

**UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET**

Mr Vojislav Stanić

**ISPITIVANJE ANTIMIKROBNIH
AKTIVNOSTI MATERIJALA NA BAZI
KALCIJUM HIDROKSIAPATITA**

Doktorska disertacija

Beograd, 2011.

Mentori:

Dr Suzana Dimitrijević

*docent Tehnološko-Metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

Dr Slavica Raičević

*naučni savetnik Instituta za nuklearne nauke
„Vinča“ Univerziteta u Beogradu*

Član komisije:

Dr Đorđe Janačković

*red. prof. Tehnološko-Metalurškog fakulteta
Univerziteta u Beogradu*

U Beogradu _____

Ova doktorska disertacija je rađena u Institutu za nuklearne nauke „Vinča“ Univerziteta u Beogradu.

Ovom prilikom zahvaljujem se dr Suzani Dimitrijević, docentu Tehnološko-Metalurškog fakulteta u Beogradu i dr Slavici Raičević naučnom savetniku Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ u Beogradu, na predloženoj temi kao i na ukazanoj stručnoj pomoći prilikom njene izrade i pisanja.

Veliku zahvalnost dugujem dr Đorđu Janačkoviću, redovnom profesoru Tehnološko-Metalurškog fakulteta u Beogradu na pruženoj stručnoj pomoći prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije.

Zahvaljujem se na ukazanoj stručnoj pomoći prilikom izrade iste: dr Veljku Veljkoviću, dr Iliji Plećašu, dr Zoranu Miodragoviću, dr Slađani Tanasković, mr Bojanu Jokiću, dr Bojani Zmejkovski, dr Draganu Manojloviću, mr Dragoljubu Jovanoviću, dr Danijeli Randelović, mr Mirjani Novaković, mr Maji Popović, dr Mirjani Pavlović, dr Jeleni Antić-Stanković, dr Miodragu Mitriću, dr Čedomiru Jovalekiću i dr Nataši Bibić.

Takođe, koristim priliku da se zahvalim kolegama: dr Ivani Smičiklas, dr Slavku Dimoviću i mr Mariji Šljivić na pruženoj podršci tokom rada na tezi.

Na kraju, želeo bih da se zahvalim mojim roditeljima koji su bili moja najveća podrška.

Vojislav Stanić

Izvod

Antimikrobni materijali na bazi hidroksiapatita su potencijalno atraktivni za širok spektar primena u medicini. Monofazni srebro-, bakar- i cink-dopirani hidroksiapati ($M_xCa_{10-x}(PO_4)_6(OH)_2$, $M = Ag, Cu$ ili Zn , $0,002 \leq x \leq 0,04$) su sintetizovani korišćenjem metode neutralizacije. Ova metoda se sastoji od rastvaranja oksida metala (Ag_2O , CuO ili ZnO) u rastvoru H_3PO_4 , i sporog dodavanja rastvora u suspenziju $Ca(OH)_2$ radi homogene raspodele dopantnog jona.

Kvantitativna elementala analiza je pokazala da su joni srebra, bakra i cinka u potpunosti ugradili u hidroksiapatit. Rendgenostruktorna analiza je pokazala da su svi dopirani uzorci veoma slične strukture sa čistim hidroksiapatitom i u skladu su sa ASTM podacima (kartica 9-432). Svi difrakcinski pikovi su oštri i dobro razdvojeni, što ukazuje da je dobijeni monofazni i dobro iskristalisani hidroksiapatiti. Posmatranja transmisionim elektronskim mikroskopom su pokazala da su morfologije čestice sintetisanih hidroksiapatita veoma slične, nepravilnog oblika i nano veličine. Prosečna dužina čestica u svim uzorcima je oko 70 nm i oko 15-25 nm u prečniku. Antimikrobna aktivnost uzorka su testirani na mikroorganizme koji mogu da izazovu infekcije vezane za implantate: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* i *Candida albicans*. Rezultati antimikrobnih testova su pokazali da svi dopirani uzorci hidroksiapatita imaju antimikrobnu aktivnost. Antimikrobna efikasnost materijala je u funkcija vrste i količine dopantnog jona. Aktivnost je najviše izraženo sa uzorcima hidroksiapatita dopiranih jonima srebra. Antimikrobno dejstvo uzoraka dopiranog sa najvećom količinom srebra na ćelije mikroorganizama je posmatrana pomoću mikroskopa atomskih sila. Studije su pokazale da dopirani uzorak hidroksiapatita stvara značajne morfološke promene na ćelijama mikroorganizama koje mogu biti uzrok njihove smrti. Test hemolize je izveden na srebro- i cink-dopirane uzorke kako bi se ispitala njihova hemokompatibilnost. Stepem hemolize uzoraka je bio manji od 3% i zbog toga, se može zaključiti da su nehemolitički. Tako, pripremljeni metal dopirani hidroksiapati su perspektivni za inženjering koštanog tkiva i mogu se primeniti kao materijali za mikrobiološki tretman zagađene vode, kao aditivi polimera i za opštu upotrebu.

Abstract

Antimicrobial materials based on hydroxyapatite are potentially attractive in a wide variety of medical applications. Monophase silver-, copper- or zinc-doped hydroxyapatite ($M_xCa_{10-x}(PO_4)_6(OH)_2$; $M = Ag, Cu \text{ or } Zn$; $0.002 \leq x \leq 0.04$) were synthesized using a neutralization method. This method consists of dissolving metal oxide ($Ag_2O, CuO \text{ or } ZnO$) in a solution of H_3PO_4 , and the slow addition of a solution to the suspension of $Ca(OH)_2$ was applied for the purpose of homogenous distribution of dopant ions.

The quantitative elemental analysis showed that the silver, copper and zinc ions fully incorporated into the hydroxyapatite. X-ray diffraction analysis showed that all doped samples are very similar in structure to pure hydroxyapatite and in accordance with ASTM data (Card 9-432). All of the diffraction peaks were sharp and well resolved, indicating the obtained monophase and well crystallized hydroxyapatite. Observation of transmission electron microscopy showed that the morphology of the synthesized hydroxyapatite particles are very similar, irregular shaped and nano sized. The average length of particles in all samples is about 70 nm and about 15–25 nm in diameter. Antimicrobial activities of the samples were tested for microorganisms that can cause implant-related infections including: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* and *Candida albicans*. The results of antimicrobial tests demonstrate that all doped hydroxyapatite samples showed antimicrobial activity. Antimicrobial efficacy of these materials is a function of types and quantities of dopant ions. The activity is most pronounced with the silver-doped hydroxyapatite samples. Antimicrobial effects of silver-doped samples with the most silver on microorganism's cells are observed by the atomic force microscope. The studies show that a silver-doped hydroxyapatite sample causes considerable morphological changes of microorganism cells which might be the cause of cells' death. A hemolysis test was performed on silver and zinc-doped samples to determine their hemocompatibility. The hemolysis ratios of the samples are lower than 3% and therefore, it can be concluded that they are nonhemolytic. Thus, prepared metal-doped hydroxyapatite nanopowders promising for bone tissue engineering and can be applied as materials for the treatment of microbiologically polluted water, as a polymer additive and for general use.

SADRŽAJ

1	Uvod	1
2	Opšti deo	3
2.1	Biomaterijali	3
2.1.1	Hidroksiapatit kao biomaterijal	6
2.1.2	Ostale vrste kalcijum ortofosfatnih jedinjenja	10
2.2	Biološki hidroksiapatit	14
2.3	Kristalna struktura hidroksiapatita	18
2.4	Postupci sinteze hidroksiapatita	20
2.4.1	Mokri postupci sinteze	20
2.4.1.1	Precipitacione metode	20
2.4.1.2	Hidroliza kalcijum ortofosfata	23
2.4.1.3	Hidrotermalna metoda	24
2.4.1.4	Sol-Gel metoda	24
2.4.1.5	Mikroemulziona metoda	25
2.4.2	Suvi postupci sinteze	26
2.4.2.1	Sinteze u čvrstoj fazi	26
2.4.2.2	Mehanohemijska metoda	26
2.5	Metal supstitusani hidroksiapatiti	27
2.6	Infekcije izazvane ugradnjom biomaterijala	30
2.7	Antimikrobna svojstva srebra, bakra i cinka	31
3	Eksperimentalni deo	37
3.1	Materijali	37
3.1.1	Hemikalije korišćene za sinteze hidroksiapatita	37
3.1.2	Mikroorganizmi korišćeni za određivanje antimikrobnih svojstava dobijenih materijala	38
3.1.2.1	Morfolološke i kulturalne osobine <i>Staphylococcus aureus</i>	38
3.1.2.2	Morfolološke i kulturalne osobine <i>Escherichia coli</i>	38
3.1.2.3	Morfolološke i kulturalne osobine <i>Candida albicans</i>	39
3.2	Sinteze kalcijum hidroksiapatita	39
3.2.1	Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima srebra	40
3.2.2	Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima bakra	41
3.2.3	Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima cinka	41
3.3	Metode karakterizacije uzoraka	41
3.3.1	Rendgenostrukturalna analiza	41
3.3.2	Infracrvena spektroskopska analiza	42
3.3.3	Skenirajuća elektronska mikroskopija	42
3.3.4	Transmisiona elektronska mikroskopija	43
3.3.5	Elementalna analiza	43
3.3.6	Ispitivanje desorpcije jona metala	44
3.4	Analiza antimikrobnih svojstva hidroksiapatita	44

3.5	AFM analiza	46
3.6	Test biokompatibilnosti	48
4	Rezultati i diskusija	49
4.1	Rendgenostrukturna analiza sintetisanih uzoraka	50
4.2	Infracrvena spektroskopska analiza sintetisanih uzoraka	56
4.3	Elementalna analiza sintetisanih uzoraka	59
4.4	Morfologija čestica sintetisanih uzoraka	61
4.5	Rezultati rastvorljivosti sintetisanih uzoraka	65
4.6	Antimikrobna aktivnost sintetisanih uzoraka	67
4.7	Hemolitička aktivnost sintetisanih uzoraka	80
4.8	Antimikrobni mehanizam dejstva sintetisanih uzoraka	82
5	Zaključak	87
6	Literatura	89

1. Uvod

Biomaterijali su atraktivno polje istraživanja zbog njihove široke primene u medicini, farmaciji, kozmetici i industriji. Sintetski biomaterijali svakodnevno se usavršavaju i nalaze sve širu primenu. Indikacije za upotrebu sintetskih biomaterijala u cilju ozdravljenja koštanog tkiva i popunjavanja koštanih defekata nakon bolesti, traume ili hiruške intervencije, svakodnevno se povećavaju. Među njima posebno mesto zauzimaju biomaterijali na bazi kalcijum hidroksiapatita, zbog svoje sličnosti sa mineralnom komponentom kostiju, biokompatibilnosti, bioaktivnosti i osteokonduktivnosti. Ovi biomaterijali našli su svoju primenu, pre svega, u ortopediji, kranio i maksilofacijalnoj hirurgiji. Hidroksiapatit se poslednjih nekoliko decenija sve više primenjuje u raznim drugim oblastima nauke i tehnologije: kao nosači lekova, za izolovanje i prečišćavanje proteina i nukleinskih kiselina, kao katalizatori hemijskih reakcija i u sorpciji štetnih organskih i neorganskih jedinjenja u cilju njihove imobilizacije. Sa obzirom na specifične primene hidroksiapatita, postavljaju se visoki zahtevi u pogledu njegovog sastava, fizičko-hemijskih i bioloških osobina. Hidroksiapatiti se koriste u rekonstrukciji i reparaciji oštećenog koštanog tkiva u obliku praha, poroznih blokova, kao obloge na metalnim implantima i u obliku kompozita. Hidroksiapatit se integriše u okolno koštano tkivo nakon određenog vremena, stimuliše i ubrzava njegovu regeneraciju. Ugradnja hidroksiapatitnog implanta je ponekada praćena infekcijom, što može dovesti do njegovog odstranjenja. Proces infekcije često započinje adhezijom ćelija mikroorganizama na površinu implanta. Da bi se sprečila inicijalna adhezija mikroorganizama i postoperativne infekcije vrši se oblaganje ili ugradnja antimikrobnih agenasa: antibiotika, antiseptika i jona metala (Ag(I), Cu(II), Zn(II) i drugi). Problemi koji se mogu javiti kod lečenja antibioticima i antisepticima je sve češća pojava rezistencije mikroorganizma, citotoksičnost i relativno brza desorpcija sa površine implanta.

Poznato je da antimikrobna aktivnost mnogih organskih i neorganskih materijala potiče od prisustva raznih jona metala. Naročito veliko interesovanje postoji za materijalima na bazi jona metala: srebra, bakra i cinka. Joni ovih metala pokazuju oligodinamičko dejstvo i širok spektar antimikrobnog dejstva, sa malim štetnim uticajem na humane ćelije. Bakar i cink su bioelementi, u malim količinama su neophodni za odvijanje mnogih biohemijskih procesa, dok su u većim količinama toksični. Danas postoje mnoge metode gde se joni srebra, bakra ili cinka, mogu površinski ugraditi u

čestice hidroksiapatita ili po celoj zapremini u toku direktne sinteze. Glavni problem kod postojećih metoda je prisustvo primesa koje utiču na strukturu, fizičko-hemijske osobine, i na antimikrobnu aktivnost dobijenih materijala. Dobijanje monofaznih čestica sa homogenom raspodelom antimikrobnih jona od posebnog je značaja za hidroksiapatitne materijale za primenom u medicinske svrhe.

Ova doktorska disertacija je osmišljena i realizovana sa ciljem da prikaže kompletan ciklus istraživanja, počevši od sinteze i karakterizacije novih monofaznih materijala na bazi kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima metala: srebra, bakra ili cinka, do ispitivanja antimikrobne aktivnosti i biokompatibilnosti, odnosno njihove primene.

Naučni ciljevi ove disertacije su:

- Da se izvrši optimizacija uslova neutralizacione sinteze kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima metala: Ag(I), Cu(II) ili Zn(II), radi dobijanja proizvoda bez pimesa, homogenog hemijskog sastava sa odgovarajućim fizičko-hemijskim osobinama, kako bi se omogućila primena u medicini i raznim granama industrije;
- Ispitivanje hemijskog sastava, strukturnih i morfoloških karakteristika sintetisanih dopiranih prahova hidroksiapatita metodama elementalne analize, rendgeno strukturne analize, infracrvene spektroskopije, skenirajuće i transmisionne elektronske mikroskopije;
- Ispitivanje antimikrobne aktivnosti dobijenih materijala na različitim sojevima mikroorganizama u *in vitro* uslovima;
- Proučavanje uticaja vrste i količine jona metala: srebra, bakra i cinka, u materijalima na antimikrobnu aktivnost;
- Ispitivanje hemotoksičnosti uzoraka radi ocene njihove biokompatibilnosti.

2. Opšti deo

2.1. Biomaterijali

Biomaterijali se definišu kao supstance (sve osim leka), ili kombinacije supstanci, sintetičkog ili prirodnog porekla, koji se mogu koristiti u bilo kom periodu u celini ili kao delovi sistema koji tretiraju, poboljšavaju, ili zamenjuju bilo koje tkivo, organ, ili funkciju tela [1]. Oblast biomaterijala doživela je veliku ekspanziju razvoja u poslednje tri decenije. Prema mestu ugradnje biomaterijali mogu biti: ortopedski, dentalni, oftamološki, kardiovaskularni, dermatološki i slično. Da bi određeni materijal mogao da se primeni u funkciji biomaterijala, potrebno je da poseduje svojstvo *biokompatibilnosti* sa tkivom i svojstvo *biofunktionalnosti*. *Biokompatibilnost* se odnosi na sposobnost materijala da u kontaktu sa živim tkivima ne izaziva toksične, imunološke ili druge štetne reakcije. *Biofunktionalnost* biomaterijala manifestuje se kroz sposobnost obavljanja predviđene funkcije kroz određeno vreme. Biomaterijal mora da bude *bioadhezivan*, što podrazumeva da okolno tkivo intimno prijanja uz implantni materijal. Nakon prihvatanja materijala od strane organizma, odnosno biokompatibilnosti, sledeće važno svojstvo koju biomaterijal mora da ispolji je *bioaktivnost*. Pod ovim terminom se podrazumeva sposobnost biomaterijala da u kontaktu sa telesnom tečnošću ili tkivom na svojoj površini pospeši specifični biološki odgovor organizma, što dovodi do stvaranja veze sa tkivom. Pored ovih zahteva, za specifične primene biomaterijala, postavljaju se i neki dodatni:

- *biodegradacija* (hiruškog konca, kapsule za aplikaciju lekova),
- *netoksičnost* biomaterijala prilikom njegove razgradnje,
- *antimikrobna aktivnost* biomaterijala je veoma poželjna u sprečavanju infekcija,
- *izdržljivost* biomaterijala ugrađenog u vidu implanta u ljudskom organizmu bi tokom celog radnog veka trebalo da funkcioniše bez ikakvih oštećenja,
- *modul elastičnosti* (E) – elastična kompatibilnost implantata i koštane mase važna je kako bi se izbegle različite elastične deformacije i postupno odvajanje proteze od kostiju. Međutim, moduli elastičnosti implantata su obično viši od modula elastičnosti kosti (oko 17 kNmm^{-2}) [2],
- *permeabilnost* i *difuzibilnost* (membrane veštačkih organa) i slično.

Polimerni biomaterijali imaju široku primenu u biomedicini zahvaljujući svojoj biokompatibilnosti, dizajniranoj fleksibilnosti, mogućnosti površinskih izmena, maloj težini, dobrim mehaničkim osobinama i netoksičnoj degradaciji. Prema osobinama pokazanim u *in vitro* i *in vivo* sistemima oni mogu biti bioneresorbilni i bioresorbilni. Bioneresorbilni polimeri koji se sada najčešće koriste za izradu koštanih implanta su ultrateški visokomolekularni polietilen (UHMWPE) i polimetilmetaakrilati [3, 4].

Neke od trenutno najintenzivnije proučavanih grupa polimera za biomedicinsku primenu su biodegradabilni poliesteri: polilaktidi, poliglikolidi i njihovi kopolimeri, koji se u telu hidrolitički potpuno razgrađuju do CO₂ i H₂O [5]. Biodegradabilni polimeri tokom vremena dovode do resorpcije implanta, a njihovo mesto se popunjava novim koštanim tkivom. Ovako izgrađen implant u početnoj fazi nakon ugradnje, u potpunosti učvršćuje kost, dok ne dođe do ostointegracije.

Keramički biomaterijali (biokeramika) obuhvataju veliku grupu materijala, imaju bioaktivna svojstva, indukujući rast nove kosti, pa se često primenjuju kao prevlake na metalnim implantima. Na [Slici 2.2](#) pokazani su delovi endo proteze napravljene od keramičkih materijala [2]. Keramički materijali su hemijski i biološki inertniji prema svim tečnostima iz organizma u odnosu na druge materijale koji se koriste za proizvodnju implantata. Poseduju visoku tvrdoću, te su otporni na habanje i oštećenja koja mogu nastupiti ukoliko delići koštane mase, koštanog cementa ili pak čestica metala dođu u dodir sa površinama delova izrađenih od keramike. Usled visoke krutosti, keramički materijali nisu podložni nikakvim deformacijama. Ukoliko naprezanje pređe određenu granicu, dolazi do pucanja. Biokeramike se prema načinu vezivanja sa okolnim koštanim tkivom mogu podeliti na četiri tipa [6]:

- Inertni – mehaničko vezivanje (Al₂O₃, ZrO₂),
- Porozni – urastanje tkiva unutar pora (hidroksiapatit),
- Bioaktivni – vezivanje se ostvaruje na graničnoj površini (bioaktivna stakla, HAP),
- Bioresorbilni – zamenjuje novim tkivom (HAP, kalcijum-fosfati, bioaktivna stakla).



Slika 2.2 – Delovi endoproteze od keramičkih materijala [2].

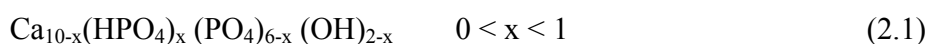
Tokom poslednje decenije, velika pažnja je posvećena proučavanju kompozitnih biomaterijala. Kompoziti se dobijaju kombinovanjem dva ili više materijala, tako da se ostvare osobine koje nema nijedan materijal pojedinačno. Postoji veliki broj različitih tipova kompozita koji predstavljaju različite kombinacije metala, biokeramičkih materijala i biopolimera. Naročito su interesantni kompoziti od hidroksiapatita ili trikalcijum fosfata i biodegradabilnih, biokompatibilnih i bioaktivnih polimera [6-9]. Kompozitni biomaterijali u smeši sa faktorima rasta formiraju novu grupu kompozitnih biomaterijala, koji mogu da ubrzavaju proces rekonstrukcije i oporavka [10, 11].

2.1.1. Hidroksiapatit kao biomaterijal

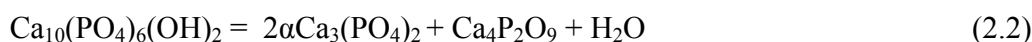
Hidroksiapatitna biokeramika se dugi niz godina koristi kao biomaterijal pogodan za zamenu koštanog tkiva zbog dobre biokompatibilnosti, bioaktivnosti, osteokonduktivnosti i sličnih hemijskih i mehaničkih osobina sa prirodnom kosti. U skladu sa tim, on se intenzivno koristi u stomatologiji, ortopediji, takođe, i za kontrolisan transport lekova u organizmu [12-16]. Hidroksiapatit se javlja u tri hemijske modifikacije:

- stehiometrijski hidroksiapatit (HAP),
- kalcijum deficitarni hidroksiapatit (CDHAP) i
- oksihidroksiapatit.

Stehiometrijski hidroksiapatit (HAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) poseduje odnos Ca/P od 1,67. Hidroksiapatiti sa Ca/P molarnim odnosom nižim od 1,67 se zovu *kalcijum-deficitarni hidroksiapatiti* (CDHAP) i mogu se predstaviti sledećom hemijskom formulom [17]:



Difraktogrami i IR spektri stehiometrijskog i kalcijum deficitarnog apatita su skoro indentični, što znači da nestehiometrijska jedinjenja zadržavaju osnovne karakteristike HAP-a. Kristali CDHAP su nižeg stepena kristaliničnosti i imaju veću specifičnu površinu [18]. CDHA na osnovu stepena kristaliničnosti i Ca/P odnosa, veoma sličanih apatitnoj fazi kostiju. Rastvorljivost CDHAP je veća od hidroksiapatita i ona raste sa smanjenjem Ca/P odnosa, kristaliničnosti i veličine kristalita. Zagrevanjem iznad 700°C , kalcijum-deficitarni hidroksiapatit sa $\text{Ca/P} = 1,5$ se pretvara u β -TCP (trikalcijum fosfat) i sa $1,5 < \text{Ca/P} > 1,67$ se pretvara u smešu HAP i β -TCP [17]. Na višim temperaturama HAP se može raspasti na $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i $\text{Ca}_4\text{P}_2\text{O}_9$ prema hemijskoj reakciji [18]:



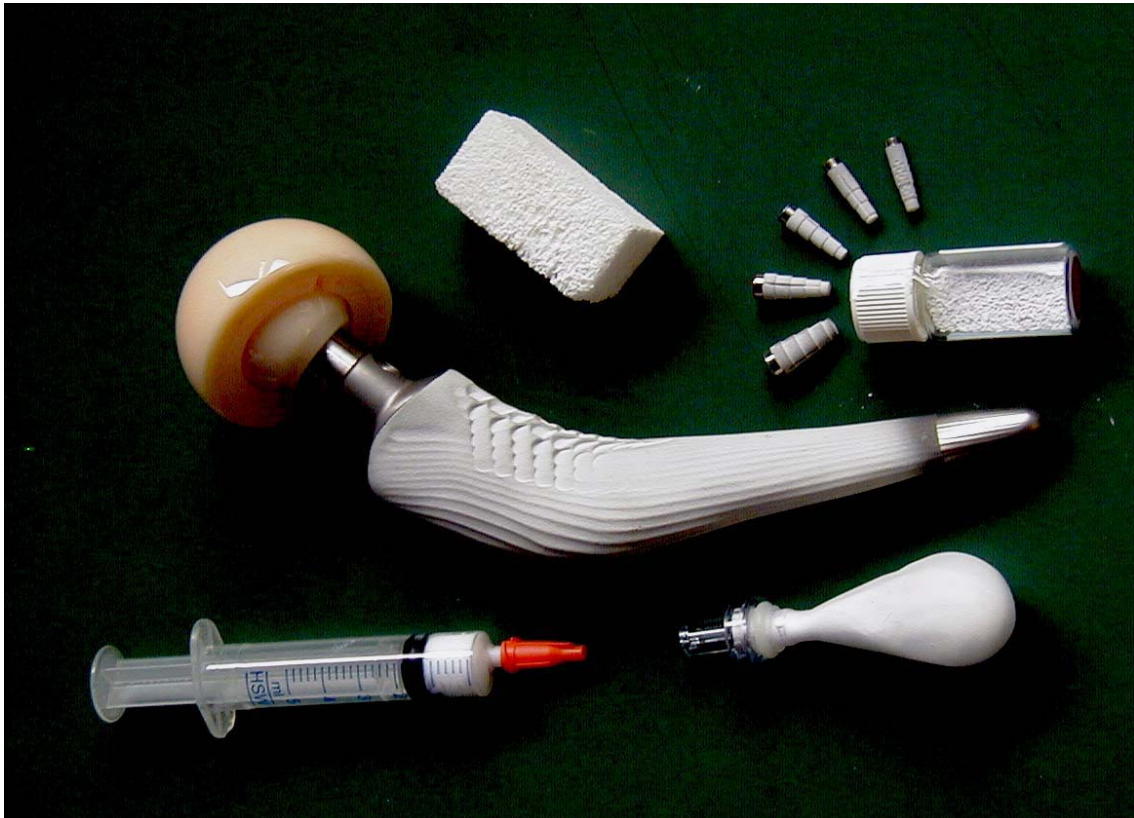
Zhou i sar. [19] su izvestili da se HAP transformiše u oksipatit u temperaturnom intervalu od 1200°C do 1400°C i u trikalcijum fosfat, kalcijum pirofosfat i tetrakalcijum fosfat između 1400°C i 1550°C , prema sledećim hemijskim reakcijama:



Stehiometrijski hidroksiapatit za razliku od CDHAP, nikada nije detektovan u biološkim sistemima [17].

Primena hidroksiapatita u medicini zavisi od njegovih fizičko-hemijskih osobina kao što su: hemijski sastav, veličina i morfologija kristala, kristalno uređenje, termička stabilnost i rastvorljivost. Hidroksiapatit se klinički može primeniti kao punilo (eng.

Filler) u popunjavanju defekata kod oštećenih kostiju, u obliku praha, granula ili poroznih struktura (blokova) sa kontrolisanim dimenzijama i oblikom pora (Slika 2.3), kao obloge na metalnim implantima i kao komponenta kompozitnih biomaterijala.



Slika 2.3 Hidroksiapatit u različitim oblicima: prah, sinterovani blok i nanesen kao obloga na metalnim implantima [17].

Visoko kristalični i stehiometrijski hidroksiapatiti su pokazali slabiju resorpciju tokom aktivnosti osteoklasta pri čemu može ostati na mestu implantacije godinama. Hidroksiapatit interaguje sa okolnim koštanim tkivom i integriše se u njemu posle određenog vremena, stimuliše i ubrzava njegovu regeneraciju. Okuda i sar. [20] su poredili biološki efekat CDHAP i HAP u regeneraciji oštećenog tkiva butne kosti zeca *in vivo* i *in vitro* uslovima. CDHAP se ugradio u koštano tkivo, preko resorpcije, što je dovelo do regeneracije oštećenog tkiva. Sa druge strane, implantirani HAP se nije resorbovao ali je došlo do njegove degradacije usled invazije novoformiranog koštanog tkiva. U literaturi se veoma često pod istom oznakom HAP (HAp ili HA) obuhvaćeni

stehiometrijski i kalcijum deficitarni hidroksiapatit. U daljem tekstu oznaka HAP odnosiće se na obe vrste hidroksiapatita.

Za osteointegraciju hidroksiapatita, pored hemijskog sastava veoma je važna njegova poroznost [21]. Porozni hidroksiapatiti pokazuju jaku tendenciju vezivanja za kosti [22]. Naime, koštano tkivo raste unutar pora, povećavajući jačinu HAP implanta. Dimenzije i morfologija pora su važni faktori za osteointegraciju [23-25]. Smatra se da je minimalna veličina pora oko 100 μm neophodna za srastanje sa okolnim koštanim tkivom obezbeđujući pri tome i prokrvljenost [26, 27]. Takođe, smatra se da je i veličina pora od 50 μm dovoljna za osteokondukciju [28]. Implanti sa većim porama imaju manju mehaničku čvrstoću, pa se uglavnom koriste u reparaciji manjih koštanih oštećenja.

Histološki posmatrano, proces urastanja kosti u porozni sloj (osteointegracija) isti je kao i kod zarastanja polomljene kosti. Porozna keramika služi kao osteokonduktivni nosač u kome proteini i ćelije kosti mogu migrirati, među njima, ćelije progenitori mogu diferencirati u funkcionalne osteoblaste [29].

Sintetički hidroksiapatit se upotrebljava kao obloge na metalnim implantima kako bi se postiglo njihovo bioaktivno učvršćivanje. Metalni implantati ne poseduju mogućnost srastanja sa koštanim tkivom kao i odsustvo prilagođavanja strukture mehaničkim opterećenjima, što može tokom vremena da dovede do oštećenja okolnog tkiva. Oblaganjem metalnih implantata HAP-om omogućava njegovo srastanje sa okolnim koštanim tkivom. Takođe, HAP obloga ima i ulogu sorpcije jona metala (Fe, Ti, Co i drugi) otpuštenih iz metalnog dela implanta smanjujući njihovu količinu u okolnim tkivima. Prevlake se mogu nanostiti raznim postupcima: pulsna laserska depozicija, sol-gel postupci, elektroforetska depozicija i drugi [30].

Krajem 90-tih godina započelo je korišćenje kompozita građenih od HAP sa prirodnim ili sintetskim polimerima. HAP/polimer kompoziti su po mehaničkim osobinama i modulu elastičnosti najpribližniji osobinama prirodnog koštanog tkiva. Ograničavajuće svojstvo HAP-a za široku ortopedsku primenu je njegova krtost. Odnos udela polimera i HAP odlučujuću ulogu u formiranju mehaničkih karakteristika kompozita. Organski polimeri mogu da simuliraju neke karakteristike fibrilarne organske komponente koštanog matriksa [31]. Zanimljiva je primena bioresorbibilnih polimera: poliglikola, polilaktida i polikaprolaktida. Nakon implantacije, polimerna komponenta kojom je ojačan HAP, se bioresorbuje ustupajući na taj način mesto novoformiranom koštanom tkivu [32]. Kompozitni materijali izgrađeni od HAP i biodegradibilnih polimera su se pokazali kao efikasni sistemi za kontrolisanu desorpciju antibiotika [33]. Ovakvi sistemi se zasnivaju na postepenom lokalnom otpuštanju antibiotika, paralelno sa razgradnjom polimera.

2.1.2. Ostale vrste kalcijum ortofosfatnih jedinjenja

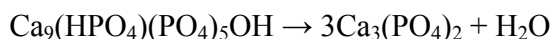
Pored hidroksiapatita, skoro svi ostali ortofosfati su interesantni za medicinske svrhe [12, 34, 35]. Njihova primena i funkcija u medicini zavisi od njihove strukture, sastava i stabilnosti. Klasifikacija kalcijum ortofosfata (CaP) se uobičajeno vrši prema njihovom Ca/P molarnom odnosu, koji varira od 0,5 do 2 (Tablica 2.1). Stabilnost kalcijum ortofosfata zavisi od molskog odnosa kalcijuma prema fosforu, temperaturi kojom se tretiraju i pH vrednosti okolne sredine. Kalcijum ortofosfati su teško rastvorni u vodi izuzev $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2$ i $\text{Ca}(\text{HPO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$. Hidroksiapatit je u odnosu na ostale kalcijum-ortofosfate najmanje rastvorljiv u neutralnim i baznim rastvorima (Slika 2.4) [35].

- Kalcijum-dihidrogenfosfat monohidrat (MCPM; eng. Monocalcium phosphate monohydrate, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$), je najrastvorljiviji od svih kalcijum ortofosfata na svim pH vrednostima. MCPM nije biokompatibilan i ne može se koristiti u reparaciji koštanog tkiva, izuzev u kombinaciji sa baznim CaP jedinjenjima kao što su α -TCP ili β -TCP [36]. Na temperaturi iznad 100°C , oslobađa molekul vode i transformiše se u anhidrovani kalcijum-dihidrogenfosfat [17].
- Kalcijum-dihidrogenfosfat anhidrovani (MPCA; eng. Monocalcium phosphate anhydrous, $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$), kristališe pod istim uslovima kao MCPM ali na temperaturama iznad 100°C . Međutim, nema primenu u medicini [17] jer nije biokompatibilan.
- Kalcijum-hidrogenfosfat dihidrat - brušit (DCPD; eng. Dicalcium phosphate dihydrate, $(\text{CaHPO}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), kristališe iz vodenog rastvora pri $\text{pH} < 6,5$. DCPD na temperaturi od 60 – 100°C oslobađa vodu gradeći DCPA (CaHPO_4) [37]. Takođe, DCPD je metastabilan i može preći u DCPA ($\text{pH} < 6$), OCP ($\text{pH} = 6-7$) ili PHA ($\text{pH} > 7$) [37]. DCPD je biološki važan jer je često prisutan kod patoloških oblika kalcifikacije (dentalne naslage, kristalourija – kristali u urinu, hondrokalcinoze – taloženje kristala kalcijuma u hrskavici i urinarni kamenčići) i u karijesnim lezijama [38-40]. Pretpostavlja se da se javlja kao intermedijer u fazi kristalizacije i prilikom rastvaranja enamelna kiselina [38, 39]. DCPD je biokompatibilan, biorazgradiv i osteokonduktivan, pa se u medicini koristi u ortofosfatnim cementima [41-45]. Takođe, dodaje se zubnim pastama kao polirajuće sredstvo i u sprezi sa NaF i/ili $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$ se koristi kao sredstvo u zaštiti od karijesa [46-52].
- Kalcijum-hidrogenfosfat anhidrovani - monetit (DCPA; eng. Dicalcium phosphate, CaHPO_4), je 0,680 puta manje rastvoran od dikalcijum fosfat dihidrata. DCPA

je najstabilniji kalcijum fosfat na niskim pH vrednostima. Slično DCPD, DCPA se dobija kristalizacijom iz vodenih rastvora, ali na temperaturu iznad 100°C. On je biokompatibilan, biorazgradiv i osteokonduktivan i koristi se kao cement i kao polirajući agens. Za razliku od DCPD, nije nađen u patološkim kalcifikacijama.

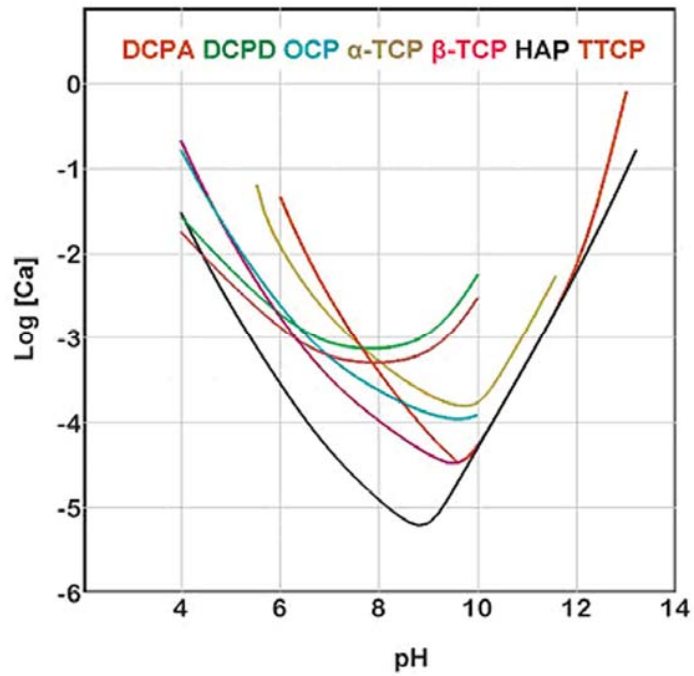
- Oktakalcijum-fosfat (OCP; eng. Octacalcium phosphate, $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$), često je prelazni intermedijer prilikom taloženja termodinamički stabilnijeg hidroksiapatita i biološkog apatita [37, 53]. OCP je biokompatibilan, biorazgradiv i osteokonduktivan. U ortopedskoj hirurgiji, OCP se koristi za reparaciju oštećenih kostiju [54-59]. Kristalna struktura oktakalcijum fosfata se sastoji od dve apatitne paralelne ploče (100), koje su veoma slične hidroksiapatitnim i hidratnog sloja [12].

