

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO METALURŠKI FAKULTET

Željko M. Radovanović

**UTICAJ JONA SREBRA, BAKRA I
CINKA NA SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH
MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM-
HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-
FOSFATA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2016.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Željko M. Radovanović

**THE INFLUENCE OF SILVER, COPPER
AND ZINC IONS ON THE PROPERTIES
OF BIO-CERAMIC MATERIALS BASED
ON CALCIUM HYDROXYAPATITE AND
CALCIUM PHOSPHATE**

Doctoral Dissertation

Belgrade, 2016

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO METALURŠKI FAKULTET

Željko M. Radovanović

**UTICAJ JONA SREBRA, BAKRA I CINKA NA SVOJSTVA
BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM-
HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA**

Doktorska disertacija

Mentor:

Dr Đorđe Janačković, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

Dr Rada Petrović, redovni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Suzana Dimitrijević-Branković, vanredni profesor,
Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Dr Vesna Kojić, naučni saradnik,
Univerzitet u Novom Sadu, Medicinski fakultet, Institut za onkologiju Vojvodine,
Sremska Kamenica

U Beogradu, datum odbrane: _____

Ova doktorska disertacija je urađena na katedri za Neorgansku hemijsku tehnologiju, Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, pod mentorstvom Prof. dr Đorđa Janačkovića, kome se posebno zahvaljujem na ukazanom poverenju, korisnim sugestijama i savetima tokom eksperimentalnog rada i pisanja doktorske disertacije.

Prof. dr Radi Petrović se zahvaljujem na izuzetnoj posvećenosti, podršci i stručnoj pomoći tokom izrade ove doktorske disertacije.

Prof. dr Suzani Dimitrijević-Branković se zahvaljujem na velikoj pomoći, podršci, savetima i trudu tokom ispitivanja antibakterijskog delovanja materijala.

Dr Vesni Kojić sa Instituta za onkologiju u Sremskoj Kamenici se zahvaljujem na pomoći i savetima tokom *in vitro* ispitivanja biokompatibilnosti materijala.

Posebnu zahvalnost dugujem kolegama dr Bojanu Jokiću i dr Đorđu Veljoviću na stalnoj podršci, savetima i pomoći tokom eksperimentalnog rada.

Veliku zahvalnost dugujem i kolegama: mr Ivoni Janković-Častvan, dr Slavici Lazarević i dr Vojislavu Staniću na pruženoj pomoći i savetima.

Dr Eriksu Palcevskisu, dr Aija Krumina i dr Ilmars Zalite sa Tehničkog univerziteta u Rigi se zahvaljujem na posvećenom vremenu i angažovanju prilikom mikrotalasnog sinterovanja i XRD analiza biokeramičkih materijala.

Dr Saši Vasiljiću sa Instituta za medicinska istraživanja Vojno-medicinske akademije se zahvaljujem za uloženi trud i komentare tokom ispitivanja citotoksičnosti prahova koji su zatim korišćeni za dobijanje skafolda.

Dr Jeleni Pantić sa Instituta za nuklearne nauke „Vinča” se zahvaljujem na XRD analizama biokeramičkih materijala.

Kolegicama: Lidiji Radovanović i Kati Trifković se zahvaljujem na TGA/DSC analizama prahova, odnosno mehaničkom ispitivanju skafolda.

Doktorsku disertaciju posvećujem roditeljima i supruzi Lidiji jer bez njihove neizmerne ljubavi, podrške i pomoći ne bih mogao da završim ovo delo.

UTICAJ JONA SREBRA, BAKRA I CINKA NA SVOJSTVA BIOKERAMIČKIH MATERIJALA NA BAZI KALCIJUM- HIDROKSIAPATITA I KALCIJUM-FOSFATA

IZVOD

Kalcijum-fosfati čine neorganski deo kostiju i zuba sisara. Ova dobro poznata činjenica je ohrabrila istraživače da tokom prethodnih godina primene sintetisani kalcijum-hidroksiapatit (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) i kalcijum-fosfat (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), α - i β -TCP faze, kao implantne materijale. Njihova sličnost sa neorganskim delom kostiju je potvrđena, a posebno je istaknuta njihova biokompatibilnost i osteokonduktivnost i dodatno bioaktivnost HAp-a i bioresorpcija TCP-a. Dvofazne forme (BCP): HAp/ β -TCP i HAp/ α -TCP, kao i trifazna forma HAp/ β -TCP/ α -TCP, pokazale su se kao bolji biomaterijali nego pojedinačne faze i posebno su interesantne za dalja istraživanja.

U cilju dobijanja biomaterijala sa antimikrobnim efektom, prahovi HAp-a dopirani jonima Ag^+ , Cu^{2+} ili Zn^{2+} su sintetisani hidrotermalnom metodom pri čemu je odnos Ca/P iznosio 1,67. U sintezama moljski udeo dopanata iznosio je 0,2, odnosno 0,4 mol% sa ciljem da se dobiju prahovi sa dobrom antimikrobnom aktivnošću uz očuvanje biokompatibilnosti. Dopirani prahovi HAp-a su kalcinirani na 1200 °C tokom 2 h sa namerom da se ispita uticaj dopiranja na stvaranje dvofaznih prahova HAp/ α -TCP, kao i antimikrobna aktivnost i biokompatibilnost tako dobijenih prahova. Za analizu svih prahova, nedopiranih i dopiranih HAp i HAp/ α -TCP, korišćeni su visokorezolucioni skenirajući elektronski mikroskop (FESEM), rendgenska difrakcija (XRD), infracrvena spektroskopija sa Furijeovom transformacijom (FTIR), atomska apsorpciona spektroskopija (AAS) i energetska disperziona spektroskopija (EDS). Termička analiza sintetisanih prahova je sprovedena u cilju određivanja faznih transformacija tokom zagrevanja do 1200 °C. Antibakterijska aktivnost prahova ispitana je u *in vitro* uslovima u odnosu na mikroorganizme: *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), *Escherichia coli* (*E. coli*), *Pseudomonas aeruginosa* (*P. aeruginosa*) i *Candida albicans* (*C. albicans*). Svi prahovi su pokazali dobru antimikrobnu aktivnost, s tim da su prahovi dopiranih HAp/ α -TCP dali malo bolje rezultate u odnosu na sve patogene mikroorganizme nego dopirani HAp prahovi. *In vitro* testovi biokompatibilnosti, kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT) i test odbacivanja boje (DET), su

korišćeni da bi se procenila biokompatibilnost dopiranih HAp/ α -TCP prahova sa MRC-5 humanim fibroblastnim ćelijama. Ovi testovi su potvrdili da dati prahovi nemaju citotoksični efekat. Posebno dobru biokompatibilnost su pokazali prahovi HAp/ α -TCP dopirani nižim udelom jona Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} . Na osnovu testova antimikrobne aktivnosti i biokompatibilnosti zaključeno je da su dopirani HAp/ α -TCP prahovi obećavajući materijal za korišćenje u rekonstruktivnoj hirurgiji kostiju.

Kompakti dobijeni od sintetisanih, nedopiranog i dopiranih HAp prahova, korišćenjem unijaksijalnog a zatim i izostatskog presovanja, sinterovani su konvencionalno i mikrotalasno. Dobijeni kompakti su analizirani sledećim metodama: FTIR, FESEM, XRD i EDS. Efekat dopiranja na mehanička svojstva procesiranih HAp/TCP kompakata ispitan je poređenjem prosečne veličine zrna, poroznosti/relativne gustine i merenjem vrednosti tvrdoće i žilavosti loma. Pokazano je da dopiranje jonima Cu^{2+} uzrokuje najmanju poroznost kompakata, što kao rezultat daje najveće vrednosti tvrdoće i žilavosti loma, od 3,91 GPa i $1,46 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Kompakti dobijeni od HAp-a dopiranog jonima Ag^+ i Zn^{2+} ispoljavaju lošija mehanička svojstva usled veće poroznosti, čak i pri mikrotalasnom sinterovanju koje obezbeđuje gušće kompakte nego konvencionalno sinterovanje.

Hidrotermalnom metodom sintetisana je još jedna grupa prahova, sa početnim odnosom Ca/P od 1,50, i to: HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp. Dopiranje silicijumom je izvedeno u cilju stabilizacije TCP faza pri kalcinaciji. Sintetisani prahovi kalcinirani su na 1100 i 1150 °C, a sa ciljem dobijanja prahova pogodnih za procesiranje skafolda. Citotoksičnost prahova kalciniranih na 1150 °C procenjena je na osnovu njihovog delovanja na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) i nekrozu L929 ćelija. Pokazalo se da prah Si-HAp snižava metaboličku aktivnost, dok prah AgCuSi-HAp utiče na značajno smanjenje proliferativne aktivnosti L929 ćelija, što ukazuje na njihov potencijalni citotoksični efekat. Međutim, potvrda citotoksičnog delovanja ovih materijala nije dobijena na nivou ćelijske nekroze i nije praćena statistički značajno većom produkcijom ROS-a.

Polazni skafoldi pripremljeni su od prahova (HAp-1,50) kalciniranih na 1100 i 1150 °C tehnikom replike sunđera, nakon čega su skafoldi sinterovani na 1300 i 1400 °C. Utvrđeno je da je prečnik pora ovako procesiranih skafolda u opsegu od 100

do 500 μm i da su pore u većini slučajeva međusobno povezane i valjkastog oblika što su dobre karakteristike za interakciju skafold–koštano tkivo, odnosno proliferaciju ćelija i rast nove kosti unutar skafolda. *In vitro* ispitivanjima skafolda na bazi HAp/TCP u simuliranom telesnom fluidu dokazana je njihovu bioaktivnost. Ukupna poroznost skafolda je u opsegu od 85 do 94%, što kao posledicu daje prilično slabe mehaničke karakteristike: od 2,4 do 20,3 N maksimalne sile, od 0,05 do 0,28 MPa pritisne čvrstoće i od 0,3 do 7,0 MPa za Jungov modul elastičnosti. Antimikrobna aktivnost odabranih serija skafolda u odnosu na *E.coli* i *S.aureus* bila je u opsegu od slabe do umerene. Pretpostavka je da bi se postepenom razgradnjom skafolda i oslobađanjem dopiranih jona metala *in situ* na mestu ugradnje ostvarila zadovoljavajuća antimikrobna zaštita. Ipak, uzimajući u obzir slabe mehaničke karakteristike skafolda oni bi mogli poslužiti za stvaranje kompozitnih materijala sa biopolimerima čime bi se poboljšala mehanička svojstva a zadržale ostale dobre osobine skafolda.

Ključne reči: hidroksiapatit, dopiranje, kalcijum-fosfat, antimikrobna aktivnost, biokompatibilnost, sinterovanje, biokeramika, skafoldi, mehanička svojstva.

Naučna oblast: Hemija i hemijska tehnologija.

UDK broj: 546.57 : 537.56-034.3 : 537.56-034.5 : 666.3-1 : 661.842

THE INFLUENCE OF SILVER, COPPER AND ZINC IONS ON THE PROPERTIES OF BIOCERAMIC MATERIALS BASED ON CALCIUM HYDROXYAPATITE AND CALCIUM PHOSPHATE

ABSTRACT

Calcium phosphates constitute the inorganic part of bones and teeth of mammals. This fact is well known and has encouraged researchers to apply hydroxyapatite (HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) and tricalcium phosphate (TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), both α - and β -TCP, over the past years as implant materials. Their similarity to the inorganic part of hard tissues has been confirmed, highlighting their biocompatibility and osteoconductivity and, in addition, the bioactivity of HAp and the bioresorbability of TCP. The biphasic forms (BCP): HAp/ β -TCP and HAp/ α -TCP and the triphasic form HAp/ β -TCP/ α -TCP, which were proved to be even better biomaterial than single phases, are of particular interest.

Hydroxyapatite (HAp) powders doped with Ag^+ , Cu^{2+} or Zn^{2+} were synthesized by a hydrothermal method, at a Ca/P ratio of 1.67, in order to obtain biomaterial with an antimicrobial effect. The synthesis was performed with two contents of dopant (0.2 or 0.4 mol %) by considering both the antimicrobial activities and biocompatibility of the powders. The doped HAp was annealed at 1200 °C for 2 h with the intention of investigating the influence of doping on the creation of biphasic HAp/ α -TCP and determining the antimicrobial activity and biocompatibility of the obtained biphasic powders. Analyses of all powders, undoped and doped HAp and HAp/ α -TCP, were performed by Field emission scanning electron microscopy (FESEM), X-Ray diffraction (XRD), Atomic absorption spectroscopy (AAS) and Energy-dispersive X-Ray spectroscopy (EDS). Thermal analysis of the synthesized powders was performed to evaluate the phase transformations during heating up to 1200 °C. The *in vitro* antibacterial activities of the powders were evaluated against the pathogenic microorganisms: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* and *Candida albicans*. All powders showed good antimicrobial activity but generally the powders of doped HAp/ α -TCP demonstrated better results against all pathogenic microorganisms than the powders of doped HAp. *In vitro* biocompatibility tests, MTT and DET, were used to evaluate the biocompatibility of doped HAp/ α -TCP with MRC-5

human fibroblast cells. These tests confirmed that the powders did not have a cytotoxic effect. The HAp/ α -TCP powders doped with the lower content of Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions showed especially good biocompatibility. The antimicrobial and biocompatibility tests recommend the doped HAp/ α -TCP as promising material for use in reconstructive surgery of bones.

Green compacts were obtained from hydrothermally synthesized powders, pure and doped HAp, using cold uniaxially and subsequent isostatically pressing. The compacts were further conventionally and microwave sintered. Analyses of processed compacts were conducted by FTIR, FESEM, XRD, and EDS. The effect of doping with Ag^+ , Cu^{2+} and Zn^{2+} ions on the mechanical properties of the obtained hydroxyapatite/tricalcium phosphate compacts was determined by comparing the average grain sizes, porosity/relative density and the measured values for the hardness and fracture toughness. It was shown that doping with Cu^{2+} resulted in the lowest porosity of compacts, which gave as a result the highest values of hardness and fracture toughness, that amounted to 3.91 GPa and $1.46 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, respectively. Compacts obtained from hydroxyapatite doped with Ag^+ and Zn^{2+} exhibited worse mechanical properties due to the formation of high porosity in them even with microwave sintering, which generally gives denser compacts than conventional sintering.

Another group of powders, HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp and AgZnSi-Hap, with an initial Ca/P ratio of 1.50, was synthesized by the hydrothermal method. Doping with silicon ions was aimed at stabilizing the TCP phase during calcination. The synthesized powders were calcined at 1100 and 1150 °C in order to obtain powders suitable for scaffold processing. The cytotoxicity of the powders calcined at 1150 °C was evaluated based on their action on metabolic activity, cell proliferation, production of reactive oxygen species (ROS) and necrosis of L929 cell. The Si-HAp powder had reduced metabolic activity, while the AgCuSi-HAp powder significantly decreased the proliferative activity of L929 cells, which indicate their potential cytotoxic effect. However, confirmation of cytotoxic activity in these materials was not obtained at the level of cell necrosis and was not accompanied by significantly higher production of ROS.

Starting scaffolds were obtained by the replica foam method starting from the powders (HAp-1.50) calcined at 1100 and 1150 °C, which were further sintered at 1300

and 1400 °C. It was found that the diameters of the pores in such processed scaffolds were in the range of 100 to 500 µm and the pores were in the majority of cases interconnected, and cylindrical in shape, which are good characteristics for scaffold–bone tissue interaction, and the proliferation of cells and growth of new bone within the scaffold. *In vitro* evaluation of scaffolds based on HAp/TCP in simulated body fluid confirmed their bioactivity. The total porosity of the scaffold ranged from 85 to 94 % and in accordance with such a large porosity, the mechanical characteristics were fairly weak: from 2.4 to 20.3 N for the maximum force, from 0.05 to 0.28 MPa for the compressive strength and from 0.3 to 7.0 MPa for the Young's modulus. The antimicrobial activity of the selected series of scaffolds against *E. coli* and *S. aureus* ranged from poor to moderate. It is assumed that during the gradual degradation of the scaffolds, doped metal ions would be released *in situ* at the placement site that could achieve satisfactory antimicrobial protection. Thus, taking into account the poor mechanical properties of the scaffolds, it is thought that they could be used to create composite materials with a biopolymer, which would enhance the mechanical properties while maintaining the other good qualities of the scaffolds.

Keywords: hydroxyapatite, doping, calcium phosphate, antimicrobial activity, biocompatibility, sintering, bioceramics, scaffold, mechanical properties

Scientific field: Chemistry and chemical technology.

UDK number: 546.57 : 537.56-034.3 : 537.56-034.5 : 666.3-1 : 661.842

Sadržaj

1. Uvod.....	1
TEORIJSKI DEO	
2. Skeletni sistem – podela, uloga i svojstva.....	5
3. Biomaterijali.....	14
3.1. Preduslovi za primenu materijala kao implanata.....	14
3.2. Podela biomaterijala.....	16
3.3. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata.....	23
3.3.1. Hidroksiapatit.....	26
3.3.2. Metode dobijanja prahova hidroksiapatita.....	29
3.3.3. Tri-kalcijum fosfat (TCP).....	33
4. Dopiranje HAp i HAp/TCP jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , antimikrobna svojstva i biokompatibilnost.....	36
5. Kompakti i skafoldi.....	41
EKSPERIMENTALNI DEO	
6. Hidrotermalna sinteza prahova hidroksiapatita.....	53
7. Metode karakterizacije prahova hidroksiapatita (HAp-1,67).....	55
7.1. Rendgenska difrakciona analiza.....	55
7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	56
7.3. Energetska disperzivna spektroskopija.....	56
7.4. Infracrvena spektroskopska analiza.....	57
7.5. Ispitivanje otpuštanja jona metala.....	57
7.6. Simultana TG/DSC analiza.....	57
8. Ispitivanje antimikrobnog delovanja prahova.....	58
9. Analiza biokompatibilosti kalciniranih prahova.....	59
9.1. Čelijska linija.....	59
9.2. Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT).....	59
9.3. Test odbacivanja boje (DET).....	60
9.4. Priprema za slikanje MRC-5 ćelija.....	60
10. Kompaktiranje HAp prahova presovanjem.....	61
10.1. Unijaksijalno presovanje.....	61
10.2. Izostatsko presovanje.....	61

11. Tehnike sinterovanja za dobijanje biokeramičkih materijala.....	62
11.1. Konvencionalno sinterovanje.....	62
11.2. Mikrotalasno sinterovanje.....	62
12. Metode karakterizacije biokeramičkih materijala – kompakata.....	62
12.1. Određivanje gustine i relativnog linearnog skupljanja.....	62
12.2. Analiza mikrostrukture skenirajućom elektronskom mikroskopijom.....	63
12.3. Određivanje prosečne veličine zrna biokeramičkih materijala.....	63
12.4. Rendgenska difrakciona analiza.....	63
12.5. Određivanje mehaničkih karakteristika kompakata.....	64
12.5.1. Određivanje tvrdoće.....	64
12.5.2. Određivanje žilavosti.....	64
13. Metode karakterizacije prahova hidroksiapatita (HAp-1,50).....	65
13.1. Rendgenska difrakciona analiza.....	65
13.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija.....	65
13.3. Energetska disperzivna spektroskopija.....	65
13.4. Infracrvena spektroskopska analiza.....	66
13.5. Ispitivanje citotoksičnosti prahova kalciniranih na 1150 °C.....	66
13.5.1. Priprema kondicioniranog medijuma hidroksiapatitnih materijala..	66
13.5.2. Kultivacija ćelija.....	66
13.5.3. Merenje metaboličke aktivnosti ćelija.....	67
13.5.4. Merenje proliferacije ćelija.....	67
13.5.5. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS).....	68
13.5.6. Analiza ćelijske nekroze.....	68
13.5.6.1. Obeležavanje ćelija sa propidijum-jodidom.....	68
13.5.6.2. Merenje produkcije laktat dehidrogenaze.....	69
13.5.7. Statistička analiza.....	69
14. Dobijanje skafolda tehnikom replike poliuretanskog suđera.....	69
15. Metode karakterizacije skafolda.....	70
15.1. Rendgenska difrakciona analiza.....	70
15.2. Analiza mikrostrukture skenirajućom elektronskom mikroskopijom.....	71
15.3. Određivanje poroznosti i mehaničkih karakteristika.....	71
15.4. Ispitivanje antimikrobnog delovanja skafolda.....	71

REZULTATI I DISKUSIJA

16. Karakterizacija hidrotermalno sintetisani i kalcinisani prahovi HAp-1,67.....	73
17. Biokeramički materijali – kompakti.....	89
18. Karakterizacija hidrotermalno sintetisani i kalcinisani prahovi HAp-1,50.....	109
19. Biokeramički materijali – skafoldi.....	122
20. Zaključak.....	135
21. Literatura.....	138
22. Biografija autora.....	166
23. Izjava o autorstvu.....	167
24. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorskog rada.....	168
25. Izjava o korišćenju.....	169

1. Uvod

Tokom istorije ljudi su nastojali da fizičke nedostatke nastale usled povreda i/ili bolesti nadomeste upotrebom različitih materijala. Najveća je svakako upotreba materijala za zamenu zuba pa se koristila slonovača, zubi i kosti životinjskih vrsta, zlato, pa čak i drvo [1,2]. Poslednjih decenija dvadesetog veka intenzivirana su istraživanja na dobijanju biomaterijala koji mogu zameniti ciljne delove ljudskog tela. Ipak, veštački biomaterijali sa osobinama koje imaju prirodni materijali još nisu dobijeni. Za veliki broj implantnih materijala utvrđeno je da posle određenog perioda dobrog obavljanja funkcije za koju su i namenjeni dolazi do narušavanja njihovih osobina i neophodno ih je zameniti, dok neki implantni odmah po primeni izazivaju komplikacije jer ne pružaju adekvatnu mehaničku potporu ili izazivaju infekcijske, toksične ili alergijske reakcije [1]. Stoga je dobijanje što adekvatnijih implantnih materijala stalni napor istraživača širom sveta.

Najvažniji preduslovi za primenu implantnog materijala u odnosu na tkivo su: biokompatibilnost, mehanički kontinuitet, netoksičnost materijala ili produkata razgradnje. Postavljaju se i drugi, specifični uslovi, u zavisnosti od mesta primene datog implanta (bioaktivnost, osteokonduktivnost, biodegradacija, otpornost na infekcije itd.) [1].

Stalno povećanje ljudske populacije a posebno starije, uslovljava i veću potrebu za materijalima koji bi zamenili oštećeno koštano tkivo nastalo usled trauma ili bolesti. Autograf je svakako najbolji biomaterijal za zamenu i reparaciju koštanih defekata [3]. Kako potiče od samog pacijenta, nema bojazni da će materijal izazvati imuno reakciju. Nažalost, upotreba autografa je ograničena količinom koštane mase koja je dostupna za upotrebu, ali i potrebom za dodatnom hirurškom intervencijom što može znatno iskomplikovati izlečenje pacijenta. Zbog navedenih razloga neophodna je upotreba sintetičkih materijala [3]. Postoje brojni sintetički materijali koji se ispituju za primenu ili se već koriste, a među njima kalcijum-hidroksiapatit (HAp) se izdvaja zbog svojih bioloških karakteristika. Sintetički HAp $[\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2]$ je veoma sličan neorganskom delu kostiju i dentina zuba. HAp je poznat kao materijal dobre biokompatibilnosti i bioaktivnosti, netoksičan je u bilo kojoj količini i osteokonduktivan. Bioaktivnost HAp-a stimuliše, a osteokonduktivnost ubrzava

regeneraciju koštanog tkiva. HAp se koristi u obliku: praha, pasti, kompakta, skafolda (čvrstih oblika sa definisanom makroporoznošću), kao kompozit sa raznim vrstama polimera i kao prevlaka za metalne implante [3,4]. Nedostaci HAp-a su male vrednosti Jungovog modula elastičnosti i žilavosti loma, pa je po prirodi krt. Takođe, spora razgradnja HAp-a ograničava njegovu upotrebu [2].

Zagrevanjem nestehiometrijskog, kalcijum-deficitarnog HAp-a na temperaturama oko 800 °C dobija se β -trikalcijum-fosfat (β -TCP), a zagrevanjem na temperaturama višim od ~1125 °C dobija se α -trikalcijum-fosfat (α -TCP) [5]. Ove visokotemperaturne faze, β -TCP i α -TCP, takođe su biomaterijali dobrih svojstava i reaktivnije su od HAp-a, pa time imaju i bolje resorbabilne i osteokonduktivne osobine. Sa stanovišta upotrebe kao implantnog materijala naročito su interesantne bifazne forme HAp/ β -TCP i HAp/ α -TCP, kao i trifazna forma HAp/ β -TCP/ α -TCP (HAp/TCP) [6]. α -TCP ima veću rastvorljivost u vodenim rastvorima od β -TCP, a naročito od HAp-a [5,7]. Rastvaranjem α -TCP povećava se koncentracija Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona na međupovršini dodira implant–kost, čime se olakšava stvaranje nove kosti i povezivanje implanta sa neoštećenom kosti domaćina [8]. Izborom odgovarajućeg odnosa HAp/TCP u ovom dvofaznom sistemu moguće je kontrolisati brzinu razgradnje implanta i prilagoditi je potrebama, tj. brzini formiranja nove kosti na mestu ugradnje [2].

Veliki problem pri implantaciji predstavljaju i moguće infekcije kao posledica delovanja raznih mikroorganizama [9–13]. Upotreba antibiotika oralno pre implantacije i/ili na samom mestu implantiranja često ne daje dovoljnu zaštitu od infekcija, a dugoročno može da ima i jako negativne posledice. Naime, veoma je teško odrediti pravu/dovoljnu dozu antibiotika kao i pravi antibiotik za delovanje protiv prisutnih patogenih mikroorganizama, jer se ne može predvideti koje bakterije mogu izazvati infekciju. Ukoliko dođe do greške, lako se stvaraju rezistentni sojevi bakterija koje je naknadno teško ukloniti i sanirati njihovo delovanje [14–16]. Upotreba jona metala u malim količinama, kao što su Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , za suzbijanje mikroorganizama znatno je delotvornija jer dati joni imaju širok spektar dejstva prema bakterijskim kulturama [17–19]. Stoga se korišćenjem prahova HAp i HAp/TCP dopiranih jonima navedenih metala mogu dalje procesirati implant koji su istovremeno biokompatibilni i imaju odgovarajuće antimikrobno delovanje na mestu implantiranja za suzbijanje eventualnih infekcija.

Dopiranje jonima metala utiče i na sinterabilnost prahova kalcijum-hidroksiapatita, kao i na odnos faza/faznu transformaciju u kalcijum-hidroksiapatitnoj/kalcijum-fosfatnoj biokeramici. Ovaj uticaj odražava se na fizičko-hemijska svojstva kompakata i skafolda dobijenih od dopiranih prahova na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata. S tim u vezi, a kako bi se dobio pogodan odnos HAp/TCP faza u prahovima, primenjuje se i dopiranje jonima Si^{4+} .

Glavni cilj istraživanja u oblasti biomaterijala je dobiti implante koji bi u potpunosti oponašali koštano tkivo na različitim mestima ugradnje u koštanom sistemu, kako po biološkim tako i po mehaničkim osobinama.

Naučni ciljevi istraživanja u okviru ove doktorske disertacije su:

- Ispitivanje uticaja dopiranja hidrotermalno sintetisanog HAp-a jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} u malom procentu na antimikrobnu aktivnost, biokompatibilnost i bioaktivnosti.
- Ispitivanje antimikrobnog delovanja Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} dopiranih prahova HAp i HAp/TCP u odnosu na više vrsta patogenih mikroorganizama.
- Ispitivanje uticaja dopiranja jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} na biokompatibilnost prahova HAp/TCP, sprovođenjem odgovarajućih testova biokompatibilnosti u *in vitro* uslovima u kontaktu sa MRC-5 humanim fibroblastnim ćelijama i L929 fibroblastnim ćelijama miševa.
- Proučavanje uticaja dopiranja na karakteristike HAp/TCP kompakata dobijenih konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem.
- Ispitivanje uticaja dopirajućih jona na fazni sastav, strukturne, morfološke i mehaničke karakteristika skafolda na bazi dopiranog HAp/TCP.

TEORIJSKI DEO

2. Skeletni sistem – podela, uloga i svojstva

Radi boljeg razumevanja mesta implantacije i uloge koju bi trebalo da obavljaju biomaterijali za zamenu i reparaciju kostiju, u ovom poglavlju predstavljena je uloga i osobine skeletnog sistema i struktura kostiju čoveka.

Koštano tkivo je visokospecijalizovano vezivno tkivo sastavljeno od ćelija i vanćelijskog matriksa. Specifična prostorna organizacija vanćelijske matrice koja pored kolagena sadrži i visok procenat neorganske faze, pretežno hidroksiapatita, daje ovom tkivu veliku tvrdoću i čvrstinu.

Skeletni sistem odrasle ljudske jedinke sastoji se od 206 kostiju [20–22]. Prema obliku kosti se dele na četiri glavne kategorije:

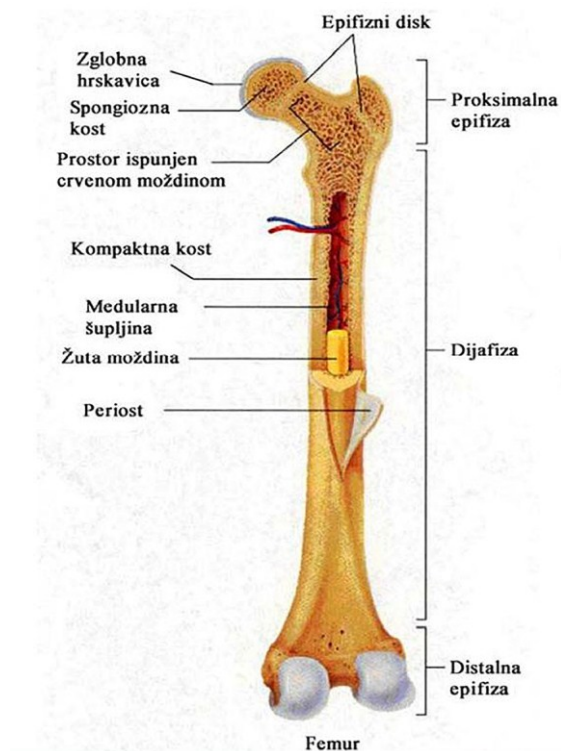
1. **duge kosti** (ramena kost, žbica i lakatna kost, butna kost, golenjača i lišnjača),
2. **kratke kosti** (kosti šake, stopala),
3. **pljosnate kosti** (kosti lobanje, karlične i grudne kosti) i
4. **kosti nepravilnog oblika** (kosti lica i kičmeni pršljenovi).

Neke podele kao kategorije prepoznaju još i **pneumatične kosti** koje u strukturi poseduju šupljine ispunjenje vazduhom, kao što je mastoidni nastavak slepočne kosti i **sezamoidne kosti**, koje se razvijaju u predelu zglobova i u vezi su sa tetivama mišića.

Uloga kostiju u telu je višestruka. Pre svega, kosti daju čvrstinu celom telu i mehaničku potporu mišićima i tetivama čime je omogućeno kretanje. Kostii štite strukturu i značajne organe kranijalnog (kosti glave) i torokalnog (grudni koš) dela od povreda i poremećaja. Unutrašnjost kostiju sastoji se od koštane srži koja obezbeđuje odvijanje hematopoetskog procesa tokom koga se obrazuju elementi krvi, a u kosti se takođe skladište i različiti joni, kao npr. Ca^{2+} , PO_4^{3-} , Mg^{3+} , Si^{4+} itd., koji se po potrebi otpuštaju i koriste u metaboličkim aktivnostima za održavanje mineralne homeostaze i kiselo-bazne ravnoteže. Kostii služe i kao rezervoari faktora rasta i citokina, proteina male molekulske mase, neophodnih za pravilno funkcionisanje imunog sistema [23,24]. Takođe, kao specifični delovi skeletnog sistema izdvajaju se zubi koji služe za ishranu i kosti srednjega uha, jedine kostii koje ne menjaju svoju veličinu tokom života, koje učestvuju u transmisiji zvuka.

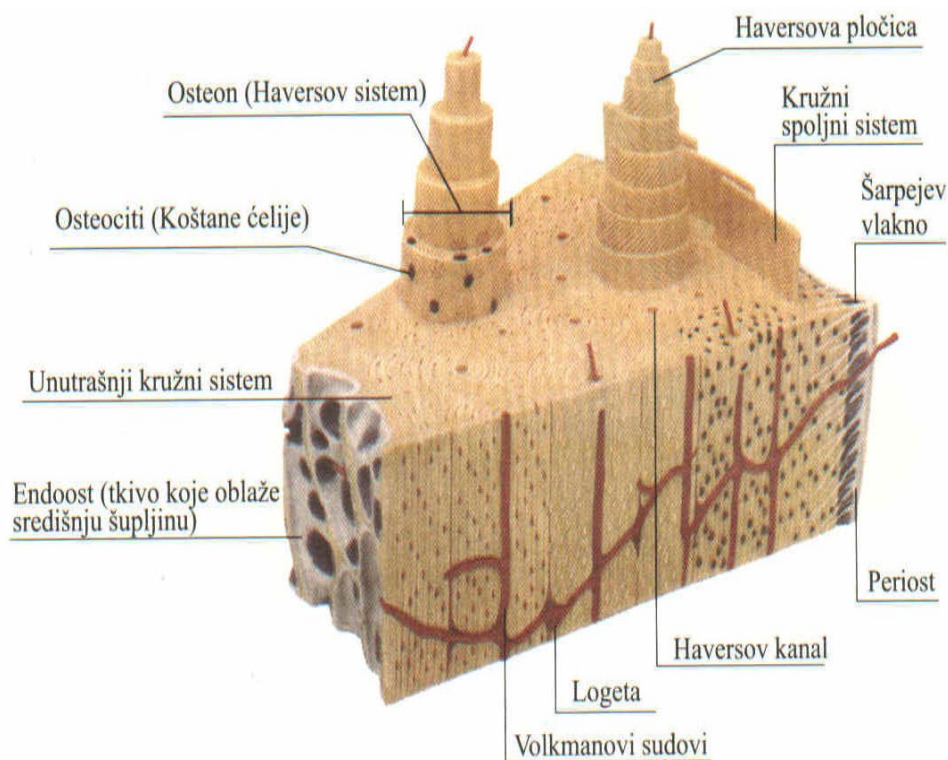
Po strukturi, kosti se dele na kompaktne ili kortikalne kosti koje imaju veliku mehaničku čvrstoću usled guste strukture i na trabekularne ili spongiozne porozne (sunderaste) kosti [25,26]. Skelet odraslog čoveka se sastoji od oko 80% kortikalne kosti i 20% trabekularne kosti [27,28]. Po masenom sastavu, kosti se sastoje od oko 75% neorganske faze i oko 25% organske faze. Neorgansku fazu kostiju pretežno čini hidroksiapatit (60%), voda (9%), karbonati (4%) i joni koji se javljaju u tragovima kao npr.: Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} itd. (2,7%). Organska faza kostiju sastoji se prvenstveno od kolagena tipa I (20%), nekolagenskih proteina (3%), organskih jedinjenja u tragovima (npr. lipidi, polisaharidi) i primarnih ćelija kosti [28,29]. Iako sačinjavaju manje od 3% mase kostiju, primarne ćelije čine kost živim tkivom i omogućavanju njen rast i stalno prilagođavanje kroz procese razgradnje i izgradnje izazvane unutrašnjim signalima i uticajem spoljnih sila. Faktori rasta i citokini prisutni su u malim količinama a njihova uloga se ispoljava u diferencijaciji, aktivaciji i proliferaciji koštanih ćelija i obnavljanju koštanog tkiva. Ukupni udeo neorganskih i organskih faza varira u malom procentu od kosti do kosti, zavisno od njihovog oblika, položaja i uloge u telu [29].

Na primeru butne kosti (femur) biće prikazana unutrašnja struktura dugih kostiju (slika 1). Butna kost je najduža kost u ljudskom telu i sastoji se iz tri dela: na krajevima su proksimalna i distalna **epifiza**, a središnji deo, valjkastog i izduženog oblika je **dijafiza**. Diafiza je sa epofizama povezana pomoću **metafize**. **Pokosnica (periost, lat. periosteum)** je vezivna opna koja prekriva spoljašnju površinu kosti izuzev zglobnih površina koje prekriva zglobna hrskavica i predela pripoja tetiva i ligamenata [30,31]. Sastoji se od spoljašnjeg fibroznog i unutrašnjeg osteogenog sloja.



Slika 1. Unutrašnja struktura butne kosti [5].

Spoljašnji sloj se sastoji od gustog vlaknastog tkiva, a unutrašnji sloj je rastresitije građe, više vaskularizovan i sadrži progenitorske ćelije koje se diferenciraju u osteoblaste, ćelije sposobne da stvaraju koštano tkivo. Upravo delovanjem ovih ćelija kost raste u širinu (debljinu) tokom perioda okoštavanja pa je pokosnica razvijenija kod dece, a u slučaju preloma osteoblastne ćelije učestvuju u procesu zarastanja i stvaranja kalusa [30,31]. Treba napomenuti da jedine kosti skeletnog sistema koje nemaju pokosnicu su sezamoidne kosti. Dalje prema unutrašnjosti kosti nalazi se kompaktno (kortikalno) koštano tkivo na koje se nastavlja sunderasto (kancelozno) koštano tkivo. Od pokosnice u kompaktno koštano tkivo prostiru se snopovi kolagenih vlakana koji se nazivaju Šarpejeva vlakna (slika 2) a smer njihovog prostiranja je određen mehaničkim momentima. Ovim vlaknima pokosnica je čvrsto vezana za kost [30,31].

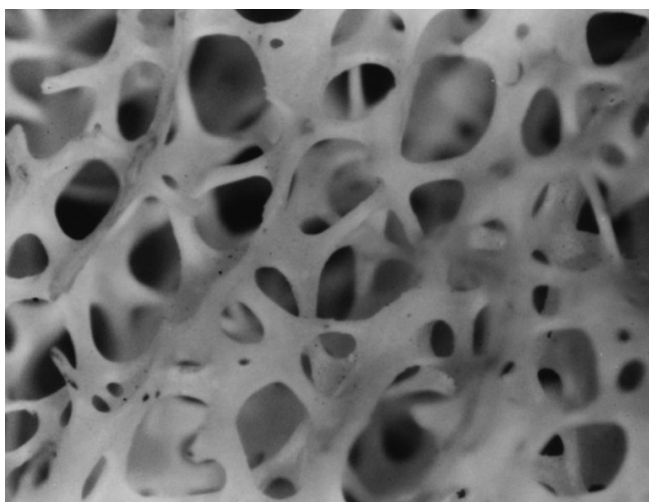


Slika 2. Uvećan detalj strukture duge kosti [51].

Kompaktno tkivo predstavlja čvrsto kontinualno tkivo sastavljeno od mnoštva lamelarnih, cilindričnih jedinica koji se nazivaju **osteoni** (Haversov sistem) i vidljivi su tek pomoću mikroskopa (slika 2). Koncentrične lamele osteona građene su od kolagenih vlakana koja su raspoređena paralelno i spiralno okružuju središte osteona, Haversov kanal, kroz koga prolaze krvni i limfni sudovi i nervi [33,34]. Između lamela u

lakunama, malenim džepovima, smestene su koštane ćelije osteociti međusobno povezane međućelijskim vezama. Kroz kompaktnu kost pružaju se i Volkmanovi kanali sa krvnim sudovima poprečno na Haversove kanale koje povezuju [33,34].

Sunderasto tkivo kosti se sastoji od tankih pločastih, klinastih ili štapićastih **trabekula** koje izgrađuju trodimenzionalnu šupljikavu strukturu sposobnu da se suprostavi delovanju spoljnih sila na datu kost (slika 3). Šupljine čine 75% zapremine sunderastog tkiva i ispunjene su koštanom srži (medulla ossium) ili drugim mekim tkivom. Zbog ovakve građe, više neorganske materije nalazi se u kompaktnoj nego u sunderastoj kosti.



Slika 3. Građa sunderastog tkiva unutrašnjosti kosti [35].

Kompaktno tkivo kosti je deblje, a sunderasto znatno tanje na području dijafize, dok je na području epifiza i metafiza situacija obrnuta (slika 1). Središnji, uzdužni deo diafize čini moždinska šupljina (medulla) u kojoj je smeštena crvena koštana srž tokom perioda rasta, a kasnije u odraslom dobu žuta koštana srž (masno tkivo). Dakle, zidove moždinske šupljine čini sunderasto koštano tkivo, a ono je obloženo tankom vaskularnom membranom koja se naziva **endosteum** [36,37]. Endosteum je veoma sličan periosteumu, tj. pokosnici. Tokom perioda normalnog rasta, širina kosti na području dijafize se povećava obrazovanjem novog tkiva kosti delovanjem osteoblastnih ćelija iz periosteuma. Da bi se sprečilo prekomerno debljanje kosti, osteoklasne ćelije resorbuju koštano tkivo sa strane endosteuma [37]. Time se ujedno, tokom procesa rasta, i dalje širi moždinska šupljina. Površina endosteuma se obično resorbuje znatno brže tokom perioda nedovoljne ishrane uzrokujući nepovoljno

smanjenje debljine kosti. Moždinska šupljina je područje unutar bilo koje kosti (duge, ravne, itd.) koje sadrži koštanu srž [38].

Pločaste kosti sastoje se od tankog omotača kompakte kosti, a unutrašnjost je ispunjena sunderastim koštanim tkivom [25,26].

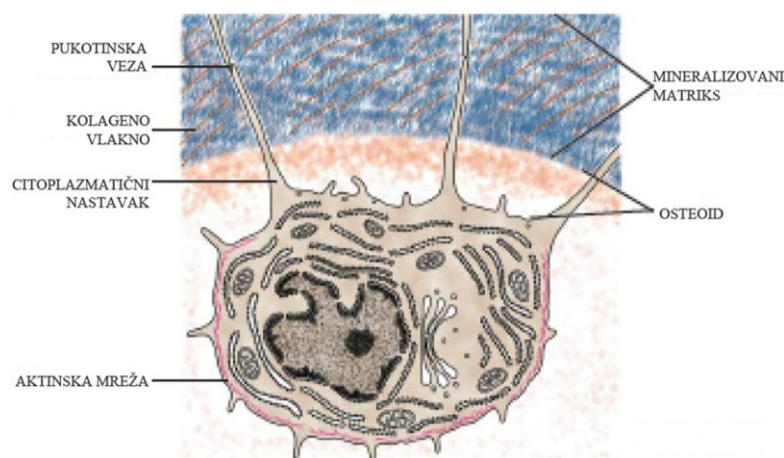
Kosti su veoma dinamičko tkivo podvrgnuto procesima stalne razgradnje i izgradnje koji omogućavaju da se skelet neprestano prilagođava promenjivim zahtevima tela, kako tokom rasta i razvoja organizma, tako i posle zbog raznih mikronaprslina u kostima. Pri rođenju koštano tkivo čini nezrela **primarna** ili **fibrozna kost**, kod koje je vanćelijski matriks nepravilnog izgleda jer su kolagena vlakna isprepletana. Ovo koštano tkivo se brže stvara i obnavlja a sadrži i četiri puta više osteocita nego zrela **sekundarna** ili **lamelarna kost** koja ga zamenjuje tokom 4. i 5. godine detetovog života. Mineralni matriks lamelarne kosti sastoji se iz koštanih listića, lamela, sa kolagenim vlaknima raspoređenim u paralelne snopove i takva organizacija vlakana daje najveći otpor dejstvu spoljnih sila na kost. Lamelarna kost izgrađuje i **kompaktno** i **sunderasto** tkivo, dok se fibrozna kost pojavljuje i u odraslom dobu tokom zarastanja preloma ili u patološkim stanjima koja stimulišu stvaranje koštanog tkiva [30].

Kolagena vlakna predstavljaju osnovu za mineralizaciju koja najverovatnije započinje na mestima šupljina između molekula. Neorganski deo matriksa čine kristali HAp-a u kojima su joni Ca^{2+} supstituisani velikim brojem katjona u tragovima (K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Na^+ , Fe^{2+} , Zn^{2+} itd.), a fosfatni joni su delimično supstituisani karbonatnim jonima i u manjoj meri OH^- -joni F^- jonima [25,39]. Ovako velike supstitucije u molekulima HAp-a koštanog tkiva posledica su činjenice da je ovakav HAp po tipu kalcijum-deficitaran. Kristali su u obliku iglica i listića dužine 30–50 nm, širine 15–30 nm i debljine 2–10 nm [40]. Dimenzije HAp kristala se razlikuju po mestu u skeletu gde se stvaraju, pa tako postoji razlika među kristalima cementa, dentina i gleđi zuba [41]. Sama gleđ, najtvrdja komponenta ljudskog skeleta, poseduje najduže kristale HAp-a od 5–6 μm . Kristali su obavijeni hidratisanom ljuskom kroz koju se vrši razmena jona sa okolnim kolagenim vlaknima sa kojima su povezani. Ovako kompozitno uređena struktura kosti, sastavljena od kristala HAp-a i vlakana kolagena daje najbolja mehanička svojstva od oba materijala, čvrstinu HAp-a i žilavost kolagena [42].

Kosti rastu sve do kraja puberteta, a posle se prilagođavaju spoljnim uticajima. Stalni fizički napori kod fizičkih radnika i sportista oblikuju i jačaju mišiće, a da bi ti mišići mogli pravilno da funkcionišu i kosti moraju da se prilagode i ojačaju. Takođe, različite sportske discipline zavisno od potrebe forsiraju različit razvoj tela, pa tako i skeletnog sistema. Ovo stalno prilagođavanje kostiju moguće je zbog toga što je kost, iako pretežno sadrži neorganske komponente, živo tkivo. Primarne ćelije kosti svojim delovanjem preobražavaju i održavaju kost tokom čitavog života. Postoje dve osnovne populacije ćelija u koštanom tkivu: ćelije koje stvaraju i održavaju koštani matriks – **osteoblasti** i **osteociti** i ćelije koje vrše resorpciju koštanog matriksa i time započinju proces remodelovanja koštanog tkiva – **osteoklasti** [43]. Pored ovih ćelija, u unutrašnjem sloju periosteuma i endosteuma i u Haversovim kanalima postoje i progenitorske ćelije koje potiču od mezenhimske matične ćelije i mogu da se diferenciraju u osteoblaste [43].

Osteoblastne ćelije (slika 4) učestvuju u sintezi svih organskih komponenti koštanog matriksa. Nalaze se na koštanim površinama koje prekrivaju u grupama i međusobno su povezane neksusima, vezama za međućelijsku komunikaciju, koje propuštaju male molekule iz jedne ćelije u drugu [30].

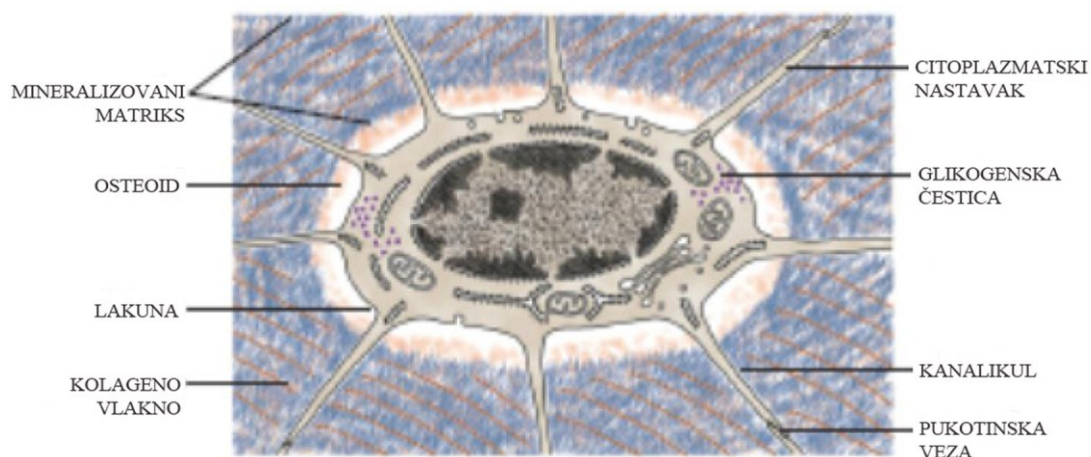
Sveže izlučen organski matriks, koji se naziva **osteoid** nalazi se uz osteoblaste i svetlije je boje u odnosu na mineralizovani matriks koji je dalje od osteoblasta (slika 4). Sinteza osteoida traje oko 10–15 dana pre nego što on počne da mineralizuje. Tokom procesa mineralizacije, soli kalcijuma deponuju se u osteoid, a osteoblastne ćelije su uvek odvojene od mineralizovanog matriksa tankim slojem nemineralizovanog matriksa [30,42,43].



Slika 4. Izgled osteoblastne ćelije i okoline [44].

Primarna mineralizacija traje nekoliko dana i u ukupnoj mineralizaciji učestvuje sa oko 70%, a zatim mineralizaciju dovršava sekundarna mineralizacija koja se odvija nekoliko sledećih meseci [42,45]. Izlučivajući osteoid ćelije osteoblasta se udaljavaju jedne od drugih stalno ostajući povezane citoplazmatičnim produžecima i neksusima i naposljetku ostaju okružene matriksom sa svih strana. Osteoblastne ćelije se tada transformišu u osteocite [46]. Proces mineralizacije povezan je i sa kolagenim vlaknima, i na mestima međumolekulskih džepova javljaju se prvi kristali HAP-a čiji se broj vremenom povećava i oni oblažu kolagena vlakna ispunjavajući i prostor između vlakana [30]. Pretpostavka je da na ovaj proces deluju određeni nekolageni proteini, koji se vežu za kolagenska vlakna upravo na mestima međumolekulskih džepova omogućavajući precipitaciju Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona i time stvaranje kristala [30,42].

Osteoblastne ćelije, koje su na površini osteoida, po dobijenom signalu prekidaju lučenje matriksa i prelaze u stanje mirovanja te se tada smanjuju i nazivaju koštane oblažuće ćelije ili površinski osteociti. Ove ćelije po potrebi mogu biti ponovo aktivirane i onda nastavljaju sa stvaranjem koštanog matriksa, a takođe mogu biti i uklonjene ciljanim procesom ćelijske smrti, apoptozom [47]. Osteoblasti na ćelijskoj membrani poseduju receptore za hormon paratiroidne žlezde, parathormon (PTH), koji kada se poveže onemogućava sintezu alkalne fosfataze i stimuliše oslobađanje faktora koji podstiču aktivnost osteoklasta.



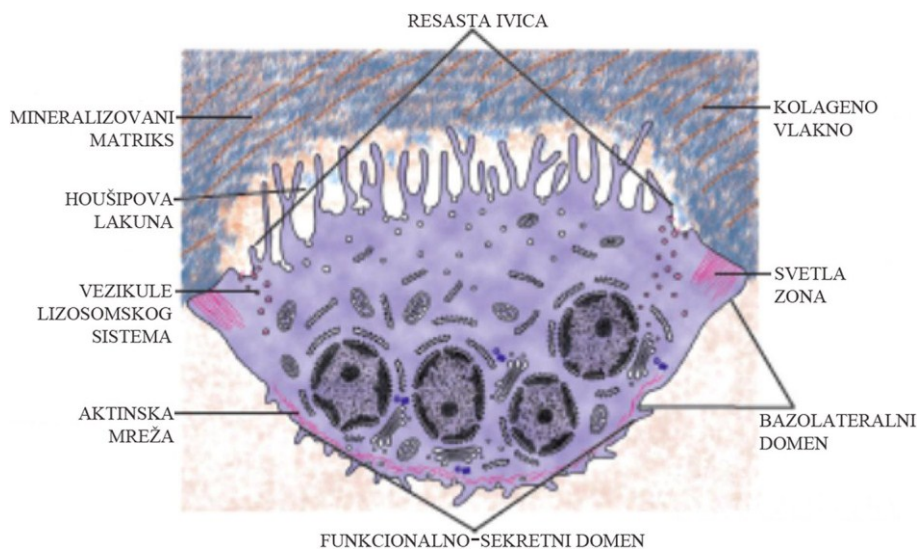
Slika 5. Izgled osteocitne ćelije i okoline [44].

Osteocite (slika 5) su zrele koštane ćelije i najbrojnije su ćelije u kostima. U mineralizovanom matriksu su pravilno raspoređene po malim šupljinama koje se nazivaju **lakune**. Međusobno su povezane citoplazmatičnim produžecima i neksusima

koje prolaze tankim koštanim kanalićima preko kojih ćelije dobijaju neophodne hranjive materije i gasove iz kapilara Haversovih kanala [48].

Pretpostavlja se da ovakva dobra povezanost osteocita omogućava njihovu ulogu senzora za detekciju potrebe za proizvodnjom ili razgradnjom koštanog matriksa prilikom funkcionalnog prilagođavanja skeleta ili potrebe za reparaciju matriksa zbog nastalih mikroostećenja. Ova funkcija ih čini jako značajnim za održavanje vijabilnosti koštanog tkiva, iako su znatno manje aktivni u odnosu na osteoblaste [48].

Osteoklasne ćelije (slika 6) nastaju spajanjem mononukleusnih progenitora (unipotentne stem ćelije) monocitno-makrofagne ćelijske porodice [30]. Osteoklasne ćelije razgrađuju koštani matriks i sa osteoblastima oblikuju skelet i regulišu ukupnu masu kosti. To su krupne ćelije veličine oko 150 μm koje sadrže od 2 do 50 jedara i prilično su pokretljive [30].

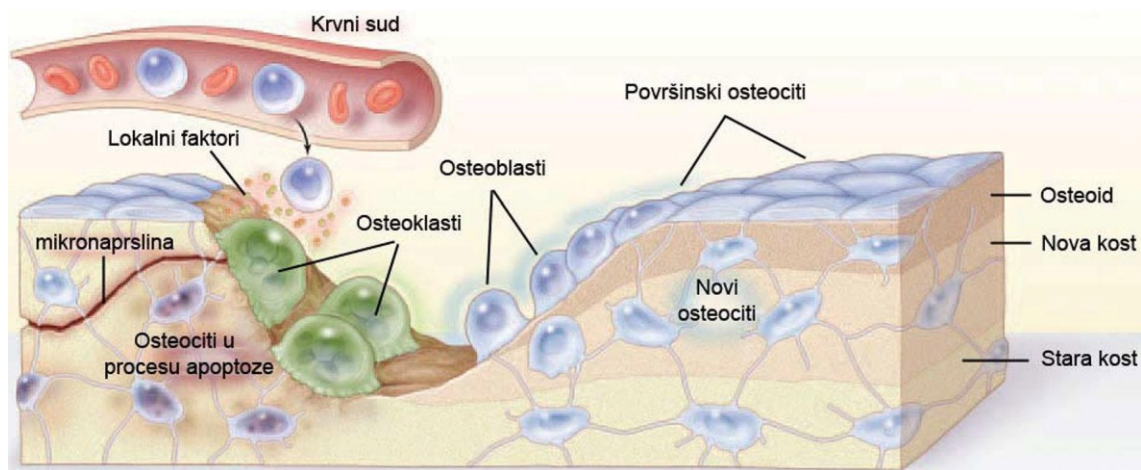


Slika 6. Izgled osteoklasne ćelije i okoline [44].

U aktivnom stanju priljubljuju se uz koštanu površinu pomoću integrinskih molekula. Citoplazma u zoni resorpcije sadrži brojne mikrofilamente (aktinske filamente) koji stvaraju gustu vlaknastu strukturu u vidu prstena. Kako aktinski filamenti nemaju organele ova oblast se naziva svetla zona [30]. Deo plazma membrane okružen prstenom se uvećava ugrađivanjem membranskih vezikula pa ima naboran izgled. Vezikule služe za ugrađivanje protonskih pumpi u membranu (vaskularne H-adenosin-trifosfataza (H-ATP-aza)), koje acidifikacijom resorpcione površine vrše njenu demineralizaciju. Zatim se izlučuju brojni hidrolitički enzimi (lizosomske proteaze) a pre svega katepsin K koji razgrađuje kolagena vlakna tj. organski deo matriksa pri

pH < 7. Razgrađujući kost, osteoklastna ćelija pravi udubljenje koje se naziva resorpciona lakuna ili Haušipova lakuna. Po prestanku resorpcije osteoklast se odvaja od koštanog matriksa i ide na novo mesto koje treba resorbovati ili biva apoptozom (ćelijska smrt) uklonjen [30]. Pretpostavlja se da visoka koncentracija Ca^{2+} -jona zaustavlja resorpciju i vodi ka odvajanju osteoklasta sa datog mesta. Takođe, estrogen i bifosfonati imaju inhibitorno dejstvo na razgradnju koštanog matriksa indukujući apoptozu osteoklasta. Deaktivaciju osteoklasta vrši kalciton, hormon parafolikularne ćelije tiroidne žlezde [30].

Čitav ciklus popravke koštanog tkiva trabekularne kosti, oštećenog mikroprrslinom, prikazan je na slici 7. Mikroprrslina prekida veze između osteocitnih ćelija izazivajući njihovu smrt. Površinski osteociti i osteociti bliže mikroprrslini ispuštaju proteine (lokalni faktori) koji signaliziraju lokaciju i veličinu štete [49]. Ovi lokalni faktori privlače osteoklastne ćelije iz krvi i koštane srži i one se aktiviraju na datom mestu i vrše razgradnju oštećenog tkiva. Osteoklastne ćelije prati veći broj osteoblastnih ćelija koje formiraju osteoid od koga kasnije nastaje novo koštano tkivo. Osteoblastne ćelije koje ostanu zarobljene u novom koštanom tkivu transformišu se u nove osteocitne ćelije a osteoblastne ćelije koje ostaju na površini postaju nove površinske, oblažuće ćelije [50].



Slika 7. Proces popravke trabekularne kosti [50].

3. Biomaterijali

Materijali koji se koriste za obnavljanje ili popravku celog ili dela tkiva, odnosno organa nazivaju se biomaterijalima. Definicije biomaterijala izvedene su na osnovu očekivanja kakvu ulogu dati materijali treba da odigraju. Na konferenciji Nacionalnog instituta zdravlja (NIH) Sjedinjenih Američkih Država, biomaterijal je definisan kao bilo koja supstanca, različita od leka, ili kombinacija supstanci, veštačkog ili prirodnog porekla, koja se može koristiti za bilo koji period vremena, u celini ili kao deo sistema kojim se tretira, uvećava, ili zamenjuje bilo koje tkivo, organ, ili funkcija tela [51,52]. Evropsko društvo za biomaterijale je 1986. godine znatno uprostilo definiciju biomaterijala kao neživog materijala korišćenog u medicinskim sredstvima namenjenim da budu u kontaktu sa biološkim sistemima [51,52]. Nauka o biomaterijalima obuhvata elemente medicine, biologije, hemije, inženjerstva tkiva i nauke o materijalima. Iz prethodnog je jasno da se radi o jako složenoj i osetljivoj oblasti kojoj je cilj da pažljivo dizajnira materijal kako bi odgovorio brojnim, opštim i specifičnim, uslovima koji moraju biti ispunjeni da bi se dati materijal mogao upotrebiti kao biomaterijal [1,53].

3.1. Preduslovi za primenu materijala kao implanata

Materijal mora prvenstveno da oponaša prirodno tkivo ili organ po sastavu i strukturi iz kojih proizilaze slične osobine i uloga koju bi obavljao u telu. Pitanje **biokompatibilnosti** neophodno je u potpunosti ispitati pre nego se materijal nađe na tržištu i započne njegova primena u kliničkom okruženju. Zbog toga se biomaterijali moraju pažljivo analizirati i odgovoriti brojnim zahtevima u procedurama koje su slične ispitivanju novih lekova [53,54]. Biokompatibilnost podrazumeva i da implantni materijal ne nanosi nikakvu štetu okolnom tkivu ili organima, tj. da bude **netoksičan**, da **nije kancerogen**, da ne izaziva alergije ni upalne procese. Sve prethodno treba da se dokaže u testovima biokompatibilnosti, kako za sam materijal, tako i za produkte razgradnje ako je materijal degradabilan. Takođe, biokompatibilan implant bi trebalo da lako ostvari vezu sa odgovarajućim tkivom domaćina. Treba napomenuti da biokompatibilnost materijala zavisi od mesta primene. Tako npr. materijali koji su

biokompatibilni za popravku ili zamenu kosti ne moraju biti biokompatibilni u slučaju kad je potrebna primena na mestima direktnog kontakta sa krvlju [55]. Važno je i da implant pruži **mehanički kontinuitet** na mestu ugradnje, jer se time ne stvaraju smicajni naponi na međupovršini implant–tkivo domaćina. Uslov za iste mehaničke osobine posebno se odnosi na ugradnju implanta u skeletni sistem pri reparaciji nekog njegovog dela da se ne bi narušila potporna i zaštitna funkcija istog. Sa mehaničkim kontinuitetom zadovoljava se i uslov **biofunktionalnosti** koji podrazumeva da materijal obavlja predviđenu funkciju tokom određenog vremenskog perioda. Primena biomaterijala na posebnim mestima u ljudskom organizmu povlači i specifične uslove koji se moraju ispuniti, pa je tako **bioaktivnost** jako značajna za npr. ubrzanje oporavka kostiju (osteokonduktivnost), regeneraciju pokidanog nerva itd. **Biodegradacija** je uslov primene u slučajevima kada dati biomaterijal posle obavljene funkcije i prestanka potrebe za njim treba da se samorazgradi i na prirodan način ukloni iz tela. Ta osobina je značajna za hirurški konac, implante u rekonstruktivnoj hirurgiji [56], nosače lekova, nosače ćelija za regeneraciju oštećenih ili obolelih organa i slične primene. **Otpornost na infekcije** traži se od onih biomaterijala koji se ugrađuju na mesta potencijalno mogućeg prodora bakterija u organizam. Kateteri i dovodi koji napajaju veštačko srce krvlju po svojoj funkciji su naprave koje prodiru kroz kožu i zbog toga je potrebno da se u njih inkorporiraju antimikrobna sredstva kao što su joni metala i/ili antibiotici. U poslednje vreme zbog infekcija koje se dešavaju pri ugradnji implanata u telo čoveka, nameće se zahtev da implant mora imati neku vrstu antimikrobne zaštite. **Propustljivost** je funkcionalna osobina raznih membrana koje se koriste u vantelesnim uređajima koji su u vezi sa telom pacijenta ili su sastavni deo veštačkih organa. **Poroznost** je svojstvo materijala koje je veoma važno u slučaju primene koštanih implanata zbog urastanja tkiva kosti u biomaterijal i vaskularizaciju unutar implanta. **Trombootpornost** je zahtevana osobina biomaterijala za koje je predviđeno da budu u kontaktu sa krvlju kao što su srčani zalisci, veštačke arterije, pa i veštačko srce kao organ u celini. Ovaj zahtev se ispunjava pravilnim dizajnom površine implanta putem obrazovanja bioaktivnih slojeva. **Sterilizabilnost** je zahtev da se biomaterijal, pre upotrebe kao implant, može lako sterilisati i time ukloniti sve moguće uzročnike infekcija. Pri postupku sterilizacije biomaterijal ne sme da menja svoje fizičko-hemijske i biološke osobine. Injektibilni koštani materijali (npr. cementi) moraju imati **vreme vezivanja** koje traje dovoljno

dugo da se dati materijal može primeniti pre očvršćavanja. Takvi materijali moraju posedovati i odgovarajuću **viskoznost** koja omogućuje lako oblikovanje unutar zahtevanih dimenzija pri primeni. Takođe, **temperaturni efekat** pri vezivanju cementa ne sme da bude veliki da ne bi došlo do odumiranja okolnog tkiva. Pored svih navedenih fizičko-hemijskih, mehaničkih i bioloških osobina koje materijali moraju zadovoljiti da bi se primenili kao biomaterijali na specifičnim mestima primene i **cena biomaterijala** utiče na biranje konkretnog materijala za primene [4,57,58].

3.2. Podela biomaterijala

Velika potreba za biomaterijalima uslovlila je intenzivan razvoj ove oblasti u poslednje dve decenije. Poslednjih decenija prošloga veka broj biomaterijala koji su se mogli primeniti bio je relativno mali i prvenstveno su se odnosili na reparaciju skeletnog sistema dok je danas izbor materijal znatno raznovrsniji. Biomaterijali se koriste: za popravku ili zamenu kuka i skoro svih vrsta kostiju, za zamenu ligamenata i tetiva, za popravku ili zamenu zuba i kao implantati za fiksaciju zuba, za zamenu srčanih zalistaka; krvnih sudova; tkiva kože, kao implantati u estetskoj hirurgiji, za kontaktna sočiva, kao nosioci lekova za kontrolisano otpuštanje, za zamenu nerva itd.

Podela biomaterijala može da se izvede na osnovu nekoliko kriterijuma, pa se tako biomaterijali dele prema poreklu, vrsti materijala od koga su sačinjeni, interakciji sa živim tkivom, mestu primene, vremenu trajanja itd [55].

Na osnovu mesta primene biomaterijali se dele na: ortopedske, stomatološke, oftamološke, kardiovaskularne, dermatološke i druge [55].

Glavna podela biomaterijala je na prirodne i veštačke. **Prirodni materijali** mogu biti: autologi, homolog i heterologi [49,59].

Autologi (endogeni materijal – „iz tela“ pacijenta) su biološki materijali iz istog organizma koji se koriste za transplantaciju. Predstavljaju “zlatni standard” i svakako su najbolji mogući biomaterijal koji se može koristiti kao implant. **Autograftovi** su autologi biomaterijali koji se primenjuju za transplantaciju kostiju i zuba. Ovi materijali su osteogeni, osteoinduktivni, netoksični i ne izazivaju imunsku reakciju s obzirom da potiču iz istog organizma. Sadrže osteogenetske ćelije koje diferenciraju i ubrzavaju formiranje koštanog tkiva, osteokonduktivnu koštanu matricu i osteoinduktivne faktore koji

pružaju podršku za koštani rast. Telo pacijenta obično dobro prihvati autografitni materijal i brzo dolazi do srastanja sa tkivom kosti koja okružuje implant [49,59–61]. Nedostaci upotrebe autografa su potreba za drugom hirurškom intervencijom radi prikupljanja koštanog tkiva za transplantaciju, a i sama količina dostupnog autografa je mala i u slučaju veličih koštanih oštećenja nedovoljna [62,63]. Takođe, mesto odakle se prikuplja autografitni materijal može da pretrpi znatna oštećenja a moguća je i pojava infekcije [64–69]. Ovi nedostaci povećavaju troškove operacije i vreme oporavka pacijenata koji mogu biti izloženi dugotrajnom postoperativnom bolu.

Homologi (egzogeni materijal – „van tela“ pacijenta) su biološki materijali iz drugog organizma iste vrste. **Alograftovi** su homologi biomaterijali, tj. koštano tkivo druge osobe koje se najčešće koriste u obliku liofilizovanih kostiju. Nisu osteoinduktivni kao autograftovi, ali su sa njima uporedivi po pitanju ostekonduktivnosti. Upotreba alograftova nosi rizik od izazivanja imune reakcije i prenošenja bolesti, a moguće je i odbacivanje koštanog tkiva donora [49].