- Trikalcijum-fosfat (TCP, eng. Tricalcium phosphate, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), ima dva glavna polimorfna oblika α i β . Jedinična ćelija α -TCP je monoklinična, a β -TCP romboedarska. Ova razlika u strukturi uzrokuje da je α -TCP rastvorljiviji od β -TCP. α -TCP dobija se zagrevanjem β -TCP na temperaturi iznad 1125°C. β -TCP se može dobiti kalcinacijom sinterovanjem kalcijum deficitarnog hidroksiapatita na temperaturi iznad 800°C.

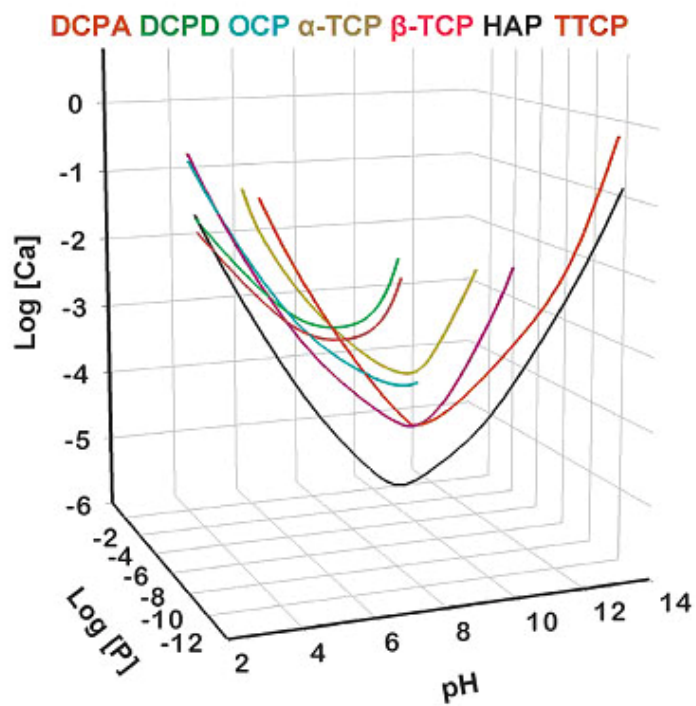


Oba polimorfna oblika TCP-a su biokompatibilna i bioresorbilna i koriste se u obliku raznih cementa u reparaciji kostiju i stomatologiji [12, 60].

- Amorfni kalcijum fosfat (ACP; eng. amorphous calcium phosphate, $\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n = 3 - 4.5$; 15 – 20% H_2O) je amorfna faza sa tipičnim Ca/P molarnim odnosom 1,50 [17]. Taloženje kalcijum ortofosfata iz umerenih ili presićenih rastvora, ili iznad neutralne pH, vodi ka stvaranju amornog kalcijum fosfata kao početne faze [61]. Zatim, dolazi do formiranja stabilnijih kristalnih faza kao što su oktakalcijum fosfat ili hidroksiapatit. Amorfni karakter ACP se obično detektuje povećanjem širine pikova i odsustvom pikova niskog intenziteta u Rendgenskom difraktogramskom spektru [36]. Amorfni kalcijum fosfat igra važnu ulogu kao prelazna faza u procesu biomineralizacije kostiju [62]. Ovaj kalcijumfosfat zbog svoje bioaktivnosti i odličnih biorazgradivih osobina može upotrebiti u razne svrhe: obloge implantata, punilac oštećenih delova kostiju i za pravljenje stomatoloških kompozitnih materijala [37, 63, 64]. ACP se može koristiti kao prekursor za sintezu hidroksiapatita [65].



a)



b)

Slika 2.4 Grafici rastvorljivosti kalcijum fosfata u zavisnosti od pH sredine: u dve dimenzije a); u tri dimenzije b) [35].

Tablica 2.1 Kristalografski podaci za kalcijum fosfate [34].

Jedinjenje	Ca/P	Kristalografska grupa	Parametri jedinične ćelije
MCPM	0,5	Triklinitična $P\bar{1}$	$a = 5,6261(5) \text{ \AA}$, $b = 11,889(2) \text{ \AA}$, $c = 6,4731(8) \text{ \AA}$, $\alpha = 98,633(6)^\circ$, $\beta = 118,262(6)^\circ$, $\gamma = 83,344(6)^\circ$
MCPA	0,5	Triklinitična $P\bar{1}$	$a = 7,5577(5) \text{ \AA}$, $b = 8,2531(6) \text{ \AA}$, $c = 5,5504(3) \text{ \AA}$, $\alpha = 109,87(1)^\circ$, $\beta = 93,68(1)^\circ$, $\gamma = 109,15(1)^\circ$
DCPD	1,0	Monoklinitična Ia	$a = 5,812(2) \text{ \AA}$, $b = 15,180(3) \text{ \AA}$, $c = 6,239(2) \text{ \AA}$, $\beta = 116,42(3)^\circ$
DCPA	1,0	Triklinitična $P\bar{1}$	$a = 6,910(1)$, $b = 6,627(2)$, $c = 6,998(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 96,34(2)^\circ$, $\beta = 103,82(2)^\circ$, $\gamma = 88,33(2)^\circ$
OCP	1,33	Triklinitična $P\bar{1}$	$a = 19,692(4) \text{ \AA}$, $b = 9,523(2) \text{ \AA}$, $c = 6,835(2) \text{ \AA}$, $\alpha = 90,15(2)^\circ$, $\beta = 92,54(2)^\circ$, $\gamma = 108,65(1)^\circ$
α -TCP	1,5	Monoklinitična $P2_1/a$	$a = 12,887 \text{ \AA}$, $b = 27,280(4) \text{ \AA}$, $c = 15,219(2) \text{ \AA}$, $\beta = 126,20(1)^\circ$
β -TCP		Romboedarska $R3Ch$	$a = b = 10,4183(5) \text{ \AA}$, $c = 37,3464(23) \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$
HAP	1,67	Monoklinitična $P21/b$	$a = 9,421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6,881 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$
		Heksogonalna $P6_3/m$	$a = b = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881(2) \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$
FAP	1,67	Heksogonalna $P6_3/m$	$a = b = 9,367 \text{ \AA}$, $c = 6,884 \text{ \AA}$, $\gamma = 120^\circ$
TTCP	2,0	Monoklinitična $P2_1/a$	$a = 7,023(1) \text{ \AA}$, $b = 11,986(4) \text{ \AA}$, $c = 9,473(2) \text{ \AA}$, $\beta = 90,90(1)^\circ$

- Fluoroapatit (FAP, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$) je najstabilniji i najmanje rastvorljiv od svih ortofosfata [34]. Niska rastvorljivost, dobra hemijska stabilnost i toksičnost usled velikog sadržaja fluora glavni su razlozi što se čist FAP retko koristi kao biomaterijal za reparaciju kostiju [66, 67]. Međutim, kompoziti FAP i HAP su predmet naučnih istraživanja za medicinsku primenu [68, 69]. Razna jedinjenja fluora (NaF, $\text{Na}_2\text{PO}_3\text{F}$) se dodaju pastama za zube da bi se smanjila rastvorljivost enamela formiranjem površinskih slojeva FAP [70]. Takođe, fluor smanjuje stvaranje kiselina pomoću bakterija jer smanjuje njihovu sposobnost metabolizama šećera [18].
- Tetrakalcijum fosfat (TTCP ili TetCP; eng. Tetracalcium phosphate), ($\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$), je najbazniji ortofosfat. Njegova rastvorljivost u vodi je veća od HAP (Slika 2.4). TTCP se ne može dobiti iz vodenog rastvora. On se može napraviti jedino reakcijom u čvrstoj fazi iznad 1300°C , npr. zagrevanjem ekvimolarnih količina DCPA i CaCO_3 u suvom vazduhu ili u atmosferi azota [71]. TTCP je nestabilan u vodenim rastvorima i polako hidrolizuje na HAP i $\text{Ca}(\text{OH})_2$ [17]. U medicini se koristi za pravljenje raznih cementa [42, 72-74].

2.2. Biološki hidroksiapatit

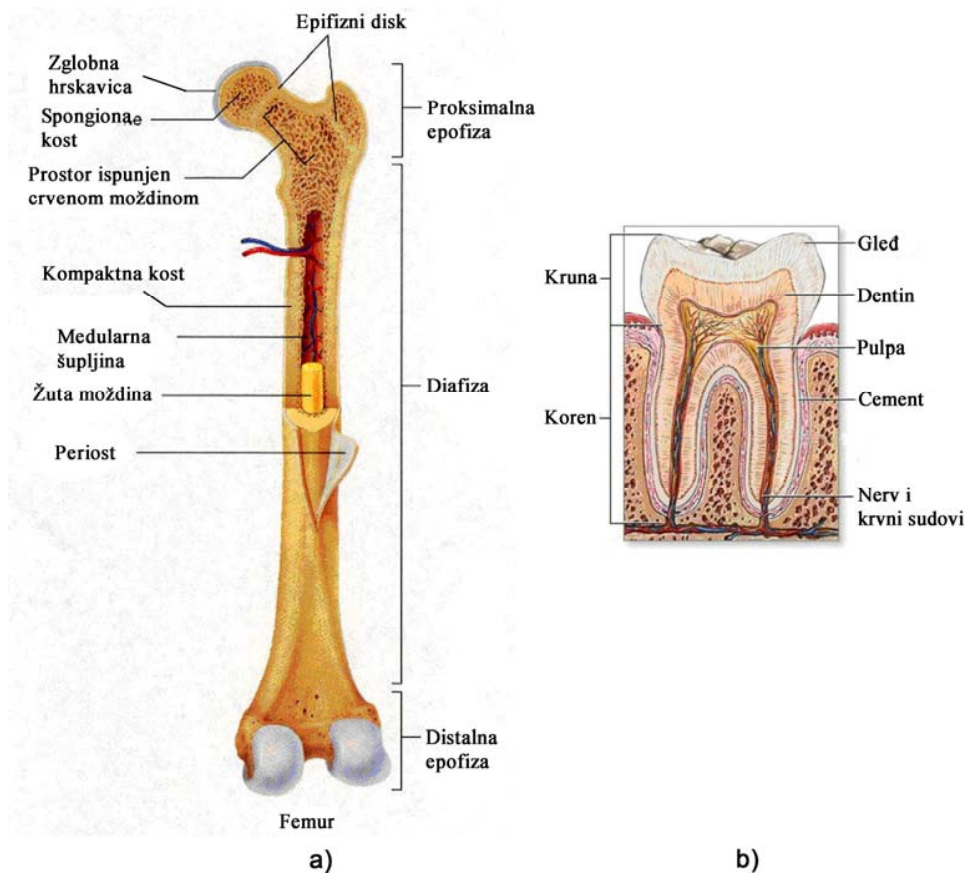
Koštano tkivo (kost) se sastoji od organske i neorganske komponente (Slika 2.5). Neorganska komponenta uglavnom se nalazi u formi kristalnog biološkog apatita i amorfno kalcijum fosfata i ona obezbeđuje mehaničku čvrstoću. Biološki apatit je sličan sintetičkom hidroksiapatitu (HAP), mada postoje razlike u sastavu, stehiometriji, fizičkim i mehaničkim osobinama. Biološki apatiti su obično kalcijum-deficitarni sa prisutnim raznim supstancijama: CO_3^{2-} , HPO_4^{2-} i raznim drugim anjonima i katjonima u HAP (Tablica 2.2). Biološki apatiti su slabo kristalinički skoro amorfni, kristali imaju izgled iglica, tankih pločica ili listića, nanometarskih dimenzija: dužine 30–50 nm, širine 15–30 nm i debljine 2–10 nm [75]. Organske komponente u kostima se nalazi približno 22%, od čega 90-95% čini protein kolagen. U koštanom tkivu se nalaze dve osnovne ćelijske populacije. Jednu čine ćelije koje učestvuju u stvaranju i održavanju koštanog matriksa (osteoblasti i osteociti), dok druge, osteoklasti, omogućavaju resorpciju koštanog matriksa i na taj način remodelaciju koštanog tkiva (Sl. 2.6) [76]. Koštano tkivo je veoma dinamično, jer se neprestano nadogarađuje i uklanja resorpcijom, što je odraz prilagođavanja koštanog tkiva homeostatskim i mehaničkim potrebama organizma. Pored ovih ćelija, u unutrašnjem sloju periosta i endosteumu nalaze se progenitorske ćelije koje mogu da se diferenciraju u osteoblaste.

Slično kostima, neorganski deo zuba je takođe izgrađen od biološkog apatita. Zubi se sastoje iz tri različita mineralizovana sloja: zubne gleđi, dentina i cementa (Sl. 6). Gleđ se sastoji skoro u potpunosti od biološkog apatita (Tab. 2.5), iz tog razloga je najčvršće i najgušće tkivo u organizmu. Kristaliti gleđi su dobro kristalisani, štapićastog oblika dužine nekoliko mikrona, debljine oko 30nm i širine oko 60 nm [17]. Dentin je avaskularno tkivo slično kosti. Kristali HAP-a koji ulaze u sastav dentina su mnogo manji od kristala koji čine gleđ. Biološki apatit dentina je u obliku blokova, slabo kristalisan i nanodimenzija (~25 nm širine, ~4 nm debljine i ~35 nm dužine) [17]. Cement je sličan tkivu kosti, avaskularan i nema osteone i krvne sudove.

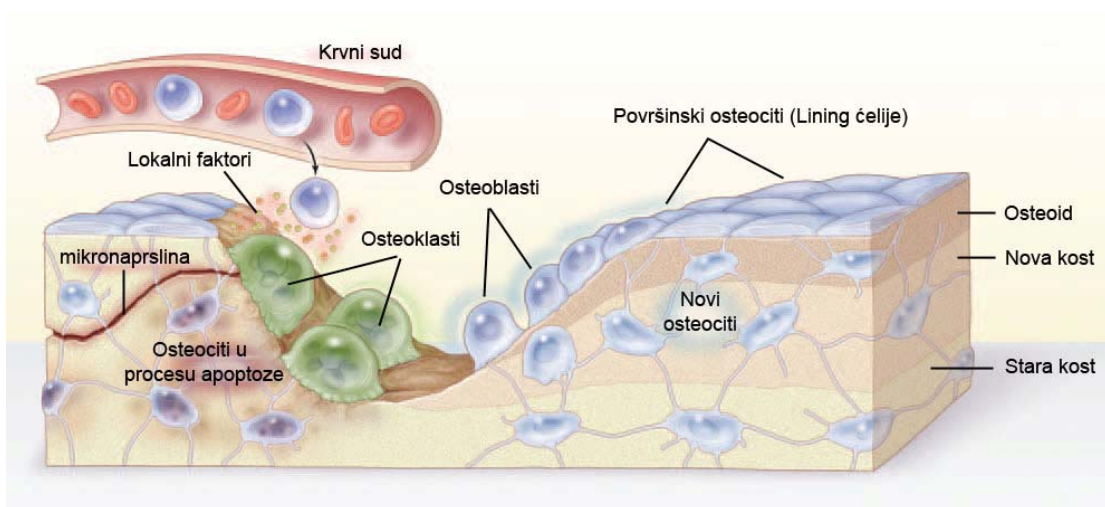
Prirodni koštani graftovi, ili najčešće korišćena, autologa kost, još uvek se često koristi u reparaciji i regeneraciji oštećene kosti, posebno zbog odsustva imunološke reakcije nakon hirurškog tretmana i veoma dobrih bioloških performansi u smislu osteogeneze, osteoinduktivnosti (uz pomoć koštanih morfogenetskih proteina (BMPs) prisutnih u graftu) i osteokonduktivnosti [77-80]. Autologa kost daje brojne prednosti u zadovoljavajućoj koštanoj regeneraciji, ipak njena upotreba je povezana i sa nekoliko važnih nedostataka. Upotreba graftova zahteva dodatnu hirušku proceduru, što može dovesti do oštećenja donorskog mesta, hroničnog postoperativnog bola, hipersenzitivnosti i infekcije. Drugi važan nedostatak autograftova jeste ograničena dostupnost. S druge strane, alogenetski, kost pre implantacije prolazi kroz tehnike proizvodnje, kao što su liofilizacija, radijacija ili sušenje kako bi se smanjio rizik od bilo kakve imunogenetske reakcije. Ta tehnika proizvodnje ima negativni efekat na osteoinduktivni i osteokonduktivni potencijal alograftova, sa posledičnim smanjenjem bioloških performansi u odnosu na autograftove.

Tablica 2.2 Uporedni hemijski sastav, kristalne i mehaničke karakteristike humane gleđi, dentina, kostiju i sintetisanog HAP [4, 5].

Sastav (%)	HAP	Kost	Gleđ	Dentin
Kalcijum	39,6	34,8	36,5	35,1
Fosfor	18,5	15,2	17,7	16,9
Ca/P	1,67	1,71	1,63	1,61
Natrijum	-	0,9	0,5	0,6
Magnezijum	-	0,72	0,44	1,23
Kaljum	-	0,03	0,08	0,05
Karbonati	-	7,4	3,5	5,6
Floridi	-	0,03	0,01	0,06
Hloridi	-	0,13	0,30	0,01
Pirofosfati	-	0,07	0,022	0,10
Neorganska materija	100	65	97	70
Organska materija	-	25	1,5	20
Voda	-	10	< 2	10
Kristaliničnost	100	33-37	70-75	33-37
Proizvodi sinterovanja (800°C)	HAP	HAP + CaO	β-TCP + HAP	β-TCP + HAP
Mehaničke karakteristike				
Modul elastičnosti (10 ⁶ MPa)	0,01	0,020	0,014	
Zatezna čvrstoća (MPa)	100	150	70	



Slika 2.5. Strukture: (a) kosti i (b) zuba [17]

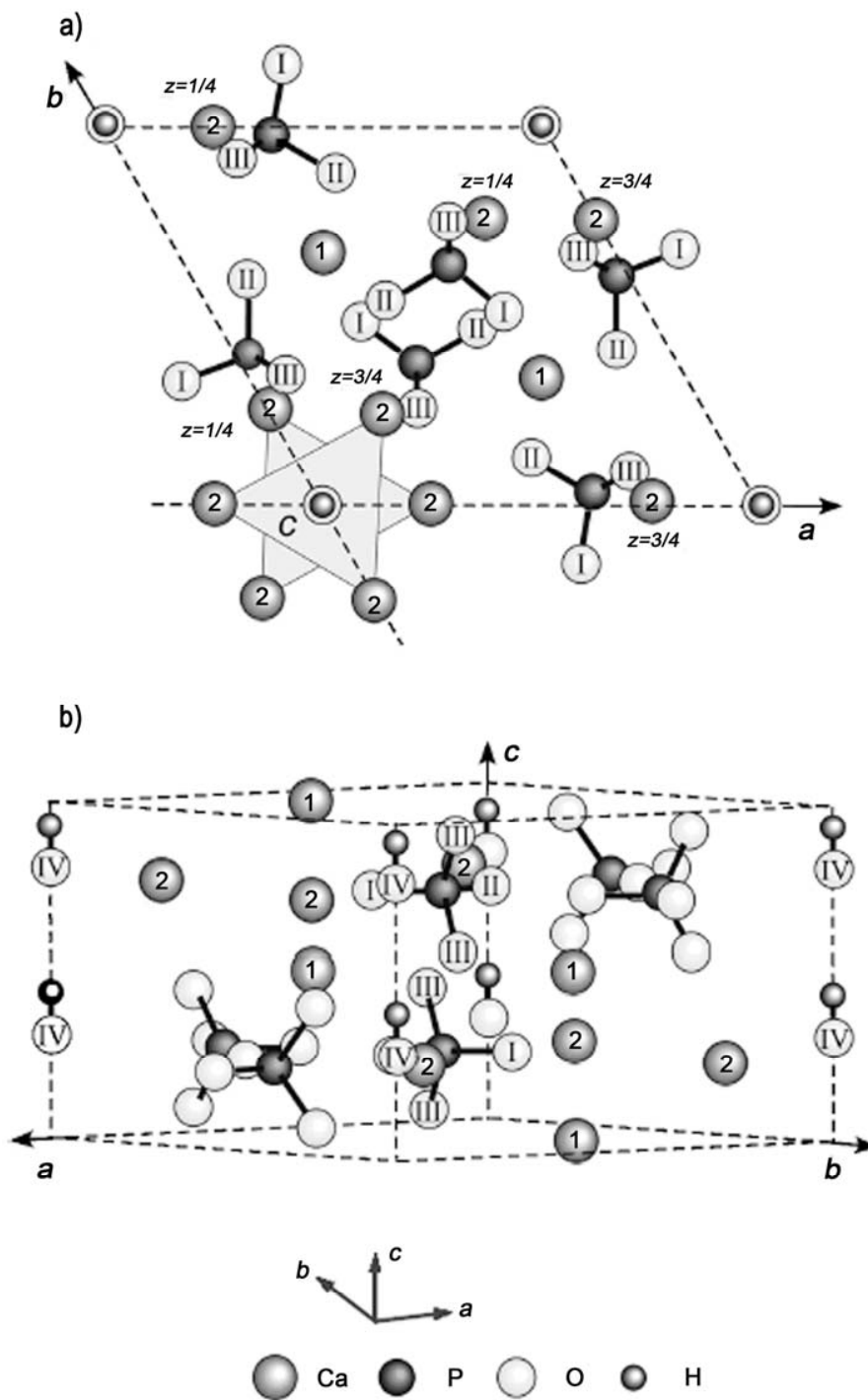


Slika 2.6. Proces remodelovanja koštanog tkiva [76]

2.3. Kristalna struktura hidroksiapatita

Kristalna struktura hidroksiapatita HAP se javlja u dva strukturna oblika, heksagonalni i monoklinični. Heksagonalna struktura se odnosi na nestehiometrijski hidroksiapatit dok se monoklinična struktura povezuje sa stehiometrijskim, odnosno sa hemijski čistim hidroksiapatitom. Na temperaturi iznad 250°C monoklinični HAP prelazi u heksagonalni oblik [17]. Veoma je teško dobiti heksagonalni oblik zbog prisutnih nečistoća, odnosno, raznih jona koji potiču iz polaznih supstanci. Takođe, monoklinična struktura HAP je nešto energetski stabilnija od heksagonalne [17]. Heksagonalni oblik HAP se gradi precipitacijom iz presičenih rastvora na 25°C do 100°C, dok se monoklinični oblik HAP dobija zagrevanjem heksagonalnog oblika na 850°C [17]. Monoklinična struktura ima prostornu grupu $P2_1/b$ sa parametrima jedinične ćelije $a = 9.421 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, and $\gamma = 120^\circ$ [81]. Heksagonalna struktura HAP ima prostornu grupu $P6_3/m$ sa parametrima jedinične ćelije $a = b = 9.432 \text{ \AA}$, $c = 6.881 \text{ \AA}$, i $\gamma = 120^\circ$ [82]. Slika 2.7 pokazuje heksagonalnu jediničnu ćeliju (ima ukupno 44 atoma) koja sadrži dva neekvivalentna Ca položaja [Ca(1) i Ca(2)], jedan P položaj, četiri različita kiseonikova položaja [O(I), O(II), O(III) i O(IV)] i jedan H položaj duž c-ose. P atom formira tetraedar sa O(I), O(II) i dva O(III) atoma, i tetraedri su povezani preko Ca(1) i/ili Ca(2) duž c-ose. Ca(1) je vezan sa tri O(I) i tri O(II) atoma sa dužinom veze od oko 0,24 nm. Sa druge strane, Ca(2) je šesto koordinovan sa jednim O(II) atomom, četiri O(III) atoma i O(IV) atomom. Ca(2) atomi grade trougao, sa položajima $z = \frac{1}{4}$ i $\frac{3}{4}$. Susjedni trouglovi su međusobno pomereni za 60° . U pogledu orijentacije OH kolona duž c-ose, moguće su dve orijentacije: paralelna -OH-OH- za heksagonalnu (Slika 2.7) i -OH-HO- za monokliničnu strukturu. Nađeno je da može doći do narušavanja orijentacije OH grupa duž kolone kod heksagonalne strukture [83]. Dakle, monoklinična struktura hidroksiapatita je nešto stabilnija od heksagonalne. Glavna karakteristika ovakve strukture jeste velika termodinamička stabilnost; jedino je fluoroapatit od ostalih ortofosfata stabilniji.

Fluoroapatit (FAP) na sobnoj temperaturi ima heksagonalnu strukturu u kojoj se pojedinačni F^- nalazi u sredini ravni Ca(2) trougla, dok su atomi kiseonika iz OH grupa kod HAP-a, pomereni za 0,03 nm od ravni kalcijumovih trouglova. Ova razlika u strukturi između FAP i HAP je možda glavni razlog veće termodinamičke stabilnosti FAP [84].



Slika 2.7. Heksagonalna struktura jedinične ćelije HAP [83].

2.4. Postupci sinteze hidroksiapatita

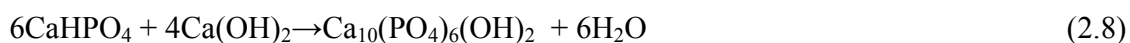
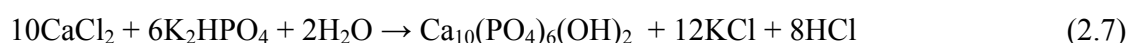
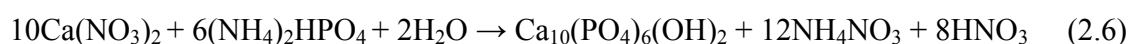
Sintetički hidroksiapatit je materijal koji se dugo primenjuje u raznim granama nauke i tehnologije. Primena različitih metoda sinteze i varijacija parametara sinteze u okviru iste metode, neophodna je da bi se dobio proizvod sa fizičko-hemijskim osobinama prilagođenim specifičnoj nameni. Metode dobijanja se mogu klasifikovati u dve kategorije: suve i mokre hemijske metode.

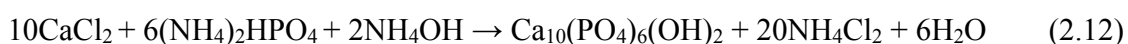
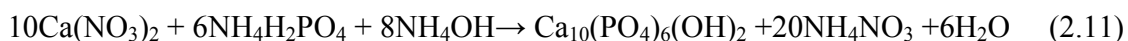
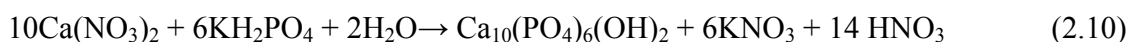
2.4.1. Mokri postupci sinteze

Mokre metode sinteze hidroksiapatita obuhvataju procese: precipitacije, hidrolize, hidrotermalne, sol-gel i sinteze iz emulzija. Prednost ovih metoda je da postoji mogućnost kontrole dobijanja čestica određene veličine i morfologije, te da se mogu dobiti značajne količine materijala iz jeftinih hemikalija uz korišćenje relativno pristupačne opreme. Međutim, mokri postupci često vode ka stvaranju nestehiometrijskog hidroksiapatita, kontaminiranog raznim anjonima kao što su: karbonati, hidrogen fosfati, nitrati i hloridi. Sve ove primese mogu značajno uticati na fizičko-hemijske osobine proizvoda.

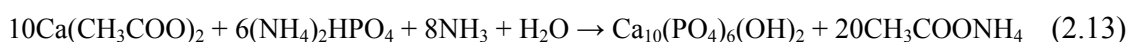
2.4.1.1. Precipitacione metode

Metode bazirane na precipitaciji iz vodenih rastvora najpogodnije su za pripremu velikih količina hidroksiapatita. Dva tipa reakcija se tipično koriste kod precipitacionih metoda. Prvi tip su reakcije između kalcijumovih i fosfatnih soli. Najčešće soli kalcijuma koje se koriste u ovoj metodi za dobijanje HAP jesu: CaNO_3 , CaCl_2 ili $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, dok se za obezbeđenje fosfatnih jona najčešće koriste rastvori $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$ ili H_3PO_4 . Primeri sinteze HAP su prikazani hemijskim reakcijama [85-87]:

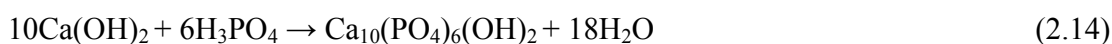




Kalcijum acetat se često koristi u sintezama umesto CaCl_2 i $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, jer se acetatni anjon ne ugrađuje u strukturu HAP-a za razliku od nitratnog i hloridnog anjona [85].



Drugi tip je reakcija neutralizacije između $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i H_3PO_4 , koju su prvo primenili Tagai i Aoiki [88] i predstavili je reakcijom:



Metoda neutralizacije je vrlo jednostavna metoda za dobijanje HAP-a, veoma ekonomična i pogodna za industrijsku primenu, ne zahteva složenu i skupu opremu, a omogućava dobijanje velike količine uzorka iz samo jedne sinteze. Karakteristike HAP prahova dobijenih neutralizacionim postupkom, kao što su morfologija, stehiometrija, specifična površina, veličina kristalita i kristaliničnost, veoma zavise od uslova sinteze: pH, temperature, koncentracije i čistoće reaktanata, prisustva inertne atmosfere, brzine ukapavanja H_3PO_4 , načina mešanja reaktanata, vremena starenja taloga i raznih drugih faktora.

- **Uticaj čistoće reaktanata**

Bernard i sar. [89] su, proučavajući uticaj primesa prisutnih u $\text{Ca}(\text{OH})_2$ (od raznih proizvođača), našli da joni magnezijuma imaju veliki uticaj na morfologiju i stehiometriju HAP-a, favorizujući stvaranje nestehiometrijskog proizvoda. Hidroksiapatiti dobijeni od CaO (dobijen žarenjem $\text{Ca}(\text{OH})_2$ na 600°C u toku 1 sata) koji su imali visok sadržaj MgO (0,4% - 0,875%) su se nakon žarenja na 900°C delimično ili potpuno (0,875% MgO) pretvorili u β -TCP. Kalcijum deficitarni HAP je nestabilan tokom žarenja i raspada se na β -TCP i stehiometrijski hidroksiapatit.

- **Uticaj pH sredine**

Palchik i sar. [90] su u svom radu ispitali uticaj pH vrednosti reakcione sredine u opsegu 7-12. Ustanovljeno je da se pri pH 7 dobija proizvod sa malom količinom karbonata u strukturi, dok sa porastom pH njegov sadržaj raste. Takođe, ustanovljeno je da se sušenjem taloga na sobnoj temperaturi dobija loše iskristalisan, a na 120°C dobro iskristalisan proizvod.

- **Uticaj temperature**

Izbor temperature za sintezu HAP je od velikog značaja. Stepem kristaličnosti čestica raste sa porastom temperature sinteze, dok specifična površina opada.

- **Brzina ukapavanja H₃PO₄**

Sporo dodavanje reaktanata vodi ka formiranju čistog i kristalnog proizvoda sa većim česticama, zahvaljujući niskoj prezasićenosti i izbegavanju pojave lokalnih nehomogenosti [91]. Gouveia i sar. [92] su ispitali uticaj brzine dodavanja H₃PO₄ u suspenziju Ca(OH)₂ na svojstva HAP-a. Pri brzinama od 1 mLmin⁻¹ i 1,5 mLmin⁻¹ nije primećen uticaj dok je pri brzini dodavanja od 8 mLmin⁻¹ došlo do stvaranje pored HAP i neidentifikovane Ca-P faze. Žarenjem uzorka na 800°C neidentifikovana Ca-P faza se raspala na β-TCP i CaO.

- **Način mešanja reaktanata**

Yoruç i sar. [93] su ispitali uticaj načina mešanja reaktanata (magnetom, ultrazvukom i kombinovano magnetno-ultrazvučno) na osobine HAP-a. Prah napravljen kombinovanim magnetno-ultrazvučnim mešanjem je bio nanočestični i sastojao se samo od HAP. Ostala dva načina mešanja (magnetnom mešalicom i ultrazvukom) pokazala su se manje efikasnim jer su pored HAP indentifikovane i primese: neizreagovani Ca(OH)₂ i CaHPO₄. Afshar i sar. [94] su ustanovili da je HAP dobijen iz reakcione suspenzije mešane (mehanička mešalica) brzinom od 2000 obmin⁻¹ sadržao znatno manju količinu neizreagovanog CaO od uzorka dobijenog pri mešanju od 500 obmin⁻¹.

- **Uticaj inertne atmosfere**

Sa obzirom da se OH⁻ i PO₄³⁻ grupe mogu supstituisati sa karbonatnim anjonom, ustanovljeno je da izvođenje sinteze u atmosferi filtriranog inertnog gasa (N₂ ili Ar) značajno smanjuje sadržaj CO₃²⁻ u finalnom proizvodu [94].

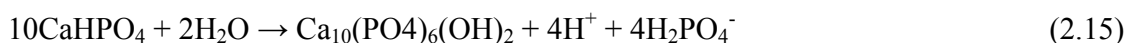
- **Uticaj vremena i temperature starenja taloga**

Vreme starenja reakcione smeše ima važnu ulogu u dobijanju stehiometrijskog i visoko-kristalnog proizvoda. Tokom procesa starenja taloga u matičnom rastvoru dolazi do transformacije prekursorskih čvrstih faza u hidroksiapatit, rekristalizacije, rasta većih kristala na račun manjih i do agregacije čestica. Efekat starenja je izraženiji na nižim temperaturama s obzirom da se rastvorljivost HAP-a smanjuje sa povećanjem temperature. Lazić i sar. [95] su našli da tokom starenja dolazi do rasta kristala u prvih 20 časova nakon precipitacije. Dalje povećavanje vremena starenja nije bitno uticalo na veličinu kristala.

2.4.1.2. Hidroliza kalcijum ortofosfata

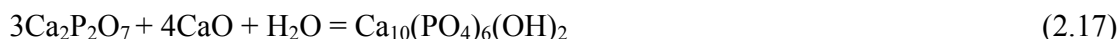
Hidroksiapatit se može dobiti hidrolizom kalcijum ortofosfata: CaHPO₄·2H₂O, CaHPO₄, α-Ca₃(PO₄)₂, β-Ca₃(PO₄)₂, Ca₈H₂(PO₄)₆·5H₂O i Ca₄(PO₄)₂O, kao i njihovih smeša. Reakcije hidrolize reprodukuju bolje sastav i morfologiju sintetisanih kristala HAP od precipitacionih procesa i zavise od manjeg broja parametara sinteze (temperatura, vreme izvođenja reakcije, hemijski sastav reaktanata i pH). Važan parameter hidrolize ortofosfata je stehiometrija polaznog jedinjenja [96].