Heterologi (egzogeni materijal) su biološki materijali iz organizma druge vrste. Pri njihovoj primeni postoji opasnost od autoimune reakcije. **Ksenograftovi** su heterologi materijali koji se dobijaju od kosti govečeta, svinja ili tretiranjem korala a primenjuju se u obliku kolagena, želatina i deprotonizovane kosti. Njihova mana je da imaju nepredvidljivu strukturu i malu mehaničku čvrstoću [49,58].

Veštački biomaterijali ili **aloplastični** su sintetisani materijali neživog porekla. Prema **vrsti materijala** od koga se sastoje dele se na: metale, polimere, keramiku i kompozitne materijale koji nastaju kombinovanjem prethodnih (najčešće keramike i polimera). U tabeli 1 prikazane su prednosti i nedostaci veštačkih materijala kao i primeri njihove upotrebe kao implantnih materijala [49].

Metalni biomaterijali kao što su legure titana, nerđajući čelici i kobalt–hrom legure odlikuju se biološkom inertnošću, dobrim mehaničkim karakteristikama i otpornošću na koroziju [52,70]. Legure titana: Ti–6Al–4V i Ti–13Nb–13Zr imaju najpovoljniji odnos čvrstoće prema gustini u odnosu na ostale metalne materijale i njihova površina se pasivizira sa TiO₂ koji im daje veliku otpornost na koroziju (Tabela 2.). Nepovoljnosti legura titana su: teže oblikovanje, niska otpornost na habanje i smicajna čvrstoća [57]. Generalno, metalni biomaterijali, zbog svoje jačine i čvrstoće čine se idealnim kao implantni za supstituciju kosti jer umnogome prevazilaze mehaničke

osobine kosti pa po tome izgleda da bi dobro obavljali potpurnu i zaštitnu funkciju kao deo skeletnog sistema.

Tabela 1. Prednosti i nedostaci veštačkih materijala za implantaciju [52,71].

Materijal	Prednosti	Nedostaci	Primeri upotrebe
Polimeri	Elastičnost, lako se oblikuju, mala gustina	Slabe mehaničke karakteristike, deformišu se tokom vremena, mogu da degradiraju, često nisu bioaktivni	Konci za ušivanje, krvni sudovi, umetak kuka, zamena delova uha i nosa i ostalih mekih tkiva
Metali	Čvrstoća, žilavost, otporni na habanje, laki za oblikovanje	Mogu da korodiraju u fiziološkom okruženju, velika gustina, često nisu bioaktivni, ne degradiraju	Koreni implant za zub, zamena butne kosti, pločice i zavrtnji za kosti,
Keramika	Biokompatibilni ili inertni, otporni na habanje, otporni na koroziju	Krti, neelastični, mala zatezna čvrstoća, teško se oblikuju, mala žilavost	Zamena zuba i kosti, zamena kuka, oblaganje dentalnih i ortopetskih implanata od metala
Kompoziti	Čvrstoća, oblikovanje po meri	Teško se prave	Implanti za zamenu kostiju, srčani zalisci

Međutim, ta razlika u mehaničkim osobinama narušava mehanički kontinuitet koji bi implant trebalo da zadovolji. Loša strana upotrebe metalnih implanata leži u činjenici da imaju dosta veći Jungov modul elastičnosti od prirodne kosti (tabela 2). Posledica navedenog je da pri kontaktu metalnog implanta i kosti, implant prenosi spoljnja mehanička opterećenja na tkivo kosti, što dovodi do smanjenja gustine kosti u blizini metalnog implanta [57]. U tabeli 2 prikazane su odabrane mehaničke osobine važnih predstavnika metalnih biomaterijala i poređenje sa mehaničkim osobinama kompaktne kosti.

Tabela 2. Važne mehaničke osobine predstavnika metalnih biomaterijala [57]

Materijal	Jungov modul elastičnosti, E (GPa)	Granica elastičnosti, σ_y (MPa)	Zatezna čvrstoća, σ_{uts} (MPa)	Zamor materijala, σ_{end} (MPa)
Nerđajući čelik	190	221–1213	586–1351	241–820
Kobalt-hrom (Co-Cr) legure	210–253	448–1606	655–1896	207–950
Titan (Ti)	110	485	760	300
Ti-6Al-4V	116	896–1034	965–1103	620
Kompaktna kost	15–30	30–70	70–150	

Metalni implantati se najčešće koriste u ortopediji na mestima u telu koja su izložena velikom opterećenju (load-bearing implants) kao što su implantati kuka ili kolena. U obliku klinova, zavrtnja i pločica koriste se na mestima gde je potrebno učvršćivanje fraktura kostiju, a mogu biti i delovi veštačkih zalistaka i vaskularnih stentova [57].

Mnogi **polimeri** se koriste kao biomaterijali jer se odlikuju biokompatibilnošću, lako se oblikuju, male su mase, imaju mogućnost površinske izmene, dobre mehaničke osobine i oni polimeri koji se razgrađuju daju netoksične proizvode [72,73]. Dve su glavne podele polimera: na biodegradabilne i nedegradabilne i na prirodne i sintetičke. Prednost sintetičkih polimera je što se pravilnom kontrolom procesa proizvodnje izbegava pojava nečistoća u materijalu pa nisu toksični, ne izazivaju infekcije niti imuni odgovor organizma. Takođe, sinteza polimera može da se prilagodi potrebama i da se dobiju materijali zahtevanih osobina u pogledu čvrstoće, elastičnosti, brzine razgradnje itd. Glavni predstavnici ove grupe materijala su: proteini, polisaharidi, poliesti, hidrogelovi, poliamidi, polilaktidi, poliglikoidi itd. Najčešće se koriste biodegradabilni polimeri od kojih se prave nosači lekova, konci za ušivanje, skafoldi za fiksaciju koštanih fraktura itd [72,73].

Keramički biomaterijali su složena jedinjenja i čvrsti rastvori koji sadrže elemente metala i nemetala, spojene jonskim i kovalentnim hemijskim vezama u kristalnoj ili amorfnoj formi [1,52]. Tabela 1 prikazuje prednosti i nedostatke keramičkih materijala za korišćenje kao implantnih materijala. Dakle, keramički biomaterijali mogu biti i biokompatibilni i inertni u odnosu na tkiva kostiju i mišića, a svi su hemijski i biološki inertni u odnosu na telesne tečnosti. Visoka tvrdoća i otpornost na habanje i koroziju poželjne su osobine za implantne materijale, ali sa druge strane ovi materijali nisu elastični, imaju nisku zateznu čvrstoću i žilavost, tj. krti su i samim tim nisu podložni većim deformacijama. Takođe, nepovoljna osobina je i što se ovi materijali teško oblikuju [52].

Razlike u načinu ostvarivanja veze sa okolnim koštanim tkivom dele keramičke materijale u četiri osnovne grupe što je prikazano u tabeli 3.

Tabela 3. Podela keramičkih materijala prema načinu vezivanja sa koštanim tkivom [4].

Tip	Način vezivanja	Glavni predstavnici
1. Gusta inertna keramika	Mehaničko vezivanje (morfološka fiksacija)	Al_2O_3 , ZrO_2 , pirolitički ugljenik
2. Porozna inertna keramika	Urastranje tkiva unutar pora (biološka fiksacija)	Porozna Al_2O_3 , HAp prevlaka na poroznom metalu
3. Bioaktivna keramika, gusta neporozna	Hemijsko vezivanje sa koštanim tkivom na graničnoj površini (bioaktivna fiksacija)	HAp, bioaktivno staklo, bioaktivna staklo-keramika
4. Bioresorbilna keramika, gusta, neporozna ili porozna	Implant se vremenom zamenjuje novim tkivom	Kalcijum-sulfat, kalcijum-fosfat

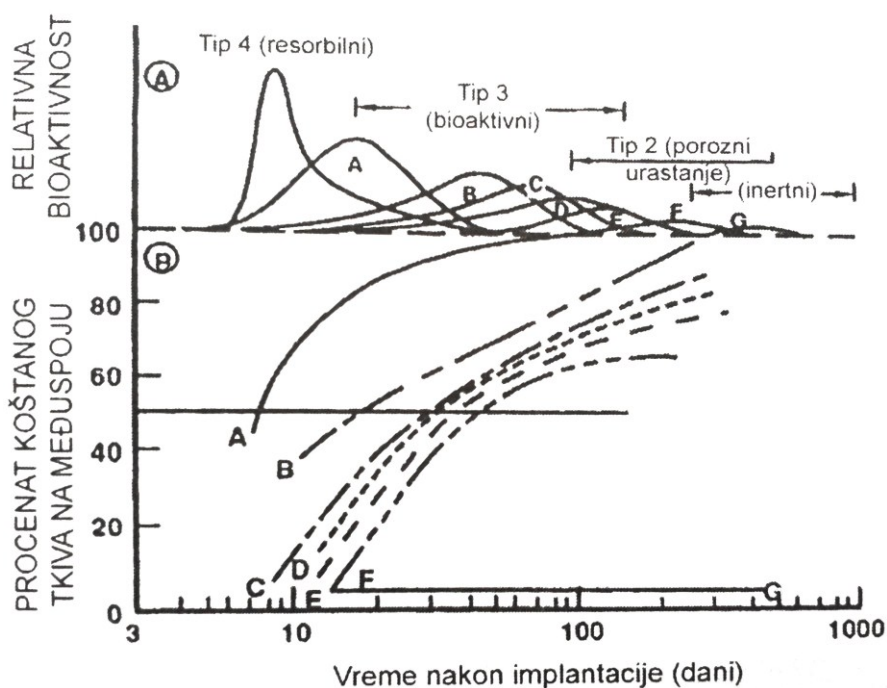
Treba napomenuti, da bioinertni materijali (bili oni keramika, metali ili polimeri) zadržavaju svoj oblik posle implantacije u telu i ne izazivaju imunološku reakciju. Ovi materijali ne stvaraju nikakvu drugu vezu sa okolnim koštanim tkivom osim mehaničke, a često dolazi do zaštitne reakcije organizma i obrazovanja neprijanjajućeg fibroznog omotača oko takvog implanta što dalje vodi inkapsulaciji i potpunom izolovanju implanta što je nepovoljno i sa mehaničke strane.

Tabela 3 ukazuje da način vezivanja keramičkog implanta sa koštanim tkivom zavisi kako od relativne reaktivnosti i poroznosti implanta, tako i od odgovora živog tkiva na implant. Neki od faktora uzajamnog uticaja implant–živo tkivo koji određuju jačinu međusobne veze navedeni su u tabeli 4.

Tabela 4. Faktori uzajamnog uticaja implant–koštano tkivo [1].

Sa strane tkiva	Sa strane implanta
Vrsta tkiva	Hemijski sastav implanta
Zdravlje tkiva	Faze prisutne u implantu
Starost tkiva	Faze prisutne na granici
Prokrvljenost tkiva	Morfologija površine
Pokretanje površine	Hemijske reakcije
Mehaničko opterećenje	Mehaničko opterećenje

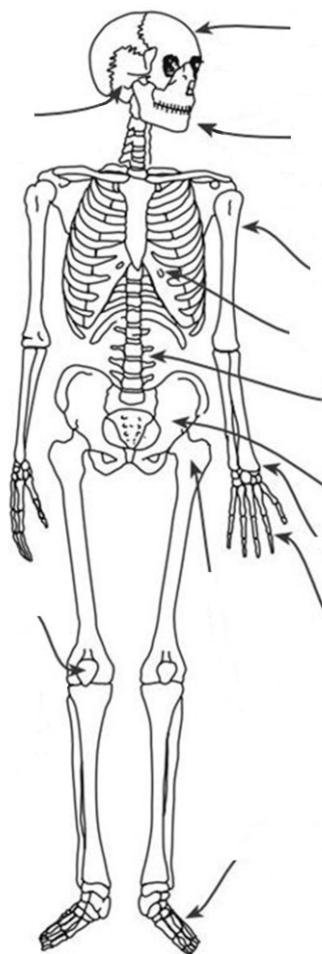
Kojom će se brzinom ostvariti veza na međuspoju implant–koštano tkivo zavisi od bioaktivnosti (hemijske aktivnosti) biokeramičkog materijala. Na slici 8 prikazano je poređenje relativnih reaktivnosti različitih vrsta biokeramičkih materijala i kako ta reaktivnost utiče na brzinu formiranja veze implant–koštano tkivo.



Slika 8. Poređenje bioaktivnosti različitih biokeramičkih implanata: (a) relativna brzina bioaktivnosti (u odnosu na tip 4, resorbne implante) i (b) vremenska zavisnost formiranja veze implant–koštano tkivo ((A) 45S5 Bioglass[®], (B) KGS Ceravital[®], (C) 55S4,3 Bioglass[®], (D) Apatit-volastonit staklo-keramika, (E) HAp, (F) KGX Ceravital[®] i (G) $Al_2O_3-Si_3N_4$) [4].

Poredeći tabelu 3 i sliku 8 jasno je da implantni materijal veće bioaktivnosti ostvaruje bržu vezu sa tkivom kosti i novo koštano tkivo na međuspoju se brže stvara.

Biokeramika se koristi prvenstveno za popravku i zamenu oštećenih delova skeletnog sistema i zuba, kao na primer za zamenu koštanih segmenata i zglobova; kao privremeni implanti za reparaciju koštano tkiva (skafoldi); za izradu krunica i proteza (slika 9). Zavisno od datih potreba, keramički materijali mogu biti u obliku praha, granula, paste, gustih (kompakti) i poroznih blokova (skafoldi) [2]. Česta je i upotreba biokeramičkih materijala kao prevlaka na implantima drugih materijala, pretežno metalima (slika 10), čime se obezbeđuje biokompatibilnost i bolji spoj takvih implanata sa tkivom domaćina.



Slika 9. Mesta moguće upotrebe biokeramičkih koštanih implanata [52].

U tabeli 5 predstavljene su značajne fizičke osobine glavnih predstavnika metala, polimera i keramičkih materijala a u tabeli 6 na jednostavan način su prikazane prednosti i slabosti glavnih grupa biomaterijala po pitanju toksičnosti i imunološke sigurnosti, mehaničkih osobina, bioaktivnosti i degradacije. Ova tabela pokazuje zašto je dobro koristiti veštački stvorenu biokeramiku u odnosu na ostale vrste biomaterijala. Mehaničke osobine su jedina oblast u kojoj keramički materijali pokazuju slabe rezultate i zbog toga je veliki broj istraživanja fokusiran na prevazilaženje ovih nedostataka.

Tabela 5. Značajne fizičke osobine pojedinih veštačkih biomaterijala [52].

Materijal	Gustina (g·cm ⁻³)	Zatezna čvrstoća (MPa)	Pritisna čvrstoća (GPa)	Jungov modul elastičnosti, <i>E</i> (GPa)	<i>K_{1c}</i> (MPa·m ^{1/2})	Tvrdoća (Knoop) x 10 ²	Površinska energija loma (J·m ⁻²)	Poissonov odnos
HAp	3,16	40–300	0,3–0,9	80–120	0,6–1,0	4–4,5	2,3–20	0,28
TCP	3,14	40–120	0,45–0,65	90–120	1,20		6,3–8,1	
Biostaklo	1,8–2,9	20–350	0,8–0,12	40–140	–2	40–50	14–50	0,21–0,24
A-W staklo keramika	3,07	215	1,08	118	2			
SiO ₂	2,2	70–120		–70	0,7–0,8	70–75	3,5–4,6	0,17
Al ₂ O ₃	3,85– 3,99	270–500	3,0–5,0	380–410	3–6	150–200	7,6–30	0,27
Si ₃ N ₄	3,18	600–850	0,5–2,5	300–320	3,5–8,0	~220	20–100	0,27
SiC	3,10– 3,21	250–600	~0,65	350–450	3–6	~270	22–40	0,24
Grafit	1,5–2,25	5,6–25	0,035– 0,08	3,5–12	1,9–3,5		~500	0,3
PMMA	1,2	60–70	–0,08	3,5	1,5	1,6	300–400	
Ti	4,52	345	0,25–0,6	117	60	18–26	–15000	0,31
Ti/Al/V legura	4,4	780–1050	0,45–1,85	110	40–70	32–36	–10000	0,34
Ti/Al/Nb/Ta legura	4,4–4,8	840–1010		105	50–80		–17000	0,32
Co/Cr/Mn legura	7,8–8,2	400–1030	0,48–0,6	230	120–160	30	–5000	0,30
Fe/Cr/Ni legura	7,8–8,2	540–4000	1,0–0,40	200	55–95	12–90	~50000	0,20–0,33

A-W - apatite-wollastonite
PMMA - Poly(methyl methacrylate)

Tabela 6. Opšte poređenje biomaterijala [74].

	Prenos bolesti, toksičnost, imunologija	Mehaničke osobine	Bioaktivnost	Degradacija
Autograft	+	+	+	+
Allograft	–	+	±	±
Metali	±	+	–	–
Keramika	+	–	+	+
Polimeri	±	±	±	±

Simboli +, ± i – predstavljaju: odličnu, srednju ili slabu sposobnost materijala u datoj oblasti, redom.

3.3. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata

Kalcijum-fosfatni biomaterijali se zbog svoje sličnosti sa neorganskom fazom kosti, netoksičnosti i biokompatibilnosti često primenjuju za reparaciju i zamenu koštanog tkiva. Prva sistematska ispitivanja kalcijum-fosfatnih jedinjenja preduzeta su početkom dvadesetog veka [5].

Mogućnosti upotrebe ovih materijala kao koštanih implanta prvi put su ispitivane 1920. godine [75]. Sledeće studije o dobijanju kalcijum-fosfatnih materijala i mogućem korišćenju u medicini obavljene su pedeset godina kasnije [76,77]. Upravo

Upravo na osnovu datih osobina, među kalcijum-fosfatima za potrebe reparacije i zamene koštanog tkiva izdvajaju se HAp, odnosno CDHAp i α -TCP i β -TCP.

Kalcijum-fosfati sa odnosom $\text{Ca/P} \leq 1,0$ nisu pogodni materijali za implante zbog velike rastvorljivosti i kiselosti, a tetrakalcijum-fosfat nije pogodan jer je previše bazan. Nepovoljnost HAp-a predstavlja njegova slaba resorbilnost i krtost, dok sa druge strane TCP biomaterijali imaju slabije mehaničke osobine nego HAp. Da bi se iskoristile najbolje osobine oba materijala, ispitivani su materijali dobijeni mešanjem HAp-a i TCP, pretežno β -TCP [8,85–97].

Tabela 7. Vrste i najvažnija svojstva kalcijum-fosfata [3].

Ca/P, molski odnos	Jedinjenje	Formula	Rastvorljivost na 25 °C, – log(Ks)	Rastvorljivost na 25 °C, g/l	Opseg vrednosti pH stabilnosti u vodenom rastvoru na 25 °C
0,5	MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	~18	0,0–2,0
0,5	MCPA	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	~17	Stabilan iznad 100 °C
1,0	DCPD	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	~0,088	2,0–6,0
1,0	DCPA	CaHPO_4	6,90	~0,048	Stabilan iznad 100 °C
1,33	OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	~0,0081	5,5–7,0
1,5	α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	~0,0025	[a]
1,5	β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~0,0005	[a]
1,2–2,2	ACP	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3\text{--}4,5$; 15–20% H_2O	[b]	[b]	~5–12, metastabilan
1,5–1,67	CDHAp	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$ ($0 < x < 1$)	~85	~0,0094	6,5–9,5
1,67	HAp	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	116,8	~0,0003	9,5–12
1,67	FA	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{F}$	120,0	~0,0002	7–12
1,67	OA	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	~69	~0,087	[a]
2,0	TTCP	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38–44	~0,0007	[a]

^[a] Jedinjenja se ne mogu dobiti precipitacijom iz vodenih rastvora

^[b] Ne može se precizno izmeriti. Ipak, određene su sledeće vrednosti: 25,7±0,1 (pH = 7,40), 32,7±0,1 (pH = 5,28). Komparativni stepen rastvaranja u kiselom puferu: ACP >> α -TCP >> β -TCP > CDHA >> HAp > FA

Pošto je predmet rada ove doktorske disertacije HAp i HAp/TCP materijali, u sledećim poglavljima će pobliže biti predstavljene osobine, načini dobijanja, mogućnosti poboljšanja, oblikovanja i primene ovih materijala.

3.3.1. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAp) pripada velikoj grupi jedinjenja slične strukture koji se nazivaju apatiti, opšte formule $M_{10}(AO_4)_6B_2$ gdje M mogu biti joni: Ca^{2+} , Mg^{2+} , Sr^{2+} , Ba^{2+} , Fe^{2+} , Cd^{2+} , Pb^{2+} , Al^{3+} , Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , a AO_4 mogu biti: PO_4^{3-} , VO_4^{3-} , SiO_4^{4-} , AsO_4^{3-} , CO_3^{2-} dok je B: OH^- , F^- , Cl^- ili CO_3^{2-} .

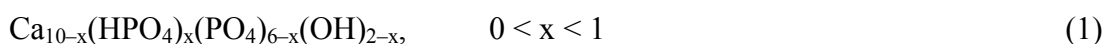
Molekulska formula HAp-a je $Ca_5(PO_4)_3OH$ ali se obično predstavlja formulom $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ da bi se ukazalo na činjenicu da se jedinična kristalna ćelija sastoji od dva molekula. Ime po IUPAC je pentakalcijum–hidroksid–tris(ortofosfat). Veoma je sličan neorganskom delu kosti i dentina zuba. HAp je poznat kao materijal dobre biokompatibilnosti i bioaktivnosti, netoksičan je u bilo kojoj količini i osteokonduktivan. Zbog navedenih osobina koristi se već decenijama za zamenu oštećenog koštanog tkiva i dentina zuba. Posle fluoroapatita (FA), stehiometrijski HAp (Ca/P = 1,67) je najstabilniji i najmanje rastvorljiv od svih kalcijum-ortofosfata, pa se duži vremenski period i kao implant ne degradira [3,98–101]. Bioaktivnost HAp-a stimuliše, a osteokonduktivnost ubrzava regeneraciju koštanog tkiva. U svojstvu implanta HAp se koristi u obliku: praha, paste, kompakta, skafolda (čvrstih oblika sa definisanom makroporoznošću), kao kompozit sa raznim vrstama polimera i kao prevlaka za metalne implante [3]. Pored upotrebe kao implantnog materijala za zamenu i/ili reparaciju kostiju, HAp se koristi i kao katalizator u različitim reakcijama [102–105], za uklanjanje neželjenih elemenata iz tla i tečnosti [106–109] i kao nosač za antibiotike [110–118].

Postoje tri modifikacije kalcijum-hidroksiapatita:

- ◆ stehiometrijski hidroksiapatit (HAp),
- ◆ kalcijum-deficitarni hidroksiapatit (CDHAp) i
- ◆ oksihidroksiapatit (OHAp).

Stehiometrijski hidroksiapatit sa odnosom Ca/P = 1,67 predstavlja se formulom $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$. U slučaju kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita, molski odnos Ca/P je manji od 1,67. Dobija se sintezama HAp-a pri nedovoljnoj količini kalcijuma za stehiometrijski odnos i/ili usled prisustva malih količina karbonata pa dolazi do zamene fosfatnih tetraedarskih grupa karbonatnim grupama koje su planarne strukture. Pri ovim zamenama grupa, da bi se kompenzovalo naelektrisanje, O^{2-} joni iz fosfatnih tetraedarskih grupa se izmenjuju sa OH^- jonima tako da se ukupno PO_4^{3-} joni zamenjuju

sa $[\text{CO}_3\text{OH}]^{3-}$ jonima. Ova modifikacija kalcijum-hidroksiapatita je po odnosu Ca/P i stepenu kristaliničnosti najbližnja biološkom hidroksiapatitu koji u koštanom tkivu čini neorgansku fazu [119]. CDHAp se može dobiti i hidrolizom α -TCP-a [120–122]. U slučaju kada je nedovoljna količina kalcijuma u sintezi, a bez supstitucije karbonatnim grupama, CDHAp se može predstaviti formulom (1) [5]:



Nesupstituisani CDHAp ne postoji u biološkim sistemima, već takozvani biološki apatit kod koga su joni Ca^{2+} delimično supstituisani jonima Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} (pojedinačno ili zajedno u različitim odnosima), joni PO_4^{3-} ili HPO_4^{2-} delimično zamenjeni CO_3^{2-} -jonima, dok OH^- -jone delimično menjaju F^- , Cl^- i CO_3^{2-} -joni [5,99,101,123].

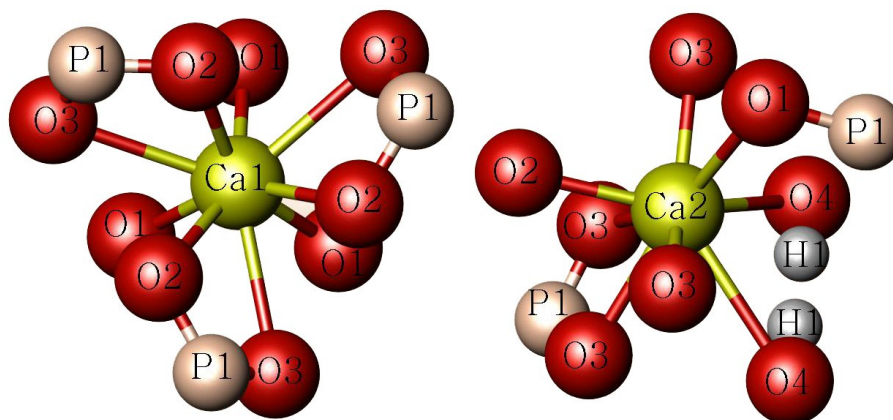
HAp i CDHAp imaju jako slične difraktograme i FTIR spektre, s tim da su CDHAp kristali nižeg stepena kristaliničnosti i imaju veću površinu [124]. Rastvorljivost CDHAp je veća od rastvorljivosti HAp-a. Sa smanjenjem Ca/P odnosa, kristaliničnosti i veličine kristalita, rastvorljivost se povećava što se objašnjava sve većom nesavršenošću strukture CDHAp-a [125]. Osim upotrebe kao biomaterijala, CDHAp se koristi kao nosač lekova [126], a nađeno je da poseduje i katalitičke sposobnost za proizvodnju biodizela [127]. U literaturi se često i stehiometrijski hidroksiapatit i kalcijum-deficitarni hidroksiapatit predstavljaju skraćenicama HAp, Hap ili Ha, a ovde će se nadalje obeležavati kao HAp.

Oksihidroksiapatit predstavlja se formulom $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_{2-2x}\text{O}_x$ []_x gde se hidroksilni joni zamenjuju kiseoničnim jonima, uz pojavu anjonskih šupljina.

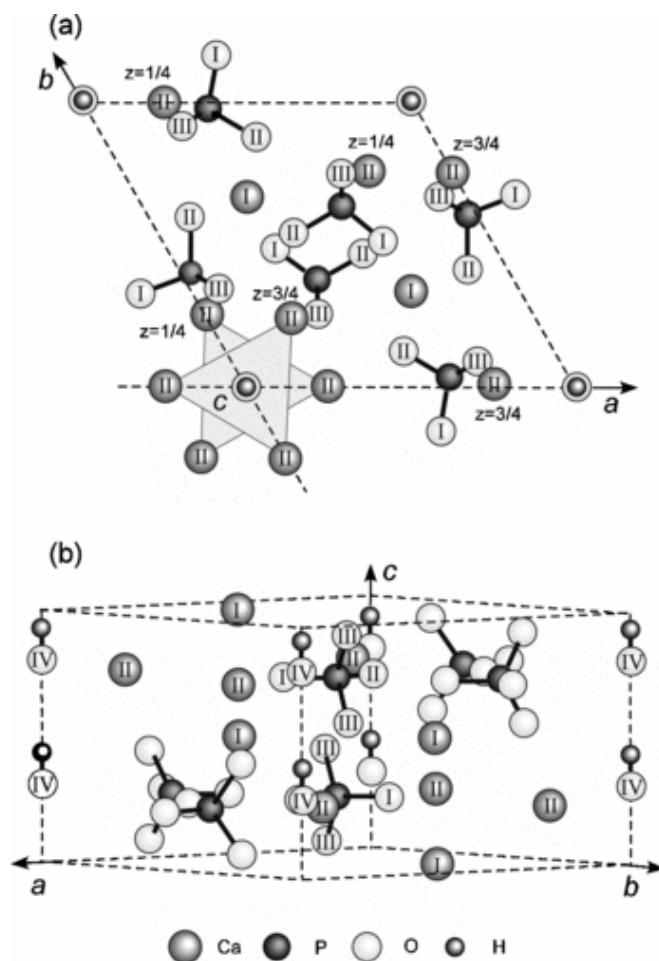
Hemijski čist HAp je monoklinične prostorne grupe $P2_1/b$ [128] ali na temperaturama iznad 250 °C dolazi do fazne transformacije u heksagonalnu prostornu grupu $P63/m$ [119,129–131]. Za razliku od monokliničnog, u heksagonalnom prostornom rasporedu su OH^- -joni pomereni u svakome redu naviše ili naniže. Da bi se kompenzovala data naprezanja dolazi do supstitucija različitim jonima ili stvaranja jonskih vakansija pa je heksagonalni HAp retko stehiometrijski. Poznato je da neke primese, kao npr. zamena OH^- -jona F^- ili Cl^- -jonom, stabilizuju heksagonalnu strukturu HAp-a na sobnoj temperaturi [132].

Parametri jedinične ćelije heksagonalnog HAp-a su $a = b = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$. Jedinična ćelija sadrži 44 atoma, među kojima su 2 kristalografski različita Ca-atoma, Ca(I) i Ca(II) (slika 11). Ca(I)-atomi okruženi su sa 9 O-atoma (po tri O-atoma na pozicijama (I), (II) i (III)), pri čemu su dužine Ca(I)-O veza 0,241, 0,245 i/ili 0,281 nm, redom [129,133]. Ovi Ca-atomi pakuju se u strukturi jedan iznad drugog u koloni duž c -ose. Ca(II)-atomi povezani su sa 8 O-atoma (jednim O(I), jednim O(II), četiri O(III) i dva atoma O(IV)), na rastojanjima od 0,236, 0,239 i/ili 0,251 nm, redom [116, 120]. Ca(II)-atomi u strukturi se pakuju cik-cak jedan u odnosu na drugi duž c -ose, obrazući trouglove čiji su rogljevi pomereni za 60° u svakoj novoj ravni, na visini $z = \frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$ jedinične ćelije (slika 12). Iako su veze Ca(I)-O relativno duže od Ca(II)-O veza, broj veza sa kiseoničnim atomima, devet u odnosu na osam, ukazuju da je na poziciji Ca(II) olakšana zamena Ca-atoma zbog većeg međuatomskog prostora. Takođe, i odnos broja mesta Ca(II) u odnosu na Ca(I) je 3:2 pa je i statistički veća verovatnoća zamene. Istraživanja su pokazala da sa većom koncentracijom dopanta, supstitucija jona Ca^{2+} na poziciji Ca(II) je energetski favorizovana, što je pokazano supstitucijama jonima Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} i Cd^{2+} . Ipak, neki istraživači tvrde da se sa manjom koncentracijom dopanta, u većoj meri supstituiše Ca-atoma u poziciji Ca(I) [133–136]. Supstitucija atoma Ca(I) je nepovoljnija i zbog načina pakovanja samih atoma, pravolinijski nasuprot cik-cak kod Ca(II)-atoma (slika 12).

U kristalnoj rešetki HAp-a postoje četiri kristalografski različita O-atoma (O(I)-O(IV)), jedan P-atom i jedan H-atom duž c -ose (slika 12). P-atomi formiraju tetraedre sa atomima O(I), O(II) i dva atoma O(III) i ovi tetraedri su povezani preko Ca(I) i Ca(II) duž c -ose [137].



Slika 11. Okruženje Ca jona na pozicijama Ca(I) i Ca(II).



Slika 12. Heksagonalna struktura jedinične ćelije HAp [137].

3.3.2. Metode dobijanja prahova hidroksiapatita

Kako je već navedeno, ispitivanja kalcijum–fosfatnih jedinjenja počela su pre više od jednoga veka, ali su ona intenzivirana tek u poslednjih četrdeset godina. Tokom ovoga perioda, razvijeno je više metoda za sintezu HAp-a, koje će ukratko biti predstavljene u ovom poglavlju.

Precipitacione metode

Najjednostavniji način dobijanja veštačkog HAp-a predstavlja sinteza precipitacijom iz vodenih rastvora. Moguća su dva tipa reakcija u ovim metodama:

1. reakcije između fosfata i soli kalcijuma [138–141] i
2. reakcija neutralizacije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i H_3PO_4 [142].

Za prvi tip reakcija obično se koriste soli $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CaCl_2 ili $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ kako bi se u sistem uveli joni Ca^{2+} i soli K_2HPO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ili $(\text{NH}_4)_3\text{PO}_4$, kao izvor

PO_4^{3-} jona. Ove sinteza se odvijaju ukapavanjem kalcijumovih i fosfatnih rastvora u vodu ili fosfatnog rastvora u vodeni rastvor soli kalcijuma na pH-vrednostima većim od 9 i temperaturama od 25 do 90 °C i pri konstantnom mešanju. Nakon dodavanja celokupne količine reaktanata neophodno je da rastvor odstoji (oko 24 h ili više) da bi se završio proces sinteze i dobio stehiometrijski HAp pri čemu dolazi i do ukрупnjavanja kristala [143–145]. I sinteza HAp-a reakcijom neutralizacije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i H_3PO_4 odvija se na prethodno opisan način [142].

Iako je ovaj postupak dobijanja HAp-a najpogodniji za sintezu velikih količina apatita, nedostatak predstavlja nemogućnost precizne kontrole parametara sinteze kao što su: pH-vrednost, temperatura, odnos Ca/P, tj. čistoća reaktanata, brzina sjedinjavanja reaktanata, način mešanja, vreme i temperatura odstojevanja reakcione smeše i drugi [146–149]. Zbog pomenutih nedostataka precipitacione metode iz dve različite šarže obično se ne dobija HAp iste morfologije, stehiometrije i kristaliničnosti.

Metoda hidrolize

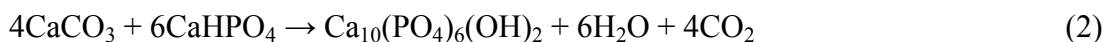
Hidrolizom α -TCP u vodenom rastvoru, pri odnosu čvrsto:voda 1:1, moguće je dobiti CDHAp [120]. Pri tom, ispitivan je uticaj temperature vodene smeše u opsegu od 30 do 75 °C i utvrđeno je da sa povećanjem temperature specifična površina dobijenog CDHAp-a opada. Dobijanje HAp-a hidrolizom α -TCP [121] ispitan je i pri temperaturama od 37, 45 i 57 °C i utvrđeno je da se sa povećanjem temperature smanjuje vreme reakcije sa 18 i 11 na 6,5 h, redom. Hidroliza α -TCP u formi suspenzije i formi granula pokazala je da je hidroliza granula znatno usporenija usled ograničenog prodiranja vode u granule [121]. HAp je moguće dobiti i hidrolizom pojedinačnih jedinjenja ili smeša kalcijum-fosfata: $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaHPO_4 i $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ u vodenom rastvoru amonijaka, natrijum- ili kalijum-hidroksida [109]. Takođe, u amonijačnom- ili natrijum-fosfatnom rastvoru CaCO_3 i $\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ mogu da hidrolizuju u HAp. [122].

Hidrotermalna metoda

Povišena temperatura i pritisak pri hidrotermalnoj sintezi omogućavaju dobijanje praha HAp-a visoke kristaliničnosti, slične veličine i oblika čestica. Kontrolom parametara sinteze (temperatura, pritisak, pH-vrednost, brzina mešanja, vreme sinteze, dodatak raznih aditiva) moguće je uticati na morfologiju i veličinu čestica. Zbog toga se

hidrotermalna metoda često koristi za sintezu HAp-a, čistog i dopiranog raznim jonima metala [150–158].

Hidrotermalnom metodom moguće je dobiti HAp polazeći od CaCO_3 i CaHPO_4 ili $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ u odgovarajućem stehiometrijskom odnosu prema sledećim hemijskim reakcijama:



Stehiometrijski HAp se može dobiti hidrotermalnom reakcijom kalcijum-pirofosfata i kalcijum-oksida u prisustvu vodene pare i atmosferi azota pri pritisku od 30 MPa i temperaturi od 350°C tokom 3 h [159]:



Dobijanje HAp-a hidrotermalnom metodom moguće je i raznim modifikovnim metodama kao što su: reakcija sa $\text{Ca}(\text{EDTA})_2$ u fosfatnim rastvorima, "flux growth" metoda, "gel growth" metoda itd [151,160].

Sol-gel metoda

Sol-gel metoda se zasniva na sposobnosti jednog ili više reaktanata da obrazuje/ju sol-gel, a ovom metodom se dobijaju proizvodi veće čistoće i homogenosti, i to na nižim temperaturama nego korišćenjem drugih metoda sinteze. Tokom sol-gel sinteze koloidna disperzija (sol) se transformiše u čvrstu fazu (gel), koja sadrži mrežu čvrste faze u čijim porama se nalazi tečna faza [161]. Nakon geliranja sledi sušenje pa žarenje suvog gela čime se uklanjaju rastvarač i organska jedinjenja. HAp prah nanometarskih dimenzija dobijen je sol-gel reakcijom P_2O_5 i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ rastvorenih u apsolutnom etanolu [162]. Tokom 1 h reakcioni rastvor je grejan na 60°C i dobijen je providan gel koji je zatim sušen 24 h na 80°C pa zagrevan pri brzini od $10^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$ na 600, 700, 800 i 900°C . Na dve niže temperature dobijen je samo HAp (10–15 nm veličina kristala) a na dve više i mali udeo CaO i β -TCP-a. Koristeći $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ i $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ i uz etilendiamintetrasirćetnu kiselinu ($\text{EDTA} \cdot \text{C}_{10}\text{H}_{16}\text{N}_2\text{O}_8$) ili vinsku kiselinu ($\text{C}_4\text{H}_6\text{O}_6$) kao kompleksirajuće agente. Nakon sporog isparavanja na 65°C rastvor se transformisao u providan gel pa su dalje kalcinacijom na 1000°C tokom 5 h dobijeni HAp prahovi različite morfologije [163].

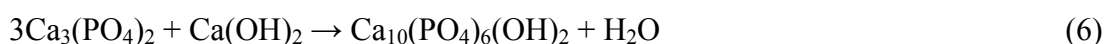
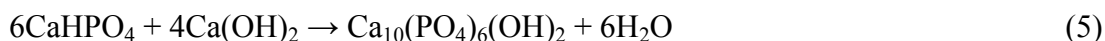
Mikroemulziona metoda

Emulzija je sistem dve nemešljive tečnosti od kojih je jedna u obliku kapljica dispergovana u drugoj. Za dobijanje stabilnih emulzija koriste se površinski aktivne supstance. Osim mikroemulzija, koje su i najstabilnije, postoje i nanoemulzije i makroemulzije, čija je podela izvršena prema veličini dispergovanih kapi. Reakcije sinteze odvijaju se u ograničenom prostoru koji formiraju vodene kapi stabilizovane u fazi ulja površinski aktivnim supstancama. Ovom metodom sinteze mogu se dobiti prahovi HAp-a sa česticama nanometarskih dimenzija [164–166].

Reakcije u čvrstom stanju

Ova metoda se zasniva na zagrevanju smeše čvrstih reaktanata do visokih temperatura. Tada dolazi do reakcija u čvrstom stanju kojima se može dobiti HAp, ali sa aglomeratima nepravilnog oblika i nehomogenog sastava, tj. primesama drugih faza zbog nepotpunog odigravanja reakcije koje se dešava zbog malog koeficijenta difuzije jona u čvrstoj fazi [167]. Koristeći CaO, P₂O₅ i SiO₂ kao glavne reaktante i dobro ih mešajući a zatim presujući smesu u granule i sinterujući do 1250 °C dobijen je HAp kao i β-TCP i α-TCP na većim temperaturama [167].

Primeri reakcija u čvrstom stanju za dobijanja HAp-a iz monetita i β-TCP [168]:



Ovom metodom moguće je sintetisati i dopiran HAp [169], ali se ne mogu dobiti prahovi nanometarskih dimenzija čestica i potrebna je skupa oprema i veliki utrošak energije.

Mehanohemijaska metoda

Mehanohemijaska sinteza predstavlja takođe sintezu u čvrstom stanju, ali se u ovom slučaju za odigravanje reakcija koristi mehanička energija mlevenja. Mlevenjem smeše čvrstih reaktanata dolazi do usitnjavanja čestica pri čemu se stvaraju nove reaktivne površine kao i strukturni defekti koji ubrzavaju reakcije. Ova metoda je jednostavna i mogu se dobiti čestice nanometarskih dimenzija, a nedostatak je aglomeracija čestica, raspodela veličina čestica je široka, moguće je da zaostanu metastabilne faze i primese od mlina. Koriste se različiti tipovi mlinova kao što su:

vibracioni, atricioni, horizontalni i planetarni kuglični mlinovi. Sinteza se može kontrolisati sledećim parametrima: intenzitet mlevenja (frekvencija kod vibracionog, brzina rotacije kod planetarnog mlina), veličina i stepen punjenja posude, broj kuglica i njihova veličina i gustina itd. Zbog svoje jednostavnosti, mehanohemijske sinteze HAp-a sa česticama nanometarskih dimenzija se često koriste [170,171]. HAp visoke kristaliničnosti i veličine čestica manje od 30 nm, dobijen je polazeći od CaO i CaHPO₄ korišćenjem visokoenergetskog vibraciono mlina tokom više od 20 h [170]. HAp je mehanohemijski moguće dobiti koristeći pojedinačno sledeće supstance: Ca₃(PO₄)₂, P₂O₅ ili CaHPO₄ sa Ca(OH)₂ [171]. Takođe, upotrebom CaCO₃ i CaHPO₄, kao i CaCO₃ i (NH₄)H₂PO₄ dobija se HAp i CO₂, odnosno HAp, CO₂ i NH₃, redom [158]. Pomenute kombinacije supstanci mlevene su 60 h i veličine kristala HAp-a su iznosile od 22 do 39 nm.

3.3.3. Tri-kalcijum fosfat (TCP)

Beta-kalcijum-fosfat (β -TCP) i α -TCP su visokotemperaturne faze HAp-a koje se dobijaju zagrevanjem na temperaturama oko 800 °C i 1125 °C, redom. Obično se zagrevanjem HAp prvo transformiše u β -TCP na oko 800 °C a daljim zagrevanjem β -TCP se transformiše u α -TCP na temperaturama oko 1125 °C [5]. α -TCP može biti zadržana tokom hlađenja do sobne temperature [129,152,156–158], a na sobnoj temperaturi i uz odsustvo vlage postoji u metastabilnom stanju. Stepem stabilnosti α -TCP dosta zavisi od jonske supstitucije. Pronađeno je da strukturu α -TCP stabilise Si⁴⁺ [88,89,172,173] pa u prisustvu Si⁴⁺ α -TCP može nastati na temperaturama od 800 do 1000 °C. α -TCP može nastati i reakcijama smeša prekursora u čvrstom stanju na visokim temperaturama [7].

Ova dva biomaterijala, α -TCP i β -TCP, brže se rastvaraju od HAp-a (tabela 5) pa imaju i bolje resorbabilne i osteokonduktivne osobine. Predstavljaju se molekulskom formulom Ca₃(PO₄)₂, ali pripadaju različitim kristalnim sistemima (tabela 8). Ta razlika u pakovanju molekula uslovljava veliku razliku u gustini i rastvorljivosti od čega zavisi mogućnost primene ovih materijala [7,132]. α -TCP je reaktivnija faza od β -TCP i u vodenim rastvorima brže se rastvara i hidrolizuje u CDHAp [120–122]. Postoji još i faza α' -TCP, ali je ona stabilna samo na temperaturama višim od oko 1465 °C, a na

nižim temperaturama se brzo transformiše u α -TCP fazu, pa se praktično ne može koristiti [132].

Poslednjih godina povećan je interes za upotrebu α -TCP kao biomaterijala pogodnog za dobijanje koštanih cemenata, degradabilne biokeramike i kompozita za popravku koštanog tkiva. Zbog velike brzine rastvaranja upotreba samo α -TCP-a kao biomaterijala za zamenu i popravku koštanog tkiva nije moguća [174]. α -TCP se prvenstveno koristi kao glavni sastojak hidrauličnih koštanih cemenata [175–181] koji se upotrebljavaju u stomatologiji, maksiofacialnoj hirurgiji i ortopediji.

U smeši sa HAp-om i β -TCP-om dobija se dvofazna ili trofazna, degradabilna biokeramika. Pokazano je da se u *in vivo* uslovima preko faznog sastava može podesiti brzina degradacije dvofazne HAp/ β -TCP biokeramike [182]. Na isti način se mogu kombinovati i α -TCP i HAp u dvofaznom HAp/ α -TCP sistemu a u cilju usklađivanja brzine degradacije ovakog materijala sa brzinom stvaranja novog koštanog tkiva [88,89,93]. Razgradnja α -TCP-a iz dvofaznog HAp/ α -TCP materijala vodi lokalnom povećanju koncentracije Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona, što ima veliki uticaj na proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta a time i na brže stvaranje novog koštanog tkiva [183]. α -TCP može da se koristi i kao sporo-otpuštajuće đubrivo za kiselu zemljišta [184].

Tabela 8. Strukturni podaci za β -TCP, α -TCP i α' -TCP [7].

	β -TCP	α -TCP	α' -TCP
Sistem	Romboedarski	Monokliničan	Heksagonalni
Prostorna grupa	$R3c$	$P2_1/a$	$P6_3/mmc$
a , nm	1,04352(2)	1,2859(2)	0,53507(8)
b , nm	1,04352(2)	2,7354(2)	0,53507(8)
c , nm	3,74029(5)	1,5222(3)	0,7684(1)
α , °	90	90	90
β , °	90	126,35(1)	90
γ , °	120	90	120
Z	21	24	1
V , nm ³	3,5272(2)	4,31(6)	0,19052(8)
V_0 , nm ³	0,1680(2)	0,180(6)	0,19052(8)
D_{th} , g cm ⁻³	3,066	2,866	2,702

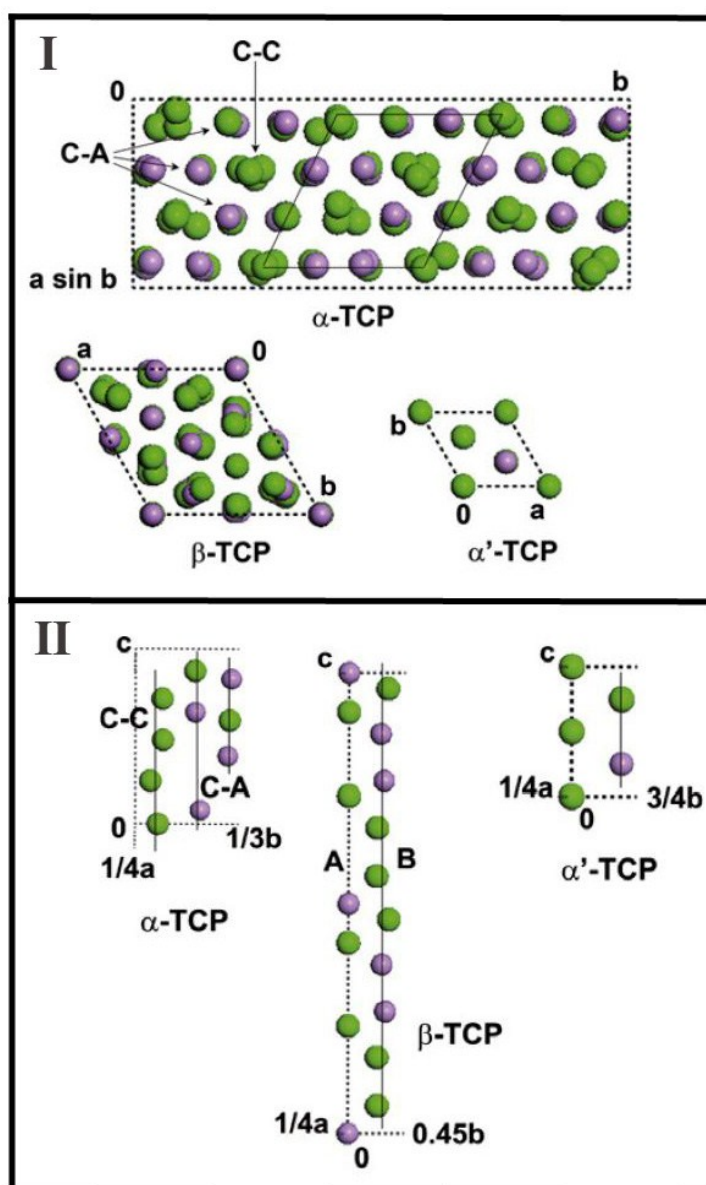
a , b , c , α , β i γ – parametri kristalne ćelije;

Z – broj jediničnih formula po jediničnoj ćeliji;

V – zapremina jedinične ćelije;

V_0 – zapremina po jediničnoj formuli; D_{th} – teorijska gustina

Joni Ca^{2+} i PO_4^{3-} od kojih se sastoji α -TCP raspoređeni su u kolone koje su orjentisane duž pravca [001]. Postoje dva tipa kolona: katjon–katjon, C–C, kolona koja se sastoji samo od Ca^{2+} jona i katjon–anjon, C–A, kolona koja se sastoji od naizmenično raspoređenih Ca^{2+} i PO_4^{3-} jona. U C–C kolonama položaj katjona Ca^{2+} je takav da ne obrazuju pravu liniju već su naizmenično pomereni u različite strane. Svaka C–C kolona okružena je sa šest C–A kolona, a svaku C–A kolonu okružuju tri C–C i tri C–A kolone naizmenično raspoređene [7].



Slika 13. Projekcije ćelija α -TCP, β -TCP i α' -TCP [7]:

I) projekcije u pravcu [001], II) delimična projekcija jediničnih ćelija na bc -ravan koja pokazuje raspored atoma u koloni orjentisanoj duž pravca [001]. Ca – zelena; P – ljubičasta; O – nije prikazana radi jasnoće. C–C, katjon–katjon kolona; C–A, katjon–anjon kolona.

4. Dopiranje HAp i HAp/TCP jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , antimikrobna svojstva i biokompatibilnost

I pored opsežnih procedura koje se preduzimaju za obezbeđenje sterilnih uslova prilikom operacija zamene ili popravke delova skeletnog sistema, mogućnost da se razvije infekcija na mestu implantacije i dalje je velika [9,10]. Infekcije značajno povećavaju cenu tretmana zdravstvenog problema pacijenta jer je po njihovoj pojavi neophodna bar još jedna dodatna operacija za saniranje infekcije i ponovnu ugradnju implanta. Takođe, vreme oporavka se produžava i kvalitet života pacijenta je narušen [11,12]. Uobičajena priprema pacijenta za operaciju podrazumeva davanje određenih doza antibiotika i pre i posle operacije. Ipak, ovakav postupak često ne obezbeđuje optimalnu dozu leka na mestu implantacije, što pogoduje razvoju infekcije. Takođe, mnoge bakterijske kulture koriste biofilm da se zaštite od napad antibiotika i imunog sistema [10,13,185]. Za lokalni tretman i prevenciju infekcije implanta, još pedesetih godina počelo se sa razvojem implantnih materijala punjenih antibioticima [14]. Ni ovaj postupak, iako znatno precizniji u dostavi leka i većim dozama istog na potrebnom mestu, nije doveo do sprečavanja nastanka infekcija. Kao prvo, nemoguće je predvideti koja bakterijska kultura ili više njih može biti odgovorna za razvoj infekcije, pa prema tome i prethodno koristiti odgovarajući antibiotik. Druga stavka povlači pitanje odgovarajuće doze leka i vremena delovanja te doze. Preterana količina leka može biti štetna za sam organizam, a slabija doza leka od potrebne za suzbijanje i uništenje mikroorganizama vodi njihovom prilagođavanju i stvaranju otpornih, rezistentnih, sojeva bakterija na dati lek [14–16]. Loše strane ovakvog tretmana dovele su poslednjih decenija do pojave bakterijskih kultura otpornih na antibiotike kao što su: meticilin-rezistentna *Staphylococcus aureus* (MRSA), vankomicin-rezistentna *Enterococcus* (VRE) i rezistentna na veći broj lekova *Mycobacterium tuberculosis* (MDR-TB) [186–189].

Da bi se prevazišle ove teškoće a ipak obezbedio biomaterijal sa antimikrobnom zaštitom, poslednjih godina istraživanja su usmerena na upotrebu jona metala kao antimikrobnih agenasa. Dopiranjem implantnog materijala malim količinama jona metala kao što su Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} dobija se materijal kod koga je otežano prijanjanje i širenje patogenih mikroorganizama na površini. Ugradnjom ovakvog materijala u

organizam i stalnim otpuštanjem jona metala u okolinu stvara se sredina jako nepovoljna za razmnožavanje mikroorganizama. Ipak, i u slučaju korišćenja jona metala mora se paziti na količinu koja se upotrebi jer su u velikim koncentracijama otrovni po ljudske ćelije [17,190–193]. Joni metala imaju širok spektar delovanja prema bakterijskim kulturama, a načini na koji negativno utiču na mikroorganizme još nije u potpunosti utvrđen. Pretpostavlja se da joni metala deluju na ćelijski zid i ćelijsku membranu, proteine u citoplazmi i nukleinske kiseline mikroorganizama narušavajući njihovu funkciju što datim mikroorganizmima onemogućava deobu i na taj način ih uništavaju [17–19,194,195,196–198].

Za oligodinamično delovanje (grčki: oligos- nešto malo; dynamis- snaga, sila) metala, odnosno, antimikrobno delovanje u malim količinama, nađeno je da je redosled toksičnosti na mikroorganizme sledeći [199]:

Ag > Hg > Cu > Cd > Cr > Pb > Co > Au > Zn > Fe > Mn > Mo > Sn

Pojedini metali su i pri niskim koncentracijama otrovni i za ljudske ćelije. S druge strane, svojim odličnim oligodinamičnim delovanjem a neotrovnošću za ljude u malim koncentracijama, i Ag i Cu su korišćeni još od antičkog vremena za izradu pribora za jelo i posuda za čuvanje vode, dezinfekciju rana itd. Cink ima slabiji oligodinamički efekat, ali kao i Cu spada u grupu bioelemenata koji su u malim količinama neophodni za odvijanje brojnih biohemijjskih procesa [191–193] pa i onih povezanih sa razvojem kostiju [200–206].

Poslednjih godina naročito je interesantno dobijanje HAp-a dopiranog jonima Ag⁺, Cu²⁺ ili Zn²⁺, ili njihovom kombinacijom. Takođe, sintetisani su i dopirani TCP. Brojni istraživači su korišćenjem različitih metoda sinteze i različitih količina dopanata pokušali da dobiju materijal što bolje biokompatibilnosti i antimikrobnog delovanja.

Feng i saradnici [207] su tretirali HAp-om obloženu aluminijumsku osnovu rastvorima AgNO₃ različite koncentracije. Na ovaj način Ag⁺-dopiran HAp pokazao je dobru biokompatibilnost u odnosu na mišije makrofage, ćelijsku liniju RAW264.7 i osteoblaste, MG63 ali samo do 20 ppm AgNO₃ u rastvoru. Sa 100 ppm AgNO₃ u početnom rastvoru za tretiranje HAp-a dobijena je prevlaka Ag⁺-HAp toksična prema navedenim ćelijskim linijama. U sledećem radu istih istraživača [196] ispitan je uticaj

Ag^+ u obliku AgNO_3 na *E. coli* i *S. aureus*. Pomoću transmisionog elektronskog mikroskopa i X-ray uređaja utvrdili su da kod tretiranih bakterija dolazi do odvajanja citoplazmatične membrane od ćelijskog zida, a u nekim slučajevima i do uništenja ćelijskog zida, DNA molekul je komprimovan i izgubio je sposobnost udvajanja a proteini su postali neaktivni. Rameshbabu i saradnici [208] su primenjujući mikrotalasno zračenje sintetisali Ag^+ supstituisan HAp sa različitim udelom Ag^+ (0,5–3,0 at.%). HAp dopiran većim koncentracijama Ag^+ pokazao je bolje antimikrobno delovanje u odnosu na *E. coli* i *S. Aureus*, ali jedino je 0,5% AgHAp bio dobre biokompatibilnosti u kontaktu sa ljudskim osteoblastnim ćelijama. W. Chen i saradnici [209] su dopirali HAp sa $2,05 \pm 0,55$ mas.% Ag^+ . Prevlaka sa ovakvim Ag-HAp-om značajno je smanjila prijanjanje *S. epidermidis* i *S. aureus*, a *in vitro* citotoksičnost nije pokazana u ispitivanju sa ljudskim embrionalnim nepčanim mezenhimalnim ćelijama. U sledećoj studiji W. Chan i saradnici [210] su sol-gel postupkom sintetisali dopirani HAp sa 1,0 mas.% i 1,5 mas.% Ag^+ , a zatim dobijenim Ag-HAp-om obložili disk od titanijuma. Ova obloga smanjila je prijanjanje bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* u odnosu na površinu nedopiranog HAp-a. Na osnovu aktivnosti alkalne fosfataze ljudskih embrionalnih nepčanih mezenhimalnih ćelija utvrdili su i da AgHAp1,0 ima sličnu osteokonduktivnu aktivnost kao i čista HAp površina. Ewald i saradnici [211] su dopirali i α -TCP i β -TCP sa Ag^+ u nameri da dobiju Ag-HAp i Ag-brušitni cement, respektivno. Antimikrobna aktivnost ovih materijala ispitana je u odnosu na *S. aureus* i *S. epidermidis* i pokazalo se da Ag-brušitni cement ima odlične antimikrobne osobine, za razliku od Ag-HAp. I u testu citokompatibilnosti sa humanim osteoblastima, ćelijska linija MG63, Ag-brušitni cement je zadovoljio u pogledu aktivnosti i broja ćelija dok i u ovom slučaju Ag-HAp se nije dobro pokazao. Ciobanu i saradnici [212–215] i Costescu i saradnici [216] su sintetisali nanokristalne prahove Ag:Hap precipitacionom metodom sa udelom Ag u HAp-u od 0,02 do 0,4 at.%. Antimikrobnu aktivnost ispitali su u odnosu na više sertifikovanih referentnih kultura (ATCC) i kliničkih mikrobioloških sojeva, gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija i gljivičnih sojeva. Efikasnu antimikrobnu aktivnost pokazala je većina Ag:Hap nanočestičnih prahova a najbolje su se, naravno, pokazali prahovi sa većim sadržajem Ag^+ u HAp-u. U ovim radovima nije ispitano kako bi taj veći sadržaj Ag^+ u HAp-u imao uticaj na humane ćelije. Yikai Chen i saradnici [217] odredili su antimikrobnu aktivnost i citotoksičnost AgHAp prevlaka

nanešenih na podlogu od titanijuma plazma raspršivanjem. Utvrđeno je da je sadržaj Ag u prevlakama HAp-a: 0,64, 2,44 i 4,09%. Ovaj materijal suzbio je sa preko 95% bakterijske kulture *E.coli*, *S.aureus* i *P. aeruginosa*, a nije pokazao citotoksičnost u odnosu na fibroblastnu ćelijsku liniju L929. Isti istraživači [218] su ispitali otpuštanje Ag nano čestica i Ag^+ sa prevlaka Ag-HAp-a nanesenih na podlogu od titanijuma, a u rastvoru simuliranog telesnog fluida (SBF) i fluida za razmenu (buffering fluid - BF). Prevlake su nanete koprecipitacijom i plazma raspršivanjem. Ovi testovi su pokazali sporo otpuštanje jona i nano čestica Ag, sa razlikom da je veće otpuštanje sa prevlake dobijene koprecipitacijom, što je po mišljenju autora posledica različite hrapavosti i kristaliničnosti prevlaka. Iqbal i saradnici [219] su koristeći mikrotalasno zračenje sintetisali Ag^+ dopiran HAp sa udelom srebra od 0,3, 1,0 i 5,0 mas.%. Antimikrobni test sa bakterijskim kulturama: *S. aureus*, *Bacillus subtilis*, *P. aeruginosa* i *E. coli* pokazao je da su sintetisani AgHAp prahovi aktivni protiv datih bakterija. Takođe, test otpuštanja jona otkrio je da se Ag^+ joni sporo otpuštaju u sva tri slučaja. Jedan od glavnih zaključaka ovoga rada je da je optimalni udeo Ag^+ 0,3 mas.%, jer pored dobre antimikrobne aktivnosti najmanje utiče na strukturu i termalnu stabilnost HAp-a. Diaz i saradnici [220] su koloidnim postupkom sintetisali kompozit Ag nano čestica (1 mas.%) i HAp čestica. Iako ovo nije slučaj dopiranja HAp-a sa Ag^+ , naveden je jer je pokazana jaka antimikrobna aktivnost za *S. aureus*, *Pneumococcus* (Pn) i *E. coli*. Trujillo i saradnici [221] su koristeći plazma baziranu jonsku implantaciju i spaterovanje formirali Ag dopiran HAp (~0,5 mas.% i ~1,5 mas.%) tanki film na titanu. Ova obloga AgHAp-a zaustavila je rast bakterijskih kultura *S. epidermidis* i *P. aeruginosa* u rastvoru. Jelinek i saradnici [222] su laserskom depozicijom dobili tanke filmove Ag dopiranog HAp-a. Detektovane koncentracije Ag u sloju HAp-a bile su: 0,006, 0,3, 1,2, 4,4, 8,3 i 13,7 at.%. Antibakterijska efikasnost ovih slojeva Ag-HAp-a u odnosu na *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*) menjali su se sa povećanjem koncentracije Ag od 71,0 do 99,9%. Yan Li i saradnici [223] su sintetisali CuHAp koristeći metodu izmene jona. Ovaj materijal je pokazao antimikrobnu aktivnost u odnosu na *E. coli*, ali i citotoksičnost u odnosu na humane fetalne osteoblastne ćelije. Ito i saradnici [224] su utvrdili da dopiranje TCP/HAp keramike sa Zn^{2+} u iznosu od 0,6 do 1,2 mas.% povećava proliferaciju mišijih osteoblastnih ćelija. Kada je sadržaj Zn^{2+} veći od 1,2 mas.% dolazi do ispoljavanja citotoksičnosti takvih materijala. Isti autori [225] su

nešto kasnije pronašli da u *in vitro* uslovima Zn^{2+} inhibira osteoklasnu resorpciju kostiju. Webster i saradnici [226] su utvrdili da dopiranje HAp-a sa 2 mol% Zn^{2+} značajno povećava adheziju osteoblasta u poređenju sa nedopiranim HAp-om. Jidong Li i saradnici [227] su ispitivali obogaćivanje natrijum-karbonatnog HAp-a (NaCHAp) sa Cu^{2+} i Zn^{2+} . Prema ovim autorima, rastvaranje pa precipitacija NaCHAp je dominantni mehanizam pomoću koga se joni izmenjuju, a adsorpcija i difuzija su zastupljeni u manjoj meri. Kako je NaCHAp rastvorljiviji u rastvoru $CuSO_4$ nego u rastvoru $ZnSO_4$, to je i rezultat da je Zn^{2+} više prisutan na površini a Cu^{2+} po dubini NaCHAp-a očekivan. Pretpostavka autora je da Cu^{2+} , pošto je manjeg radijusa nego Zn^{2+} (0,72 Å naspram 0,74 Å), ne samo da zamenjuje Ca^{2+} i Na^+ kao i Zn^{2+} , već i da ulazi u vakansije i/ili heksagonalne kanale rešetke NaCHAp. Ergun i saradnici [228] i Ming'Ou Li i saradnici [229] istraživali su samo strukturne i morfološke karakteristike Zn^{2+} dopiranog HAp-a. Ming'Ou Li i saradnici [229] su zaključili da se dopiranje lakše sprovodi precipitacijom za razliku od hidrotermalne metode. Takođe, kristaliničnost i termička stabilnost HAp-a značajno opada sa povećanjem udela dopiranja jonima Zn^{2+} . Chung i saradnici [230] su primenili sol-gel metod za sintezu Ag^+ i Zn^{2+} dopiranog HAp-a. U antimikrobnom testu Ag-HAp i Zn-HAp su ispoljili kontaktnu inhibiciju mikroba *Streptococcus mutans*. Kim i saradnici [231] su koristeći precipitacionu metodu pokušali da dobiju antimikrobnu keramiku (AC) baziranu na HAp-u dopiranjem Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} jonima. Antimikrobni efekat u odnosu na *E. coli* pokazao je prah Ag^+ -AC za razliku od prahova Cu^{2+} -AC i Zn^{2+} -AC kod kojih se taj efekat nije mogao utvrditi. Stanić i saradnici [232, 233] su sintetisali Ag^+ -, Cu^{2+} - i Zn^{2+} - supstituisan HAp koristeći precipitacioni metod. Sintetisani prahovi AgHAp, CuHAp i ZnHAp su ispoljili antimikrobnu aktivnost redukujući *S. aureus*, *E. coli* i *C. albicans*.

Navedena istraživanja su pokazala da se sa povećanjem koncentracije dopirajućih jona povećava antimikrobna aktivnost ali i slabi biokompatibilnost u kontaktu sa humanim i mišijim ćelijama. Uzimajući u obzir i dobru antimikrobnu aktivnost i dobru biokompatibilnost, optimalna koncentracija dopiranja HAp-a jonima Ag^+ , Cu^{2+} ili Zn^{2+} , ili njihovom kombinacijom, bila bi ispod 1 mas.%.

5. Kompakti i skafoldi

Pored upotrebe u ulozi punioca, u obliku prahova i pasta, i kao prevlake za metalne implante, veoma važnu ulogu imaju i biokeramički materijali na bazi hidroksiapatita u obliku kompakata i skafolda. Glavni cilj je dobiti implante koji će verno oponašati osobine bilo koje kosti u čovečijem organizmu, a upotrebna vrednost biokeramike na bazi HAp-a i HAp/TCP umanjena je njihovom krutom prirodom. S obzirom da su HAp i HAp/TCP veoma biokompatibilni, najviše pažnje u istraživanjima ovih materijala se poklanja dobijanju implanata poboljšanih mehaničkih osobina. Prema dosadašnjim istraživanjima, gusti biokeramički kompakti bolje oponašaju mehaničke karakteristike kompaktno kosti i dentina zuba, dok skafoldi više odgovaraju za zamenu suđerastog dela kostiju. Literaturni podaci [234] navode da su vrednosti pritiska čvrstoće, zatezne čvrstoće, žilavosti loma i poroznosti za kompaktno kosti: 100–150 MPa, 50–151 MPa, 2–12 MPa·m^{1/2} i 5–10%, redom, a za suđeraste kosti: 2–12 MPa, 1–5 MPa, 0,1–0,8 MPa·m^{1/2} i 50–90%, redom. Ovako veliki opsezi u mehaničkim karakteristikama koštanih tkiva posledica su merenja na različitim tipovima i pravcima pružanja kostiju, a zavise i od starosti i opšteg zdravstvenog stanja ljudske jedinice.