Perloff i Posner [97] su predložili dva moguća mehanizma hidrolize monetita u zatvorenom sistemu na 300°C i predstavili reakcijama:



2.4.1.3 Hidrotermalna metoda

Postupci hidrotermalne sinteze uključuju heterogene reakcije u prisustvu vode ili nekog drugog rastvarača, pri visokom pritisku i temperaturi u zatvorenom sistemu. Pri tim uslovima dolazi do rastvaranja i reakcije između jedinjenja koja su nerastvorna pri uobičajenim postupcima sinteze, ili pri istima ne reaguju. Neretko, pri tim uslovima nastaju različiti materijali u odnosu na uobičajne metode sinteze. Reaktori za dobijanje i obradu materijala pod hidrotermalnim uslovima su često kombinovani sa drugim oblicima energije: mikrotalasne, mehanohemijske, elektrohemijske ili sonohemijske energije, radi dobijanja proizvoda sa određenim fizičko-hemijskim osobinama i povećanju kinetike reakcije. Hidrotermalna tehnika je idealna za dobijanje čestica visoke čistoće, kontrolisane stehiometrije i veličine, uske raspodele veličine čestica, kontrolisane morfologije i mikrostrukture, ujednačenosti, određene gustine, visoke kristaliničnosti i tako dalje [98]. Sa druge strane, visoka temperatura može katalitički da ubrza nepoželjne reakcije kao na primer, redukciju jona Ag(I) do elementarnog srebra. Hidrotermalni postupci se uspešno primenjuju u sintezi HAP i raznih metal supstituisanih hidroksiapatita [99-103]. Yubao i sar [104] sintetisali su stehiometrijski HAP pod hidrotermalnim uslovima iz kalcijum pirofosfata prema reakciji:



Morfologija i veličina čestica u hidrotermalnoj sintezi HAP može se kontrolisati preko raznih termodinamičkih i netermodinamičkih parametara kao na primer, temperature, pH, vreme sinteze, aditivi i brzina mešanja. Hidrotermalnom sintezom se dobijaju dobro kristalisani igličasti kristali HAP, veličine od 20-300 nm, sa minimalnom aglomeracijom.

2.4.1.4 Sol-gel metoda

Sol-gel je nekonvencionalna metoda dobijanja materijala veće čistoće i homogenosti na nižim temperaturama u odnosu na klasične metode, a zasnovana je na osobinama jednog ili više reaktanata da obrazuju sol-gel. Upotrebom sol-gel postupka mogu se dobiti razni keramički, stakleni i organsko-neorganski materijali u različitim oblicima: nanočestice, tanke filmske prevlake, mikroporozne membrane, keramička vlakna, monoliti, aerogelni materijali i drugo. Sol-gel proces uključuje prelaz koloidnog rastvora (sol) u čvrstu fazu (gel). Koloidni rastvor predstavlja sistem koji sadrži čvrste

čestice (1–100 nm) koje su suspendovane u tečnoj fazi. Gel je, za razliku od sola, rigidne mrežaste strukture sa porama submikronskih dimenzija i polimernih lanaca čija je srednja dužina veća od mikrometra [105, 106].

Za opisivanje sol-gel postupka važne su tri reakcije: hidroliza, kondenzacija alkohola i kondenzacija vode. Do geliranja sistema dolazi reakcijama hidrolize i kondenzacije alkoksida prekursora, uz kiselinu ili bazu kao katalizator. U reakcijama hidrolize, dodatkom vode, zamjenjuje se alkoksidna skupina (OR) sa hidroksilnom skupinom (OH). Kondenzacija uključuje M-OH grupu (M je metal koji učestvuje u reakciji) proizvodeći vezu M-O-M, uz nusprodukt vodu. Faktori kao što su pH vrednost, molarni odnos H_2O/M i katalizatori mogu uticati da se hidroliza završi pre nego što počne kondenzacija. Kako broj M-O-M veza raste, individualni molekuli se ugrađuju u zajednički nagomilani sol (koloidni rastvor). Polimerizacijom se dalje čestice sola međusobno povezuju u mrežu i nastaje gel. Gelnu fazu u sol-gel postupku se opisuje kao trodimenzionalni čvrsti kostur okružen tečnom fazom, gde su tečnost i čvrsta faza kontinuirane i koloidnih (nanometarskih) dimenzija.

Nakon faze geliranja sledi proces sušenja, u kome se odstranjuje rastvarač iz gela i dolazi do njegovog skupljanja. Dobijeni suvi gelovi se termički tretiraju (žare) radi dobijanja konačnog proizvoda. Prilikom termičkog tretmana dolazi do odstranjivanja rastvarača iz mikropora, uklanjanja zaostalih organskih jedinjenja i faznih transformacija. Proces žarenja često dovodi i do aglomeracije i ukрупnjavanja nano čestica. Sol-gel metodom su uspešno sintetisani nanočestični prahovi hidroksiapatita [107-110].

2.4.1.5 Mikroemulziona metoda

Emulzija predstavlja disperzni sistem dve tečnosti, koje se međusobno ne mešaju, u kojoj je jedna tečnost u obliku kapi dispergovana u drugoj. Površinski aktivne supstance (skraćeno PAS, emulgatori ili tenzidi) se koriste za dobijanje stabilnih emulzija i kao kontrolni agensi u sintezi neorganskih nanočestica. Prema veličini dispergovanih kapi emulzije se dele na mikroemulzije, nanoemulzije (mini emulzije) i makroemulzije. Mikroemulzije se, za razliku od nanoemulzija i makroemulzija, obrazuje spontano i termodinamički su stabilni sistemi. Prečnik kapi dispergovane faze mikroemulzija se graniči sa disperzijama micela PAS (do 10 nm) i nanoemulzijama (20-500 nm) iznosi od 10 – 100 nm [111, 112]. Glavni nedostatak mikroemulzija je da one zahtevaju veće količine PAS (obično preko 10 wt%) [113] od nanoemulzija i makroemulzija. PAS se na

osnovu prirode polarnog dela i ponašanja u vodenom rastvoru klasifikuju na: anjonske, katjonske, nejonske i amfoterne.

Postoji tri osnovna tipa strukture mikroemulzija: voda u ulju (V/U), ulje u vodi (U/V) i bikontinuirana struktura. Kod mikroemulzija sa bikontinuiranom strukturom, voda i ulje su kontinuirane faze koje se uzajamno prožimaju, a na granici faza se nalazi fleksibilni, kontinuirani, monomolekulski film PAS. Dispergovane vodene kapi u mikroemulziji zapravo predstavljaju mini reaktore u kojim se odvijaju sinteze.

Prahovi hidroksiapatita dobijeni ovom metodom pretežno su sačinjeni od nanometarskih čestica [112-117].

2.4.2. Suvi postupci sinteze

2.4.2.1 Sinteze u čvrstoj fazi

Relativno mali broj naučnih studija postoji o procesima dobijanja HAP reakcijama u čvrstoj fazi [118, 119]. Sinteze se baziraju na zagrevanju heterogene smeše reaktanata u određenom odnosu, pri čemu se dobija nova kristalna faza. Kristali HAP dobijeni ovom metodom su stehiometrijskog sastava, čestice su mikrometarske veličine sa nedefinisanom morfologijom, često sadrže primese drugih faza zbog nemogućnosti potpune difuzije jona u čvrstom stanju [119]. Kao mana ove metode navode se: nemogućnost dobijanja nanočestičnih prahova i ekonomska strana: velika potrošnja energije i skupa oprema.

2.4.2.2. Mehanohemijaska metoda

Mehanohemija proučava fizičkohemijske promene materije pod uticajem mehaničke energije. Mlevenje je tehnika koja se uglavnom koristi u tehnologiji prerade praškastih materijala za smanjenje veličine čestica i homogenizaciju. Tokom mlevenja u materijalima dolazi do fizičkih i hemijskih promena, odnosno može dovesti do iniciranja i odvijanja hemijskih reakcija.

Nekoliko fenomena igra važnu ulogu prilikom odvijanja mehanohemijske reakcije, a to su [120-123]:

- stalno lomljenje čestica i permanentno formiranje novih (čistih) reaktivnih površina;

- permanentno slepljivanje i lomljenje čestica, koje dovodi do odvijanja hemijskih reakcija (za slučaj smeše prahova);
- stvaranje velikog broja strukturnih defekata kao što su vakancije, intersticije i dislokacije;
- Pojava visokoenergizovanih mesta u tačkama sudara kugli (na primer planetarni mlin) i materijala.

Prednost mehanohemijske metode je u njenoj jednostavnosti i mogućnosti dobijanja nanočestičnih prahova i mnogih materijala, dok se u nedostatke ubrajaju pojava aglomeracije praha, široka raspodela veličine dobijenih čestica, kontaminacija od strane opreme i prisustvo metastabilnih faza. Ova metoda se najčešće koristi za dobijanje neorganskih materijala i legura, a u poslednje vreme i organskih jedinjenja [124, 125]. Za mehanohemijske sinteze koriste se različiti tipovi mlinova kao što su: vibracioni, atricioni, planetarni i horizontalni kuglični mlinovi. Trajanje mehanohemijske sinteze zavisi od brojnih faktora, kao što su: vrsta polaznih supstanci, tip mlina koji se koristi, i parametara mlevenja: intenzitet mlevenja, veličina posude, frekvencija kod vibracionog mlina, brzina rotacije kod planetarnog mlina, maseni odnos kugli prema prahu, veličina, gustina i broj kugli, stepen punjenja posude, temperatura mlevenja i razni drugi faktori. Mehanohemijska metoda se često koristi za dobijanje nanočestičnih prahova hidroksiapatita, korišćenjem različitih kombinacija reaktanata [126-129].

2.5. Metal supstitusani hidroksiapatiti

Hidroksiapatitna kristalna struktura je relativno fleksibilna pri supstituciji jona: Ca(II), PO_4^{3-} i OH^- , i oni se mogu delimično ili potpuno zameniti drugim jonima, bez narušavanja kristalografske simetrije. Supstituenti u strukturi HAP-a mogu uzrokovati promene u karakteristikama, parametara jedinične ćelije, kristalnoj simetriji, kristaliničnosti, termalnoj stabilnosti, morfologiji, rastvorljivosti, hemijskim i biološkim osobinama. Kalcijum se može izmeniti sa raznim katjonima, jednovalentnim Na(I), K(I), Ag(I), dvovalentnim: Mg(II), Sr(II), Mn(II), Pb(II), Ba(II) Cu(II), Zn(II), trovalentnim: Cr(III), Fe(III) i drugim. Hidroksidni anjon se uglavnom supstituiše sa: F^- , Cl^- , Br^- i CO_3^{2-} , sa druge strane fosfatni anjon se može zameniti sa: CO_3^{2-} , AsO_4^{3-} i VO_4^{3-} [130]. Fizičko-hemijska svojstva dopiranih hidroksiapatita umnogome zavise od vrste i količine prisutnog jona metala u kristalnoj rešetki. Ugradnja raznih katjona ili anjona u strukturu

hidroksiapatita može se izvesti na dva načina: sorpcijom jona iz rastvora ili inkorporacijom prilikom direktne sinteze.

Hidroksiapatit pokazuje veliki afinitet prema sorpciji jona metala i radionuklida, pri tome se grade nerastvorne i termodinamički stabilne fosfatne faze u širokom pH opsegu [131-135]. Stabilnost i slaba rastvorljivost fosfatnih faza je veoma važna u pogledu smanjenja pokretljivosti i biološke dostupnosti jona teških metala, a takođe i kao postupak za obradu radioaktivnog otpada. Mehanizmi sorpcije jona metala zavise od fizičko-hemijskih svojstava HAP-a, vrste jona i drugih uslova sorpcije i obuhvataju: površinsku adsorpciju, jonsku izmenu, građenje površinskih kompleksnih jedinjenja, rastvaranje i precipitaciju novih čvrstih faza.

Ugradnja raznih jona metala u strukturu hidroksiapatita direktnom sintezom, obezbeđuje veću količinu i ravnomerniju raspodelu jona po celoj zapremini. Količina metala koja će se ugraditi u strukturu HAP, zavisi od vrste, prečnika i elektronegativnosti jona metala, primenjene metode i uslova sinteze. Kristalna struktura hidroksiapatita sadrži dva neekvivalentna Ca položaja: Ca(1) i Ca(2). Supstitucija jona Ca(II) u položaju Ca(2) je energetski povoljnija. Naime, položaj Ca(2) je za 0,013 eV energetski stabilniji od položaja Ca(1) [136]. Rastojanje između jona kalcijuma u položajima Ca(1) i Ca(2) je veće nego u položajima C(1) i Ca(1). Joni metala sa većim prečnikom i većom elektronegativnošću prvenstveno supstituišu jone kalcijuma u položaju Ca(2), dok joni sa manjim prečnikom i manjom elektronegativnošću u položaju Ca(1) [137].

Supstitucijom dvovalentnog Ca(II) sa monovalentnim jonima: Na(I) i K(I) u apatitnoj kristalnoj rešetki nastaje razlika u naelektrisanju koja se može neutralisati stvaranjem dodatnih vakancija [138] ili može doći do simultane supstitucije PO_4^{3-} sa dvovalentnim CO_3^{2-} anjonom [139]. Joni kalijuma se znatno manje ugrađuju u hidroksiapatit od jona natrijuma, pri istim polaznim koncentracijama soli (K_2CO_3 i Na_2CO_3) [140]. Rendgenostukturnom analizom HAP-a, sintetisanog u prisustvu Na(I), utvrđeno je da joni natrijuma prvenstveno supstituišu jone kalcijuma u položaju Ca(2) [141]. Analizom XRD spektara uzoraka sa različitim sadržajem kalijuma, ustanovljeno je linearno smanjenje parametara a kristalne rešetke hidroksiapatita sa porastom sadržaja jona kalijuma [142].

Rameshbabu i sar. [143] su pretpostavili da joni srebra supstituišu jone Ca(II) u hidroksiapatitu do 3%, pri većoj količini srebra dolazi do stvaranja Ag_3PO_4 . Rendgenostukturna analiza je pokazala linearan porast parametara a i b kristalne rešetke sa porastom sadržaja srebra sto je u saglasnosti sa većim prečnikom jona Ag(I) (0,128 nm) u odnosu na prečnik jona Ca(II) (0,099 nm).

Magnezijum je prisutan u biološkom apatitu, bitan je u metabolizmu kostiju, ima uticaj na aktivnost ćelija: osteoblasta i osteoklasta, stimulujući rast kostiju. Magnezijum supstituiše jone Ca do 10%, prvenstveno u položaju Ca(2), iako ima manji jonski prečnik (0,065 nm) od jona kalcijuma (0,099 nm). Ovo se može objasniti njegovom većom elektronegativnošću, Ca(2)-O veza je kraća u odnosu na veze Ca(1)-O u kristalnoj rešetki HAP-a, prisustvo hidroksidnog anjona u položaju Ca(2) i većom fleksibilnošću položaja Ca(2) za supstituciju. Joni magnezijuma imaju inhibitorski uticaj na nukleaciju i rast čestica, favorizujući stvaranje kiselijih Ca/P faza, dok se sa porastom njihovog udela smanjuje stepen kristaliniteta i raste rastvorljivost HAP [144]. Ren i sar. [145] su našli da se u kristalnoj rešetki nanočestičnog HAP 5-7 % kalcijum supstituiše jonima magnezijuma prvenstveno u položaju Ca(1).

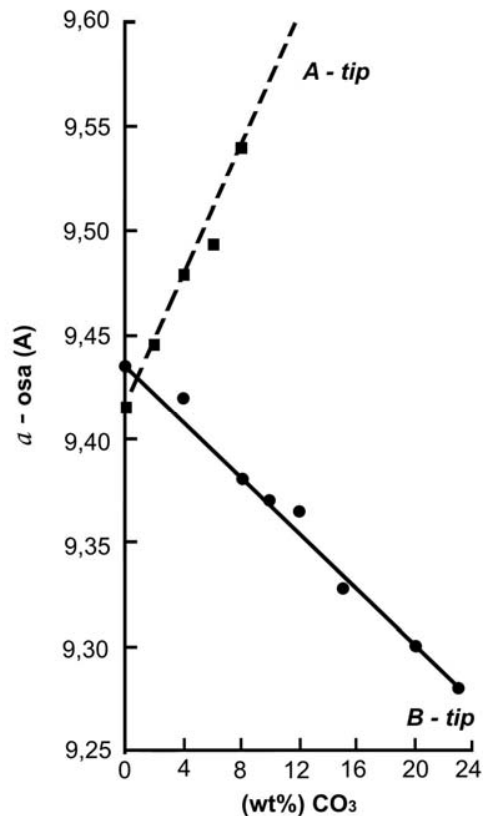
Cink supstituiše kalcijum do 15% u hidroksiapatitu. Rendgenostukturnom analizom uzoraka utvrđeno je da parametar kristalne rešetke c , monotono opada sa porastom sadržaja cinka, dok drugi parametar a opada do 5 mol% Zn, a zatim raste. Povećanje vrednosti ovog parametra pri većim koncentracijama cinka pripisano je delimičnom supstitucijom OH⁻ jona molekulima H₂O [146]. Tang i sar. [147] eksperimentalno su odredili da se joni Ca(II) supstituišu jonima Zn(II) u položaju Ca(2) hidroksiapatita, sa značajnom lokalnom strukturnom distorzijom.

Misono i Hall [148] ispitujući oksido-redukzione osobine hidroksiapatita dopiranog kupri jonima, sa molskim odnosom Cu/Ca = 0-0,025, ustanovili su na osnovu XRD analize da joni Cu(II) supstituišu jone Ca(II) u oba položaja Ca(1) i Ca(2).

Ba(II), Cd(II), Sr(II) i Pb(II) mogu u potpunosti supstituisati jone kalcijuma u hidroksiapatitu [149-151]. Barijum apatit se jedino može dobiti reakcijama u čvrstom stanju, samo mala količina barijuma se može ugraditi u HAP metodom precipitacije iz vodene sredine [149]. Rendgenostukturnom analizom uzoraka sa različitim sadržajem ovih jona ustanovljeno je da supstituišu jone kalcijuma prvenstveno u položaju Ca(2). Parametri kristalne rešetke a i c linearno opadaju sa porastom sadržaja jona Cd(II) u HAP-u, dok rastu linearno kod jona Ba(II) i Sr(II) i nelinearno kod Pb(II) [149-151]. Jon Cd(II) ima manji jonski prečnik od Ca(2) ali veću elektronegativnost. S druge strane joni Ba(II), Sr(II) i Pb(II) imaju veće jonske prečnike od Ca(II).

Karbonatni anjon (CO₃⁻²) se može ugraditi u strukturu HAP-a na dva načina: zamenom dve hidroksilne grupe iz kristalne rešetke (A-tip supstitucije) ili zamenom fosfatnog anjona kristalne rešetke (B-tip supstitucije), pri tome ravnotežno naelektrisanje se održava otpuštanjem odgovarajuće količine jona kalcijuma. Oba tipa supstitucije A i B se mogu javiti istovremeno, i tada se radi o mešovitom AB-tipu. A-tip apatita se može dobiti tretiranjem čistog hidroksiapatita sa CO₂, dok B-tip apatita se može ostvariti iz

vodenih rastvora. Biološki apatiti se deklarišu kao B-tip. Sa porastom sadržaja karbonata kod A-tipa dolazi do porasta parametra a i smanjenja c parametra kristalne resetke HAP, a kod B-tipa do smanjenja a i porasta c parametra [152] (Sl. 2.8).



Slika 2.8. Uticaj količine karbonatnih jona na dimenzije a parametra jedinične ćelije hidroksiapatita [153].

2.6. Infekcije izazvane ugradnjom biomaterijala

Ugradnja biomaterijala u ljudski organizam je ponekada praćena pojavom infekcije, koja može dovesti do njegovog odstranjenja. Proces infekcije često započinje adhezijom ćelija mikroorganizama za površinu implanta. Dalje dolazi do kolonizacije i često do formiranja adherentnog i lepljivog biofilma u kojem su mikroorganizmi zakačeni za površinu imlanta [154]. Najčešći uzročnici infekcija su bakterijske vrste koje su sposobne da grade biofilm: *S. aureus*, *S. epidermis* i *P. aeruginosa*. Infekcije mogu biti izazvane i drugim mikroorganizmima [155]. Mikroorganizmi u biofilmu su znatno

otporniji na antibiotike kao i na imuni odgovor domaćina [156, 157]. Takođe, biofilm deluje kao stalni izvor infekcije. Oblaganjem koštanih implantata slojevima proteina poput albumina ili polimera može se smanjiti adhezija mikroorganizama [158]. Da bi se sprečila inicijalna adhezija mikroorganizama i postoperativne infekcije vrši se oblaganje ili ugradnja u implantate antimikrobnih agenasa: antibiotika, antiseptika i jona metala. Antibiotička profilaksa se pokazala veoma uspešnom u redukciji postoperativnih infekcija. Problemi koji se mogu javiti kod lečenja antibioticima je pojava rezistencije mikroorganizma, citotoksičnost i relativno brza desorpcija. Da bi se postiglo efikasnije lečenje potrebno je da koncentracija antibiotika bude iznad minimalno inhibitorne koncentracije u dužem vremenskom periodu. Na taj način se eliminiše predoziranje i sprečavaju sporedni neželjeni efekti, na primer citotoksičnost. Rastuća rezistencija bakterija na antibiotike predstavlja sve važniji problem u prevenciji i tretmanu postoperativnih infekcija. Ovaj problem se posebno javlja kad je u pitanju *S. aureus*. Prema nekim istraživanjima, *S. aureus* je glavni uzročnik u više od 30% postoperativnih infekcija [159]. Njegova rastuća multi rezistentnost na beta-laktamske antibiotike, označena kao rezistencija na meticilin (MRSA sojevi) ali i na druge antibiotike, otežava lečenje i može dovesti do uklanjanja implanta pa čak i da ugrozi život bolesniku. Alternativa upotrebi antibiotika je korišćenje antiseptika na površini implanta. Antiseptici kao hlorheksidin, hloroksilenol, gencijan violet, poli(heksametilenbiguanide) i biljni ekstrakti imaju široki spektar antimikrobne aktivnosti [160-162]. Takođe, antiseptici imaju nuspojave u smislu citotoksičnosti, deluju letalno na fibroblaste istim mehanizmom kojim razgrađuju ćelijski zid bakterija, ali mogu razviti i rezistenciju bakterija [159, 163]. Da bi se sprečila ili umanjila adhezija mikroorganizama vrši se inkorporacija jona metala u strukturu biomaterijala. Joni metala: Ag, Cu i Zn, se najčešće koriste kao antimikrobni agensi, zbog njihovog oligodinamičnog efekta i niske citotoksičnosti prema humanim ćelijama.

2.7. Antimikrobna svojstva srebra, bakra i cinka

Pojedini metali pokazuju oligodinamičko dejstvo (grč. oligos, mali; dynamis, koji ima jako dejstvo), odnosno, u malim količinama imaju letalan efekat na mikroorganizme. Zhao i Stevens [164] su poredili oligodinamički efekat pojedinih jona metala na *E. coli*, došli su do zaključka da srebro ima najjače antimikrobno dejstvo:



Među ovim metalima, srebro i bakar su vekovima korišćeni za prevenciju i lečenje raznih bolesti. Dobro je poznata upotreba srebrnog posuđa u antičkom dobu za čuvanje vode i vina. Herodot je zabeležio da je kralj Persije za vreme ratovanja, čuvao predhodno prokuvanu vodu u posudama od srebra [165]. Credé je 1884 godine u medicini uveo praksu davanja kapi rastvora srebra nitrata u oči novorođenčadi radi sprečavanja njihove upale, i ova praksa je do skoro bila u upotrebi. Takođe, 0,5% rastvor AgNO_3 se uspešno koristio u saniranju inficiranih rana [165]. Ruska svemirska agencija koristila je elektrohemijski regenerisane jone srebra da steriliše vodu za piće, namenjenu astronautima u svemirskoj stanici MIR i njihovom delu Međunarodne svemirske stanice [166]. Takođe, NASA je koristila jone srebra za prečišćavanje vode za piće u vasionom brodu Apolo [167].

Srebro, naročito joni srebra pokazuju širok spektar antimikrobnog dejstva; retka rezistentnost mikroorganizama i niska toksičnost prema humanim ćelijama, glavni su razlozi velikog interesovanja za antimikrobnim materijalima na bazi srebra. Ipak, u slučajevima povećanog izlaganja, srebro pokazuje citotoksičan efekat u vidu oboljenja Argirija [168].

Sa druge strane, bakar i cink su bioelementi, u malim količinama su neophodni za odvijanje mnogih biohemijjskih procesa, dok su u većim količinama toksični. Cink je sastavni deo enzima alkalne fosfataze koja ima stimulatornu ulogu u okoštavanju i integraciji kalcijum fosfatnih implanta pri regeneraciji kostiju [169, 170]. Koncentracije jona bakra i cinka koje su toksične za ćelije mikroorganizama su mnogo manje nego za humane ćelije. Joni bakra i cinka pokazuju širok spektar antimikrobnog dejstva [171-173].

Tačan mehanizam dejstva jona antimikrobnih metala na mikroorganizme još uvek nije poznat, ali se može pretpostaviti na osnovu morfoloških, strukturnih, funkcionalnih promena mikrobnih ćelija. Antimikrobno dejstvo jona pojedinih metala se tumači preko tri mehanizma:

- vezivanje jona metala pretežno za proteine,
- vezivanje jona metala za nukleinske kiseline,
- generisanje kiseoničnih radikala.

Letalna mesta antimikrobnog dejstva jona metala na ćeliji mikroorganizma su:

- ćelijski zid i ćelijska membrana,
- proteini u citoplazmi i
- nukleinske kiseline.

Mehanizam delovanja jona antimikrobnih metala na ćeliju mikroorganizma je višestepen. Prvo, joni se vezuju za ćelijski zid i membranu, time narušavaju neke njene funkcije. Joni dalje prodiru u unutrašnjost ćelije kroz membranu i inhibiraju razne proteine u citoplazmi i ribozomima i interaguju sa nukleinskim kiselinama sprečavajući procese replikacije, transkripcije i translacije, zbog čega ćelija umire. Surve i Badge [174] su odredili prisutnost jona srebra u pojedinim delovima ćelije (ćelijski zid : membrana : citoplazma) kod ispitivanja baktericidnog dejstva na *S. epidermidis* (20%, 50%, 30%) i *K. pneumoniae* (19%, 48%, 33%).

Primarno mesto antimikrobnog dejstva jona metala je ćelijska membrana, i ono može biti jedino sa letalnim efektom. Vezivanje jona metala za membranu može izazvati različite efekte:

- promenu permeabilnosti,
- promenu transmembranskog potencijala,
- blokiranje aktivnog transporta metabolita,
- inaktivaciju enzima (respiratornog lanca, oksido-redukcije i druge),
- potpuno razaranje membranske strukture i razne druge posledice.

Joni antimikrobnih metala pokazuju naročito afinitet prema proteinima, vezujući se za aminokiselinske ostatke koji sadrže elektron donorske atome: S, N i O. Mnogo jače antimikrobno dejstvo jona srebra u odnosu na jone Cu(II) i Zn(II) posledica je veće stabilnosti njegovih kompleksa sa aminokiselinama koje sadrže tiol grupe (cistein i metionin). Razlika u stabilnosti kompleksa može se objasniti na osnovu teorije tvrdih i mekih kiselina i baza. Pearson je zapazio na osnovu stabilnosti kompleksa da tvrde kiseline vezuju, uglavnom, za tvrde baze, a meke kiseline za meke baze (Pearson-ovo pravilo) [175], i da su kompleksi tvrdo-tvrdih i meko-mekih učesnika stabilniji od mešovityh tvrdo-mekih. Jon srebra spada u meke kiseline (Tab. 2.3) i gradi veoma stabilne komplekse sa mekim bazama, kao što su tionati - RSH (Tab. 2.4). Sa druge strane joni Cu(II) i Zn(II) su na prelazu između jakih i slabih kiselina (Tab. 2.3) i sa -SH grupom grade manje stabilne komplekse od jona srebra. Postoji dosta izuzetaka u pogledu stabilnosti kompleksa na osnovu Pearsonovog pravila. Naime, jon kalcijuma je jaka kiselina ali ne gradi komplekse sa jakim bazama NH₃ i aminima, dok joni srebra grade veoma stabilne komplekse (Tab. 2.3 i Tab. 2.4).

Tablica 2.3. Tvrdo-meke metalne kiseline [176]

Tvrde metalne kiseline	Prelazne metalne kiseline	Meke metalne kiseline
Li ⁺ , Na ⁺ , K ⁺ , Be ²⁺ , Mg ²⁺ , Ca ²⁺	Fe ²⁺ , Co ²⁺ , Ni ²⁺ , Cu ²⁺ , Zn ²⁺ , Pb ²⁺	Pd ²⁺ , Pt ²⁺ , Cd ²⁺ , Hg ²⁺ , Ag ⁺ , Hg ⁺

Tablica 2.4. Tvrde-meke baze

Tvrde baze	Prelazne baze	Meke baze
F ⁻ , OH ⁻ , H ₂ O, ROH, ClO ₄ ⁻ , CO ₃ ²⁻ , NO ₃ ⁻ , PO ₄ ³⁻ , SO ₄ ³⁻ , NH ₃ , RNH ₂ , acetate, oksalato, glicinato	Br ⁻ , SO ₃ ²⁻ , NO ₂ ²⁻	RSH, R ₂ S, RS ⁻ i ostali S donori, CN ⁻ , SO ₃ ²⁻

Liau i sar. [177] su ispitivali uticaj pojedinih jedinjenja koja sadrže -SH grupu ili R-S-S-R. Rezultati su pokazali da jedinjenja koja sadrže tiol grupe (-SH), kao aminokiselina cistein ili kao tioglikolat, kompleksiraju jone srebra u rastvoru i tako neutrališu njegovo baktericidno dejstvo prema *Pseudomonas aeruginosa*.

Jung i sar. [178] su pomoću TEM uočili dezintegraciju ćelijskih membrana *E. coli* i *S. aureus* nakon baktericidnog tretmana sa rastvorom jona srebra. Gross i saradnici [179] su našli da joni Cu(II) uzrokuju smanjenje zapremine ćelije i destrukciju pigmenta kod *Chlorella* sp. Njihovi rezultati ukazuju da je oštećenje ćelijske membrane prvi korak u nizu toksičnog dejstva kupri jona. Takođe, mnoge naučne studije su pokazale da kupri joni inhibiraju respiraciju i fotosintezu kod *Chlorella* sp [180-183]. Ohsumi i sar. u svom radu [184] su izvestili da ćelije *Saccharomyces cerevisiae* ($3 \cdot 10^8$ mL⁻¹) nakon dodatka rastvora jona Cu(II) (100 µM) u roku od 2 min na 25°C gube permeabilnost plazmine membrane usled stvaranja lezija. Promenom permeabilnosti Schreurs i Rosenberg [185] su izvestili da su joni srebra uticali na permeabilnost membrana kod *E. coli* dovodeći do isticanja metabolita iz ćelije: fosfata, manitola, sukcinata, glutanina i prolina. Joni srebra pri niskim koncentracijama reverzibilno blokiraju respiratorni lanac kod mikroorganizama a pri visokim koncentracijama ireverzibilno [186]. Holt i Bard [187] su pretpostavili da joni srebra inhibiraju NADH dehidrogenazu u respiratornom lancu *E. coli*. Do sličnih rezultata došli su Semeykina i Skulachev [188] kod *Bacillus* sp. Yamanaka i sar. [189] su pokazali da je glavno baktericidno dejstvo jona srebra u citoplazmi *E. coli* i da inaktivije proteine prisutne u ribozomima i neke druge proteine i enzime, sprečavajući pri tome sintezu enzima i proteina esencijalnih za stvaranje ATP.

Joni Ag(I) i Cu(II) se mogu jako kovalentno vezati za nukleinske kiseline [190]. Niske koncentracije jona Ag(I) i Cu(II) dovode do reverzibilne inaktivacije dok visoke koncentracije mogu dovesti do fragmentacije nukleinskih kiselina.

Pandian i sar. [191] su ispitali antimikrobnu aktivnost rastvora AgNO₃ na *Bacillus licheniformis*. Pri koncentraciji nižim od MIC (minimalna inhibitorna koncentracija) 5 mM AgNO₃, u bakterijskoj ćeliji dolazi do stvaranja nanočestica srebra, najverovatnije dejstvom enzima nitrat reduktaze. Veće koncentracije AgNO₃ dovode do inhibicije raznih enzima (katalaza, NADH dehidrogenaza) i dolazi do fragmentacije molekule DNA.

Ispitivanja Feng i sar. [192] su pokazala da joni srebra u ćelijama *E. coli* i *S. aureus* kondezuju molekule DNA sprečavajući replikaciju i da inaktivišu proteine vezujući se za njihove –SH grupe.

Lu i sar. [193] su pretpostavili da je inhibirajuće dejstvo nanočestica srebra na virusu hepatitis B posledica interakcije čestica sa viralnom DNA molekulom, pri čemu se sprečava transkripcija. Joni Cd(II) i Hg(II) pri koncentraciji (1-10 µgmL⁻¹) i Zn(II) (100 µgmL⁻¹) su pokazali antiviralnu aktivnost prema HIV virusu, inhibirajući procese transkripcije [194].

Metali sa promenljivom valencom, kao što su živa, bakar, gvožđe i hrom ispoljavaju katalizujući efekat stvaranjem superoksidnog radikala i hidroksilnog radikala. Bakar sadrži jedan nespareni elektron u elektronskoj strukturi što ga čini aktivnim elementom u redoks-reakcijama. Kupri jon Cu(II) može da se redukuje do kupro jona Cu(I) u prisustvu bioloških reduktanata (NADH, askorbinske kiseline, sukcinata, D-laktata) koji katalizuju nastanak reaktivnog hidroksil radikala (*OH) razgradnjom H₂O₂, procesi se mogu predstaviti reakcijama [195, 196]:



Hidroksi radikal je ekstremno reaktivan (jako oksidujuće sredstvo) i može dalje da reaguje sa različitim biomolekulima, poput lipida, proteina i DNK. Mehanizam antimikrobnog dejstva nije u potpunosti istražen.

Rodriguez-Montelongo i sar. [197] su izvestili da je *ter*-butilperoksid pokazao antimikrobno dejstvo prema *E. coli* samo u prisustvu kupri jona vezanog za ćelijsku membranu. NADH ili drugi molekuli prisutni u respiratornom lancu (sukcinat, D-laktat)

su redukovali Cu(II) do Cu(I). Zatim Cu(I) joni su oksidovani sa *ter*-butilperoksidom sa istovremenom inaktivacijom NADH oksidaze.

U svojim radovima Sagripanti [196, 198, 199] je izvestio o inaktivaciji raznih mikroorganizama usled oštećenja nukleinskih kiselina preko oksidativnih radikala generisanih jonima Cu(II).

Adsorpcijom atmosferskog kiseonika, na atomima ili jonima srebra, nastaje atomski (nascentni) kiseonik koji poseduje jako antimikrobno dejstvo [198-200]. Nascentni kiseonik adsorbovan na površini srebra u vodenoj sredini lako oksiduje tiol grupe (RSH) prisutne u aminokiselinskim ostacima proteina na površini mikroorganizama, gradeći pri tome disulfidnu vezu R-S-S-R, sprečavajući time respiraciju i transfer elektrona [200].

3. Eksperimentalni deo

3.1 Materijali

3.1.1 Hemikalije korišćene za sinteze hidroksiapatita

U toku izrade eksperimentalnog dela ove disertacije korišćen je veliki broj hemikalija. Sve korišćene hemikalije za sinteze uzoraka hidroksiapatita su bile p. a. čistoće, a njihov spisak je dat u nastavku:

- Ag_2O – (Merck, 99%).
- CaCO_3 – (Merck, 98%).
- CuO – (Merck, 99%)
- H_3PO_4 – (Merck, > 85%).
- ZnO – (Aldrich, 99,99%).

Bidestilovana voda je korišćena prilikom sinteze uzoraka apatita. Takođe, korišćena je za kvantitativnu elementarnu analizu kao i za desorpciju jona Ag(I) , Cu(II) i Zn(II) iz uzoraka.

Azot (N_2 – 99,99% čistoće) je korišćen pri sintezi uzoraka apatita da bi se obezbedila inertna atmosfera.

3.1.2 Mikroorganizmi korišćeni za određivanje antimikrobnih svojstava dobijenih materijala

Za ispitivanja su korišćeni sojevi indikatorskih bakterija *Escherichia coli* (Gram-negativna) ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* (Gram-pozitivna) ATCC 25923 i kvasca *Candida albicans* ATCC 24433.