Pri procesiranju kompakata posebna pažnja je usmerena na dobijanje odgovarajućih vrednosti tvrdoće (H) i žilavosti loma (K_{IC}) neophodnih za sigurnu primenu u ortopediji i stomatologiji, tj. mestima ugradnje gde se zahtevaju dobre mehaničke karakteristike tokom dužeg vremenskog perioda [124,235]. Kompakti na bazi HAp-a i HAp/TCP dobijaju se presovanjem (unijaksijalno i/ili izostatsko) ili livenjem čime se dobijaju polazni kompakti koji se zatim sinteruju različitim tehnikama. Najčešće se primenjuju: mikrotalasno sinterovanje (MW) [236–247], konvencionalno sinterovanje (CS) [242,243,247–271], toplo presovanje (HP) [254,272] i toplo izostatsko presovanje (HIP) [248,273]. Maksimalne vrednosti za H i K_{IC} dobijene korišćenjem ovih tehnika sinterovanja na temperaturama od 1000 do 1400 °C su u opsegu od 2,7 do 8,4 GPa i od 0,73 do 1,92 MPa·m^{1/2}, redom.

Prvo istraživanje u kome je mikrotalasno sinterovanje upotrebjeno za procesiranje kompakata HAp-a sprovedli su Fang i saradnici [236]. Dobili su HAp

biokeramiku veće gustine, bolje mikrostrukture i veće čvrstoće i to za mnogo kraće vreme u poređenju sa kompaktima koji su konvencionalno sinterovani.

Chanda i saradnici [237] su u svojim istraživanjima koristili komercijalno dostupne čiste prahove HAp i β -TCP sa veličinom čestica od 600 nm. Ovim prahovima dodavali su oksidne aditive: MgO, ZnO i TiO₂. Količina dodatih oksida bila je 1 mas.% MgO za HAp, odnosno 1 mas.% TiO₂ za β -TCP, u prvom slučaju i 1 mas.% MgO + 0,25 mas.% ZnO i za HAp i za β -TCP u drugom slučaju. Nakon mlevenja od 7 h prahovi su unijaksijalno presovani na 150 MPa a zatim izostatski presovani na 350 MPa tokom 15 minuta. Dalje su polazni kompakti mikrotalasno sinterovani na 1250 °C tokom 30 minuta. Ispostavilo se da je dodavanje oksida HAp-u imalo veoma negativan uticaj na tvrdoću kompakata, što se pokazalo i kod TCP-a, ali sa mnogo manjom razlikom. S druge strane, dodatkom oksida, i kod HAp-a i kod TCP-a vrednosti pritiskne čvrstoće su povećane. Takođe, gustina HAp kompakata smanjena je sa 94% (čist Hap) na 88% (pri dodatku oksida), dok je kod TCP povećana od 82% za čist do maksimalnih 90% za TCP sa dodatim oksidima MgO i ZnO. Prosečna veličina zrna kod HAp-a iznosila je 4,5 μ m, dodatkom MgO povećana je na 5,8 μ m, dok je kod Hap kompakata sa MgO i ZnO veličina čestica iznosila 3,3 μ m. Kod kompakata TCP-a, prosečna veličina zrna iznosila je 3,8 μ m, dodatkom TiO₂ veličina zrna se povećala na 4,8 μ m, dok se dodavanjem smeše oksida MgO i ZnO veličina zrna smanjila i iznosila je 3,2 μ m. Poredeći rezultate sa ranijim istraživanjima kompakata sličnog polaznog sastava ali konvencionalno sinterovanih ovi autori su zaključili da je mikrotalasno sinterovanje mnogo ekonomičnije jer usled nepostojanja temperaturnog gradijenta veće su brzine zagrevanja pa ciklus kraće traje a dobijaju se iste ili bolje mehaničke osobine kompakata.

Mirhadi i saradnici [238] su nanočestični prah β -TCP unijaksijalno presovali (100 MPa), a zatim sinterovani konvencionalno tokom 2 h ili mikrotalasno tokom 15 minuta na 900, 1000 i 1100 °C. MW uzorci pokazali su veću gustinu, manja zrna (150 nm na 900 °C i 3 μ m na 1100 °C) i kao posledicu svega navedenog, veću tvrdoću od CS uzoraka.

Thuault i saradnici [239] su koprecipitacijom dobijeni prah HAp-a kalcinirali na 800 i 900 °C (pri čemu je veličina zrna kalciniranih prahova iznosila 75 i 177 nm, redom) a zatim livenjem obrazovali početni kompaktni koji su dalje mikrotalasno

sinterovali na temperaturama od 1190 do 1270 °C, sa korakom od 20 °C i pri vremenu zadržavanja od 5, 15 i 30 minuta. Kratko vreme zadržavanja na temperaturi sinterovanja nije dovelo do povećanja veličine zrna. Najbolji rezultat je dobijen za prah kalcinisan na 800 °C a zatim MW na 1230 °C tokom 5 minuta koji dostigao relativnu gustinu od 99,6% i $K_{IC} = 1,12 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$.

Da MW sprečava rast zrna, pogotovo na temperaturama ispod 1200 °C, zaključili su i Ramesh i saradnici [240]. Oni su kompakte HAp-a sinterovali u intervalu 1000–1300 °C, tokom 30 minuta, pri čemu nije došlo do razlaganja na TCP faze. Dobijene su relativne gustine od 90% do 98% i najveća žilavost od $1,45 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ na 1050 °C i tvrdoća od 6,38 GPa na 1150 °C. Veličina zrna na 1000 °C iznosila je oko 0,1 μm, na 1200 °C 0,86 μm, da bi na 1300 °C porasla na 2,08 μm, što je povećanje od 2,3 puta za poslednjih 100 °C sinterovanja. Ipak, i ova veličina zrna dobijena MW na 1300 °C je više od dva puta manja od veličine zrna uzoraka koje su u prethodnim studijama ovi istraživači dobili putem CS.

MW sinterovanje su u svojim istraživanjima koristili i Bose i saradnici [241]. Upotrebom nanočestičnog praha obrazovali su polazne kompakte uniaksijalnim (50 MPa) pa izostatskim presovanjem (345 MPa tokom 10 minuta), koje su zatim sinterovali na temperaturama 1000, 1100 i 1150 °C tokom 20 minuta. Najbolje vrednosti H (8,4 GPa) i K_{IC} ($1,9 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$) dobijene su za kompakt sinterovan na 1000 °C koji se odlikovao i najmanjom veličinom zrna od ~170 nm. Sa porastom temperature sinterovanja mehaničke osobine su pogoršane a veličina zrna za 1150 °C je iznosila 1,16 μm, dok je teorijska gustina za sve temperature iznosila oko 98%. Povećanje tvrdoće i žilavosti kroz proces dobijanja zrna manjih dimenzija objašnjen je istovremenim porastom relativne zapremine granica zrna koje pružaju veći otpor širenju prsline kroz materijal. Takođe, kompakti sa manjom veličinom zrna pokazali su bolju interakciju sa humanim osteoblastnim ćelijama u *in vitro* uslovima kroz bolju kvašljivost usled više granica zrna.

Veljović i saradnici [242] su hidrotermalno sintetisali HAp prah sa sferičnim aglomeratima koji je zatim unijaksijalno presovan na 100 MPa za dobijanje polaznih kompakata. Kompakti su sinterovani MW u temperaturnom intervalu 900–1200 °C tokom 15 minuta (brzina zagrevanja $20 \text{ °C}\cdot\text{min}^{-1}$). Dobijeni su HAp/ α -TCP kompakti jedinstvene mikrostrukture sa sfernim porama zaostalim od šupljih aglomerata praha i

nepravilnim porama između njih. Za ovaj tip keramike relativno visoka vrednost K_{IC} od $1,25 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ je dobijena na $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ što se objašnjava upravo uticajem sfernih pora na ojačanje kompakata. Druga grupa uzoraka koja je za dobijanje polaznog kompakta izostatski presovana na 400 MPa pokazala je još veću vrednost K_{IC} od $1,35 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ pri istim uslovima MW sinterovanja na $1200 \text{ }^\circ\text{C}$, dok se uzorci sinterovani konvencionalno odlikuju lošijim mehaničkim osobinama.

Isti autori [243] su pokazali da kompakti sinterovani mikrotalasno ($900\text{--}1200 \text{ }^\circ\text{C}$, 15 minuta) a koji se sastoje od HAp-a generalno imaju bolje mehaničke karakteristike od kompakata faznog sastava HAp/TCP. Najbolji rezultati HAp kompakata za H je $4,85 \text{ GPa}$ na $1200 \text{ }^\circ\text{C}$ i $K_{IC} \sim 1,3 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ na $900 \text{ }^\circ\text{C}$. Navedeni uzorci pri konvencionalnom sinterovanju imaju lošije mehaničke karakteristike. I ovim istraživanjem je dokazano da manja veličina zrna poboljšava osobine materijala što je glavni zaključak i studije koje su sprovedli Dasgupta i saradnici [244].

Hoepfner i saradnici [252] su u svojim ispitivanjima konvencionalno sinterovali kompakte u temperaturnom intervalu od 1100 do $1400 \text{ }^\circ\text{C}$ i zaključili su da sa povećanjem poroznosti opada vrednost H dok veličina zrna mikrostrukture kompakata nema jasan uticaj na tvrdoću.

Za prevenciju rasta zrna, Veljović i saradnici [246], Lukić i saradnici [257] kao i Mazaheri i saradnici [258] koristili su postupak dvostepenog sinterovanja (eng. two step sintering – TSS) kompakata primenom mikrotalasnog, odnosno konvencionalnog sinterovanja. Dvostepeno sinterovanje podrazumeva u prvom koraku sinterovanje na višoj temperaturi (dovoljnoj za dostizanje kritične gustine pri kojoj pore postaju termodinamički nestabilne u odnosu na skupljanje) uz kratko vreme zadržavanja, a drugi korak predstavlja snižavanje temperature sinterovanja uz duže vreme zadržavanja na krajnjoj temperaturi (dovoljnoj da se postigne visoka gustina kompakata uz istovremeno sprečavanje rasta zrna). Veljović i saradnici [246] su sa kompakte dobijene MWTSS dobili veličinu zrna od $0,078 \text{ }\mu\text{m}$, $H = 5,00 \text{ GPa}$ i $K_{IC} = 1,58 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, dok su vrednosti istih veličina za kompakte dobijene CSSS (SSS – single step sintering) iznosile $3,00 \text{ }\mu\text{m}$, $2,39 \text{ GPa}$ i $0,28 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom, a u slučaju CTSS $1,40 \text{ }\mu\text{m}$, $5,22 \text{ GPa}$ i $1,03 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Vrednosti veličine zrna, tvrdoće i žilavosti kompakata, koje su u svojoj studiji odredili Lukić i saradnici [257] iznosile su $0,375 \text{ }\mu\text{m}$, $4,9 \text{ GPa}$ i $1,11 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom, kod kompakata dobijenih TSS, a za

kompakte dobijene CS – 1,4 μm , 4,5 GPa i 0,95 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Istraživanja Mazaheri-ja i saradnika [258] dala su sledeće vrednosti veličine zrna, H i K_{IC} od 0,19 μm , 7,8 GPa i 1,92 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom, za kompakte sinterovane TSS i 1,7 μm , 7,06 GPa i 0,98 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom kod kompakata sinterovanih CS. Dobijene vrednosti za veličinu zrna, H i K_{IC} u sva tri ispitivanja jasno ukazuju na superiornost dvostepenog u odnosu na jednostepeno sinterovanje.

Thangamani i saradnici [259] su ispitali uticaj kalcinacije (800 i 1000 °C, uzorci obeleženi sa 800C i 1000C) i procesiranja (kalcinacija i zatim mlevenje tokom 6 h, uzorci 800P i 1000P) praha HAp-a i temperature sinterovanja (1000–1400 °C tokom 3 h) unijaksijalno presovanih (65 MPa) polaznih kompakata na denzifikaciju, mikrostrukturu i mehaničke osobine kompakata. Pokazalo se da kompakti nastali od procesiranih prahova (posebno 800P) ispoljavaju bolju denzifikaciju, uniformu mikrostrukturu i poboljšane mehaničke osobine (800P: $H = 6,3$ GPa na 1300 °C i $K_{\text{IC}} = 0,88$ $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$).

Ramesh i saradnici [262,263] su ispitivali sinterabilnost polaznih kompakata obrazovanih od komercijalnog praha (HAC), precipitaciono sintetisanog praha (HAW) i praha sintetisanog mehanohemijском metodom (HAM). Kompakti su unijaksijalno (1,3–2,5 MPa) pa izostatski presovani (200 MPa) a zatim sinterovani u temperaturnom opsegu od 1000 do 1400 °C tokom 2 h (brzina zagrevanja 2 °C \cdot min⁻¹). Ispostavilo se da je optimalna temperatura sinterovanja HAW kompakata 1100 °C pri kojoj je ostvarena relativna gustina od 99,8%, H od 7,04 MPa i K_{IC} od 1,22 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$. Druga dva kompakta, HAC i HAM, najbolje rezultate ostvarili su na 1300 °C sa gustinom od 98 i 95,5%, H od 5,47 i 4,73 GPa i vrednosti za K_{IC} od 0,75 i 0,82 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Oba istraživanja su pokazala da kompakt nastao od precipitacionog praha ima najbolju denzifikaciju i mehaničke osobine, pa se može zaključiti da gustina i veličina zrna određuju mehaničke osobine kompakata.

Muralithran i saradnici [267] su komercijalno dostupan HAp unijaksijalno presovali na 40 MPa a zatim izostatski presovali na 200 MPa. Dobijeni polazni kompakti sinterovani su konvencionalno pri brzini zagrevanja od 2 °C \cdot min⁻¹ na temperaturama od 1000 do 1450 °C tokom 2 h. Utvrđeno je da je optimalna temperatura sinterovanja 1250 °C pri kojoj je ostvarena gustina veća od 99%, veličina zrna od 2 μm i maksimalna tvrdoća od 6,08 GPa. Istraživači su zaključili da ne tako dobre mehaničke

osobine kompakata sinterovanih na temperaturama nižim od 1250 °C potiču od manje gustine, a iznad ove temperature zbog rasta zrna i transformacije HAp-a u TCP. Dakle, vrednost tvrdoće raste sa porastom gustine do neke kritične vrednosti veličine zrna, a zatim sa porastom veličine zrna opada iako gustina ostaje približno ista. Da transformacija HAp-a u β -TCP, i kasnije u α -TCP loše utiče na mehaniku kompakata zapaženo je i u drugim istraživanjima [270,271].

Dobijanje kompakata upotrebom toplog presovanja i konvencionalnog sinterovanja i poređenje ove dve tehnike bili su deo studije koju su ispitali Veljović i saradnici [272]. Za dobijanje polaznih kompakata koristili su nanočestični prah HAp-a koga su izostatski presovali na 400 MPa tokom 1 minuta. Prva grupa polaznih kompakata je konvencionalno sinterovana na 1000–1200 °C pri brzini zagrevanja od 20 °C·min⁻¹ i vremenu zadržavanja od 45 minuta do 8 h. Druga grupa polaznih kompakata je sinterovana metodom toplog presovanja pri konstantnom pritisku od 20 MPa i u struji argona na temperaturama 900, 950 i 1000 °C tokom 1 do 2 h. Najbolje rezultate ostvarili su kompakti toplo presovani na 950 °C tokom 1 h: veličina zrna 50 nm, $K_{IC} = 1,52 \text{ MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ i $H = 4,30 \text{ GPa}$. Isti polazni kompakti konvencionalno sinterovani na 1200 °C tokom 2 h pokazuju veličinu zrna od 3 μm , $K_{IC} = 0,28 \text{ MPa m}^{1/2}$ i $H = 2,39 \text{ GPa}$.

Boilet i saradnici [273] su koristili konvencionalno sinterovanje, a zatim toplo izostatsko presovanje u cilju dobijanja što gušćih biokeramičkih kompakata čistog HAp-a i β -TCP, kao četiri bifazne serije kompakata HAp/ β -TCP (BCP) masenog sastava: 20/80, 40/60, 60/40 i 80/20. Konvencionalno sinterovanje je sprovedeno u temperaturnom intervalu od 900 do 1250 °C pri brzini zagrevanja i hlađenja od 5 °C·min⁻¹ i sa vremenom zadržavanja od 5 h. U cilju dostizanja teorijskih gustina kompakti su zatim podvrgnuti toplom izostatskom presovanju u atmosferi Ar/O₂ (80/20 vol%) na temperaturama 1050 i 1100 °C pri brzini zagrevanja od 5 °C·min⁻¹ i pritisku od 160 MPa tokom 1 h. Posle CS na 1030 °C najveća vrednost relativne gustine od 99,8% dobijena je za kompakt dobijen od čistog TCP a sa povećanjem udela HAp-a relativna gustina opada sve do čistog HAp-a koji beleži najslabiju vrednost od 94,0%, dok se vrednost veličine zrna kreće od 1,83 μm za TCP do 0,79 μm za HAp. Ovaj rezultat ukazuje na negativan uticaj HAp-a na denzifikaciju BCP-a ali i pozitivan uticaj na sprečavanje rasta zrna. Posle toplog izostatskog presovanja svi uzorci su imali

teorijsku gustinu veću od 99,9% pri čemu nije došlo do promene veličine zrna. Najniža vrednost H određena je za kompakte dobijene od čistog TCP i iznosila je 4,9 GPa. Sa porastom udela HAp-a, vrednost tvrdoće raste sve do maksimalne od 6,1 GPa određene za kompakte dobijene od čistog HAp-a, pri čemu je vrednost K_{IC} za sve uzorke iznosila $1 \pm 0,1 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{1/2}$. Ova studija je pokazala da je moguće dobiti kompakte visoke gustine koji su sačinjeni od HAp i β -TCP faza, kao i čistih faza.

Svega nekoliko autora je predstavilo rezultate istraživanja mehaničkih karakteristika kompakata dobijenih od prahova HAp-a dopiranih pretežno jonima metala. Generalno, dopiranje HAp-a se vrši u cilju poboljšanja njegove biokompatibilnosti i/ili antimikrobne aktivnosti ili sinterabilnosti [157,158,245,247,256,266,274]. Tako su Veljović i saradnici [245] ispitivali uticaj dopiranja HAp-a jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} na sinterabilnost i strukturu kompakata. Dopiranje jonima Sr^{2+} je izvedeno u količini od 3,0 mol% i jonima Mg^{2+} sa 1,0 mol% u odnosu na Ca^{2+} . Sintetisani nanočestični prahovi su zatim izostatski presovani na 400 MPa tokom 1 minuta. Tako dobijeni polazni kompakti su sinterovani sledećim metodama: jednostepeno i dvostepeno mikrotalasno sinterovanje (MWSSS i MWTSS, redom) i konvencionalno sinterovanje (CSSS). U svim slučajevima brzina zagrevanja iznosila je $20 \text{ }^\circ\text{C} \cdot \text{min}^{-1}$, dok su se temperature sinterovanja i vremena zadržavanja razlikovali u zavisnosti od metode i to: a) uzorci su sinterovani MWSSS na temperaturama od 900 i 1200 $^\circ\text{C}$, tokom 15 minuta; b) primenom MWTSS uzorci su sinterovani na 950 $^\circ\text{C}$ u trajanju od 2 minuta nakon čega je temperatura sinterovanja snižena na 850 $^\circ\text{C}$ i uzorci su na toj temperaturi tretirani 10 minuta; c) istom metodom (MWTSS) uzorci su prvo žareni na 1050 $^\circ\text{C}$ (2 minuta), a zatim je temperatura snižena na 950 $^\circ\text{C}$ i uzorci su žareni 10 minuta i d) CSSS metodom uzorci su sinterovani na 1200 $^\circ\text{C}$ u trajanju od 2 h. U svim slučajevima sinterovanja dobijena je bifazna HAp/ β -TCP biokeramika i utvrđeno je da dopiranje jonima kao i metode sinterovanja i uslovi procesiranja bitno utiču na linearno skupljanje, gustinu, poroznost i mikrostrukturu kompakata. Takođe, u oba slučaja dopiranja, denzifikacija HAp-a je inhibirana u slučaju mikrotalasno sinterovanih kompakata što se može objasniti transformacijom HAp u TCP fazu. Maksimalne dobijene vrednosti H su 4,80 GPa za Sr-HAp i 4,78 GPa za Mn-HAp pri MWSSS1200, dok je vrednost K_{IC} $1,54 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{1/2}$ za Sr-HAp i $1,35 \text{ MPa} \cdot \text{m}^{1/2}$ za Mn-HAp pri CSSS1200.

Curran i saradnici [247] su precipitacionom metodom sintetisali HAp dopiran sa 5% i 10% Sr^{2+} jona. Uzorci su sinterovani mikrotalasno i konvencionalno na 1200 °C tokom 1 h. Zapaženo je da sa porastom stepena dopiranja raste relativna gustina i to nešto više tokom mikrotalasnog u odnosu na konvencionalno sinterovanje (~96% za 5% Sr^{2+} za MW naspram ~90% tokom CS i ~98% za 10% Sr^{2+} za MW naspram ~97% tokom CS) što je objašnjeno većom transformacijom HAp-a u TCP tokom CS. Isti trend zapažen je i u slučaju veličine zrna kao i tvrdoće sa vrednostima za 5% Sr^{2+} ~4,5 GPa (i MW i CS) i za 10% Sr^{2+} ~5,0 GPa (MW) i ~4,7 GPa (CS).

Gunawan i saradnici [266] su proučavali uticaj dopiranja Zn^{2+} jonima i uslova sinterovanja na udeo faza i mehaničke osobine Zn-BCP biokeramike. Uzorci su sinterovani sol-gel metodom pri čemu je koncentracija Zn^{2+} jona bila u opsegu od 0 do 15 mol%. Početni kompakti su dobijeni unijaksijalnim presovanjem prahova a zatim su podvrgnuti konvencionalnom sinterovanju u opsegu temperatura od 1000 do 1300 °C. Najbolje rezultate pokazali su kompakti dobijeni od praha u kome je molski udeo Zn^{2+} jona iznosio 4 mol%, na temperaturi sinterovanja od 1300 °C. Gustina ovih kompakata bila je ~96%, veličina zrna ~0,7 μm a vrednosti tvrdoće i žilavosti, 3,44 GPa i 1,43 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$, redom. Slabije mehaničke osobine ostalih kompakata objašnjavaju se transformacijom većeg dela HAp-a u β -TCP.

Bang i saradnici [256] su metodom precipitacije sintetisali HAp dopiran SiO_4^{4-} i CO_3^{2-} jonima (Si-HA i CHA, redom). Kompakti su dobijeni unijaksijalnim presovanjem na 60 MPa pa konvencionalnim sinterovanjem HA i Si-HA na 1200 °C tokom 2 h dok su kompakti polazeći od CHA sinterovani na 800 °C tokom 2 h u struji CO_2 kako bi se smanjilo izdvajanje karbonata iz strukture. Analiza uzoraka je pokazala da supstitucija povećava specifičnu površinu, odnos Ca/P, kao i rastvorljivost. Test sa MC3T3-E1 ćelijama pokazao je da supstitucija SiO_4^{4-} i CO_3^{2-} jonima poboljšava ćelijsku proliferaciju, diferencijaciju i mineralizaciju kosti. U ovom ispitivanju nisu analizirane mehaničke osobine kompakata.

Iz prethodno navedenih istraživanja može se zaključiti da mehaničke karakteristike kompakata veoma zavise od osobina polaznih prahova. Te osobine su pre svega: stehiometrija, tj. odnos Ca/P, fazni sastav, veličina čestica i stepen njihove aglomeracije, supstitucija raznim jonima i kristaliničnost. Zato je i način dobijanja polaznog praha prvi i veoma važan korak u ukupnom procesu dobijanja biokeramičkog

materijala. Kada se kao polazni prah koristi nanočestični HAp izborom pravilnog procesiranja mogu se dobiti kompakti čije veličine zrna su par stotina nanometara, što se pokazalo dobro tokom ispitivanja u *in vitro* uslovima sa humanim ćelijama [275,276]. Takođe, iako poroznost slabi mehaničke osobine kompakata, naročito kada su u pitanju pore nepravilnog oblika i većih dimenzija, moguće je dobiti kompakt sa dobrim mehaničkim karakteristikama ako su pore sfernog oblika [250]. Utvrđeno je i da mikroporoznost kao i neravnine na površini implanta, bilo da je u pitanju kompakt ili skafold, mogu značajno da utiču na ostvarenje veze implant–kost, jer i u *in vitro* i u *in vivo* uslovima poboljšavaju prijanjanje humanih ćelija na implant i njihovu proliferaciju i diferencijaciju što vodi stvaranju novog koštanog tkiva [276–278].

Kao i kompakti, i skafoldi moraju da zadovolje sledeće uslove kako bi se mogli upotrebiti u ulozi implanata: biokompatibilnost, netoksičnost implanta i produkata razgradnje, mehanički kontinuitet i razgradivost koja odgovara brzini stvaranja novog koštanog tkiva, bioaktivnost, sterilizabilnost i poroznost [279–281]. Glavna razlika između kompakata i skafolda je, pored mehaničkih karakteristika, upravo u poroznosti. Pri procesiranju kompakata istraživači nastoje da dobiju kompakte što boljih mehaničkih svojstava, pa shodno tome i manje poroznosti. S druge strane, prilikom dobijanja skafolda upravo veća poroznost je poželjna. Utvrđeno je da je za vaskularizaciju i urastanje koštanog tkiva neophodno da kalcijum–fosfatni skafoldi imaju pore koje su potpuno povezane i prečnika u opsegu od 100 do 700 μm , sa ukupnom poroznošću od 40 do 80% [282,283].

Za dobijanje skafolda koriste se: keramički materijali (kalcijum–fosfati, bioaktivna stakla i staklo–keramika), prirodni ili veštački polimeri, metalni materijali i kompoziti [284,285]. Nedostatak keramičkih materijala ogleda se u njihovoj krtošći i često, zavisno od vrste keramičkog materijala, maloj brzini degradacije. Polimerni skafoldi uglavnom imaju slabe mehaničke karakteristike koje su dodatno pogoršane velikom brzinom degradacije ovih materijala. Takođe, većina polimera se odlikuje lošom bioaktivnošću. Porozni metalni skafoldi imaju dobra mehanička svojstva, čak i suviše dobra u odnosu na koštano tkivo pa često dolazi do štetnog mehaničkog diskontinuiteta što za posledicu ima stvaranje fibroznog tkiva pored takvog implanta. Zbog veoma male brzine degradacije metalnih skafolda potrebna je dodatna operacija za

njihovo uklanjanje ili ostaju dugoročno u telu pacijenta i tada postoji bojazan od trovanja jonima metala usled korozije ovakvih implanata [285].

Postoje brojne tehnike za dobijanje skafolda [285–288]. Najznačajnije su:

- Tehnika izluživanja čestica (IČ) (particulate-leaching), koja se zasniva na mešanju materijala za formiranje pora koji se lako rastvara u vodi ili nekom drugom rastvaraču (npr. so, šećer itd.) i rastvora materijala od koga se formira skafold (polimer, keramički prahovi). Ovo je jednostavna metoda sa lakom kontrolom veličine pora i poroznosti, ali se oblik i povezanost pora ne mogu kontrolisati.
- Tehnika faznog razdvajanja (FR), zasniva se na termodinamičkoj nestabilnosti faza višekomponentnog sistema, pri čemu dolazi do ispiranja rastvorljivije faze. Nedostatak ove tehnike je mali prečnik i neuniformna raspodela pora. Postoji više varijanti ove tehnike za dobijanje skafolda a posebno je interesantna tehnika termički iniciranog faznog razdvajanja (TIPS), kojom se može dobiti skafold velike poroznosti i povezanosti pora.
- Tehnika replike polimernog suđera (RPS), kod koje se postupak dobijanja skafolda zasniva na prekrivanju zidova polimernog suđera suspenzijom keramičkog praha, vode i aditiva. Zatim se sprovodi sinterovanje malom brzinom zagrevanja u cilju uklanjanja polimernog suđera uz istovremeno kopiranje njegove strukture keramičkim materijalom. Prednost ove tehnike je dobijanje skafolda velike poroznosti i povezanosti pora koje imaju zadovoljavajući prečnik, dok je glavni nedostatak loša mehanička svojstva [286].
- Tehnike 3D štampanja (3D), koje postoje u više varijacija, a sve se odlikuju dobrom kontrolom veličine pora i njihove povezanosti. Glavni nedostaci su skupa oprema i neophodnost biomaterijala pogodnih karakteristika za primenu.

U tabeli 9 dat je pregled literaturnih podataka o skafoldima dobijenim od različitih materijala i primenom različitih tehnika. Navedeni su dostupni podaci za poroznost, mehanička svojstva i antimikrobnu aktivnost. Ono što nije navedeno a

postoji u velikom broju ovih istraživanja je i *in vitro* i *in vivo* ispitivanje sa ćelijama, humanim i životinjskim. Uopšte, ova istraživanja su pokazala da ćelijama pored dobre biokompatibilnosti materijala skafolda pogoduje veća poroznost, veća veličina pora i njihova povezanost.

Tabela 9. Literaturni podaci o skafoldima dobijenih od različitih materijala i primenom različitih tehnika procesiranja.

Skafold	Metoda dobijanja	Poroznost (%)	Veličina pora (μm)	Pritisna čvrstoća (MPa)	Jungov modul (GPa)	Antimikrobno delovanje
β -TCP [289]	3D	27,3–41,0	404–737	5,48–1,75	–*	–
β -TCP + 0,5% SiO ₂ + 0,25% ZnO [289]	3D	27,3–41,0	344–698	10,21–4,34	–	–
β -TCP [281]	MW-3D	50	400	10,95	–	–
HAp [290]	FR	65–85	165–218	16,3–1,7	2,9–0,8	–
HAp [291]	FR	60–38	~546	12–32	–	–
HAp [292]	FR	–	277–170	1,1–2,3	–	–
Chit/HAp [293]	FR	6,6	–	1,25	0,00046	–
Chit/glu/HAp [293]	FR	6,2	–	0,26	0,00025	–
CS/nHAp, 25/75% [294]	FR	79-83	~200–700	2,76–3,77	0,00052–0,00070	–
HAp/ β -TCP [288]	IČ	60–70	200–800	18–5	0,50–0,28	–
Si- α -TCP/HAp [295]	RPS	–	≤ 1000	5,7–3,4	–	–
HAp [296]	RPS	55–70	–	7,0–0,2	–	–
Ag-HAp [297]	FR	30-63	3–900	0,9-3,8	–	+
PLG [298]	FR	80, 85 i 92	–	0,26, 0,091 i 0,0047	–	–
HAp [299]	RPS i livenje	–	200–400	5	8	–
Cu–bioaktivno staklo [300]	RPS	–	300–500	–	–	+
80% HAp + 20% β -TCP [301]	RPS	70	400	–	–	–
HAp [302]	3D	41	250–350 i 2–8	34,4–23,4	–	–
(40% HAp + 60% β -TCP) prevučen HAp/PCL [303]	RPS	90,8	550	2,1	–	–
TCP skafold prevučen 5 % PCL [304]	RPS	70	300-800	2,41	–	–
Porozni Ta [305]	3D–Laser	27–55	200-2000	100–746	–	–
Porozni Ti [306]	3D–Laser	17–58	800	24–463	–	–

Chit ili CS – chitosan

Glu – β -1,3-glucan

PLG – poly (DL-lactide-co-glycolide)

PCL – polycaprolactone

*Oznaka "–" ukazuje da nije ispitano da li skafoldi imaju navedena svojstva.

EKSPERIMENTALNI DEO

6. Hidrotermalna sinteza prahova hidroksiapatita

Za sintezu čistog hidroksiapatita korišćene su sledeće hemikalije:

- $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Carlo Erba Reagenti, čistoće p.a.) [Ca],
- $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Šabac, čistoće p.a.) [K.III],
- $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Analitika Ltd, 99% čistoće) [P] i
- $\text{CO}(\text{NH}_2)_2$ (Lach-Ner, 99.5% čistoće) [Urea].

U tabeli 10 su prikazane mase reaktanata za dobijanje HAp-a sa molskim odnosom $\text{Ca}/\text{P} = 1,67$.

Kao izvor jona dopanata Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} korišćene su sledeće hemikalije:

- AgNO_3 (Lafoma Skopje, čistoće p.a.) za Ag-HAp,
- $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Zorka Šabac, čistoće p.a.) za Cu-HAp i
- $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kemika Zagreb, 99% čistoće) za Zn-HAp.

Udeo dopanata iznosio je $Y = 0,2$ i $0,4$ mol% u odnosu na Ca:

$$Y = [\text{M} / (\text{M} + \text{Ca})] \cdot 100, \quad (7)$$

sa konstantnim molskim odnosom u početnom rastvoru:

$$(\text{Ca} + \text{M})/\text{P} = 1,67 \quad (\text{M} = \text{Ag}, \text{Cu} \text{ ili } \text{Zn}). \quad (8)$$

Tabela 10. Mase reaktanata (g) korišćene za sintezu nedopiranog i dopiranih HAp prahova (HAp-1,67).

	Ca	K.III	P	Urea	AgNO_3	$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
HAp	11,81	11,18	4,68	12,00	–	–	–
Ag(0,2)HAp	11,78	11,18	4,68	12,00	0,0170	–	–
Ag(0,4)HAp	11,76	11,18	4,68	12,00	0,0340	–	–
Cu(0,2)HAp	11,78	11,18	4,68	12,00	–	0,0242	–
Cu(0,4)HAp	11,76	11,18	4,68	12,00	–	0,0483	–
Zn(0,2)HAp	11,78	11,18	4,68	12,00	–	–	0,0298
Zn(0,4)HAp	11,76	11,18	4,68	12,00	–	–	0,0595

Odgovarajuće količine reaktanata za sintezu čistog i dopiranih prahova HAp-a dodavane su i rastvarane (prema navedenom redosledu u tabeli 10, sa leva na desno) u stakleni sud napunjen sa 1500 ml destilovane vode. Stakleni sud sa pripremljenim

rastvorom za sintezu unet je u autoklav u koji je prethodno sipano 1500 ml destilovane vode u cilju uniformnog prenosa toplote i postizanja napona pare na temperaturi sinteze tako da destilovana voda iz reakcionog suda ne otparava tokom sinteze. Autoklav je zagrevan do 160 °C tokom 45 minuta, a onda držan na datoj temperaturi 2 h i 15 minuta. Nakon tog perioda autoklav je postepeno ohlađen na sobnu temperaturu i iz njega je izvađen reakcioni sud. Po završetku sinteze vrednost pH je iznosila oko 9,2. Istaloženi prahovi HAp-a, nedopiran i dopirani, odvojeni su filtracijom pomoću vakuuma, isprani destilovanom vodom, zatim osušeni u sušnici tokom 4 h na temperaturi od 105 °C i na kraju sprašeni u avanu.

Za dobijanje kompaktnih biokeramičkih formi odabrani su sledeći prahovi: HAp, Ag(0,2)HAp, Ag(0,4)HAp, Cu(0,4)HAp i Zn(0,4)Hap.

Polovina količine od svih sintetisanih prahova je termički tretirana na 1200 °C tokom 2 h u atmosferi vazduha pri brzini zagrevanja od 10 °C·min⁻¹ a zatim je ispitivana antimikrobna aktivnosti i biokompatibilnosti kalciniranih prahova.

Druga grupa prahova sa početnim odnosom Ca/P = 1,50 za nedopiran HAp, odnosno

$$(Ca+M)/(P+Si) = 1,50 \quad [M = 0, Ag, Cu, Ag+Cu \text{ ili } Ag+Zn] \quad (9)$$

za dopiran HAp, sintetisana je prema prethodno navedenoj proceduri, korišćenjem sledećih hemikalija:

- Ca(NO₃)₂·2H₂O (Prolabo chemicals, čistoće p.a.) [Ca],
- Na₂H₂EDTA·2H₂O (Prolabo chemicals, čistoće p.a.) [K.III],
- NaH₂PO₄·2H₂O (Prolabo chemicals, čistoće p.a.) [P] i
- Co(NH₂)₂ (Zorka Šabac, čistoće p.a.) [Urea] ,

za dobijanje nedopiranog HAp-a i:

- AgNO₃ (Merck, čistoće p.a.) [Ag],
- Cu(NO₃)₂·4H₂O (Merck, čistoće p.a.) [Cu],
- Zn(NO₃)₂·6H₂O (Kemika Zagreb, 99% čistoće) [Zn] i
- Si(OC₂H₅)₄ (TEOS - Fluka, čistoće ≥ 98%) kao izvor [Si],

kako bi se dobili dopirani prahovi.

Početna koncentracija dopanata u rastvoru iznosila je 0,4 mol% za Ag⁺ i Cu²⁺ kad je dopiranje vršeno samo jonima Ag⁺ ili samo jonima Cu²⁺, dok su, za dopiranje sa tri jona (AgCuSi i AgZnSi), početne koncentracije bile 0,2 mol% za Ag⁺ i 0,4 mol% za

Cu^{2+} i Zn^{2+} . U svim slučajevima dopiranja jonima Si^{4+} masa dodatog TEOS-a je odgovarala količini Si^{4+} koja bi teorijski zamenila 12,5% P. Pre dodavanja u reakcioni rastvor, 1 g TEOS-a je rastvoren u 15 g apsolutnog alkohola. Mase reaktanata potrebnih za sintezu prikazane su u tabeli 11. Ova grupa prahova, s obzirom na početni odnos Ca/P biće nadalje obeležena sa HAp-1,50.

Dopiranje silicijumom je sprovedeno u cilju stabilizacije TCP faza pri kalcinaciji praha, odnosno kasnije sinterovanju skafolda [295]. Pregledom literature [307–309] nađeno je da Si^{4+} joni imaju ulogu u biomineralizaciji i stimulaciji biološke aktivnosti, pa je dopiranje jonima Si^{4+} u sintezama izvedeno samostalno i zajedno sa jonima Ag^+ i Cu^{2+} odnosno Ag^+ i Zn^{2+} kako bi ispitali odvojeno uticaj dopiranja jonima Si^{4+} i ostalih ispitivanih jona na fizičko-hemijske i biološke osobine prahova.

Tabela 11. Mase reaktanata (g) korišćene za sintezu nedopiranog i dopiranih HAp-1,50 prahova.

Uzorak	Ca	K.III	P	Urea	Ag	Cu	Zn	Si
HAp	11,81	12,28	5,20	13,22	–	–	–	–
Si-HAp	13,40	12,28	5,20	13,22	–	–	–	1,0
Ag-HAp	11,76	12,28	5,20	13,22	0,0340	–	–	–
Cu-HAp	11,76	12,28	5,20	13,22	–	0,0483	–	–
AgCuSi-HAp	13,31	12,28	5,20	13,22	0,0193	0,0556	–	1,0
AgZnSi-HAp	13,31	12,28	5,20	13,22	0,0193	–	0,0675	1,0

Dobijeni prahovi su dalje termički tretirani na 1100 i 1150 °C tokom 2 h (pri brzini zagrevanja od 10 °C·min⁻¹) u cilju dobijanja kalciniranih prahova pogodnih za pripremu skafolda tehnikom replike poliuretanskog suđera.

7. Metode karakterizacije prahova hidroksiapatita (HAp–1,67)

7.1. Rendgenska difrakciona analiza

Fazni sastav sintetisanih i kalciniranih prahova određen je rendgenskom difrakcionom analizom (XRD) na uređaju ITAL Structures APD 2000 korišćenjem zračenja Cu K_{α} linije ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) u opsegu 2θ ugla od 20 do 65 ° sa korakom od

$0,05^\circ \text{ s}^{-1}$. Relativni udeo kristalne faze u prahovima (X_c) određen je prema Landi i saradnicima [310] korišćenjem jednačine (10):

$$X_c = 1 - (V_{112/300} / I_{300}) \quad (10)$$

gde je $V_{112/300}$ relativni intenzitet udoline između difrakcionih pikova (112) i (300) i I_{300} je relativni intenzitet difrakcionog pika (300) HAp-a.

Relativni sadržaj α -TCP (α -TCP(%)) u kalcinisanim prahovima je izračunat na osnovu sledeće jednačine (11):

$$\alpha\text{-TCP}(\%) = I_{170} / (I_{170} + I_{211}) \quad (11)$$

gde su I_{170} i I_{211} relativni intenziteti difrakcionih pikova (170) i (211), koji predstavljaju pikove najvećeg intenziteta faza α -TCP i HAp u difraktogramu, redom.

Veličina kristalita (D) HAp-a određena je iz refleksije (002) na $2\theta = 25,8^\circ$ koristeći Šererovu jednačinu (12):

$$D = K\lambda / \beta_m \cos\theta \quad (12)$$

gde je K koeficijent oblika i ima vrednost približno 1, λ je talasna dužina rendgenskog zračenja, β_m predstavlja širinu na poluvisini date refleksije u radijanima a θ je vrednost ugla difrakcije rendgenskog zračenja.

Parametri jedinične ćelije HAp-a (a i c (Å) i V (Å³)) određeni su upotrebom programa Jade 6.

7.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija sintetisanih i kalcinisanih prahova je proučavana skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju TESCAN Mira3 XMU pri naponu od 20 kV. Priprema za SEM analizu obuhvatala je nanošenje prahova u tankom sloju na nosače preko dvostruko lepljive provodne trake a zatim i neparavanje legurom zlato/paladijum u naparivaču tipa Polaron SC502 Sputter coater.

7.3. Energetska disperzivna spektroskopija

Semikvantitativni hemijski sastav sintetisanih i kalcinisanih prahova (Ca, P, Ag, Cu i Zn) određen je energetsom disperzionom spektroskopijom (EDS). EDS sačinjava SiLi detektor karakterističnih rendgenskih zraka i Isis 3.2 softverski paket (Oxford Instruments, UK) koji je povezan na više-kanalni analizator i SEM JEOL JSM 5800.

Ova metoda zasniva se na brojanju i razvrstavanju u masene i atomske procenete karakterističnih X-zraka emitovanih iz atoma hemijskih elemenata koji sačinjavaju uzorak. Do emisije X-zraka dolazi usled bombardovanja površine uzorka elektronskim snopom SEM-a, pri čemu pojedini elektroni bivaju izbačeni iz atoma a na njihovo mesto dolaze elektroni iz spoljnjih ljuski koji imaju višu energiju pa se taj višak energije emituje u vidu X-zraka sa tačno definisanim količinom energije za svaki hemijski element.

7.4. Infracrvena spektroskopska analiza

Određivanje karakterističnih hemijskih grupa u sintetisanim i kalcinisanim prahovima sprovedeno je infracrvenom spektroskopskom analizom na uređaju MB Boman Hartmann MB 100 u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} . Uzorci su pripremljeni mešanjem prahova i KBr u odnosu 1:150, redom, a zatim homogenizovani u ahatnom avanu i ispresovani u čeličnom kalupu.

7.5. Ispitivanje otpuštanja jona metala

Otpuštanje jona metala (Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+}) iz sintetisanih i kalcinisanih prahova je ispitivana u fosfatnom puferском rastvoru ($m(\text{Na}_2\text{HPO}_4) = 4,26 \text{ g}$ i $m(\text{KH}_2\text{PO}_4) = 2,72 \text{ g}$ u 1 l destilovane vode) na fiziološkoj vrednosti pH od 7,2. Odmerene količine od po 0,1 g svakog od prahova u PVC posudi zapremine 15 ml uravnotežavane su sa po 10,00 ml rastvora pufera na 37 °C u vodenom kupatilu Memert sa šejkerom. U vremenskim intervalima od 1, 4 i 24 sata suspenzije su ceđene kroz filter papir. Desorbovane količine jona metala u rastvoru su određene metodom atomske apsorpcione spektroskopije (AAS).

7.6. Simultana TG/DSC analiza

Termalne osobine hidrotermalno sintetisanih prahova su ispitane od sobne temperature do 1200 °C korišćenjem uređaja SDT Q600 TGA/DSC (TA instruments). Ova analiza je sprovedena pri brzini zagrevanja od 20 °C·min⁻¹ u atmosferi vazduha pri brzini protoka gasa od 100 cm³·min⁻¹.

8. Ispitivanje antimikrobnog delovanja prahova

Ispitivanje antimikrobnog delovanja sintetisanih i kalciniranih prahova su izvršena u *in vitro* uslovima primenom kvantitativnog testa određivanja procenta redukcije broja mikroorganizama u tečnom medijumu usled kontakta sa prahovima. Patogeni mikroorganizmi korišćeni u ovom testu su: gram-pozitivna *S. aureus* (ATCC 25923), dve gram-negativne; *E. coli* (ATCC 25922) i *P. aeruginosa* (ATCC 27833) i gljivica *C. albicans* (ATCC 24433) [157,158].

Određivanje procenta redukcije živih ćelija mikroorganizama je vršeno u sterilnom fosfatnom puferu (pH = 7,2) inokulisanom sa 0,1 ml inokuluma pojedinačnih indikatorskih kultura. Pre testa praškasti uzorci su sterilisani korišćenjem UV lampe da bi se izbegla zagađenja stranim mikroorganizmima. Po 0,1 g sintetisanih i kalciniranih prahova je dodato u epruvete koje su sadržavale 9,9 ml fosfatnog pufera i zatim inokulirane sa 0,1 ml kulture mikroorganizama koji su pripremljeni preko noći. Zatim su epruvete promešane i inkubirane u vodenom kupatilu sa šejkerom, na 37 °C. Nakon 1 h inkubacije, alikvoti od po 1 ml zapremine su uzeti za određivanje broja živih ćelija mikroorganizama. Određivanje broja preživelih mikroorganizama u epruvetama sa uzorcima je vršeno pripremom serije razblaženja u fiziološkom rastvoru (1:10) i prenošenjem alikvota od po 1 ml iz razblaženog rastvora u sterilne Petri kutije. Nakon preliivanja Petri kutija rastopljenom i ohladjenom čvrstom podlogom i nakon solidifikacije agara, Petri kutije su inkubirane na 37 °C. Prebrojavanje kolonija preživelih mikroorganizama je vršeno nakon 24 h, a rezultati su izražavani kao procenat redukcije broja mikroorganizama (R , %) koji je izračunat prema sledećoj formuli:

$$R (\%) = [(C_0 - C) / C_0] \quad (13)$$

gde je C_0 broj kolonija mikroorganizama posle kontakta sa kontrolnim uzorkom (nedopirani HAp), a C broj kolonija mikroorganizama posle kontakta sa dopiranim prahovima.

9. Analiza biokompatibilosti kalciniranih prahova

9.1. Čelijska linija

In vitro ispitivanja su izvršena na čelijskoj liniji humani fibroblasti pluća (MRC-5), koje rastu zalepljene za podlogu suda (Costar, 25cm³) u medijumu Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Gibco BRL, UK) sa 4,5 g·l⁻¹ glukoze i 10% FCS (fetal calf serum, Sigma). Medijum sadrži antibiotike: penicilin 100 IJ·ml⁻¹ i streptomycin 100 µg·ml⁻¹. Čelijska linija je održavana pod standardnim uslovima: na temperaturi od 37 °C u atmosferi zasićenoj vlagom sa 5% CO₂ (Heraeus). Presađivana je dva puta nedeljno a u eksperimentima je korišćena u logaritamskoj fazi rasta između trećeg i desetog presađivanja. U eksperimentima su korišćene samo žive (vijabilne) ćelije. Broj ćelija i njihova vijabilnost određeni su testom odbacivanja boje sa 0,1% tripan plavim [311,312]. Vijabilnost ćelija korišćenih u eksperimentu je bila veća od 90%.

9.2. Kolorimetrijski test sa tetrazolijum solima (MTT)

Ćelije sakupljene u logaritamskoj fazi rasta se tripsiniziraju, resuspenduju i izbroje u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petri šolje (50 mm, Center well, Falcon) u kojima su se nalazili ispitivani prahovi. Kontrolni uzorci ne sadrže ispitivane supstance. Petri šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ tokom 48 h. Po isteku inkubacije vrši se presejavanje ćelija sa ispitivanih supstanci u svež medijum. Vijabilne ćelije su posejane (5·10³·100µl⁻¹) u kvadriplikatu u mikrotitar ploče sa 96 otvora. Ploče sa zasejanim ćelijama ostavljaju se u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂ u trajanju od 48, 72, 96 h. Rastvor MTT, pripremljen neposredno pre dodavanja, dodat je u sve otvore na ploči u zapremini od 10 µl po otvoru i inkubacija je nastavljena naredna 3 h (u termostatu na 37 °C, sa 5% CO₂). Po isteku 3 h u svaki otvor je dodato po 100 µl 0.04 mol·dm⁻³ HCl u izopropanolu. Apsorbancija je očitavana odmah po isteku inkubacije na čitaču za mikrotitar ploče (Multiscan, MCC/340) na talasnoj dužini od 540 nm i referentnoj od 690 nm. Otvori na

ploči koji su sadržavali samo medijum i MTT, ali ne i ćelije, služili su kao slepa proba (Kontrola).

Frakcija preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema formuli:

$$\%K = (N_s / N_k) \cdot 100 \quad (14)$$

pri čemu je N_k broj ćelija kontrolnih uzoraka, a N_s broj ćelija uzoraka sa ispitivanom supstancom.

9.3. Test odbacivanja boje (DET)

Test odbacivanja boje (DET – Dye exclusion test) izveden je prema sledećoj proceduri. Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petri šolje (Center well, Falcon) na ispitivane prahove u koncentraciji $2 \cdot 10^5 \cdot \text{ml}^{-1}$. U kontrolnim uzorcima nije bilo supstanci. Petrijeve šolje sa zasejanim ćelijama ostavljene su u termostatu na 37°C , sa 5% CO_2 naredna 48 h. Po završenoj inkubaciji, ćelije su izbrojane uz pomoć invertnog mikroskopa u komoricama za brojanje. Korišćena je Neubauer-ova komorica gde se ćelije broje u četiri kvadrata. Svaki kvadrat je podeljen na 16 manjih kvadrata tako da ih ima ukupno 64. Dalje je odvojeno 100 μl ćelija i tome dodato 100 μl boje 0,1% tripan-plavo i posle intenzivnog mešanja nekoliko kapi je nanešeno na oba polja komorice za brojanje. Tripan-plavo boji mrtve ćelije, dok žive ćelije ostaju nebojene. Broj ćelija u 1 ml suspenzije se izračunava iz formule:

$$G = g \cdot 10 \cdot 2 \cdot 1000 \quad (15)$$

gde je: g - broj ćelija u 16 kvadrata (prosečan broj ćelija u 4·16 kvadrata), 10 - dubina komore, 2 - faktor razblaženja i 1000 - zapreminski koeficijent.

Udeo preživelih ćelija izražava se kao procenat od kontrolne vrednosti prema formuli 14.

9.4. Priprema za slikanje MRC-5 ćelija

Priprema za slikanje MRC-5 ćelija koje su bile u kontaktu sa medijumom ispitivanih prahova urađena je na sledeći način. Svi prahovi su stavljani u medijum bez seruma (DMEM) tako da je koncentracija bila $200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Nakon 72 h medijum je

profiltriran (zbog sterilnosti) i dodato je 10% seruma, tako da je taj medijum korišćen u svim ispitivanim uzorcima osim kontrolnih.

Ćelije su sakupljene u logaritamskoj fazi rasta, tripsinizirane, resuspendovane i izbrojane u 0,1% tripan plavom. Vijabilne ćelije su posejane u Petri šolje (50 mm, Center well, Falcon) sa medijumom koji je bio 72 h u kontaktu sa ispitivanim prahovima, u koncentraciji $2 \cdot 10^5 \text{ ml}^{-1}$. Kontrolni uzorci nisu sadržavali ispitivane supstance. Petri šolje sa zasejanim ćelijama su ostavljene u termostatu na 37°C , sa 5% CO_2 u toku 48 h. Po završenoj inkubaciji uzorci su slikani. Slikanje MRC-5 ćelija sprovedeno je pri uslovima niskog vakuuma (LVSEM - low vacuum SEM) korišćenjem uređaja JEOL-JSM 6460LV pri naponu filameta od 20 kV i pritisku u komori od 50 Pa.

10. Kompaktiranje HAp prahova presovanjem

10.1. Unijaksijalno presovanje

Sintetisani HAp prahovi (nedopirani i dopirani) su kompaktirani presovanjem na uniaksijalnoj presi, pri pritisku od 100 MPa tokom 1 minuta. Presovanje je izvršeno u čeličnom kalupu prečnika 8 mm.

10.2. Izostatsko presovanje

Nakon unijaksijalnog presovanja dobijene pilulice su izostatski presovane na 400 MPa tokom 1 minuta, u čeličnom kalupu prečnika 3,5 cm. Kao medijum za prenos pritiska korišćeno je hidraulično ulje. Ovaj postupak unijaksijalnog pa izostatskog presovanja je primenjen prema ranijem istraživanju [242] u kome je utvrđeno da se na ovaj način ostvaruje najveća gustina kompakta pre sinterovanja. Polazna gustina uniaksijalno pa izostatski ispresovanih kompakata određena je merenjem dimenzija i mase.

11. Tehnike sinterovanja za dobijanje biokeramičkih materijala

11.1. Konvencionalno sinterovanje

Konvencionalno sinterovanje kompakata je izvršeno u peći proizvođača “Elektron” (Srbija), pri brzini zagrevanja od $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ a na temperaturi od $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$ tokom 2 h. Nakon završetka procesa sinterovanja uzorci su izvađeni iz peći i ohlađeni na sobnoj temperaturi.

11.2. Mikrotalasno sinterovanje

Kompakti dobijeni presovanjem HAp-a, nedopiranog i dopiranog jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , sinterovani su u laboratorijskoj peći za mikrotalasno sinterovanje tipa Linn High Therm MHTD 1800-4,8/2, 45-135, na temperaturama od 900, 1200 i $1300\text{ }^{\circ}\text{C}$, tokom 15 minuta, pri brzini zagrevanja $20\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$. Ovaj tip mikrotalasne peći koristi šest magnetrona za zagrevanje. Temperatura uzoraka je merena optičkim pirometrom, koji je postavljen na vrhu peći. Nakon završetka procesa sinterovanja uzorci su hlađeni u peći tokom 1 h do temperature od $300\text{ }^{\circ}\text{C}$, a zatim izvađeni iz peći i hlađeni na sobnoj temperaturi.

12. Metode karakterizacije biokeramičkih materijala – kompakata

12.1. Određivanje gustine i relativnog linearnog skupljanja

Gustina konvencionalno i mikrotalasno sinterovanih kompakata određena je merenjem dimenzija i mase. Relativno linearno skupljanje kompakata tokom sinterovanja određeno je prema formuli 16:

$$L = [(d_0 - d) / d_0] \cdot 100 \quad (16)$$

gde je d_0 – prečnik kompakta na početku sinterovanja a d – prečnik kompakta na kraju sinterovanja.

12.2. Analiza mikrostrukture skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Skenirajućom elektronskom mikroskopijom (TESCAN Mira3 XMU) analizirana je mikrostruktura biokeramičkih kompakata sinterovanih konvencionalno i mikrotalasno. Za svaki od uzoraka analizirane su površina preloma i polirana površina kompakta. Površina preloma kompakta analizirana je kako bi se sagledala unutrašnja struktura kompakta, dok je polirana i termički nagrižena površina kompakta analizirana sa ciljem da se odrede veličine zrna koji izgrađuju kompakt. Posle poliranja i određivanja mehaničkih osobina, kompakti su termički nagrizani na temperaturi za 50 °C nižoj od temperature sinterovanja tokom 30 minuta. Na ovaj način otkrivene su granice zrna i njihovo analiziranje FESEM metodom je olakšano. I u ovom slučaju uzorci su zbog svoje prirodne neprovodnosti napareni tankim slojem Au-Pd legure pre FESEM analize.

12.3. Određivanje prosečne veličine zrna biokeramičkih materijala

Prosečne veličine zrna određene su sa mikrografa poliranih i termički nagriženih površina uzoraka metodom linearnog presecanja (linear intercept method). Ova metoda podrazumeva povlačenje pravih linija preko mikrografa uzorka i iz količnika dužine linije i broja granica zrna koja ta linija preseca dobija se srednja vrednost prečnika zrna za datu liniju. Što je veći broj linija za jedan mikrograf to je prosečna veličina zrna tačnije određena.

12.4. Rendgenska difrakciona analiza

Kompakti serija CS12 (konvencionalno sinterovani na 1200 °C) i MW13 (mikrotalasno sinterovani na 1300 °C) analizirani su pomoću rendgenske difrakcije praha na uređaju Bruker D8 Advance sa upotrebom monohromatora i korišćenjem zračenja Cu $K\alpha$ u opsegu ugla 2θ od 20 do 65 ° sa korakom od 0,02 °. XRD serija kompakata MW09 (mikrotalasno sinterovani na 900 °C) i MW12 (mikrotalasno sinterovani na 1200 °C) je snimljena difraktometrom Rigaku Ultima IV (bez

monohromatora) pomoću Cu $K\alpha$ zračenja u opsegu ugla 2θ od 20 do 65 ° sa korakom od 0,02 °.

Semikvantitativna analiza sastava sinterovanih kompakata (maseni procenat faza (mas.%) izvršena je pomoću programa Jade 6. Utačnjavanje podataka dobijenih rendgenskom difrakcijom izvršeno je u odnosu na standardne referentne JCPDS (The International Centre for Diffraction Data) kartice sa brojevima: 74-0566, 70-2065 i 29-0359 za HAp, β -TCP i α -TCP, redom.

12.5. Određivanje mehaničkih karakteristika kompakata

12.5.1. Određivanje tvrdoće

Tvrdoća dobijenih biokeramičkih materijala je određena Vickersovom metodom indentacije. Metoda se sastoji iz utiskivanja dijamantske igle sa vrhom u obliku četverostrane piramide u ispoliranu površinu uzorka. Površina se pre ispitivanja polira sa ciljem da se izbegne uticaj neravnina na pravac prostiranja pukotine. Nakon testa na površini ispoliranog uzorka se formiraju četverostrani otisci. Otisci su formirani delovanjem opterećenja na površinu uzorka u trajanju od 5 s na uređaju Buehler Indentament serije 1100. Za očitavanje otisaka je korišćen optički mikroskop.

Pomoću jednačine 17 i poznate dužine dijagonale otisaka izračunata je tvrdoća materijala [313]:

$$H = 1854,4 \cdot X \cdot (N \cdot 0,168)^{-2} \quad (\text{GPa}) \quad (17)$$

gde je: X – masa kojom se deluje (g), N – dužina dijagonale otiska (μm).

12.5.2. Određivanje žilavosti

Metoda se kao i kod određivanja tvrdoće sastoji iz utiskivanja dijamantske igle sa vrhom u obliku četverostrane piramide u ispoliranu površinu uzorka. Nakon testa na površini ispoliranog uzorka se formiraju pukotine koje kreću iz temena četverostranog otiska, a imaju pravac dijagonale. Dužina pukotina se koristi za izračunavanje žilavosti. Otisci su, kao i kod određivanja tvrdoće, formirani delovanjem opterećenja na površinu

uzorka u trajanju od 5 s na uređaju Buehler Indentament serije 1100. Za očitavanje otisaka je korišćen optički mikroskop.

Žilavost (K_{IC}) dobijenih biokeramičkih materijala je određena korišćenjem jednačine Evans-a i Charles-a [313]:

$$K_{IC} = 0,0824 P \cdot c^{-3/2} \quad (\text{MPa} \cdot \text{m}^{1/2}) \quad (18)$$

gde je: P – opterećenje (N), c – dužina pukotine (μm).

13. Metode karakterizacije prahova hidroksiapatita (HAp-1,50)

13.1. Rendgenska difrakciona analiza

Fazni sastav sintetisanih i kalcinisanih prahova određen je rendgenskom difrakcionom analizom (XRD) na uređaju ITAL Structures APD 2000 korišćenjem zračenja $\text{Cu } K_{\alpha}$ linije ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) u opsegu ugla 2θ od 20° do 60° sa korakom od $0.02^{\circ} \text{ s}^{-1}$.

13.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija sintetisanih i kalcinisanih prahova ispitana je SEM mikroskopijom na uređaju TESCAN Mira3 XMU pri naponu od 20 kV. Priprema za SEM analizu obuhvatala je nanošenje prahova u tankom sloju na nosače preko dvostruko lepljive provodne trake a zatim i neparavanje legurom Au/Pd u naparivaču tipa Polaron SC502 Sputter coater.

13.3. Energetska disperzivna spektroskopija

Semikvantitativni hemijski sastav hidrotermalno sintetisanih prahova (Ca, P, Ag, Cu i Zn) određen je energetsom disperzionom spektroskopijom (EDS). EDS sačinjava SiLi detektor karakterističnih rendgenskih zraka i Isis 3,2 softverski paket (Oxford Instruments, UK) koji je povezan na više-kanalni analizator i SEM JEOL JSM 5800.

Prahovi su za potrebe ove analize kompaktirani kako bi se tačnije odredio odnos Ca/P i sadržaj Ca i P i dopanata.

13.4. Infracrvena spektroskopska analiza

Određivanje hemijskih grupa u sintetisanim i kalcinisanim prahovima sprovedeno je infracrvenom spektroskopskom analizom na uređaju MB Boman Hartmann MB 100 u oblasti talasnih brojeva od 4000 do 400 cm^{-1} . Uzorci su pripremljeni mešanjem prahova sa KBr u odnosu 1:150, a zatim homogenizovani u ahatnom avanu i ispresovani u čeličnom kalupu.

13.5. Ispitivanje citotoksičnosti prahova kalcinisanih na 1150 °C

13.5.1. Priprema kondicioniranog medijuma hidroksiapatitnih materijala

Hidroksiapatitni materijali (HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp, AgZnSi-HAp) su rastvoreni u RPMI (Roswell Park Memorial Institute) medijumu (Sigma) bez seruma u koncentraciji od 200 $\text{mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. RPMI medijum se primenjuje za podržavanje rasta mnogih tipova kultivisanih ćelija. Nakon toga su rastvori materijala držani 72 h u inkubatoru na temperaturi od 37 °C i 0,5% CO_2 (Binder GmbH). Po završenoj inkubaciji, kondicionirani medijumi (KM) su centrifugirani 10 minuta na brzini od 2500 obrtaja radi uklanjanja čestica materijala. Do upotrebe u ogledima za ispitivanje citotoksičnosti, KM su čuvani na 4 °C. Neposredno pre dodavanja u ćelijsku kulturu, medijumima je dodat fetalni teleći serum (FBS, Sigma) u koncentraciji od 10%. Medijumima je dodata 5 mM NaOH kako bi pH-vrednost iznosila približno 7 [314].

13.5.2. Kultivacija ćelija

Pre izvođenja testova citotoksičnosti, L929 ćelijska linija (NCTC klon, ATCC, Rockwell) je odmrznuta i propagirana kroz najmanje tri pasaže. Propagiranje ćelija je izvedeno u flaskovima od 25 cm^2 , na 37 °C u kompletnom RPMI medijumu. Kompletan RPMI medijum sadrži 10% fetalnog telećeg seruma, antibiotike (gentamicin – 10 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, penicilin – 100 IU, streptomycin – 100 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$, Galenika) i 2-merkaptoetanol (50 μM , Sigma). Tripsinizacija ćelija je izvršena sa 0,25% tripsin-EDTA rastvorom (Sigma). Nakon svake tripsinizacije, analizirana je vijabilnost ćelija

brojanjem u 0,2% rastvoru Tripan-plavog (Sigma). U testovima su korišćene ćelije čija je vijabilnost veća od 95%.

L929 ćelije (1×10^4 ćelija u 200 μ l) su zasejane u mikrotitarskim pločama sa 96 mesta (Costar) 48 h pre izvođenja testova. Neposredno pre dodavanja KM, iz bazena mikrotitarskih ploča je uklonjen stari medijum, a na ćelije je dodato po 100 μ l KM. Ćelije su potom kultivisane 24 h na 37 °C [314].

13.5.3. Merenje metaboličke aktivnosti ćelija

L929 ćelije su kultivisane 24 h u triplikatima bazena mikrotitarskih ploča u prisustvu različitih koncentracija KM (100%, 50%, 25% i 12,5%). Po završenoj inkubaciji, kompletan supernatant ćelijskih kultura je uklonjen i zamenjen sa 100 μ l rastvora 3-4,5-dimetiltiazol-2-il -2,5-difeniltetrazolium bromida (MTT) ($0,5 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, Sigma) u kompletnom RPMI medijumu. Ćelije su potom kultivisane 4 h na 37 °C, nakon čega je u bazene mikrotitarske ploče dodata podjednaka zapremina 10% natrijum–dodecil–sulfata (Sigma) u 0,01M HCl. Kvantifikacija formazana sa karakterističnom crveno-ljubičastom bojom je izvršena nakon 24 h kultivacije, očitavanjem optičke gustine uzoraka (OD) na 570 nm primenom automatskog čitača mikrotitarskih ploča (DV – 990-BV Microplate Reader). Metabolička aktivnost je izražena kao relativna vrednost u odnosu na kontrolne ćelije koje su kultivisane sa svežim kompletnim RPMI medijumom, čija je redukcija MTT uzeta kao mera 100% metaboličke aktivnosti [315].

$$\text{metabolička aktivnost (\%)} = \frac{\text{OD ćelija sa kondicioniranim medijumom}}{\text{OD ćelija sa svežim kompletnim medijumom}} \times 100 \quad (19)$$

13.5.4. Merenje proliferacije ćelija

L929 ćelije su kultivisane 24 h u triplikatima bazena mikrotitarskih ploča u prisustvu različitih koncentracija KM (100%, 50%, 25% i 12,5%). Ćelijama je dodat $^3\text{[H}^+]$ -timidinom ($1 \mu\text{Ci/bazen}$, $6,7 \text{ Ci} \cdot \text{mM}^{-1}$, Amersham) 8 h pre isteka kultivacije. Po isteku inkubacije ćelije su odvojene od podloge tripsinizacijom. Nivo radioaktivnosti koji

odgovara proliferaciji ćelija je potom očitana na beta scintilacionom brojaču (Beckman, LKB-1219 Rackbeta). Rezultati su izraženi kao proliferativna aktivnost ćelija koja je izračunata na osnovu radioaktivnosti ćelijskih kultura (cpm – broj otkucaja u minutu) sa KM i kontrolnih ćelija koje su kultivisane u svežem kompletnom RPMI medijumu, čija je radioaktivnost uzeta kao mera 100% proliferacije [316].

$$\text{proliferativna aktivnost (\%)} = \frac{\text{cpm kultura sa kondicioniranim medijumom}}{\text{cpm kultura sa svežim kompletnim medijumom}} \times 100 \quad (20)$$

13.5.5. Merenje produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS)

L929 ćelije su kultivisane 24 h u triplikovima bazena mikrotitarskih ploča u prisustvu KM (100% koncentracija – kondicioniranje 200 mg·ml⁻¹). Nakon isteka inkubacije, supernatant ćelijskih kultura je uklonjen, ćelije su isprane i dodatno kultivisane 30 minuta sa 2'-7'-di-hlorodihidro fluorescein diacetatom (DCFH-DA, 1 μM, Sigma) u RPMI medijumu bez seruma. Nakon toga ćelije su isprane u PBS-u, tripsinizirane i analizirane na protočnom citofluorimetru (CyFow® Cube6, Partec). Produkcija ROS-a je merena na osnovu intenziteta fluorescencije ćelija obeleženih sa DCFH-DA. Rezultati su izraženi kao srednje vrednosti intenziteta fluorescencije (MIN) i relativne vrednosti produkcije ROS-a. Relativne vrednosti su određivane u odnosu na kontrolne ćelije koje su kultivisane u svežem kompletnom RPMI medijumu, i njihove vrednosti ROS-a su uzete kao mera 100% produkcije [317].

$$\text{produkcija ROS (\%)} = \frac{\text{MIN vrednosti ćelija sa kondicioniranim medijumom}}{\text{MIN vrednosti ćelija sa svežim kompletnim medijumom}} \times 100 \quad (21)$$

13.5.6. Analiza ćelijske nekroze

13.5.6.1. Obeležavanje ćelija propidijum-jodidom

L929 ćelije su kultivisane 24 h u triplikovima bazena mikrotitarskih ploča u prisustvu KM (100% koncentracija – kondicioniranje 200 mg·ml⁻¹). Nakon toga su ćelije odvojene od podloge tripsinizacijom i inkubirane 5 minuta na sobnoj temperaturi

propidijum–jodidom (PI) ($40 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, Sigma). Čelije su potom isprane u PBS-u i analizirane na protočnom citofluorimetru. Čelije koje su obojene sa PI su nekrotične čelije usled narušavanja integriteta ćelijske membrane. Rezultati su izraženi kao procenat nekrotičnih ćelija (PI pozitivnih ćelija).

13.5.6.2. Merenje produkcije laktat dehidrogenaze

Nakon 24 h kultivacije u prisustvu KM ($200 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$) supernatanti četvoroplakata ćelijskih kultura L929 su sakupljeni i analizirani za prisustvo laktat dehidrogenaze (LDH). Kao mera potpune (100%) nekroze korišćena je kultura sa 1% rastvorom deterdženta Triton X-100 (Serva). Nivo LDH je određen primenom komercijalog ADVIA 1800 sistema (ADVIA 1800, Clinical Chemistry System, Siemens). Rezultati su izraženi kao količina LDH u internacionalnim jedinicama po litru [318].

13.5.7. Statistička analiza

Za analizu statističke značajnosti između više nezavisnih uzoraka korišćena je analiza varijanse (ANOVA) sa Bonferroni–jevim testom višestrukog poređenja. Statistički značajnim smatrane su vrednosti $p < 0,05$. Za statističku analizu korišćen je Graph Pad Prism softver (La Jolla, Kalifornija).

14. Dobijanje skafolda tehnikom replike poliuretanskog suđera

Nedopirani i dopirani prahovi HAp-a dobijeni hidrotermalnom sintezom pri početnom odnosu Ca/P = 1,50 koji su zatim kalcinirani na 1100 i 1150 °C tokom 2 h pri brzini zagrevanja od $10 \text{ }^\circ\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ korišćeni su za dobijanje skafolda tehnikom replike poliuretanskog suđera.

Ova tehnika zasniva se na potapanju poliuretanskog suđera odgovarajućeg oblika u suspenziju pripremljenu od destilovane vode, polivinil alkohola (PVA) i kalcinisanog praha. PVA se koristi kao vezivno sredstvo a maseni sastav suspenzije za prekrivanje poliuretanskog suđera bila je: 65% vode, 2,5% PVA i 32,5% praha [295].

Iz poliuretanskog sušera dobro natopljenog u suspenziji istisne se višak suspenzije a zatim ostavi da se suši na sobnoj temperaturi tokom 24 h. Nakon sušenja, uzorci su termički tretirani na 800 °C pri brzini zagrevanja od 2 °C·min⁻¹ i time je obezbeđeno dovoljno vremena da poliuretanski sušer sagori i produkti sagorevanja budu uklonjeni iz skafolda bez narušavanja njegove strukture. Posle 800 °C sinterovanje se nastavlja pri brzini zagrevanja od 5 °C·min⁻¹ do krajnje temperature od 1300 ili 1400 °C na kojoj se skafold sinteruje tokom 2 h.

Skafoldi su obeleženi slovima: H, S, A, C, AC i AZ, koja predstavljaju HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp, redom, iza kojih slede dve cifre od kojih prva može biti 0 ili 5 i predstavlja temperaturu kalcinacije praha od 1100 ili 1150 °C, redom, a druga 3 ili 4 i predstavlja krajnju temperaturu sinterovanja skafolda, 1300 ili 1400 °C, redom. Tako oznaka AC54 predstavlja skafold koji je dobijen od hidrotermalno sintetisanog praha AgCuSi-HAp kalcinisanog na 1150 °C a sam skafold je sinterovan na temperaturi od 1400 °C.

Nakon sinterovanja skafoldi su držani 14 dana u simuliranom telesnom fluidu (SBF – simulated body fluids [319]) što predstavlja svojevrsan test biokompatibilnosti [320] i moguće ojačavanje zidova skafolda kristalizacijom HAp-a iz SBF-a. Posudice sa SBF-om i skafoldima su za to vreme bile uronjene u vodeno kupatilo na 37 °C. Zbog pretpostavljenog iscrpljivanja jona iz SBF-a usled kristalizacije HAp-a na zidove skafolda sadržaj SBF-a u posudicama je menjan na svaka tri dana.

15. Metode karakterizacije skafolda

15.1. Rendgenska difrakciona analiza

Fazni sastav materijala koji sačinjavaju skafolde serije 54 (H54, S54, A54, C54, AC54 i AZ54) određen je rendgenskom difrakcionom analizom (XRD) na uređaju ITAL Structures APD 2000 korišćenjem zračenja Cu K_α linije ($\lambda = 1,54178 \text{ \AA}$) u opsegu ugla 2θ od 20 do 60 ° sa korakom od 0,02 °·s⁻¹ i korišćenjem kompjuterskog programa Jade 6.

15.2. Analiza mikrostrukture skenirajućom elektronskom mikroskopijom

Morfologija površine zidova skafolda posle njihovog boravka u SBF-u proučavana je skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM) na uređaju TESCAN Mira3 XMU pri naponu od 10 kV. Priprema za SEM analizu obuhvatala je lepljenje skafolda na nosače preko dvostruko lepljive provodne trake a zatim i neparavanje legurom Au/Pd u naparivaču tipa Polaron SC502 Sputter coater.

15.3. Određivanje poroznosti i mehaničkih karakteristika

Poroznost skafolda je određena posle boravka u SBF-u na osnovu formule (22):

$$P = 1 - (G.S./G.M.) \quad (22)$$

u kojoj je G.S. – gustina skafolda određena preko merenja mase i dimenzija skafolda a G.M. – gustina materijala koji izgrađuje dati skafold. S obzirom da za sve skafolde nije određen fazni sastav aproksimirano je da skafolde izgrađuju faze HAp, β -TCP i α -TCP (teorijskih gustina: 3,156, 3,067 i 2,863 g·m⁻³, redom [247]) sa masenim udelom od 33,3%. Najveća greška koja se ovom aproksimacijom pravi je manja od 0,4% i ona je sabrana sa standardnom devijacijom.

Mehaničke karakteristike skafolda testirane su univerzalnom mašinom za testiranje (Schimadsu Universal testing machine, slika 58) pri brzini pritiskanja od 5 mm·min⁻¹ a do 15% utiskivanja u skafold u odnosu na njegovu početnu visinu. Merene su vrednosti maksimalne sile (N) koju pri tim uslovima skafoldi izdržavaju, pritisna čvrstoća (MPa) i Jungov modul elastičnosti (MPa) skafolda.

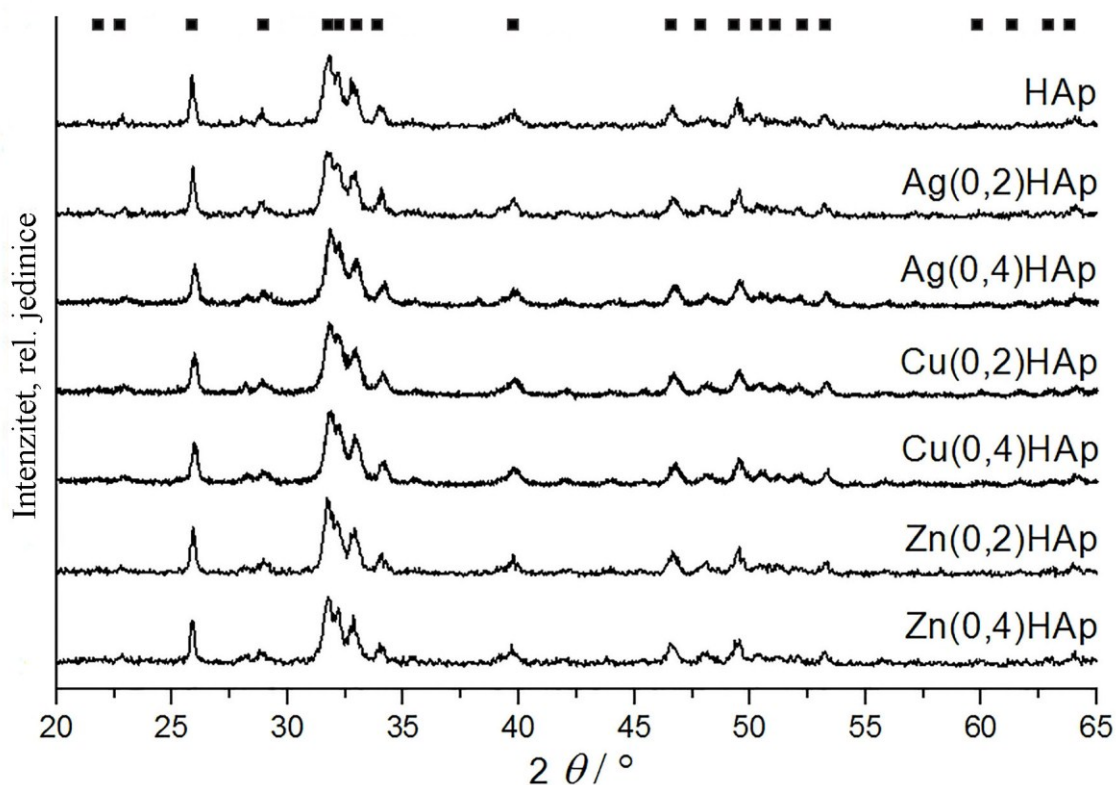
15.4. Ispitivanje antimikrobnog delovanja skafolda

Ispitivanje antimikrobnog delovanja odabranih serija skafolda posle dve sedmice provedene u SBF-u (H04, H53, H54, S04, S53, S54, AC04, AC53, AC54, AZ04, AZ53 i AZ54) izvršena je primenom kvantitativnog testa određivanja procenta redukcije broja mikroorganizama *in vitro* u tečnom medijumu tokom izlaganja materijalu skafolda. Patogeni mikroorganizmi korišćeni u ovom testu su: gram-pozitivna *S. aureus* (ATCC 25923) i gram-negativna *E. coli* (ATCC 25922). Metodologija određivanja redukcije broja mikroorganizama (*R*, %) opisana je u poglavlju 8. a proračun je urađen prema jednačini 13.

REZULTATI I DISKUSIJA

16. Karakterizacija hidrotermalno sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-1,67

Na slici 14 prikazani su rezultati rendgenske difrakcione analize hidrotermalno sintetisanih prahova. Dati difraktogrami pokazuju samo pikove koji odgovaraju karakterističnim pikovima hidroksiapatita (PDF kartica 9-432). Uticaj dopiranja jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} nije jasno izražen a do istog zaključka došli su i istraživači koji su dopirali HAp većim udelom ovih jona [212–216,321,322]. Intenzitet i širina pikova ukazuju da su sintetisani prahovi u velikoj meri amorfni što potvrđuju izračunate vrednosti veličine kristalita (tabela 12) i male kristaliničnosti (Tabela 13). Udeo kristalne faze je nešto manji kod dopiranih prahova u odnosu na HAp, osim u slučaju dopiranja jonima Zn^{2+} .



Slika 14. Rendgenska difrakciona analiza hidrotermalno sintetisanih prahova HAp-1,67. Položaj većih pikova HAp-a označeni su simbolom ■.

Pomoću Šererove jednačine izračunate veličine kristalita pokazuju da dopirani prahovi, izuzev $\text{Zn}(0,2)\text{HAp}$, imaju nešto veće kristalite (tabela 12). Takođe, povećanje sadržaja dopanta u početnom reakcionom rastvoru dovodi do povećanja kristalita za

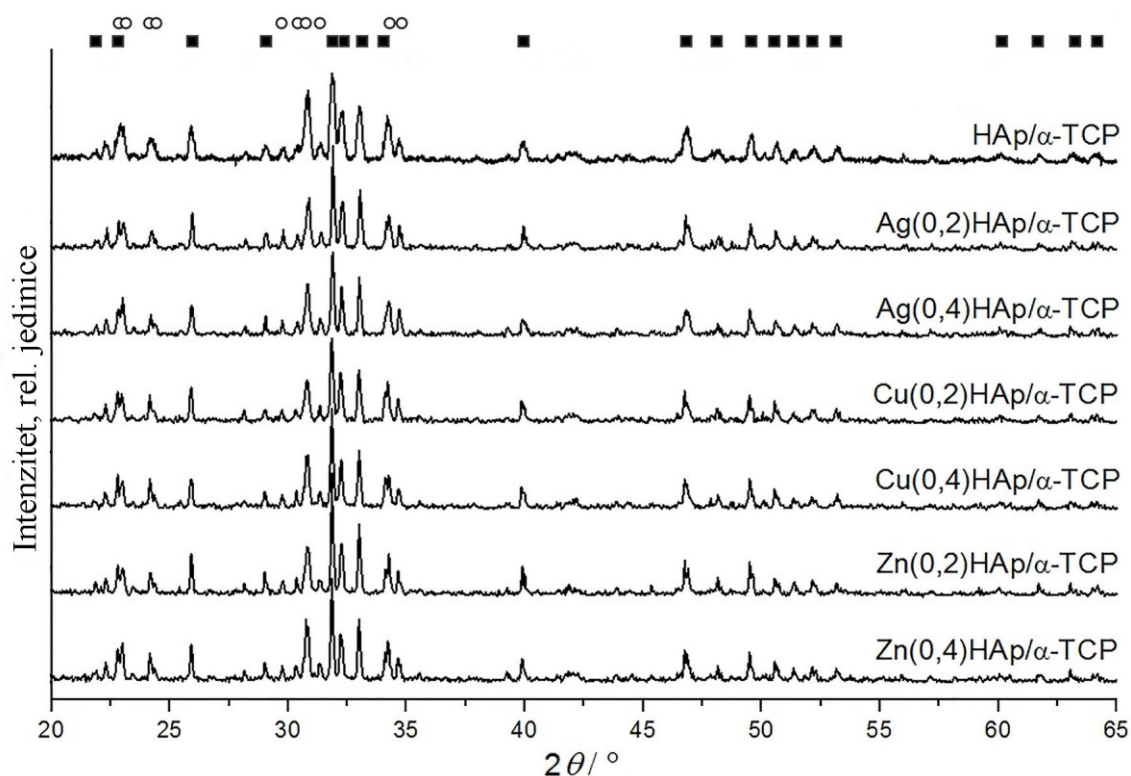
slučajeve dopiranja jonima Ag^+ i Zn^{2+} i smanjenja pri dopiranju jonima Cu^{2+} . Istovremeno, zapremine jediničnih ćelija dopiranih prahova su nešto veće, izuzev $\text{Zn}(0,4)\text{HAp}$, od zapremine jedinične ćelije nedopiranog praha (tabela 12).

Tabela 12. Veličina kristalita (D) i parametri jedinične ćelije (HAp-1,67).

Uzorci	2θ (002)	β_m (rad)	D (002) (nm)	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)
HAp1,67	25,882	0,00537	29,5	9,4440(4)	6,8862(3)	531,89(4)
Ag(0,2)HAp	25,889	0,00518	30,5	9,4327(5)	6,8749(6)	529,76(5)
Ag(0,4)HAp	25,995	0,00502	31,5	9,4231(3)	6,8679(5)	528,14(3)
Cu(0,2)HAp	25,978	0,00495	32,0	9,4321(6)	6,8680(3)	529,16(4)
Cu(0,4)HAp	25,963	0,00504	31,4	9,4247(4)	6,8664(3)	528,20(4)
Zn(0,2)HAp	25,887	0,00563	28,1	9,4332(2)	6,8821(3)	530,37(3)
Zn(0,4)HAp	25,868	0,00495	32,0	9,4476(2)	6,8824(4)	532,01(4)

Difraktogrami kalciniranih prahova na 1200 °C tokom 2 h (Slika 15) pokazuju pikove HAp-a i α -TCP (PDF kartica 09-348). Uticaj dopiranja jonima metala nije jasno izražen ni u ovom slučaju, ali vrednosti za približni udeo α -TCP faze i kristaliničnost uzoraka ukazuju na uticaj dopiranja (Tabela 13). Kristaliničnost dopiranih HAp/ α -TCP uzoraka je nešto veća od kristaliničnosti nedopiranog HAp/ α -TCP, izuzev uzoraka sa Zn^{2+} jonima i $\text{Cu}(0,4)\text{HAp}/\alpha$ -TCP. Generalno, kristaliničnost kalciniranih prahova znatno je veća od kristaliničnosti sintetisanih prahova. Iz vrednosti udela α -TCP u kalciniranim prahovima može se zaključiti da dopiranje negativno deluje na transformaciju HAp-a u α -TCP. Čak je primetno da manji udeo dopiranja (0,2 mol.%) ima negativniji uticaj na pomenutu transformaciju.

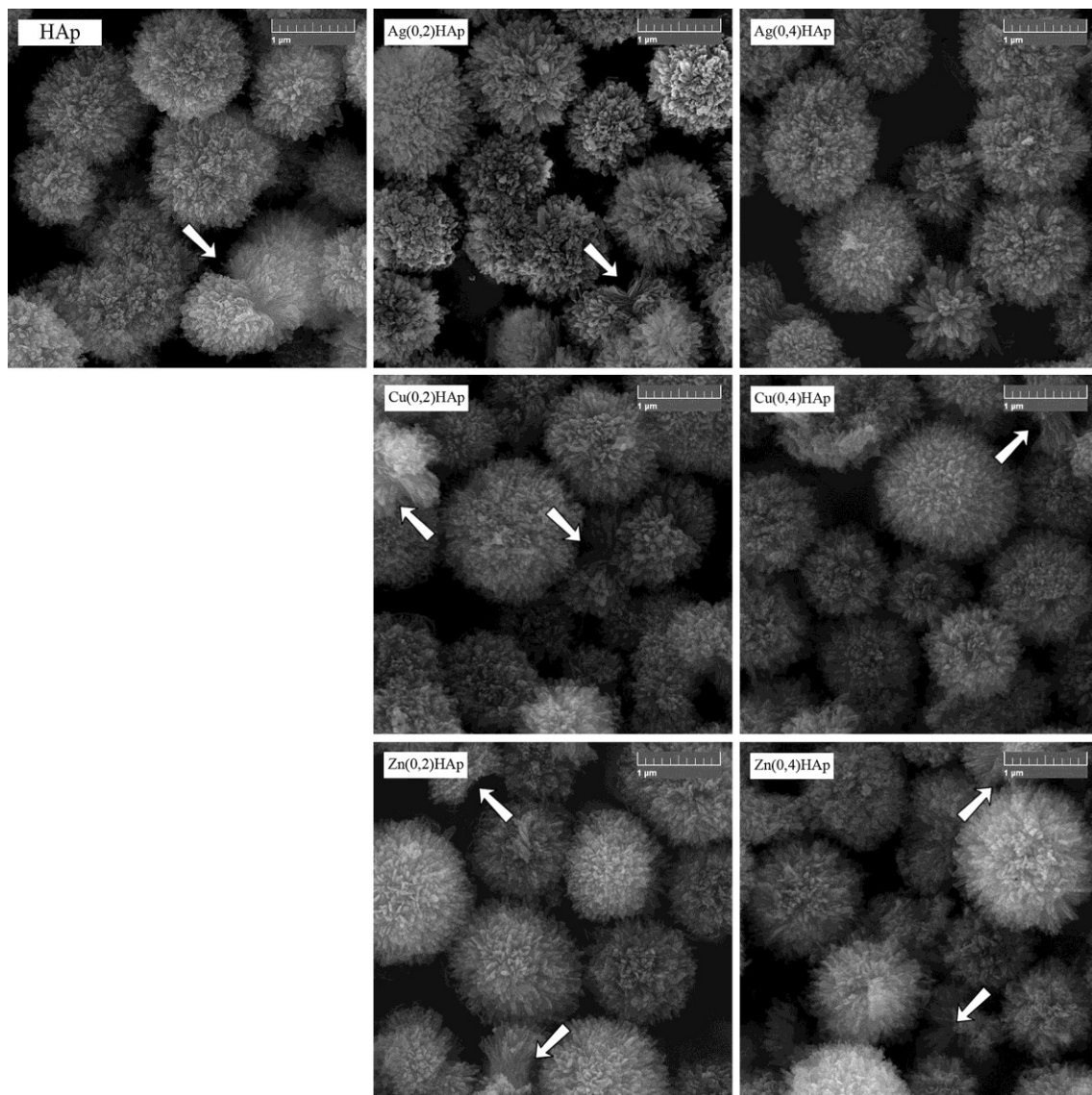
Kao što je već navedeno, jedinična ćelija HAp-a sadrži deset Ca^{2+} katjona raspoređenih u dva različita okruženja. U Ca(I) okruženju nalaze se četiri Ca^{2+} katjona i oni su okruženi sa devet atoma kiseonika (Ca(I)–O rastojanja: 0,241, 0,245 i 0,281 nm) dok je u Ca(II) okruženju smešteno šest katjona povezanih sa sedam kiseonikovih atoma (Ca(II)–O rastojanja: 0,236, 0,239 i 0,251 nm) [129,133].



Slika 15. Rendgenska difrakciona analiza kalciniranih prahova HAp-1,67 na 1200 °C. Položaj većih pikova faza: HAp i α -TCP označeni su simbolima ■ i ○, redom.

Pri većoj količini dopanata, zamena Ca^{2+} jona u poziciji Ca(II) je energetski više favorizovana, kao što je pokazano zamenom Ca^{2+} jonima Pb^{2+} , Sr^{2+} , Zn^{2+} i Cd^{2+} [123–126]. Međutim, pri dopiranju manjom količinom dopanata, uglavnom se zamenjuju Ca^{2+} joni koji su smešteni u Ca(I) okruženju [123–126]. U predstavljenom slučaju, supstitucija Ca^{2+} jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} se odvija pri niskim koncentracijama dopanata. Može se pretpostaviti da na stabilnost strukture HAp-a utiče da li joni Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} više supstituišu jone Ca^{2+} u poziciji Ca(I) ili u poziciji Ca(II) što kao posledicu daje razliku u procentu transformacije HAp-a u α -TCP (tabela 13).

FESEM mikrofografije hidrotermalno sintetisanih nedopiranog i dopiranih HAp prahova prikazane su na slici 16. Svi prahovi sastoje se od pretežno sferičnih aglomerata koji se sastoje od velikog broja štapićastih nanočestica. U najvećem broju prečnik ovih štapićastih čestica je < 100 nm, dok se njihova dužina ne može tačno odrediti. Naime, primećeni su i sferni aglomerati koji su očigledno šuplji. Ipak, prema obliku sfera pretpostavlja se da je većina sfera puna što bi značilo da dužina čestica maksimalno može biti jednaka poluprečniku sfera.

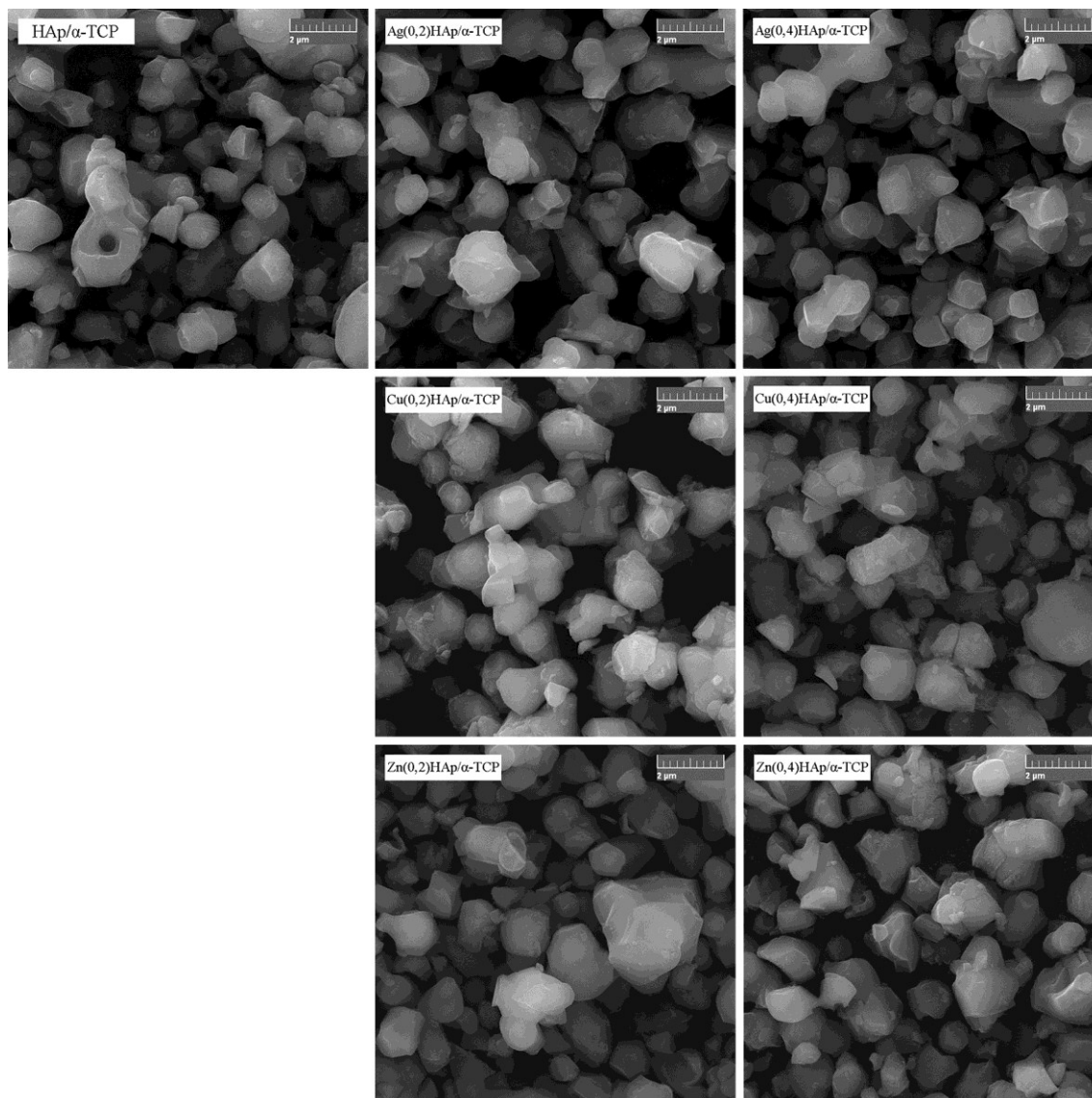


Slika 16. Hidrotermalno sintetisani nedopirani i dopirani prahovi HAp-1,67 (uvećanje 10 kx, bar = 1 μm).

Srednji prečnik aglomerisanih sfera (d) za sve prahove određen je na mikrografima manjeg uvećanja merenjem preko 150 sfera i ti podaci su predstavljeni u tabeli 13.

Pored sfernih agregata, u znatno manjoj meri na mikrografima se uočavaju i štapićaste čestice povezane u snopove (na slici 16 označeni strelicama). Velika je verovatnoća da su ovi snopovi početni stadijum u procesu povezivanja štapićastih čestica da bi krajnji rezultat bio preovlađujući sferni agregati.

Slika 17 prikazuje mikrografije prahova kalcinisanih na 1200 $^{\circ}\text{C}$ tokom 2 h. S obzirom da su difraktogrami ovih prahova pokazali da se oni sastoje od HAp i α -TCP



Slika 17. Mikrografije prahova HAp-1,67 kalciniranih na 1200 °C tokom 2 h.

faza, tako su i obeleženi uz prefiks jona kojim su dopirani prahovi i njihovim početnim molskim udelom u odnosu na Ca.

Za sve kalcinirane prahove je karakteristično da je sferičnost aglomerisanih čestica narušena, i te štapićaste čestice od kojih su sfere izgrađene se ne raspoznaju. Tako obrazovane mikronske čestice nepravilnog oblika često su i međusobno povezane u veoma različite forme kroz obrazovanje „vratova“ između njih. Dimenzije ovako nastalih čestica nisu određivane. Uticaj dopiranja na morfologiju nije primetan ni na jednoj od slika dopiranih kalciniranih prahova. Takođe, HAp i α -TCP faze se ne mogu

razlikovati na ovim mikrografijama što ukazuje da su one izmešane na molekulskom nivou, što je potvrđeno i nekim ranijim studijama [6].

U tabeli 13 su predstavljene vrednosti srednjeg prečnika (d) sfernih čestica nedopiranih i dopiranih prahova HAp-a. Dopiranje Ag^+ jonima vodi obrazovanju nešto većih sfernih agregata nego u slučaju nedopiranog HAp-a dok dopiranje Zn^{2+} jonima, a naročito Cu^{2+} jonima utiče na formiranje manjeg prečnika sfernih agregata u odnosu na nedopiran HAp. Vrednosti za kristaliničnost (X_c) i približan sadržaj α -TCP (α -TCP(%)) su već ranije komentarisane.

Tabela 13. Srednji prečnik (d) sfernih čestica nedopiranih i dopiranih prahova HAp, kristaliničnost (X_c), približan sadržaj α -TCP (α -TCP(%)) u kalcinisanim uzorcima i rezultati EDS analize (odnos (Ca+M)/P i atomski udeo dopanta (M) u uzorcima).

Uzorak	d (μ m)	X_c	α -TCP(%)	(Ca+M)/P	M (at. %)
HAp	1,30±0.28	0,49	-	1,61±0,04	-
Ag(0,2)HAp	1,38±0.26	0,49	-	1,73±0,04	0,22±0,03
Ag(0,4)HAp	1,36±0.30	0,39	-	1,66±0,01	0,55±0,06
Cu(0,2)HAp	1,19±0.26	0,40	-	1,56±0,07	0,34±0,04
Cu(0,4)HAp	1,21±0.28	0,45	-	1,56±0,08	0,38±0,05
Zn(0,2)HAp	1,23±0,14	0,57	-	1,54±0,03	0,41±0,04
Zn(0,4)HAp	1,28±0,16	0,54	-	1,58±0,05	0,54±0,08
HAp/ α -TCP	-	0,92	45,08	1,55±0,03	-
Ag(0,2)HAp/ α -TCP	-	0,95	33,61	1,73±0,03	0,09±0,04
Ag(0,4)HAp/ α -TCP	-	0,96	38,57	1,73±0,02	0,05±0,02
Cu(0,2)HAp/ α -TCP	-	0,94	33,59	1,76±0,04	0,08±0,03
Cu(0,4)HAp/ α -TCP	-	0,92	35,08	1,61±0,09	0,33±0,13
Zn(0,2)HAp/ α -TCP	-	0,93	28,21	1,64±0,07	0,17±0,09
Zn(0,4)HAp/ α -TCP	-	0,92	37,76	1,68±0,04	0,23±0,11

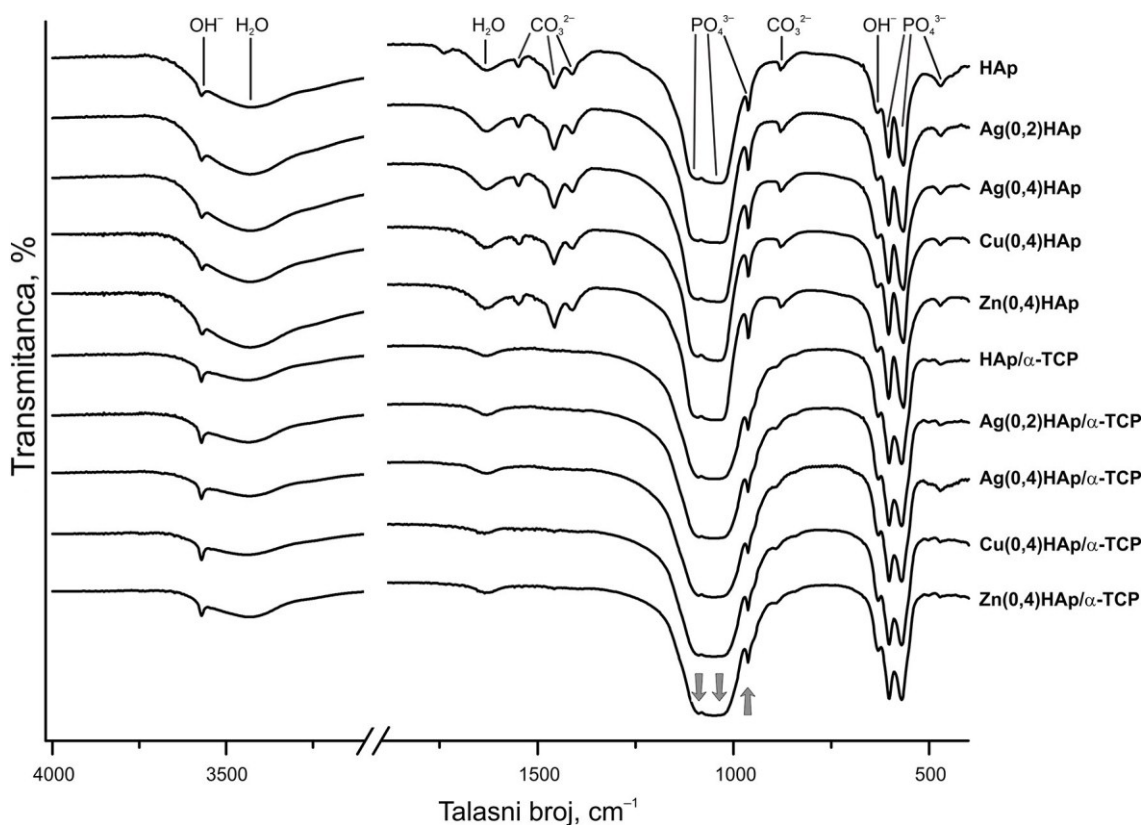
EDS analizom određene su koncentracije elemenata Ca, P, i Ag, Cu ili Zn u pripremljenim prahovima. Rezultat je izražen u atomskim % (at.%). Izuzev Cu(0,4)HAp/ α -TCP u seriji kalciniranih prahova, uzorci dopiranih HAp prahova pokazuju veći udeo dopanata Ag^+ , Cu^{2+} ili Zn^{2+} , ali te rezultate treba uzeti u razmatranje obazrivo. Naime, EDS analiza nije kvantitativna metoda i može se navesti da je potvrđeno prisustvo jona Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , ali je greška određivanja udela elemenata koji su prisutni u malim koncentracijama velika, pa se zato ne može tvrditi da su izmerene vrednosti pouzdane.

Rezultati EDS analize pokazuju da je (Ca+M)/P odnos kod sintetisanih prahova pretežno ispod vrednosti za stehiometrijski HAp, osim u slučaju Ag(0,2)HAp. Kod kalciniranih prahova ovaj odnos je veći za prahove dopirane jonima Ag^+ i Cu(0,2)HAp/ α -TCP i Zn(0,4)HAp/ α -TCP. Podaci pokazuju da su pretežno sintetisani Ca deficitarni hidroksiapatiti (CDHAp) koji se kalcinacijom jednim delom transformišu u stehiometrijski HAp i α -TCP. Dopiranje negativno deluje na pomenutu transformaciju pa dopirani kalcinirani prahovi imaju veće vrednosti (Ca+M)/P.

FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-1,67 prikazani su na slici 18. Spektri uzoraka sa manjim sadržajem jona Cu^{2+} i Zn^{2+} nisu prikazani jer su veoma slični spektrima uzoraka sa većim sadržajem jona, a u cilju jasnijeg prikaza na slici 18. Široki pikovi na oko 3400 i 1630 cm^{-1} mogu se pripisati istezanju i savijanju OH veze u molekulu vode, redom. Slab pik na oko 962 cm^{-1} i dva intenzivna pika na oko 1045 i 1090 cm^{-1} odgovaraju redom $\nu_1(\text{PO})$ simetričnoj i $\nu_3(\text{PO})$ asimetričnoj vibraciji. Navedeni simetrični pik na 962 cm^{-1} jasno se uočava na spektrima sintetisanih prahova, a slabije u slučaju kalciniranih prahova. Promena pika na 962 cm^{-1} i širenje pikova na oko 1045 i 1090 cm^{-1} kod kalciniranih prahova objašnjava se transformacijom HAp-a u TCP (pikovi na slici 18 označeni sivim strelicama) [323].

Zbog savijanja OPO-grupe (ν_4 i ν_2) javljaju se dva jaka pika na oko 569 i 602 cm^{-1} i jedan slab pik na 472 cm^{-1} . Pikovi na oko 3570 i 632 cm^{-1} mogu se pripisati vibracijama istezanja (ν_s) i relaksacije/opuštanja (ν_L) OH^- -grupe HAp-a, redom. Ove vibracije su karakteristične za HAp prahove [244,324] i vidljive su i u spektrima kalciniranih prahova. Pik na oko 880 cm^{-1} predstavlja $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ vibraciju savijanja, dok pikovi na 1411, 1457 i 1548 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ vibracijama

istežanja. Da bi se postigla odgovarajuća pH-vrednost za dobijanje praha, u navedenim hidrotermalnim sintezama je korišćena urea. Razlaganje uree dovodi do stvaranja CO_3^{2-} -jona koji su *in situ* ugrađeni u strukturu HAp-a [325]. Prema literaturi, termičkim tretiranjem karbonatnih HAp prahova na temperaturama višim od $1100\text{ }^\circ\text{C}$ dovodi do uklanjanja karbonatnih jona iz uzoraka [326]. Slab pik na oko 880 cm^{-1} ($\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$) može se uočiti na spektrima kalciniranih prahova, što ukazuje da dekarbonizacija u slučaju ovih prahova nije do kraja sprovedena. Pikovi na 1457 i 1548 cm^{-1} potiču od jona CO_3^{2-} koji menjaju pojedine jone OH^- (A-tip), dok pikovi na oko 880 i 1411 cm^{-1} potiču od jona CO_3^{2-} koji menjaju pojedine jone PO_4^{3-} (B-tip). Prema tome, hidrotermalno sintetisani prahovi HAp-1,67 su AB karbonatni hidroksiapatiti.



Slika 18. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-1,67.

Pomoću AAS određena je koncentracija otpuštenih jona Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} iz sintetisanih i kalciniranih prahova u fosfatnom puferском rastvoru (pH 7,2) na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$ a tokom 1, 4 i 24 h i ti rezultati su predstavljeni u tabeli 14. Otpuštanje jona Zn^{2+} nije detektovano što upućuje na zaključak da su se ovi joni

ugradili na po njih povoljna mesta pa je i otpuštanje ovih jona ispod minimuma detekcije AAS metode. Što se tiče otpuštanja jona Ag^+ i Cu^{2+} jasno je da se više jona otpusti iz sintetisanih prahova a dosta manje iz kalcinisanih. Takođe, u svim slučajevima je otpuštanje jona Ag^+ veće nego otpuštanje jona Cu^{2+} . Prema Nightingale i saradnicima [327], poluprečnik hidratisanih jona za Ca^{2+} , Cu^{2+} i Ag^+ su 0,412 nm, 0,419 nm i 0,341 nm, redom, što upućuje na zaključak da je za Ag^+ jone mnogo povoljnije iz rastvora tokom sinteze da zamene jone Ca^{2+} u HAp-u. Međutim, poluprečnici jona u kristalnoj rešetci za Ca^{2+} , Cu^{2+} i Ag^+ su 0,099 nm, 0,072 nm i 0,126 nm, redom, pa prema ovome za Ag^+ jone je mnogo teže da se zadrže u strukturi HAp-a nego za Cu^{2+} jone. S druge strane, Ca(II) pozicija u strukturi α -TCP (dužina Ca(II)–O veza je oko 0,268 nm, a sam Ca(II) je okružen sa šest kiseonikovih atoma) [328] je znatno pogodnija za supstituciju nego Ca(I) i Ca(II) pozicije u HAp-u pa je najverovatnije ovo jedan od uzroka slabijeg otpuštanja jona metala iz kalcinisanih HAp/ α -TCP prahova u odnosu na sintetisane HAp prahove. Takođe, površina čestica kalcinisanih prahova je usled termičkog tretmana manje pogodna za otpuštanje jona za razliku od površine aglomerisanih sfera sintetisanih prahova (slike 16 i 17).

Tabela 14. Test otpuštanja jona (mg jona / g dopiranog HAp ili HAp/ α -TCP).

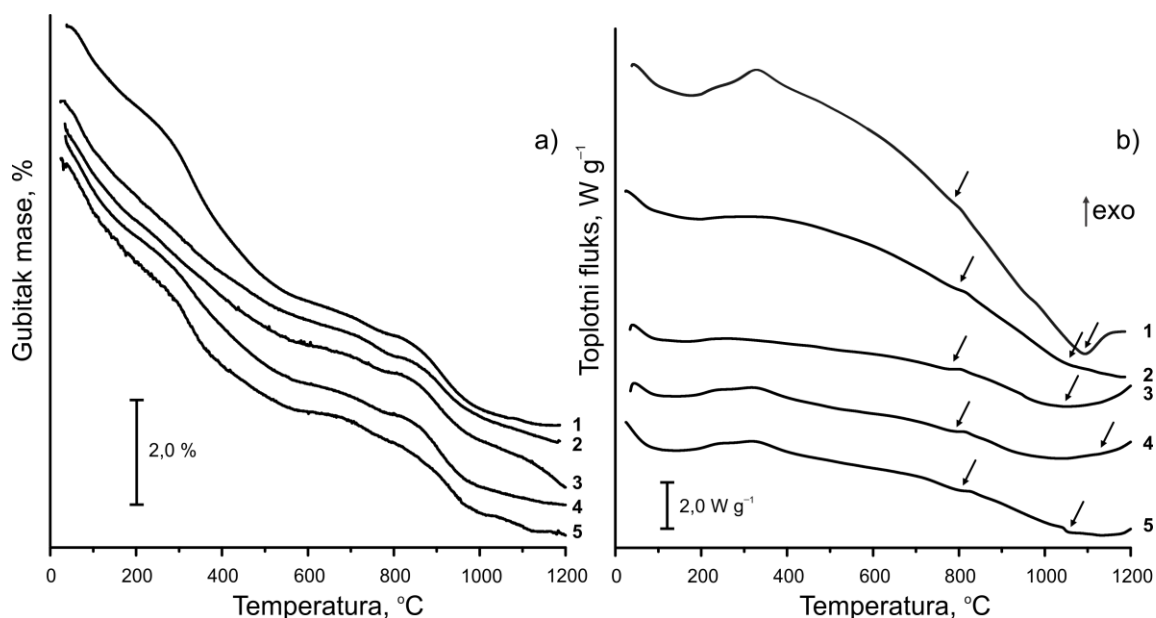
* Otpuštanje jona Zn^{2+} nije detektovano.

Vreme (h) → Uzorak	1	4	24
Ag(0,2)HAp	0,0032	0,0057	0,0057
Ag(0,4)HAp	0,0069	0,0079	0,0082
Cu(0,2)HAp	0,0008	0,0008	0,0032
Cu(0,4)HAp	0,0008	0,0025	0,0050
Ag(0,2)HAp/ α -TCP	0,0006	0,0019	0,0013
Ag(0,4)HAp/ α -TCP	0,0006	0,0013	0,0019
Cu(0,2)HAp/ α -TCP	0,0008	0,0008	0,0008
Cu(0,4)HAp/ α -TCP	0,0008	0,0008	0,0008

Poredeći količine otpuštenih jona posle 1 h i posle 24 h za prahove dopirane istim udelom jona Ag^+ , odnosno jona Cu^{2+} , zaključuje se da je količina otpuštenih jona posle 24 h zanemarljivo veća. Ovo konstantno otpuštanje jona metala u malim

količinama obezbeđuje odgovarajuću akumulaciju jona za antimikrobnu aktivnost tokom dužeg vremenskog perioda. Takođe, najveće koncentracije otpuštenih jona određene ovim testom daleko su ispod toksičnih koncentracija za humane ćelije, koje za Ag^+ jone iznose $10 \text{ mg}\cdot\text{l}^{-1}$ [190].

Termogravimetrijska analiza i diferencijalna skenirajuća kalorimetrija (TGA/DSC) prikazuju termičko ponašanje prahova sintetisanih pri Ca/P odnosu od 1,67 (slika 19). Ova analiza je urađena u opsegu temperatura od 20 do 1200 °C, a ispitani su prahovi: HAp, Ag(0,2)HAp, Ag(0,4)HAp, Cu(0,4)HAp i Zn(0,4)HAp. Navedeni prahovi su odabrani kao polazne supstance za dobijanje kompaktnih biomaterijala, pa su upravo zbog toga oni analizirani ovom metodom.



Slika 19. a) TG i b) DSC krive sintetisanih prahova izabranih za dobijanje kompakata:
1 – HAp, 2 – Ag(0,2)HAp, 3 – Ag(0,4)HAp, 4 – Cu(0,4)HAp i 5 – Zn(0,4)HAp.

Prema TG krivama (slika 19 a), tokom zagrevanja prahova 1–5 do 1200 °C gubitak mase je relativno mali i iznosi oko 7 %. DSC krive pokazuju endotermne pikove u opsegu od 774 do 800 °C i ovi pikovi se mogu pripisati transformaciji HAp-a u β -TCP (slika 19 b). Najnižu temperaturu ove transformacije pokazuje prah 3 (774 °C), temperatura transformacije prahova 1, 2 i 4 je na oko 780 °C, dok se transformacija praha 5 dešava tek na 800 °C. Daljim zagrevanjem prahova 1–5 do 1200 °C dolazi do transformacije β -TCP faze u α -TCP fazu, što potvrđuje i XRD difrakcija (slika 15 i tabela 13). Ova transformacija dešava se na oko 1055 °C za prahove 2, 3 i 5, za prah 1

na 1095 °C, dok do transformacije praha 4 dolazi na 1130 °C. DSC analiza ukazuje da dopiranje Ag⁺ i Zn²⁺ jonima snižava temperaturu transformacije β-TCP faze u α-TCP fazu u odnosu na čist HAp za razliku od dopiranja Cu²⁺ jonima koje otežava ovu transformaciju, tj. pomera je ka višim temperaturama.

U ovom istraživanju, ispitana je antimikrobna aktivnost dopiranih uzoraka u odnosu na tri bakterijske vrste: jedne gram-pozitivne *S. aureus* (ATCC 25923) i dve gram-negativne *E. coli* (ATCC 25922) i *P. aeruginosa* (ATCC 27833) i gljivice *C. albicans* (ATCC 24433) (tabela 15). Ovi mikroorganizmi izabrani su kao najčešći uzročnici infekcija kod ljudi a navedene kolekcije ATCC sojeva su izabrane kako bi se uporedili rezultati sa prethodnim studijama [231,223,232,233].

Tabela 15. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dopiranih HAp i HAp/α-TCP prahova.

Uzorak	<i>S. aureus</i>		<i>E. coli</i>		<i>P. aeruginosa</i>		<i>C. albicans</i>	
	Broj kolonija	R / %	Broj kolonija	R / %	Broj kolonija	R / %	Broj kolonija	R / %
Kontrola	6,0 x10 ⁶		6,4 x10 ⁶		1,0x10 ⁷		5,4x10 ⁶	
HAp	2,2 x10 ⁴		1,9x10 ⁵		6,4x10 ⁶		1,0x10 ⁶	
Ag(0,2)HAp	0	100	1,0 x10 ³	99,5	8,7x10 ⁴	98,6	4,5x10 ⁴	95,5
Ag(0,4)HAp	0	100	3,0x10 ³	98,4	8,3x10 ⁴	98,7	2,0x10 ²	100
Cu(0,2)HAp	1,0x10 ²	99,5	1,5x10 ⁴	92,1	8,1x10 ⁵	87,3	6,5x10 ⁵	35,0
Cu(0,4)HAp	1,6x10 ²	99,3	4,0x10 ³	97,9	1,6x10 ⁵	97,5	1,5x10 ⁵	85,0
Zn(0,2)HAp	2,2x10 ³	90,0	9,1x10 ⁴	52,1	5,3x10 ⁵	91,7	2,9x10 ⁵	71,0
Zn(0,4)HAp	9,6x10 ²	95,6	3,6x10 ⁴	81,1	2,0x10 ⁵	96,9	2,8x10 ⁵	72,0
Kontrola	8,40x10 ⁴		6,36x10 ⁴		2,0x10 ⁶		1,4x10 ⁶	
HAp/α-TCP	2,53x10 ⁴		3,15x10 ⁴		7,0x10 ⁵		1,1x10 ⁵	
Ag(0,2)HAp/α-TCP	4,33x10 ²	98,3	1,5x10 ³	95,2	1,0x10 ²	100	3,0x10 ²	99,7
Ag(0,4)HAp/α-TCP	6,7x10 ¹	99,7	1,62x10 ²	99,5	3,0x10 ²	100	4,0x10 ²	99,6
Cu(0,2)HAp/α-TCP	1,14x10 ²	99,6	6,72x10 ²	97,9	3,0x10 ³	99,6	3,0x10 ³	97,3
Cu(0,4)HAp/α-TCP	1,25x10 ²	99,5	1,62x10 ³	94,9	9,0x10 ²	99,9	1,8x10 ³	98,4
Zn(0,2)HAp/α-TCP	1,86x10 ²	99,3	8,06x10 ²	97,4	1,9x10 ³	99,7	7,2x10 ³	93,5
Zn(0,4)HAp/α-TCP	2,61x10 ²	100	1,21x10 ³	96,2	1,0x10 ²	100	5,7x10 ³	94,8

Svakako da bi upotreba kliničkih sojeva izolovanih iz inficiranih pacijenata pokazala stvarnu biološku aktivnost dopiranih prahova HAp-a u medicinskoj praksi i to bi mogao biti predmet istraživanja u budućim antimikrobnim studijama.

Prahovi Cu(0,2)HAp i Zn(0,2)HAp pokazuju najslabija antimikrobna svojstva. Ovaj nalaz je očekivam s obzirom na udeo dopiranih jona kod datih prahova, a i joni Ag⁺ imaju bolje antimikrobno dejstvo što potvrđuju ranija istraživanja [223,231–233]. Uopšteno, antimikrobna aktivnost raste sa porastom sadržaja jona u dopiranim HAP i HAP/ α -TCP prahovima, a takav trend je uočen i u literaturi [208,210,212–216,219,222].

Li i saradnici [223] i Stanić i saradnici [233] otkrili su da je tokom antibakterijskog testa, nedopiran HAp doveo do smanjenja broja ćelija u poređenju sa slepom probom. I dok Li tvrdi da je HAp izazvao smrt bakterija, Stanić pretpostavlja da se mikroorganizmi adsorbuju na čestice HAp-a i tako uklonjaju iz sistema. U skladu sa ovim, stepen redukcije broja kolonija (R (%)) je izračunat u odnosu na nedopirani HAP i nedopirani HAP/ α -TCP, prema jednačini 13, kako bi se pokazao samo efekat dopiranih jona.

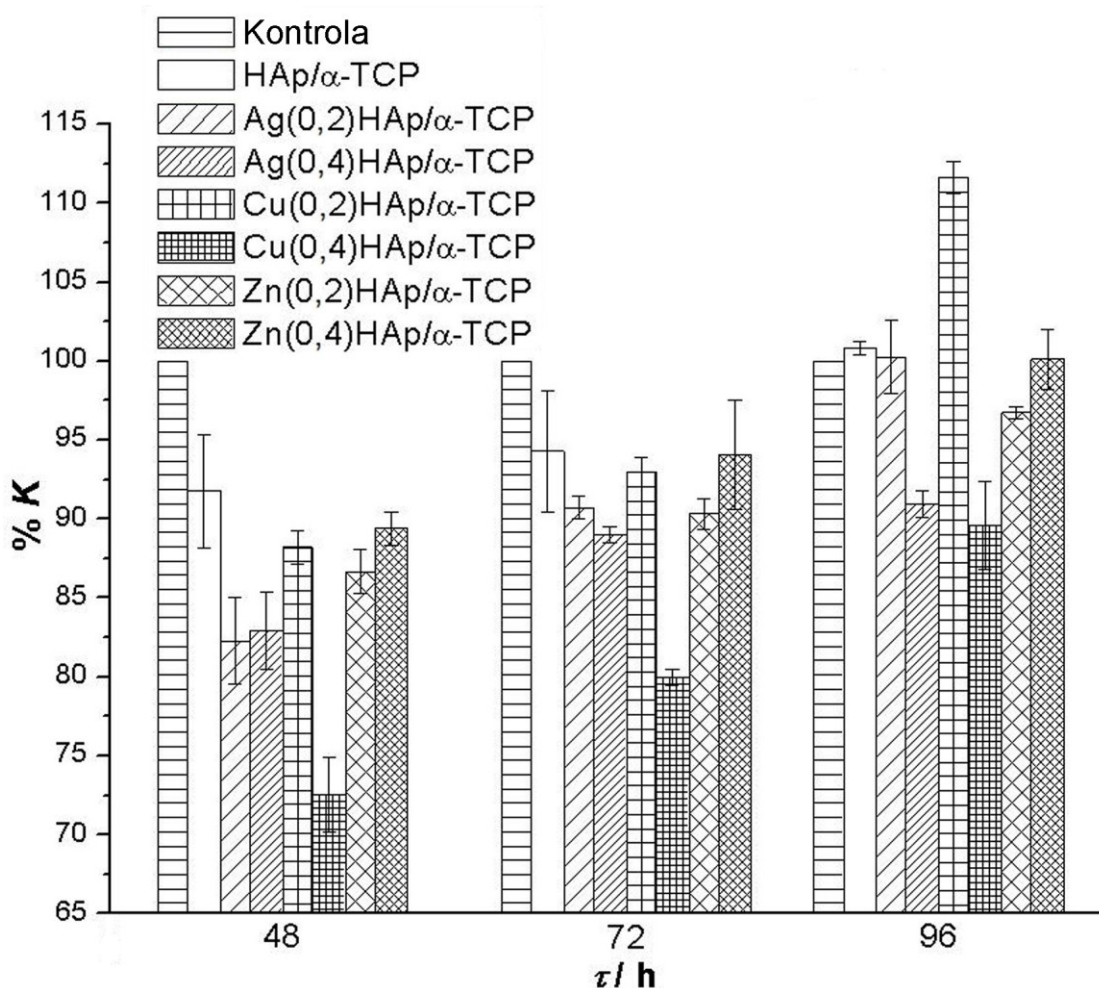
Iako test otpuštanja jona pokazuje da se više jona oslobađa iz dopiranih HAP prahova, antimikrobni test potvrđuju da dopirani HAP/ α -TCP prahovi imaju uniformnu i u nekim slučajevima (*P. aeruginosa* i *C. albicans*) znatno bolju aktivnost protiv sve četiri vrste mikroorganizama u odnosu na dopirane HAP prahove. Ovaj rezultat se može objasniti pomenutom površinskom adsorpcijom mikroorganizama na dopiranim uzorcima HAP/ α -TCP pri čemu bakterije i gljivica dolaze u bliski kontakt sa dopiranim jonima, koji ih uništavaju i sprečavaju njihov rast.

Dakle, može se pretpostaviti da se antimikrobno dejstvo prahova HAp zasniva na otpuštanju jona, dok se kod dopiranih HAP/ α -TCP antimikrobna aktivnost zasniva na površinskoj adsorpciji mikroorganizama i aktivnosti jona na površini.

Ovo dokazuje da se antimikrobna aktivnost dopiranih dvofaznih HAP/ α -TCP prahova može porediti sa antimikrobnom aktivnošću dopiranih HAP prahova, s tim da sporo otpuštanje jona Ag⁺, Cu²⁺ ili Zn²⁺ iz dvofaznih prahova pruža bolju zaštitu od mikroorganizama tokom dužeg perioda vremena. To je razlog zbog kojeg su dopirani HAP/ α -TCP prahovi bolji antimikrobni materijali i stoga je dalje ispitivana njihova biokompatibilnost pomoću *in vitro* MTT i DET testova sa MRC-5 humanim

fibroblastnim ćelijama. U oba testa, održivost ćelija u kontaktu sa prahovima je ispitivana tokom 48, 72 i 96 h.

Rezultati MTT testova (slika 20) pokazali su da se broj ćelija povećao tokom vremena pri kontaktu sa svim kalciniranim prahovima. Udeo preživelih ćelija (% *K*) ukazuje da ne postoji citotoksičnosti ispitivanih prahova. Prema standardu [314] i prah Cu(0,4)HAp/ α -TCP, sa najslabijim rezultatom % *K* (posle 48 h), nije citotoksičan. Pretpostavlja se da slabiji rezultati % *K* dopiranih prahova, posle 48 h i posle 72 h, u odnosu na prah HAp/ α -TCP potiču od uticaja jona dopiranja: Ag⁺, Cu²⁺ i Zn²⁺.

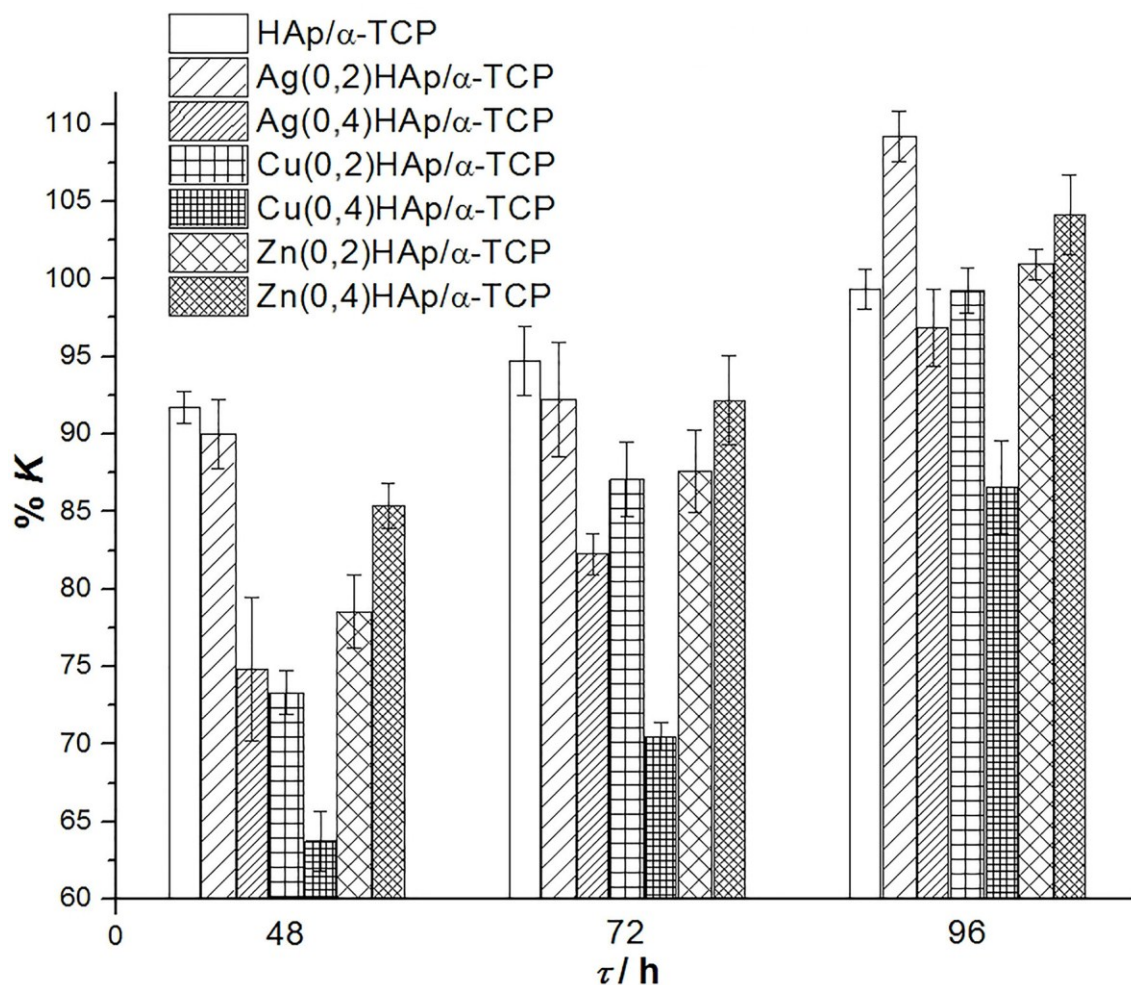


Slika 20. Frakcija preživelih ćelija (% *K*) u MTT testu biokompatibilnosti.

Pored uticaja dopanta, na osnovu MTT testa može se videti i manji uticaj praha na preživljavanje ćelija poređenjem vrednosti % *K* za kontrolni uzorak i % *K* za ćelije u kontaktu sa HAp/ α -TCP. Posle 48 i 72 h, vrednost % *K* za HAp/ α -TCP bio je niži od vrednosti % *K* za kontrolni uzorak. Kojić i saradnici [329] su otkrili da je mogućnost iritacije α -TCP zanemarljiva, dok Tamai i saradnici [330] tvrde da je citotoksičnost α -

TCP veća nego u slučaju HAp-a, pa se može zaključiti da je uticaj α -TCP najverovatnije razlog za ovakav rezultat.

Održivost ćelija u kontaktu sa uzorcima Ag(0,2)HAP/ α -TCP i Ag(0,4)HAP/ α -TCP bila je ista nakon 48 i 72 h, dok je posle 96 h, udeo vitalnih ćelija u kontaktu sa Ag(0,2)HAP/ α -TCP bio приметно veći i sličan onom nađenom kod ćelija koje su bile u kontaktu sa HAP/ α -TCP. Od uzoraka dopiranih jonima Cu²⁺ tokom sva tri vremena ispitivanja, održivost ćelija tokom kontakta sa Cu(0,2)HAP/ α -TCP bila je značajno bolja nego pri kontaktu ćelija sa Cu(0,4)HAP/ α -TCP. Za razliku od prahova dopiranih jonima Ag⁺ i Cu²⁺, kod prahova dopiranih jonima Zn²⁺ pokazao se sasvim drugačiji trend. Ćelije su pokazale da im više odgovara prah dopiran većim sadržajem Zn²⁺ jona. U odnosu na sve testirane uzorke, Cu(0,2)HAP/ α -TCP pokazao je najbolje rezultate tokom kontakta sa ćelijama.



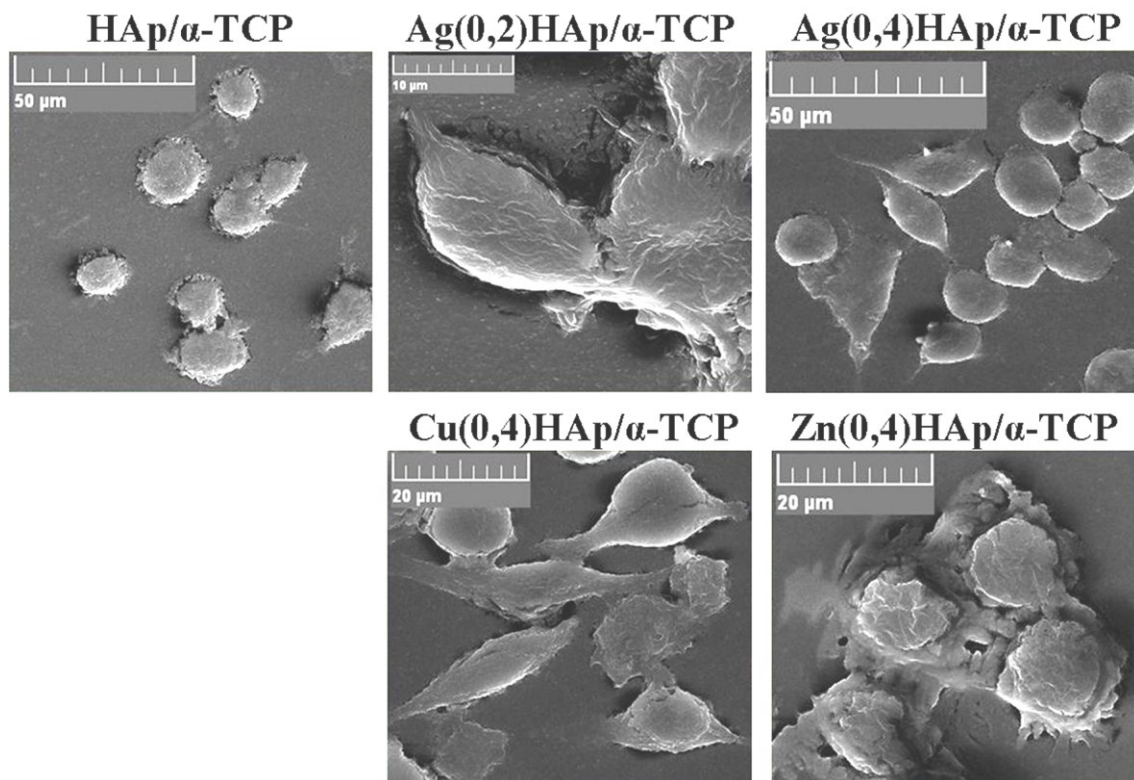
Slika 21. Frakcija preživelih ćelija (% K) u DET testu biokompatibilnosti.

DET test (slika 21), kao i MTT test, pokazao je bolju održivost ćelija pri kontaktu sa prahovima u kojima je udeo dopanata iznosio 0,2 mol% nego sa prahovima kod kojih je molski udeo dopanata bio 0,4 mol%, osim za prahove sa jonima Zn^{2+} . Najbolji rezultat imale su ćelije koje su bile u kontaktu sa prahom Ag(0,2)HAp/ α -TCP. Najmanju vrednost % *K* imale su ćelije u kontaktu sa uzorkom Cu(0,4)HAp/ α -TCP, dok su vrednosti % *K* za ćelije u kontaktu sa prahovima Ag(0,4)HAp/ α -TCP, Cu(0,2)HAp/ α -TCP i Zn(0,2)HAp/ α -TCP bile približno iste, a posle 96 h poredive sa vrednostima % *K* dobijenih od ćelija u kontaktu sa prahom HAp/ α -TCP.

Tokom MTT i DET testova, pokazano je kako male razlike u sadržaju dopanata (0,2 i 0,4 mol% Ag^+ , Cu^{2+} ili Zn^{2+} u odnosu na Ca) utiču na vitalnost MRC-5 fibroblastnih ćelija. U slučaju dopiranja jonima Ag^+ i Cu^{2+} niži udeo dopanata pogoduje ćelijama, a obrnuto važi za dopiranje jonima Zn^{2+} . Na osnovu vrednosti % *K* u MTT i DET testovima, može se zaključiti da prahovi dopirani i sa 0,2 mol% i sa 0,4 mol% dopanata nisu citotoksični.