3.1.2.1 Morfolološke i kulturalne osobine *Staphylococcus aureus*

S. aureus je Gram-pozitivna bakterija iz grupe stafilokoka. Robert Koch je 1878 prvi otkrio stafilokoke u gnoju jednog bolesnika. Stafilokoke su Gram-pozitivne okruglaste bakterije. Fakultativni su anaerobni organizmi. Rod *Staphylococcus* je dobio ime po izgledu kolonija, koje su slične grožđu i potiče od grčkih reči *staphylus* što znači grozd i *coccus* što označava zrno. U rodu postoji oko 30 vrsta, ali samo su neke patogene. Medicinski najznačajnije za čoveka su: *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermis*, *Staphylococcus intermedius* i *Staphylococcus saprophyticus*. (*S. aureus*) Medicinski najvažnija stafilokoka je *Staphylococcus aureus*, zbog svoje patogenosti.

Bakterije su okruglastog oblika (koka), prečnika 0,6–1,0 μm , ali im veličina varira u zavisnosti od soja, starosti kulture i vrste podloge na kojoj se razmnožavaju. Nepokretne su i ne formiraju endospore. U preparatima iz kultura kolonije su poređane u nepravilnim grozdovima. *S. aureus* dobro raste na mnogim čvrstim i u tečnim hranljivim podlogama. Optimalna temperatura za razmnožavanje je 30–37°C, a može da se razmnožava i na temperaturama između 6,5–46°C, optimalna pH podloge iznosi 7,4. Na agaru, posle inkubacije od 24 sata, obrazuju okrugle, blago ispupčene, glatke, neprozračne kolonije prečnika 1–2 mm. Kolonije su obično zlatno-žute boje, mada mogu biti i svetlo žute, krem i bele. U bujonu dobro rastu, uzrokuju njegovo zamućenje i na dnu stvaraju prašinasti talog. U tečnim podlogama ne proizvode pigment.

3.1.2.2 Morfolološke i kulturalne osobine *Escherichia coli*

E. coli je Gram-negativna bakterija, pripada rodu *Escherichia* i porodici *Enterobacteriaceae*. Jedna je od šest vrsta iz roda *Escherichia*, ostale su: *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* i *E. vulneris*. Ovaj rod je dobio ime po Theodoru Escherichu koji je prvi izolovao i opisao ove bakterije.

Bakterije su štapićastog oblika, dužine 2,0–6,0 μm , širine 1,0–1,5 μm . Javljaju se pojedinačno, u parovima i nepravilnim grupama. Većina sojeva poseduju flagele

peritrihijalno raspoređene, što im omogućuje kretanje. Mnogi sojevi ponekada imaju tanku kapsulu, a mnogi imaju brojne fimbrije. Ne obrazuje spore. *Escherichia coli* je aerobna i fakultativno anaerobna bakterija.

Escherichia coli dobro raste na mnogim hranljivim podlogama. Kolonije su najčešće srednje veličine, okrugle, konveksne, glatke, sjajne, providne i bezbojne. Neki sojevi, najčešće oni sa kapsulom imaju mukoidne kolonije. Izrasle kolonije na endo-agru i eozin-metilensko-plavom-agaru poseduju metalni sjaj. *E. coli* difuzno muti bujon.

3.1.2.3 Morfološke i kulturalne osobine *Candida albicans*

Rod *Candida* pripada podrazdelu *Deuteromycotina*, klasi *Blastomycetes*. Ovaj rod sadrži oko 200 vrsta, a nešto više od 20 vrsta kandidate su patogene za ljude. Glavne patogene vrste su: *Candida albicans* koja je najčešći izazivač oboljenja, zatim *Candida dubliniensis*, *Candida glabrata*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* i *Candida tropicalis*.

Candida albicans je dimorfna gljivica. Kod prve forme, jednoćelijske gljivice imaju okrugao, ovalan oblik (blastospore ili blastokonidije). Druga forma gljivice je karakteristična prilikom rasta i razmnožavanja. Usled neodvajanja pupoljaka, obrazuju se pseudohife, sa različitim stepenom prelaska ka pravoj hifi. Često se ova forma naziva micelijum. Prelaz između dva oblika, može biti uzrokovan spoljašnjim uticajima: pH, temperaturom (b) ili različitim hemijskim jedinjenjima: N-acetilglukozamin, prolin ili cink (d).

Candida albicans raste na sladnom agaru, Sabouraudovoj podlozi (4% maltoze ili glukoze), Littmanovoj podlozi kao i na krvnom agaru. Posle inkubacije od nekoliko dana na temperaturi 25-37°C porastu okrugle, glatke, beličasto-žute kolonije. Kultura miriše na kvasac.

3.2. Sinteza kalcijum hidroksiapatita

Kalcijum hidroksiapatit (HAP) je dobijen titracijom vodene suspenzije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ pomoću rastvora H_3PO_4 . Suspenzija $\text{Ca}(\text{OH})_2$ je dobijena najpre žarenjem CaCO_3 na 1000°C tokom 20 sati, a zatim suspendovanjem dobijenog CaO u 0.5 L bidestilovane vode. Početna koncentracija suspenzije $\text{Ca}(\text{OH})_2$ iznosila je 0,5 M, a pH $10,6 \pm 0,1$. Suspenzija se zagreva u reakcionom balonu na 95°C, uz pomoć grejne obloge i u toku

sinteze temperatura se reguliše kontaktnim termometrom. Za titraciju se koristi 300 mL rastvora 0,5 M H_3PO_4 , koji se dodaje brzinom od oko 1 mL min^{-1} . Postepeno dodavanje rastvora H_3PO_4 i konstantno mešanje suspenzije obezbeđuju homogenu presićenje i sprečavaju pojavu lokalnih nehomogenosti. Sinteza se izvodi u inertnoj atmosferi, u struji N_2 , kako bi se sprečio kontakt sa ugljen-dioksidom iz vazduha i ugrađivanje CO_2 u strukturu HAP. U toku sinteze reakciona smeša se meša mehaničkom mešalicom konstantnom brzinom od 300 obr min^{-1} . Tok reakcije se prati promenom pH vrednosti suspenzije. Promene su vrlo male sve do završne tačke titracije, kada pH naglo pada i titracija se prekida pri pH ~ 7 . Suspenzija se ostavlja u matičnom rastvoru da stari 20 sati na sobnoj temperaturi (25°C), u inertnoj atmosferi uz konstantno mešanje (200 obr min^{-1}). Nakon starenja, suspenzija se procedi na vakuumu. Dobijeni precipitat se osuši na 105°C preko noći u sušnici, a potom se spraiši u avanu. Uzorak se čuva u eksikatoru i karakteriše kao prah.

3.2.1. Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima srebra

Uzorci hidroksiapatita dopirani jonima srebra (Ag-HAP) su dobijeni po proceduri sličnoj za dobijanje čistog kalcijum hidroksiapatita.

Određena količina CaO (dobijen žarenjem CaCO_3 24 h na 1000°C) se suspenduje u 0,5 L vode zagrejane na 95°C. Za titraciju suspenzije se koristio rastvor dobijen rastvaranjem određene količine Ag_2O u 0,3 L H_3PO_4 (0,5 M), koji se dodaje brzinom od oko 1 mL/min. Suspenzija se u toku titracije zagreva u reakcionom balonu na 95°C, uz konstantno mešanje (3000 obr min^{-1}). Svi uzorci su bili sintetisani sa početnom količinom $[\text{Ag} + \text{Ca}] = 0.25$ mol, dok je molski udeo Ag ($[\text{Ag}/(\text{Ca}+\text{Ag})] \cdot 100\%$) u uzorcima bio u rasponu 0,02%; 0,04% i 0,4% za Ag-HAP1, Ag-HAP2 i Ag-HAP3, respektivno. Molski odnos (Ag+Ca)/P od 1,67 u svim uzorcima je bio konstantan. Količine polaznih supstanci su date u [Tablici 4.3](#). Tok reakcije se prati promenom pH vrednosti suspenzije. Titracija suspenzije se prekida pri postizanju pH ~ 7 . Nakon titracije, suspenzija je ostavljena da stari 20 sati uz konstantno mešanje (200 obr min^{-1}), na sobnoj temperaturi (25°C). Dobijeni proizvod je proceden na vakuumu, ispran bidestilovanom vodom i ostavljen u sušnici na 105°C preko noći da se osuši.

3.2.2. Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima bakra

Uzorci hidroksiapatita dopiranih jonima bakra (Cu-HAP) su dobijeni po istom postupku i eksperimentalnim uslovima kao prilikom dobijanja uzoraka hidroksiapatita dopiranih jonima srebra. Umesto srebra oksida (Ag_2O) upotrebljen je bakar(II) oksid (CuO). Molski udeo $[\text{Cu}/(\text{Ca}+\text{Cu})]\cdot 100\%$ u uzorcima je bio 0,04% i 0,4% za Cu-HAP1 i Cu-HAP2, respektivno, dok je molski odnos $(\text{Cu}+\text{Ca})/\text{P}$ od 1,67 bio konstantan. Količine upotrebljenih supstanci su prikazane u Tablici 4.3. Suspenzija nakon starenja (20 h) je filtrirana na vakuumu, talog je ispran bidestilovanom vodom i osušen u sušnici na 105°C preko noći.

3.2.3. Sinteza hidroksiapatita dopiranih jonima cinka

Ista procedura kao za dobijanja Ag-HAP-a i Cu-HAP-a je izvedena i za dobijanje uzoraka hidroksiapatita dopiranih jonima cinka. U sintezi je umesto Ag_2O odnosno CuO korišćen ZnO . Molski udeo cinka ($[\text{Zn}/(\text{Ca}+\text{Zn})]\cdot 100\%$) u uzorcima je bio 0,04% za Zn-HAP1 i 0,4% za Zn-HAP2. Molski odnos $(\text{Cu} + \text{Ca}) / \text{P}$ od 1,67 je bio konstantan. U Tablici 4.3 su date količine supstanci upotrebljenih u sintezama. Dobijeni kristalni talozi su procedeni na vakuumu, isprani bidestilovanom vodom i osušeni preko noći na 105°C u sušnici.

3.3. Metode karakterizacije uzoraka

3.3.1. Rendgenostruktorna analiza

Rendgenostruktorna analiza (XRD) je najznačajnija fizička metoda indentifikacije i karakterizacije čvrste supstance. Ova metoda prvenstveno služi za kvalitativnu analizu, odnosno za indentifikaciju nepoznate supstance, na osnovu karakteristične difrakcione slike (difraktograma) dobijene rasejavanjem rendgenskog zračenja na ispitivanom kristalnom uzorku. Ovom metodom se mogu odrediti: parametri jedinične ćelije, naponi na rešetki, veličina kristalita i stepen kristaliniteta uzorka. Takođe, može se koristiti i za kvantitativnu analizu, odnosno za procenu udela kristalnih faza u uzorku.

Svi uzorci snimljeni su na difraktometru Philips PW-1050. Za analizu je upotrebljena K_α linija Cu, pri naponu 20 kV i struje od 15 mA, na rendgenskoj cevi.

Merenja su vršena u oblasti difrakcije 2θ od 20° do 70° , sa korakom od $0,05^\circ$ i vremenom ekspozicije 1s. Parametri jedinične ćelije a , b i c dobijenih materijala su određeni korišćenjem podprograma „Le Bail fit“ koji se nalazi u paketu Fullprof programa.

3.3.2. Infracrvena spektroskopska analiza

Infracrvena spektroskopija (FTIR) je primenjena kao kvalitativna metoda kojom je na osnovu položaja apsorpcionih traka izvršena identifikacija funkcionalnih grupa. Molekulski spektri u infracrvenoj oblasti nastaju kvantiranim prelascima molekula između različitih oscilatornih odnosno oscilatorno-rotacionih nivoa. Molekuli koji apsorbuju u infracrvenoj oblasti, često sadrže veći broj traka različitog intenziteta i oblika. Pomeranje traka ili njihovo cepanje na dublete može doći usled interakcije normalnog oscilovanja sa lokalnim električnim poljem u kristalu ili sa oscilacijama kristalne rešetke kao celine.

FT-IR spektri svih uzoraka su snimljeni KBr tehnikom u opsegu $4000-400\text{ cm}^{-1}$. Uzorci hidroksiapatita dopiranih jonima srebra su snimljeni spektrofotometrom PERKIN-ELMER FTIR 1725X. Uzorci dopirani jonima bakra i cinka su snimljeni na Nicolet 6700 FT-IR spektrofotometru.

3.3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Mikroskopska analiza uzoraka apatita dobijenih neutralizacionom metodom najpre je rađena skenirajućom elektronskom mikroskopijom (SEM), a detaljnija ispitivanja su vršena transmisionim elektronskim mikroskopom (TEM). Elektronski mikroskop služi za formiranje uvećane slike objekta difrakcijom visokoenergetskih elektrona. Fokusirani snop elektrona pri interakciji sa materijalom uzorka izaziva ekscitaciju i emisiju zračenja iz čestica. Emitovano elektromagnetno zračenje i izbačeni elektroni sakupljaju se i, zavisno od vrste detektora, daju informacije o uzorku. Slika uzorka može se formirati od reflektovanih upadnih elektrona ili od sekundarnih elektrona. Sekundarni elektroni nastaju pri neelastičnoj interakciji primarnog snopa elektrona sa slabo vezanim elektronima u atomu uzorka. Ukoliko su uzorci provodni, za SEM analizu nije potrebna prethodna priprema uzoraka. Površina neprovodnih materijala se priprema deponovanjem tankog provodnog sloja.

Uzorci su pripremljeni dispergovanjem veoma malih količina praha u etanolu i nanošenjem dobijene suspenzije na nosač uzorka. Uzorci su zatim naparavani tankim slojem Au, metodom katodnog raspršivanja (spaterovanja), pomoću uređaja Polaron SC 7610. Sintetisani uzorci hidroksiapatita su snimljeni na JEOL JXA 840 skenirajućem elektronskom mikroskopu.

3.3.4. Transmisiona elektronska mikroskopija

Ova metoda je urađena u cilju određivanja veličine i oblika sintetisanih čestica. Transmisijski i skenirajući elektronski mikroskopi za stvaranje slike objekta su slični po tome što oba koriste snop elektrona.

Transmisioni elektronski mikroskop (TEM) koristi propuštene elektrone za dobijanje informacije unutar samog uzorka. Koristi se za ispitivanje morfologije, rasporeda kristala unutar uzorka, njihove orijentacije i stepena uredjenosti. Kao što samo ime govori, TEM sliku oblikuje pomoću elektrona koji se odašilju kroz preparat. SEM, pak, skenira površinu preparata te sliku oblikuje otkrivajući elektrone koji se odbijaju od spoljne površine preparata.

Uzorci za ispitivanje TEM analizom su pripremljeni ultrazvučnim dispergovanjem malih količina praha u etanolu i nanošenjem dobijene suspenzije na bakarnu mrežicu obloženu ugljenikom. Snimanja su vršena na JEM-2010F transmisionom elektronskom mikroskopu pri radnom naponu od 100 kV.

3.3.5. Elementalna analiza

Semikvantitativni sastav uzoraka (Ca, Ag, Cu, Zn, P) je određen EDS metodom (Energy Dispersive Spectrometry). Uređaj za analizu radi u sklopu skenirajućeg elektronskog mikroskopa. Analiza se zasniva na karakterističnim X-zracima emitovanih iz atoma hemijskog elementa koji se nalazi u uzorku. U toku bombardovanja uzorka elektronskim snopom iz SEM-a pojedini elektroni površinskih atoma bivaju izbačeni. Elektroni iz spoljnje ljuske, sa višom energijom, popunjavaju nastalu vakanciju, a višak energije se emituje u obliku X-zraka. Ispitivanja naših uzoraka ovom metodom su izvršena pomoću uređaja Oxford Instruments QX-2000.

Kvantitativna elementalna analiza (Ca, Ag, Cu, Zn, P) uzoraka je rađena metodom atomske emisije spektrometrije sa induktivno spregnutom plazmom, pomoću

uređaja ICP spektrometar Spectro Flame (Spectro Analytical Instruments, Nemačka). Odgovarajuća količina uzorka se rastvori u 1 M HNO₃ (p.a. Merck) do tačne zapremine, tako da koncentracija elementa za ispitivanje iznosi oko 3 ppm. Korišćena je metoda standardnog dodatka, da bi se otklonili razni činioci koji bi mogli uticati na tačnost merenja. Za određivanje elemenata korišćene su sledeće talasne dužine: Ca – 393,4 nm i 422,7 nm, Ag – 328,1 nm, Cu – 324,8 nm, Zn – 213,9 nm i P – 253,565 nm.

3.3.6. Ispitivanje desorpcije jona metala

Desorpcija jona metala (Ag, Cu i Zn) iz uzoraka je ispitivana u fosfatnom puferском rastvoru na fiziološkoj pH 7,2. Odmerene količine od 1,0000 g apatita u PVC posudi zapremine 50 mL uravnotežavane su na horizontalnom šejkeru sa po 20,00 mL rastvora pufera. U vremenskim intervalima 1, 2 i 4 sata, suspenzije su ceđene kroz filter papir. Desorbovane količine jona metala (Ag; Cu; Zn) u rastvoru su određene metodom ICP.

3.4. Analiza antimikrobnih svojstva hidroksiapatita

Ispitivanje antimikrobnih svojstava uzoraka hidroksiapatita su vršena primenom kvalitativnih i kvantitativnih testova. Primenjeni su kvalitativni test - difuzije na agarnoj ploči i kvantitativni test - određivanje procenta redukcije broja mikroorganizama u tečnom medijumu tokom izlaganja uzorcima hidroksiapatita [201].

Za pripremu inokuluma mikroorganizama i za određivanje broja preživelih mikroorganizama, korišćena je podloga Trypton soja, bujon i agar, obogaćena ekstraktom kvasca (0,6%). Podloga je pripremana prema preporukama proizvođača (Torlak, Beograd), rastvaranjem određene količine suve podloge u destilovanoj vodi i dodavanjem agar-agara za solidifikaciju podloge. Sterilizacija podloga je vršena u autoklavu (Sutjeska, Srbija) na 120°C i pri pritisku od 1,5 bar, u vremenu od 30 min.

Inokulum je pripreman zasejavanjem pojedinačnih kultura u tečnu podlogu i inkubacijom u termostatu na 37°C u vremenu od 16-18 h. Ovakva priprema inokuluma pojedinačnih kultura mikroorganizama, iz eksponencijalne faze rasta, je korišćena za svaku seriju eksperimenata.

Test difuzije na agarnoj ploči je izvođen zasejavanjem indikatorskih mikroorganizama (0,2 mL iz razblaženja 10²) u tripton soja – soft agar (6 mL) kojim je

prelivana prethodno pripremljena agarna podloga u Petri kutiji ($\phi 9$ cm). Nakon solidifikacije soft agara, na površinu su nanošeni tabletirani uzorci hidroksiapatita ($\sim 0,1$ g). Petri kutije se inkubiraju preko noći (18-24 h) u termostatu na 37°C . Nakon inkubacije posmatrano je pojavljivanje zone inhibicije rasta (bistre zone) oko tabletiranih uzoraka. Rezultati su izražavani kao prečnik zone inhibicije (u mm).

Odredjivanje procenta redukcije živih ćelija mikroorganizama je vršeno u sterilnom fosfatnom puferu (pH 7,2) inokulisanom sa 0,1 mL inokuluma pojedinačnih indikatorskih kultura. 0,1 g uzorka hidroksiapatita je dodato u epruvete koje su zatim inkubirane u vodenom kupatilu tresilice, na 37°C . Nakon 1, 2 i 4 h inkubacije, alikvoti od 1 ml zapremine su uzeti za odredjivanje broja živih ćelija mikroorganizama. Odredjivanje broja preživelih mikroorganizama u epruvetama sa uzorcima hidroksiapatita je vršeno pripremom serije razblaženja u fiziološkom rastvoru (1:10, 1:100, 1:1000 i dalje) i prenošenjem alikvota od 1 mL iz određenog razblaženja 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 izračunavan na osnovu sledeće formule:

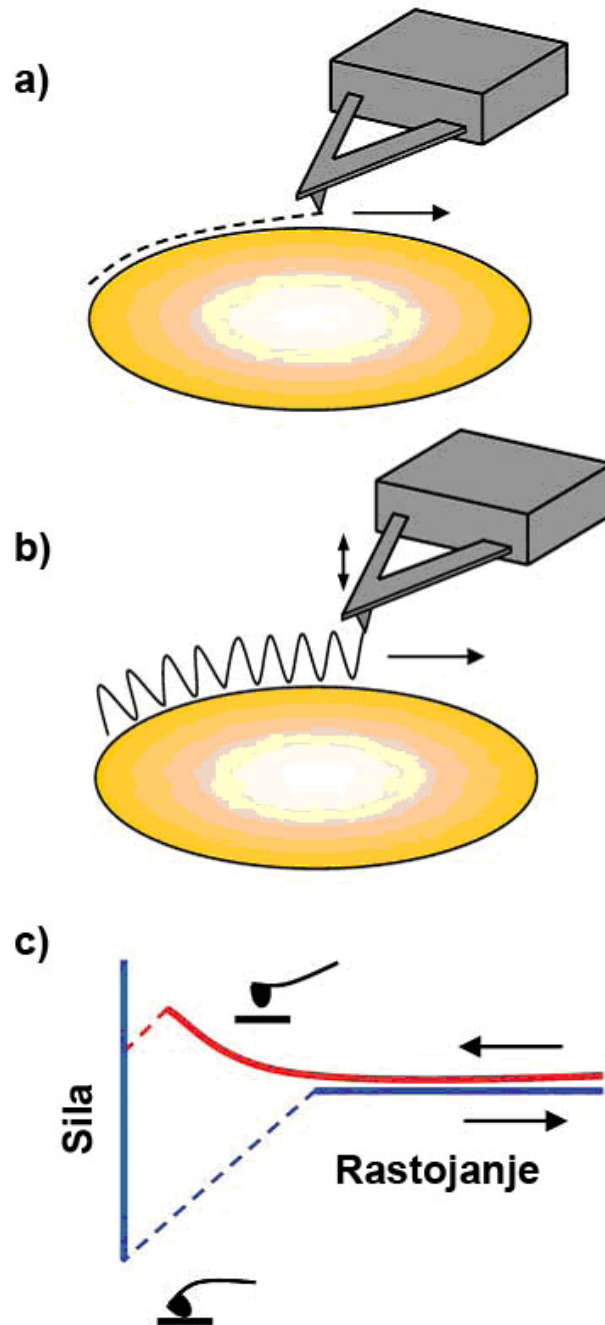
$$R = \frac{C_0 - C}{C_0} \quad (3.1)$$

gde je: C_0 – broj kolonija mikroorganizama izraslih posle kontakta sa kontrolnim uzorkom (hidroksiapatit bez dopantnih metala), a C - broj kolonija mikroorganizama izraslih posle kontakta sa uzorcima hidroksiapatita.

3.5. AFM analiza

Princip rada AFM mikroskopa (eng. Atomic-force microscopy) se zasniva na merenju sile između ispitivane površine i igle (tip) mikroskopa. Merna sonda je gredica mikroskopskih dimenzija sa oštrim vrhom koja klizi po površini uzorka, a njeno savijanje se meri optički (koristeći laser, interferometrija) ili električki (piezoelektrične metode kad je gredica sačinjena od piezoelektrika kao što je na primer kvarc). Gredica ima određenu rezonantnu frekvenciju oscilovanja (50-150 kHz). Promena frekvencije oscilovanja gredice je srazmerna sili koja deluje između vrha igle i uzorka; ove informacije se koriste za rekonstrukciju slike površine.

Postoje tri vrste načina snimanja površine uzorka: kontaktni, nekontaktni i režim kuckanjem - Tapping Mode (Sl. 3.1.). U kontaktnom režimu vrh igle je uvek u kontaktu sa površinom uzorka, a njena topografija se dobija kao rezultat praćenja promene frekvencije oscilovanja gredice. Kod nekontaktnog režima, vrh igle nije u kontaktu sa površinom uzorka, već se nalazi 50-150 Å iznad nje. Van der Valsove sile deluju između uzorka i vrha igle, one su slabije u odnosu na sile kod kontaktnog načina snimanja. Topografija površine se dobija kao rezultat promene amplitude, faze, odnosno frekvencije oscilovanja gredice. U režimu kuckanja, vrh igle je povremeno u kontaktu sa površinom uzorka. Topografija uzorka se dobija od promene amplitude vibracija ili faza oscilovanja gredice. AFM je korišćen za analizu morfoloških promena na ćelijama: *E. coli*, *S. aureus* and *C. albicans*; nastalih dejstvom čestica čistog hidroksiapatita ili AgHAP3. Rastvor sterilnog kalijum hidrogenfosfatnog puferskog rastvora (0,99 mL) je inokulisano sa 0,01 mL inokuluma mikroorganizma. Ćelije su sakupljene centrifugiranjem (10000 obr/min, 5 min) i resuspendovane u fosfatnom puferu do 1 mL. Zatim, 0,01 g uzorka HAP-a ili AgHAP3 je dodato u epruvetu. Uzorci su zatim inkubirani 15 minuta u vodenom kupatilu tresilice, na 37°C. Nakon inkubacije, mala količina alkivota od uzorka je naneta na mikroskopsku pločicu. Pripremljene pločice se ostave u sterilnoj Petri šolji da se osuše na sobnoj temperaturi do snimanja AFM-om. Površinska morfologija ćelija mikroorganizama nakon tretmana sa prahom sintetisanih uzoraka je posmatrana pomoću mikroskopa atomskih sila (AFM). AFM karakterizacija je izvršena sa AutoProbe CP-Research SPM (TM Microscopes-Veeco) upotrebom skenera sa rasponom od 90 μm. Snimanja su vršena u vazduhu u bezkontaktnom AFM režimu. Nominalna sila tokom skeniranja iznosila je 40 Nm⁻¹, dok je rezonantna frekvencija bila u oblasti (200-400) kHz. AFM slike su proizvedene i analizirane pomoću dva softverska paketa: Image Processing and Data Analysis Version 2.1.15 i SPM Lab Analysis software, VEECO DI SPMLab NT Ver. 6.0.2.



Slika 3.1. Principi rada AFM mikroskopa: a) kontakti; b) kuckanjem i c) nekontakti način [202].

3.6. Test biokompatibilnosti

Biokompatibilnost sintetisanih materijala je ispitana testom hemotoksičnosti opisanom u literaturi [203, 204]. Kao materijal u ispitivanju korišćena je sveža krv izvađena iz zdravog čoveka. Starost i pol čoveka nije bila registrovana.

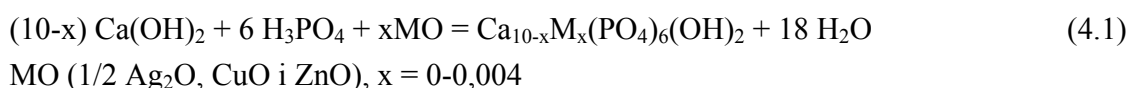
U po dve epruvete odmereno je po 0,1 g svakog od ispitivanih uzoraka hidroksiapatita i epruvete su dopunjene sa po 10 mL fiziološkog rastvora (Hemofarm, Srbija). 8 mL krvi se razblaži sa 10 mL fiziološkog rastvora. Po 0,2 mL razblažene krvi se doda u epruvete sa uzorcima koje su prethodno bile uravnotežene u fiziološkom rastvoru u toku 30 min na 37°C. Sve pripremljene epruvete su termostatirane 60 min u vodenom kupatilu tresilice na 37°C. Epruvete nakon termostatiranja su centrifugirane 10 min na 700 g. Nakon toga je određivana absorbanca supernatantne tečnosti u svakoj epruveti na 545 nm, korišćenjem Ultrospec 3300 (Amersham Bioscience) UV/VIS spektrofotometra. Fiziološki rastvor i destilovana voda su korišćeni kao negativna i pozitivna kontrola. Brzina hemolize je izračunata na osnovu sledeće formule:

$$HR = \frac{D_t - D_{nc}}{D_{pc} - D_{nc}} \quad (3.2)$$

gde je: D_t - absorbanca uzorka, D_{nc} - absorbanca negativne kontrole i D_{pc} - absorbanca pozitivne kontrole.

4. Rezultati i diskusija

U ovom radu je korišćena metoda neutralizacije za sintezu čistog hidroksiapatita i tri serije uzoraka prahova na bazi kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima: Ag(I), Cu(II) ili Zn(II), u različitim koncentracijama. Sinteze se mogu uprošćeno prikazati hemijskom reakcijom:



Neutralizaciona metoda je izabrana u odnosu na druge metode zbog ekonomičnosti i mogućnosti dobijanja čistog proizvoda u visokom prinosu. Takođe, regulisanjem fizičko-hemijskih parametara sinteze može se direktno uticati na svojstva hidroksiapatitnih prahova: veličinu, stepen kristaliniteta čestica i homogenost uzorka.

Radi dobijanja homogenog proizvoda, prvo je oksid dopanta (Ag₂O, CuO ili ZnO) rastvoren u H₃PO₄, a zatim rastvor polako ukapavan u suspenziju Ca(OH)₂. Kako je ranije nađeno [91], sporo dodavanje rastvora fosforne kiseline u suspenziju Ca(OH)₂, vodi ka formiranju čistog i homogenog proizvoda. Izbor temperature, vreme starenja suspenzije, su od velikog značaja za sintezu hidroksiapatitnih prahova metodom neutralizacije. Temperature od 95°C prilikom ukapavanja rastvora H₃PO₄ u suspenziju Ca(OH)₂ i od 25°C prilikom starenja suspenzije, kao i vreme starenja od oko 20 sati, su izabrani radi dobijanja dobro kristalisanog i stehiometrijskog proizvoda. Takođe, sinteze su izvodene u inertnoj atmosferi, u struji N₂, kako bi se u što većoj meri sprečio kontakt reakcione suspenzije sa ugljen-dioksidom iz vazduha i njegovu ugradnju u kristalnu rešetku hidroksiapatita.

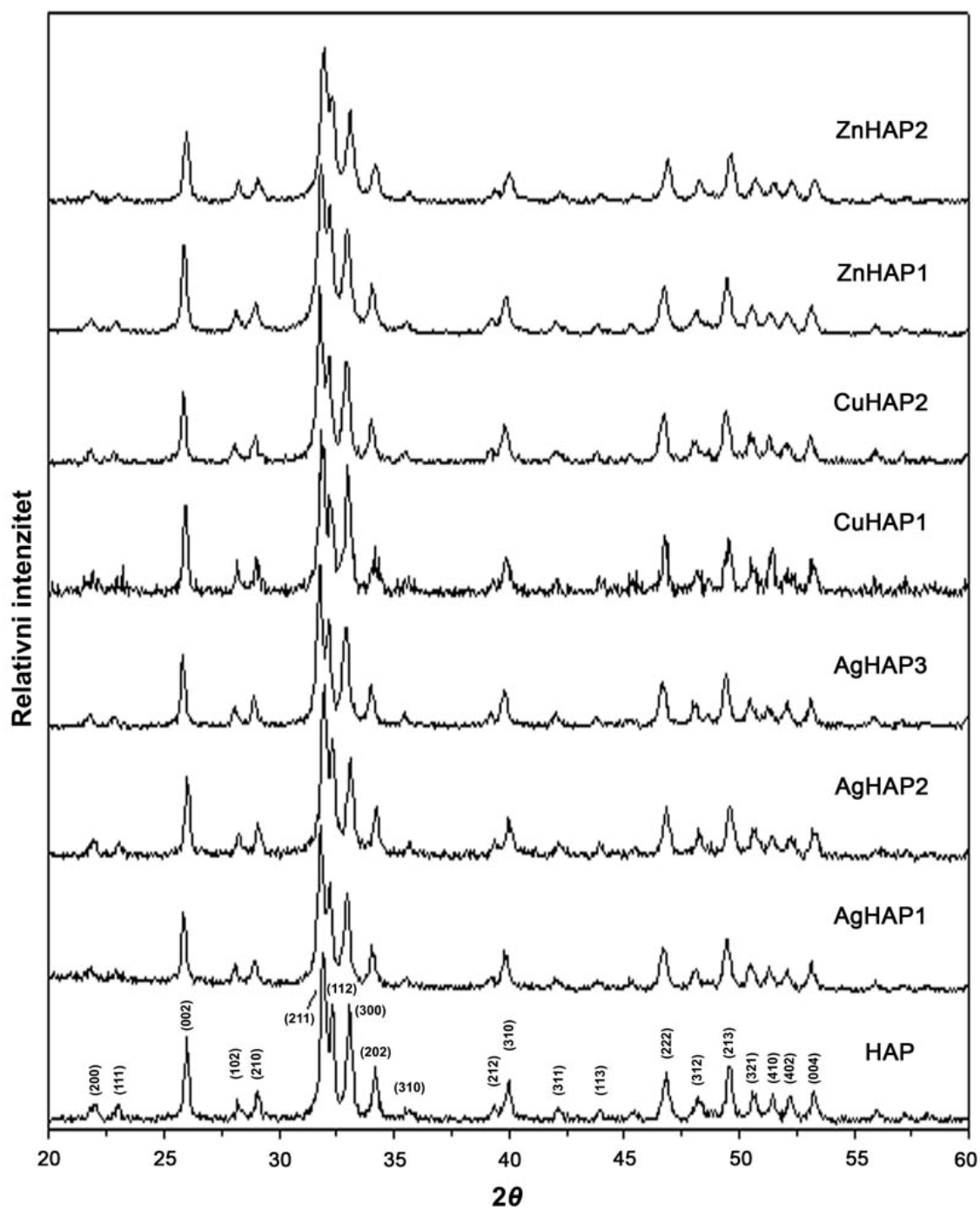
4.1. Rendgenostruktorna analiza sintetisanih uzoraka

Kvalitativna metoda rendgenske difrakcije (XRD) je prvenstveno rađena zbog identifikacije prisutnih kristalnih faza u sintetisanim uzorcima. Zatim je izvršena njihova delimična karakterizacija, određeni su parametri jedinične ćelije (a , b i c), stepen kristaliniteta i udeo kristalne faze.

Difraktogrami sintetisanih uzoraka su dati uporedo na Slici 4.1. Na osnovu položaja pikova svi uzorci poseduju heksogonalnu strukturu, prostorne grupe $P6_3/m$, koja odgovara strukturi kalcijum hidroksiapatita i u saglasnosti je sa podacima kartice ASTM 9-432. Prikazani difraktogrami su međusobno veoma slični, poseduju oštre, izražene i pretežno razmaknute pikove, što ukazuje da su sintetisani uzorci visoko kristalini. Takođe, u difraktogramima nisu indetifikovani pikovi koji potiču od drugih metal-fosfatnih faza ili neizreagovanog kalcijum oksida. Iz literaturnih podataka, joni srebra do 4%, joni bakra do 10% i joni cinka do 15% mogu supstituisati jone kalcijuma u hidroksiapatitu bez stvaranja sekundarnih faza [143, 147, 205]. U sintetisanim uzorcima dopantni joni: Ag(I), Cu(II) i Zn(II) su prisutni u veoma malom procentu i ne utiču na fazni sastav, na osnovu toga može se pretpostaviti da su sintetisani uzorci monofazni.

Korišćenjem programa Fullprof, odnosno njegovog podprograma Le Bail fit, izračunati su parametri jediničnih ćelija uzoraka. Vrednosti parametra kristalne rešetke čistog HAP-a i uzoraka dopiranih jonima metala su dati u Tablici 4.1.

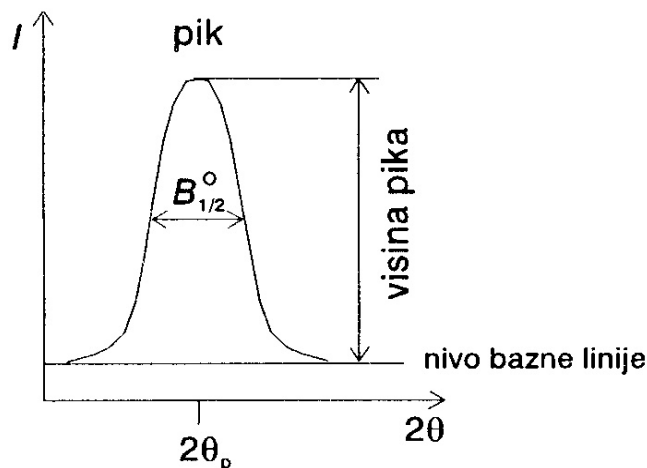
Sa difraktograma uzorka se može pretpostaviti veličina kristalita i udeo kristalne faze u česticama. Što je stepen kristaliniteta viši, maksimumi na dijagramu praha će biti uži. Zbog toga se širine maksimuma mogu koristiti za određivanje stepena kristaliniteta, odnosno dimenzija kristalnih regiona u kojima struktura nije bitno narušena. Na širinu linije utiču brojni strukturni i instrumentalni faktori. Širina difrakcione linije obično se meri na poluvisini maksimuma i tada se naziva širina na poluvisini (FWHM – The Full Width at Half Maximum) kao na Slici 4.2.



Slika 4.1 XRD difraktogrami sintetisanih uzoraka kalcijum hidroksiapatita sa različitim sadržajem dopatnih metala.

Tablica 4.1 Srednje vrednosti parametara jediničnih ćelija ($a = b, c$), veličine kristalita i stepeni kristaliničnosti sintetisanih uzorka hidroksiapatita

Uzorak	Parametar a (Å)	Parametar c (Å)	Zapremina jedinične ćelije (Å ³)	Veličina kristalita		χ_c
				L_{002}	L_{300}	
HAP	9,4261	6,8971	1592,0978	42	32	0,86
Ag-HAP1	9,4273	6,8976	1593,8447	36	30	0,74
Ag-HAP2	9,4299	6,8982	1594,8627	37	28	0,72
Ag-HAP3	9,4331	6, 8993	1596,1998	37	30	0,79
Cu-HAP1	9,4249	6,8957	1591,3694	40	28	0,80
Cu-HAP2	9,4218	6,8954	1590,2535	39	28	0,77
Zn-HAP1	9,4244	6,8970	1591,5006	34	24	0,68
Zn-HAP2	9,4330	6,8765	1589,6674	34	26	0,68



Slika 4.2 Širina na poluvisini difrakcione linije.

Srednja veličina kristalita kod uzorka izračunata je na osnovu *Scherrer*-ove formule, sa difraktograma predstavljenog na Slici 4.1, uz pretpostavku da su kristalna zrna cilindričnog oblika.

$$t = \frac{0,95 \lambda}{\beta_{1/2} \cos \theta} \quad (4.2)$$

gde su: λ - talasna dužina Cu $K\alpha_1$ zračenja, θ - ugao difrakcije i $\beta_{1/2} = \sqrt{B^2 - b^2}$, B je F.W.H.M. – potpuna širina na polovini visine odgovarajućeg pika i b je faktor ugaone korelacije. Za određivanje srednje veličine kristalita korišćene su difrakcioni maskimumi koji odgovaraju refleksiji sa (002) i (300) ravni (L_{002} , L_{300}). Veličina L_{002} odgovara dimenzijama kristalita duž c-ose (dužina kristalita), a L_{300} dimenzijama duž a-kristalografske ose (širina kristalita). Podaci za veličinu kristalita dobijenih uzoraka prikazani su u Tablici 4.1.

Prema E. Landi-ju i sar. [206] udeo kristalne faze (X_c) u sintetisanim uzorcima, može se odrediti korišćenjem sledeće jednačine:

$$X_c \approx 1 - \frac{V_{112/300}}{I_{300}} \quad (4.3)$$

gde su: I_{300} - intenzitet difrakcionog pika (300), a $V_{112/300}$ predstavlja rastojanje između vrha difrakcionog pika (112) i podnožja pika (300), izraženo u jedinicama intenziteta,

koje je kod slabo kristalnih uzoraka blisko nuli. Iračunate vrednosti frakcija kristalne faze (X_c) u uzorcima hidroksiapatita su dati u [Tablici 4.1](#).

Sintetisani HAP ima nešto veće vrednosti parametra rešetke a i c u odnosu na standardni hidroksiapatit ($a = 0,9418$ nm i $c = 0,6884$ nm prema ASTM kartici 9-432) ([Tablica 4.1](#)). Povećanje vrednosti parametara rešetke su posledica načina pripreme uzoraka, nestehiometrijskog sastava i prisustva raznih primesa. Naime, razni joni prisutni u polaznim hemikalijama, zatim molekuli vode i karbonatni joni mogu uticati na vrednosti parametara kristalne rešetke. Prosečna vrednost veličine kristalita duž c -ose ima vrednost $L_{002} = 42$ nm dok vrednost veličine kristalita u pravcu a -ose L_{300} iznosi 32 nm. Na osnovu dobijenih vrednosti može se reći da su čestice sintetisanog hidroksiapatita cilindričnog oblika. Ovaj rezultat je kasnije potvrđen i mikroskopskom analizom.

Sa rendgenograma prikazanih na [Slici 4.1](#) se vidi da povećanje sadržaja srebra u uzorcima AgHAP-a, izaziva sistematsko pomeranje maksimuma refleksija prema manjim vrednostima uglovima 2θ ([Slika 4.1](#)). Ova pomeranja su verovatno posledica supstitucije jona kalcijuma sa znatno većim jonima srebra ([Tabl. 4.2](#)). Takođe, analizom podataka prikazanih u okviru [Tablici 4.1](#) zapaža se linearni porast parametara kristalne rešetke sa povećanjem sadržaja srebra. Rezultati su u skladu sa prethodnim izveštajem Rameshbabu i sar. [143], gde je pretpostavljeno da joni srebra supstituišu jone kalcijuma u kristalnoj rešetki. Takođe, postoji mogućnost da joni srebra potpuno ili delimično zauzimaju druge kristalografske položaje, što za posledicu ima porast parametra kristalne rešetke. Supstitucijom dvovalentnih jona kalcijuma sa monovalentnim jonima srebra u hidroksiapatitnoj kristalnoj rešetki nastaje razlika u naelektrisanju koja se može neutralisati stvaranjem dodatnih vakancija ili može doći do simultane supstitucije PO_4^{3-} sa dvovalentnim CO_3^{2-} anjonom.

Prema rezultatima datim u [Tablici 4.1](#), može se uočiti da svi uzorci AgHAP-a imaju manje prosečne veličina kristalita i nižu kristaliničnost nego čist hidroksiapatit. Smanjenje je očekivano usled inkorporacije jona Ag^+ na mesto Ca^{2+} unutar kristalne rešetke, imajući u vidu razliku u jonskim prečnicima srebra i kalcijuma ([Tablica 4.2](#)). Uzorak AgHAP3 ima nešto veću vrednost stepena kristaliničnosti, verovatno kao posledica malih odstupanja uslova sinteze ili različite količine ugrađenih karbonatnih anjona.

Kod uzoraka hidroksiapatita dopiranih jonima Cu^{2+} može se videti smanjenje vrednosti parametara rešetke a i c sa porastom koncentracije dopanta ([Tablica 4.1](#)). Dopiranjem se joni Cu^{2+} supstitucionalno ugrađuju u rešetku HAP-a, deformišući kristalnu strukturu, što dovodi do promene dimenzija elementarne ćelije, tj. smanjenja međuatomskih rastojanja.

Ove deformacije prouzrokovane su razlikom prečnika jona bakra i kalcijuma (Tablica 4.2). Ova diskusija je u saglasnosti sa literaturnim podacima. Naime, Misono i Hall [148] su pretpostavili na osnovu EPR (eng. Electron paramagnetic resonance) spektara da joni bakra supstituišu jone kalcijuma u oba kristalografska položaja: Ca(1) i Ca(2). Prosečne veličine kristalita koje su procenjene primenom Scherrer-ove formule su niže od vrednosti za uzorak čistog hidroksiapatita (Tablica 4.1). Iz dobijenih rezultata se može zaključiti da povećanje sadržaja bakra u uzorcima dovodi do konstantnog smanjenja dimenzija kristalita i stepena kristaliniteta prahova.

Tablica 4.2 Jonski radijusi metala (M).

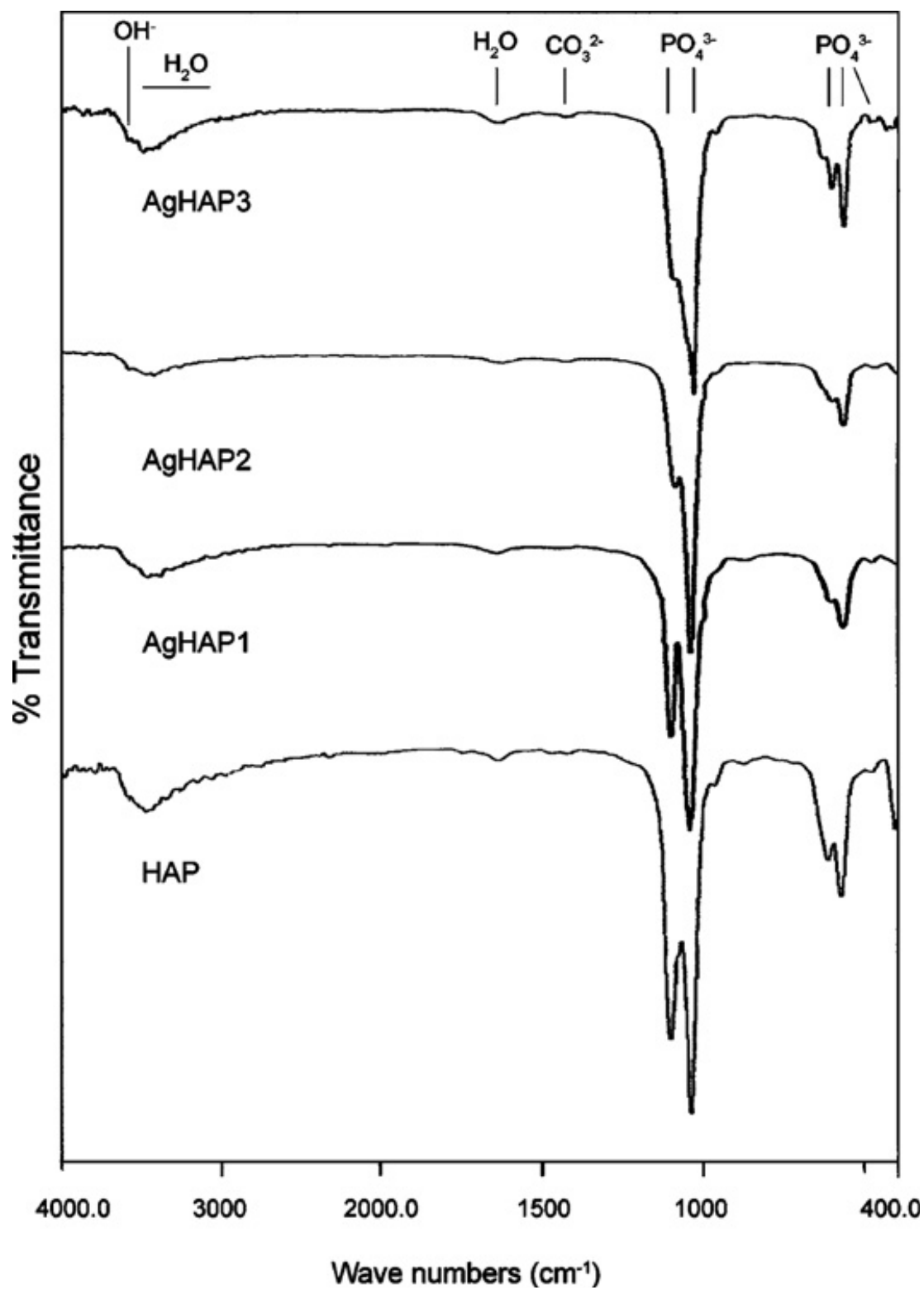
M	Jonski radijus (nm)
Ca(II)	0,099
Ag(I)	0,128
Cu(II)	0,073
Zn(II)	0,074

Sa difraktograma datih na Slici 4.1 se vidi da sa porastom koncentracije dopanta u ZnHAP uzorcima, pikovi postaju širi i pomeraju prema većim vrednostima 2θ . Parametri jedinične ćelije a i c u uzorcima dopirani jonima cinka u odnosu na HAP opadaju sa povećanjem količine dopanta, izuzev parametra a za uzorak ZnHAP2 (Tablica 4.1). Opadanje parametara kristalne rešetke je posledica supstitucije jona kalcijuma sa jonima cinka koji su manjeg prečnika (Tablica 4.2). Veća vrednost parametra a u ZnHAP2 uzorku, najverovatnije je rezultat ugradnje veće količine molekula vode u apatitnu strukturu. Miyaji i sar. [146] su izvestili da u hidroksiapatitu dopiranom jonima cinka dolazi do povećanja parametra a odnosno smanjenja parametra b , usled delimične substitucije OH grupa sa molekulima vode u elementarnoj ćeliji. Takođe, na osnovu podataka datih u Tablici 4.1 se može zaključiti da joni cinka utiču na smanjenje dimenzija kristalita i stepena kristaliniteta prahova. Joni cinka imaju inhibitorški uticaj na nukleaciju i rast čestica hidroksiapatita, favorizujući stvaranje čestica sa manjim udelom kristalne faze [207, 208].

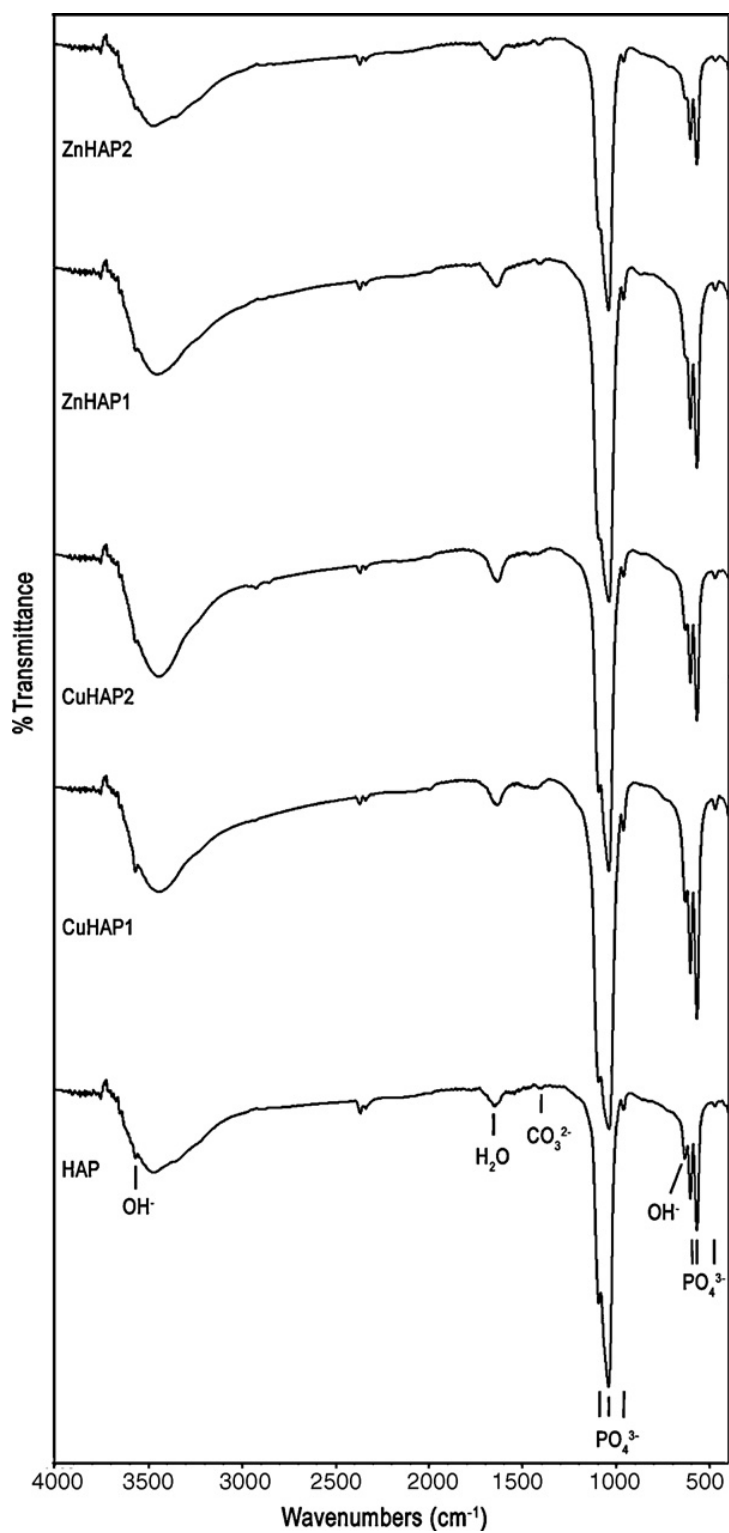
4.2. Infracrvena spektroskopska analiza sintetisanih uzoraka

Dalja analiza čestica dobijenih uzoraka vršena je pomoću infracrvene spektroskopije (FT-IR). Infracrvena spektroskopija se koristi u kvalitativnoj analizi za identifikaciju funkcionalnih grupa supstance, za strukturalna određivanja, a može i u kvantitativnoj analizi. Neorganska jedinjenja imaju relativno siromašan FT-IR spektar, njihova identifikacija se vrši na osnovu poređenja eksperimentalnog spektra nepoznatog jedinjenja sa spektrima poznatih jedinjenja iste klase ili na osnovu korelacionih tabela. Infracrvena spektroskopija ne spada u osetljive kvantitativne analize. Ona omogućava određivanje sadržaja primese iznad 1% [209]. Kvantitativna FT-IR analiza se svodi na merenju intenziteta odabranog apsorpcionog maksimuma jedinjenja tj. njegove visine, mada se tačniji rezultati dobijaju merenjem površine. Pored toga što služi za identifikaciju glavnih funkcionalnih grupa u uzorku, FT-IR analiza se često koristi za detekciju tragova nečistića.

Odgovarajući FT-IR spektri svih sintetisanih uzoraka dati su na [Slici 4.3](#) i [Slici 4.4](#). FT-IR spektri uzoraka hidroksiapatita dopiranih jonima metala su skoro identični sa spektrom čistog hidroksiapatita i mogu se uočiti zajedničke karakteristične apsorpcione trake koje potiču od adsorbovane vode, hidroksilne, fosfatne i karbonatne grupe. Apsorpcione trake karakteristične za PO_4^{3-} grupu nalaze se na oko 1092 cm^{-1} , 1040 cm^{-1} , 962 cm^{-1} , 601 cm^{-1} i 471 cm^{-1} [210]. Trake u intervalu od 1032 cm^{-1} do 1108 cm^{-1} uobičajeno najjače trake u spektru pripadaju ν_3 , a traka slabog intenziteta na 962 cm^{-1} odgovara ν_1 vibracijama PO_4^{3-} grupe. Traka slabog intenziteta na oko 470 cm^{-1} odgovara ν_2 (PO_4^{3-}) vibraciji. Trake u obliku dubleta koje se nalaze u oblasti od 568 cm^{-1} do 605 cm^{-1} pripadaju ν_4 (PO_4^{3-}) vibraciji. Traka slabog intenziteta na oko 1410 cm^{-1} odgovaraju ν_3 vibracijama CO_3^{2-} grupe. Položaj ove trake ukazuje na supstituciju PO_4^{3-} grupe apatita CO_3^{2-} grupama, odnosno na formiranje hidroksiapatita sa karbonatima (tip B) [152]. Na osnovu slabog intenziteta ovih traka, može se pretpostaviti da je količina karbonatnih jona veoma mala u svim uzorcima. Tokom sinteze moguća je apsorpcija atmosferskog CO_2 , što za posledicu ima ugrađivanje karbonatnog anjona u kristalnu rešetku hidroksiapatita. Na osnovu slabog intenziteta apsorpcionih traka karbonatne grupe u svim sintetisanim uzorcima hidroksiapatita, može se zaključiti da je veoma mala količina jona karbonata ugrađeno. Široke jake trake u opsegu od 2500 cm^{-1} do 3700 cm^{-1} pripadaju ν_3 i ν_1 i traka slabog intenziteta na oko 1642 cm^{-1} potiču od ν_2 vibracija adsorbovanih molekula vode [211]. Oštar pik ili prevoj na oko 3572 cm^{-1} odgovara ν_s , dok traka na 632 cm^{-1} odgovara ν_L vibracijama OH^- grupe [211].



Slika 4.3 FT-IR spektri sintetisanih uzoraka: HAP, AgHAP1, AgHAP2 i AgHAP3.



Slika 4.4 FT-IR spektri sintetisanih uzoraka: HAP, CuHAP1, CuHAP2, ZnHAP1 i ZnHAP2.

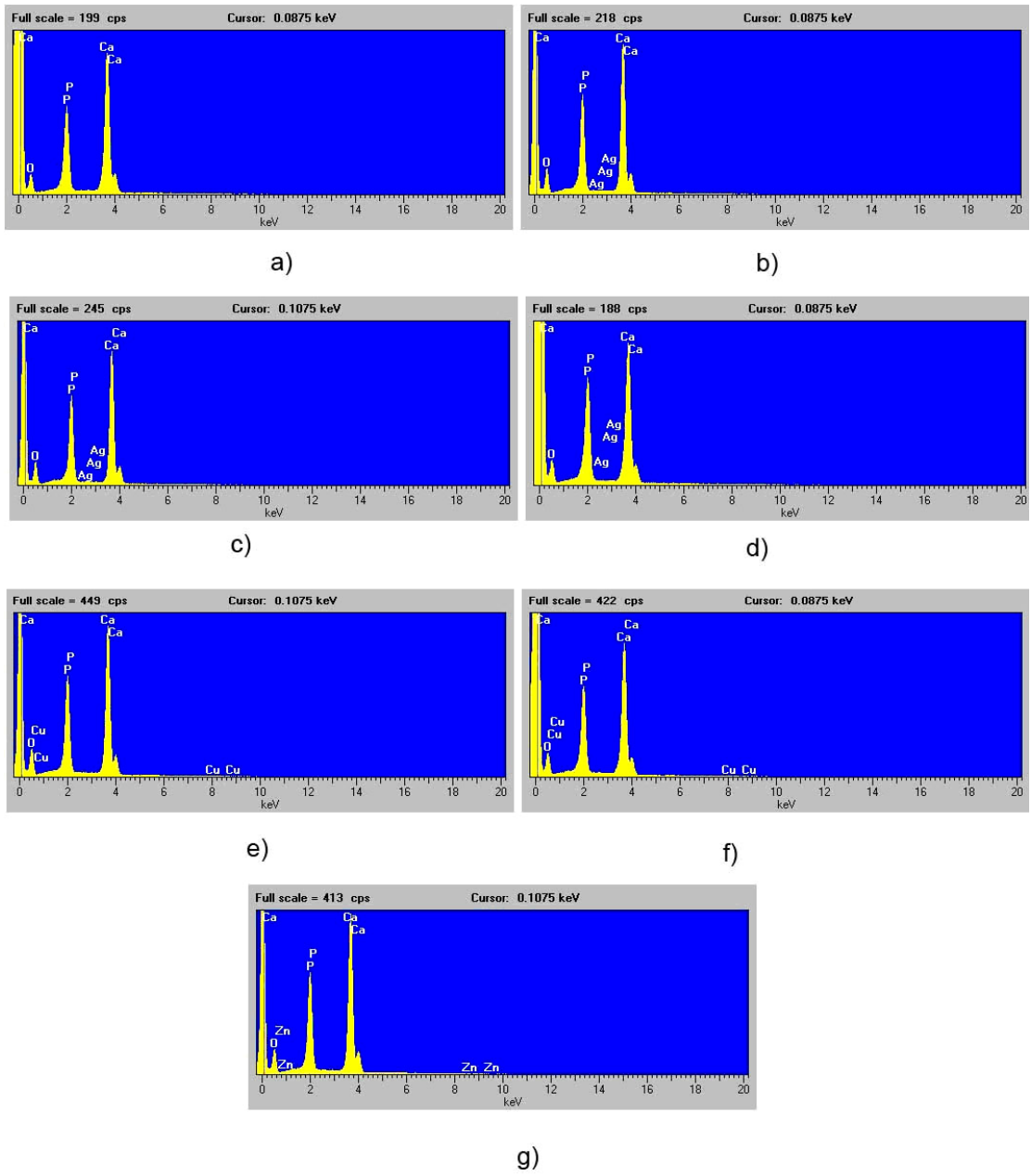
4.3. Elementalna analiza sintetisanih uzoraka

Spektri dobijeni kvalitativnom EDS analizom, potvrdili su uspešno dopiranje i čistoću svih sintetisanih uzoraka. Na Slici 4.5 su prikazani rezultati EDS analiza svih uzorka, osim ZnHAP1, gde se vidi prisustvo svih potrebnih elemenata, odnosno, kvalitativno se potvrđuje hemijski sastav.

Rezultati kvantitativne elementalne analize sintetisanih uzorka su dati u Tablici 4.3. Rezultati pokazuju da je molski odnos $[Ca + M]/[P]$, ($M = Ag, Cu$ ili Zn) uzorka nešto manji od stehiometrijskog. Stehiometrijski hidroksiapatiti imaju Ca/P odnos 1,67. Formiranje kalcijum-deficitarnih uzoraka HAP-a uobičajena je pojava kod sinteza mokrim postupkom. Rezultati kvantitativne elementalne analize su pokazali da je sadržaj dopanantnih metala u svim uzorcima nešto veći od unesenih količina. Ovo odstupanje se može povezati sa nestehiometrijskim odnosom proizvoda. Na osnovu dobijenih rezultata, može se zaključiti da su joni dopanta u potpunosti ugradili u kalcijum hidroksiapatit.

Tablica 4.3 Rezultati elementalne analize sintetisanih uzoraka.

Uzorak	(M/Ca) % (teorijski)	(M/Ca) % (nađeno)	(Ca + M)/P
HAP	0	0	1,65
Ag-HAP1	0,002	0,022	1,63
Ag-HAP2	0,040	0,043	1,61
Ag-HAP3	0,400	0,406	1,62
Cu-HAP1	0,040	0,042	1,65
Cu-HAP2	0,400	0,410	1,63
Zn-HAP1	0,040	0,043	1,63
Zn-HAP2	0,400	0,420	1,61



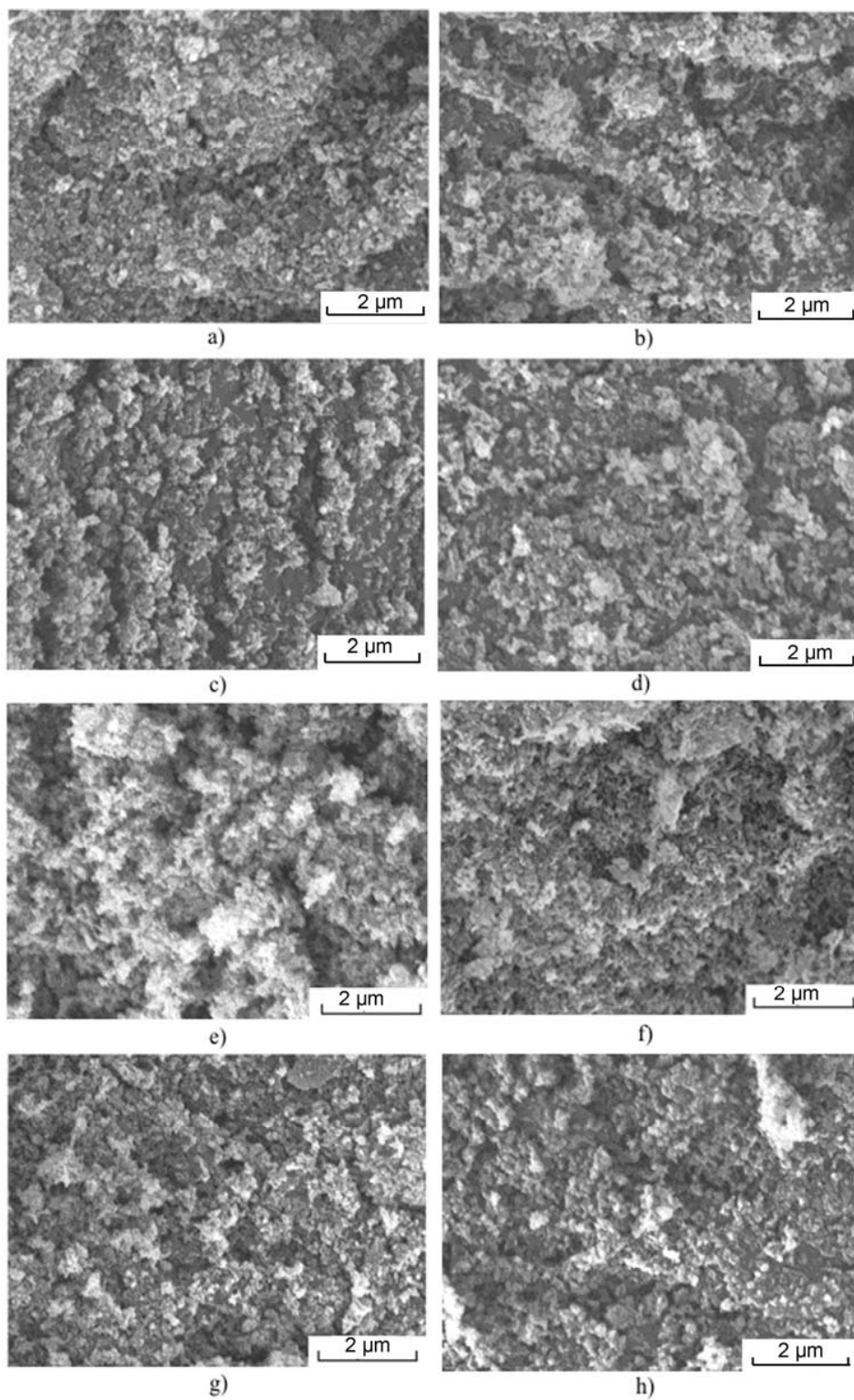
Slika 4.5 EDS fotografije elementarne analize sintetisanih uzoraka: a) HAP, b) AgHAP1, c) AgHAP2, d) AgHAP3, e) CuHAP1, f) CuHAP2 i g) ZnHAP2.

4.4. Morfologija čestica sintetisanih uzoraka

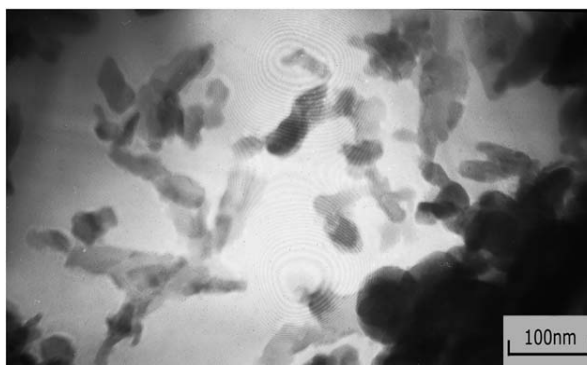
Morfologija čestica je važna karakteristika materijala, koja utiču na njihovu primenu. Nanočestice imaju bolju interakciju i adheziju sa ćelijama u odnosu na mikročestice i širi opseg bioloških primena zahvaljujući malim dimenzijama i fizičko-hemijskim karakteristikama. Nanočestični hidroksiapatit se pokazao efikasnijim u obnavljanju kosti od konvencionalnog [212, 213]. Sa druge strane, nanočestični antimikrobni materijali imaju jače antimikrobno dejstvo od većih čestica. Naime, nano čestice za razliku od krupnijih, imaju mnogo veću površinu u odnosu na njihov volumen. To znači da se na površini nano čestica nalazi veća količina aktivnih antimikrobnih jona.

Za prvu procenu morfoloških karakteristika sintetisanih uzoraka korišćen je skenirajući elektronski mikroskop (SEM). Mikrografije dobijenih uzoraka su prikazane na Slici 4.6. Na svim snimcima se može uočiti da prahovi pokazuju slične strukture, sastavljene od aglomerata, nepravilnog oblika, različitih veličina i hrapavih površina. Na osnovu izgleda aglomerata može se pretpostaviti da su izgrađeni od veoma sitnih primarnih čestica nanometarskih dimenzija.

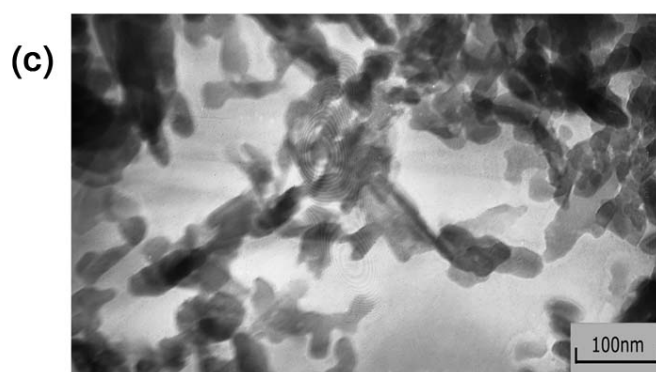
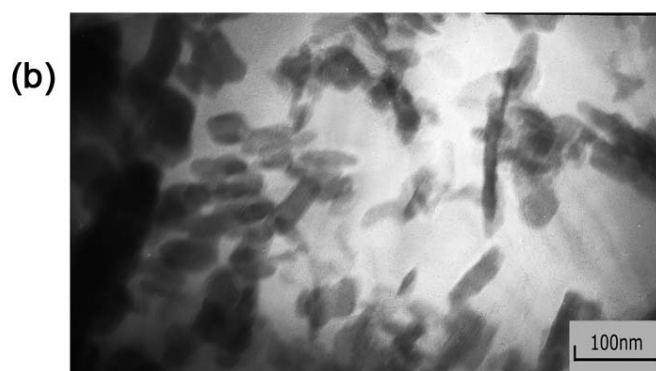
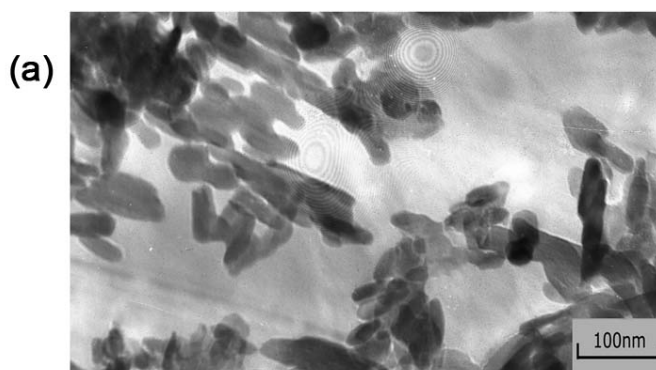
Detaljnija morfološka karakterizacija uzoraka na nanometarskom nivou izvršena je transmissionom elektronskom mikroskopijom. TEM mikrografije sintetisanih uzoraka su prikazane na Slikama: 4.7, 4.8, 4.9 i 4.10. Sa ovih mikrografija se može uočiti da su svi uzorci homogeni i da su u većem procentu prisutne nanometarske čestice, sličnih morfoloških karakteristika: nepravilnog cilindričnog oblika često izvijene i neujednačene veličine. Prosečna dužina čestica kod svih uzoraka iznosi oko 70 nm a širina oko 15-20 nm. Na svim snimcima mogu se videti postojanje u manjem broju kraćih čestica ipod 50 nm i dužih od 100 nm. Na osnovu ovih mikrografija se može zaključiti da porast količine dopanta ne utiče bitno na veličinu i morfologiju čestica. Poređenjem prosečne veličine čestica sa dimenzijama kristalita uzoraka izračunatim pomoću Scherer-ove jednačine (Tab. 4.3), može se zaključiti da su primarne čestice pretežno polikristalne. Čestice dužine oko 100 nm, su najverovatnije nastale kao posledica srastanja čestica prilikom njihovog rasta. Takođe, na TEM mikrografijama, mogu se videti aglomerati čestica, što je očekivano s obzirom da je korišćena metoda sinteze iz tečne faze.