Morfologija ćelija MRC-5 je analizirana nakon 48 h koliko su ćelije provele u medijumu u kom se prethodno 72 h nalazio jedan od sledećim prahova: HAp/ α -TCP, Ag(0,2)HAp/ α -TCP, Ag(0,4)HAp/ α -TCP, Cu(0,4)HAp/ α -TCP ili Zn(0,4)HAp/ α -TCP. Za ovaj test izabrani su pretežno dvofazni prahovi sa većim udelom dopanata zbog većeg oslobađanja jona. Mikrografi (slika 22) pokazuju da nema štetnog uticaja oslobođenih jona iz prahova HAp/ α -TCP na ćelije. Ćelije su izduženog i ovalnog oblika i povezane preko citoplazmatičnih proširenja. Osim toga, ćelije koje su bile u medijumu sa oslobođenim jonima iz dopiranih prahova bolje su se proširile na površini Petri šolja i bolje izgledale nego ćelije koje su bile u medijumu čistog HAp/ α -TCP praha.

Tokom ovih istraživanja pokazano je da se HAp i HAp/ α -TCP prahovi dopirani jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} mogu sintetisati hidrotermalnom metodom i zatim žarenjem. Dopiranjem prahova HAp-a moguće je značajno povećati njegovu upotrebljivost antimikrobnim delovanjem jona, pa čak i poboljšati njegove biološke performanse dopiranjem Cu^{2+} i Zn^{2+} -jonima koji su i mikronutrijenti. Takođe, pokazalo se da sintetisani prahovi sadrže anjone CO_3^{2-} što ih čini još sličnijim biološkom apatitu i time pogodnijim za zamenu istog.



Slike 22. Prikaz ćelija MRC–5 koje su bile u kontaktu 72 h sa medijumom kalciniranih prahova navedenih iznad odgovarajućih slika.

Dopirani prahovi HAp-a žareni su na temperaturi od 1200 °C pri čemu je došlo do transformacije u dopirani dvofazni HAp/ α -TCP. Dopiranje ima neznatno negativan uticaj na transformaciju HAp u α -TCP. Niska koncentracija oslobođenih jona dala je dobre rezultate antimikrobne aktivnosti protiv *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *C. albicans* kod svih dopiranih HAp i HAp/ α -TCP prahova. Antimikrobna aktivnost dopiranih HAp/ α -TCP prahova protiv svih patogenih mikroorganizama je uniformna, a u nekim slučajevima čak i bolja od dopiranih HAp prahova. Istovremeno, ovi materijali nisu citotoksični, što je dokazano MTT i DET testovima. Uzorci u kojima je udeo Ag^+ i Cu^{2+} iznosio 0,2 mol% dali su veće vrednosti viabilnih MRC-5 humanih fibroblastnih ćelija u poređenju sa uzorcima u kojima je udeo dopanata bio 0,4 mol%, dok je kod uzoraka dopiranih jonima Zn^{2+} suprotan odnos.

Na osnovu prikazanih rezultata može se zaključiti da su dopirani HAp i HAp/ α -TCP prahovi veoma perspektivan materijal za dobijanje kompakata, skafolda, punjenje šupljina zuba i za nanošenje na metalne implantate.

17. Biokeramički materijali – kompakti

Za dobijanje kompaktnih biokeramičkih formi odabrani su sledeći prahovi:

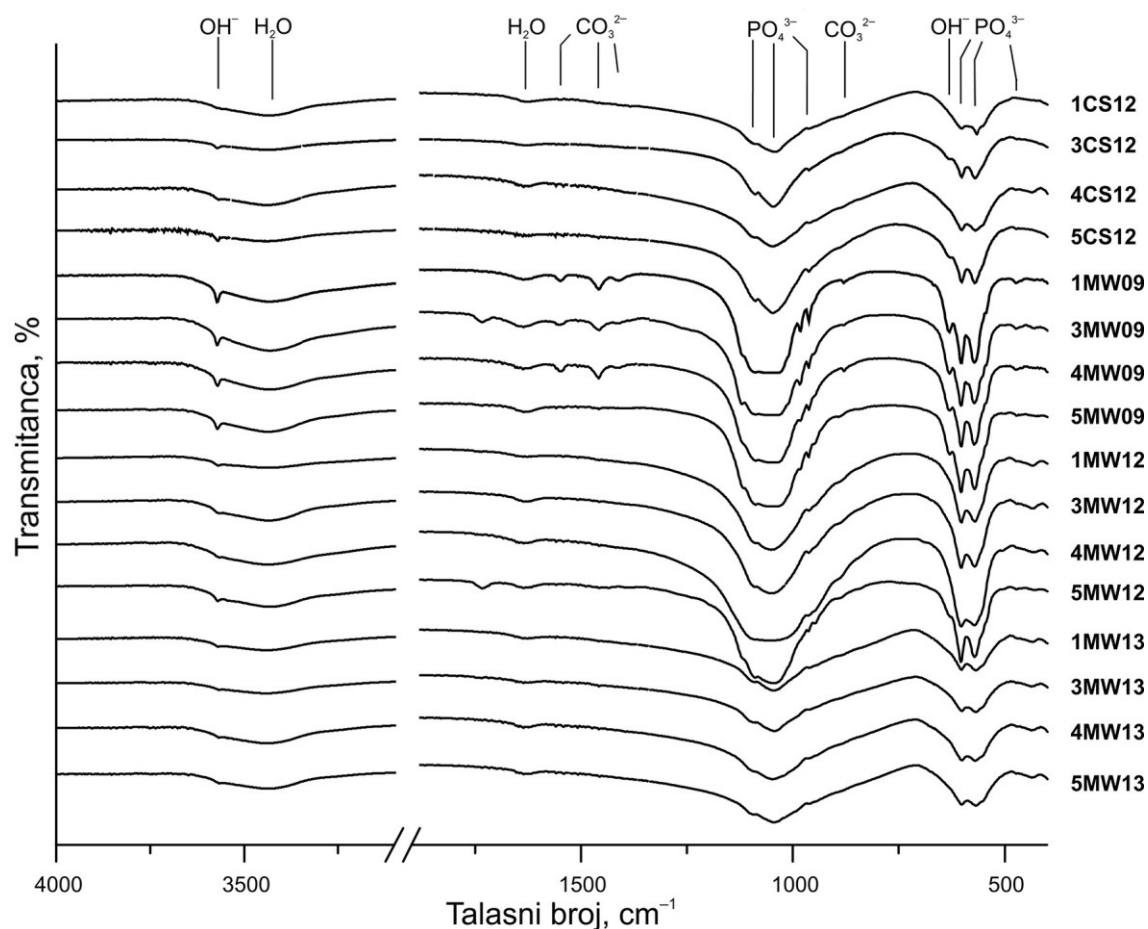
1 - HAp, 2 - Ag(0,2)HAp, 3 - Ag(0,4)HAp, 4 - Cu(0,4)HAp i 5 - Zn(0,4)Hap. Broj ispred praha predstavlja prvu oznaku kompakta i upućuje na prah od koga je procesiran. CS označava konvencionalno sinterovanje a MW mikrotalasno, dok brojevi 09, 12 i 13 predstavljaju temperature sinterovanja, 900, 1200 i 1300 °C, redom.

FTIR spektri sinterovanih kompakata prikazani su na slici 23. Spektri uzoraka sa manjim sadržajem jona Ag^+ (obeleženi sa 2) nisu prikazani jer su veoma slični spektrima uzoraka sa većim sadržajem Ag^+ -jona (obeleženi sa 3) a zbog jasnijeg prikaza na slici 23. Široki pikovi na oko 3400 i 1630 cm^{-1} mogu se pripisati istezanju i savijanju OH veze u molekulima vode, redom. Slab pik na oko 962 cm^{-1} i dva intenzivna pika na oko 1045 i 1090 cm^{-1} odgovaraju redom $\nu_1(\text{PO})$ simetričnoj i $\nu_3(\text{PO})$ asimetričnoj vibraciji. Navedeni simetrični pik na 962 cm^{-1} jasno se uočava na spektrima kompakata MW09. Međutim, ovaj pik nije izražen kod kompakata sinterovanih na visokim temperaturama što se zajedno sa širenjem pikova na oko 1045 i 1090 cm^{-1} objašnjava transformacijom HAp-a u TCP [323].

Zbog savijanja OPO-grupe (ν_4 i ν_2) javljaju se dva intenzivna pika na oko 569 i 602 cm^{-1} i jedan slab pik na 472 cm^{-1} . Pikovi na oko 3570 i 632 cm^{-1} mogu se pripisati vibracijama istezanja (ν_s) i relaksacije/opuštanja (ν_L) OH-grupe HAp-a, redom. Ove vibracije su karakteristične za HAp prahove [244,324] i zastupljene su, takođe, i u spektrima svih kompakata sinterovanih na 1200 i 1300 °C, iako su manje vidljive. To se dešava zato što se veliki deo HAp-a transformiše u TCP tokom sinterovanja. Pik na oko 880 cm^{-1} predstavlja $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ vibraciju savijanja, dok pikovi na 1411, 1457 i 1548 cm^{-1} odgovaraju asimetričnim $\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$ vibracijama istezanja. Ovi pikovi su jasno uočljivi u spektrima MW09 kompakata. Da bi se postigla odgovarajuća pH-vrednost za dobijanje praha, u navedenih hidrotermalnim sintezama je korišćena urea. Razlaganje uree dovodi do stvaranja CO_3^{2-} -jona koje su *in situ* ugrađeni u strukturu HAp-a [325]. Prema literaturi, sinterovanje HAp prahova na temperaturama višim od 1100 °C dovodi do uklanjanja karbonatnih jona iz uzoraka [326]. Slab pik na oko 880 cm^{-1} ($\nu_2(\text{CO}_3^{2-})$) može se uočiti na spektrima uzoraka iz serije MW12, ali ne i u spektrima uzoraka iz serija CS12 i MW13. Takođe, prisutni su i pikovi na oko 945, 970 i 1126 cm^{-1} , jasnije izraženi kod MW09 kompakata a slabije kod ostalih kompakata sinterovanih na višim

temperaturama. Prema literaturi, ovi pikovi odgovaraju vibracijama PO_4^{3-} jona u β -TCP [331].

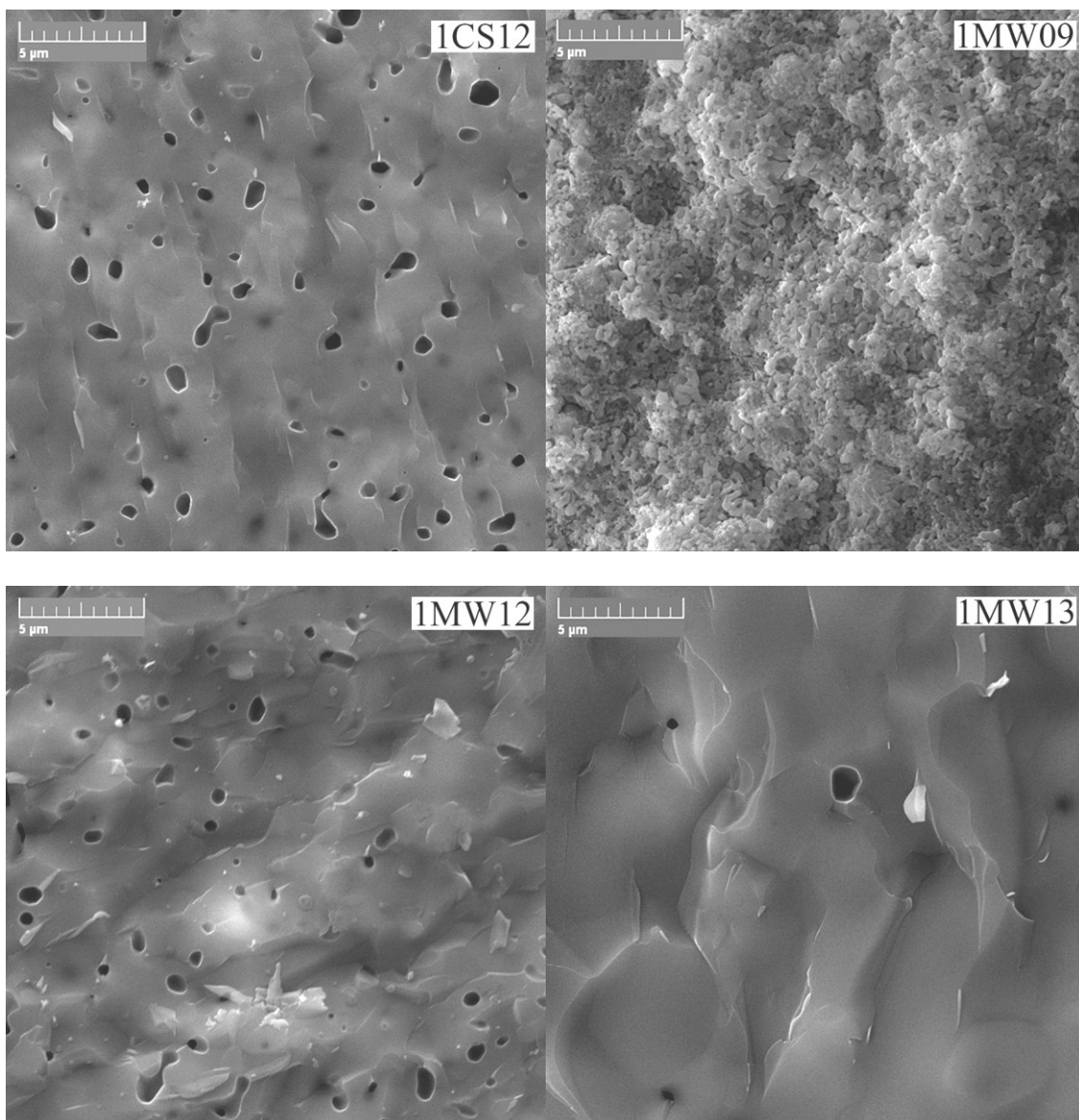
FTIR spektri kompakata serije MW09 slični su FTIR spektrima prahova HAp-1,67 (slika 18) od kojih su nastali, s tim da je kod kompakata pored karbonatnog HAp-a prisutna i β -TCP faza. FTIR spektri kompakata serija CS12, MW12 i MW13 pokazuju da su karbonatni joni pretežno uklonjeni, sadržaj HAp-a i β -TCP faza je manji nego kod kompakata serije MW09, uz pojave (smanjenje pik na 962 cm^{-1} i širenje pikova na oko 1045 i 1090 cm^{-1}) koje upućuju na transformaciju HAp-a u TCP što sa prethodnim ukazuje na veći sadržaj α -TCP u datim kompaktima.



Slika 23. FTIR spektri kompakata sinterovanih konvencionalnom i mikrotalasnom tehnikom.

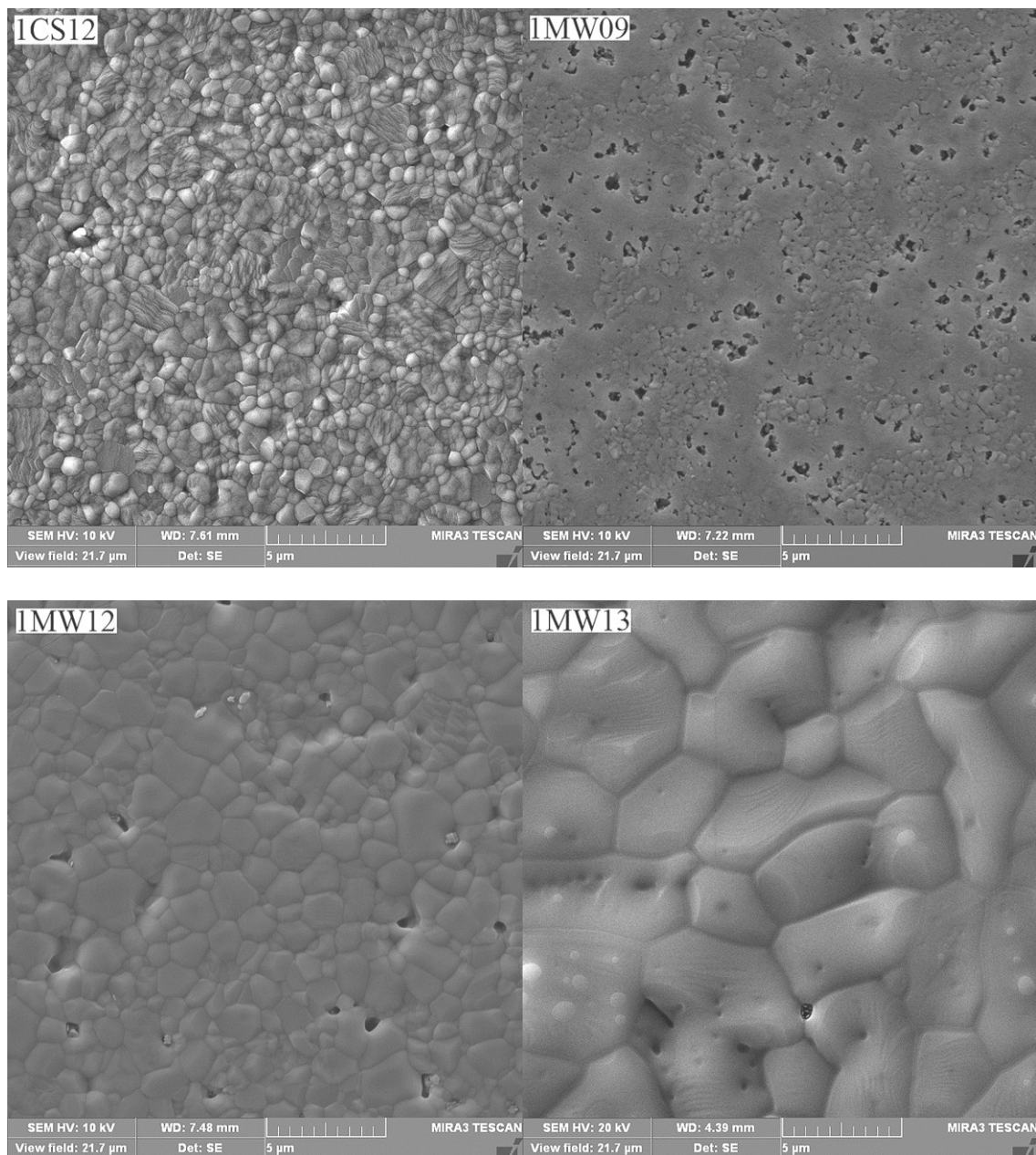
FESEM mikrofotografije preloma i poliranih površina kompakata prikazani su na slikama 24–33. Na osnovu ovih mikrofotografija može se zaključiti da su, nakon završetka MW sinterovanja na $900\text{ }^{\circ}\text{C}$, dobijeni kompakti ostali u početnoj fazi sinterovanja [332]. Nije došlo do formiranja zrna, osim u slučaju uzorka 5MW09, mada ta zrna nisu

međusobno čvrsto povezana. U svim ostalim uzorcima serije MW09 mogu se uočiti brojne pore između sfera, kao i šupljine u pojedinim sferama.



Slika 24. Morfologija preloma kompakata dobijenih od nedopiranog HAp-a (uveličanje 10 kx, bar 5 µm).

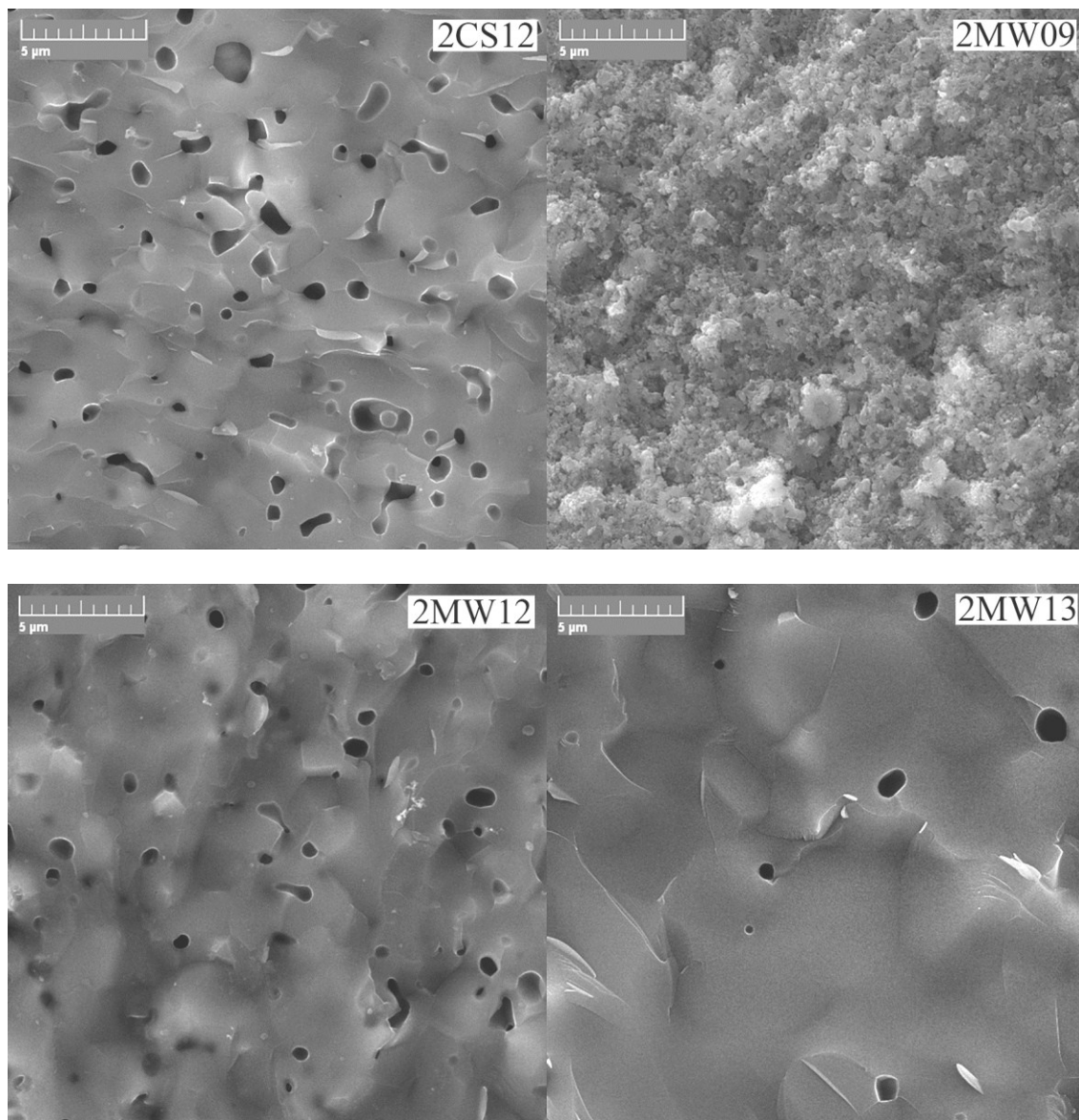
Površine kompakata sinterovanih na 1200 °C (serije CS12 i MW12) takođe sadrže brojne pore sfernog i/ili neodređenog oblika. Međutim, uzorci MW12 sadrže znatno manje pora nego uzorci serije CS12, što je uočljivo na mikrografima preloma kompakata. To ukazuje na bolju densifikaciju zbog karakterističnog zapreminskog sinterovanja pri MW [242].



Slika 25. Morfologija poliranih površina kompakata dobijenih od nedopiranog HAp-a (uveličanje 10 kx, bar 5 µm).

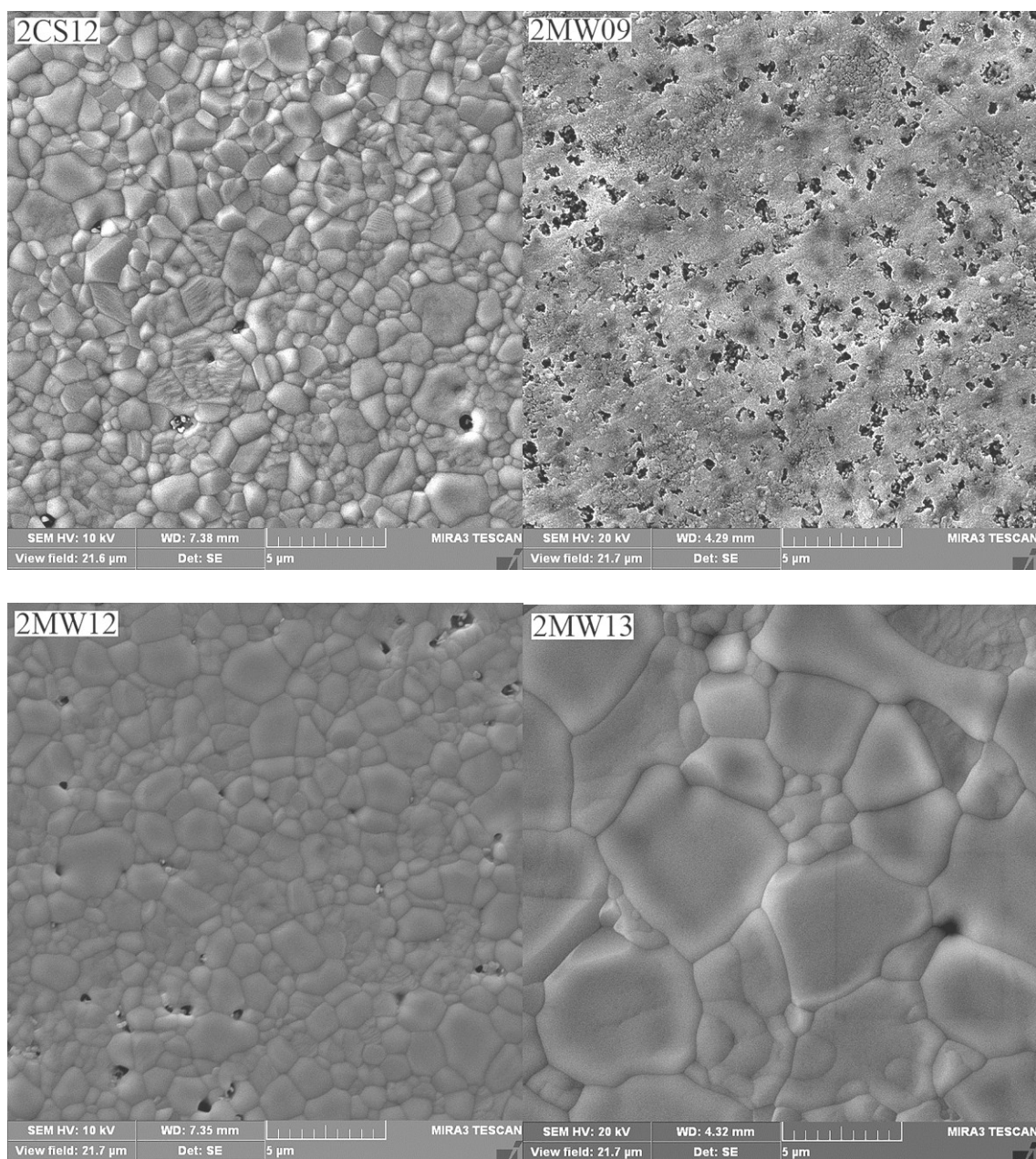
Prethodni nalaz potvrđuje prednost MW u odnosu na CS sinterovanje pri čemu se za mnogo kraće vreme, i znatno manji utrošak energije, dobijaju kompakti većih gustina. Kompakti označena sa 3 i 5, odnosno apatiti u kojima udeo dopiranih Ag^+ - i Zn^{2+} -jona ima vrednost 0,4 mol%, sadrže najveći broj pora u obe serije. Pri ovoj koncentraciji, ova dva jona imaju negativan uticaj kako na MW, tako i na CS

sinterovanje. Međutim, dopiranje jonima Cu^{2+} poboljšava sinterovanja u poređenju sa nedopiranim HAp-om.



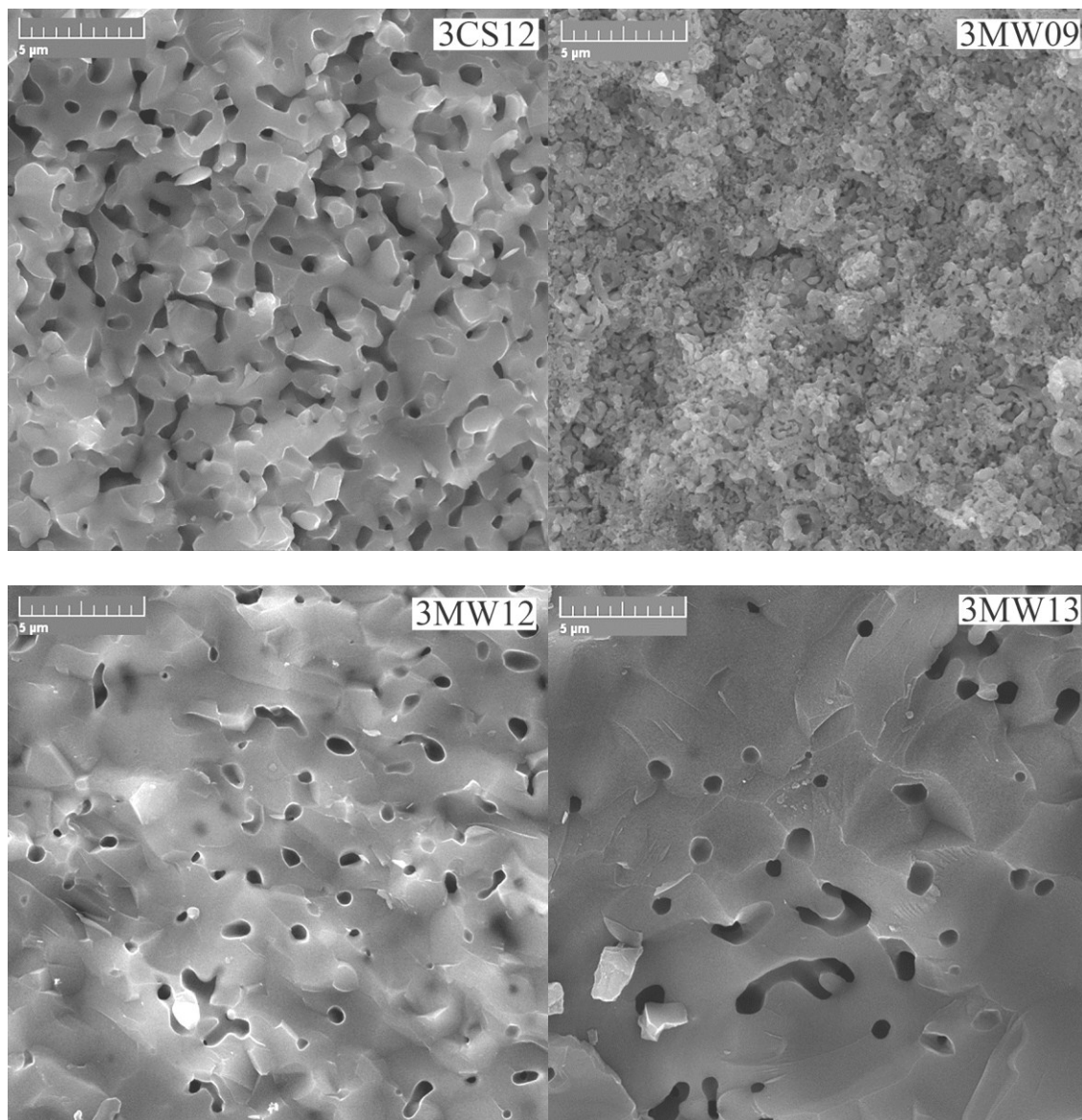
Slika 26. Morfologija preloma kompakata dobijenih od praša $\text{Ag}(0,2)\text{HAp}$ (uveličanje 10 kx, bar $5 \mu\text{m}$).

Poredeći mikrografije poliranih površina jasno je da uzorci serija CS12 i MW12 imaju slične veličine zrna. Jedino uzorak 1CS12 ima skoro dva puta manju vrednost prosečne veličine zrna (AGS – average grain size) nego uzorak 1MW12. Uzorci serije MW13 imaju manji broj pora ali su te pore većih dimenzija nego pore zastupljene u kompaktima sinterovanim CS i MW na $1200 \text{ }^\circ\text{C}$.

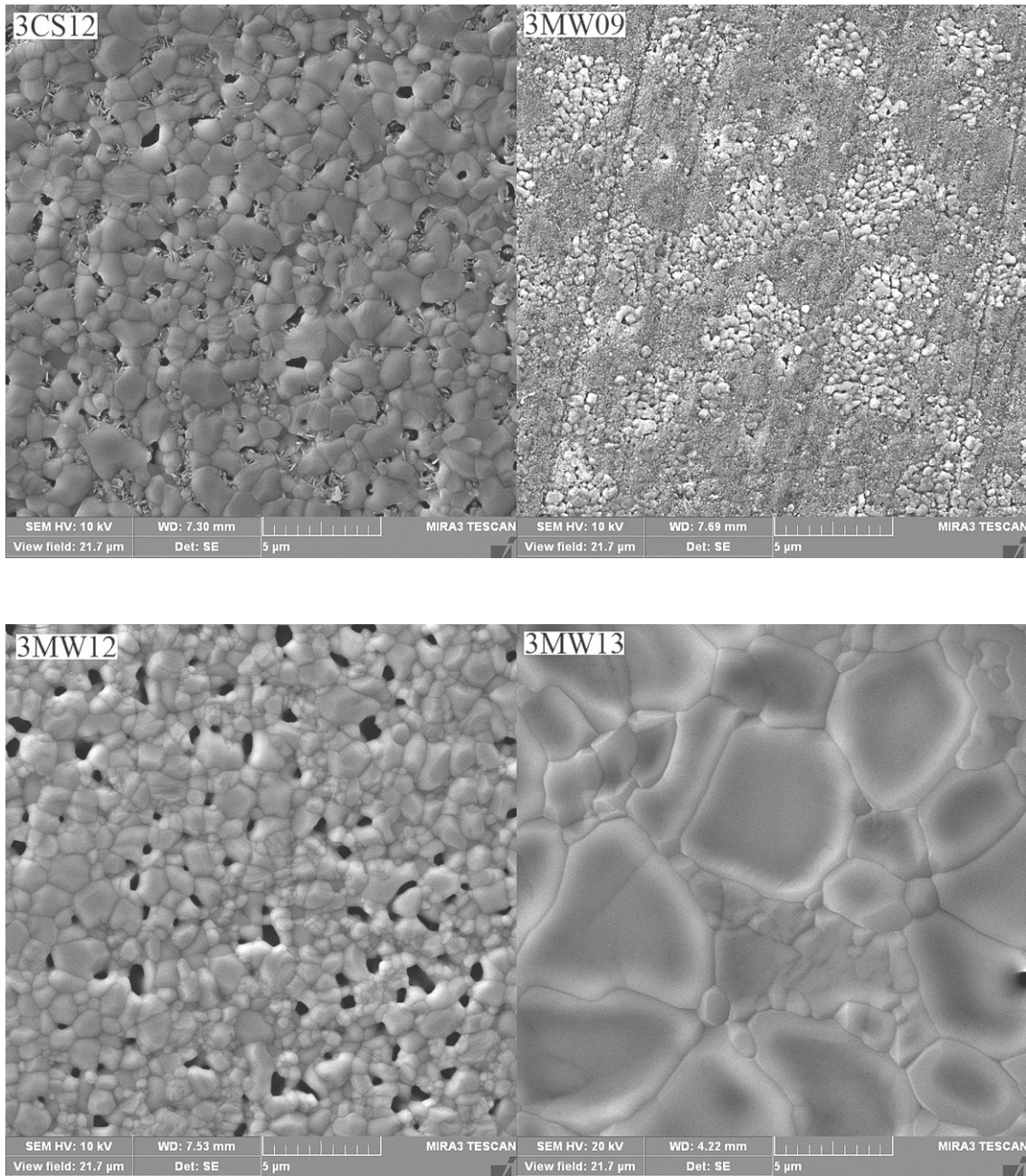


Slika 27. Morfologija poliranih površina kompakata dobijenih od praha Ag(0,2)HAp (uveličanje 10 kx, bar 5 µm).

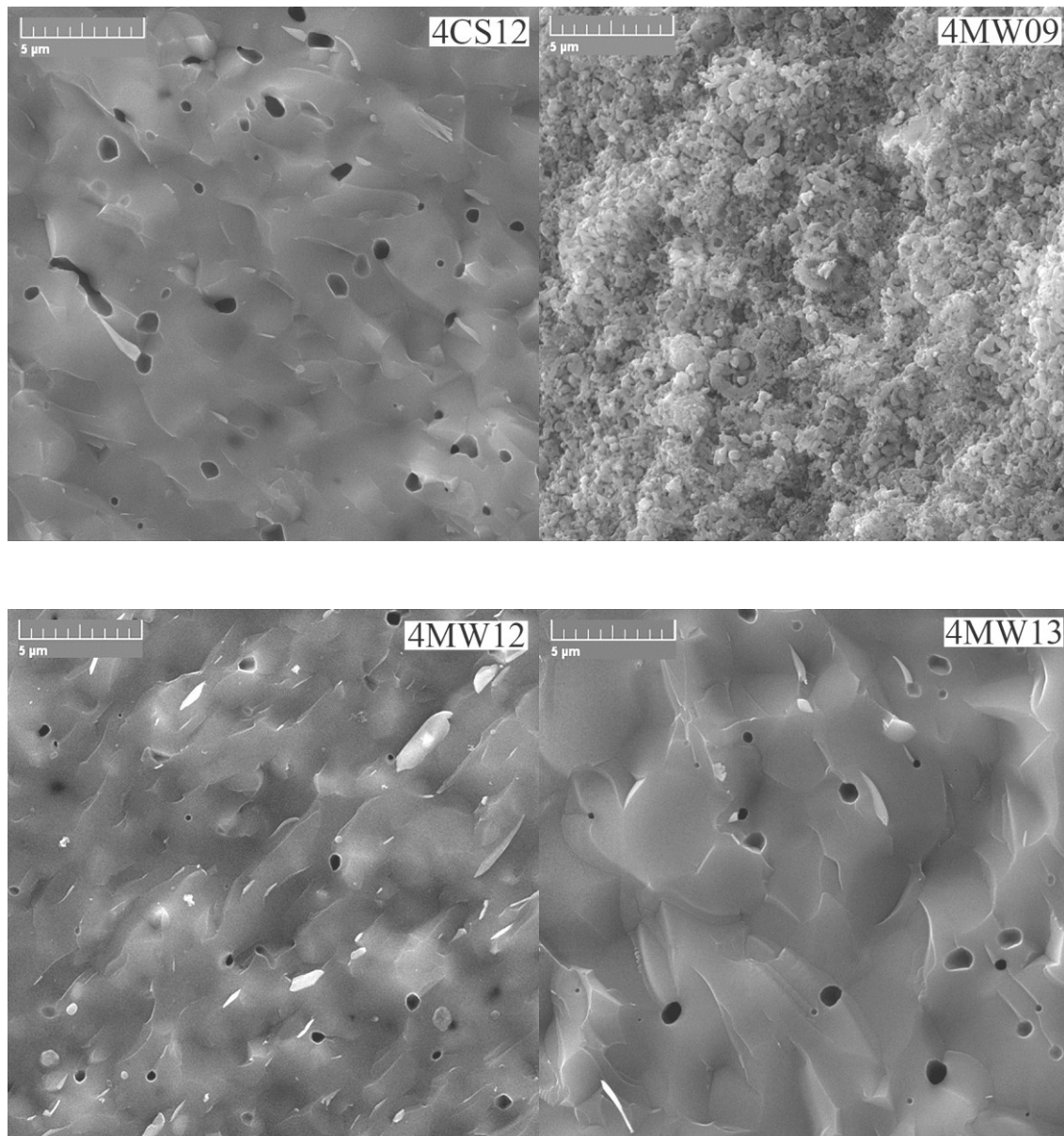
Rast zrna kod uzoraka MW13 je mnogo veći nego kod uzoraka CS12 i MW12. Primetan je diskontinualni rast velikih zrna na račun malih kod kompakata dopiranih jonima Ag^+ i Zn^{2+} . Površina preloma ukazuje na dominantni transgranularni lom što je u saglasnosti sa mikrometarskom veličinom zrna [254].



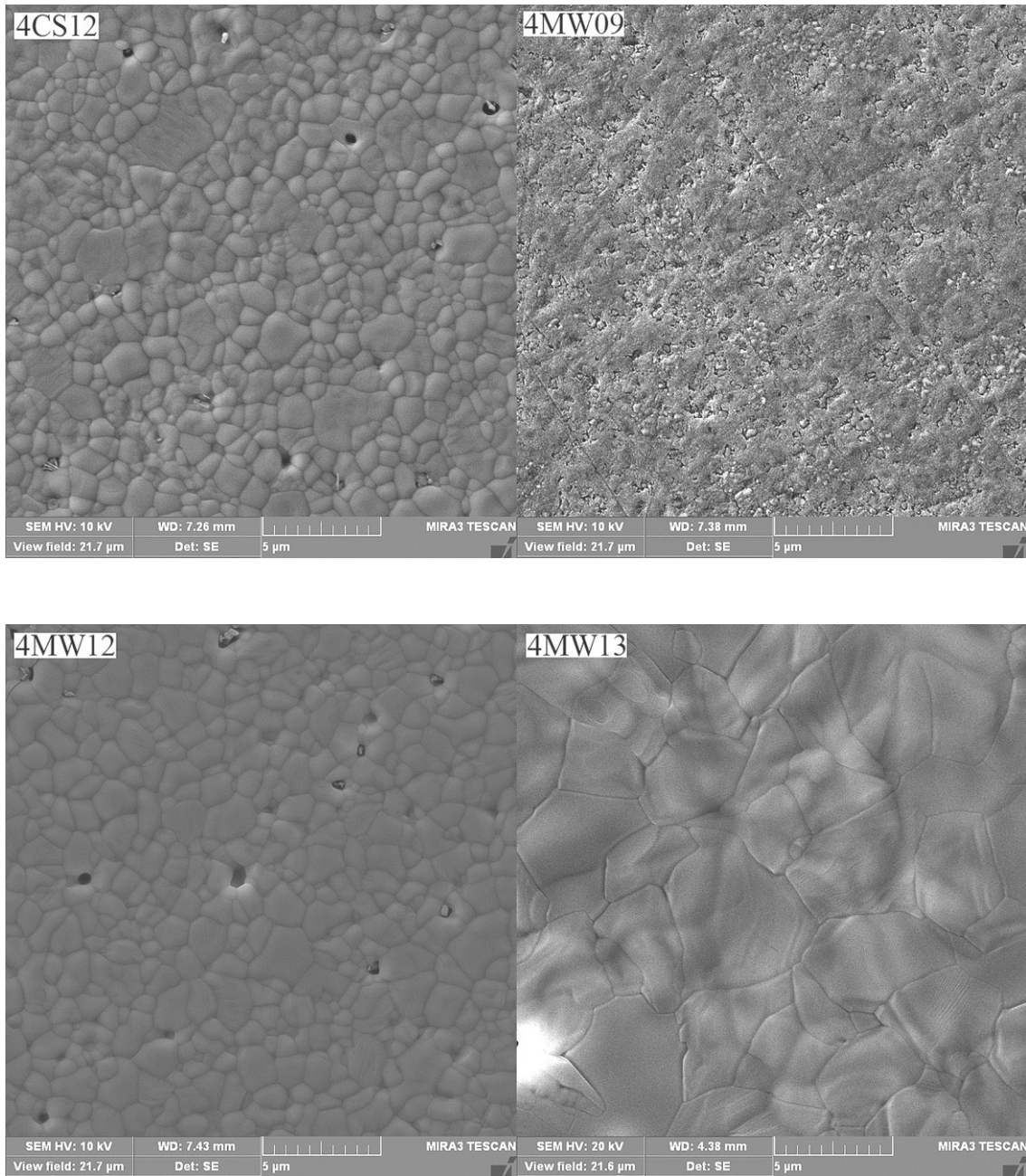
Slika 28. Morfologija preloma kompakata dobijenih od praha Ag(0,4)HAp (uveličanje 10 kx, bar 5 µm).



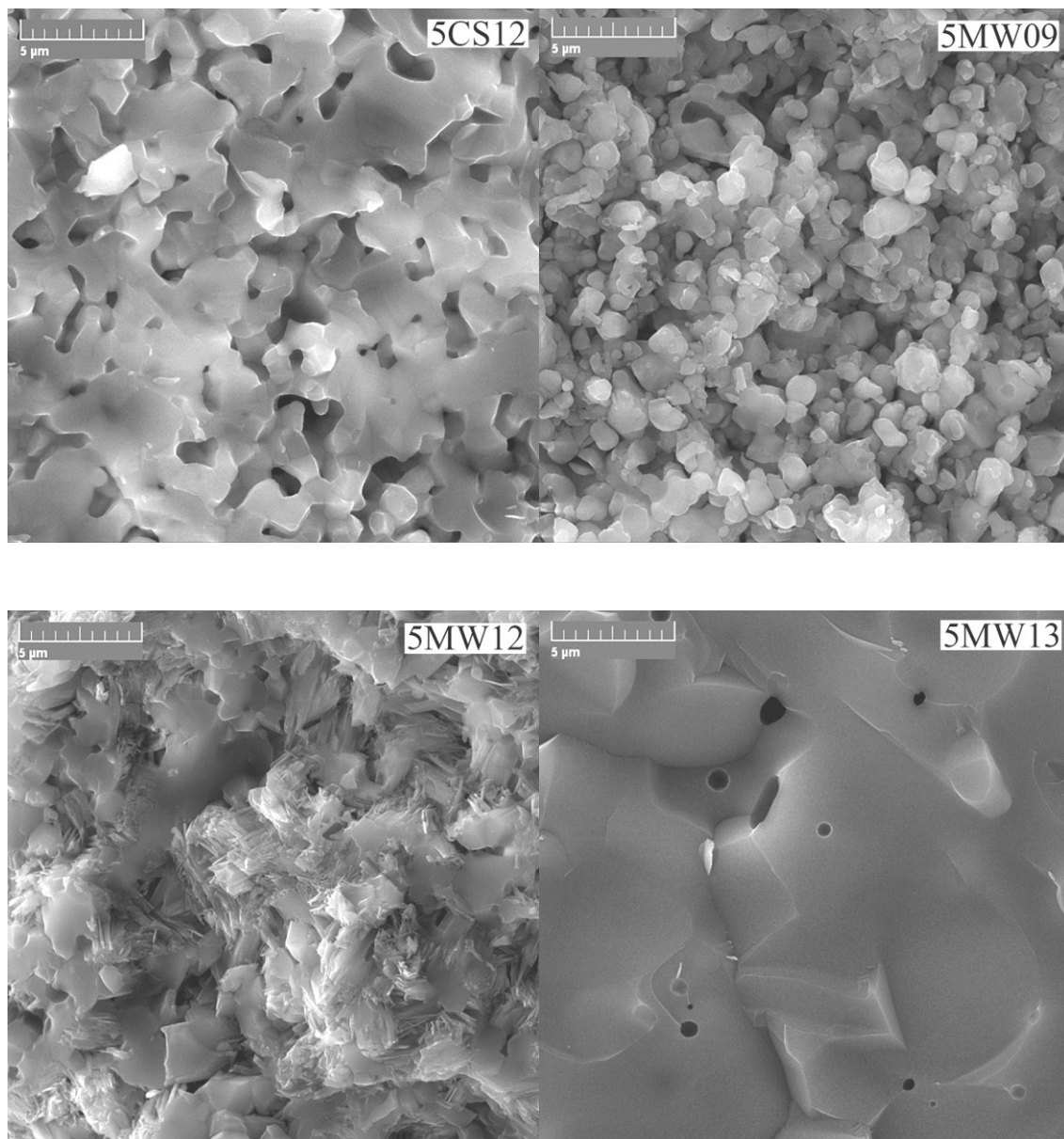
Slika 29. Morfologija poliranih površina kompakata dobijenih od praha Ag(0,4)HAp (uveličanje 10 kx, bar 5 μm).



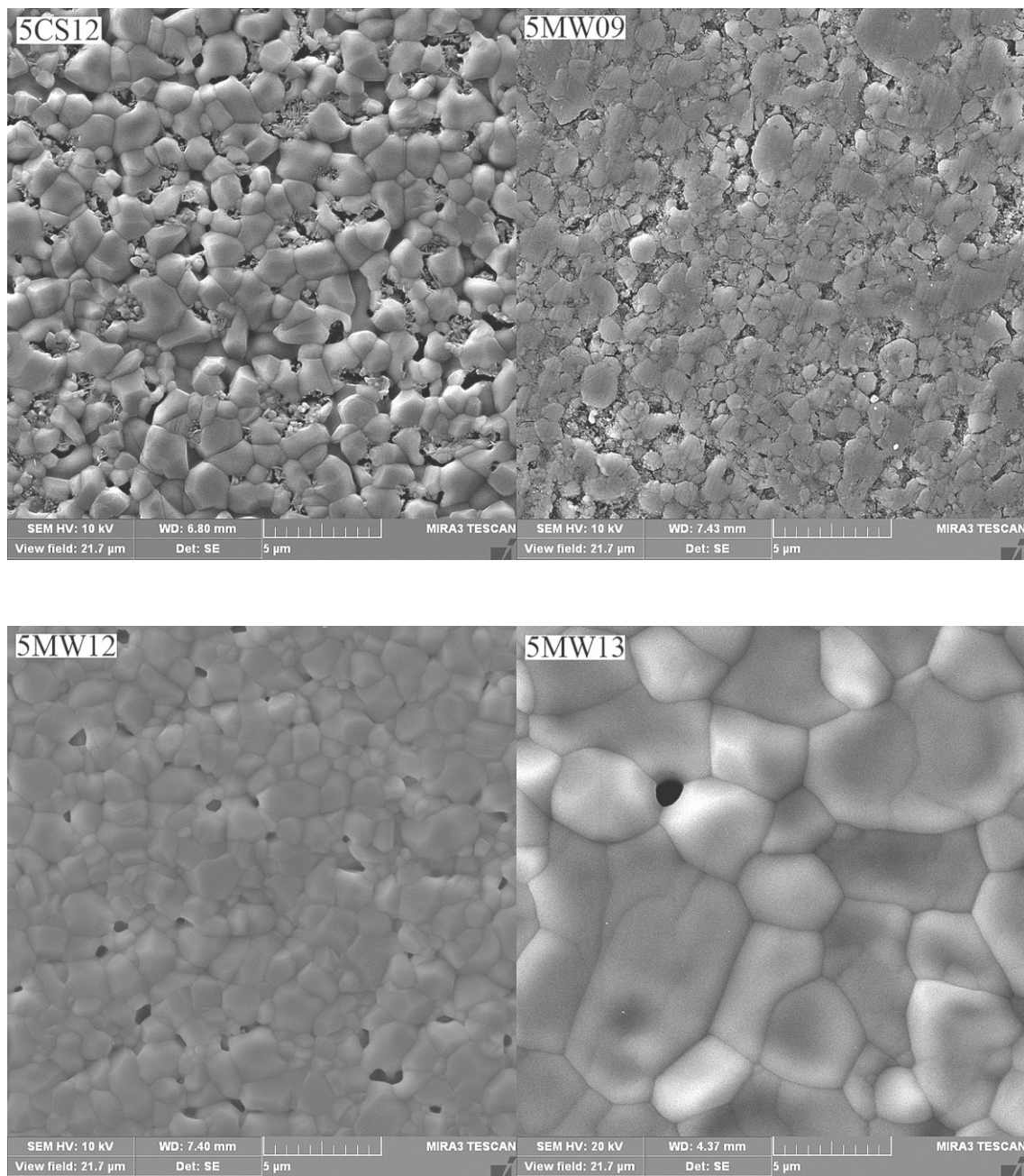
Slika 30. Morfologija preloma kompakata dobijenih od praha $\text{Cu}(0,4)\text{HAp}$ (uveličanje 10 kx, bar 5 μm).



Slika 31. Morfologija poliranih površina kompakata dobijenih od praha $\text{Cu}(0,4)\text{HAp}$ (uvećanje 10 kx, bar 5 μm).



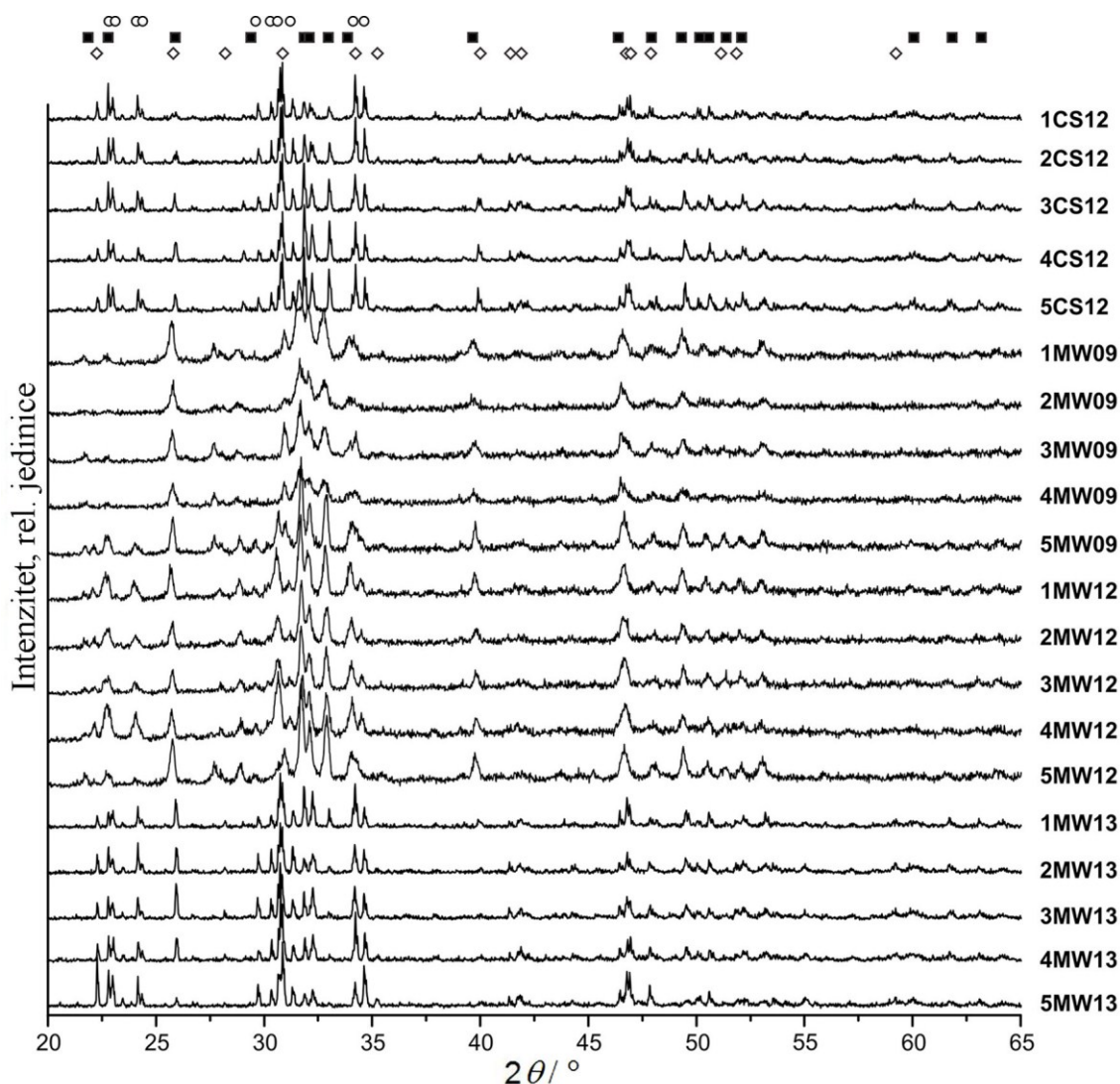
Slika 32. Morfologija preloma kompakata dobijenih od praha Zn(0,4)HAp (uveličanje 10 kx, bar 5 μm).



Slika 33. Morfologija poliranih površina kompakata dobijenih od praha Zn(0,4)HAP (uveličanje 10 kx, bar 5 μm).

EDS analiza (tabela 16) kompakata pokazuje da je Ca/P odnos u svim uzorcima manji od stehiometrijskog odnosa u čistom HAP-u, i ovo ukazuje na formiranje TCP faza. Prisustvo dopirajućih katjona je takođe detektovano. Izuzev u slučaju serije **MW09**, atomski udeo Ag^+ jona u kompaktima je manji nego atomski udeo Cu^{2+} i Zn^{2+}

jona, što ukazuje da su se poslednja dva navedena jona bolje ugradila u strukturu apatita. Prema Nightingale [327], kristalni radijusi Ca^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} i Ag^+ su 0.099 nm, 0.072 nm, 0.074 nm i 0.126 nm, redom, i otuda, za Ag^+ jone je mnogo teže da se zadrže u HAP i TCP strukturi nego jonima Cu^{2+} i Zn^{2+} [136].



Slika 34. XRD dijagrami konvencionalno i mikrotalasno sinterovanih kompakata. Položaj većih pikova faza: HAP, β -TCP i α -TCP označeni su simbolima ■, ◆ i ○, redom.

Na slici 34 su prikazani XRD dijagrami konvencionalno i mikrotalasno sinterovanih kompakata. Semikvantitativna analiza XRD podataka (tabela 16) potvrđuje transformaciju HAP-a u TCP faze tokom sinterovanja. Prisustvo β -TCP faze je detektovano u svim kompaktima, dok je α -TCP faza nađena u kompaktima sinterovanim na 1200 i 1300 °C i takođe u kompaktu 5MW09. Ova analiza je u

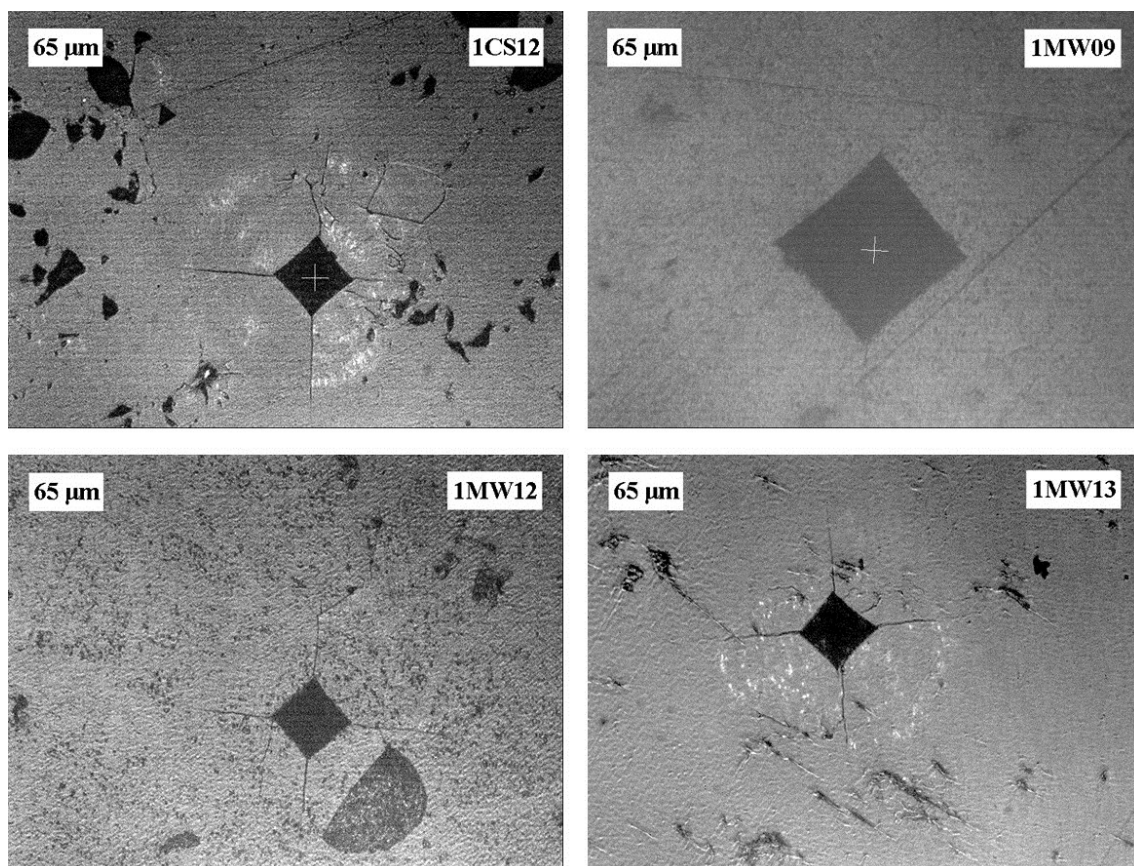
saglasnosti sa FESEM analizom, koja je potvrdila da se uzorak 5MW09 značajno razlikuje od drugih uzoraka serije MW09. Dodatno, DSC analiza HAp prahova je pokazala da u uzorcima 2, 3 i 5, transformacija u α -TCP započinje ranije i semikvantitativna analiza XRD podataka ukazuje da je ova transformacija za kompakt 5MW09 posebno izražena tokom mikrotalasnog sinterovanja na 900 °C. Takođe je zapaženo da je stabilizacija β -TCP bolja u kompaktna dopiranim jonima Cu^{2+} (uzorci 4MW12 i 4MW13) dok je u kompaktnu dopiranom jonom Zn^{2+} (uzorak 5MW13) podstaknuta transformacija β -TCP u α -TCP fazu.

Tabela 16. Prosečna veličina zrna (AGS), EDS rezultati i semikvantitativni rezultati masenog udela faza (mas.%) iz XRD podataka.

Uzorak	AGS (μm)	EDS		XRD (mas.%)		
		(Ca+M)/P, (at. odnos)	M (at.%)	HAp	β -TCP	α -TCP
1CS12	0,56±0,05	1,55±0,01	–	29,9(6)	32,2(7)	37,9(8)
2CS12	0,91±0,11	1,57±0,01	0,04±0,02	32,8(6)	26,7(5)	40,5(8)
3CS12	0,86±0,07	1,53±0,02	0,09±0,03	27,3(6)	35,6(7)	37,1(8)
4CS12	0,93±0,10	1,59±0,01	0,14±0,04	26,9(4)	44,1(6)	29,0(5)
5CS12	1,16±0,18	1,60±0,01	0,14±0,03	37,3(4)	27,2(3)	35,5(4)
1MW09	–	1,63±0,01	–	57,4(8)	42,6(6)	–
2MW09	–	1,64±0,01	0,15±0,02	61,9(6)	38,1(5)	–
3MW09	–	1,63±0,03	0,18±0,04	55,3(5)	44,7(6)	–
4MW09	–	1,64±0,01	0,12±0,03	62,5(5)	37,5(4)	–
5MW09	–	1,64±0,01	0,11±0,04	59,6(7)	28,8(3)	11,6(2)
1MW12	1,06±0,22	1,60±0,01	–	24,6(4)	26,2(5)	49,2(8)
2MW12	1,02±0,20	1,57±0,03	0,04±0,02	29,7(9)	21,7(6)	48,6(8)
3MW12	0,72±0,10	1,59±0,03	0,07±0,02	30,2(7)	23,8(6)	46,0(9)
4MW12	1,03±0,13	1,60±0,01	0,14±0,06	28,5(6)	55,6(9)	15,9(4)
5MW12	1,03±0,10	1,57±0,01	0,10±0,04	20,6(5)	36,7(8)	42,7(5)
1MW13	3,53±0,28	1,56±0,01	–	16,4(4)	24,4(7)	59,2(9)
2MW13	3,99±0,73	1,54±0,03	0,03±0,01	15,7(4)	29,7(8)	54,6(9)
3MW13	3,71±0,84	1,60±0,03	0,06±0,02	20,4(4)	29,4(6)	50,2(8)
4MW13	3,25±0,54	1,59±0,02	0,14±0,03	17,9(5)	58,3(9)	23,8(5)
5MW13	3,65±0,50	1,55±0,02	0,11±0,03	15,9(2)	16,6(2)	67,5(8)

Na slici 35 prikazani su otisci na poliranim površinama kompakata procesiranih od nedopiranog HAp-a nastali Vickersovim testom. Primenjeno opterećenje je 1 kg za kompakte sinterovane na 1200 i 1300 °C i 0,3 kg za kompakt sinterovan na 900 °C. I za ostale serije kompakata, dobijene od dopiranih prahova, sličan je izgled otiska i pukotina koje se prostiru u pravcu dijagonala otiska a služe za određivanje žilavosti. Ova slika ilustruje da su primenjene optimalne vrednosti opterećenja za određivanje mehaničkih svojstava kompakata.

Mehaničke karakteristike sinterovanih kompakata predstavljene su u tabeli 17. Kompakti **MW09** se odlikuju veoma slabim mehaničkim svojstvima jer su, kao što je utvrđeno sa FESEM mikrofografija, ostali u početnoj fazi sinterovanja. Malo skupljanje tokom sinterovanja (do 3,3 %) i velika poroznost kompakata (oko 34 %) uzrokuju slaba mehanička svojstva: H u opsegu od 0,76 do 1,01 GPa, dok su vrednosti K_{IC} u opsegu od 0,66 do 0,77 MPam^{1/2}.



Slika 35. Mikrografije ispoliranih površina kompakata čistog HAp-a, sinterovanih konvencionalno i mikrotalasno, posle određivanja mehaničkih osobina Vickersovim testom.

Imajući u vidu temperaturu sinterovanja ovakvi rezultati su očekivani i ova serija kompakata je prvenstveno i bila zamišljena da da uvid u strukturu uzoraka na početku sinterovanja. Takođe, ovi rezultati su pokazali da sferično aglomerisani HAp prahovi ne mogu biti uspešno sinterovani MW na 900 °C kao što je slučaj sa nanočestičnim HAp prahovima [243].

Najveće vrednosti ostvarene i prezentovane u literaturi [239–250,257–273] za H i K_{IC} za sinterovane HAp ili BCP kompakte, su u opsegu od 2,7 do 8,4 GPa i od 0,73 do 1,92 MPa·m^{1/2}, redom. Ali, neki autori su tokom ispitivanja materijala za određivanje H i K_{IC} primenili opterećenje manje i jednako 0,5 kg [240,241,247,249,258,261–264,266,267,271] i, takođe, mnogo istraživača nije navelo primenjeno opterećenje koje su koristili [239,242,243,245,246,250,268,272]. Istraživači navode da primenjuju manje opterećenje da ne bi razorili uzorak [261,333]. Thangamani i saradnici [259] kao i Slosarczyk i saradnici [265] koristili su opterećenja od 0,2 do 2,0 kg za određivanje vrednosti H i zaključili su da su veće vrednosti za H dobijene kad je primenjeno opterećenje bilo malo i obrnuto. S druge strane, pojedini istraživači [257,260] su dobijali relativno visoke vrednosti H i K_{IC} (4,9 i 4,45 GPa, redom, i 1,11 and 0,95 MPa·m^{1/2}, redom) primenjujući veće opterećenje (veće od 0,5 kg). Na ovaj način određene vrednosti H i K_{IC} čine se mnogo realnije u pogledu eventualne primene, nego vrednosti određene primenom manjeg opterećenja.

Kako je već navedeno, u ovom istraživanju za uzorke sinterovane na 1200 i 1300 °C je primenjeno opterećenje od 1 kg i najbolji rezultati za H su: 3,85 i 3,91 GPa za **4CS12** i **4MW12**, redom. Dodatno, najveće vrednosti za K_{IC} su 1,46 MPa·m^{1/2} za kompakt **4CS12** i 1,34 MPa·m^{1/2} u slučaju kompakta **3MW12** (tabela 2).