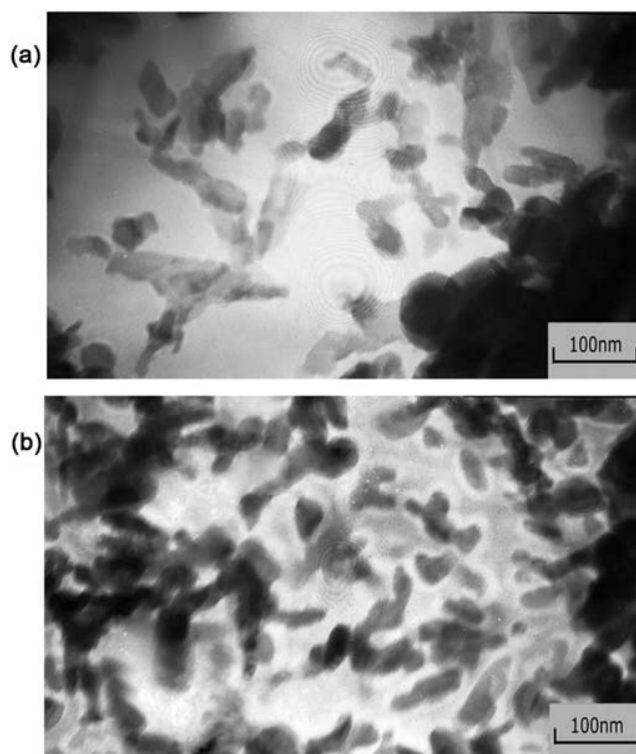
Slika 4.6 SEM mikrografije uzoraka: a) HAP; b) AgHAP1, c) AgHAP2, d) AgHAP3, e) CuHAP1, f) CuHAP2, g) ZnHAP1 i h) ZnHAP2.



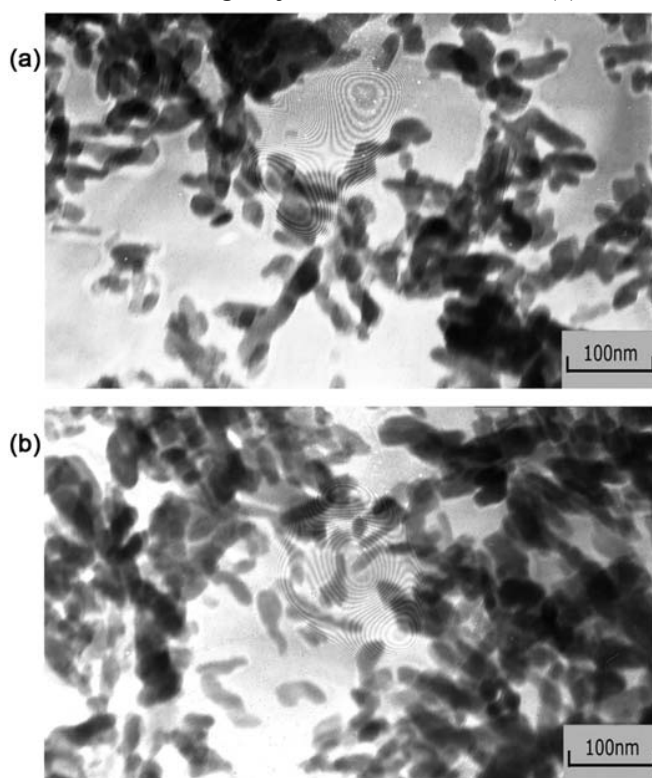
Slika 4.7 TEM mikrografija uzoraka hidroksiapatita HAP.



Slika 4.8 TEM mikrografije uzoraka: AgHAP1(a), AgHAP2 (b) i AgHAP3 (c).



Slika 4.9 TEM mikrografije uzoraka: CuHAP1 (a) i CuHAP2 (b).



Slika 4.10 TEM mikrografije uzoraka: ZnHAP1 (a) i ZnHAP2 (b).

4.5. Rezultati rastvorljivosti sintetisanih uzoraka

Studija rastvorljivosti antimikrobnih biomaterijala je neophodan korak u proceni podobnosti njihove upotrebe. Antimikrobni biomaterijali sa niskim stepenom rastvorljivosti poseduju dobru antimikrobnu aktivnost u dužem vremenskom periodu. Rastvorljivost hidroksiapatitnih materijala zavisi od brojnih faktora: hemijskog sastava, vrste i količine prisutnih primesa, Ca/P molskog odnosa, kristalnosti, specifične površine, veličine čestica i od sastava rastvora za ispitivanje rastvorljivosti. Ca-deficitarni hidroksiapatiti imaju veću rastvorljivost. Čestice sa većom specifičnom površinom i manjom veličinom imaju veću rastvorljivost dok sa većom kristalnošću imaju manju rastvorljivost [214]. Rastvorljivost hidroksiapatita zavisi od vrste prisutnog jona, dok porastom njegove količine efekat je izraženiji. Rastvorljivost karbonatnog hidroksiapatita raste sa povećanjem količine karbonata. Mayer i Featherstone [215] su ispitivali rastvorljivost sintetičkog hidroksiapatita sa različitim sadržajem karbonata sa i bez dodatih jona cinka. Uzorci karbonatnih hidroksiapatita dopirani jonima Zn(II) pokazali su manju rastvorljivost od uzoraka bez cinka. Hidroksiapatiti dopirani sa jonima Cu(II) pokazuju veću rastvorljivost [216].

Rastvorljivost uzoraka hidroksiapatita ispitana je u fosfatnom puferu na pH 7,4 u vremenskim intervalima 1, 2 i 4 sata radi korelacije sa kvantitativnim antimikrobnim testom. Analizirane su samo količine oslobođenih jona metala: Ag(I), Cu(II) i Zn(II). Rezultati testa su prikazani u Tablici 4.4.

Kod uzorka AgHAP3 detektovane su veoma male količine jona srebra u fosfatnom puferu nakon 2 i 4 sata inkubacije. Oslobođanje jona srebra je posledica veće količine jona srebra i distorzije kristalne rešetke HAP, takođe postoji mogućnost da je izvesna količina jona srebra nalazi u intersticijskom položaju. Količine oslobođenih jona Ag(I), Cu(II) i Zn(II) u ostalim uzorcima je bila ispod granica detekcije ICP. Na osnovu dobijenih rezultata se može zaključiti da inkorporacija jona srebra u hidroksiapatit vodi ka povećanju rastvorljivosti AgHAP uzoraka.

Tablica 4.4 Koncentracije oslobođenih jona: Ag(I), Cu(II) i Zn(II) (mgL^{-1}) u filtratu nakon 1, 2 i 4 sata inkubacije na 37°C .

Uzorak	Vreme (h)		
	1	2	4
AgHAP1	0	0	0
AgHAP2	0	0	0
AgHAP3	0	0,08	0,13
CuHAP1	0	0	0
CuHAP2	0	0	0
ZnHAP1	0	0	0
ZnHAP2	0	0	0

4.6. Antimikrobna aktivnost sintetisanih uzoraka

U razvoju novih biomaterijala na bazi hidroksiapatita za primenu u ortopedskoj hirurgiji i stomatologiji, posebna pažnja se posvećuje sprečavanju infekcija, koje mogu nastati nakon ugradnje implantata. Prema nekim studijama pojava infekcija se javlja kod <5% pacijenata i one mogu dovesti do odstranjenja implanta [164]. Većina infekcija nastaje u prvih pet godina od implantacije, mada su na svim implantima moguće doživotne infekcije. Mikroorganizmi koji izazivaju infekcije mogu kontaminirati reparirani deo kosti prilikom hirurške intervencije, naknadnom infekcijom rane, zatim širenjem zapaljenja iz okolnih tkiva i širenjem mikroorganizama putem krvi ili limfe iz udaljenog žarišta infekcije.

Stafilokoke su najčešći patogeni koji se dovode u vezu sa infekcijama implantata. Prema nekim studijama *Staphylococcus aureus* je glavni uzročnik u više od 30% postoperativnih infekcija [156, 217, 218]. *S. aureus* je Gram-pozitivna bakterija iz grupe stafilokoka. Njegova rastuća multi rezistentnost na beta-laktamske antibiotike, označena je kao rezistencija na meticilin (MRSA sojevi) kao i prema drugim antibioticima, otežava primenu antibiotika u sprečavanju i lečenju infekcija.

Escherichia coli je Gram-negativna bakterija, pripada rodu *Escherichia* i porodice Enterobacteriaceae. *E. coli* je oportunistički patogen koji uzrokuje bolest kod pacijenata čiji su odbrambeni mehanizmi oštećeni nekom druge bolesti, ili kod onih koji su lečeni zračenjem, ili antibiotskom terapijom, ili nekim drugim medikamentima. *E. coli* može uzrokovati zapaljenje kostiju (osteomijelitis) i dovesti do post-operativnih infekcija prilikom ugradnje koštanih implantata.

Postoperativne infekcije u ortopediji izazvane *Candida albicans* ili drugim vrstama gljivica su veoma retke [219, 220]. Osteomijelitis uzrokovan *C. albicans* se javlja kod bolesnika sa oslabljenim imunitetom, usled dugotrajne upotrebe antibiotika ili direktno traumatskom inokulacijom [221].

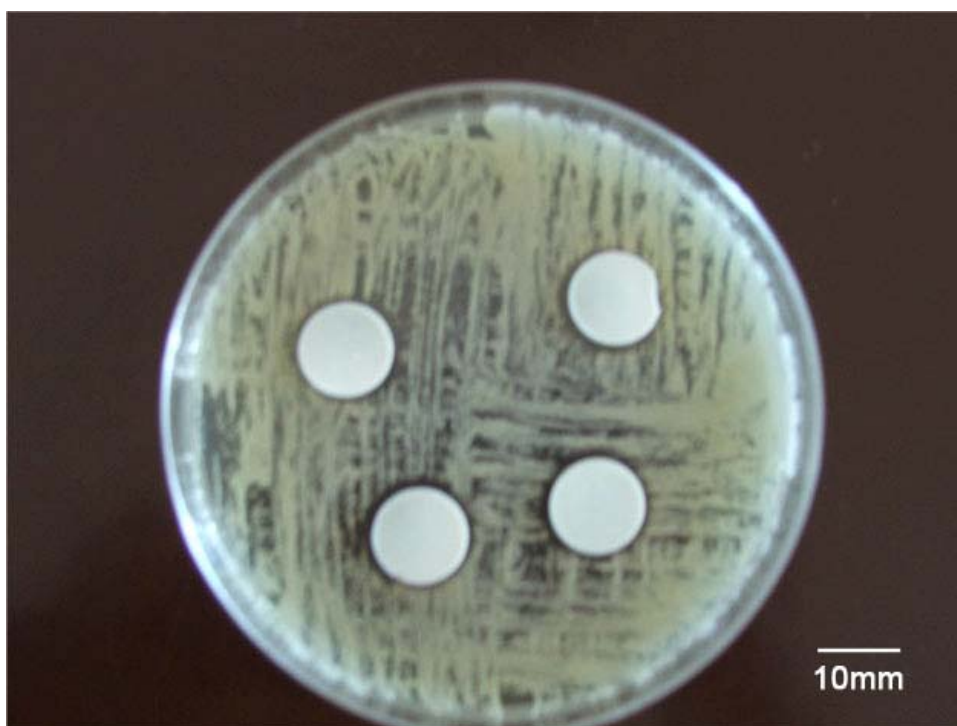
Pored navedenih mikroorganizama i brojni drugi uzročnici mogu izazvati infekcije implanta. Adhezija mikroorganizama na površinu hidroksiapatita predstavlja ključni, početni korak u infekciji. Da bi se sprečile infekcije, vrši se modifikacija implantacionih materijala odgovarajućim antimikrobnim agensima. Stoga je ispitivanje aktivnosti antimikrobnih materijala jedan od važnijih testova za njihovu biomedicinsku primenu.

Antimikrobna aktivnost sintetisanih uzoraka hidroksiapatita ispitana je na: *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, i *Candida albicans*, primenom kvalitativnog (disk-difuzionog) i kvantitativnog antimikrobnog testa.

Rezultati disk-difuzionog testa sintetisanih uzoraka na ispitivanim mikroorganizmima su prikazani u Tablici 4.5. Dobijeni rezultati pokazuju da AgHAP uzorci poseduju najjače antimikrobno dejstvo, koje je naročito izraženo prema bakteriji *E. coli*. AgHAP2 je pokazao antimikrobno dejstvo samo prema *E. coli*. Za uzorak AgHAP3 je zabeležena antimikrobna aktivnost prema svim ispitivanim sojevima mikroorganizama. Najveća širina zone inhibicije bila je za *E. coli*, dok je prema *S. aureus* i *C. albicans* bila znatno manja. Antimikrobna aktivnost AgHAP2 i AgHAP3 uzoraka je rezultat veće količine srebra i nastaje kontaktom ćelija mikroorganizma sa površinom uzorka i usled difuzije jona srebra u hranljivu podlogu. Slika 4.11 i Slika 4.14 ilustruju antimikrobno dejstvo AgHAP uzoraka prema ispitivanim mikroorganizmima.

Tablica 4.5 Antimikrobna aktivnost sintetisanih uzoraka.

Uzorak	Zona inhibicije (mm) rasta mikroorganizma		
	<i>E. coli</i>	<i>S. aureus</i>	<i>C. albicans</i>
HAP	0	0	0
AgHAP1	0	0	0
AgHAP2	1	0	0
AgHAP3	4	1	1
CuHAP1	0	0	0
CuHAP2	1	0	0,5
ZnHAP1	0	0	0
ZnHAP2	0	0	0



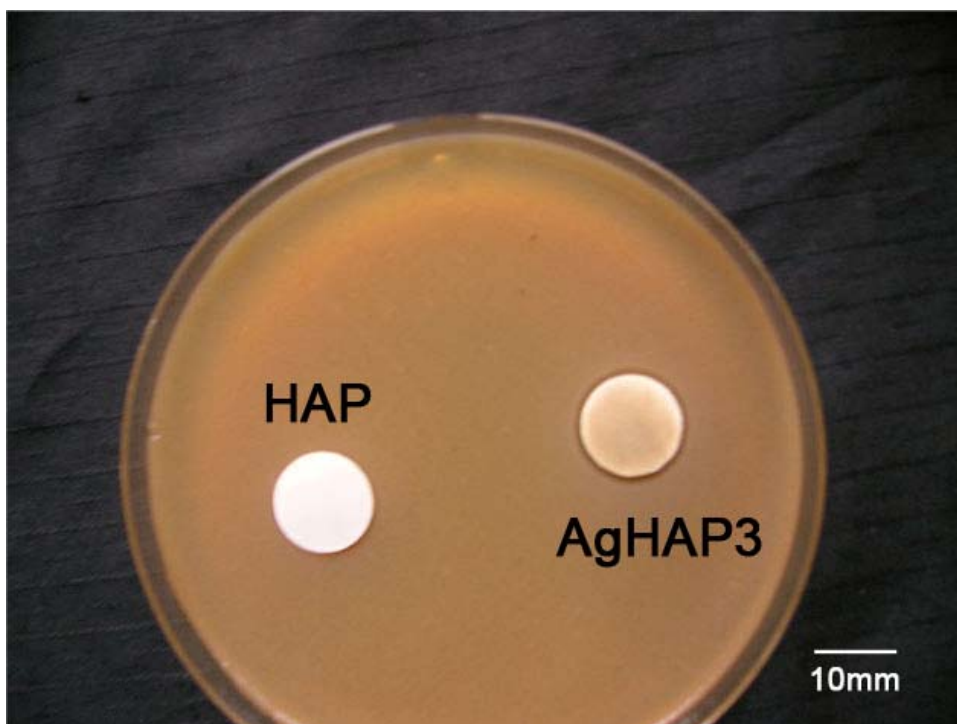
Slika 4.11 Antimikrobna aktivnost AgHAP2 uzorka u odnosu na *E. coli*.



Slika 4.12 Antimikrobna aktivnost AgHAP3 uzorka u odnosu na *E. coli*.



Slika 4.13 Antimikrobna aktivnost AgHAP3 uzorka u odnosu na *S. aureus*.



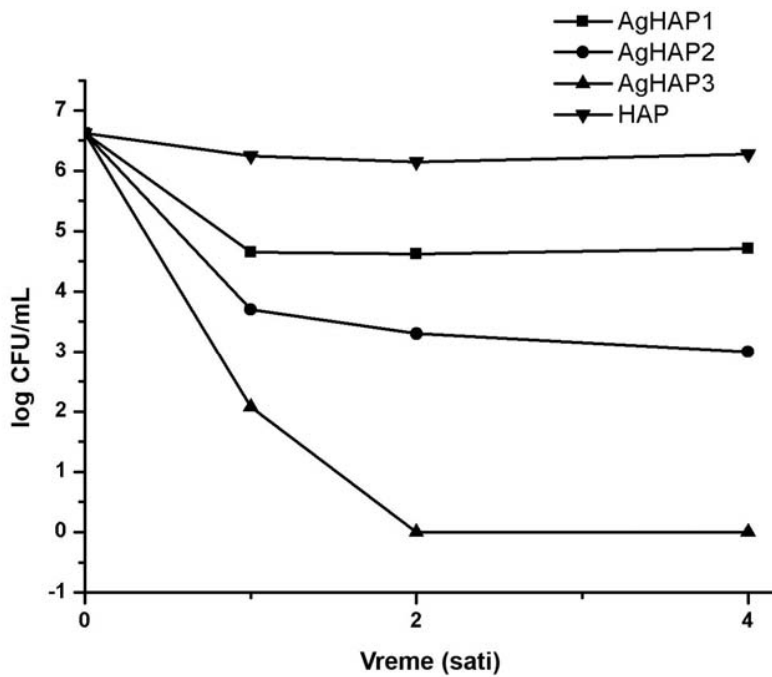
Slika 4.14 Antimikrobna aktivnost AgHAP3 uzorka u odnosu na *C. albicans*.

Disk-difuziona metoda se veoma često koristi u istraživanjima početne procene antimikrobnog dejstva materijala, međutim, pouzdanost testa zavisi od stepena difuzibiliteta hranljive podloge na prisutne sastojke u svakom ispitivanom materijalu. Metoda je kvalitativna i zbog toga za bolju procenu antimikrobnih osobina uzoraka korišćena je kvantitativna antimikrobna metoda. Ispitivanje antimikrobne aktivnosti uzoraka ovom metodom se zasniva na merenju kinetike opadanja/rasta broja ćelija testiranog mikroorganizama tokom neposrednog dodira sa ispitivanim materijalom.

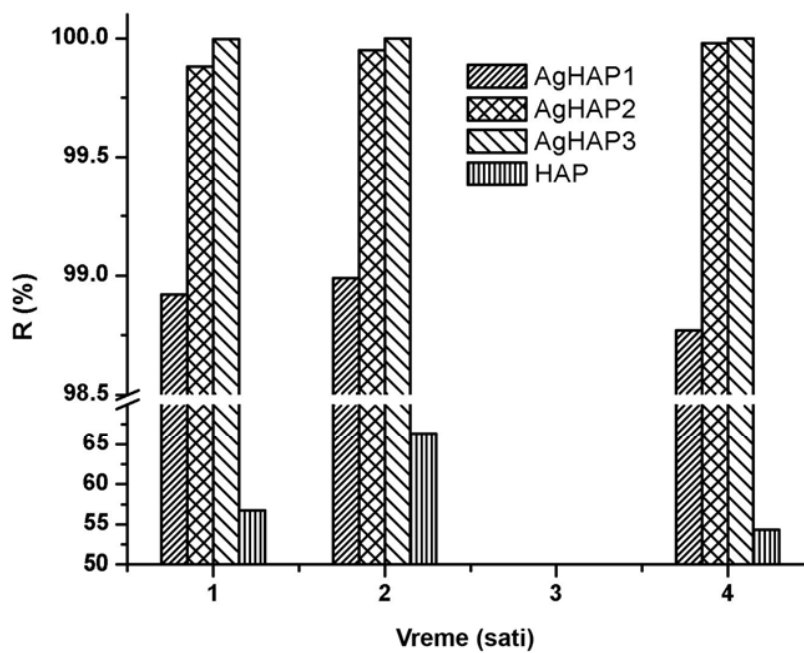
Rezultati kvantitativnog antimikrobnog testa za AgHAP uzorke su pokazali smanjenje broja vidljivih kolonija svih ispitivanih sojeva mikroorganizama. Antimikrobni efekat AgHAP uzorka zavisi od količine srebra i kako raste njegov udeo, tako se povećava antimikrobna efikasnost. Najveću osetljivost na ispitivane uzorke je dobijena za *E. coli*, gde je postignut procenat redukcije broja ćelija za oko 89–100% (Sl. 4.15 i Sl. 4.16). Uzorak AgHAP3 je pokazao baktericidno dejstvo prema *E. coli* nakon drugog sata. AgHAP2 je pokazao konstantno opadanje broja kolonija sa vremenom, nakon 4 sata stepen redukcija je iznosio 99,98%. Kod uzorka AgHAP1 uočen je postepen pad broja kolonija nakon 1 i 2 sata (~99%), a potom dolazi do njihovog porasta.

AgHAP uzorci prema *S. aureus* (Sl. 4.17 i Sl. 4.18) i *C. albicans* (Sl. 4.19 i Sl. 4.20), su ispoljili nešto slabiju antimikrobnu aktivnost i kod njih nije bilo biocidnog dejstva. Smanjenje broja kolonija je bio srazmeran količini srebra u uzorcima. Uzorak AgHAP3 je pokazao konstantno opadanje broja kolonija sa vremenom, nakon 4 sata stepen redukcija *S. aureus* je iznosio 99,98%. Za uzorke AgHAP1 i AgHAP2 uočen je postepen pad broja kolonija *S. aureus* nakon prvog i drugog sata i njihov porast nakon 4 sata. Nakon drugog sata izlaganja postignuti stepen redukcije broja ćelija se kretao u opsegu od oko 97% za uzorak sa najmanjom količinom srebra do 99,47% za uzorak sa većim sadržajem srebra. Kod *C. Albicans* postepen rast stepena redukcije nakon 1 i 2 sata je zabeležen samo kod AgHAP3 uzorka, nakon drugog sata je iznosio 99,92%. Kod ostalih AgHAP uzoraka pad broja kolonija je zabeležen samo nakon prvog sata, gde je postignuti procenat redukcije iznosio 85,86% za uzorak AgHAP1 i ~ 99% za uzorak AgHAP2.

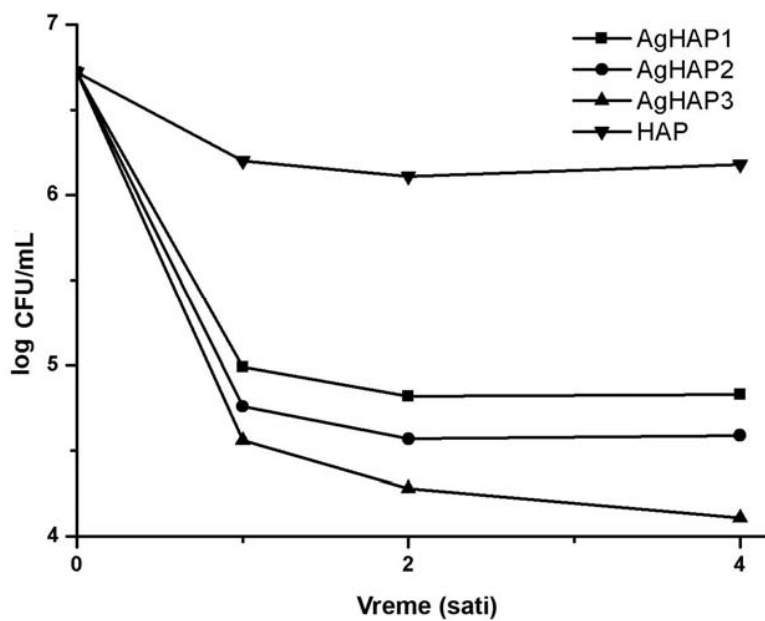
Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima, da su materijali na bazi srebra efikasniji prema *E. coli* u odnosu na *S. Aureus* [222-228]. Razlika u osetljivosti bakterija prema srebru je najverovatnije posledica različite građe ćelijskog omotača.



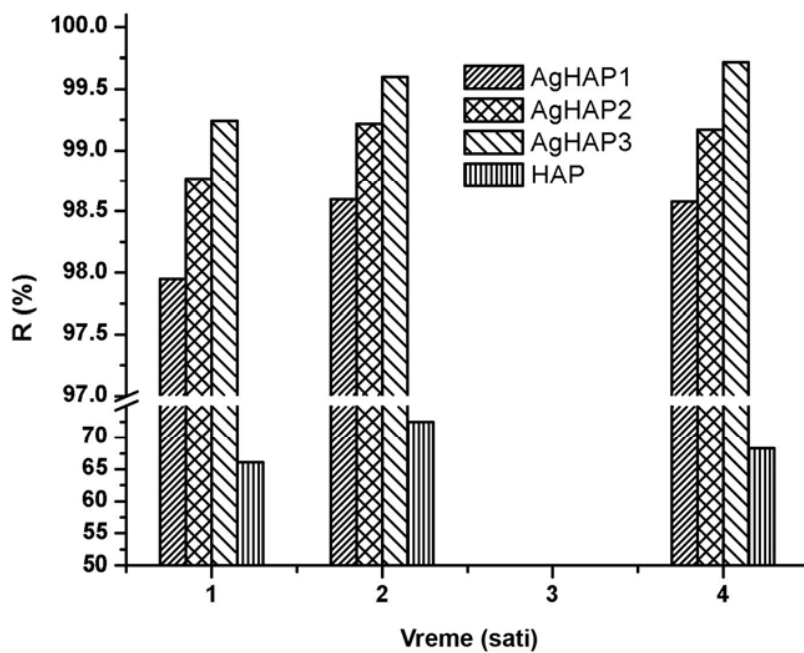
Slika 4.15 Log CFU/mL ćelija *E. coli*.



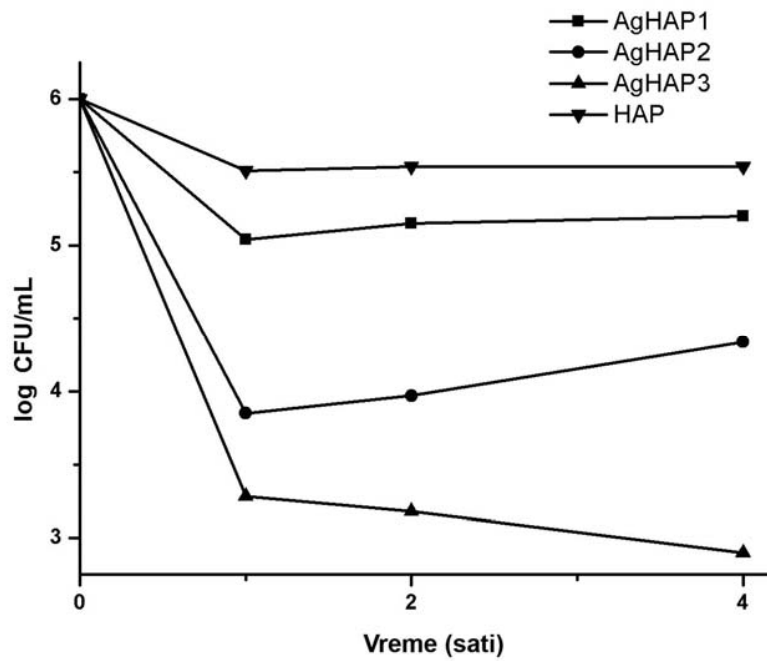
Slika 4.16 Stepen redukcije (R) broja ćelija *E. coli*.



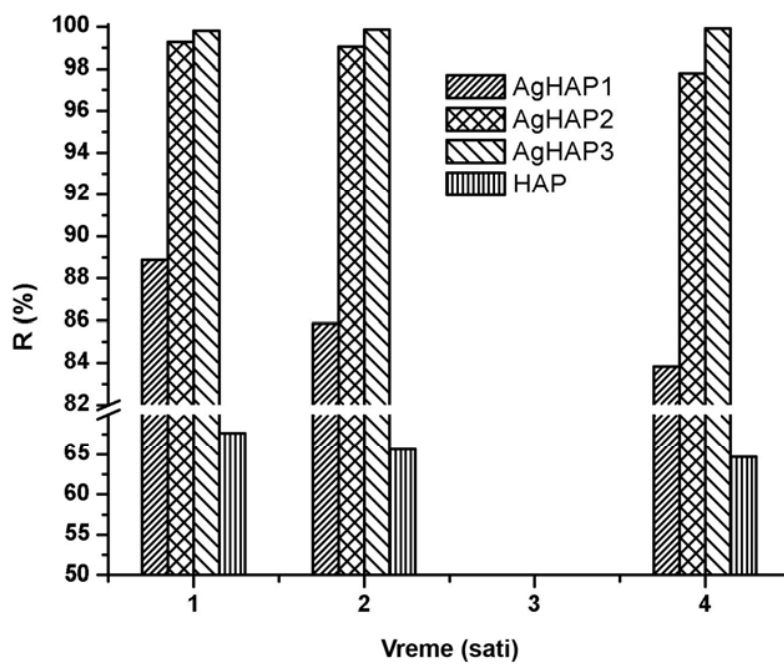
Slika 4.17 Log CFU/mL ćelija *S. aureus*.



Slika 4.18 Stepen redukcije (R) broja ćelija *S. aureusi*.



Slika 4.19 Log CFU/mL ćelija *C. albicans*.



Slika 4.20 Stepen redukcije (R) broja ćelija *C. albicans*.

Podaci iz literature, takođe, potvrđuju jako antibakterijsko dejstvo materijala na bazi srebra i hidroksiapatita. Postupak površinske inkorporacije jona srebra se široko koristi za modifikaciju površine hidroksiapatitnih materijala. Chen i sar. [229] su *in vitro* uslovima našli značajno smanjenje broja adheriranih bakterija *S. epidermidis* i *S. aureus* na površini hidroksiapatitne obloge tretirane jonima srebra u odnosu na ne tretiranu površinu. Chung i sar. [230] su ispitali *in vitro* uslovima antibakterijski uticaj HAP obloga površinski tretiranih jonima srebra i cinka procesom jonske izmene na *S. mutans*. HAP obloga sa 10000 ppm Ag je pokazala baktericidno dejstvo. Ispitivanja Feng i sar. [231, 232] *in vitro* uslovima su pokazala da Ag-HAP obloge poseduju jako antibakterijsko dejstvo prema *E. coli*, *P. aeruginosa*, *S. aureus* i *S. epidermidis*. Díaz i sar. [233] su napravili srebro-hidroksiapatitni nanokompozitni materijal koloidnim postupkom, dok su redukciju srebra izvršili u H₂/Ar atmosferi na 350°C. Rezultati antimikrobnih testova su pokazali visoku aktivnost sintetisanog materijala prema *S. aureus*, *Pneumococcus* i *E. coli*. Ispitivanja Mo i sar. [222] su pokazali da je kompozitna obloga napravljena od AgHAP i TiO₂ na Ti, veoma efikasan antimikrobni agens prema *E. coli* i *S. Aureus*. Takođe, Zhang i sar. [234] su izvestili o jakom antimikrobnom dejstvu AgHAP prema *E. coli* i *S. Aureus*. Hidroksiapatit je dobijen hidrotermalnom modifikacijom prirodnog (koralnog) HAP-a, dok su joni srebra procesom sorpcije uneseni u strukturu hidroksiapatita.

Nekoliko naučnih studija ispitalo je antimikrobnu aktivnost hidroksiapatitnih materijala dopiranih jonima srebra. Kim i saradnici [235] su ispitali antimikrobni efekat hidroksiapatita dopiranih jonima Ag(I); Cu(II) ili Zn(II), dobijenih neutralizacionom metodom prema *E. coli*. Uzorci dopirani jonima srebra su pokazali jako antimikrobno dejstvo. Rameshbabu i saradnici [143] su izvestili o jakom antimikrobnom efektu materijala na bazi hidroksiapatita dopiranih jonima srebra dobijenih modifikovanom neutralizacionom metodom prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus*. Chung i sar. [236] su proučavajući antimikrobni efekat hidroksiapatita dopiranih jonima srebra, dobijenih sol-gel postupkom, pokazali da pri količini od 2000 ppm Ag, materijali imaju jako dejstvo prema *S. mutans* ATCC 25175.

U literaturi ne postoji mnogo izveštaja o antimikrobnom dejstvu materijala na bazi hidroksiapatita modifikovanog jonima bakra ili cinka. Ispitivanja Kim i sar. [235] nisu jasno pokazala antimikrobno dejstvo hidroksiapatitnih materijala dopiranih jonima bakra ili cinka. Li i sar. [237] su izvestili o antimikrobnom dejstvu CuHAP prema *E. coli*. Chung i sar. [236] su izvestili o antimikrobnom dejstvu hidroksiapatita dopiranog sa 2000 ppm jona cinka prema *S. mutans*.

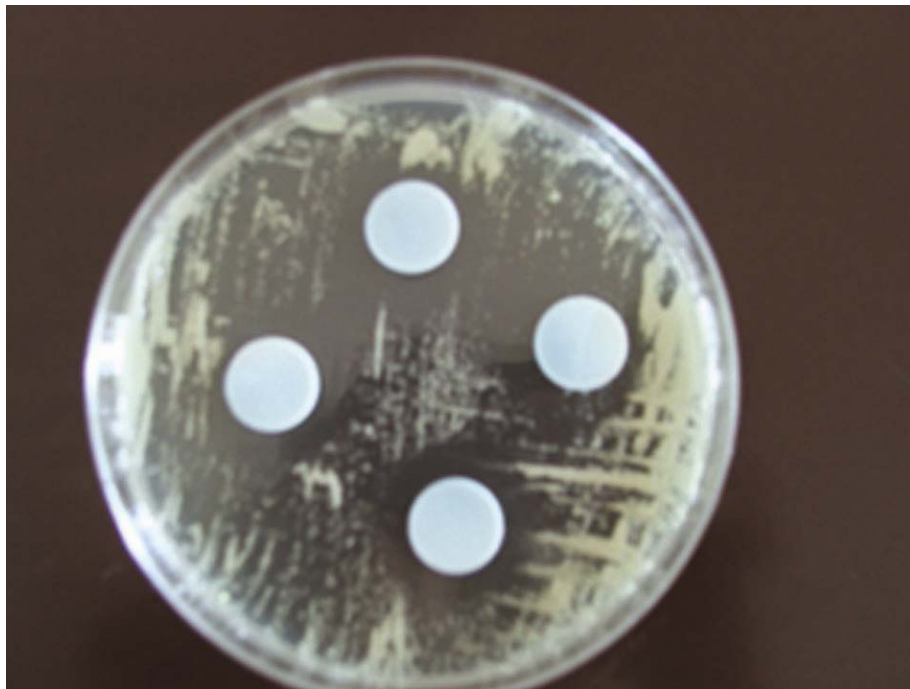
Rezultati disk-difuzionog testa sintetisanih uzoraka hidroksiapatita dopiranih jonima bakra i cinka su prikazani u Tablici 4.5. Uzorak CuHAP2 je pokazao antimikrobnu aktivnost prema bakteriji *E. coli* i gljivici *C. albicans*. Antimikrobno dejstvo CuHAP2 uzoraka prema ispitivanim mikroorganizmima je prikazano na Slici 4.21 i Slici 4.22. Mnoge naučne studije su pokazale da bakar poseduje jako antifungicidno dejstvo. Kod *C. albicans* osim zone inhibicije (0,5 mm, Tabl. 4.5) postoji i difuzna zona (~ 4 mm, Sl. 4.22), u kojoj CuHAP2 uzorak ispoljava bakteriostatičko dejstvo, tj. u kojoj je smanjena gustina rasta indikatorskog soja u okolini test uzorka u odnosu na celu površinu Petri šolje. CuHAP1 kao i uzorci dopirani jonima cinka, nisu ispoljili antimikrobnu aktivnost prema testiranim sojevima mikroorganizmima. Međutim, na površinama tableta nije primećen rast mikroorganizama, što ukazuje da nisu pogodana podloga za njihovo razmnožavanje.