Poredeći vrednosti H i K_{IC} za serije kompakata **CS12** i **MW12** primećeno je da prosečna veličina zrna nema uticaja na vrednost H , ali utiče u izvesnoj meri na vrednost K_{IC} , što je posebno primetno za uzorak **3MW12** (tabela 17). Ipak, najveći uticaj na vrednost H ima poroznost (P), to jest relativna gustina (RD). Upravo zbog veće poroznosti (vidi slike 24–33), ili manje relativne gustine, vrednosti H kompakata: **3CS12**, **5CS12** i **5MW12** su značajno manje u poređenju sa vrednostima ostalih uzoraka odgovarajuće serije. Pored toga, u pomenutim uzorcima su pore pretežno izdužene a mnogo manje sferične, što takođe negativno utiče na vrednost H [249,250]. Istovremeno, uticaj poroznosti (ili relativne gustine) je mnogo manje izražen na

vrednost K_{IC} . To se može zaključiti analizirajući vrednosti za kompakte **3CS12** i **3MW12**, koji imaju veliku poroznost, ali visoke vrednosti K_{IC} .

Tabela 17. Tvrdoća (H) i žilavost loma (K_{IC}), početna gustina (ρ_0) i gustina kompakta posle sinterovanja (ρ), linearno skupljanje (L), poroznost (P) i relativna gustina (RD) kompakata.

Uzorak	H (GPa)	K_{IC} (MPam ^{1/2})	ρ_0 (g/cm ³)	ρ (g/cm ³)	L (%)	P (vol.%)	RD (mas.%)
1CS12	3,71±0,12	1,19±0,35	1,93	2,79	13,9	7,3	92,6
2CS12	3,74±0,17	0,98±0,13	1,94	2,70	13,4	10,2	89,6
3CS12	1,72±0,01	1,25±0,12	1,92	2,25	8,0	25,3	74,6
4CS12	3,85±0,12	1,46±0,37	1,94	2,78	13,4	8,3	91,6
5CS12	1,71±0,20	1,01±0,17	1,96	2,34	5,3	23,0	76,9
1MW09	0,76±0,03	0,65±0,04	1,97	1,99	2,7	36,1	63,9
2MW09	1,00±0,06	0,74±0,05	1,98	2,06	3,0	33,9	66,1
3MW09	1,01±0,01	0,77±0,08	1,91	2,03	3,3	34,9	65,1
4MW09	0,96±0,04	0,74±0,04	2,00	2,03	3,0	34,9	65,0
5MW09	0,89±0,03	0,72±0,09	1,94	2,10	1,3	32,2	67,8
1MW12	3,66±0,25	1,00±0,24	2,03	2,76	13,0	7,6	92,2
2MW12	3,55±0,02	1,09±0,19	1,86	2,74	12,5	8,3	91,5
3MW12	3,61±0,06	1,34±0,25	1,89	2,73	11,8	8,8	91,0
4MW12	3,91±0,09	1,17±0,30	1,83	2,85	12,8	6,9	93,0
5MW12	1,68±0,26	1,04±0,15	1,85	2,66	10,5	11,3	88,6
1MW13	3,92±0,04	0,86±0,13	1,98	2,89	13,8	2,2	97,6
2MW13	3,84±0,07	1,04±0,25	1,91	2,85	13,6	4,0	96,0
3MW13	3,17±0,12	1,01±0,24	1,99	2,70	13,1	9,5	90,4
4MW13	3,90±0,24	0,85±0,15	1,97	2,99	13,9	1,3	98,4
5MW13	3,77±0,15	1,10±0,27	2,01	2,76	13,3	6,1	93,8

Kompakti serije **MW13**, iako imaju tri do četiri puta veće vrednosti prosečne veličine zrna u odnosu na kompakte serije **MW12**, pokazuju u većini slučajeva nešto veće vrednosti za H i niže vrednosti za K_{IC} (tabela 17). Manja poroznost (veća RD), u ovoj seriji kompakata ima veći uticaj na vrednost H nego prosečne veličine zrna. Dokazano je [270 i reference u tom radu,334] da sa povećanjem temperature sinterovanja dolazi i do povećanja zrna i na nekoj temperaturi se dostiže kritična vrednost veličine zrna. Posle toga veći uticaj na vrednost H ima sve veća veličina zrna a ne poroznost i dolazi do drastičnog slabljenja tvrdoće. Kako se to ne dešava u slučaju kompakata serije **MW13** zaključujemo da nije dostignuta kritična vrednost veličine zrna. Dodatno, zaostale pore su sfernog oblika što ima pozitivan uticaj na H [242,250]. Istovremeno, vrednosti K_{IC} polako opadaju sa povećanjem veličine zrna, što je u skladu sa literaturnim nalazima [243,263,335]. Uzorak **3MW13** ($P = 9,5\%$) ima H vrednost 3,17 GPa, dok je vrednost H kod uzorka **1MW13** ($P = 2,2\%$) najveća i iznosi 3,92 GPa. Maksimalna vrednost K_{IC} od 1,10 MPam^{1/2} postiže se kod uzorka **5MW13**.

Dobijeni rezultati za H i K_{IC} mogu se prema primenjenom dopantu za sve četiri serije sinterovanja uporediti na sledeći način: serije 1 i 2 pokazale su slične vrednosti za H i K_{IC} , s tim da uzorci serije 2 ima nešto veću poroznost i vrednosti AGS.

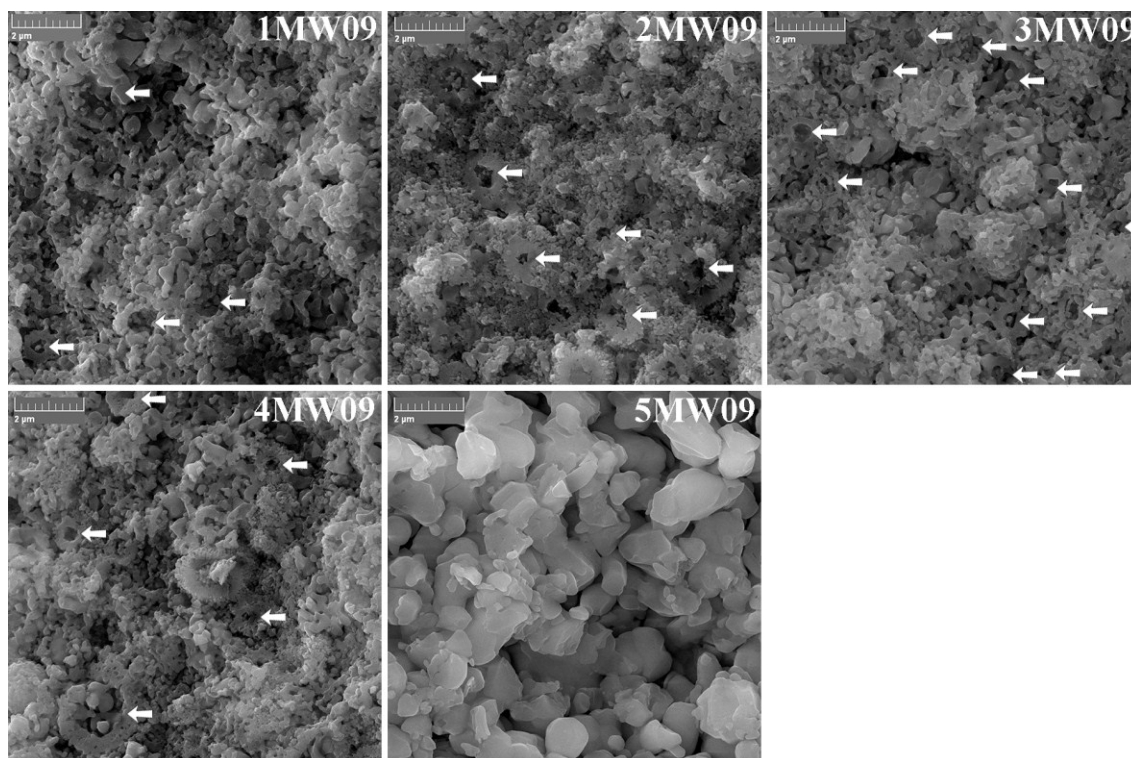
Visoko-temperaturno sinterovanje kompakata serija 3 i 5 imalo je kao rezultat najlošije vrednosti H . Dopiranje većim procentom Ag^+ i Zn^{2+} -jona dovodi do nastanka većeg broja pora i shodno tome slabljenju mehaničkih osobina kompakata. To nije slučaj sa uzorcima dopiranim jonima Cu^{2+} , kao i sa uzorcima koji su imali niži molski udeo Ag^+ -jona.

Kako bi morfologija uzoraka serije **MW09** bila jasnija, na slici 36 je prikazana površina loma snimljena pri uveličanju od 20 kx. Na osnovu prethodno prikazanih rezultata i slike 36, moguće je zaključiti da postoje dva mehanizma slabljenja strukture dopiranog HAp-a, delovanjem Ag^+ i Zn^{2+} -jona a oba povezana sa razvojem veće poroznosti.

U slučaju dopiranja jonima Ag^+ hidrotermalnom sintezom su dobijeni sferni agregati Ag^+ -HAp [158]. Ovi sferni agregati sastoje se od čestica štapićastog oblika, od kojih je jedan deo ispunjen, a drugi sa šupljinama. Šuplje forme mogu se videti na slici 36 (označene strelicama). Pretpostavlja se da se deo šupljih sfera razbije usled primene relativno visokog pritiska pri presovanju i da između razbijenih delova u kompaktu

zaostaju pore. Veći procenat Ag^+ -jona pri dopiranju dovodi do formiranja većeg broja pora (slika 36), delom između i delom unutar sfernih agregata. Pored toga, u uzorku 3MW09 su приметne veće čestice u poređenju sa uzorcima 1MW09, 2MW09 i 4MW09, čija je struktura slična (slike 24–33 i slika 36). Međutim, mikrotalasnim sinterovanjem na višim temperaturama zbog karakterističnog zapreminskog zagrevanja moguće je postići manju poroznost, a samim tim i bolje mehaničke karakteristike u poređenju sa konvencionalnim sinterovanjem, što se može zaključiti poređenjem uzoraka 3MW12 i 3CS12 na slikama 24–33 i vrednosti za P i H (tabela 17).

Ipak, kod uzoraka HAp dopiranih jonima Zn^{2+} , 5MW09, mehanizam formiranja kompaktne strukture (slike 24–33 i slika 36) tokom sinterovanja je potpuno drugačiji. Pregledom literature pronađeno je [266,336] da dopiranje Zn^{2+} i CO_3^{2-} -jonima stabilizuje HAp, što se nije moglo zaključiti za ovde prikazane kompakte. Poređenje nedopiranog HAp-a i HAp-a dopiranog Ag^+ i Cu^{2+} -jonima, dalo je sledeće razlike: FTIR spektar za 5MW09 pokazuje da su vibracije za CO_3^{2-} i OH^- mnogo manje izražene u poređenju sa drugim uzorcima (slika 2), šta je posledica transformacije većeg dela HAp-a u TCP (β i α), a koja je potvrđena XRD analizom.



Slika 36. Prelomna površina kompakata sinterovanih MW na 900 °C (uvećanje 20 kx, bar 2 µm).

Sve do sada navedeno pokazuje da se u kompaktnima dobijenim od HAp-a dopiranog jonima Zn^{2+} tokom sinterovanja, zbog brže transformacije HAp→TCP, od sfernih agregata praha nastaju slabo povezana zrna pri čemu velika količina pora ostaje između njih.

Poroznost kompakata serija 3 i 5 koja se formira na prethodno opisan način teško je kasnije eliminisati sinterovanjem i ti uzorci posle sinterovanja na temperaturama od 1200 i 1300 °C imaju veoma veliki udeo pora i samim tim i najniže vrednosti za H (Tabela 17).

Kompakti serije 4, koji se formiraju presovanjem praha HAp-a dopiranog jonima Cu^{2+} , daju najbolju stabilizaciju β -TCP faze i minimalne vrednosti P za sve kompaktne sinterovane na visokim temperaturama. To je dalje praćeno time da su ovi uzorci pokazali najbolje rezultate pri određivanju H i K_{IC} u poređenju sa drugim uzorcima prikazanim u ovom radu.

Podaci iz literature ukazuju da transformacija HAp→ α -TCP dovodi do formiranja pukotina u strukturi apatita [268], kao i da transformacija HAp→TCP utiče na slabljenje mehaničkih osobina [270,337]. Kao što je već pokazano, sinterovanje kompakata na višim temperaturama dovodi do transformacije velikog dela HAp-a u TCP, što najverovatnije doprinosi slabljenju ukupnih mehaničkih svojstva. I pored navedenog, HAp/ β -TCP/ α -TCP materijali mogu biti veoma korisni kao implantati u delovima skeletnog sistema koji ne trpi velika mehanička opterećenja a za koje je važan brz oporavak nove kosti. Na mestu primene kompakata uticaj dopiranih jona može biti veoma važan jer su Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} -joni dobri antimikrobni agensi, a Cu^{2+} i Zn^{2+} -joni spadaju i u mikroelemente [157,158,232,233,274].

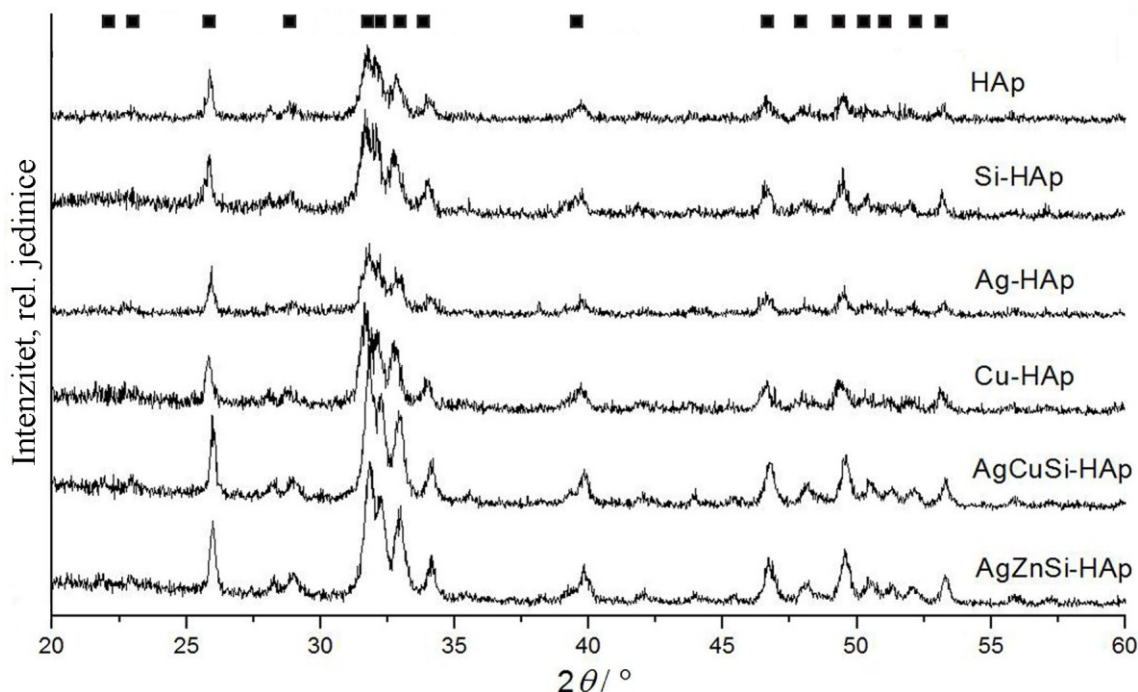
Hidrotermalnom metodom dobijeni prahovi, HAp-a i HAp-a dopiranog jonima Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} korišćeni su za dobijanje kompakata, CS sinterovanjem na 1200 °C i MW sinterovanjem na 900, 1200 i 1300 °C. Karakteristika ovih prahova je da se sastoje od štapićastih čestica aglomerisanih u sfere. Dimenzije čestica (prečnik i/ili dužina) su u rasponu od nekoliko desetina nm do oko 1,5 μm , u zavisnosti od toga da li su sfere ispunjena ili šuplje. Sinterovanjem dolazi do spajanja sfera, ali između sfera i unutar šupljih sfera zaostaje veliki broj pora. Dopiranje HAp-a jonima Ag^+ i Zn^{2+} uzrokuje veliku poroznost u kompaktnima, koja se ne može u potpunosti ukloniti tokom sinterovanja. To značajno smanjuje mehaničke osobine ovih kompakata. Kompakti koji

sadrže jone Cu^{2+} imaju najmanju poroznost i samim tim najbolje mehaničke osobine. Svi kompakti dobijeni CS sinterovanjem na $1200\text{ }^{\circ}\text{C}$ i MW sinterovanjem na 1200 i $1300\text{ }^{\circ}\text{C}$ sadrže HAp/ β -TCP/ α -TCP faze sa različitim masenim udelom pojedinačnih faza. Odnos faza kod kompakata koji sadrže Ag^{+} -jone sličan je kao kod kompakata dobijenih od nedopiranog HAp-a. Zn^{2+} -joni u kompaktima dovode do brže transformacije HAp-a u β -TCP i kasnije u α -TCP, dok kompakti sa Cu^{2+} -jonima sadrže najviše β -TCP faze. Prednost MW sinterovanja nad CS sinterovanjem potvrđena je poređenjem stepena densifikacije kompakata serija CS12 i MW12, iako je za uzorak 4CS12 postignut najbolji odnos vrednosti za H i K_{IC} od $3,85\text{ GPa}$ i $1,46\text{ MPam}^{1/2}$, redom.

18. Karakterizacija hidrotermalno sintetisani i kalcinisani prahovi HAp-1,50

Druga serija HAp prahova u kojima je molnski odnosu Ca/P iznosio 1,50 takođe je sintetisana hidrotermalnom metodom. Kao dopanti u ovoj seriji prahova korišćeni su joni Si^{4+} , Ag^{+} , Cu^{2+} kao i kombinacije ovih jona ($\text{Ag}+\text{Cu}+\text{Si}$ i $\text{Ag}+\text{Zn}+\text{Si}$).

Na slici 37 prikazani su difraktogrami sintetisanih prahova i na njima su uočljivi samo karakteristični pikovi kalcijum-hidroksiapatita.



Slika 37. XRD rezultati hidrotermalno sintetisanih prahova HAp-1,50. Položaj većih pikova HAp-a označeni su simbolom ■.

Prahovi HAp, Si-HAp, Ag-HAp i Cu-HAp pokazuju pretežno amorfnu strukturu dok su HAp prahovi dopirani sa više jona, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp, više kristalni.

Iz dobijenih XRD podataka izračunate su veličine kristalita (D), pomoću Šererove jednačine, i parametri jedinične ćelije pomoću programa Jade 6. Izračunati podaci prikazani su u tabeli 18. Za razliku od prahova HAp-1,67 (tabela 12), veličina kristalita dopiranih prahova u ovoj seriji sinteza je manja nego kristaliti nedopiranog HAp-a, a i razlika u dimenzijama je više izražena. U slučaju dopiranja samo jednim jonom, vrednosti zapremine jediničnih ćelija približne su zapremini koju ima nedopiran HAp, dok dopiranje sa tri jona dovodi do smanjenje zapremine jedinične ćelije.

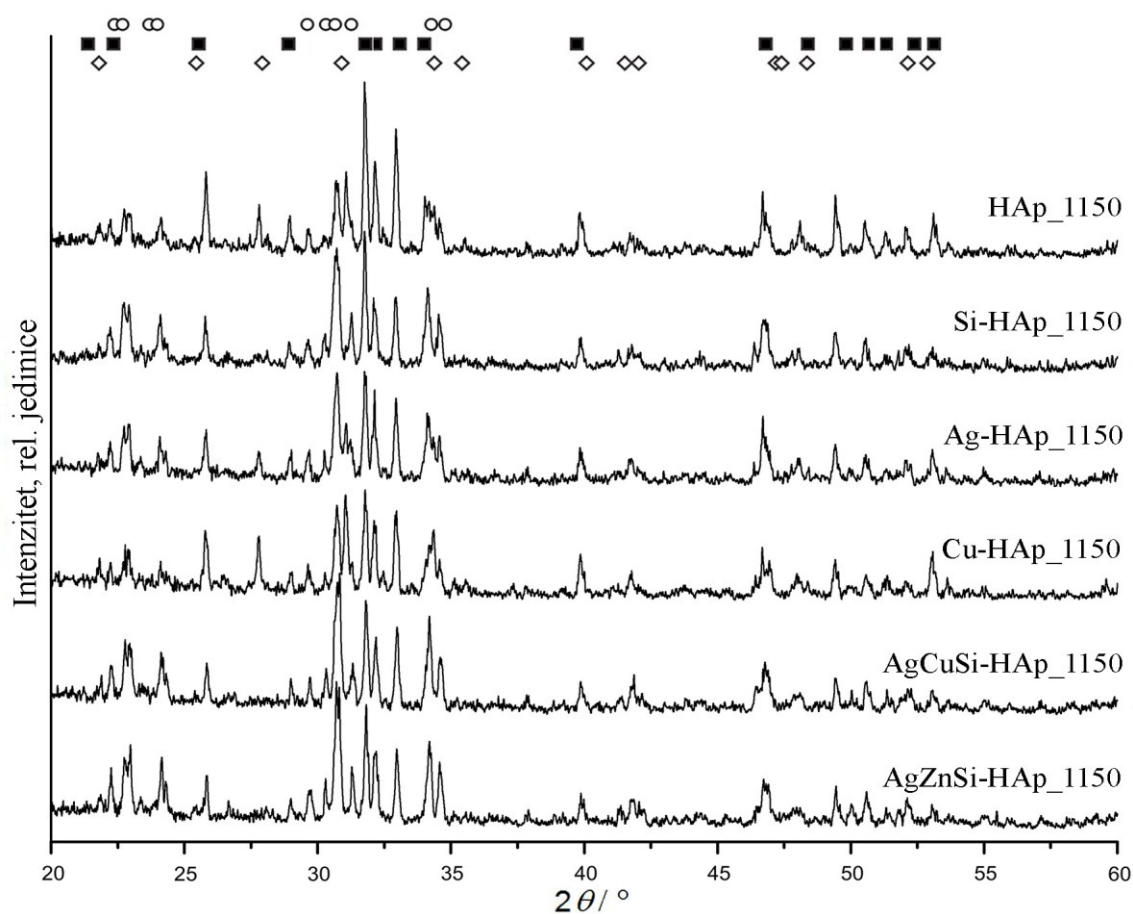
Tabela 18. Veličina kristalita (D) i parametri jedinične ćelije prahova HAp-1,50.

Uzorci	2θ (002)	β_m (rad)	D (002) (nm)	a (Å)	c (Å)	V (Å ³)
HAp	25,881	0,00331	47,7	9,4472(4)	6,8770(7)	531,55(5)
Si-HAp	25,853	0,00377	42,0	9,4446(5)	6,8829(4)	531,71(5)
Ag-HAp	25,901	0,00431	36,7	9,4459(9)	6,8714(6)	530,97(6)
Cu-HAp	25,772	0,00511	31,0	9,4453(3)	6,8968(4)	532,86(4)
AgCuSi-HAp	25,978	0,00361	43,8	9,4247(4)	6,8664(3)	526,98(4)
AgZnSi-HAp	25,957	0,00387	40,9	9,4021(5)	6,8637(4)	525,46(3)

Sintetisani prahovi su kalcinirani na 1100 i 1150 °C da bi se dobili odgovarajući polazni prahovi za pripremu skafolda. Osim SEM analize, kojom su analizirani svi kalcinirani prahovi, ostale analize (FTIR spektroskopija, XRD analiza i testovi citotoksičnosti) su primenjene samo na prahove kalcinirane na 1150 °C.

Na slici 38 prikazani su difraktogrami prahova kalciniranih na 1150 °C. Uočava se da se prahovi sastoje od tri faze: HAp, β -TCP i α -TCP. U tri slučaja dopiranja silicijumom, Si-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp, prevlađuju HAp i α -TCP faze dok je kod kalciniranih prahova HAp, Ag-HAp i Cu-HAp i udeo β -TCP faze primetan, pogotovo kod praha dopiranog jonima Cu²⁺. Takođe, uočljivo je da su pikovi HAp-a uži od pikova α -TCP što ukazuje na bolju kristaliničnost HAp-a.

Rezultati određivanje masenog udela faza semikvantitativnom metodom pomoću programa Jade 6 predstavljeni su u tabeli 19.



Slika 38. XRD kalciniranih prahova (HAp-1,50) na temperaturi 1150 °C. Položaj većih pikova faza: HAp, β -TCP i α -TCP označeni su simbolima ■, ◆ i ○, redom.

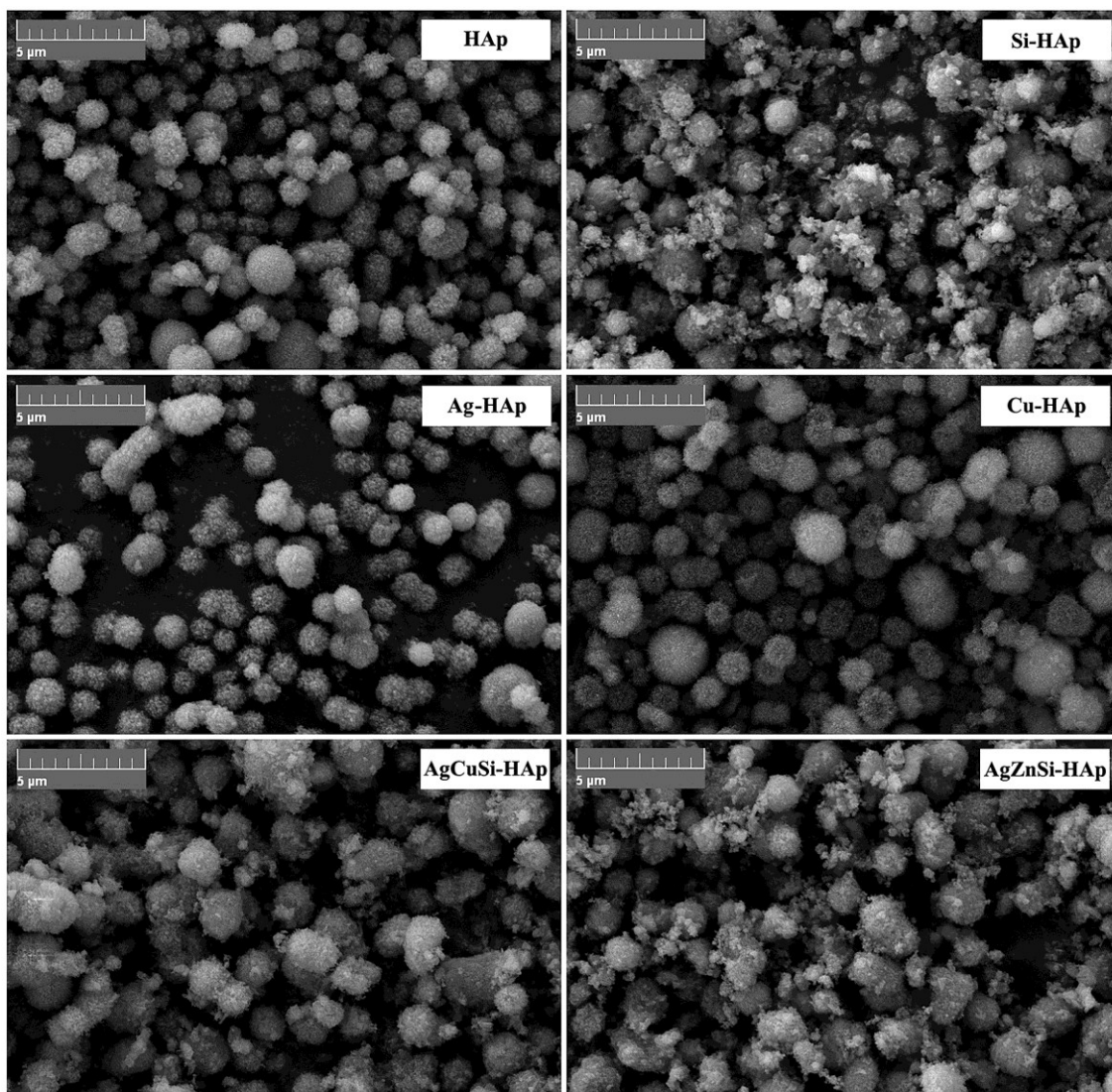
U slučaju nedopiranog praha i prahova dopiranih jonima Ag^+ i Cu^{2+} udeo β -TCP faze je značajan, pogotovo u prahu dopiranom jonima Cu^{2+} . Poredeći ove prahove sa prahovima HAp-1,67 kalciniranim na 1200 °C, a koji sadrže samo HAp i α -TCP faze, može se zaključiti da temperatura kalcinisanja od 1150 °C i vreme zadržavanja od 2 h nije dovoljno za potpunu transformaciju β -TCP u α -TCP kao što je slučaj sa kalciniranjem na 1200 °C tokom 2 h. Ovo je posebno izraženo u slučaju dopiranja jonima Cu^{2+} koji, kako se pokazalo i kod kompakata, stabilizuju β -TCP fazu.

Tabela 19. Maseni udeo (mas.%) faza koje sačinjavaju prahove HAp-1,50, kalcinirane na temperaturi 1150 °C.

Faze	HAp	Si-HAp	Ag-HAp	Cu-HAp	AgCuSi-HAp	AgZnSi-HAp
HAp	49,8(6)	36,6(5)	34,2(4)	33,7(5)	35,7(6)	34,6(4)
β -TCP	21,3(5)	2,0(2)	19,4(3)	30,7(2)	1,1(3)	1,4(4)
α -TCP	28,9(7)	61,4(4)	46,4(6)	35,6(6)	63,2(7)	64,0(8)

U tri preostala slučaja (Si-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp) gde sadržaj dopiranja silicijumom daleko prevazilazi sadržaj ostalih jona, preovlađuju faze HAp i α -TCP, dok je sadržaj β -TCP faze zanemarljiv, tj. ispod granice greške ove metode. Dakle, dopiranje jonima Si^{4+} favorizovalo je nastanak α -TCP faze čime su potvrđene ranije tvrdnje da Si^{4+} stabilizuju α -TCP fazu [88,89,172,173].

Na slici 39 prikazane su morfologije sintetisanih prahova. Kao i u slučaju prahova HAp-1,67, i kod ovih sinteza prahovi HAp, Ag-HAp i Cu-HAp se sastoje od sfernih agregata nastalih od štapićastih čestica. Veličina sfernih agregata je od 0,5 do 2,0 μm . Uzorci dopirani jonima Si^{4+} (Si-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp), pored sfernih aglomerisanih čestica, sadrže i značajan udeo čestica nanometarskih dimenzija od kojih deo najverovatnije potiče od SiO_2 .



Slika 39. SEM mikrografije hidrotermalno sintetisanih prahova HAp-1,50.

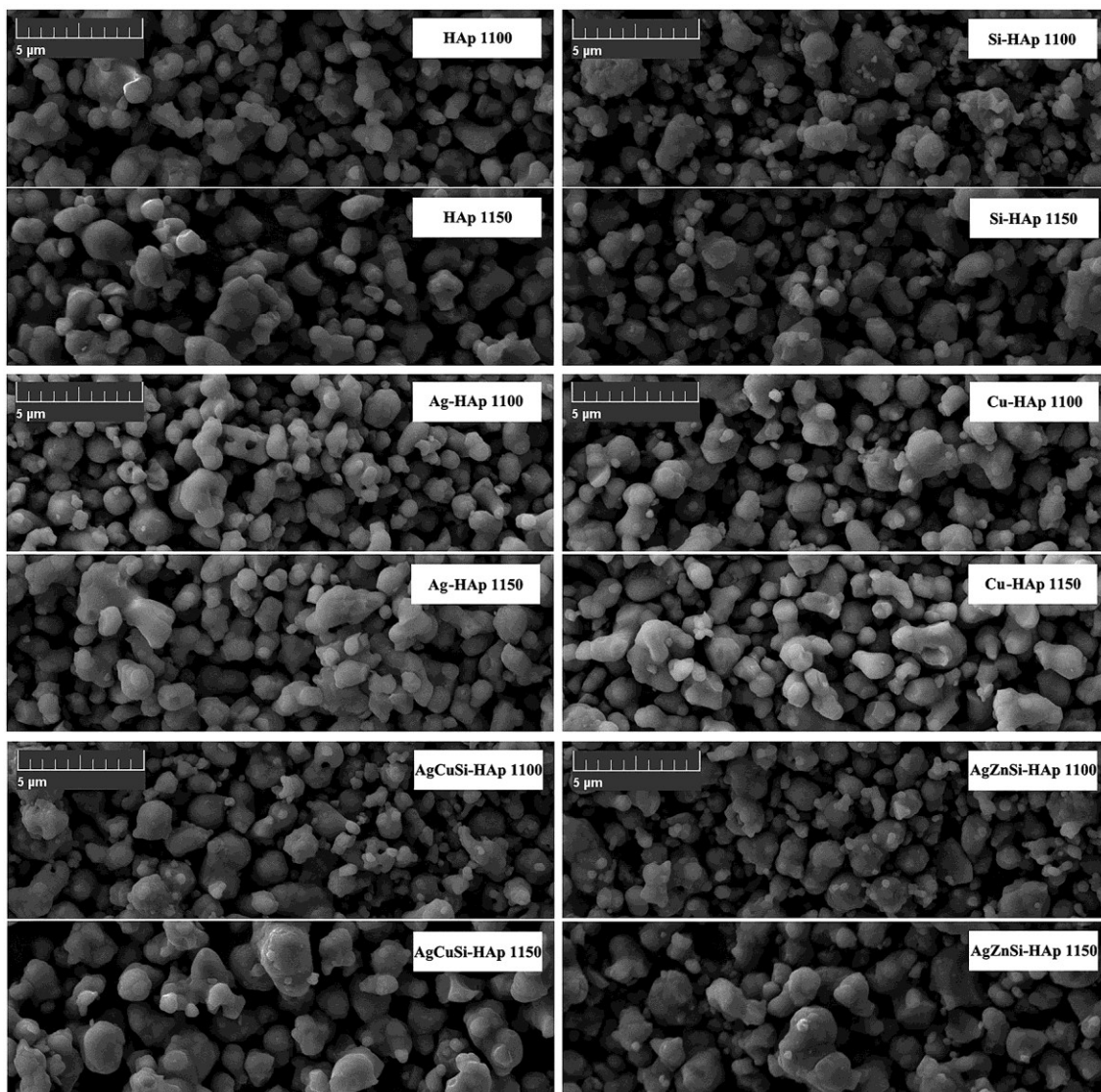
Rezultati EDS analize sintetisanih prahova prikazani su u tabeli 20. Dobijeni podaci pokazuju da je Ca/P odnos, u čije izračunavanje je uključen i udeli dopanata, u većini slučajeva malo iznad 1,50. Sadržaj jona Si^{4+} pri dopiranju u kombinaciji sa jonima Ag^+ i Cu^{2+} i jonima Ag^+ i Zn^{2+} je manji u odnosu na prah HAp-a dopiran samo jona Si^{4+} . U odnosu na početnu količinu jona Si^{4+} u reakcionom rastvoru sadržaj u dopiranim prahovima je 3–12 puta manji. Može se zaključiti da je dopiranje jonima Si^{4+} otežano u slučaju istovremenog dopiranja sa drugim jonima, a naročito ga ometa dopiranje jonima Cu^{2+} . Detektovan sadržaj jona Ag^+ u odnosu na Ca je nešto veći (oko 0,7% u Ag-HAp i 0,3% u AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp) nego u početnom reakcionom rastvoru (0,4 i 0,2%), dok je sadržaj jona Cu^{2+} i Zn^{2+} znatno manji.

Tabela 20. EDS rezultati ispitivanja hidrotermalno sinterovanih prahova HAp-1,50.

Uzorci	Ca (at.%)	P (at.%)	Si (at.%)	Ag (at.%)	Cu (at.%)	Zn (at.%)	Ca/P
HAp	60,28±0,09	39,72±0,09	–	–	–	–	1,52±0,01
Si-HAp	60,73±0,11	38,03±0,04	1,24±0,13	–	–	–	1,55±0,01
Ag-HAp	60,01±0,49	39,58±0,50	–	0,41±0,05	–	–	1,53±0,03
Cu-HAp	61,32±0,06	38,58±0,06	–	–	0,10±0,01	–	1,59±0,01
AgCuSi-HAp	60,70±0,49	38,65±0,58	0,38±0,13	0,20±0,02	0,07±0,02	–	1,56±0,03
AgZnSi-HAp	59,96±0,29	38,96±0,35	0,83±0,50	0,17±0,04	–	0,08±0,02	1,51±0,02

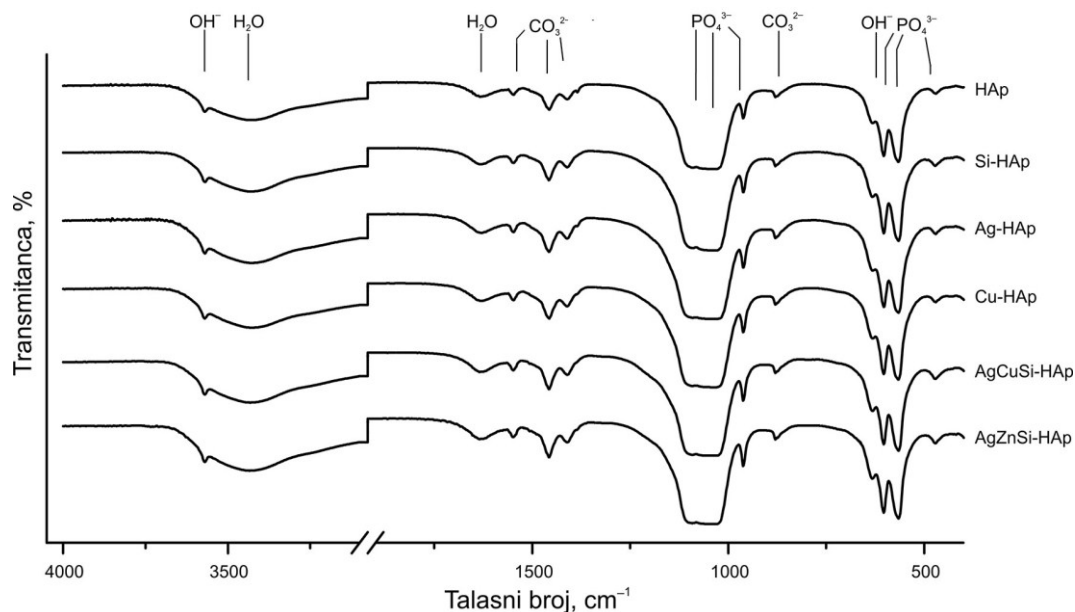
Mikrografi prahova kalciniranih na 1100 i 1150 °C prikazuju zaobljene čestice koje su međusobno delimično povezane obrazovanjem međučestičnih vratova. Primećuje se da su za svaku seriju dopiranja nešto veća zrna formirana na temperaturi kalcinacije od 1150 °C. Ta razlika između veličine zrna prahova kalciniranih na 1100 °C i prahova kalciniranih na 1150 °C najviše je uočljiva za prahove u kojima su dopanti tri različita jona, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp. Dopiranje jonima Si^{4+} nije opravdalo očekivanja u pogledu dobijanja kalcinisanog praha kod koga sfere neće biti međusobno povezane. Najverovatnije je da su temperature kalcinacije sintetisanog praha, 1100 i

1150 °C, za ovaj udeo dopiranja silicijumom veće od pogodnih za dobijanje kalcinisanog praha sa ne povezanim sfernim česticama.



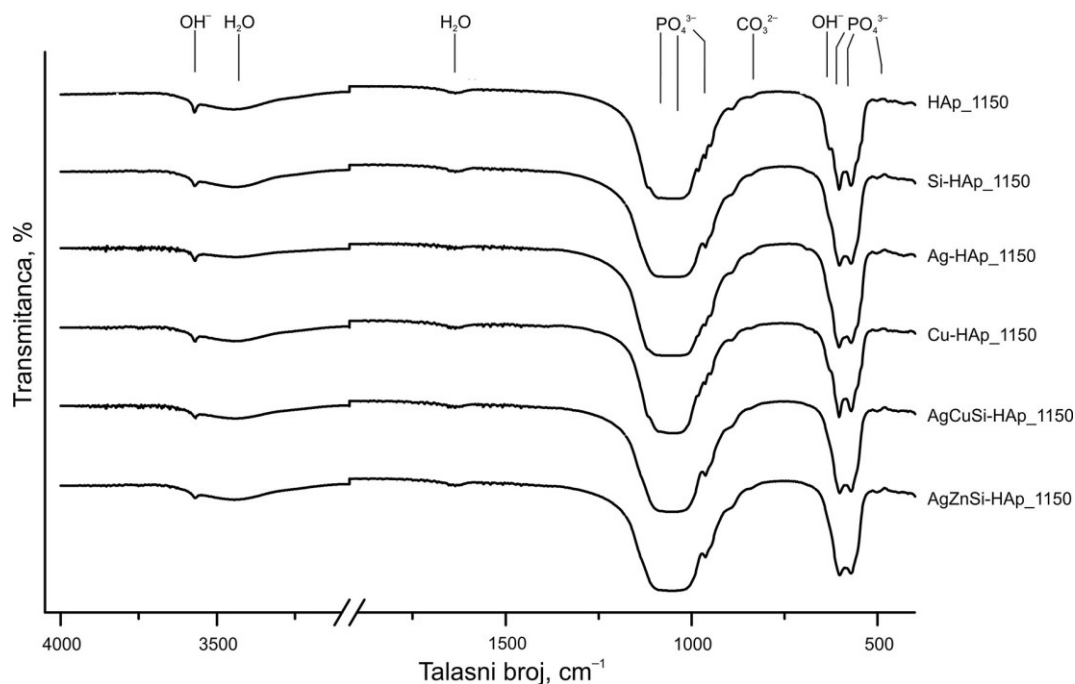
Slika 40. Prahovi kalcinisani na 1100 i 1150 °C (uveličanje 10 kx, bar = 5 µm).

FTIR spektri nedopiranog i dopiranih prahova HAp-1,50 (slika 41), veoma su slični FTIR spektrima prahova HAp-1,67 (slika 18), tako da objašnjenje vibracija uočenih na FTIR spektrima prahova HAp-1,67 (strana 79) važe i u slučaju prahova HAp-1,50. Dakle, dobijeni su karakteristični FTIR spektri hidroksiapatita koji su AB karbonatno supstituisani, što je posledica korišćenja uree za postizanje odgovarajuće pH tokom hidrotermalne sinteze HAp-a.



Slika 41. FTIR spektri hidrotermalno sintetisanih prahova HAp-1,50.

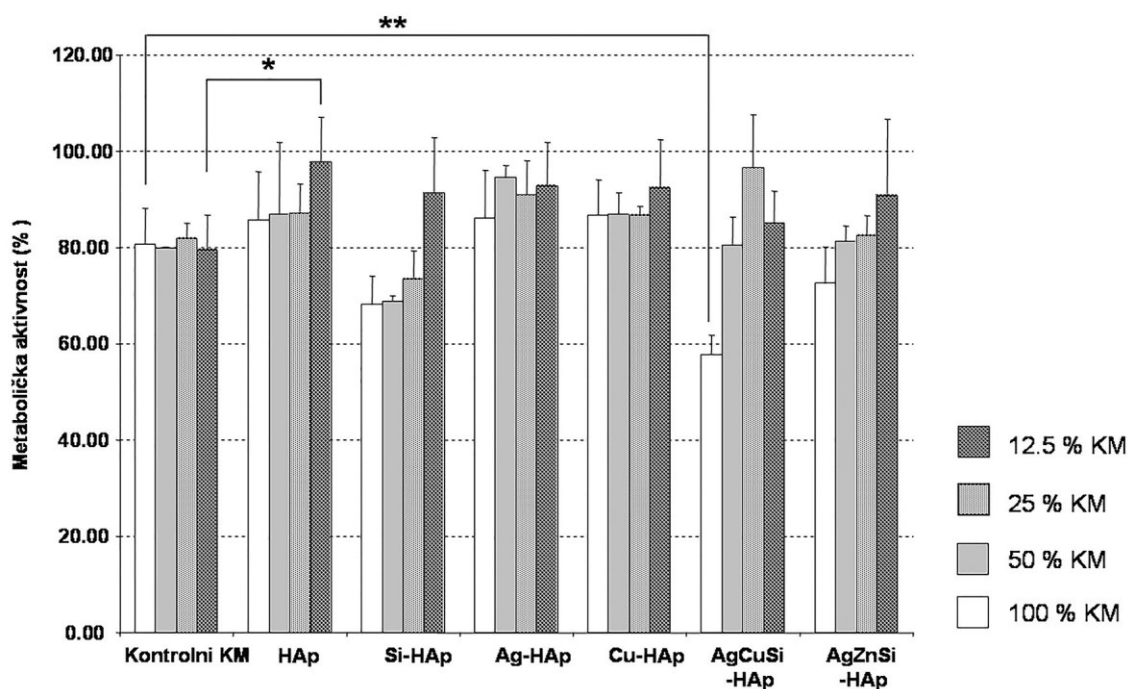
Takođe, za FTIR spektre prahova HAp-1,50 kalciniranih na 1150 °C (slika 42) odgovara objašnjenje dato za FTIR spektre kompakata (strana 89 i slika 23). Uočavaju se pikovi koji ukazuju na prisustvo HAp-a i TCP faza (β -TCP i α -TCP). Kako je već navedeno, prisustvo ovih faza je potvrđeno rendgenskom difrakcionom analizom (slika 38) a određen je i maseni udeo faza semikvantitativnom metodom (tabela 19).



Slika 42. FTIR spektri prahova kalciniranih na 1150 °C, HAp-1,50.

Citotoksičnost prahova HAp-1,50 kalciniranih na 1150 °C ispitana je primenom indirektnih testova sa kondicioniranim medijumom (KM), u skladu sa ISO standardima za *in vitro* testiranje citotoksičnosti (ISO 10993-5: 2009) [314]. U sklopu ove celine istraživanja, citotoksičnost navedenih prahova je procenjena na osnovu njihovog efekta na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i nekrozu L929 ćelija.

Efekat kalciniranih prahova na metaboličku aktivnost L929 ćelija analiziran je primenom testa koji se zasniva na redukciji MTT-a do formazana [315]. U ovim testovima metaboličke aktivnosti ispitivan je efekat 100%, 50%, 25% i 12.5% KM, pri čemu je 100% koncentracija KM imala 200 mg·ml⁻¹ praha materijala. Rezultati ispitivanja metaboličke aktivnosti su pokazali da je u poređenju sa ćelijama koje su kultivisane sa sveže pripremljenim kompletnim medijumom, metabolička aktivnost u prisustvu KM kod većine ispitivanih uzoraka bila snižena za oko 20% (slika 43).

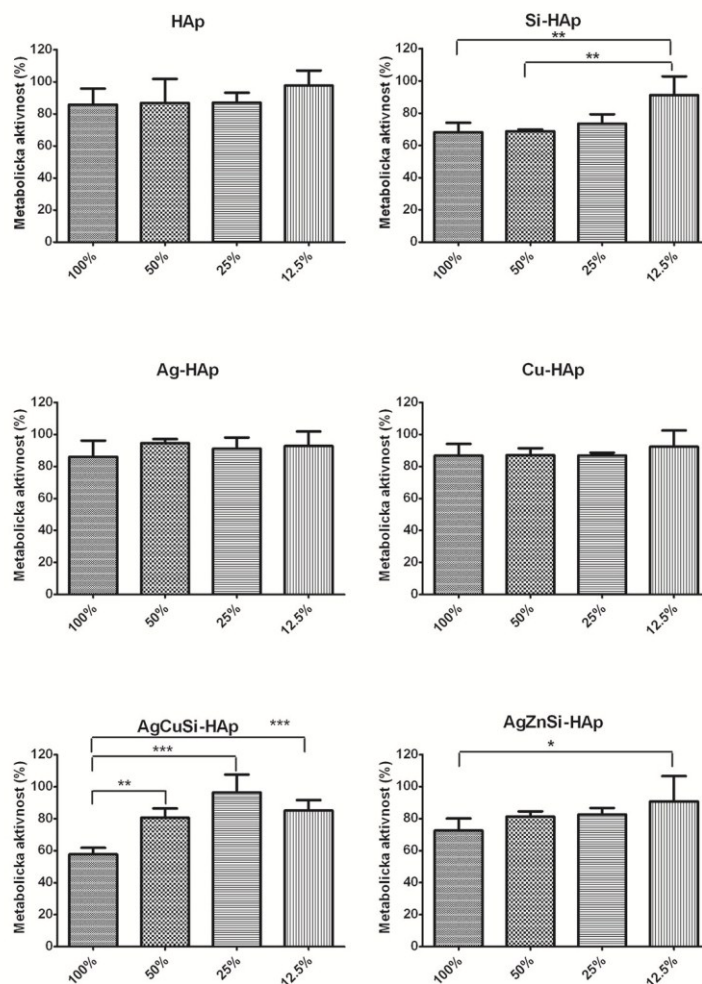


Slika 43. Efekat kalciniranih prahova na metaboličku aktivnost L929 ćelija.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ u poređenju sa kontrolnim KM.

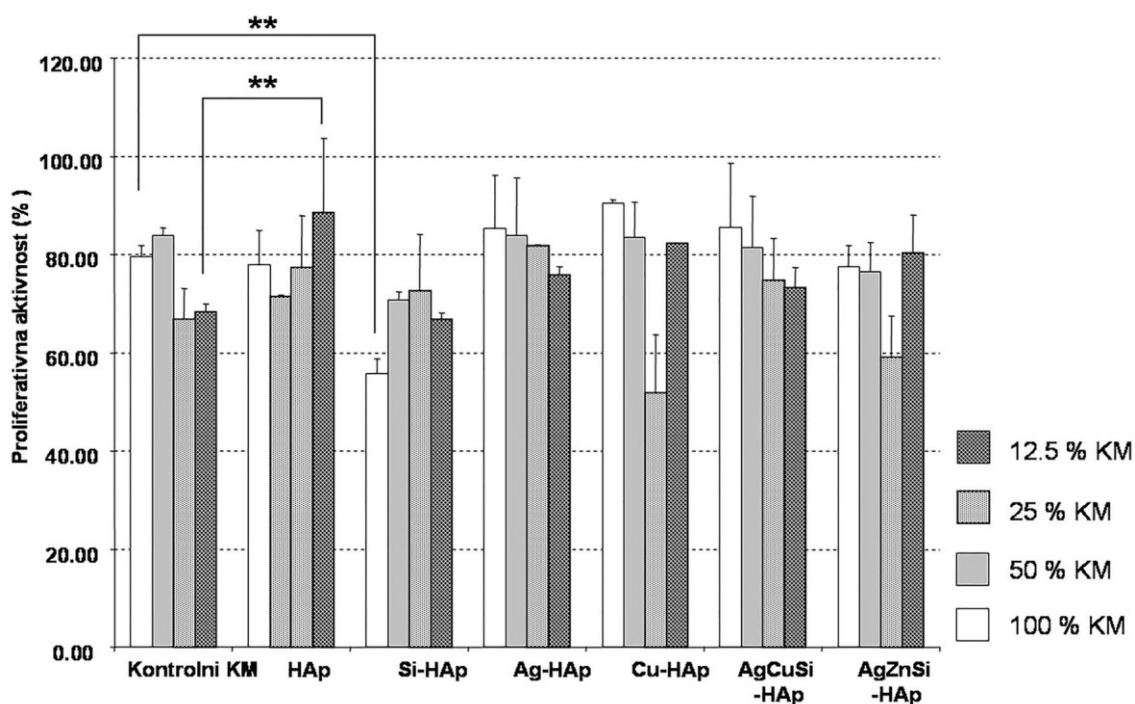
Najmanja inhibicija metaboličke aktivnosti je zabeležena u kulturi sa uzorkom 12,5% HAp i iznosila je 2,25%. Metabolička aktivnost ćelija iz ovih kultura je bila statistički značajno veća u poređenju sa istovetnom koncentracijom kontrolnog KM ($P < 0,05$). Sa druge strane, najveće sniženje metaboličke aktivnosti (oko 40%) je

uočeno kod ćelija koje su kultivisane u prisustvu 100% koncentracije KM AgCuSi-HAp materijala. Njihova metabolička aktivnost je bila značajno niža u poređenju sa ćelijama kultivisanim u kontrolnom kondicioniranom medijumu ($P < 0,01$). Najveće vrednosti metaboličke aktivnosti su zapažene u kulturama sa HAp, Ag-HAp i Cu-HAp KM i one su iznosile od 85–97%. Veće vrednosti su bile karakteristične za najniže koncentracije KM (12.5%), međutim nije uočena statistička značajnost između testiranih koncentracija KM. Najveći raspon u vrednostima metaboličke aktivnosti je bio evidentan u kulturama sa Si-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp KM i on se kretao od 57,76% kod AgCuSi-HAp (100% KM) do 91,32% kod Si-HAp (12,5% KM). Kod ovih kultura, uočena je statistički značajna razlika između ispitivanih koncentracija KM koja je prikazana na slici 44.



Slika 44. Efekat kalciniranih prahova na metaboličku aktivnost L929 ćelija, poređenje unutar grupe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,01$ u poređenju sa 100% koncentracijom KM.

Efekat KM kalciniranih prahova na proliferaciju L929 ćelija je ispitan u testu sa ugradnjom $^3\text{[H}^+]$ -timidina [316]. Proliferativan odgovor je kvantifikovan na osnovu radioaktivnosti koja je direktno proporcionalna sintezi DNK molekula u proliferišućim ćelijama. Rezultati prikazani na slici 45 ukazuju da ispitivani materijali utiču na proliferativnu aktivnost L929 ćelija na sličan način kao i kada se radi o modulaciji njihove metaboličke aktivnosti. Najveći broj ispitivanih koncentracija (22 od 28 uzoraka, 78,6%) dovodi do inhibicije proliferativnog odgovora u rasponu od 9,5 do 21,1%. Manji broj uzoraka dovodi do veće inhibicije proliferacije ćelija, od 48,1% (Cu-HAp 25% koncentracija KM) do 31,5% (Si-HAp 12,5% koncentracija KM). Međusobnim poređenjem proliferativnog odgovora ćelija u prisustvu ispitivanih uzoraka i u prisustvu kontrolnog KM ustanovljeno je da postoji statistički značajno sniženje proliferacije L929 ćelija jedino u prisustvu Si-HAp materijala (100% KM) (proliferativna aktivnost od 55,74% u odnosu na 79,45%, $P < 0,01$). Sa druge strane slično efektu na metaboličku aktivnost, uzorak HAp u koncentraciji KM od 12,5% značajno je stimulisao proliferativnu aktivnost ćelija u poređenju sa istovetnom koncentracijom kontrolnog KM (proliferativna aktivnost od 88,52% u odnosu na 68,38%, $P < 0,01$).

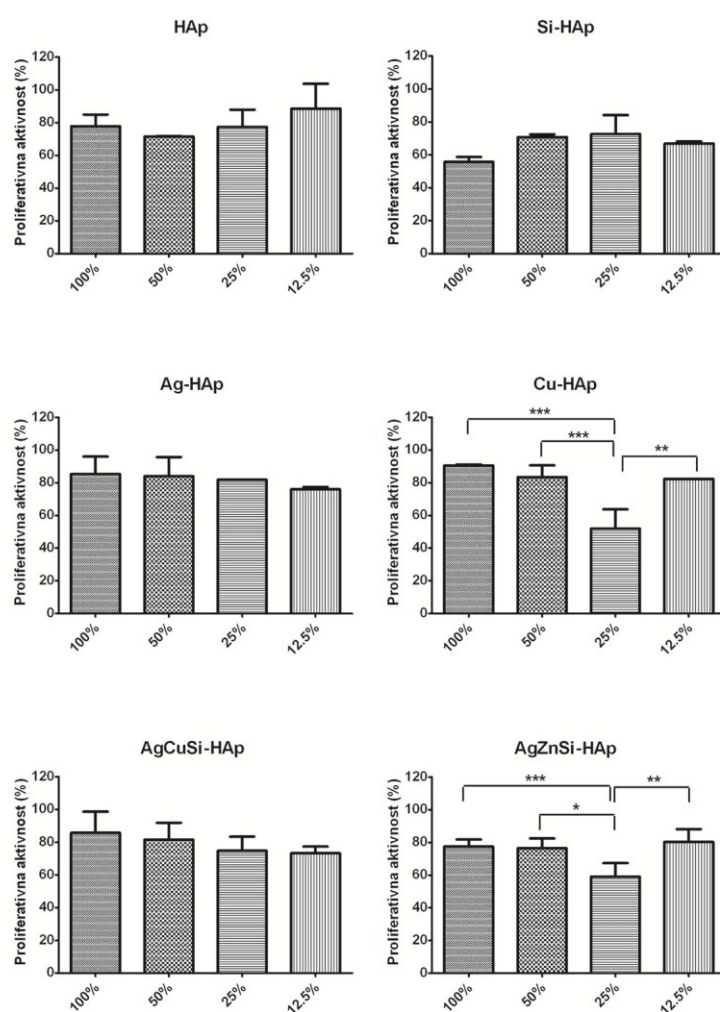


Slika 45. Efekat kalciniranih prahova na proliferativnu aktivnost L929 ćelija.

** $P < 0,01$ u poređenju sa kontrolnim KM.

Na slici 46 prikazano je poređenje unutar grupe proliferativne aktivnosti ćelija u prisustvu ispitivanih materijala. Značajna razlika u proliferativnoj aktivnosti je uočena jedino u grupama sa Cu-HAp i AgZnSi-HAp pri koncentraciji KM od 25%.

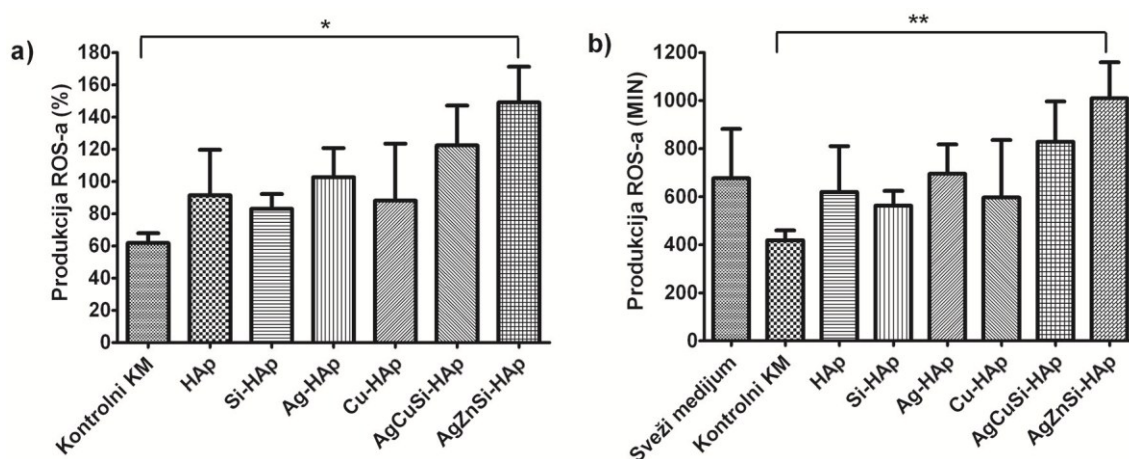
Polazeći od preporuke ISO standarda za *in vitro* testiranje citotoksičnosti (ISO 10993-5: 2009) [314], prema kojima sniženje vijabilnosti na nivo manji od 70% ukazuje na postojanje citotoksičnog delovanja, na osnovu dobijenih rezultata ispitivanja metaboličke i proliferativne aktivnosti može se pretpostaviti da na nivou 100% koncentracije KM ($200 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) Si-HAp i AgCuSi-HAp materijali ispoljavaju citotoksično delovanje.



Slika 46. Efekat kalciniranih prahova na proliferaciju L929 ćelija – poređenje unutar grupe. * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,01$ u poređenju 25% koncentracije sa ostalim koncentracijama KM.

Polazeći od pretpostavke da se u osnovi snižavanja metaboličke aktivnosti i proliferativnog odgovora može nalaziti povećana produkcija slobodnih kiseoničnih radikala, u narednom delu istraživanja ispitan je nivo intracelularne produkcije reaktivnih kiseoničnih vrsta (ROS) kod L929 ćelija koje su kultivisane u prisustvu KM ispitivanih materijala. Produkcija ROS-a je ispitana protočnom citofluorimetrijom, primenom metode oksidacije 2'-7'-dihlorido-dihidro-fluorescein-diacetata kako je opisano u studiji Eruslanova i Kusmartseva [317]. Rezultati prikazani na slici 47 ukazuju da su ćelije kultivisane u prisustvu KM ispitivanih prahova imale povećanu produkciju ROS-a. Interesantno je da je statistički značajno povećanje količine ROS-a u poređenju sa kontrolnim KM zapaženo jedino u kulturama sa AgZnSi-HAp KM (za oko 2,4 puta, slika 47b), kod kojih nije uočena značajna inhibicija metaboličke i proliferativne aktivnosti L929 ćelija (slike 43–47). Sa druge strane u kulturama sa Si-HAp i AgCuSi-HAp materijalima u kojima je detektovano sniženje metaboličke i proliferativne aktivnosti za više od 30%, produkcija ROS-a je bila veća (1,34 i 1,98 puta u odnosu na kontrolni, slika 47b) ali ne i statistički značajna. Na osnovu prethodnog se može pretpostaviti da povećana produkcija ROS-a nije u osnovi snižavanja metaboličke i proliferativne aktivnosti L929 ćelija koje su kultivisane u prisustvu ispitivanih materijala.

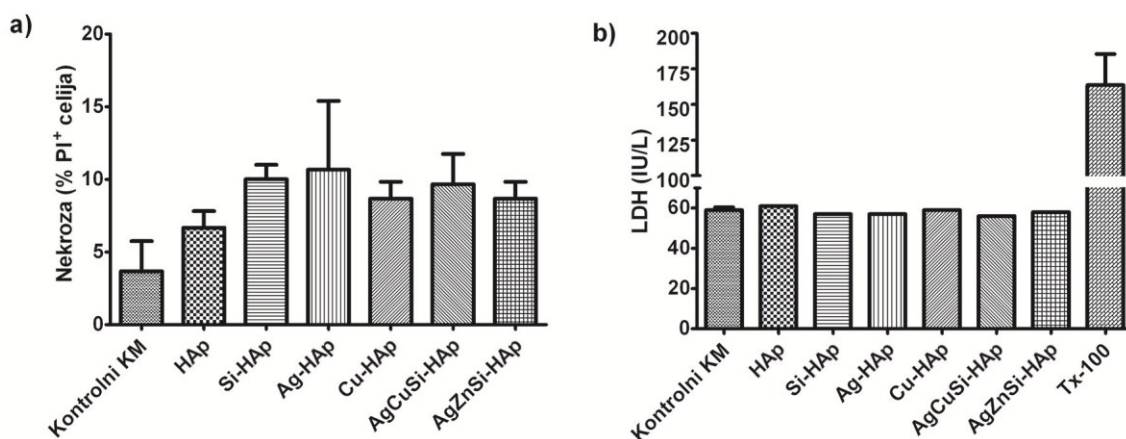
Moguće je da je veća produkcija ROS-a pri ispitivanju KM prahova AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp (slika 47) posledica zbirnog delovanja svih dopirajućih jona.



Slika 47. Efekat kalciniranih prahova na produkciju ROS-a L929 ćelija.

* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$ u poređenju sa kontrolnim KM.

U završnom delu ispitivanja citotoksičnosti kalciniranih prahova analiziran je njihov efekat na ćelijsku nekrozu. Nekroza ćelija je ispitivana na osnovu procene integriteta ćelijske membrane primenom postupka obeležavanja ćelija propidijum-jodidom (PI) i na osnovu otpuštanja enzima laktat-dehidrogenaze (LDH) u supernatantima ćelijskih kultura L929 ćelija [316,318]. Dobijeni rezultati ukazuju da KM dobijen kondicioniranjem $200 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ HAp praha ne dovodi do značajne nekroze L929 ćelija. Zastupljenost nekrotičnih ćelija, na osnovu obeležavanja sa PI, kod većine ispitivanih materijala je iznosila oko 10%, dok gotovo da nije bilo razlike u količini oslobođene LDH (slika 48). Vrednosti LDH su bile u nivou bazalnih vrednosti samog KM u kome su L929 ćelije kultivisane. Polazeći od kriterijuma ISO standarda koji definišu postojanje citotoksičnog efekta (smanjenje ćelijske vijabilnosti za više od 30%) [314], detektovane vrednosti ćelijske nekroze ne ukazuju na postojanje citotoksičnosti ispitivanih materijala.



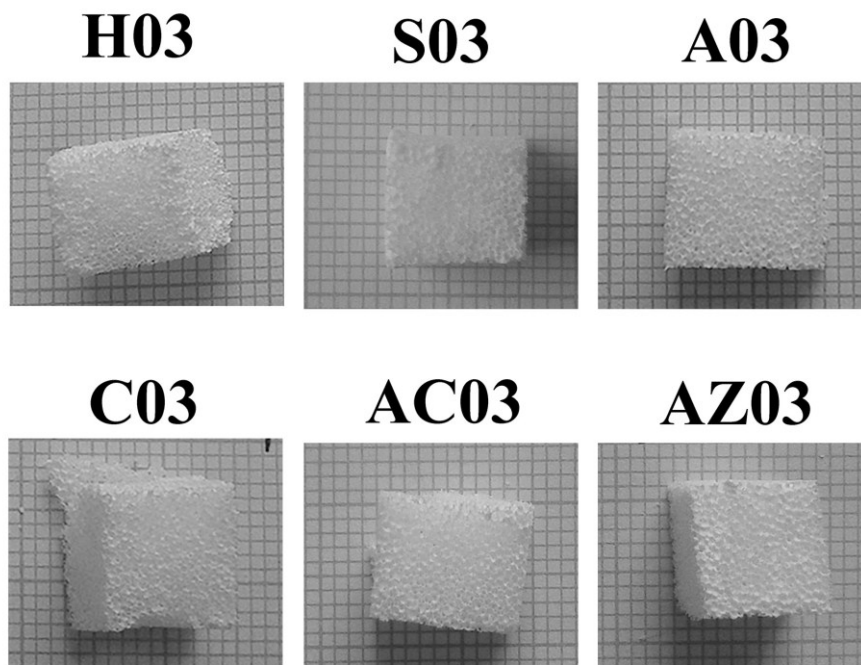
Slika 48. Efekat HA materijala na nekrozu L929 ćelija.

Rezultati ispitivanja citotoksičnosti ukazuju da od ispitivanih kalciniranih prahova, jedino AgCuSi-HAp i Si-HAp materijali značajno snižavaju metaboličku, odnosno proliferativnu aktivnost L929 ćelija. Budući da su detektovane vrednosti ispod 70% vrednosti kontrolnih ćelija, prema kriterijumima ISO standarda za *in vitro* testiranje citotoksičnosti (ISO 10993-5: 2009) [314] može se govoriti o potencijalnom citotoksičnom efektu navedenih materijala. Međutim potvrda citotoksičnog delovanja ovih materijala nije dobijena na nivou ćelijske nekroze i nije bila praćena statistički značajno većom produkcijom ROS-a.

19. Biokeramički materijali – skafoldi

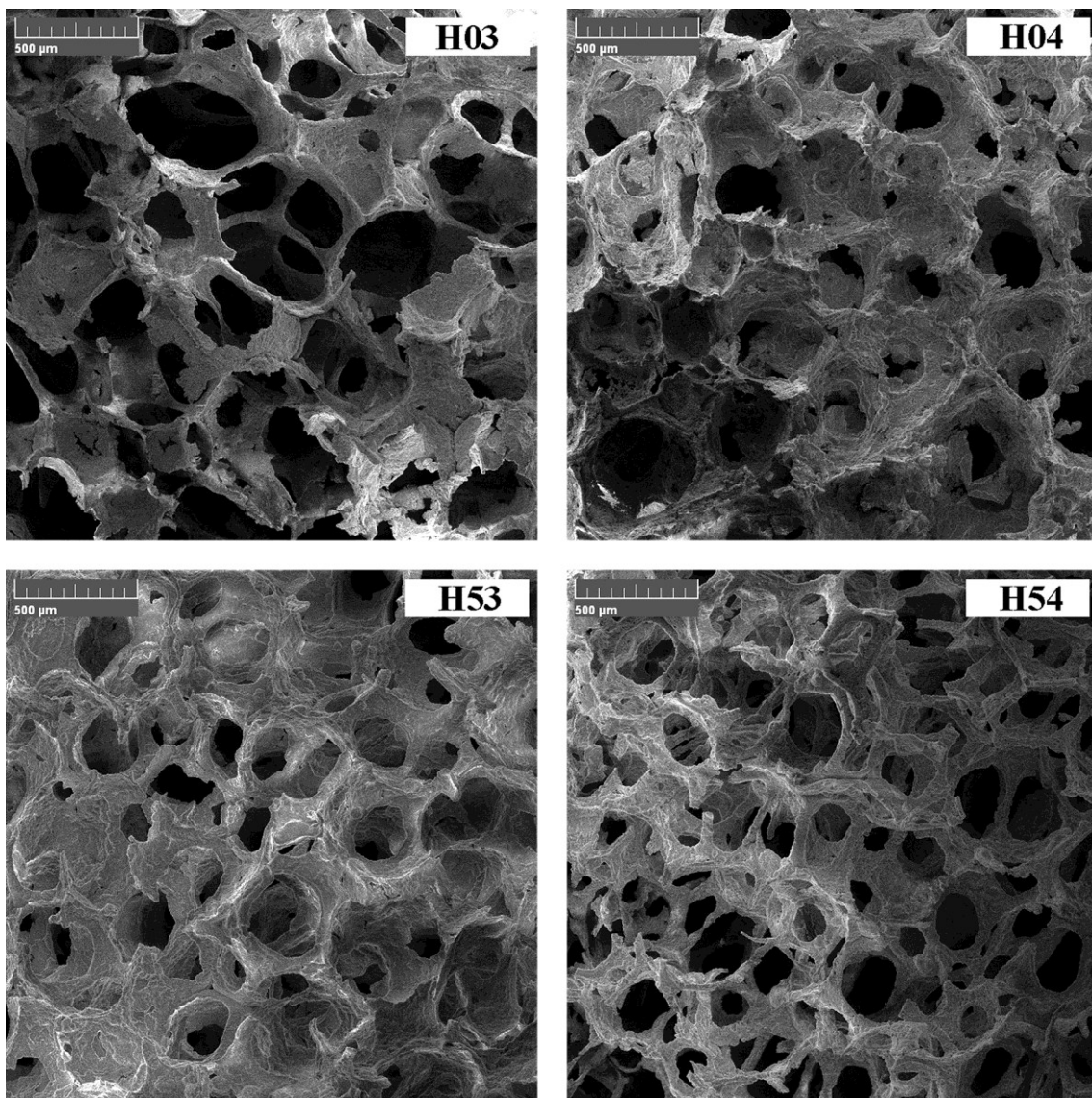
Podsećanje na oznake skafolda, obeleženi su slovima: **H**, **S**, **A**, **C**, **AC** i **AZ**, koja predstavljaju HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp, redom, iza kojih slede dve cifre od kojih prva može biti 0 ili 5 i predstavlja temperaturu kalcinacije praha od 1100 ili 1150 °C, redom, a druga 3 ili 4 i predstavlja krajnju temperaturu sinterovanja skafolda, 1300 ili 1400 °C, redom.

Makroskopski prikaz skafolda serije 03 (prahovi kalcinirani na 1100 °C, sinterovanje na 1300 °C) predstavljen je na slici 49. Makroskopski izgled skafolda ostalih serija sinterovanja (04, 53 i 54) isti je kao kod serije 03. Imajući na umu da je poliuretanski suđer za pripremu skafolda sečen na kockice približnih dimenzija 1 x 1 x 1 cm, sa slike se pomoću milimetarskog papira vidi da nije došlo do velikog skupljanja. Uzrok tome su temperature kalcinacije prahova (1100 i 1150 °C). Upravo je glavni cilj kalcinacije praha, pre procesirana skafolda od tog praha, da se izbegne veliko skupljanje pri sinterovanju, jer bi veliko skupljanje narušilo strukturu skafolda. Takođe, prilikom kalcinacije poželjno je da ne dođe do spajanja čestica praha [295].

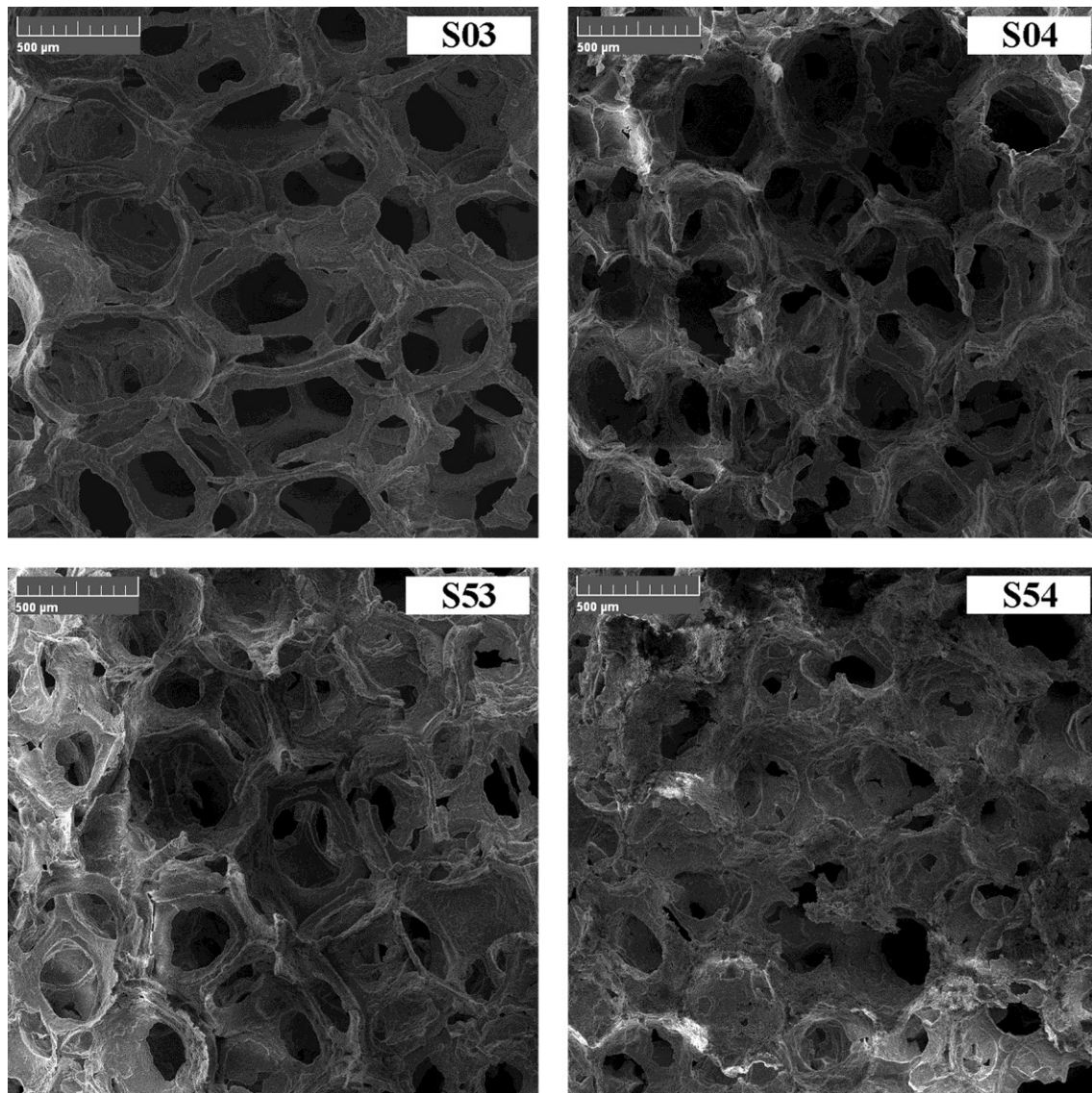


Slika 49. Makroskopski prikaz skafolda serije 03 na milimetarskom papiru.

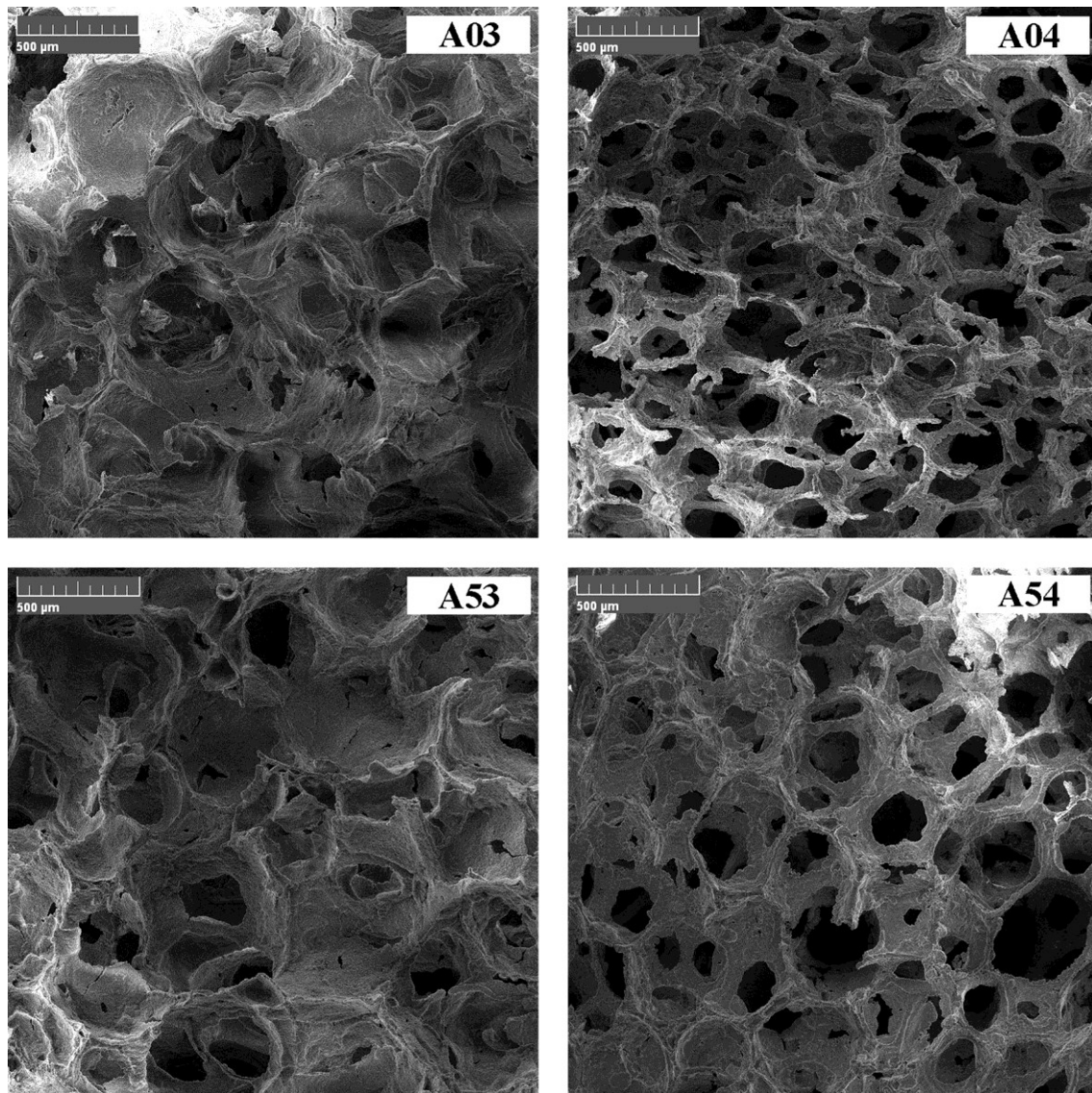
Na slikama 50–55 predstavljene su morfologije skafolda snimljene pri uveličanju 100 x. Očito je da skafoldi imaju veliku poroznost, sa porama čije se veličine kreću u opsegu od oko 100 do 500 μm . Povezanost pora na većini skafolda je velika i pore su valjkastog oblika što sve zajedno čini dobru osnovu za interakciju skafold–koštano tkivo, odnosno proliferaciju i rast nove kosti unutar skafolda.



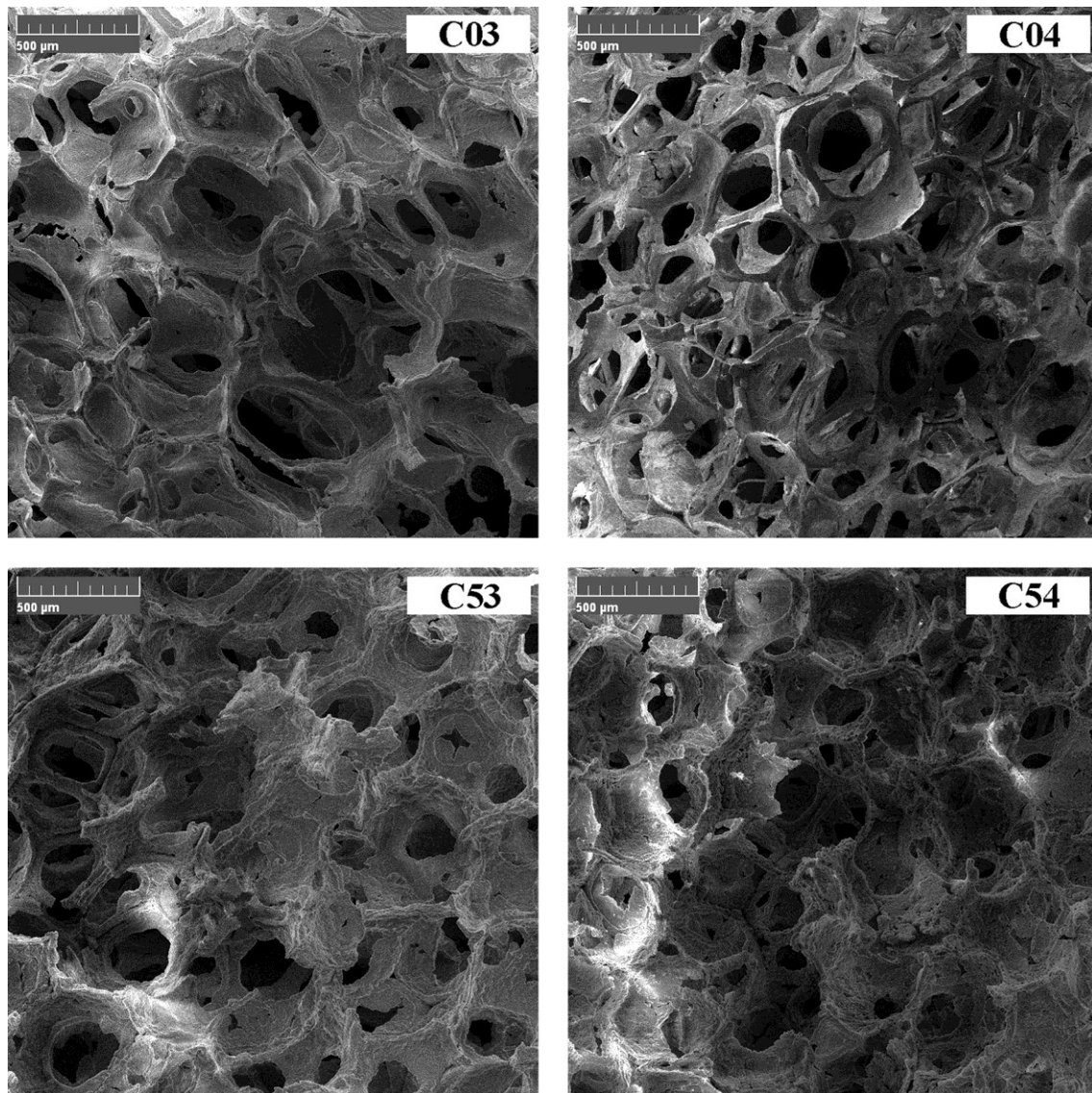
Slika 50. Morfologija skafolda serije H – čist HAp (uveličanje 100x).



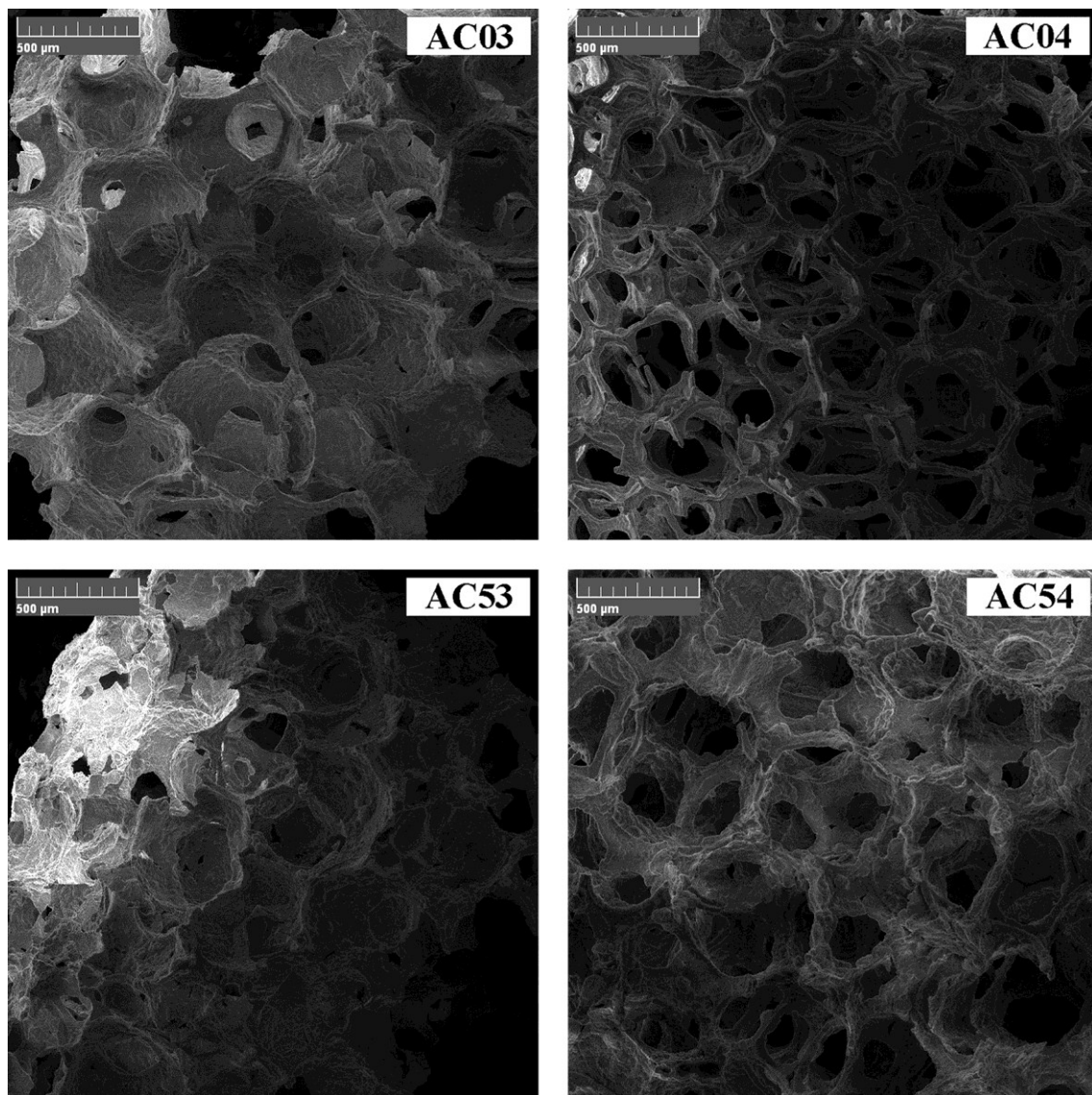
Slika 51. Morfologija skafolda serije S – SiHAp (uveličanje 100x).



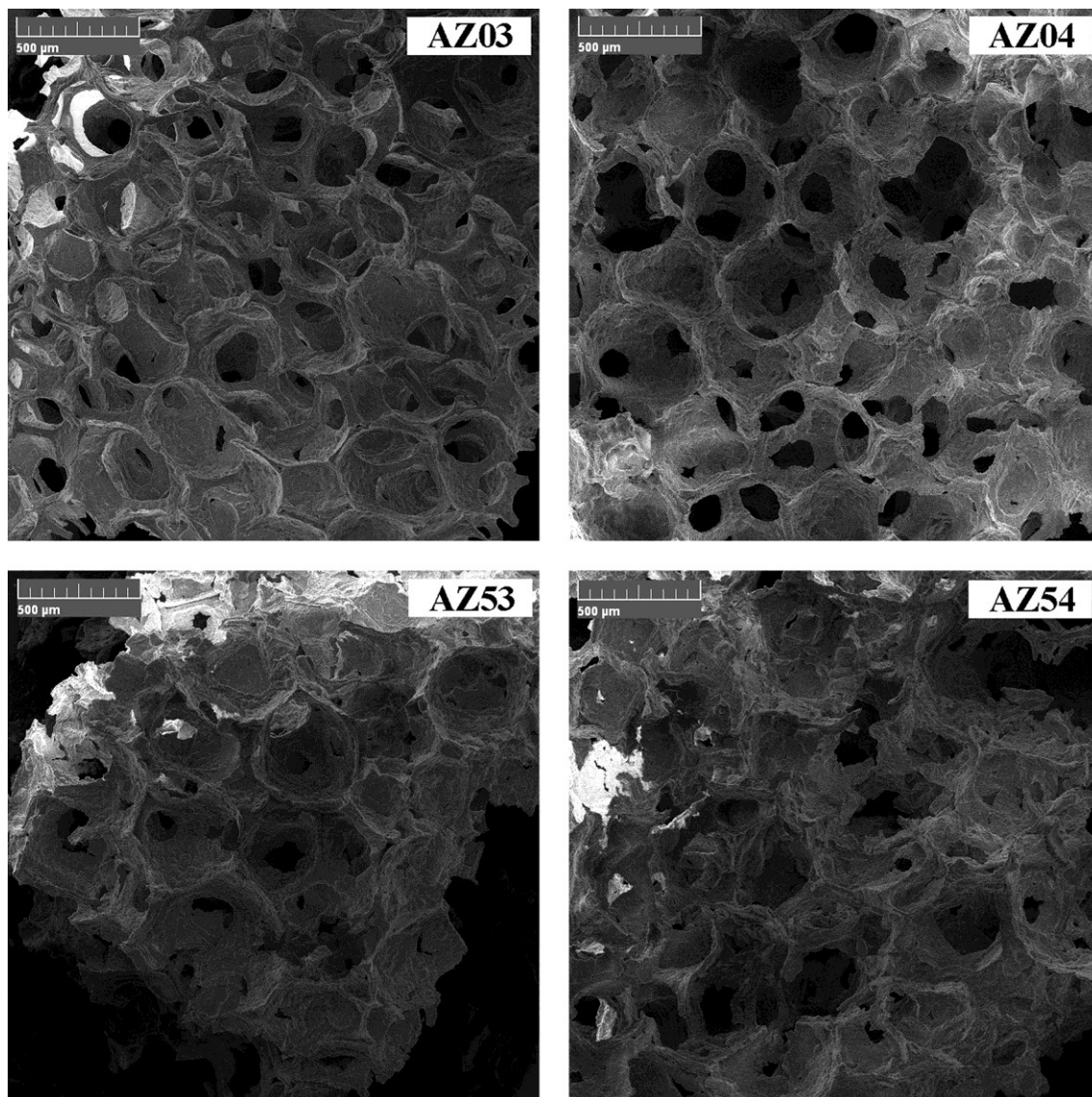
Slika 52. Morfologija skafolda serije A – AgHAp (uveličanje 100x).



Slika 53. Morfologija skafolda serije C – CuHAp (uveličanje 100x).



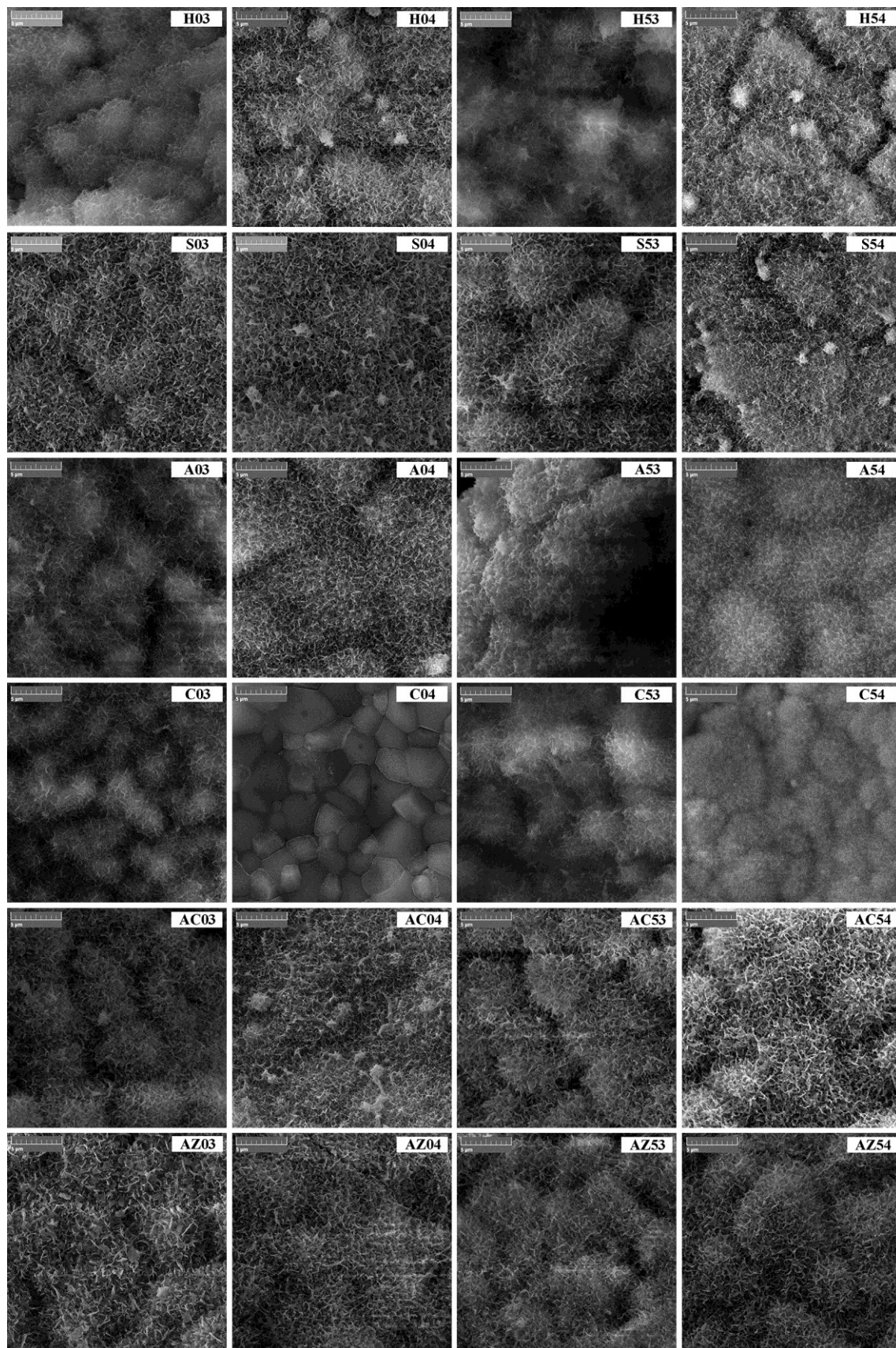
Slika 54. Morfologija skafolda serije AC – AgCuSiHAp (uveličanje 100x).



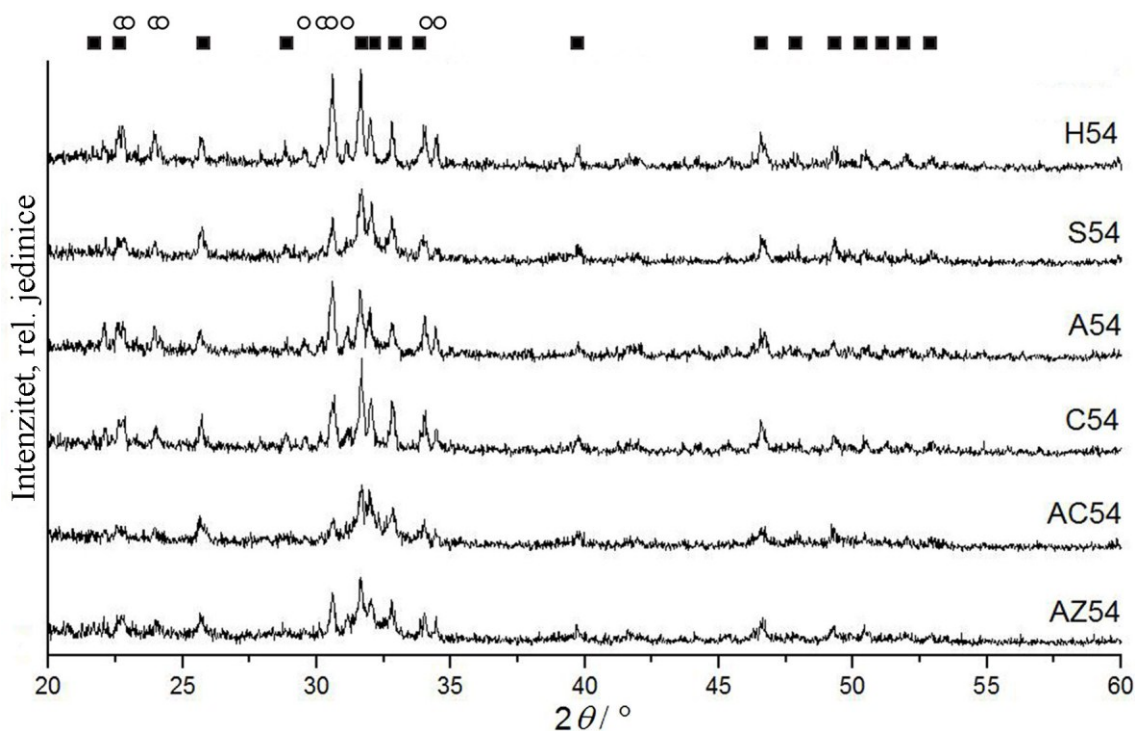
Slika 55. Morfologija skafolda serije AZ – AgZnSiHAp (uveličanje 100x).

Mikrografija površine skafolda (slika 56) posle 14 dana u SBF-u pokazuje novoformirani sloj apatita, ispod kojeg se naziru zrna koja izgrađuju skafolde. Jedino u slučaju skafolda C04 (prah Cu-HAp, kalcinisan na 1100 °C, skafold sinterovan na 1400 °C) nije se obrazovao primetan sloj apatita preko svih zrna. Ipak, i kod ovoga skafolda na pojedinim zrnima (zrna su svetlija na slici) pri većim uvećanjima vidi se početak kristalizacije iglica apatita. Formiranje apatitnog sloja ukazuje na dobra bioaktivna svojstva skafolda u *in vitro* uslovima [320].

XRD podaci dobijeni za seriju skafolda 54, posle dve nedelje u SBF-u (slika 57), pokazuju da se ovi biokeramički materijali sastoje od dve faze, HAp i α -TCP (tabela 21). U većini slučajeva preovlađuje HAp faza.



Slika 56. Površina skafolda snimljena posle dve nedelje u SBF-u (10 kx, bar 5 µm).



Slika 57. Difraktogrami materijala od koga su sačinjeni skafoldi serije 54 posle dve nedelje u SBF-u. Položaj većih pikova faza: HAp, i α -TCP označeni su simbolima ■ i o, redom.

Prethodni nalaz ukazuje da je došlo do hidrolize α -TCP u HAp tokom držanja skafolda u SBF-u. Dakle, pri ovim uslovima nije ni moguća stabilizacija α -TCP faze jonima Si^{4+} , šta više, skafoldi koji sadrže Si^{4+} jone imaju i najmanji procenat α -TCP faze. Tokom boravka skafolda u SBF-u dolazi do rastvaranja površine, to jest, rastvara se (hidrolizuje) α -TCP na površini zidova skafolda, i precipitacije apatita iz SBF-a. Skafoldi koji sadrže jone Si^{4+} imaju na početku držanja u SBF-u i više α -TCP faze na površini. Kako se hidroliza odvija samo na površini [121] zidova skafolda to znači da veći sadržaj α -TCP na površini vodi većem obimu transformacije u HAp.

Tabela 21. Fazni sastav skafolda serije 54 izračunat analizom XRD podataka (slika 57).

Faze	H54	S54	A54	C54	AC54	AZ54
HAp	48,5(6)	72,5(6)	45,7(4)	60,6(5)	81,2(7)	66,4(8)
α -TCP	51,5(7)	27,5(3)	54,3(6)	39,4(6)	18,8(4)	33,6(5)



Slika 58. Šimadsu, univerzalna mašina za testiranje, pomoću koje su određene mehaničke karakteristike skafolda i prikaz testiranja.

Na slici 58 prikazana je oprema za testiranje mehaničkih karakteristika skafolda. U gornjem desnom uglu prikazan je trenutak u kome deo mašine pritiska skafold pri brzini od $5 \text{ mm} \cdot \text{min}^{-1}$. Ovim testiranjem određene su vrednosti maksimalne sile (N) koju pri tim uslovima skafoldi mogu da izdrže, pritisna čvrstoća (MPa) i Jungov modul elastičnosti (MPa) skafolda i date vrednosti su navedene u tabeli 22.

S obzirom na veliku ukupnu poroznost dobijene vrednosti maksimalne sile, pritisne čvrstoće i Jungovog modula elastičnosti su očekivano prilično slabe. I podacima iz literature ukazuju na obrnuto proporcionalan odnos poroznosti i mehaničkih karakteristika [288–291,296,298]. Upoređujući rezultate dobijene za skafolde procesirane različitim režimima kalcinacije praha i sinterovanja skafolda u tri od šest serija najbolji rezultati su dobijani pri temperaturnom režimu 04 a dva puta pri temperaturnom režimu 53.

U odnosu na dopante, najbolje rezultate ostvaruju skafoldi dopirani sa po tri jona (Ag+Cu+Si i Ag+Zn+Si). Pretpostavka je da stvaranje novog HAp-a hidrolizom α -TCP ojačava strukturu skafolda.

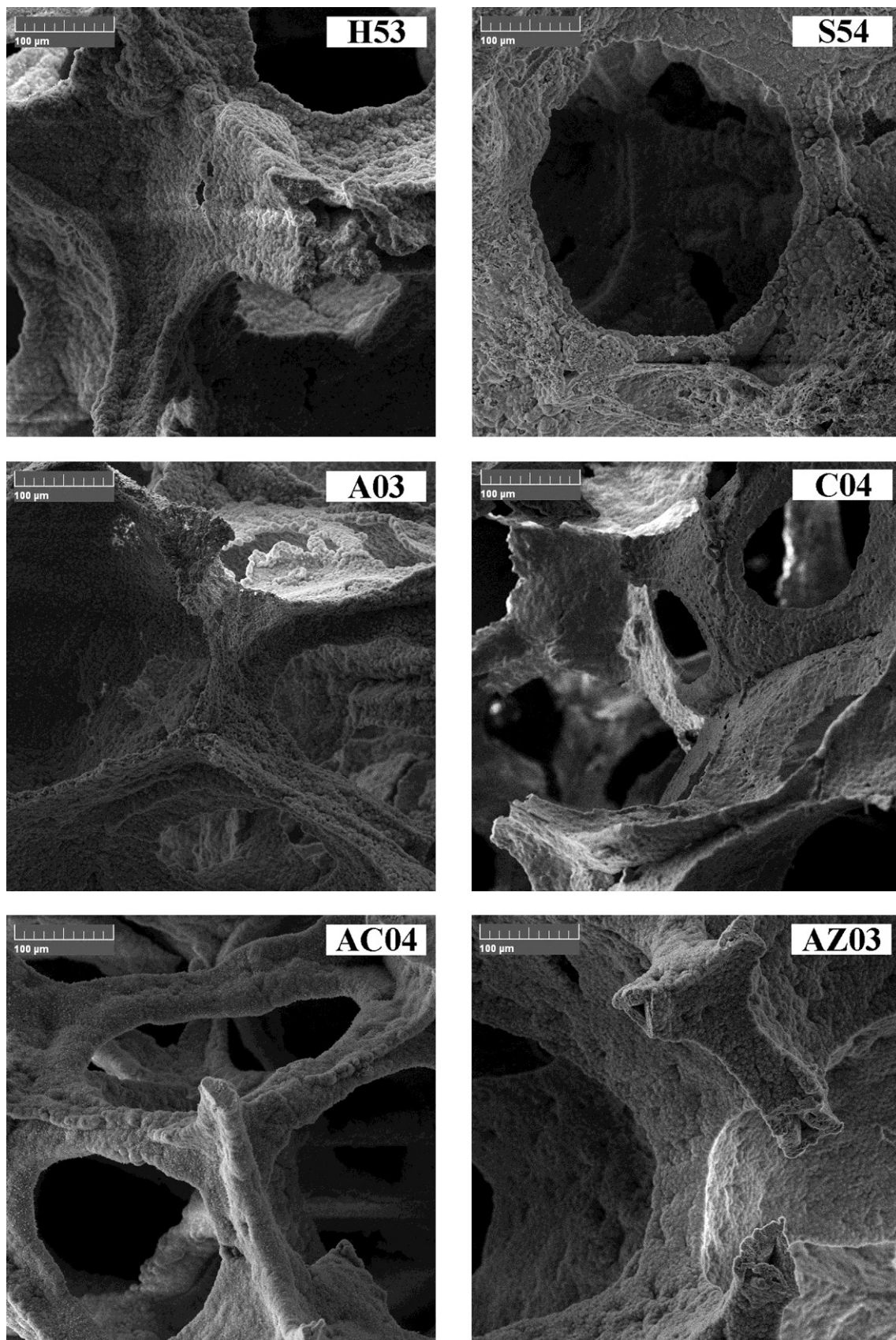
Tabela 22. Mehaničke karakteristike skafolda.

SkafoId	Početni prah	Temperatura kalcinacije praha / sinterovanja skafolda (°C)	Ukupna poroznost (%)*	Maksimalna sila (N)	Pritisna čvrstoća (MPa)	Jungov modul elastičnosti (MPa)
H03	HAp	1100/1300	93,8±1,3	3,88±1,20	0,05±0,01	0,31±0,07
H04	HAp	1100/1400	87,2±1,5	13,12±1,70	0,16±0,06	1,92±0,67
H53	HAp	1150/1300	93,1±0,9	8,13±0,58	0,08±0,02	0,50±0,17
H54	HAp	1150/1400	89,9±2,5	2,44±0,57	0,05±0,03	1,65±1,12
S03	Si-HAp	1100/1300	90,8±1,5	3,57±0,72	0,07±0,02	1,88±0,36
S04	Si-HAp	1100/1400	89,5±2,3	4,37±0,85	0,06±0,02	0,26±0,10
S53	Si-HAp	1150/1300	91,9±0,8	13,05±0,33	0,18±0,04	1,43±0,15
S54	Si-HAp	1150/1400	89,9±1,2	8,45±0,76	0,20±0,04	0,78±0,09
A03	Ag-HAP	1100/1300	91,4±3,7	4,14±0,52	0,06±0,02	1,08±0,11
A04	Ag-HAP	1100/1400	89,2±0,8	10,90±0,78	0,15±0,04	1,24±0,09
A53	Ag-HAP	1150/1300	92,0±0,9	8,68±0,91	0,12±0,04	0,75±0,15
A54	Ag-HAP	1150/1400	92,1±1,6	5,28±0,49	0,07±0,03	0,45±0,12
C03	Cu-HAp	1100/1300	91,9±0,6	9,76±0,67	0,20±0,04	2,84±0,24
C04	Cu-HAp	1100/1400	94,2±1,0	3,97±0,48	0,10±0,03	1,80±0,19
C53	Cu-HAp	1150/1300	93,3±0,7	10,69±0,93	0,11±0,03	0,66±0,16
C54	Cu-HAp	1150/1400	90,1±1,0	8,48±0,73	0,13±0,04	1,06±0,11
AC03	AgCuSi-HAp	1100/1300	92,9±2,1	7,38±0,56	0,08±0,02	0,69±0,09
AC04	AgCuSi-HAp	1100/1400	89,5±1,6	6,58±0,51	0,08±0,01	1,19±0,17
AC53	AgCuSi-HAp	1150/1300	90,8±1,9	10,90±1,70	0,14±0,06	6,45±0,45
AC54	AgCuSi-HAp	1150/1400	88,2±1,0	17,49±0,89	0,23±0,05	7,01±0,37
AZ03	AgZnSi-HAp	1100/1300	91,6±1,4	9,98±0,58	0,12±0,03	1,17±0,21
AZ04	AgZnSi-HAp	1100/1400	85,6±4,6	20,29±2,25	0,28±0,12	5,67±0,44
AZ53	AgZnSi-HAp	1150/1300	91,4±1,4	11,48±0,93	0,12±0,05	1,35±0,22
AZ54	AgZnSi-HAp	1150/1400	90,5±1,1	10,41±0,61	0,15±0,03	1,40±0,23

*± (standardna devijacija + 0,4% greška aproksimacije za gustinu materijala skafolda)

Na slici 59 detaljnije su prikazani zidovi i mostovi koji sačinjavaju strukturu skafolda. Debljina mostova je manja od 100 μ m, a mnogi od njih su šuplji, što je posledica sagorevanja poliuretanskog sundera [286].

Ovaj nedostatak, zbog koga su i mehaničke karakteristike skafolda slabe mogao bi se ispraviti prevlačenjem skafolda suspenzijom sa manjim udelom praha i ponovnim sinterovanjem [286].



Slika 59. Zidovi i mostovi skafolda slikani pri uveličanju od 500 x

Tabela 23. Antimikrobna aktivnost odabranih skafoldnih materijala u odnosu na *E.Coli*.

Temperatura (kalcinacije) sinterovanja °C	HAp	Si-HAp	AgCuSi-HAp		AgZnSi-HAp	
	Broj	Broj	Broj	R (%)	Broj	R (%)
(1100) 1400	$2,00 \cdot 10^6$	$3,00 \cdot 10^6$	$1,07 \cdot 10^6$	96,4	$1,10 \cdot 10^6$	63
(1150) 1300	$1,90 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^6$	$1,70 \cdot 10^6$	10,52	$1,80 \cdot 10^6$	5,3
(1150) 1400	$1,50 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^6$	$1,50 \cdot 10^6$	0	$1,40 \cdot 10^6$	6,6

Antimikrobna aktivnost odabranih serija skafolda u odnosu na *E.coli* i *S.aureus* (tabele 23 i 24) je u opsegu od slabe do umerene. Ovakav rezultat mogao se očekivati s obzirom da se radi o čvrstim materijalima, prevučeni slojem apatita iz SBF-a. Pretpostavka je da bi se postepenom razgradnjom skafolda i oslobađanjem dopiranih jona metala *in situ* na mestu ugradnje ostvarila zadovoljavajuća antimikrobna zaštita. I u ovom slučaju serija 04 se najbolje pokazala. Ipak, uzimajući u obzir slabe mehaničke karakteristike, ovi skafoldi bi mogli poslužiti za stvaranje kompozitnih materijala sa biopolimerima čime bi se pojačala mehanička svojstva a zadržale ostale dobre osobine skafolda.

Tabela 24. Antimikrobna aktivnost odabranih skafoldnih materijala u odnosu na *S.Aureus*.

Temperatura (kalcinacije) sinterovanja °C	HAp	Si-HAp	AgCuSi-HAp		AgZnSi-HAp	
	Broj	Broj	Broj	R (%)	Broj	R (%)
(1100) 1400	$0,50 \cdot 10^6$	$0,15 \cdot 10^6$	$0,20 \cdot 10^6$	60	$0,34 \cdot 10^6$	32
(1150) 1300	$0,20 \cdot 10^6$	$0,60 \cdot 10^6$	$0,33 \cdot 10^6$	0	$0,19 \cdot 10^6$	5
(1150) 1400	$1,70 \cdot 10^6$	$0,60 \cdot 10^6$	$0,45 \cdot 10^6$	73,6	$0,55 \cdot 10^6$	70,6

20. Zaključak

U cilju ispitivanja uticaja jona srebra, bakra i cinka na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata, hidrotermalnim postupkom sintetisane su dve vrste dopiranih prahova HAp-a. Prahovi HAp-1,67 su dopirani jonima: Ag^+ , Cu^{2+} i Zn^{2+} , a prahovi HAp-1,50 su dopirani pojedinačno jonima: Si^{4+} , Ag^+ , Cu^{2+} i sa po tri jona istovremeno: $\text{Ag}^+ + \text{Cu}^{2+} + \text{Si}^{4+}$ i $\text{Ag}^+ + \text{Zn}^{2+} + \text{Si}^{4+}$. Od prahova HAp-1,67 procesirani su kompakti, a od HAp-1,50 skafoldi. Karakterizacijom sintetisanih i kalciniranih prahova HAp-1,67 i HAp-1,50, kao i kompakata i skafolda, došlo se do sledećih zaključaka:

- Hidrotermalnom sintezom dobijeni su dopirani prahovi HAp-1,67 i HAp-1,50 koji su karbonatno supstituisani i sastoje se od sfernih aglomerata veličine od 0,5 do 2,0 μm , koji su izgrađeni od štapićastih čestica prečnika manjeg od 100 nm.
- Kalcinisanjem sintetisanih prahova HAp-1,67 na 1200 °C i HAp-1,50 na 1150 °C tokom 2 h dobijeni su dvofazni HAp/ α -TCP, odnosno trofazni HAp/ β -TCP/ α -TCP dopirani prahovi. Za prahove HAp-1,67 dopiranje sa sva tri jona ima podjednak, neznatno negativan uticaj na transformaciju u α -TCP (28-38% u odnosu na 45% za nedopiran HAp), pri čemu manji udeo dopiranja (0,2 mol%) negativnije utiče na transformaciju. Kod prahova HAp-1,50, joni Si^{4+} favorizuju stvaranje α -TCP faze na račun β -TCP koja ima zanemarljiv udeo, dok je kod nedopiranog praha i dopiranog jonima Ag^+ i Cu^{2+} i udeo β -TCP faze značajan. Kalcinacija u najvećoj meri, ali ne i potpuno, dovodi do dekarbonizacije prahova.
- Sintetisani i kalcinirani dopirani prahovi HAp-1,67 imaju veliki potencijal za primenu u ortopediji i stomatologiji zbog izrazite antimikrobne aktivnosti ka najčešćim uzročnicima infekcija koje se mogu razviti nakon ugradnje koštanih implanata: *S. aureus*, *E. coli*, *P. aeruginosa* i *C. albicans*. Ovim je značajno povećana upotrebna vrednost HAp i HAp/TCP prahova. Antimikrobna aktivnost dopiranih HAp/ α -TCP prahova protiv svih patogenih mikroorganizama bila je uniformnija, a u nekim slučajevima i bolja od dopiranih HAp prahova sa rezultatom redukcije patogenih mikroorganizama koja se kreću u opsegu od 94 do 100%.

- MTT i DET *in vitro* testovi biokompatibilnosti dopiranih prahova HAp/ α -TCP sa MRC-5 humanih fibroblasnim ćelijama u tečnom medijumu su pokazali da dati prahovi nisu citotoksični. Posle 96 h vijabilnost ćelija u kontaktu sa dopiranim prahovima bila je približna ili čak i bolja od vijabilnosti ćelija u kontaktu sa kontrolom. U slučaju dopiranja jonima Ag^+ i Cu^{2+} , bolju bioaktivnost pokazuju uzorci sa manjim udelom jona dopanata (početnih 0,2 mol% u odnosu na 0,4 mol%), dok je u slučaju dopiranja jonima Zn^{2+} obrnuto. Ovim testovima je dokazan uticaj dopiranja sa dve različite koncentracije jona metala na biokompatibilnost prahova.
- Kompakti sinterovani konvencionalno i mikrotalasno na 1200 °C pokazuju sličnu morfologiju sa prosečnom veličinom zrna oko 1 μm . Kod obe tehnike sinterovanja, joni Ag^+ i Zn^{2+} uzrokuju povećanje poroznosti, što značajno pogoršava mehaničke osobine datih kompakata (H oko 1,7 GPa osim MW kompakta sa Ag^+). Kompakti koji sadrže jone Cu^{2+} imaju najmanju poroznost, što uzrokuje najbolje mehaničke osobine. Svi kompakti dobijeni sinterovanjem na 1200 i 1300 °C sadrže HAp/ β -TCP/ α -TCP faze sa različitim udelom. Odnos faza kod kompakata koji sadrže Ag^+ -jone sličan je kao kod kompakata dobijenih od nedopiranog HAp-a. Zn^{2+} -joni utiču na bržu transformacije HAp-a u β -TCP i kasnije u α -TCP, dok kompakti sa Cu^{2+} -jonima sadrže najviše β -TCP faze. Prednost mikrotalasnog u odnosu na konvencionalno sinterovanje potvrđena je poređenjem stepena denzifikacije sinterovanjem na 1200 °C, iako je uzorak dopiran jonima Cu^{2+} , konvencionalno sinterovan, pokazao najbolju kombinaciju vrednosti H i K_{IC} od 3,85 GPa i 1,46 MPam^{1/2}, redom. Mikrotalasnim sinterovanjem na 1300 °C prosečna veličina zrna je porasla na 3-4 μm , a vrednosti H su pretežno malo veće, dok je K_{IC} slabije u odnosu na kompakte mikrotalasnno sinterovane na 1200 °C.
- Citotoksičnost prahova HAp-1,50 kalciniranih na 1150 °C procenjena je na osnovu njihovog delovanja na metaboličku aktivnost, proliferaciju, produkciju reaktivnih kiseoničnih vrsta i nekrozu L929 ćelija. Jedino prahovi Si-HAp i AgCuSi-HAp značajno snižavaju metaboličku, odnosno proliferativnu aktivnost L929 ćelija, redom, što ukazuje na njihov potencijalni citotoksični efekat. Međutim, potvrda citotoksičnog delovanja ovih materijala nije dobijena na nivou

ćelijske nekroze i nije praćena statistiĉki znaćajno većom produkcijom reaktivnih kiseonićnih vrsta.

- Upotrebom tehnike replike poliuretanskog sundera, od prahova HAp-1,50 (HAp, Si-HAp, Ag-HAp, Cu-HAp, AgCuSi-HAp i AgZnSi-HAp) kalciniranih na 1100 i 1150 °C dobijeni su skafoldi sinterovanjem na 1300 i 1400 °C. Skafoldi su drŹani dve sedmice u SBF-u i u tom periodu formirao se novi sloj apatita na zidovima skafolda, Źto je potvrda biokompatibilnosti. Dobijeni su skafoldi velike poroznosti (od 85 do 94 %) sa porama dimenzija od oko 100 do 500 μm . Pore su u većini slućajeva mećusobno povezane i valjkastog oblika, Źto sve zajedno ĉini dobru osnovu za interakciju skafold-koŹtano tkivo, odnosno proliferaciju i rast nove kosti unutar skafolda. Mećutim, s obzirom na nedostatke primenjene tehnike dobijanja skafolda, Źto je rezultiralo u velikoj poroznosti i maloj debljini mostova koji su ĉesto i Źuplji, ne moŹe se utvrditi uticaj dopiranja na mehanićke karakteristike. Navedeni nedostaci uzrokuju slabe mehanićke karakteristike, od 0,05 do 0,28 MPa pritodne ĉvrstoće i od 0,3 do 7,0 MPa Jungovog modula elastićnosti. Antimikrobna aktivnost odabranih serija skafolda u odnosu na *E.coli* i *S.aureus* bila je u opsegu od slabe do umerene. S obzirom da se radi o ĉvrstim materijalima, prevućenim slojem apatita iz SBF-a ovakav rezultat je oćekivan. Pretpostavka je da bi se zadovoljavajuća antimikrobna zaŹtita mogla ostvariti postepenom razgradnjom skafolda i oslobaćanjem dopiranih jona metala *in situ* na mestu ugradnje.

21. Literatura

- [1] Balać I., Bugarski B., Ćosić I., Dramićanin M., Đorđević D., Filipović N., Ignjatović N., Janačković Đ., Kojić M., Manojlović V., Marković Z., Obradović B., Pajić Lijaković I., Pavlović M., Plavšić M., Ranković V., Stojanović B., Trajković V., Uskoković D., Uskoković P., Veljković D., Vlastelica I., Vunjak Novaković G., “Biomaterijali”, Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd, 2010.
- [2] Dorozhkin S.V., “Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art”, *Journal of Functional Biomaterials*, Volume 1, Issue 1, 2010, Pages 22–107.
- [3] Dorozhkin S.V., “Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates”, *Biomatter.*, Volume 1, Issue 1, 2011, Pages 3–56.
- [4] Hench L.L., “Bioceramics: From Concept to Clinic”, *Journal of the American Ceramic Society*, Volume 74, Issue 7, 1991, Pages 1487–1510.
- [5] Dorozhkin S.V., “Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine”, *Materials*, Volume 2, Issue 2, 2009, Pages 399–498.
- [6] Dorozhkin S.V., “Biphasic, triphasic and multiphasic calcium orthophosphates”, *Acta Biomaterialia*, Volume 8, Issue 3, 2012, Pages 963–977.
- [7] Carrodegua R.G., De Aza S., “ α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications”, *Acta Biomaterialia*, Volume 7, Issue 10, 2011, Pages 3536–3546.
- [8] Daculsi G., Laboux O., Malard O., Weiss P., “Current state of the art of biphasic calcium phosphate bioceramics”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 14, Issue 3, 2003, Pages 195–200.
- [9] von Eiff C., Jansen B., Kohner W., Becker K., “Infections associated with medical devices: pathogenesis, management and prophylaxis”, *Drugs*, Volume 65, Issue 2, 2005, Pages 179–214.
- [10] Stoodley P., Ehrlich G.D., Sedghizadeh P.P., Hall-Stoodley L., Baratz M.E., Altman D.T., Sotereanos N.G., Costerton J.W., De Meo P., “Orthopaedic biofilm infections”, *Current Orthopaedic Practice*, Volume 22, Issue 6, 2011, Pages 558–563.
- [11] Harris W., Sledge C.B., “Total hip and total knee replacement (Part II)”, *The New England Journal of Medicine*, Volume 323, Issue 12, 1990, Pages 801–807.
- [12] Nasser S., “Prevention and treatment of sepsis in total hip replacement surgery”, *Orthopedic Clinics of North America*, Volume 23, Issue 2, 1992, Pages 265–277.
- [13] Schmidt G.L., Altman G.T., “Biofilms in orthopaedic surgery”, *Operative Techniques in Orthopaedics*, Volume 12, Issue 4, 2002, Pages 242–246.
- [14] Campoccia D., Montanaro L., Speziale P., Arciola C.R., “Antibiotic-loaded biomaterials and the risks for the spread of antibiotic resistance following their

- prophylactic and therapeutic clinical use”, *Biomaterials*, Volume 31, Issue 25, 2010, Pages 6363–6377.
- [15] Thornes B., Murray P., Bouchier-Hayes D., “Development of resistant strains of *Staphylococcus epidermidis* on gentamicin-loaded bone cement *in vivo*”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, Volume 84, Issue 5, 2002, Pages 758–760.
- [16] Dion A., Langman M., Hall G., Filiaggi M., “Vancomycin release behaviour from amorphous calcium polyphosphate matrices intended for osteomyelitis treatment”, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 35, 2005, Pages 7276–7285.
- [17] Nies D.H., “Microbial heavy-metal resistance”, *Applied Microbiology and Biotechnology*, Volume 51, Issue 6, 1999, Pages 730–750.
- [18] Darouiche R.O., “Anti-infective efficacy of silver-coated medical prostheses”, *Clinical Infectious Diseases*, Volume 29, Issue 6, 1999, Pages 1371–1377.
- [19] Borkow G., Gabbay J., “Copper as a biocidal tool”, *Current Medicinal Chemistry*, Volume 12, Issue 18, 2005, Pages 2163–2175.
- [20] Hill P.A., “Bone remodelling”, *British journal of orthodontics*, Volume 25, Issue 2, 1998, Pages 101–107.
- [21] Sikavitsas V.I., Temenoff J.S., Mikos A.G., “Biomaterials and bone mechanotransduction”, *Biomaterials*, Volume 22, Issue 19, 2001, Pages 2581–2593.
- [22] Standring S., “Gray’s Anatomy: The Anatomical Basis of Clinical Practice”, Elsevier Health Sciences, New York, 2004.
- [23] Steiniche T., Hauge E.M., “Normal Structure and Function of Bone”, in “Handbook of Histology Methods”, Humana Press, Totowa, 2003.
- [24] Taichman R.S., “Blood and bone: Two tissues whose fates are intertwined to create the hematopoietic stem cell niche”, *Blood*, Volume 105, Issue 7, 2005, Pages 2631–2639.
- [25] “Medicinska enciklopedija”, Jugoslovenski leksikografski zavod, Zagreb, 1969.
- [26] Scott A.S., Fong E., “Body Structures and Functions”, Delmar Cengage Learning, New York, 2013.
- [27] Eriksen E.F., Axelrod D.W., Melsen F., “Bone Histomorphometry”, Raven Press, New York, 1994.
- [28] Salgado A.J., Coutinho O.P., Reis R.L., “Bone tissue engineering: state of the art and future trends”, *Macromolecular bioscience*, Volume 4, Issue 8, 2004, Pages 743–765,
- [29] Murugan R., Ramakrishna S., “Development of nano-composites for bone grafting”, *Composites Science and Technology*, Volume 65, Issues 15–16, 2005, Pages 2385–2406.
- [30] Clarke B., “Normal bone anatomy and physiology”, *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, Volume 3, 2008, Pages 131–139.

- [31] Dwek J.R., "The periosteum: what is it, where is it, and what mimics it in its absence?" *Skeletal Radiol*, Volume 39, Issue 4, 2010, Pages 319–323.
- [32] http://www.znanje.org/i/i21/01ii07/z_t/cvrsto__vezivno__tkivo.htm.
- [33] Park J. B., "Biomaterials An Introduction", Plenum Press, New York, 1992.
- [34] Trpinac D., "Histologija", Colibri, Beograd, 1994.
- [35] Fyhrie D.P., Kimura J.H., "Cancellous bone biomechanics", *Journal of Biomechanics*, Volume 32, Issue 11, 1999, Pages 1139-1148.
- [36] Netter F.H., "Musculoskeletal system: anatomy, physiology, and metabolic disorders", Summit, Ciba-Geigy Corporation, New Jersey, 1987.
- [37] Martini F., "Anatomy and physiology", Pearson Education Inc., San Francisco, 2007.
- [38] Martini F., Nath J.L., "Fundamentals of Anatomy and Physiology", Pearson Education Inc., San Francisco, 2009.
- [39] Simon S.R., "Orthopedic Basic Science", American Academy of Orthopaedic Surgeons, Rosemont, 1994.
- [40] Dorozhkin S.V., "Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine", *Materials*, Volume 2, Issue 4, 2009, Pages 1975–2045.
- [41] Su X., Sun K., Cui F.Z., Landis W.J., "Organization of apatite crystals in human woven bone", *Bone*, Volume 32, Issue 2, 2003, Pages 150–162.
- [42] Mann S., "Biom mineralization—Principles and concepts in bioinorganic materials chemistry", Oxford University Press, Oxford, 2001.
- [43] Seeman E., Delmas P.D., "Bone quality-The material and structural basis of bone strength and fragility", *The New England Journal of Medicine*, Volume 354, 2006, Pages 2250–2261.
- [44] <http://bioloji.bio.bg.ac.rs/files/biblioteka/1godina/skripte/obct/05%20Potporna%20tkiva%20Maja.pdf>.
- [45] Bala Y., Farlay D., Delmas P.D., Meunier P.J., Boivin G., "Time sequence of secondary mineralization and microhardness in cortical and cancellous bone from ewes", *Bone*, Volume 46, Issue 4, 2010, Pages 1204–1212.
- [46] Franz-Odenaal T.A., Hall B.K., Witten P.E., "Buried alive: how osteoblasts become osteocytes", *Developmental dynamics: an official publication of the American Association of Anatomists*. Volume 235, Issue 1, 2006, Pages 176–190.
- [47] Franceschi R.T., Li Y., "Vitamin D", In: Feldman D., Pike J.W., Adams J.S., editors, "Vitamin D", John Wiley & Sons, New Jersey, 2011.
- [48] Aarden E.M., Burger E.H., Nijweide P.J., "Function of osteocytes in bone", *Journal of cellular biochemistry*, Volume 55, Issue 3, 1994, Pages 287–299.
- [49] Salgado P.C., Sathler P.C., Castro H.C., Alves G.G., de Oliveira A.M., de Oliveira R.C., Maia M.D.C., Rodrigues C.R., Coelho P.G., Fuly A., Cabral L.M., Granjeiro

- J.M., "Bone Remodeling, Biomaterials and Technological Applications: Revisiting Basic Concepts", *Journal of Biomaterials and Nanobiotechnology*, Volume 2, Issue 3, 2011, Pages 318–328.
- [50] Seeman E., Delmas P.D., "Bone quality – The material and structural basis of bone strength and fragility", *The New England Journal of Medicine*, Volume 354, Issue 21, 2006, Pages 2250–2261.
- [51] Wang M., "Biomaterials and Tissue Engineering", Springer, New York, 2004.
- [52] Barry C.C., Grant N.M., "Ceramic Materials Science and Engineering", Springer, New York, 2007.
- [53] Meyers M.A., Chen Po-Yu, Lin A.Yu-Min, Seki Y., "Biological materials: Structure and mechanical properties", *Progress in Materials Science*, Volume 53, Issue 1, 2008, Pages 1–206.
- [54] Espinosa H.D., Rim J.E., Barthelat F., Buehler M.J., "Merger of Structure and Material in Nacre and Bone - Perspectives on de novo Biomimetic Materials", *Progress in Materials Science*, Volume 54, Issue 8, 2009, Pages 1059–1100.
- [55] Basu B., Katti D.S., Kumar A., "Advanced Biomaterials: Fundamentals, Processing, and Applications", John Wiley & Sons, New Jersey, 2010.
- [56] Blitterswijk C.V., Boer J.D., Thomsen P., Hubbell J., Cancedda R., Bruijn J.D.D., Lindahl A., Sohier J., Williams D., "Tissue Engineering", Academic Press, 2008.
- [57] Dee K.C., Puleo D.A., Bizios R., "An Introduction to Tissue-Biomaterial Interactions", John Wiley & Sons, Inc. New Jersey, 2002.
- [58] Barrack L.R., "Bone Graft Extenders, Substitutes, and Osteogenic Proteins", *The Journal of Arthroplasty*, Volume 20, Issue 2, 2005, Pages 94–97.
- [59] Murugan R., Ramakrishna S., "Bioactive nanomaterials in bone grafting and tissue engineering" In: *Handbook of nanostructured biomaterials and their applications in nanobiotechnology*, Nalwa H.S. (Ed.); American Scientific Publishers: Stevenson Ranch USA, Volume 2, 2005, Pages 141–148.
- [60] Kaveh K., Ibrahim R., Bakar M.Z.A., Ibrahim T.A., "Bone grafting and bone graft substitutes", *Journal of Animal and Veterinary Advances*, Volume 9, Issue 6, 2010, Pages 1055–1067.
- [61] Conway J.D., "Autograft and nonunions: morbidity with intramedullary bone graft versus iliac crest bone graft", *Orthopedic Clinics of North America*, Volume 41, Issue 1, 2010, Pages 75–84.
- [62] Schilling A.F., Linhart W., Filke S., Gebauer M., Schinke T., Rueger J.M., Amling M., "Resorbability of bone substitute biomaterials by human osteoclasts", *Biomaterials*, Volume 25, Issue 18, 2004, Pages 3963–3972.
- [63] Hao H., Amizuka N., Oda K., Fujii N., Ohnishi H., Okada A., Nomura S., Maeda T., "A histological evaluation on self-setting alpha-tricalcium phosphate applied in the rat bone cavity", *Biomaterials*, Volume 25, Issue 3, 2004, Pages 431–442.

- [64] Laurie S.W., Kaban L.B., Mulliken J.B., Murray J.E., “Donor-site morbidity after harvesting rib and iliac bone”, *Plastic and Reconstructive Surgery*, Volume 73, Issue 6, 1984, Pages 933–938.
- [65] Younger E.M., Chapman M.W., “Morbidity at bone graft sites”, *Journal of Orthopaedic Trauma*, Volume 3, Issue 3, 1989, Pages 192–195.
- [66] Fuchs J.R., Nasser B.A., Vacanti J.P., “Tissue engineering: a 21st century solution to surgical reconstruction”, *The Annals of Thoracic Surgery*, Volume 72, Issue 2, 2001, Pages 557–591.
- [67] Keating J.F., McQueen M.M., “Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma”, *Journal of Bone and Joint Surgery*, Volume 82, Issue 1, 2001, Pages 3–8.
- [68] le Guéhennec L., Layrolle P., Daculsi G., “A review of bioceramics and fibrin sealant”, *European Cells and Materials*, Volume 8, 2004, Pages 1–11.
- [69] Neumann M., Epple M., “Composites of calcium phosphate and polymers as bone substitution materials”, *European Journal of Trauma*, Volume 32, Issue 2, 2006, Pages 125–131.
- [70] Paital S.R., Dahotre N.B., “Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies”, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, Volume 66, Issues 1–3, 2009, Pages 1–70.
- [71] Wong J.Y., Bronizo J.D., Peterson D.R., “Biomaterials – Principles and Practice”, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Ration, Florida, USA, 2012.
- [72] Dumitriu S., Popa V.I., “Polymeric Biomaterials”, Volume 1, Taylor & Francis Group, CRC Press, Boca Ration, Florida, USA, 2013.
- [73] Kumbar S., Laurencin C., Deng M., “Natural and Synthetic Biomedical Polymers”, Elsevier Science, 2014.
- [74] <http://www.slideshare.net/shabeelpn/biomaterials-ceramics>.
- [75] Albee F.H., “Studies in bone growth. Triple calcium phosphate as a stimulus to osteogenesis”, *Annals of Surgery*, Volume 71, Issue 1, 1920, Pages 32–39.
- [76] Levitt G.E., Crayton P.H., Monroe E.A., Condrate R.A., “Forming methods for apatite prosthesis”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 3, Issue 4, 1969, Pages 683–684,
- [77] Monroe Z.A., Votawa W., Bass D.B., McMullen J., “New calcium phosphate ceramic material for bone and tooth implants”, *Journal of Dental Research*, Volume 50, Issue 4, 1971, Pages 860–862.
- [78] Nery E.B., Lynch K.L., Hirthe W.M., Mueller K.H., “Bioceramic implants in surgically produced infrabony defects”, *Journal of Periodontology*, Volume 46, Issue 6, 1975, Pages 328–347.