Rezultati kvantitativnog antimikrobnog testa za uzorke hidroksiapatita dopiranih jonima bakra i cinka su prikazani u Tablici 4.6. Antimikrobna aktivnost CuHAP i ZnHAP uzoraka sa ekvivalentnim sadržajem dopantnih jona prema *E. coli* i *S. aureus* bila je slična. Stepem redukcije broja ćelija se kretao u opsegu od oko 97% za uzorake sa manjim sadržajem dopantnih jona i oko 98% za uzorak sa većim sadržajem. Najmanju osetljivost na dejstvo CuHAP1 i ZnHAP uzorka je pokazala *C. albicans*. Međutim, najveću osetljivost *C. Albicans* je pokazala prema CuHAP2 uzorku nakon 1 sata, gde je postignut stepen redukcije od 99,1%. Jedan od mogućih razloga slične antimikrobne aktivnosti CuHAP i ZnHAP uzoraka i pored jačeg antimikrobnog dejstva jona Cu(II) je veća zastupljenost jona Zn(II) na površini čestica. Naime, poređenjem rezultata iz Tablice 4.6 sa rezultatima za AgHAP uzorke sa ekvivalentnim sadržajem dopantnih jona, može se zaključiti da CuHAP i ZnHAP imaju slabiju antimikrobnu aktivnost. Ovi rezultati su u skladu sa antimikrobnom aktivnošću jona metala, koja opada u nizu $Ag(I) > Cu(II) > Zn(II)$ [164].

Izvestan stepen redukcije broja ćelija mikroorganizama zabeležen je kod čistog hidroksiapatita (Sl. 4.16, Sl. 4.18, Sl. 4.20 i Tabl. 4.6). Dobijeni rezultati ukazuju da postoji adhezija ćelija mikroorganizama na površini čestica hidroksiapatita, što dovodi do smanjenja njihovog broja [238-240]. Hidroksiapatit pokazuje izuzetno dobre adsorpcione osobine prema proteinima eksprimiranih na površini mikroorganizama, što predstavlja osnov za njihovo izolovanje na HAP kolonama [241, 242].

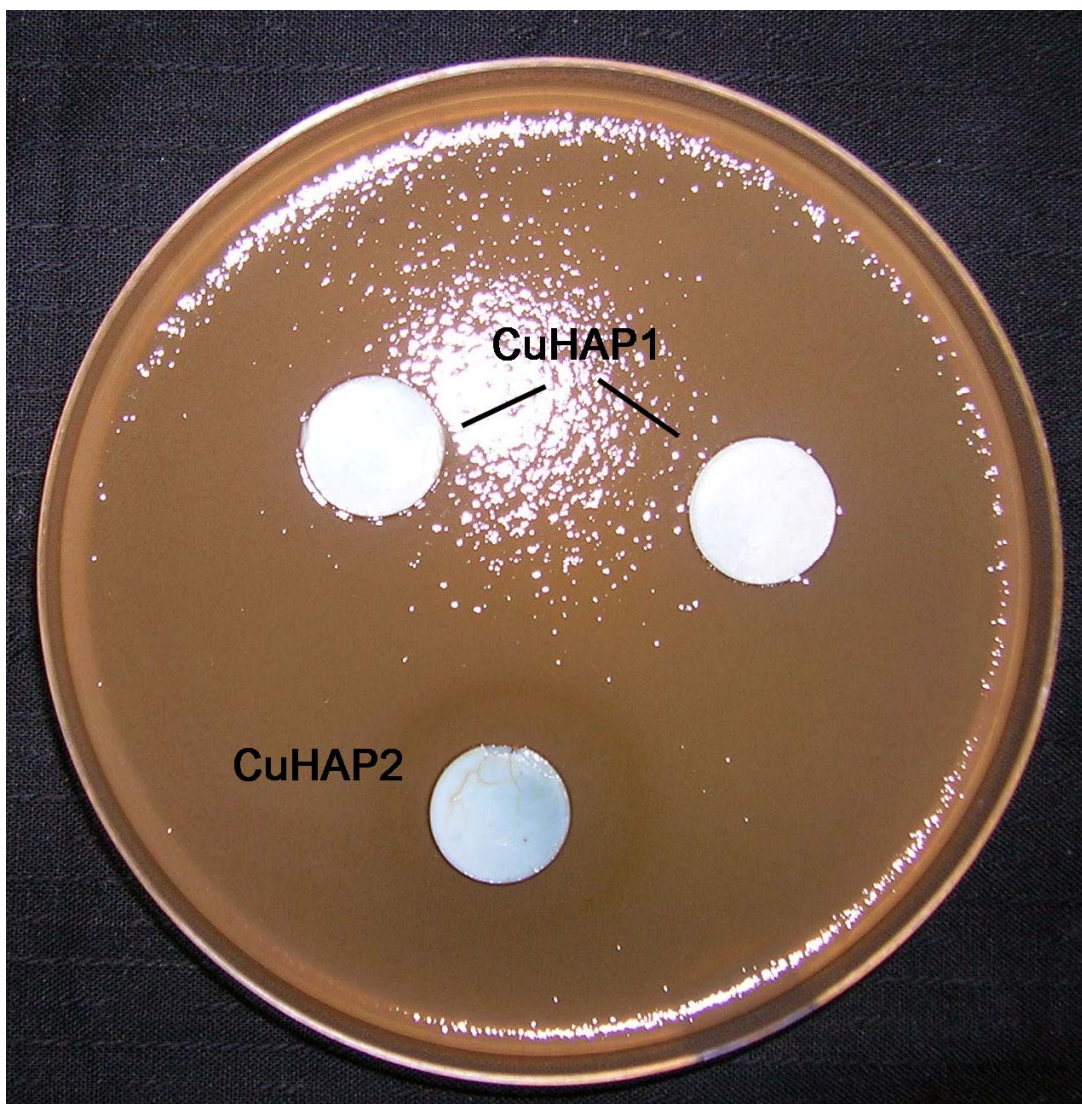


a)



b)

Slika 4.21 Antimikrobna aktivnost uzoraka CuHAP1 a) i CuHAP2 b) u odnosu na *E. coli*.



Slika 4.22 Antimikrobna aktivnost CuHAP2 uzorka u odnosu na *C. albicans*.

Tablica 4.6 Redukcija broja ćelija mikroorganizama: a) *E. coli*, b) *S. aureus* i c) *C. albicans*.

Uzorak	Mikroorganizam	Broj mikrobnih kolonija vreme (h)				R% (h)		
		0	1	2	4	1	2	4
HAP	<i>E. coli</i>	$2,2 \cdot 10^6$	$9,2 \cdot 10^5$	$8,6 \cdot 10^5$	$9,3 \cdot 10^5$	58,2	60,9	57,7
CuHAP1			$7,7 \cdot 10^4$	$6,1 \cdot 10^4$	$7,3 \cdot 10^4$	96,5	97,2	96,7
CuHAP2			$5,0 \cdot 10^4$	$3,3 \cdot 10^4$	$3,9 \cdot 10^4$	97,7	98,5	98,2
ZnHAP1			$6,9 \cdot 10^4$	$5,3 \cdot 10^4$	$6,2 \cdot 10^4$	96,9	97,6	97,2
ZnHAP2			$4,8 \cdot 10^4$	$3,1 \cdot 10^4$	$3,4 \cdot 10^4$	97,8	98,6	98,5
HAP	<i>S. aureus</i>	$1,9 \cdot 10^6$	$5,6 \cdot 10^5$	$5,8 \cdot 10^5$	$6,2 \cdot 10^5$	70,5	69,5	67,4
CuHAP1			$4,1 \cdot 10^4$	$5,4 \cdot 10^4$	$8,0 \cdot 10^4$	97,8	97,2	95,8
CuHAP2			$3,9 \cdot 10^4$	$4,3 \cdot 10^4$	$7,2 \cdot 10^4$	97,9	97,7	96,2
ZnHAP1			$5,3 \cdot 10^4$	$4,8 \cdot 10^4$	$6,5 \cdot 10^4$	97,2	97,5	96,6
ZnHAP2			$4,7 \cdot 10^4$	$4,4 \cdot 10^4$	$5,2 \cdot 10^4$	97,5	97,7	97,3
HAP	<i>C. albicans</i>	$9,9 \cdot 10^5$	$3,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$	$3,2 \cdot 10^5$	69,7	68,7	67,7
CuHAP1			$4,2 \cdot 10^4$	$7,5 \cdot 10^4$	$1,1 \cdot 10^5$	95,8	92,4	88,9
CuHAP2			$8,6 \cdot 10^3$	$1,1 \cdot 10^4$	$4,2 \cdot 10^4$	99,1	98,9	95,8
ZnHAP1			$1,4 \cdot 10^5$	$2,0 \cdot 10^5$	$3,1 \cdot 10^5$	85,9	79,8	68,7

4.7. Hemolitička aktivnost sintetisanih uzoraka

Glavni uslov za primenu biomaterijala u ljudskom organizmu je povoljna interakcija ćelija, tkiva i telesnih tečnosti sa hemijskim materijama od kojih je biomaterijal napravljen. Procena tolerancije nekog biomaterijala od strane živog tkiva može se izvršiti na osnovu testiranja njegove biokompatibilnosti *in vitro* testovima, zatim *in vivo* na eksperimentalnim životinjama i kroz klinička ispitivanja. *In vitro* testovi obuhvataju analizu citotoksičnosti, genotoksičnosti (mutagenosti) i hemolize eritrocita. Prednosti *in vitro* testova je mogućnost ponavljanja pod identičnim uslovima, strogoj kontroli po svakom parametru i ekonomskoj isplativosti. Međutim, testovi *in vitro* uslovima ne mogu u potpunosti zameniti *in vivo* i klinička istraživanja, ali mogu ukazati na neka opšta svojstva određenih biomaterijala pre njihovog uvođenja u kliničku praksu. Biomaterijali koji se danas proizvode projektuju se tako da budu kompatibilni sa elementima humane krvi što znači da ne smeju biti uzrok tromboze, antigenog odgovora, destrukcije proteina plazme, kao ni razgradnje belih ili crvenih krvnih zrnaca. Hemokompatibilnost definiše sposobnost biomaterijala ili medicinskog sredstva da ostane u kontaktu sa humanom krvlju u toku klinički relevantnog vremenskog perioda bez uzrokovanja promena krvi ili plazme, odnosno samog materijala [243]. Krv se sastoji od krvne plazme (50-60%) i krvnih ćelija (50-40%): eritrocita, leukocita i trombocita. Eritrociti sadrže hemoglobin, protein koji je neophodan za transport kiseonika i ćelijsko disanje. Liziranjem eritrocita dolazi do oslobađanja slobodnog hemoglobina u plazmu, što u organizmu dovodi do ozbiljnog oštećenja jetre i renalne funkcije. Ova činjenica se koristi u ispitivanju hemolitičkih osobina određenog biomaterijala, zbog karakteristične absorbancije hemoglobina na 540 nm. Biomaterijali koji se koriste u rekonstrukciji koštanog tkiva često u sebi sadrže hemijske komponente koje se oslobađaju u toku vezivanja, i neposredno posle unošenja, a koje mogu štetno uticati na okolna tkiva. Takođe, koštano tkivo je jedno od najdinamičnijih tkiva ljudskog organizma, jer se neprestano nadogarađuje ili uklanja resorpcijom. U toku resorptivnih procesa kalcijum se oslobađa iz kosti u vanćelijsku tečnost, uglavnom krv, gde se zadrži izvesno vreme, a kasnije se jedan deo ekskretuje urinom [244]. Takođe, takvim promena je podležan i sintetski hidoksiapatit u koštanim ispunima i implantima pre i nakon osteointegracije [245-247]. Hidoksiapatiti dopirani raznim jonima metala, bili bi takođe podložni resorptivnim procesima, što bi verovatno uzrokovalo pojavu jona dopanta u krvi. Joni nekih metala pokazuju hemolitičku aktivnost [248, 249]. U literaturi postoji malo izveštaja o hemolitičkom dejstvu srebra. Ball [250] je izvestio da isotonični rastvor NaCl

koji sadrži malu količinu srebra pokazuje hemolitičko dejstvo na eritrocite riba. Konzumacija velikih doza koloidnog srebra može dovesti do hemolize i toksično delovati na koštanu srž [251].

Hemolitička aktivnost čistog hidroksiapatita kao i uzoraka dopiranih jonima srebra i cinka su ispitane na humanim eritrocitima i rezultati su prikazani u Tablici 4.7.

Tablica 4.7 Rezultati testa hemolize.

Uzorak	Optička gustina na 540 nm	Stepen hemolize %
Destilovana voda	1,025 ± 0,001	Pozitivna kontrola
Fiziološki rastvor	0,007 ± 0,007	Negativna kontrola
HAP	0,048 ± 0,004	4,057 %
AgHAP1	0,033 ± 0,002	2,631 %
AgHAP2	0,027 ± 0,001	2,043 %
AgHAP3	0,031 ± 0,001	2,340 %
ZnHAP1	0,021 ± 0,002	1,453 %
ZnHAP2	0,022 ± 0,001	1,551 %

Na osnovu dobijenih rezultata svi testirani uzorci su imali nisku hemolitičku aktivnost nižu od 5% i mogu se smatrati netoksičnim. Uzorak čistog hidroksiapatita je pokazao najviši stepen hemolize od 3,057 % kao posledica većeg stepena kristaliničnosti čestica. Wiessner i sar. [252] su izvestili da stepen hemolize raste sa kristaliničnosti čestica hidroksiapatita. Takođe, Lijian i sar. [253] su izvestili da nanočestice hidroksiapatita neznatno u direktnom kontaktu liziraju do 5% eritrocite.

Kod Ag-HAP uzoraka stepen hemolize je rastao sa stepenom kristaliničnosti uzoraka, ali je bio ispod 5%. Cheng i sar. [254] su izvestili da HAP obloge na Ti pločicama, koje sadrže do 5% Ag ne pokazuju značajnu hemolitičku aktivnost. Stepem hemolize uzrokovan oblogama je bio niži od 0,4% i postepeno se povećavao sa sadržajem srebra.

Uzorci hidroksiapatita dopirani cinkom su pokazali niži stepen hemolize, tj. bolju hemokompatibilnost (Tabl. 4.7). Razlog tome je što uzorci Zn-HAP-a imaju manji stepen kristaliničnosti od uzoraka dopiranih jonima srebra (Tabl. 4.1). U literaturi ne postoje podaci o hemolitičkom dejstvu jona cinka. Naime, joni cinka stabilizuju membranu eritrocita [255].

Testiranje hemotoksičnosti jedan je od prvih koraka u ispitivanju biokompatibilnosti materijala. Potrebna su dalja ispitivanja *in vitro* i *in vivo* uslovima za konačnu ocenu biokompatibilnosti. Ispitivanja u *in vitro* uslovima bi se pratile interakcije sintetisanih materijala sa relevantnim humanim kulturama ćelija, kao što su ćelije koštane srži, osteoblastne ćelije i druge. *In vivo* studijama bi se kompletno sagledala njihova interakcija sa koštanim i drugim tkivima, zatim, formiranje nove kosti i osteointegracije, što bi predstavljalo značajane parametare prilikom njihove kliničke primene.

4.8. Antimikrobni mehanizam dejstva sintetisanih uzoraka

Mikroskop atomskih sila (AFM) je važna tehnika u istraživanju različitih bioloških materijala. Upotrebom AFM u istraživanju ćelija mogu se dobiti korisne informacije, o topografiji površine, a kod preseka ćelije važne informacije o arhitekturi ćelijskog omotača pa čak i određenih strukturnih elemenata unutar ćelije. U poređenju sa drugim mikroskopskim metodama, AFM pruža ključne prednosti: (i) može se ispitati struktura površine žive ćelije u realnom vremenu sa nanometarskom rezolucijom, (ii) ispitati površinske sile (npr. hidrofobne sile) i površinske osobine (hidrofobnost, elastičnost) se mogu meriti na nano nivou, i (iii) mogu se otkriti specifični receptori na površini ćelije i pratiti dinamika njihovih interakcija [256]. Takođe, u realnom vremenu AFM uređajem se mogu videti promene na ćelijama mikroorganizama nastalih dejstvom antimikrobnih agenasa. Mikroskopom atomskih sila ispitan je efekat čestica HAP i AgHAP3 uzorka na morfologiju ćelija mikroorganizana: *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*.

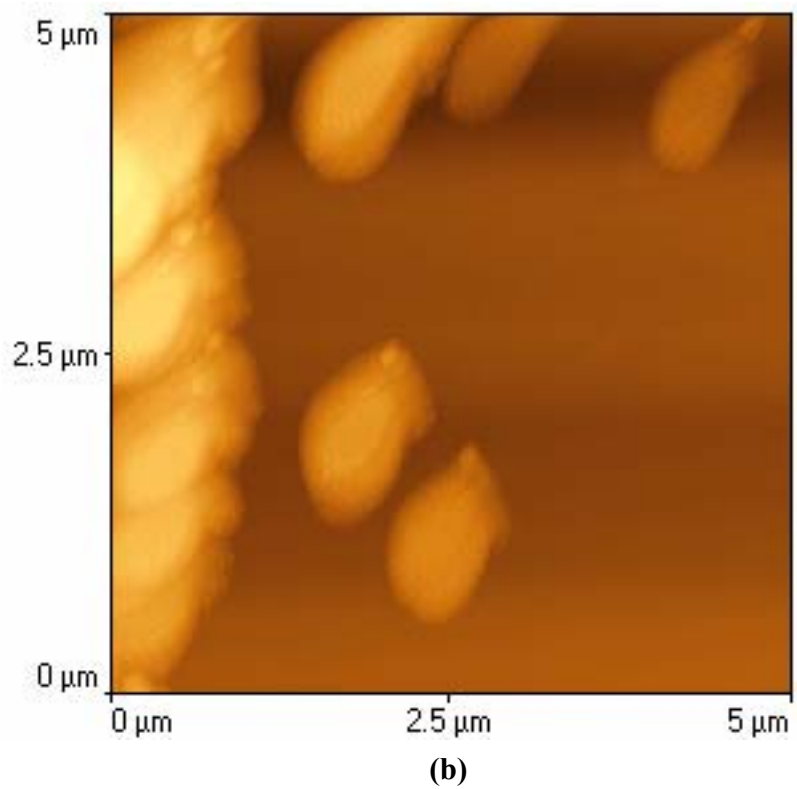
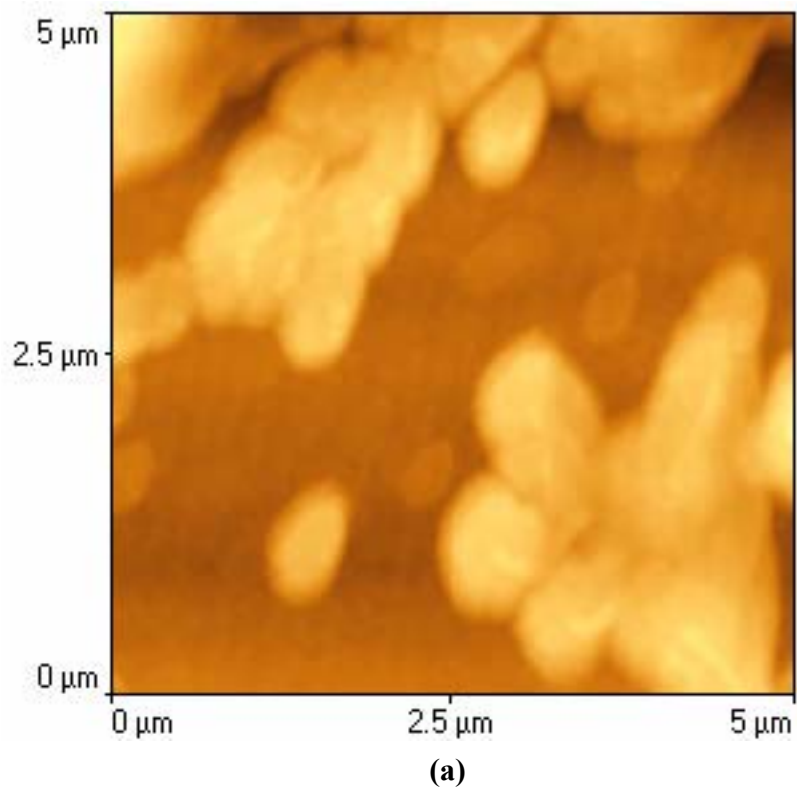
AFM slike *E. coli* tretirane sa česticama HAP i AgHAP3 su prikazane na Slici 4.23. Sa Slike 4.23a se može uočiti da su ćelije *E. coli* tretirane HAP česticama, nepravilnog štapićastog oblika, dužine oko 1,3 μm , širine oko 0,8 μm i glatkih površina. U preparatu se ćelije nalaze pojedinačno i u nepravilnim kolonijama. Može se zaključiti da čestice hidroksiapatita ne oštećuju ćelije *E. coli* i da su pogodan supstrat za njihov rast i razmnožavanje. *E. coli* tretirane AgHAP3 česticama, pokazuju značajne morfološke promene, vide se oštećenja u obliku vezikula na površini ćelija (Sl. 4.23b). Takođe, Yanga i sar. [257] su izvestili o pojavi vezikula na površini *E. coli* ćelija, kao posledice

dejstva jona srebra. Pojava vezikula na površini *E. coli*, verovatno su nastale kao posledica oštećenja spoljašnje ćelijske membrane. Naime, ćelijski omotač *E. coli* (Gram-negativna bakterija) se sastoji od tri dela: citoplazmine membrane, tankog sloja mureina i spoljašnje membrane.

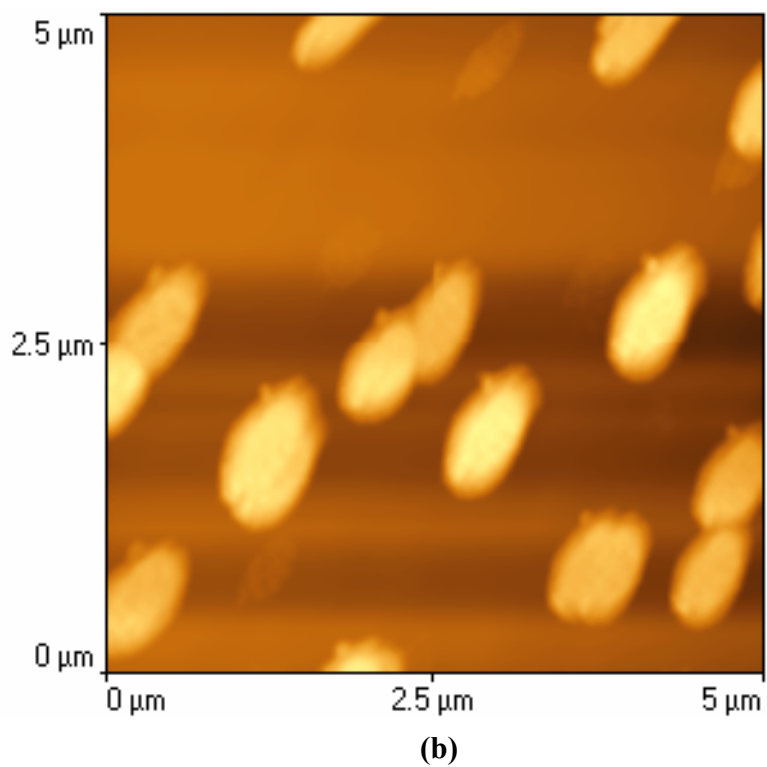
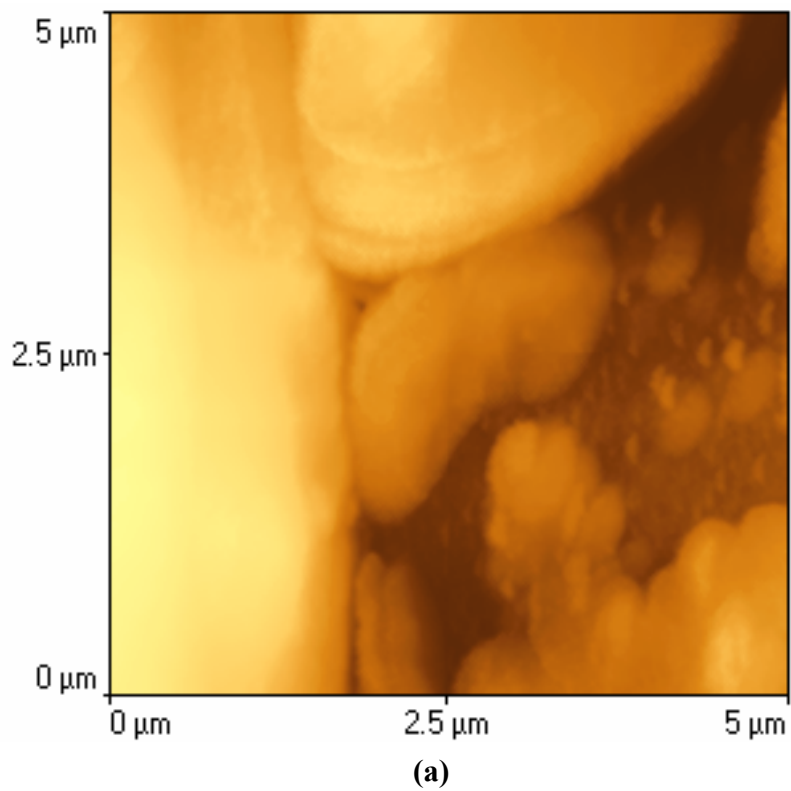
Na Slici 4.24 su prikazane AFM slike ćelija *S. aureus* tretirane sa česticama HAP i AgHAP3. Prema Slici 4.24a, dve slepljene ćelije *S. aureus* tretirane HAP česticama zadržavaju kokalnu morfologiju, prečnika oko 0,8 μm , sa glatkim površinama. Značajne morfološke promene se mogu videti na ćelijama *S. aureus* tretirane AgHAP3 česticama (Sl. 4.24b). Ćelije su izdužene, sa vidljivim oštećenjima na površini u obliku ispupčenja, koja izgledaju kao vezikule. Razlika u izgledu vezikula kod *E. coli* i kod *S. aureus* su posledica građe ćelijskih omotača. *Staphylococcus aureus* je Gram-pozitivna bakterija i njen omotač je građen od citoplazmine membrane koja je obavijena ćelijskim zidom, koji se sastoji od debelog sloja mureina koji sadrži tejhoevu i lipotejhoevu kiselinu.

Slika 4.25 prikazuju morfologije ćelija *C. albicans* nastalih tretmanom HAP i AgHAP3 česticama. *C. albicans* ćelije tretirane sa HAP česticama su ovalnog oblika sa glatkim površinama (Sl. 4.25a). Na pojedinim ćelijama se mogu uočiti stadijum vegetativnog razmnožavanja – pupljenje. Ćelije *C. albicans* tretirane AgHAP3 česticama su elipsoidne, hrapave površine i vide se mnoga oštećenjima na površini koja podsećaju na lezije (Sl. 4.25b).

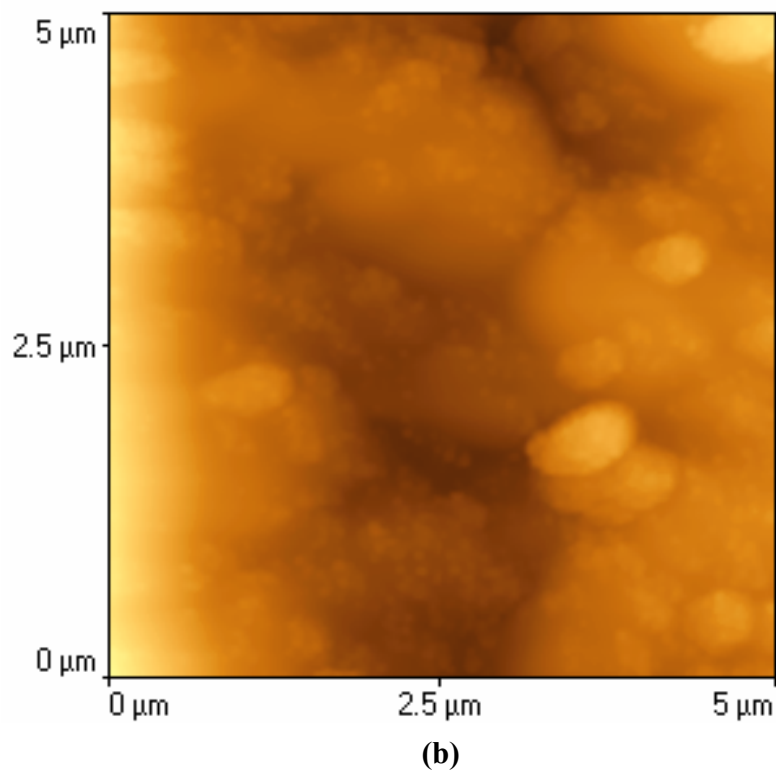
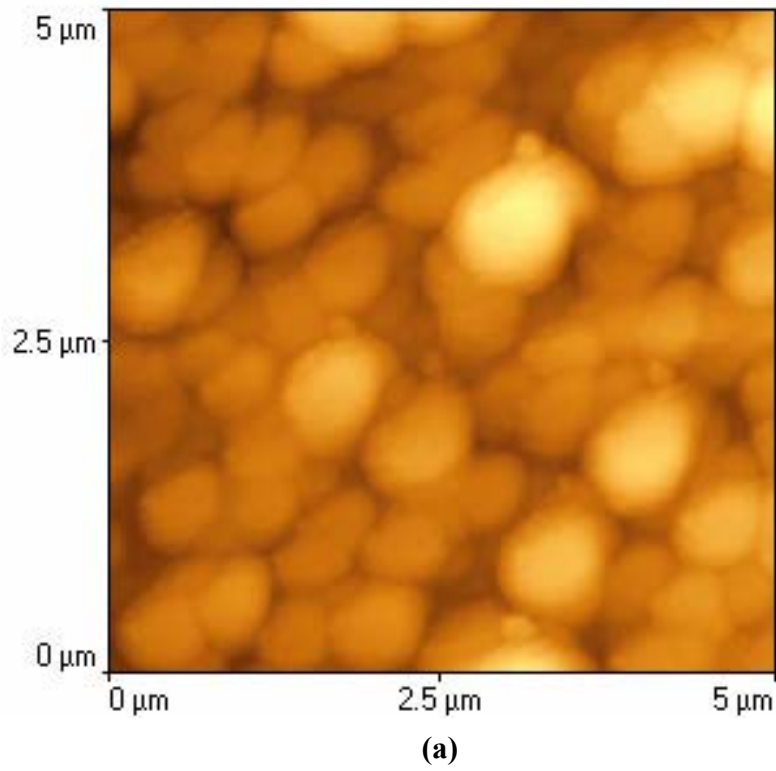
Antimikrobni mehanizam dejstva jona srebra na mikroorganizme je veoma kompleksan. Prvo, joni srebra se vezuju za ćelijski omotač, uzrokujući promene u njegovoj strukturi i permeabilnosti i inaktiviraju proteine. Zatim, joni srebra prodiru u unutrašnjost ćelije i inhibiraju razne proteine prisutne u citoplazmi i ribozomima, i interaguje sa nukleinskim kiselinama sprečavajući procese replikacije i translacije, uzrokujući time uništenje ćelije. Mehanizam antimikrobnog dejstva AgHAP3 uzoraka se može pretpostaviti na osnovu rezultata AFM analize, i on obuhvata adheziju ćelija mikroorganizama na površinu čestica i prodiranje jona srebra u ćelijski omotač. Joni srebra prisutni u kristalnoj površini AgHAP3 čestica delimično grade slabe veze sa molekulima vode, koji se izmanjuju sa tiolskim, imidazolskim, amino i karboksilnim grupama proteina prisutnih na površini ćelije mikroorganizma, uzrokujući njihovo prodiranje u ćelijski omotač. Strukturne promene koje nastaju penetracijom jona srebra, dovode do razgradnje ćelijskog omotača tj. do liziranja ćelija. Antimikrobno dejstvo AgHAP3 uzorka, verovatno uključuje interakciju AgHAP3 čestica i oslobođenih jona srebra sa ćelijskim omotačem mikroorganizama. Takođe, može se pretpostaviti sličan mehanizam antimikrobnog dejstva važi i za uzorake hidroksiapatita dopiranih jonima bakra i cinka.



Slika 4.23 AFM slike *E. coli* tretirane sa HAP česticama (a) i tretirane sa AgHAP3 česticama (b).



Slika 4.24 AFM slike *S. aureus* tretirane sa HAP česticama (a) i tretirane sa AgHAP3 česticama (b).



Slika 4.25 AFM slike *C. albicans* tretirane sa HAP česticama (a) i tretirane sa AgHAP3 česticama (b).

5. Zaključak

U ovoj doktorskoj disertaciji metodom neutralizacije sintetisani su uzorci kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima metala: srebra, bakra ili cinka. Primenom različitih metoda karakterizacije, antimikrobnih testova i ispitivanja hemotoksičnosti, dobijeni su rezultati na osnovu kojih se može zaključiti sledeće:

- Rendgenostrukturalna analiza je pokazala da svi sintetisani uzorci poseduju heksagonalnu strukturu, koja odgovara kristalnoj rešetki kalcijum hidroksiapatita (ASTM kartica 9-423). Dobijeni difraktogrami su međusobno veoma slični, poseduju oštre i izražene pikove, što ukazuje da su uzorci visoko kristalini. U difraktogramima nisu identifikovani pikovi koji potiču od drugih fosfatnih faza ili ne izreagovanog CaO.
- Promena konstanti rešetke dopiranih uzoraka u odnosu na čist hidroksiapatit je direktno povezana sa jonskim prečnikom i koncentracijom dopanta. U uzorcima dopiranih jonima srebra došlo je do povećanja parametara rešetke. Dok kod uzoraka dopiranih jonima Cu(II) i Zn(II) do smanjenja vrednosti parametara rešetke.
- SEM i TEM analize sintetisanih uzoraka su pokazale da su dobijene čestice sličnih morfoloških karakteristika: nepravilnog cilindričnog oblika, često izvijene i neujednačene veličine. Prosečna dužina čestica kod svih uzoraka iznosi oko 70 nm, a širina oko 15-20 nm, mada se mogu naći čestice kraće od 50 nm ali i duže od 100 nm.
- Antimikrobna aktivnost sintetisanih uzoraka hidroksiapatita prema: *Escherichia coli* ATCC 25922, *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 i *Candida albicans* ATCC 24433; zavisi od vrste dopantnog jona.
- Antimikrobna aktivnost uzoraka raste sa povećanjem sadržaja dopantnog jona.
- Uzorci kalcijum hidroksiapatita dopirani jonima srebra su pokazali najjaču antimikrobnu aktivnost. Najveća osetljivost na ispitivane uzorke je dobijena za *E. Coli*, gde je uzorak sa najvećim sadržajem srebra delovao baktericidno. Prema *S. aureus* i *C. albicans*, AgHAP uzorci su ispoljili nešto slabiju aktivnost. Stepenn redukciije broja ćelija *S. aureus* i *C. albicans* kod uzoraka sa najvećom količinom srebra je bio veći od 99%.

- Antimikrobna aktivnost CuHAP i ZnHAP uzoraka sa ekvivalentnim sadržajem dopantnih jona prema bakterijama *E. coli* i *S. aureus* je bila slična. Stepen redukcije broja ćelija se kretao u opsegu od oko 97% za uzorke sa manjom količinom dopantnih jona i oko 98% za uzorake sa većim sadržajem.
- Uzorak kalcijum hidroksiapatita dopiran najvećim sadržajem bakra je ispoljio najjače antimikrobno dejstvo prema *C. albicans* (99,1%), dok je stepen redukcije kod uzorka sa ekvivalentnim sadržajem cinka iznosio oko 96%.
- Testirani uzorci hidroksiapatita dopiranih jonima srebra i cinka, nisu pokazali hemolitičku aktivnost.
- AFM snimci su pokazali da je letalni efekat čestica kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima srebra prema ćelijama mikroorganizama: *E. coli*, *S. aureus* i *C. albicans*, nastao usled oštećenja spoljašnjih ćelijskih omotača.
- Na osnovu iznetih rezultata može se zaključiti da je neutralizacionom metodom moguće na veoma jednostavan i ekonomičan način sintetisati monofazne, antimikrobne prahove kalcijum hidroksiapatita dopiranih jonima: Ag(I), Cu(II) ili Zn(II).