- [79] Jarho M., Kay J.F., Drobeck H.P., Doremus R.H., “Tissue cellular and subcellular events at bone-ceramic hydroxyapatite interface”, *Journal of Bioengineering*, Volume 1, Issue 2, 1976, Pages 79–92.
- [80] Akao H., Kato K., Ogiso M., “Sintered hydroxyapatite as a new dental implant material”, *Journal of Dental Outlook*, Volume 49, 1977, Pages 567–575.
- [81] Peelen J.G.C., Rejda B.V., de Groot K., “Preparation and properties of sintered hydroxyapatite”, *Ceramurgia International*, Volume 4, 1980, Pages 71–73.
- [82] Akao H., Aoki J., Kato K., “Mechanical properties of sintered hydroxyapatite for prothetic application”, *Journal of Materials Science*, Volume 16, Issue 3, 1981, Pages 809–812.
- [83] de Groot K., “Ceramic of calcium phosphates: preparation and properties”, In: *Bioceramics of calcium phosphate*, CRC Press, Boca Ration, Florida, USA, 1983.
- [84] Lide D.R., “The CRC handbook of chemistry and physics”, 86th Ed.; CRC Press, Boca Raton, Florida, USA, 2005.
- [85] Soueidan A., Gan O.I., Bouler J.M., Gouin F., Daculsi G., “Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate and biological calcified substratum by cells of hemopoietic origin”, *Cells and Materials Journal*, Volume 5, 1995, Pages 31–44.
- [86] Benahmed M., Bouler J.M., Heymann D., Gan O., Daculsi G., “Biodegradation of synthetic biphasic calcium phosphate by human monocytes in vitro: a morphological study”, *Biomaterials*, Volume 17, Issue 22, 1996, Pages 2173–2178.
- [87] Kivrak N., Tas A.C., “Synthesis of calcium hydroxyapatite–tricalcium phosphate (HA–TCP) composite bioceramic powders and their sintering behavior”, *Journal of the American Ceramic Society*, Volume 81, Issue 9, 1998, Pages 2245–2252.
- [88] Langstaff S.D., Sayer M., Smith T.J.N., Pugh S.M., Hesp S.A.M., Thompson W.T., “Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates, Part I: Rational design, sample preparation and material characterization”, *Biomaterials*, Volume 20, Issue 18, 1999, Pages 1727–1741.
- [89] Langstaff S.D., Sayer M., Smith T.J.N., Pugh S.M., “Resorbable bioceramics based on stabilized calcium phosphates, Part II: Evaluation of biological response”, *Biomaterials*, Volume 22, Issue 2, 2001, Pages 135–150.
- [90] Yasuda H.Y., Mahara S., Nishiyama T., Umakoshi Y., “Preparation of hydroxyapatite/a-tricalcium phosphate composites by colloidal process”, *Science and Technology of Advanced Materials*, Volume 3, Issue 1, 2002, Pages 29–33.
- [91] LeGeros R.Z., Lin S., Rohanizadeh R., Mijares D., LeGeros J.P., “Biphasic calcium phosphate bioceramics: preparation, properties and applications”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 14, Issue 3, 2003, Pages 201–209.

- [92] Viswanath B., Ravishankar N., “Biphasic composite of tricalcium phosphate reinforced with hydroxyapatite whiskers”, *Materials Research Society Symposium Proceedings*, Volume 898, 2005, Pages 80–85.
- [93] Reid J.W., Pietak A.M., Sayer M., Dunfield D., Smith T.J.N., “Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system”, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 16, 2005, Pages 2887–2897.
- [94] Kannan S., Ferreira J.M.F., “Synthesis and thermal stability HAP and β -TCP composites with co-substituted sodium magnesium and fluorine”, *Chemistry of Materials*, Volume 18, Issue 1, 2006, Pages 198–203.
- [95] Li Y., Kong F., Weng W., “Preparation and characterization of novel biphasic calcium phosphate powders (α -TCP/HA) derived from carbonated amorphous calcium phosphates”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Volume 89B, Issue 2, 2009, Pages 508–517.
- [96] Daculsi G., Baroth S., LeGeros R.Z., “20 years of biphasic calcium phosphate bioceramics development and applications”, In: Narayan R., Colombo P., Singh D., Salem J., editors. “Advance in bioceramics and porous ceramics II”, Wiley-American Ceramic Society New York: p. 45–58, 2010.
- [97] Lobo S.E., Arinzech L.T., “Biphasic calcium phosphate ceramics for bone regeneration and tissue engineering applications”, *Materials*, Volume 3, Issue 2, 2010, Pages 815–826.
- [98] Mastrogiacoma M., Muraglia A., Komlev V., Peryin F., Rustichelli F., Crovace A., Cancedda R., “Tissue engineering of bone: search for a better scaffold”, *Orthodontics and Craniofacial Research*, Volume 8, Issue 4, 2005, Pages 277–284.
- [99] LeGeros, R.Z., “Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine”, Karger: Basel, Switzerland, 1991.
- [100] da Silva R.V., Bertran C.A., Kawachi E.Y., Camilli J.A., “Repair of cranial bone defects with calcium phosphate ceramic implant or autogenous bone graft”, *Journal of Craniofacial Surgery*, Volume 18, Issue 2, 2007, Pages 281–286.
- [101] O’Neill W.C., “The fallacy of the calcium—phosphorus product”, *Kidney International*, Volume 72, Issue 7, 2007, Pages 792–796.
- [102] Sugiyama S., Matsumoto H., Hayashi H., Moffat J.B., “Sorption and ion-exchange properties of barium hydroxyapatite with divalent cations”, *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*, Volume 169, Issues 1–3, 2000, Pages 17–26.
- [103] Elkabouss K., Kacimi M., Ziyad M., Ammar S., Bozon-Verduraz F., “Cobalt-exchanged hydroxyapatite catalysts: Magnetic studies, spectroscopic investigations, performance in 2-butanol and ethane oxidative dehydrogenations”, *Journal of Catalysis*, Volume 226, Issue 1, 2004, Pages 16–24.

- [104] Tahir R., Banert K., Sebti S., “Natural and synthetic phosphates: new and clean heterogeneous catalysis for the synthesis of 5-arylhydantoins”, *Applied Catalysis A: General*, Volume 298, 2006, Pages 261–264.
- [105] Reddy M.P., Venugopal A., Subrahmanyam M., “Hydroxyapatite photocatalytic degradation of calmagite (an azo dye) in aqueous suspension”, *Applied Catalysis B: Environmental*, Volume 69, Issues 3–4, 2007, Pages 164–170.
- [106] Crannell B.S., Eighmy T.T., Krzanowski J.E., Eusden Jr J.D., Shaw E.L., Francis C.A., “Heavy metal stabilization in municipal solid waste combustion bottom ash using soluble phosphate”, *Waste Management*, Volume 20, Issues 2–3, 2000, Pages 135–148.
- [107] Sugiyama S., Ichii T., Fujisawa M., Kawashiro K., Tomida T., Shigemoto N., Hayashi H., “Heavy metal immobilization in aqueous solution using calcium phosphate and calcium hydrogen phosphates”, *Journal of Colloid and Interface Science*, Volume 259, Issue 2, 2003, Pages 408–410.
- [108] Simon F.G., Biermann V., Peplinski B., “Uranium removal from groundwater using hydroxyapatite”, *Applied Geochemistry*, Volume 23, Issue 8, 2008, Pages 2137–2145.
- [109] Corami A., Mignardi S., Ferrini V., “Copper and zinc decontamination from single- and binary-metal solutions using hydroxyapatite”, *Journal of Hazardous Materials*, Volume 146, Issues 1–2, 2007, Pages 164–170.
- [110] Itokazu M., Kumazawa S., Wada E., Wenyi Y., “Sustained release of andriamycin from implanted hydroxyapatite blocks for the treatment of experimental osteogenic sarcomain mice”, *Cancer Letters*, Volume 107, Issue 1, 1996, Pages 11–18.
- [111] Burg K.J.L., Porter S., Kellam J.F., “Biomaterials developments for tissue engineering”, *Biomaterials*, Volume 21, Issue 23, 2000, Pages 2347–2359.
- [112] Alt V., Bechert T., Steinrucke P., Wagener M., Seidel P., Dingeldein E., Domann E., Schnettler R., “*In Vitro* Testing of Antimicrobial Activity of Bone Cement”, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, Volume 48, Issue 11, 2004, Pages 4084–4088.
- [113] Stigter M., Bezemer J., de Groot K., Layrolle P., “Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy”, *Journal of Controlled Release*, Volume 99, Issue 1, 2004, Pages 127–137.
- [114] Chai F., Hornez J.C., Blanchemain N., Neut C., Descamps M., Hildebrand H.F., “Antibacterial activation of hydroxyapatite (HA) with controlled porosity by different antibiotics”, *Biomolecular Engineering*, Volume 24, Issue 5, 2007, Pages 510–514.

- [115] Bai X., More K., Rouleau C.M., Rabiei A., “Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components”, *Acta Biomaterialia*, Volume 6, Issue 6, 2010, Pages 2264–2273.
- [116] Oner M., Yetiz E., Ay E., Uysal U., “Ibuprofen release from porous hydroxyapatite tablets”, *Ceramics International*, Volume 37, Issue 7, 2011, Pages 2117–2125.
- [117] Čolović B., Pašalić S., Jokanović V., “Influence of hydroxyapatite pore geometry on tigeicycline release kinetics”, *Ceramics International*, Volume 38, Issue 8, 2012, Pages 6181–6189.
- [118] Song L., Xiao Y.F., Gan L., Wu Y., Wu F., Gu Z.W., “The effect of antibacterial ingredients and coating microstructure on the antibacterial properties of plasma sprayed hydroxyapatite coatings”, *Surface and Coatings Technology*, Volume 206, Issues 11–12, 2012, Pages 2986–2990.
- [119] Mathew M., Takagi S., “Structures of Biological Minerals in Dental Research”, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology*, Volume 106, 2001, Pages 1035–1044.
- [120] TenHuisen K.S., Brown P.W., “Formation of calcium-deficient hydroxyapatite from α -tricalcium phosphate”, *Biomaterials*, Volume 19, Issue 23, 1998, Pages 2209–2217.
- [121] Durucan C., Brown P.W., “ α -Tricalcium phosphate hydrolysis to hydroxyapatite at and near physiological temperature”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 11, Issue 6, 2000, Pages 365–371.
- [122] Okada M., Matsumoto T., “Synthesis and modification of apatite nanoparticles for use in dental and medical applications”, *Japanese Dental Science Review*, Volume 51, Issue 4, 2015, Pages 85-95.
- [123] Rey C., Combes C., Drouet C., Sfihi H., “Chemical diversity of apatites”, *Advances in Science and Technology*, Volume 49, 2006, Pages. 27–36.
- [124] Orlovskii V.P., Komlev V.S., Barinov S.M., “Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics”, *Inorganic Materials*, Volume 38, Issue 10, 2002, Pages 973–984.
- [125] Zhou H.H., Li H., Guo L.H., “Molecular and Crystal Structure Characterization of Calcium-Deficient Apatite”, *Key Engineering Materials*, Volume 330–332, 2007, Pages 119–122.
- [126] Liu T.Y., Chen S.Y., Liu D.M., Liou S.C., “On the study of BSA-loaded calcium-deficient hydroxyapatite nano-carriers for controlled drug delivery”, *Journal of Controlled Release*, Volume 107, Issue 1, 2005, Pages 112–121.
- [127] Tsuchida T., Yoshioka T., Sakuma S., Takeguchi T., Ueda W., “Synthesis of biogasoline from ethanol over hydroxyapatite catalyst”, *Industrial and Engineering Chemistry Research*, Volume 47, Issue 5, 2008, Pages 1443–1452.

- [128] Elliott J.C., Mackie P.E., Young R.A., “Monoclinic hydroxyapatite”, *Science*, Volume 180, 1973, Pages 1055–1057.
- [129] Elliott J.C., “Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates”, Elsevier: Amsterdam, 1994.
- [130] Rangavittal N., Landa-Cánovas A.R., González-Calbet J.M., Vallet-Regí M., “Structural study and stability of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate: two important bioceramics”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 51, Issue 4, 2000, Pages 660–668.
- [131] Kim J.Y., Fenton R.R., Hunter B.A., Kennedy B.J., “Powder diffraction studies of synthetic calcium and lead apatites”, *Australian Journal of Chemistry*, Volume 53, Issue 8, 2000, Pages 679–686.
- [132] Dorozhkin S.V., “Calcium orthophosphates: Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic application”, *Biomatter*, Volume 1, Issue 2, 2011, Pages 121-164.
- [133] Ellis D.E., Terra J., Warschkow O., Jiang M., González G.B., Okasinski J.S., Bedzyk M.J., Rossi A.M., Eon J.G., “A theoretical and experimental study of lead substitution in calcium hydroxyapatite”, *Physical Chemistry Chemical Physics*, Volume 8, Issue 8, 2006, Pages 967–976.
- [134] Bigi A., Boanini E., Capuccini C., Gazzano M., “Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals”, *Inorganica Chimica Acta*, Volume 360, Issue 3, 2007, Pages 1009–1016.
- [135] Badraoui B., Bigi A., Debbabi M., Gazzano M., Roveri N., Thouvenot R., “Physicochemical properties and structural refinement of strontium-lead hydroxyapatites”, *European Journal of Inorganic Chemistry*, Volume 2002, Issue 7, 2002, Pages 1864–1870.
- [136] Tamm T., Peld M., “Computational study of cation substitutions in apatites”, *Journal of Solid State Chemistry*, Volume 179, Issue 5, 2006, Pages 1581–1587.
- [137] Matsunaga K., Kuwabara A., “First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite”, *Physical Review B*, Volume 75, Issue 1, 2007, Pages 014102–9.
- [138] Torrent-Burgues J., Rodriguez-Clemente R., “Hydroxyapatite precipitation in a semi batch process”, *Crystal Research and Technology*, Volume 36, Issue 8–10, 2001, Pages 1075–1082.
- [139] Tadic D., Peters F., Epple M., “Continuous synthesis of amorphous carbonated apatites”, *Biomaterials*, Volume 23, Issue 12, 2002, Pages 2553–2559.
- [140] Murugan R., Ramakrishna S., “Aqueous mediated synthesis of bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite”, *Journal of Crystal Growth*, Volume 274, Issues 1–2, 2005, Pages 209–213.
- [141] Wei M., Ruys A.J., Milthorpe B.K., Sorrell C.C., “Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: Effects of precipitation method on electrophoretic deposition”,

- Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Volume 16, Issue 4, 2005, Pages 319–324.
- [142] Tagai H., Aoki H., “Mechanical Properties of Biomaterials”, John Wiley and Sons, London, 1980.
- [143] Honda T., Takagi M., Uchida N., Saito K., Uematsu K., “Post-compositional control of hydroxylapatite in an aqueous medium”, Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Volume 1, Issue 2, 1990, Pages 114–117.
- [144] Lazić S., Katanić-Popović J., Zec S., Miljević N., “Properties of hydroxyapatite crystallized from high temperature alkaline solutions”, Journal of Crystal Growth, Volume 165, Issue 1, 1996, Pages 124–128.
- [145] Rodriguez-Lorenzo L.M., Vallet-Regi M., “Controlled crystallization of calcium phosphate apatites”, Chemistry of Materials, Volume 12, Issue 8, 2000, Pages 2460–2465.
- [146] Seckler M.M., Danese M., Derenzo S., Valarelli J.V., Giuliotti M., Rodriguez-Clemente R., “Influence of process conditions on hydroxyapatite crystallinity obtained by direct crystallization”, Materials Research, Volume 2, Issue 2, 1999, Pages 59–62.
- [147] Afshar A., Ghorbani M., Ehsani N., Saeri M.R., Sorrell C.C., “Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite”, Materials and Design, Volume 24, Issue 3, 2003, Pages 197–202.
- [148] Gouveia D.S., Bressiani A.H.A., Bressiani J.C., “Phosphoric acid rate addition effect in the hydroxyapatite synthesis by neutralization method”, Materials Science Forum, Volume 530–531, 2006, Pages 593–598.
- [149] Yoruç A.B.H., Koca Y., “Double step stirring: a novel method for precipitation of nano-sized hydroxyapatite powder”, Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures, Volume 4, Issue 1, 2009, Pages 73–81.
- [150] Janackovic Đ., Petrovic-Prelevic I., Kostic-Gvozdenovic Lj., Petrovic R., Jokanovic V., Uskokovic D., “Influence of synthesis parameters on the particle sizes of nanostructured calcium-hydroxyapatite”, Key Engineering Materials, Volumes 192-195, 2001, Pages 203–206.
- [151] Janackovic Đ., Jankovic I., Petrovic R., Kostic-Gvozdenovic Lj., Milonjic S., Uskokovic D., “Surface properties of HAP particles obtained by hydrothermal decomposition of urea and calcium-EDTA chelates”, Key Engineering Materials, Volumes 240-242, 2003, Pages 437–440.
- [152] Jokić B., Janković-Častvan I., Veljović Dj., Petrović R, Drmanić S., Janačković Dj., “Preparation of α -TCP cements from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method”, Key Engineering Materials, Volumes 309-311, 2006, Pages 821–824.

- [153] Wang Y.J., Lai C., Wei K., Chen X., Ding Y., Wang Z.L., “Investigations on the formation mechanism of hydroxyapatite synthesized by the solvothermal method”, *Nanotechnology*, Volume 17, 2006, Pages 4405–4412.
- [154] Wang Y., Zhang S., Wei K., Zhao N., Chen J., Wang X., “Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template”, *Materials Letters*, Volume 60, Issue 12, 2006, Pages 1484–1487.
- [155] Han J.K., Song H.Y., Saito F., Lee B.T., “Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method”, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 99, Issues 2–3, 2006, Pages 235–239.
- [156] Jokic B.M., Jankovic-Castvan I., Veljovic D., Bucevac D.M., Obradovic-Djuricic K., Petrovic R.D., Janackovic D.T., “Synthesis and settings behavior of alpha-TCP from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method”, *Journal of Optoelectronics and Advanced Materials*, Volume 9, 2007, Pages 1904–1910.
- [157] Radovanović Ž., Veljović Dj., Jokić B., Dimitrijević S., Bogdanović G., Kojić V., Petrović R., Janačković Dj., “Biocompatibility and antimicrobial activity of zinc(II)-doped hydroxyapatite, synthesized by a hydrothermal method”, *Journal of the Serbian Chemical Society*, Volume 77, Issue 12, 2012, Pages: 1787–1798.
- [158] Radovanović Ž., Jokić B., Veljović Dj., Dimitrijević S., Kojić V., Petrović R., Janačković Dj., “Antimicrobial Activity and Biocompatibility of Ag⁺- and Cu²⁺-doped biphasic Hydroxyapatite/ α -Tricalcium Phosphate Obtained from Hydrothermally Synthesized Ag⁺- and Cu²⁺-doped Hydroxyapatite”, *Applied Surface Science*, Volume 307, 2014, Pages 513–519.
- [159] Liou S.C., Chen S.Y., Leeb H.Y., Bow J.S., “Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders”, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 2, 2004, Pages 189–196.
- [160] Byrappa K., Yoshimura I., Yoshimura M., “Hand book of Hydrothermal Technology: Technology for Crystal Growth and Materials Processing”, William Andrew Inc., Norwich, 2001.
- [161] Petrović R., “Sol-Gel postupci sinteze u tehnologiji keramike”, Tehnološko-Metalurški Fakultet, Beograd, 2007.
- [162] Feng W., Mu-sen L., Yu-peng L., Yong-xin Q., “A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders”, *Materials Letters*, Volume 59, Issues 8–9, 2005, Pages 916-919.
- [163] Bogdanoviciene I., Beganskiene A., Toõnsuaadu K., Glaser J., Meyer H.J., Kareiva A., “Calcium hydroxyapatite, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ ceramics prepared by aqueous sol-gel processing”, *Materials Research Bulletin*, Volume 41, Issue 9, 2006, Pages 1754–1762.

- [164] Lim G.K., Wang J., Ng S.C., Chew C.H., Gan L.M., "Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes", *Biomaterials*, Volume 18, Issue 21, 1997, Pages 1433–1439.
- [165] Bose S., Saha S.K., "Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique", *Chemistry of Materials*, Volume 15, Issue 23, 2003, Pages 4464–4469.
- [166] Guo G., Sun Y., Wang Z., Guo H., "Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion", *Ceramics International*, Volume 31, Issue 6, 2005, Pages 869–872.
- [167] Pramanik S., Agarwal A.K., Rai K.N., Garg A., "Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process", *Ceramics International*, Volume 33, Issue 3, 2007, Pages 419–426.
- [168] Ramachandra Rao R., Nroopa H., Kannan T.S., "Solid state synthesis and thermal stability of HAP and HAP - beta-TCP composite ceramic powders", *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, Volume 8, Issue 8, 1997, Pages 511–518.
- [169] Kanno T., Horiuchi J.I., Kobayashi M., Motogami Y., "Characteristics of the carbonate ions incorporated into calcium-, partially-strontium-substituted", *Journal of Materials Science Letters*, Volume 18, Issue 16, 1999, Pages 1343–1345.
- [170] Yeong K.C.B., Wang J., Ng S.C., "Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄", *Biomaterials*, Volume 22, Issue 20, 2001, Pages 2705–2712.
- [171] Silva C.C., Pinheiro A.G., Miranda M.A.R., Góes J.C., Sombra A.S.B., "Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis", *Solid State Sciences*, Volume 5, Issue 4, 2003, Pages 553–558.
- [172] Sayer M., Stratilatov A.D., Reid J.W., Calderin L., Stott M.J., Yin X., MacKenzie M., Smith T.J.N., Hendry J.A., Langstaff S.D., "Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate", *Biomaterials*, Volume 24, Issue 3, 2003, Pages 369–382.
- [173] Reid J.W., Tuck L., Sayer M., Fargo K., Hendry J.A., "Synthesis and characterization of single-phase silicon substituted α -tricalcium phosphate", *Biomaterials*, Volume 27, Issue 15, 2006, Pages 2916–2925.
- [174] Kamitakahara M., Ohtsuki C., Miyazaki T., "Review paper: Behavior of ceramic biomaterials derived from tricalcium phosphate in physiological condition", *Journal of Biomaterials Applications*, Volume 23, Issue 3, 2008, Pages 197–212.
- [175] Bermúdez O., Boltong M.G., Driessens F.C.M., Planell J.A., "Development of some calcium phosphate cements from combinations of α -TCP, MCPM and CaO", *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 5, Issue 3, 1994, Pages 160–163.

- [176] Kurashina K., Kurita H., Hirano M., Kotani A., Klein C.P., de Groot K., “*In vivo* study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate/dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste”, *Biomaterials*, Volume 18, Issue 7, 1997, Pages 539–543.
- [177] Yamamoto H., Niwa S., Hori M., Hattori T., Sawai K., Aoki S., et al., “Mechanical strength of calcium phosphate cement *in vivo* and *in vitro*”, *Biomaterials*, Volume 19, Issue 17, 1998, Pages 1587–1591.
- [178] Fernández E., Gil F.J., Ginebra M.P., Driessens F.C.M., Planell J.A., Best S.M., “Production and characterization of new calcium phosphate bone cements in the CaHPO_4 - α - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ system: pH, workability and setting times”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 10, Issue 4, 1999, Pages 223–230.
- [179] Tagaya M., Goto H., Inuma M., Wakamatsu N., Tamura Y., Doi Y., “Development of self-setting Te-CP/ α -TCP cement for pulpotomy”, *Dental Materials Journal*, Volume 24, Issue 4, 2005, Pages 555–561.
- [180] Oda M., Takeuchi A., Lin X., Matsuya S., Ishikawa K., “Effects of liquid phase on basic properties of α -tricalcium phosphate-based apatite cement”, *Dental Materials Journal*, Volume 27, Issue 5, 2008, Pages 672–677.
- [181] Dorozhkin S.V., “Calcium orthophosphate cements for biomedical application”, *Journal of Materials Science*, Volume 43, 2008, Pages 3028–3057.
- [182] Daculsi G., LeGeros R.Z., Nery E., Lynch K., Kerebel B., “Transformation of biphasic calcium phosphate ceramics *in vivo*: ultrastructural and physicochemical characterization”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 23, Issue 8, 1989, Pages 883–894.
- [183] Orwar O., Lobovkina T., Gozen I., Erkan Y., Olofsson J., Weber S.G., “Protrusive growth and periodic contractile motion in surface-adhered vesicles induced by $\text{Ca}(2+)$ -gradients”, *Soft Matter*, Volume 6, Issue 2, 2010, Pages 268–272.
- [184] Budavari S., O’Neil M.J., Smith A., Heckelman P.E., Kinneary J.F., Eds. “The Merck Index: an encyclopedia of chemicals, drugs and biologicals”, Chapman & Hall, London, 1996.
- [185] Harris L.G., Richards R.G., “Staphylococci and implant surfaces: a review”, *Injury*, Volume 37, Issue 2, 2006, Pages S3–S14.
- [186] Agnoletti F., Mazzolini E., Bacchin C., Bano L., Berto G., Rigoli R., Muffato G., Coato P., Tonon E., Drigo I., “First reporting of methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA) ST398 in an industrial rabbit holding and in farm-related people”, *Veterinary Microbiology*, Volume 170, Issues 1–2, 2014, Pages 172–177.

- [187] Taylor A.R., “Methicillin-Resistant Staphylococcus Aureus Infections, Review Article”, Primary Care: Clinics in Office Practice, Volume 40, Issue 3, 2013, Pages 637–654.
- [188] Ranotkar S., Kumar P., Zutshi S., Prashanth K.S., Bezbaruah B., Anand J., Lahkar M., “Vancomycin-resistant enterococci: Troublemaker of the 21st century”, Journal of Global Antimicrobial Resistance, Volume 2, Issue 4, 2014, Pages 205–212.
- [189] Georgiev V.St., “Treatment and developmental therapeutics of Mycobacterium tuberculosis infections”, International Journal of Antimicrobial Agents, Volume 4, Issue 3, 1994, Pages 157–173.
- [190] Vik H., Andersen K.J., Julshamn K., Todnem K., “Neuropathy caused by silver absorption from arthroplasty cement”, Lancet, Volume 325, Issue 8433, 1985, Pages 872.
- [191] Stern B.R., Bonnie R., “Essentiality and Toxicity in Copper Health Risk Assessment: Overview, Update and Regulatory Considerations”, Journal of Toxicology and Environmental Health, Part A, Volume 73, Issue 2, 2010, Pages 114–127.
- [192] Hambidge K.M., Krebs N.F., “Zinc deficiency: a special challenge”, Journal of Nutrition, 137, Issue 4, 2007, Pages 1101–1105.
- [193] Prasad A.S., “Zinc deficiency”, The British Medical Journal, Volume 326, Issue 7386, 2003, Pages 409–410.
- [194] Petering H.G., “Pharmacology and toxicology of heavy metals: silver”, Pharmacology and Therapeutics Part A, Volume 1, Issue 2, 1976, Pages 127–130.
- [195] Schreurs W.J., Rosenberg H., “Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*”, Journal of Bacteriology, Volume 152, Issue 1, 1982, Pages 7–13.
- [196] Feng Q.L., Wu J., Chen G.Q., Cui F.Z., Kim T.N., Kim J.O., “A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*”, Journal of Biomedical Materials Research, Volume 52, Issue 4, 2000, Pages 662–668.
- [197] Alt V., Bechert T., Steinrucke P., Wagener M., Seidel P., Dingeldein E., Domann E., Schnettler R., “An *in vitro* assessment of the antibacterial properties and cytotoxicity of nanoparticulate silver bone cement”, Biomaterials, Volume 25, Issue 18, 2004, Pages 4383–4391.
- [198] Haraguchi Y., Sakurai H., Hussain S., Anner B.M., Hoshino H., “Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds”, Antiviral Research, Volume 43, Issue 2, 1999, Pages 123–133.

- [199] Zhao G., Stevens S.E., “Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion”, *BioMetals*, Volume 11, Issue 1, 1998, Pages 27–32.
- [200] Hunt M., “Copper and boron as examples of dietary trace elements important in bone development and disease”, *Current Opinion in Orthopaedics*, Volume 9, Issue 5, 1998, Pages 28–36.
- [201] Opsahl W., Zeronian H., Ellison M., Lewis D., Rucker R.B., Riggins R.S., “Role of copper in collagen cross-linking and its influence on selected mechanical properties of chick bone and tendon”, *Journal of Nutrition*, Volume 112, Issue 4, 1982, Pages 708–716.
- [202] Lowe N.M., Fraser W.D., Jackson M.J., “Is there a potential therapeutic value of copper and zinc for osteoporosis?”, *Proceedings Of The Nutrition Society*, Volume 61, Issue 2, 2002, Pages 181–185.
- [203] Hall S.L., Dimai H.P., Farley J.R., “Effects of zinc on human skeletal alkaline phosphatase activity *in vitro*”, *Calcified Tissue International*, Volume 64, Issue 2, 1999, Pages 163–172.
- [204] Yamaguchi M., “Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis”, *Molecular and Cellular Biochemistry*, Volume 338, Issue 1, 2010, Pages 241–254.
- [205] Lakhkar N.J., Lee I.H., Kim H.W., Salih V., Wall I.B., Knowles J.C., “Bone formation controlled by biologically relevant inorganic ions: role and controlled delivery from phosphate-based glasses”, *Advanced Drug Delivery Reviews*, Volume 65, Issue 4, 2013, Pages 405–420.
- [206] Storrie H., Stupp S.I., “Cellular response to zinc-containing organoapatite: An *in vitro* study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization”, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 27, 2005, Pages 5492–5499.
- [207] Feng Q.L., Cui F.Z., “Ag-substituted hydroxyapatite coatings with both antimicrobial effects and biocompatibility”, *Journal of Materials Science Letters*, Volume 18, Issue 7, 1999, Pages 559–561.
- [208] Rameshbabu N., Kumar T.S.S., Prabhakar T.G., Sastry V.S., Murty K.V.G.K., Rao K.P., “Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: synthesis and characterization”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Volume 80A, Issue 3, 2007, Pages 581–591.
- [209] Chen W., Liu Y., Courtney H.S., Bettenga M., Agrawal C.M., Bumgardner J.D., Ong J.L., “In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating”, *Biomaterials*, Volume 27, Issue 32, 2006, Pages 5512–5517
- [210] Chen W., Oh S., Ong A.P., Oh N., Liu Y., Courtney H.S., Appleford M., Ong J.L., “Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite

- coatings produced using a sol gel process”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Volume 82A, Issue 4, 2007, Pages 899–906.
- [211] Ewald A., Hösel D., Patel S., Grover L.M., Barralet J.E., Gbureck U., “Silver-doped calcium phosphate cements with antimicrobial activity”, *Acta Biomaterialia*, Volume 7, Issue 11, 2011, Pages 4064–4070.
- [212] Ciobanu C.S., Iconaru S.L., Chifiriuc M.C., Costescu A., Le Coustumer P., Predoi D., “Synthesis and Antimicrobial Activity of Silver-Doped Hydroxyapatite Nanoparticles”, *BioMed Research International*, Volume 2013, Article ID 916218, 10 pages, 2013. doi:10.1155/2013/916218.
- [213] Ciobanu C.S., Massuyeau F., Constantin L.V., Predoi D., “Structural and physical properties of antibacterial Ag-doped nano-hydroxyapatite synthesized at 100 °C”, *Nanoscale Research Letters*, Volume 6, Issue 1, 2011, Pages 613–620.
- [214] Ciobanu C.S., Iconaru S.L., Pasuk I., Vasile B.S., Lupu A.R., Hermenean A., Dinischiotu A., Predoi D., “Structural properties of silver doped hydroxyapatite and their biocompatibility”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 33, Issue 3, 2013, Pages 1395–1402.
- [215] Ciobanu C.S., Iconaru S.L., Le Coustumer P., Constantin L.V., Predoi D., “Antibacterial activity of silver-doped hydroxyapatite nanoparticles against gram-positive and gram-negative bacteria”, *Nanoscale Research Letters*, Volume 7, Issue 1, 2012, Pages 324–332.
- [216] Costescu A., Ciobanu C.S., Iconaru S.L., Ghita R.V., Chifiriuc C.M., Marutescu L.G., Predoi D., “Fabrication, Characterization, and Antimicrobial Activity, Evaluation of Low Silver Concentrations in Silver-Doped Hydroxyapatite” *Journal of Nanomaterials*, Volume 2013, Article ID 194854, 9 pages, 2013. doi:10.1155/2013/194854
- [217] Chen Y., Zheng X., Xie Y., Ding C., Ruan H., Fan C., “Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 19, Issue 12, 2008, Pages 3603–3609.
- [218] Chen Y., Zheng X., Xie Y., H.Ji, Ding C., Li H., Dai K., “Silver release from silver-containing hydroxyapatite coatings”, *Surface and Coatings Technology*, Volume 205, Issue 7, 2010, Pages 1892–1896.
- [219] Iqbala N., Kadir M.R.A., Malek N.A.N.N., Mahmooda N.H., Muralid M.R., Kamaruld T., “Rapid microwave assisted synthesis and characterization of nanosized silver-doped hydroxyapatite with antibacterial properties”, *Materials Letters*, Volume 89, 2012, Pages 118–122.
- [220] Díaz M., Barba F., Miranda M., Guitián F., Torrecillas R., Moya J.S., “Synthesis and Antimicrobial Activity of a Silver-Hydroxyapatite Nanocomposite”, *Journal*

- of Nanomaterials, Volume 2009, Article ID 498505, 6 pages, 2009. doi:10.1155/2009/498505.
- [221] Trujillo N.A., Oldinski R.A., Ma H., Bryers J.D., Williams J.D., Popat K.C., “Antibacterial effects of silver-doped hydroxyapatite thin films sputter deposited on titanium”, *Materials Science and Engineering C*, Volume 32, Issue 8, 2012, Pages 2135–2144.
- [222] Jelínek M., Weiserová M., Kocourek T., Zezulová M., Strnad J., “Biomedical Properties of Laser Prepared Silver-Doped Hydroxyapatite”, *Laser Physics*, Volume 21, Issue 7, 2011, Pages 1265–1269.
- [223] Li Y., Ho J., Ooi C.P., “Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper(II) and titanium(IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 30, Issue 8, 2010, Pages 1137–1144.
- [224] Ito A., Ojima K., Naito H., Ichinose N., Tateishi T., “Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 50, Issue 2, 2000, Pages 178–183.
- [225] Ito A., Kawamura H., Miyakawa S., Layrolle P., Aomori R., Tsutsumi S., “Resorbability reduction by the incorporation of zinc into tricalcium phosphate”, *Key Engineering Materials*, Volumes 192-195, 2001, Pages 199–202.
- [226] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Bizios R., “Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium II: mechanisms of osteoblast adhesion”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 59, Issue 2, 2002, Pages 312–317.
- [227] Li J., Li Y., Zhang L., Zuo Y., “Composition of calcium deficient Na-containing carbonate hydroxyapatite modified with Cu(II) and Zn(II) ions”, *Applied Surface Science*, Volume 254, Issue 9, 2008, Pages 2844–2850.
- [228] Ergun C., Webster T.J., Bizios R., Doremus R.H., “Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. I. Structure and microstructure”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 59, Issue 2, 2002, Pages 305–311.
- [229] Li M.'Ou, Xiao X., Liu R., Chen C., Huang L., “Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 19, Issue 2, 2008, Pages 797–803.
- [230] Chung R.J., Hsieh M.F., Huang K.C., Perng L.H., Chou F.I., Chin T.S., “Anti-Microbial Hydroxyapatite Particles Synthesized by a Sol–Gel Route”, *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, Volume 33, Issue 2, 2005, Pages 229–239.
- [231] Kim T.N., Feng Q.L., Kim J.O., Wu J., Wang H., Chen G.C., Cui F.Z., “Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite”, *J.*

- Journal of Materials Science: Materials in Medicine, Volume 9, Issue 3, 1998, Pages 129–134.
- [232] Stanić V., Dimitrijević S., Antić-Stanković J., Mitrić M., Jokić B., Plećaš I.B., Raičević S., “Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders”, Applied Surface Science, Volume 256, Issue 20, 2010, Pages 6083–6089.
- [233] Stanić V., Janačković Dj., Dimitrijević S., Tanasković S.B., Mitrić M., Pavlović M.S., Krstić A., Jovanović D., Raičević S., “Synthesis of antimicrobial monophasic silver-doped hydroxyapatite nanopowders for bone tissue engineering”, Applied Surface Science, Volume 257, Issue 9, 2011, Pages 4510–4518.
- [234] Fu Q., Saiz E., Rahaman M.N., Tomsia A.P., “Bioactive glass scaffolds for bone tissue engineering: state of the art and future perspectives”, Materials Science and Engineering: C, Volume 31, Issue 7, 2011, Pages 1245–1256.
- [235] Champion E., “Sintering of calcium phosphate bioceramics”, Acta Biomaterialia, Volume 9, Issue 4, 2013, Pages 5855–5875.
- [236] Fang Y., Agrawal D.K., Roy D.M., Roy R., “Microwave sintering of hydroxyapatite ceramics”, Journal of Materials Research, Volume 9, Issue 1, 1994, Pages 180–187.
- [237] Chanda A., Dasgupta S., Bose S., Bandyopadhyay A., “Microwave sintering of calcium phosphate ceramics”, Materials Science and Engineering: C, Volume 29, Issue 4, 2009, Pages 1144–1149.
- [238] Mirhadi B., “Microwave Sintering of Nano Size Powder β -TCP Bioceramics, Science of Sintering”, Volum 46, Issue 2, 2014, Pages 185–193.
- [239] Thuault A., Savary E., Hornez J.-C., Moreau G., Descamps M., Marinell S., Leriche A., “Improvement of the hydroxyapatite mechanical properties by direct microwave sintering in single mode cavity”, Journal of the European Ceramic Society, Volume 34, Issue 7, 2014, Pages 1865–1871.
- [240] Ramesh S., Tan C.Y., Bhaduri S.B., Teng W.D., “Rapid densification of nanocrystalline hydroxyapatite for biomedical applications”, Ceramics International, Volume 33, Issue 7, 2007, Pages 1363–1367.
- [241] Bose S., Dasgupta S., Tarafder S., Bandyopadhyay A., “Microwave-processed nanocrystalline hydroxyapatite: Simultaneous enhancement of mechanical and biological properties”, Acta Biomaterialia, Volume 6, Issue 9, 2010, Pages 3782–3790.
- [242] Veljović Dj., Palcevskis E., Dindune A., Putić S., Balać I., Petrović R., Janačković Dj., “Microwave sintering improves the mechanical properties of biphasic calcium phosphates from hydroxyapatite microspheres produced from hydrothermal processing”, Journal of Materials Science, Volume 45, Issue 12, 2010, Pages 3175–3183

- [243] Veljović Dj., Zalite I., Palcevskis E., Smiciklas I., Petrović R., Janačković Dj., “Microwave sintering of fine grained HAP and HAP/TCP bioceramics”, *Ceramics International*, Volume 36, Issue 2, 2010, Pages 595–603.
- [244] Dasgupta S., Tarafder S., Bandyopadhyay A., Bose S., “Effect of grain size on mechanical, surface and biological properties of microwave sintered hydroxyapatite”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 33, Issue 5, 2013, Pages 2846–2854.
- [245] Veljovic Dj., Radovanovic Z., Dindune A., Palcevskis E., Krumina A., Petrović R., Janačković Dj., “The influence of Sr and Mn incorporated ions on the properties of microwave single- and two-step sintered biphasic HAp/TCP bioceramics”, *Journal of Materials Science*, Volume 49, Issue 19, 2014, Pages 6793–6802.
- [246] Veljovic Dj., Palcevskis E., Zalite I., Petrovic R., Janackovic Dj., “Two-step microwave sintering – A promising technique for the processing of nanostructured bioceramics”, *Materials Letters*, Volume 93, 2013, Pages 251–253.
- [247] Curran D.J., Fleming T.J., Towler M.R., Hampshire S., “Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods”, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, Volume 4, Issue 8, 2011, Pages 2063–2073.
- [248] Descamps M., Boilet L., Moreau G., Tricoteaux A., Lu J., Leriche A., Lardot V., Cambier F., “Processing and properties of biphasic calcium phosphates bioceramics obtained by pressureless sintering and hot isostatic pressing”, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 33, Issue 7, 2013, Pages 1263–1270.
- [249] Laasri S., Taha M., Laghzizil A., Hlil E.K., Chevalier J., “The affect of densification and dehydroxylation on the mechanical properties of stoichiometric hydroxyapatite bioceramics”, *Materials Research Bulletin*, Volume 45, Issue 10, 2010, Pages 1433–1437.
- [250] Veljović Dj., Jančić-Hajneman R., Balać I., Jokić B., Putić S., Petrović R., Janačković Dj., “The effect of the shape and size of the pores on the mechanical properties of porous HAP-based bioceramics”, *Ceramics International*, Volume 37, Issue 2, 2011, Pages 471–479.
- [251] Mostafa N.Y., “Characterization, thermal stability and sintering of hydroxyapatite powders prepared by different routes”, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 94, Issues 2–3, 2005, Pages 333–341.
- [252] Hoepfner T.P., Case E.D., “The influence of the microstructure on the hardness of sintered hydroxyapatite”, *Ceramics International*, Volume 29, Issue 6, 2003, Pages 699–706.

- [253] He L.H., Standard O.C., Huang T.T.Y., Latella B.A., Swain M.V., “Mechanical behaviour of porous hydroxyapatite”, *Acta Biomaterialia*, Volume 4, Issue 3, 2008, Pages 577–586.
- [254] Tang C.Y., Uskokovic P.S., Tsui C.P., Veljovic Dj., Petrovic R., Janackovic Dj., “Influence of microstructure and phase composition on the nanoindentation characterization of bioceramic materials based on hydroxyapatite”, *Ceramics International*, Volume 35, Issue 6, 2009, Pages 2171–2178.
- [255] Poinern G.E.J., Brundavanam R.K., Le X.T., Fawcett D., “The Mechanical Properties of a Porous Ceramic Derived from a 30 nm Sized Particle Based Powder of Hydroxyapatite for Potential Hard Tissue Engineering Applications”, *American Journal of Biomedical Engineering*, Volume 2, Issue 6, 2012, Pages 278–286.
- [256] Bang L.T., Ramesh S., Purbolaksono J., Ching Y.C., Long B.D., Chandran H., Ramesh S., Othman R., “Effects of silicate and carbonate substitution on the properties of hydroxyapatite prepared by aqueous co-precipitation method”, *Materials and Design*, Volume 87, 2015, Pages 788–796.
- [257] Lukić M., Stojanović Z., Škapin S.D., Maček-Kržmanc M., Mitrić M., Marković S., Uskoković D., “Dense fine-grained biphasic calcium phosphate (BCP) bioceramics designed by two-step sintering”, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 31, Issues 1–2, 2011, Pages 19–27.
- [258] Mazaheri M., Haghightazadeh M., Zahedi A.M., Sadrnezhaad S.K., “Effect of a novel sintering process on mechanical properties of hydroxyapatite ceramics”, *Journal of Alloys and Compounds*, Volume 471, Issues 1–2, 2009, Pages 180–184.
- [259] Thangamani N., Chinnakali K., Gnanam F.D., “The effect of powder processing on densification, microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite”, *Ceramics International*, Volume 28, Issue 4, 2002, Pages 355–362.
- [260] Chen B., Zhang T., Zhang J., Lin Q., Jiang D., “Microstructure and mechanical properties of hydroxyapatite obtained by gel-casting process”, *Ceramics International*, Volume 34, Issue 2, 2008, Pages 359–364.
- [261] Wang J., Shaw L.L., “Nanocrystalline hydroxyapatite with simultaneous enhancements in hardness and toughness”, *Biomaterials*, Volume 30, Issue 34, 2009, Pages 6565–6572
- [262] Ramesh S., Tan C.Y., Tolouei R., Amiriyani M., Purbolaksono J., Sopyan I., Teng W.D., “Sintering behavior of hydroxyapatite prepared from different routes”, *Materials and Design*, Volume 34, 2012, Pages 148–154
- [263] Ramesh S., Aw K.L., Tolouei R., Amiriyani M., Tan C.Y., Hamdi M., Purbolaksono J., Hassan M.A., Teng W.D., “Sintering properties of

- hydroxyapatite powders prepared using different methods”, *Ceramics International*, Volume 39, Issue 1, 2013, Pages 111–119
- [264] Song J., Liu Y., Zhang Y., Jiao L., “Mechanical properties of hydroxyapatite ceramics sintered from powders with different morphologies”, *Materials Science and Engineering: A*, Volume 528, Issues 16–17, 2011, Pages 5421–5427.
- [265] Slosarczyk A., Bialoskorski J., “Hardness and fracture toughness of dense calcium–phosphate–based materials”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 9, Issue 2, 1998, Pages 103–108.
- [266] Gunawan, Sopyan I., Mel M., Suryanto, “Investigations of the effects of initial Zn concentration and sintering conditions on the phase behavior and mechanical properties of Zn-doped bcp”, *Advances in Environmental Biology*, Volume 8, Issue 8, 2014, Pages 680–685.
- [267] Muralithran G., Ramesh S., “The effects of sintering temperature on the properties of hydroxyapatite”, *Ceramics International*, Volume 26, Issue 2, 2000, Pages 221–230.
- [268] Ahmed M.A., Mansour S.F., El-dek S.I., Abd-Elwahab S.M., Ahmed M.K., “Characterization and annealing performance of calcium phosphate nanoparticles synthesized by co-precipitation method”, *Ceramics International*, Volume 40, Issue 8, Part B, 2014, Pages 12807–12820.
- [269] Chu K.T., Ou S.F., Chen S.Y., Chiou S.Y., Chou H.H., Ou K.L., “Research of phase transformation induced biodegradable properties on hydroxyapatite and tricalcium phosphate based bioceramic”, *Ceramics International*, Volume 39, Issue 2, 2013, Pages 1455–1462.
- [270] Ou S.F., Chiou S.Y., Ou K.L., “Phase transformation on hydroxyapatite decomposition”, *Ceramics International*, Volume 39, Issue 4, 2013, Pages 3809–3816.
- [271] Yetmez M., “Sintering Behavior and Mechanical Properties of Biphasic Calcium Phosphate Ceramics”, *Advances in Materials Science and Engineering*, Volume 2014, Article ID 871749, 5 pages, 2014. doi:10.1155/2014/871749.
- [272] Veljović Dj., Jokić B., Petrović R., Palcevskis E., Dindune A., Mihailescu I.N., Janačković Dj., “Processing of dense nanostructured HAP ceramics by sintering and hot pressing”, *Ceramics International*, Volume 35, Issue 4, 2009, Pages 1407–1413.
- [273] Boilet L., Descamps M., Rguiti E., Tricoteaux A., Lu J., Petit F., Lardot V., Cambier F., Leriche A., “Processing and properties of transparent hydroxyapatite and β tricalcium phosphate obtained by HIP process”, *Ceramics International*, Volume 39, Issue 1, 2013, Pages 283–288.
- [274] Šupová M., “Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review”, *Ceramics International*, Volume 41, Issue 8, 2015, Pages 9203–9231.

- [275] Veljović D., Colić M., Kojić V., Bogdanović G., Kojić Z., Banjac A., Palcevskis E., Petrović R., Janačković D., “The effect of grain size on the biocompatibility, cell-materials interface, and mechanical properties of microwave-sintered bioceramics.”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Volume 100, Issue 11, 2012, Pages 3059–3070.
- [276] Webster T.J., Ergun C., Doremus R.H., Siegel R.W., Bizios R., “Enhanced osteoclast-like cell functions on nanophase ceramics”, *Biomaterials*, Volume 22, Issue 11, 2001, Pages 1327–1333.
- [277] Yuan H., Kurashina K., de Bruijn J.D., Li Y., de Groot K., Zhang X., “A preliminary study on osteoinduction of two kinds of calcium phosphate ceramics”, *Biomaterials*, Volume 20, Issue 19, 1999, Pages 1799–806.
- [278] Karageorgiou V., Kaplan D., “Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis”, *Biomaterials*, Volume 26, Issue 27, 2005, Pages 5474–5491.
- [279] Rouwkema J., Rivron N.C., van Blitterswijk C.A., “Vascularization in tissue engineering”, *Trends in biotechnology*, Volume 26, Issue 8, 2008, Pages 434–441.
- [280] Olszta M.J., Chenga X., Jee S.S., Kumara R., Kima Y.Y., M.J. Kaufman, Douglass E.P., Gower L.B., “Bone structure and formation: A new perspective”, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, Volume 58, Issues 3–5, 2007, Pages 77–116.
- [281] Tarafder S., Balla V.K., Davies N.M., Bandyopadhyay A., Bose S., “Microwave-sintered 3D printed tricalcium phosphate scaffolds for bone tissue engineering”, *Journal of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, Volume 7, Issue 8, 2013, Pages 631–641
- [282] Sepulveda P., Bressiani A.H., Bressiani J.C., Meseguer L., König B., “*In vivo* evaluation of hydroxyapatite foams”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 62, Issue 4, 2002, Pages 587–592.
- [283] Chang B.S., Lee C.K., Hong K.S., Youn H.J., Ryu H.S., Chung S.S., Park K.W., “Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations”, *Biomaterials*, Volume 21, Issue 12, 2000, Pages 1291–1298.
- [284] Wu S., Liu X., Yeung K.W.K., Liu C., Yang X., “Biomimetic porous scaffolds for bone tissue engineering”, *Materials Science and Engineering: R: Reports*, Volume 80, 2014, Pages 1–36.
- [285] Bose S., Roy M., Bandyopadhyay A., “Recent advances in bone tissue engineering scaffolds”, *Trends in Biotechnology*, Volume 30, Issue 10, 2012, Pages 546–554.
- [286] Denry I., Kuhn L.T., “Design and characterization of calcium phosphate ceramics scaffolds for bone tissue engineering”, *Dental Materials*, Volume 32, Issue 1, 2016, Pages 43–53.

- [287] Sopyan I., Mel M., Ramesh S., Khalid K.A., “Porous hydroxyapatite for artificial bone applications”, *Science and Technology of Advanced Materials*, Volume 8, Issues 1–2, 2007, Pages 116–123.
- [288] Stergioudi F., Choleridis A., Paulidou E., Smyrnaioi E., Michailidis N., “Novel production and characterization of porous calcium phosphate suitable for bone tissue engineering applications”, *Ceramics International*, Volume 41, Issue 3, Part A, 2015, Pages 3822–3832.
- [289] Fielding G.A., Bandyopadhyay A., Bose S., “Effects of silica and zinc oxide doping on mechanical and biological properties of 3D printed tricalcium phosphate tissue engineering scaffolds”, *Dental Materials*, Volume 28, Issue 2, 2012, Pages 113–122.
- [290] Dapporto M., Sprio S., Fabbi C., Figallo E., Tampieri A., “A novel route for the synthesis of macroporous bioceramics for bone regeneration”, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 36, Issue 9, 2016, Pages 2383–2388.
- [291] Soon Y.M., Shin K.H., Koh Y.H., Lee J.H., Choi W.Y., Kim H.E., “Fabrication and compressive strength of porous hydroxyapatite scaffolds with a functionally graded core/shell structure”, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 31, Issues 1–2, 2011, Pages 13–18.
- [292] Yook S.-W., Kim H.-E., Yoon B.-H., Soon Y.-M., Koh Y.-H., “Improvement of compressive strength of porous hydroxyapatite scaffolds by adding polystyrene to camphene-based slurries”, *Materials Letters*, Volume 63, Issue 11, 2009, Pages 955–958.
- [293] Przekora A., Palka K., Ginalska G., “Biomedical potential of chitosan/HA and chitosan/ β -1,3-glucan/HA biomaterials as scaffolds for bone regeneration – A comparative study”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 58, 2016, Pages 891–899.
- [294] Tsiourvas D., Sapalidis A., Papadopoulos T., “Hydroxyapatite/chitosan-based porous three-dimensional scaffolds with complex geometries”, *Materials Today Communications*, Volume 7, 2016, Pages 59–66.
- [295] Jokic B., Stamenkovic I., Zrilic M., Obradovic-Djuricic K., Petrovic R., Janackovic Dj., “Silicon-doped biphasic α -calcium-phosphate/hydroxyapatite scaffolds obtained by a replica foam method using uniform pre-annealed spherical particles”, *Materials Letters*, Volume 74, 2012, Pages 155–158.
- [296] Tian J., Tian J., “Preparation of porous hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science*, Volume 36, Issue 12, 2001, Pages 3061–3066.
- [297] Dubnika A., Zalite V., “Preparation and characterization of porous Ag doped hydroxyapatite bioceramic scaffolds”, *Ceramics International*, Volume 40, Issue 7, Part A, 2014, Pages 9923–9930.

- [298] Ikeda R., Fujioka H., Nagura I., Kokubu T., Toyokawa N., Inui A., Makino T., Kaneko H., Doita M., Kurosaka M., “The effect of porosity and mechanical property of a synthetic polymer scaffold on repair of osteochondral defects”, *International Orthopaedics*, Volume 33, Issue 3, 2009, Pages 821–828.
- [299] Ramay H.R., Zhang M., “Preparation of porous hydroxyapatite scaffolds by combination of the gel-casting and polymer sponge methods”, *Biomaterials*, Volume 24, Issue 19, 2003, Pages 3293–3302.
- [300] Wu C., Zhou Y., Xu M., Han P., Chen L., Chang J., Xiao Y., “Copper-containing mesoporous bioactive glass scaffolds with multifunctional properties of angiogenesis capacity, osteostimulation and antibacterial activity”, *Biomaterials*, Volume 34, Issue 2, 2013, Pages 422–433.
- [301] Teixeira S., Fernandes H., Leusink A., van Blitterswijk C., Ferraz M.P., Monteiro F.J., de Boer J., “*In vivo* evaluation of highly macroporous ceramic scaffolds for bone tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research Part A*, Volume 93A, Issue 2, 2010, Pages 567–575.
- [302] Woodard J.R., Hildore A.J., Lan S.K., Park C.J., Morgan A.W., Eurell J.A.C., Clark S.G., Wheeler M.B., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J., “The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity”, *Biomaterials*, Volume 28, Issue 1, 2007, Pages 45–54.
- [303] Roohani-Esfahani S.I., Nouri-Khorasani S., Lu Z., Appleyard R., Zreiqat H., “The influence hydroxyapatite nanoparticle shape and size on the properties of biphasic calcium phosphate scaffolds coated with hydroxyapatite–PCL composites”, *Biomaterials*, Volume 31, Issue 21, 2010, Pages 5498–5509.
- [304] Xue W., Bandyopadhyaya A., Bose S., “Polycaprolactone coated porous tricalcium phosphate scaffolds for controlled release of protein for tissue engineering”, *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*, Volume 91B, Issue 2, 2009, Pages 831–838.
- [305] Balla V.K., Bodhak S., Bose S., Bandyopadhyay A., “Porous tantalum structures for bone implants: Fabrication, mechanical and *in vitro* biological properties”, *Acta Biomaterialia*, Volume 6, Issue 8, 2010, Pages 3349–3359.
- [306] Xue W., Krishna B.V., Bandyopadhyay A., Bose S., “Processing and biocompatibility evaluation of laser processed porous titanium”, *Acta Biomaterialia*, Volume 3, Issue 6, 2007, Pages 1007–1018.
- [307] Bose S., Fielding G., Tarafder S., Bandyopadhyay A., “Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics”, *Trends in Biotechnology*, Volume 31, Issue 10, 2013, Pages 594–605.
- [308] Pietak A., Reid J., Stott M., Sayer M., “Silicon substitution in the calcium phosphate bioceramics”, *Biomaterials*, Volume 28, Issue 28, 2007, Pages 4023–4032.

- [309] Khan A., Saleem M., Afzal A., Ali A., Khan A., Khan A., “Bioactive behavior of silicon substituted calcium phosphate based bioceramics for bone regeneration”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 35, 2014, Pages 245–252.
- [310] Landi E., Tampieri A., Celotti G., Sprio S., “Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites”, *Journal of the European Ceramic Society*, Volume 20, Issues 14–15, 2000, Pages 2377–2387.
- [311] Bogdanović G., Raletid-Savić J., Marković N., “*In vitro* assays for antitumor-drug screening on human tumor cell lines: dye exclusion test and colorimetric cytotoxicity assay”, *Onkološki arhiv*, Volume 2, 1994, Pages. 181–184.
- [312] Mosmann T., “Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays”, *Journal of Immunological Methods*, Volume 65, Issue 1, 1983, Pages 55–63.
- [313] Evans A.G., Charles E. A., “Fracture toughness determinations by indentation”, *Journal of the American Ceramic Society*, Volume 59, Issue 7–8, 1976, Pages 371–372.
- [314] Biological evaluation of medical devices–Part 5: Tests for *in vitro* cytotoxicity (ISO 10993-5: 2009).
- [315] Sieuwerts, A.M., Klijn J.G., Peters H.A., Foekens J.A., “The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures *in vitro* for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival”, *European journal of clinical chemistry and clinical biochemistry*, Volume 33, Issue 11, 1995, Pages 813–823.
- [316] Haugland R., “Assays for cell viability, proliferation, and function”, in *The Handbook: “A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies”*, Invitrogen Corp, Carlsbad; 2005, Pages 699–776.
- [317] Eruslanov E., Kusmartsev S., “Identification of ROS using oxidized DCFDA and flow-cytometry”, *Methods in Molecular Biology*, Volume 594, 2010, Pages 57–72.
- [318] Burd J.F., Usategui-Gomez M., “A colorimetric assay for serum lactate dehydrogenase”, *Clinica Chimica Acta*, Volume 46, Issue 3, 1973, Pages 223–227.
- [319] Kokubo T., Kushitani H., Ohtsuki C., Sakka S., Yamamuro T., “Chemical reaction of bioactive glass and glass-ceramics with a simulated body fluid”, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, Volume 3, Issue 2, 1992, Pages 79–83.
- [320] Zadpoor A.A., “Relationship between *in vitro* apatite-forming ability measured using simulated body fluid and *in vivo* bioactivity of biomaterials”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 35, 2014, Pages 134–143.

- [321] Li Y., Ho J., Ooi C.P., “Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper(II) and titanium(IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles”, *Materials Science and Engineering: C*, Volume 30, Issue 8, 2010, Pages 1137–1144.
- [322] Ciobanu C.S., Andronescu E., Stoicu A., Florea O., Le Coustumer P., Galaup S., Djouadi A., Mevellec J.Y., Musa I., Massuyeau F., Prodan A.M., Lafdi K., Trusca R., Pasuk I., Predoi D., “Influence Of Annealing Treatment Of Nano-Hydroxyapatite Bioceramics On The Vibrational Properties”, *Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures*, Volume 6, Issue 2, 2011, Pages 609–624.
- [323] Manjubala I., Sivakumar M., “*In situ* synthesis of biphasic calcium phosphate ceramics using microwave irradiation”, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 71, Issue 3, 2001, Pages 272–278.
- [324] Koutsopoulos S., “Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods”, *Journal of Biomedical Materials Research*, Volume 62, Issue 4, 2002, Pages 600–612.
- [325] Jokić B., Mitrić M., Radmilović V., Drmanić S., Petrović R., Janačković Dj., “Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method”, *Ceramics International*, Volume 37, Issue 1, 2011, Pages 167–173.
- [326] Zyman Z., Rokhmistrov D., Ivanov I., Epple M., “The influence of foreign ions on the crystal lattice of hydroxyapatite upon heating”, *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, Volume 37, Issue 6, 2006, Pages 530–532.
- [327] Nightingale E.R. Jr., “Phenomenological theory of ion solvation. Effective radii of hydrated ions”, *The Journal of Physical Chemistry*, Volume 63, Issue 9, 1959, Pages 1381–1387.
- [328] Knowles J.C., Gibson I.R., Abrahams I., “High temperature phase transition in $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ measured by neutron diffraction”, *Bioceramics*, Volume 1999, 1999, Pages 341–344.
- [329] Kojic Z., Stojanovic D., Popadic S., Jokanovic M., Janackovic Dj., “The irritative property of alpha-tricalcium phosphate to the rabbit skin”, *General Physiology and Biophysics*, Volume 28, 2009, Pages 168–173.
- [330] Tamai M., Nakaoka R., Tsuchiya T., “Cytotoxicity of various calcium phosphate ceramics”, *Key Engineering Materials*, Volume 309–311, 2006, Pages 263–266.
- [331] Rameshbabu N., Rao K.P., “Microwave synthesis, characterization and *in vitro* evaluation of nanostructured biphasic calcium phosphates”, *Current Applied Physics*, Volume 9, Issue 1, Supplement, 2009, Pages S29–S31.
- [332] Champiom E., “Sintering of calcium phosphate bioceramics”, *Acta Biomaterialia*, Volume 9, Issue 4, 2013, Pages 5855–5875.
- [333] Li S., Izui H., Okano M., “Densification, microstructure, and behavior of hydroxyapatite ceramics sintered by using spark plasma sintering”, *Journal of*

- Engineering Materials and Technology, Volume 130, Issue 3, 2008, Pages 031012-1–031012-7.
- [334] Wagoner Johnson A.J., Herschler B.A., “A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair”, *Acta Biomaterialia*, Volume 7, Issue 1, 2011, Pages 16–30.
- [335] Van Landuyt P., Li F., Keustermans J.P., Streydio J.M., Delannay F., Muting E., “The influence of high sintering temperatures on the mechanical properties of hydroxyapatite”, *Journal of Materials Science Materials in Medicine*, Volume 6, Issue 1, 1995, Pages 8–13.
- [336] Kumar G.S., Thamizhavel A., Yokogawa Y., Kalkurad S.N., Girija E.K., “Synthesis, characterization and in vitro studies of zinc and carbonate co-substituted nano-hydroxyapatite for biomedical applications”, *Materials Chemistry and Physics*, Volume 134, Issues 2–3, 2012, Pages 1127–1135.
- [337] Gua Y.W., Khora K.A., Cheang P., “Bone-like apatite layer formation on hydroxyapatite prepared by spark plasma sintering (SPS)”, *Biomaterials*, Volume 25, Issue 18, 2004, Pages 4127–4134.

22. Biografija autora

Željko Radovanović je rođen 25. 02. 1980. godine u Mostaru. Školske 1999/2000. godine je upisao Tehnološko-metalurški fakultet u Beogradu. Diplomirao je na Katedri za neorgansku hemijsku tehnologiju 2005. godine, sa prosečnom ocenom 9,18. Diplomski rad sa temom: "Sinteza i karakterizacija kordijerita nehidrolitičkim sol-gel postupkom" odbranio je sa ocenom 10.

Školske 2005/2006. godine upisao je doktorske studije na Tehnološko – metalurškom fakultetu u Beogradu na smeru Neorganska hemijska tehnologija, pod mentorstvom profesora Đorđa Janačkovića. Na doktorskim studijama je uspešno položio sve ispite predviđene planom i programom sa prosečnom ocenom 10.

Od 2007. do 2009. godine radio je kao istraživač–pripravnik a od 2009. do 2012. godine kao istraživač–saradnik na Tehnološko – metalurškom fakultetu u Beogradu. Od 2012. godine zaposlen je na Inovacionom centru Tehnološko – metalurškom fakultetu.

Učestvovao je na istraživanjima u okviru više projekata (7057B, 2005-2007;401-00-67/2005-01/02;142070, 2006-2010;142070, 2006-2010.)

Sada učestvuje na istraživanju u okviru projekta

- “Sinteza, razvoj tehnologija dobijanja i primena nanostrukturnih multifunkcionalnih materijala definisanih svojstava“, evidencioni broj III 45019, 2011-2015.

Od 2007. godine angažovan je i na ispitivanjima različitih materijala (neorganskih, organskih, metala i njihovih kompozita) skenirajućom elektronskom mikroskopijom i elektronsko disperzivnom spektroskopijom. Ova ispitivanja su vršena i za kolege sa drugih projekata a koji rade na Tehnološko-metalurškom fakultetu kao i za istraživače sa drugih fakulteta i instituta Beogradskog univerziteta. Učestvovao je u izradi više diplomskih, završnih i master radova iz oblasti neorganske hemijske tehnologije.

U okviru projekta FP7-REGPOT-2009-1 boravio je u dva navrata (jun. 2011. i jun. 2012) na obuci u Institutu neorganske hemije Tehničkog univerziteta Riga, Letonija.

23. Izjava o autorstvu

Прилог 1.

Изјава о ауторствуПотписани-а ЖЕЉКО РАДОВАНОВИЋБрој индекса или пријаве докторске дисертације PD 4/05**Изјављујем**

да је докторска дисертација под насловом:

УТИЦАЈ ЈОНА СРЕБРА, БАКРА И ЧИНКА НА СВОЈСТВА БИОКЕРАМИЧКИХ
МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ КАЛЦИЈУМ-ХИДРОКСИАПАТИТА И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да предложена докторска дисертација у целини ни у деловима није била предложена за добијање било које дипломе према студијским програмима других високошколских установа,
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис докторандаУ Београду, 25.04.2016.Жељко Радовановић

24. Izjava o istovetnosti štampane i elektronske verzije doktorske disertacije

Прилог 2.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторске дисертације

Име и презиме аутора ЖЕЉКО РАДОВАНОВИЋ
Број индекса или пријаве докторске дисертације PD 4/05
Студијски програм _____
Наслов докторске дисертације УТИЦАЈ ЈОНА СРЕБРА, БАКРА И ЦИНКА НА СВОЈСТВА БИОКЕРАМИЧКИХ МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ КАЛЦИЈУМ-ХИДРОКСИАПАТИТА И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА
Ментор Др ЂОРЂЕ ЈАНАЋКОВИЋ

Потписани/а ЖЕЉКО РАДОВАНОВИЋ

Изјављујем да је штампана верзија моје докторске дисертације истоветна електронској верзији коју сам предао/ла за објављивање на порталу **Дигиталног репозиторијума Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског звања доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2016.Жељко Радовановић

25. Izjava o korišćenju

Прилог 3.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

УТИЦАЈ ЈОНА СРЕБРА, БАКРА И ЦИНКА НА СВОЈСТВА БИОКЕРАМИЧКИХ
МАТЕРИЈАЛА НА БАЗИ КАЛЦИЈУМ-ХИДРОКСИАПАТИТА И КАЛЦИЈУМ-ФОСФАТА

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство
2. Ауторство - некомерцијално
3. Ауторство – некомерцијално – без прераде
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима
5. Ауторство – без прераде
6. Ауторство – делити под истим условима

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци, кратак опис лиценци дат је на крају).

Потпис докторанда

У Београду, 25.04.2016.

Željko Radovanović