6. Literatura

- [1] C.C. Barry, N.M. Grant, *Ceramic Materials Science and Engineering*, Springer, New York, 2007, 635.
- [2] B. Ristić, Z. Popović, D. Adamović, G. Devedžić, Izbor biomaterijala u ortopedskoj hirurgiji, *Vojnosanit. Pregl.* 67 (2010) 847–855.
- [3] S.R. Paital, N.B. Dahotre, Calcium phosphate coatings for bio-implant applications: Materials, performance factors, and methodologies, *Mater. Sci. Eng. R* 66 (2009) 1–70.
- [4] A.S. Shanbhag, H.O. Bailey, D.S. Hwang, C.W. Cha, N.G. Eror, H.E. Rubash, Quantitative analysis of ultrahigh molecular weight polyethylene (UHMWPE) wear debris associated with total knee replacements, *J. Biomed. Mater. Res.* 53 (2000) 100–110.
- [5] R.C. Thomson, M.J. Yaszemski, J.M. Powers, A.G. Mikos, Fabrication of biodegradable polymer scaffolds to engineer trabecular bone, *J. Biomat. Sci.–Polym. E.* 7 (1996) 23–38.
- [6] N. Ignjatović, D. Uskoković, Kompozitni materijali na bazi hidroksiapatita i polimera kao supstituenti tvrdog tkiva, *Hem. Ind.* 11 (2002) 1–17.
- [7] S.S. Kim, M. S. Park, O. Jeon, C.Y. Choi, B.-S. Kim, Poly(lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite scaffolds or bone tissue engineering, *Biomaterials* 27 (2006) 1399–1409.
- [8] P. Zhang, Z. Hong, T. Yu, X. Chen, X. Jing, In vivo mineralization and osteogenesis of nanocomposite scaffold of poly (lactide-co-glycolide) and hydroxyapatite surface-grafted with poly(L-lactide), *Biomaterials* 30 (2009) 58–70.
- [9] N. Ignjatovic, D. Uskokovic, Synthesis and application of hydroxyapatite/polylactide composite biomaterial, *Appl. Sur. Sci.* 238 (2004) 314–319.
- [10] H. Shen, X. Hu, F. Yang, J. Bei, S. Wang, An injectable scaffold: rhBMP-2-loaded poly (lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite composite microspheres, *Acta Biomater.* 6 (2010) 455–465.
- [11] K.J.L. Burg, S. Porter, J.F. Kellam, Biomaterial developments for bone tissue engineering, *Biomaterials* 21 (2000) 2347–2359.
- [12] M. Vallet-Regí, J. M. González-Calbet, Calcium phosphates as substitution of bone tissues, *Prog. Solid State Ch.* 32 (2004) 1–31.
- [13] D.J. Verret, Y. Ducic, L. Oxford, J. Smith, Hydroxyapatite cement in craniofacial reconstruction, *Otolaryng. Head Neck* 133 (2005) 897–899.

- [14] D.I. Ilan, A.L. Ladd, Bone graft substitutes, *Oper. Tech. Plast. Reconstr. Surg.* 9 (2003) 151–160.
- [15] G. Carotenuto, G. Spagnuolo, L. Ambrosio, L. Nicolais, Macroporous hydroxyapatite as alloplastic material for dental applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 671–676.
- [16] W.J.E.M. Habraken, J.G.C. Wolke, J.A. Jansen, Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 59 (2007) 234–248.
- [17] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine, *Materials* 2 (2009) 399–498.
- [18] V.P. Orlovskii, V.S. Komlev, S.M. Barinov, Hydroxyapatite and hydroxyapatite-based ceramics, *Inorg. Mater.* 38 (2002) 973–984.
- [19] J. Zhou, X. Zhang, J. Chen, S. Zend, K. de Groot, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 4 (1993) 83–85.
- [20] T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Minagi, Y. Gonda, G. Kawachi, M. Kamitakahara, Y. Shibata, H. Murayama, H. Kurosawa, T. Ikeda, The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials* 29 (2008) 2719–2728.
- [21] I. Sopyan, M. Mel, S. Ramesh, K.A. Khalid, Porous hydroxyapatite for artificial bone applications, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 8 (2007) 116–123.
- [22] H. Yoshikawa, N. Tamai, T. Murase, A. Myoui. Interconnected porous hydroxyapatite ceramics for bone tissue engineering. *J. R. Soc. Interface* 6 (2009) S341–S348.
- [23] J.C. Le Huec, T. Schaefferbeke, D. Clement, J. Faber, A. Le Rebellier, Influence of porosity on the mechanical resistance of hydroxyapatite ceramics under compressive stress, *Biomaterials* 16 (1995) 113–118.
- [24] O. Gauthier, J. Bouler, E. Aguado, P. Pilet, G. Daculsi, Macroporous biphasic calcium phosphate ceramics: influence of macropore diameter and macroporosity percentage on bone ingrowth, *Biomaterials* 19 (1998) 133–139.
- [25] H. Yoshikawa, A. Myoui, Bone tissue engineering with porous hydroxyapatite ceramics, *J. Artif. Organs* 8 (2005) 131–136.
- [26] S.F. Hulbert, S.J. Morisson, J.J. Klawitter, Tissue reaction to three ceramics of porous and non-porous structures, *J. Biomed. Mater. Res.* 6 (1972) 347–374.
- [27] S.F. Hulbert, J.J. Klawitter, R.B. Leonard, in: W.W. Kriegel, H. Palmour (Eds.), *Ceramics in Severe Environments*, Plenum Press, New York, 1971.

- [28] B.S. Chang, C.K. Lee, K.S. Hong, H.J. Youn, H.S. Ryu, S.S. Chung, K.W. Park, Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations, *Biomaterials* 21 (2000) 1291–1298.
- [29] T. Yoshii, S. Sotome, I. Torigoe, H. Maehara, Y. Sugata, T. Yamada, K. Shinomiya, A. Okawa, Isolation of osteogenic progenitor cells from trabecular bone for bone tissue engineering, *Tissue Eng. Part A*. 16 (2010) 933–942.
- [30] L. Guo, H. Li, Fabrication and characterization of thin nano-hydroxyapatite coatings on titanium, *Surf. Coat. Tech.* 185 (2004) 268–274.
- [31] S. Najman, Lj. Đorđević, V. Savić, N. Ignjatović, M. Miljković, P. Vasiljević, D. Uskoković. Čelijski odgovor na intraperitonealni implant kompozita PDMS /Hap. *Acta Medica Medianae* 44 (2005)1–8.
- [32] R.E. Neuendorf, E. Saiz, A.P. Tomsia, R.O. Ritchie, Adhesion between biodegradable polymers and hydroxyapatite: relevance to synthetic bone-like materials and tissue engineering scaffolds, *Acta Biomater.* 4 (2008) 1288–1296.
- [33] M.A. Rauschmann, T.A. Wichelhaus, V. Stinal, E. Dingeldein, L. Zichner, R. Schnettler, V. Alt, Nanocrystalline hydroxyapatite and calcium sulphate as biodegradable composite carrier material for local delivery of antibiotics in bone infections, *Biomaterials* 26 (2005) 2677–2684.
- [34] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphates, *J. Mater. Sci.* 42 (2007)1061–1095.
- [35] L.C. Chow, Next generation calcium phosphate-based biomaterials, *Dent. Mater. J.* 28 (2009) 1–10.
- [36] M. Böhner, Calcium orthophosphates in medicine: from ceramics to calcium phosphate cements, *Injury* 31 (2000) D37–D47.
- [37] O. M. Nakamura, Y. Miyasaka, M. Kagayama, M. Sakurai, Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite, *Tohoku J. Exp. Med.* 164 (1991) 37–50.
- [38] W.C. O'Neill, The fallacy of the calcium – phosphorus product, *Kidney Int.* 72 (2007) 792–796.
- [39] R.Z. LeGeros, Formation and transformation of calcium phosphates: relevance to vascular calcification, *Z. Kardiol.* 90 (2001) III116–III125.
- [40] A. Becker, M. Epple, K.M. Müller, I. Schmitz, A comparative study of clinically wellcharacterized human atherosclerotic plaques with histological, chemical, and ultrastructural methods, *J. Inorg. Biochem.* 98 (2004) 2032–2038.
- [41] O. Bermúdez, M.G. Boltong, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, Development of some calcium phosphate cements from combinations of α -TCP, MCPM and CaO, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 160–163.

- [42] K. Kurashina, H. Kurita, M. Hirano, A. Kotani, C.P. Klein, K. de Groot, In vivo study of calcium phosphate cements: implantation of an α -tricalcium phosphate / dicalcium phosphate dibasic/tetracalcium phosphate monoxide cement paste, *Biomaterials* 18 (1997) 539–543.
- [43] F.C.M. Driessens, J.A. Planell, M.G. Boltong, I. Khairoun, M.P. Ginebra, Osteotransductive bone cements. *Proc. Inst. Mech. Eng., H: J. Eng. Med.* 212 (1998) 427–435.
- [44] S. Takagi, L.C. Chow, K. Ishikawa, Formation of hydroxyapatite in new calcium phosphate cements, *Biomaterials* 19 (1998) 1593–1599.
- [45] H. Yamamoto, S. Niwa, M. Hori, T. Hattori, K. Sawai, S. Aoki, M. Hirano, H. Takeuchi, Mechanical strength of calcium phosphate cement in vivo and in vitro, *Biomaterials* 19 (1998) 1587–1591.
- [46] J.J. Crall, J.M. Bjerga, Effects of DCPD / APF application and prolonged exposure to fluoride on caries-like lesion formation in vitro, *J. Oral Pathol. Med.* 16 (1987) 488–491.
- [47] J.J. Crall, J.M. Bjerga, Effects of DCPD / APF application and prolonged exposure to fluoride on caries-like lesion formation in vitro, *J. Oral Pathol. Med.* 16 (1987) 488–491.
- [49] J.S. Wefel, J.D. Harless, The use of saturated DCPD in remineralization of artificial caries lesions in vitro, *J. Dent. Res.* 66 (1987) 1640–1643.
- [50] P.M. Hoppenbrouwers, E. Groenendijk, N.R. Tewarie, F.C.M. Driessens, improvement of the caries resistance of human dental roots by a two-step conversion of the root mineral into fluoridated hydroxylapatite, *J. Dent. Res.* 67 (1988) 1254–1256.
- [51] A. Gaffar, J. Blake-Haskins, J. Mellberg, In vivo studies with a dicalcium phosphate / MFP system for caries prevention, *Int. Dent. J.* 43 (1993) 81–88.
- [52] R.J. Sullivan, A. Charig, J. Blake-Haskins, Y.P. Zhang, S.M. Miller, M. Strannick, A. Gaffar, H.C. Margolis, In vivo detection of calcium from dicalcium phosphate dihydrate dentifrices in demineralized human enamel and plaque, *Adv. Dent. Res.* 11 (1997) 380–387.
- [53] W.E. Brown, N. Eidelman, B. Tomazic, Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation, *Adv. Dent. Res.* 1 (1987) 306–313.
- [54] S. Kamakura, Y. Sasano, H. Homma, O. Suzuki, M. Kagayama, K. Motegi, Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair, *J. Dent. Res.* 78 (1999) 1682–1687.

- [55] S. Kamakura, Y. Sasano, H. Homma, O. Suzuki, M. Kagayama, K. Motegi, Implantation of octacalcium phosphate nucleates isolated bone formation in rat skull defects, *Oral Dis.* 7 (2001) 259–265.
- [56] F. Sargolzaei-Aval, A. Sobhani, M.R. Arab, S.A. Sarani, M.H. Heydari, The efficacy of implant of octacalcium phosphate in combination with bone matrix gelatin (BMG) on bone regeneration in skull defects in rat, *Iran. J. Med. Sci.* 29 (2004) 124–129.
- [57] O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo, Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials* 27 (2006) 2671–2681.
- [58] O. Suzuki, H. Imaizumi, S. Kamakura, T. Katagiri, Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization, *Cur. Med. Chem.* 15 (2008) 305–313.
- [59] T. Kikawa, O. Kashimoto, H. Imaizumi, S. Kokubun, O. Suzuki, Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant, *Acta Biomater.* 5 (2009) 1756–1766.
- [60] F. Barrère, C.A. van Blitterswijk, K. de Groot, Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics, *Int. J. Nanomed.* 1 (2006) 317–332.
- [61] K. Byrappa, T. Ohachi, *Crystal growth technology*, Springer – Verlag Berlin Heidelberg, New York, USA, 2003.
- [62] J. Mahamid, A. Sharir, L. Addadi, S. Weiner, Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: indications for an amorphous precursor phase, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105 (2008) 12748–12753.
- [63] M. Nagano, T. Nakamura, T. Kokubo, M. Tanahashi, M. Ogawa, Differences of bone bonding ability and degradation behaviour in vivo between amorphous calcium phosphate and highly crystalline hydroxyapatite coating, *Biomaterials* 17 (1996) 1771–1777.
- [64] D. Skrtic, J.M. Antonucci, E.D. Eanes, Improved properties of amorphous calcium phosphate fillers in remineralizing resin composites, *Dent. Mater.* 12 (1996) 295–301.
- [65] E.D. Eanes, J.D. Termine, M.U. Nylen, An electron microscopic study of the formation of amorphous calcium phosphate and its transformation to crystalline apatite, *Calcif. Tissue. Res.* 12 (1973) 143–158.
- [66] S. Jantová, M. Theiszová, S. Letašiová, L. Birošová, T.M. Palou. In vitro effects of fluor-hydroxyapatite, fluorapatite and hydroxyapatite on colony formation, DNA damage and mutagenicity, *Mutat. Res.* 652 (2008) 139–144.

- [67] S. Overgaard, K. Søballe, M. Lind, C. Bünger, Resorption of hydroxyapatite and fluorapatite coatings in man, *J. Bone Joint Surg. [Br]* 79-B (1997) 654–659.
- [68] W. H. Arnold, A. Haase, J. Hacklaender, Z. Gintner, J. Bánóczy, P. Gaengler, Effect of pH of amine fluoride containing toothpastes on enamel remineralization in vitro, *BMC Oral Health* (2007) 7:14.
- [69] Y. Chen, X. Miao, Thermal and chemical stability of fluorohydroxyapatite ceramics with different fluorine contents, *Biomaterials* 26 (2005) 1205–1210.
- [70] J.F. McClendon, Fluorapatite and teeth, *Science* 151 (1966) 151.
- [71] W.E. Brown, E.F. Epstein, Crystallography of tetracalcium phosphate, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 69A (1965) 547–551.
- [72] E. Fernández, F.J. Gil, M.P. Ginebra, F.C.M. Driessens, J.A. Planell, S.M. Best, Calcium phosphate bone cements for clinical applications. Part I: solution chemistry, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 10 (1999) 169–176.
- [73] F.C.M. Driessens, M.G. Boltong, O. Bermúdez, J.A. Planell, M.P. Fernández E. Ginebra, effective formulations for the preparation of calcium phosphate bone cements, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 5 (1994) 164–170.
- [74] Y. Fukase, E.D. Eanes, S. Takagi, L.C. Chow, W.E. Brown, Setting reactions and compressive strengths of calcium phosphate cements, *J. Dent. Res.* 69 (1990) 1852–1856.
- [75] S. V. Dorozhkin, Nanodimensional and nanocrystalline apatites and other calcium orthophosphates in biomedical engineering, biology and medicine, *Materials* 2 (2009) 1975–2045.
- [76] E. Seeman, P.D. Delmas, Bone quality — The material and structural basis of bone strength and fragility, *N. Engl. J. Med.* 354 (2006) 2250–2261.
- [77] M. Artico, L. Ferrante, F.S. Pastore, E.O. Ramundo, D. Cantarelli, D. Scopelliti, G. Iannetti, Bone autografting of the calvaria and craniofacial skeleton: historical background, surgical results in a series of 15 patients, and review of the literature, *Surg. Neurol.* 60 (2003) 71–79.
- [78] B.C. Brevi, A.S. Magri, L. Toma, E. Sesenna, Cranioplasty for repair of a large bone defect with autologous and homologous bone in children, *J. Pediatr. Surg.* 45 (2010) E17–E20.
- [79] M.K. Sen, T. Miclau, Autologous iliac crest bone graft: should it still be the gold standard for treating nonunions, *Injury* 38S1 (2007) S75–S80.
- [80] C.G. Finkemeier, Bone-grafting and bone-graft substitutes, *J. Bone Joint Surg. Am.* 84A (2002) 454–464.
- [81] J.C. Elliott, P.E. Mackie, R.A. Young, Monoclinic hydroxyapatite, *Science*, 180 (1973) 1055–1057.

- [82] G. Ma. X.Y. Liu, Hydroxyapatite: hexagonal or monoclinic?, *Cryst. Growth Des.* 9 (2009) 2991–2994.
- [83] K. Matsunaga, A. Kuwabara, First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite, *Phys. Rev. B* 75 (2007) 014102.
- [84] L. Calderin, M.J. Stott, Electronic and crystallographic structure of apatites, *Phys. Rev. B* 67 (2003) 134106.
- [85] M. Wei, A. J. Ruys, B. K. Milthorpe, C. C. Sorrell, Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: Effects of precipitation method on electrophoretic deposition, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.* 16 (2005) 319–324.
- [86] J. Torrent-Burgues, R. Rodriguez-Clemente, Hydroxyapatite precipitation in a semi batch process, *Cryst. Res. Technol.* 36 (2001) 1075–1082.
- [87] R. Murugan, S. Ramakrishna, Aqueous mediated synthesis of bioresorbable nanocrystalline hydroxyapatite, *J. Cryst. Growth* 274 (2005) 209–213.
- [88] H. Tagai, H. Aoki, *Mechanical Properties of Biomaterials*. London: John Wiley and Sons, 1980.
- [89] L. Bernard, M. Freche, J.L. Lacout, B. Biscans, Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature-influence of purity of the raw material, *Powder Technol.* 103 (1999) 19–25.
- [90] N.A. Palchik, T.N. Grigorieva, V.N. Stolpovskaya, D.K. Arhipenko, T.N. Moroz, Vlijanie uslovia sinteza na strukturnie karakteristiki hidroksilapatita, *J. Appl. Chem.-USSR+* 10 (1997) 1591–1594.
- [91] M.M. Seckler, M. Danese, S. Derenzo, J.V. Valarelli, M. Giuliatti, R. Rodriguez-Clemente, Influence of process conditions on hydroxyapatite crystallinity obtained by direct crystallization, *Mater. Res.* 2 (1999) 59–62.
- [92] D.S. Gouveia, A.H.A. Bressiani, J.C. Bressiani, Phosphoric acid rate addition effect in the hydroxyapatite synthesis by neutralization method, *Mater. Sci. Forum* 530-531 (2006) 593–598.
- [93] A.B. H. Yoruç, Y. Koca, Double step stirring: a novel method for precipitation of nano-sized hydroxyapatite powder, *Dig. J. Nanomater. Bios.* 4 (2009) 73–81.
- [94] A. Afshar, M. Ghorbani, N. Ehsani, M.R. Saeri, C.C. Sorrell, Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite, *Mater. Design* 24 (2003) 197–202.
- [95] S. Lazić, J. Katanić-Popović, S. Zec, N. Miljević, Properties of hydroxyapatite crystallized from high temperature alkaline solutions, *J. Cryst. Growth* 165 (1996) 124–128.

- [96] O.V. Sinitsyna, A.G. Veresov, E.S. Kovaleva, Yu.V. Kolen'ko, V.I. Putlyaev, Yu.D. Tretyakova, Synthesis of hydroxyapatite by hydrolysis of α -Ca₃(PO₄)₂, Russ. Chem. B. 54 (2005) 79–86.
- [97] A. Perloff, A.S. Posner, Preparation of Pure Hydroxyapatite Crystals, Science 124 (1956) 583–584.
- [98] K. Byrappa, T. Adschiri, Hydrothermal technology for nanotechnology, Prog. Cryst. Growth. Charact. Mater. 53 (2007) 117–166.
- [99] J.K. Han, H.Y. Song, F. Saito, B.T. Lee, Synthesis of high purity nano-sized hydroxyapatite powder by microwave-hydrothermal method, Mater. Chem. Phys. 99 (2006) 235–239.
- [100] Y. Wang, S. Zhang, K. Wei, N. Zhao, J. Chen, X. Wang, Hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanopowders using cationic surfactant as a template, Mater. Lett. 60 (2006) 1484–1487.
- [101] Y.J. Wang, C. Lai, K. Wei, X. Chen, Y. Ding, Z.L. Wang, Investigations on the formation mechanism of hydroxyapatite synthesized by the solvothermal method, Nanotechnology, 17 (2006) 4405–4412.
- [102] L. Yan, Y. Li, Z.X. Deng, J. Zhuang, X. Sun, Surfactant-assisted hydrothermal synthesis of hydroxyapatite nanorods, Int. J. Inorg. Mater. 3 (2001) 633–637.
- [103] B.M. Jokic, I. Jankovic-Castvan, D. Veljovic, D.M. Bucevac, K. Obradovic-Djuricic, R.D. Petrovic, D.T. Janackovic, Synthesis and settings behavior of alpha-TCP from calcium deficient hydroxyapatite obtained by hydrothermal method, J. Optoelectron. Adv. M. 9 (2007) 1904–1910.
- [104] L. Yubao, K. de Groot, J. de Wijn, Morphology and composition of nanograde calcium phosphate needle-like crystals formed by simple hydrothermal treatment, J. Mater. Sci.: Mater. Med. 5 (1994) 326–331.
- [105] L.L. Hench, J.K. West, The sol-gel process, Chem. Rev. 90 (1990) 33–72.
- [106] R. Petrović, Sol-Gel postupci sinteze u tehnologiji keramike, Tehnološko-Metalurški Fakultet, Beograd, 2007.
- [107] S.C. Liou, S.Y. Chen, H.Y. Leeb, J.S. Bow, Structural characterization of nano-sized calcium deficient apatite powders, Biomaterials 25 (2004) 189–196.
- [108] W. Feng, L. Mu-sen, L. Yu-penga, Q. Yong-xin, A simple sol-gel technique for preparing hydroxyapatite nanopowders, Mater. Lett. 59 (2005) 916–919.
- [109] I. Bogdanoviciene, A. Beganskiene, K. Toņsuaadu, J. Glaser, H. J. Meyer, A. Kareiva Calcium hydroxyapatite, Ca₁₀(PO₄)₆(OH)₂ ceramics prepared by aqueous sol-gel processing, Mater. Res. Bull. 41 (2006) 1754–1762.

- [110] D.M. Liu, Q. Yang, T. Troczynski, W.J. Tseng, Structural evolution of sol-gel-derived hydroxyapatite, *Biomaterials* 23 (2002) 1679–1687.
- [111] K. Holmberg, *Handbook of applied surface and colloid chemistry*, John Wiley & Sons, 2002.
- [112] I. Lazarević, *Primena površinski aktivnih supstanci*, *Hemijski pregled*, 43 (2002) 36–41.
- [113] A. Forgiarini, J. Esquena, C. González, C. Solans, Studies of the relation between phase behavior and emulsification methods with nanoemulsion formation, *Progr. Colloid. Polym. Sci.* 115 (2000) 36–39.
- [114] G.K. Lim, J. Wang, S.C. Ng, C.H. Chew, L.M. Gan, Processing of hydroxyapatite via microemulsion and emulsion routes, *Biomaterials* 18 (1997) 1433–1439.
- [115] G. Guo, Y. Sun, Z. Wang, H. Guo, Preparation of hydroxyapatite nanoparticles by reverse microemulsion, *Ceram. Int.* 31 (2005) 869–872.
- [116] K. Kandori, A. Yasukawa, T. Ishikawa, Preparation and characterization of spherical calcium hydroxyapatite, *Chem. Mater.* 7 (1995) 26–32.
- [117] S. Bose, S.K. Saha, Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanopowders by emulsion technique, *Chem. Mater.* 15 (2003) 4464–4469.
- [118] J.M. Cao, J. Feng, S.G. Deng, X. Chang, J. Wang, J.S. Liu, P. Lu, H.X. Lu, M.B. Zheng, F. Zhang, J. Tao, Microwave-assisted solid-state synthesis of hydroxyapatite nanorods at room temperature, *J. Mater. Sci.* 40 (2005) 6311–6313.
- [119] S. Pramanik, A.K. Agarwal, K.N. Rai, A. Garg, Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process, *Ceram. Int.* 33 (2007) 419–426.
- [120] M.V. Zdujić, *Mehanoemijski tretman neorganskih materijala*, *Hem. Ind.* 55 (2001) 191–206.
- [121] C. Suryanarayana, Mechanical alloying and milling, *Prog. Mater. Sci.* 46 (2001) 1–184.
- [122] E. Avvakumov, M. Senna, N. Kosova, *Soft Mechanochemical Synthesis*, Kluwer Academic Publishers New York, Boston, Dordrecht, London, Moscow, 2001.
- [123] C. Mochales, H. El Briak-BenAbdeslam, M.P. Ginebra, A. Terolb, J.A. Planella, P. Boudevilleb, Dry mechanochemical synthesis of hydroxyapatites from DCPD and CaO: influence of instrumental parameters on the reaction kinetics, *Biomaterials* 25 (2004) 1151–1158.
- [124] A.V. Dushkin, Potential of mechanochemical technology in organic synthesis, *Chem. Sust. Dev.* 12 (2004) 251–273.

- [125] S. Lugovskoy, M. Nisnevitch, M. Zinigrad, D. Wolf, Mechanochemical synthesis of salicylic acid–formaldehyde chelating co-polymer, *Clean Technol. Envir.* 10 (2008) 279–285.
- [126] C.C. Silva, A.G. Pinheiro, M.A.R. Miranda, J.C. Góes, A.S.B. Sombra, Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis, *Solid State Sci.* 5 (2003) 553–558.
- [127] W. Kim, Q. Zhang, F. Saito, Mechanochemical synthesis of hydroxyapatite from $\text{Ca}(\text{OH})_2\text{-P}_2\text{O}_5$ and $\text{CaO-Ca}(\text{OH})_2\text{-P}_2\text{O}_5$ mixtures, *J. Mater. Sci.* 35 (2000) 5401–5405.
- [128] K.C.B. Yeong, J. Wang, S.C. Ng, Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO_4 , *Biomaterials* 22 (2001) 2705–2712.
- [129] I. Nikčević, V. Jokanović, M. Mitrić, Z. Nedić, D. Makovec, D. Uskoković, Mechanochemical synthesis of nanostructured fluorapatite/fluorhydroxyapatite and carbonated fluorapatite/fluorhydroxyapatite, *J. Solid State Chem.* 177 (2004) 2565–2574.
- [130] T.S.B. Narasaraju, D.E. Phebe, Some physico-chemical aspects of hydroxyapatite, *J. Mat. Sci.* 31 (1996) 1–21.
- [131] I. Smičiklas, A. Onjia, S. Raičević, Đ. Janačković, M. Mitrić, Factors influencing the removal of divalent cations by hydroxyapatite, *J. Hazard. Mater.* 152 (2008) 876–884.
- [132] S. Lazarevic, I. Jankovic-Castvan, D. Tanaskovic, V.P. Pavicevic, D.T. Janackovic, R.D. Petrovic, Sorption of Pb^{2+} , Cd^{2+} , and Sr^{2+} ions on calcium hydroxyapatite powder obtained by the hydrothermal method, *J. Environ. Eng.* 134 (2008) 683–688.
- [133] T.S. Kaludjerovic-Radoicic, S.D. Raicevic, In situ lead stabilization using natural and synthetic apatite, *Chem. Ind. Chem. Eng. Q.* 14 (2008) 269–271.
- [134] I.D. Smiciklas, A.E. Onjia, J.P. Markovic, S.D. Raicevic, Comparison of hydroxyapatite sorption properties towards cadmium, lead, zinc and strontium ions, *Mater. Sci Forum.* 494 (2005) 405–410.
- [135] S.D. Raicevic, T.S. Kaludjerovic-Radoicic, A.I. Zouboulis, In situ stabilization of toxic metals in polluted soils using phosphates: theoretical prediction and experimental verification, *J. Hazard. Mater.* 117 (2005) 41–53.
- [136] Y. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, R.J. Reeder, Y.J. Lee, Zinc incorporation into hydroxylapatite, *Biomaterials* 30 (2009) 2864–2872.
- [137] K. Zhu, J. Qiu, H. Ji, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Crystallographic study of lead-substituted hydroxyapatite synthesized by high-temperature mixing method under hydrothermal conditions, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 1785–1790.

- [138] H. El Feki, A. Ben Salah, A. Daoud, A. Lamure, C. Lacabanne, Studies by thermally stimulated current (TSC) of hydroxyl and fluoro-carbonated apatites containing sodium ions, *J. Phys. Condens. Mater.* 12 (2000) 8331–8343.
- [139] E.A.P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, D.E. Naessens, Effect of heating on the constitution of Na^+ and CO_3^{2-} containing apatites obtained by hydrolysis of monetite, *Inorg. Chem.* 33 (1993) 5999–6006.
- [140] E.A.P. De Maeyer, R.M.H. Verbeeck, I.Y. Pieters, Effect of K^+ on the stoichiometry of carbonated hydroxyapatite obtained by the hydrolysis of monetite, *Inorg. Chem.* 1996, 35, 857–863.
- [141] H. El Feki, J.M. Savariault, A.B. Salah, Structure refinements by the Rietveld method of partially substituted hydroxyapatite: $\text{Ca}_9\text{Na}_{0.5}(\text{PO}_4)_{4.5}(\text{CO}_3)_{1.5}(\text{OH})_2$, *J. Alloys Comp.* 287 (1999) 114–120.
- [142] S. Kannan, J. M. G. Ventura, J. M. F. Ferreira, Synthesis and thermal stability of potassium substituted hydroxyapatites and hydroxyapatite/ β -tricalciumphosphate mixtures, *Ceram. Int.* 33 (2007) 1489–1494.
- [143] N. Rameshbabu, T.S. Sampath Kumar, T.G. Prabhakar, V.S. Sastry, K.V.G.K. Murty, K.P. Rao, Antibacterial nanosized silver substituted hydroxyapatite: Synthesis and characterization, *J. Biomed. Mater. Res.* 80A (2007) 581–591.
- [144] E. Boanini, M. Gazzano, A. Bigi, Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.* 6 (2010) 1882–1894.
- [145] F. Ren, Y. Leng, R. Xin, X. Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 6 (2010) 2787–2796.
- [146] F. Miyaji, Y. Kono, Y. Suyama, Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite, *Mater. Res. Bull.* 40 (2005) 209–220.
- [147] Y. Tang, H.F. Chappell, M.T. Dove, R.J. Reeder, Y.J. Lee, Zinc incorporation into hydroxylapatite, *Biomaterials* 30 (2009) 2864–2872.
- [148] M. Misono, W.K. Hall, Oxidation-reduction properties of copper- and nickel-substituted hydroxyapatites, *J. Phys. Chem.* 77 (1973) 791–800.
- [149]. A. Bigi, E. Foresti, F. Marchetti, A. Ripamonti, N. Roveri. Barium calcium hydroxyapatite solid solutions, *J. Chem. Soc., Dalton Trans.* (1984) 1091–1093.
- [150] K. Zhu, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method, *J. Eur. Ceram. Soc.* 26 (2006) 509–513.
- [151] K. Zhu, J. Qiu, H. Ji, K. Yanagisawa, R. Shimanouchi, A. Onda, K. Kajiyoshi, Crystallographic study of lead-substituted hydroxyapatite synthesized by high-

- temperature mixing method under hydrothermal conditions, *Inorg. Chim. Acta* 363 (2010) 1785–1790.
- [152] Y. Lee, Y.M. Hahm, S. Matsuya, M. Nakagawa, K. Ishikawa, Characterization of macroporous carbonate-substituted hydroxyapatite bodies prepared in different phosphate solutions, *J. Mater. Sci.* 42 (2007) 7843–7849.
- [153] D. Shi, *Introduction to biomaterials*, Tsinghua University Press, Beijing, P.R. China, 2005.
- [154] G.L. Schmidt, G.T. Altman, Biofilms in orthopaedic surgery, *Oper. Tech. Orthop.* 12 (2002) 242–246.
- [155] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials* 27 (2006) 2331–2339.
- [156] L.G. Harris, R.G. Richards, Staphylococci and implant surfaces: a review, *Injury* 37 (2006) S3–S14.
- [157] F. Gotz, Staphylococcus and biofilms, *Mol. Microbiol.* 43 (2002) 1367–1378.
- [158] Y.H. An, J. Bradley, D.L. Powers, R.J. Friedman, The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model, *J. Bone Joint Surg. [Br]* 79-B (1997) 816–819.
- [159] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials* 27 (2006) 2331–2339.
- [160] A.A. Campbell, L. Song, X.S. Li, B.J. Nelson, C. Bottoni, D.E. Brooks, E.S. DeJong, Development, characterization, and anti-microbial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization, *Biomed. Mater. Res.* 53 (2000) 400–407.
- [161] L. Zhao, P.K. Chu, Y. Zhang, Z. Wu, Antibacterial coatings on titanium implants, *J. Biomed. Mater. Res.* 91B (2009) 470–480.
- [162] P. Bahna, T. Dvorak, H. Hanna, A.W. Yasko, R. Hachem, I. Raad, Orthopaedic metal devices coated with a novel antiseptic dye for the prevention of bacterial infections, *Int. J. Antimicrob. Ag.* 29 (2007) 593–596.
- [163] I.R. Sanchez, Chlorhexidine diacetate and povidone-iodine cytotoxicity to canine embryonic fibroblasts and *Staphylococcus aureus*, *Vet. Surg.* 17 (1988) 182–1855.
- [164] G. Zhao, S.E. Stevens, Multiple parameters for the comprehensive evaluation of the susceptibility of *Escherichia coli* to the silver ion, *BioMetals* 11 (1998) 27–32.
- [165] J.L. Clement, P.S. Jarrett, Antibacterial silver, *Met. Based Drugs.* 1 (1994) 467–482.

- [166] A.H. Conrad, C.R. Tramp, C.J. Long, D.C. Wells, A.Q. Paulsen, G.W. Conrad, Ag⁺ alters cell growth, neurite extension, cardiomyocyte beating, and fertilized egg constriction, *Aviat. Space Environ. Med.* 70 (1999) 1096–1105.
- [167] C.F. Albright, R. Nachum, M.D. Lechtman, Electrolytic silver ion generator for water sterilization in Apollo spacecraft water systems. Apollo applications program, NASA Contract. Rep. 1967; Report Number: NASA-CR-65738.
- [168] H. Kalouche, A. Watson, D. Routley, Blue lunulae: argyria and hypercoppreaemia, *Austral J. Dermatol.* 48 (2007) 182–184.
- [169] H. Kawamura, A. Ito, S. Miyakawa, P. Layrolle, K. Ojima, N. Ichinose, T. Tateishi, Stimulatory effect of zinc-releasing calcium phosphate implant on bone formation in rabbit femora, *J. Biomed. Mater. Res.* 50 (2000) 184–190.
- [170] H. Storrie, S.I. Stupp, Cellular response to zinc-containing organoapatite: An in vitro study of proliferation, alkaline phosphatase activity and biomineralization, *Biomaterials* 26 (2005) 5492–5499.
- [171] H. Babich, G. Stotzky, Toxicity of zinc to fungi, bacteria, and coliphages: Influence of chloride ions, *Appl. Environ. Microbiol.* 36 (1978) 906–914.
- [172] M. Heinlaan, A. Ivask, I. Blinova, H.C. Dubourguier, A. Kahru, Toxicity of nanosized and bulk ZnO, CuO and TiO₂ to bacteria *Vibrio fischeri* and crustaceans *Daphnia magna* and *Thamnocephalus platyurus*, *Chemosphere* 71 (2008) 1308–1316.
- [173] G. Borkow, J. Gabbay, Copper as a biocidal tool, *Curr. Med. Chem.* 12 (2005) 2163–2175.
- [174] N.N. Surve, U.S. Badge, Silver toxicity in pathogenic *Staphylococcus epidermidis* and *Klebsiella pneumoniae*, *Int. J. Integ. Biol.* 7 (2009) 139–144.
- [175] R.G. Pearson, Hard and soft acids and bases, *J. Am. Chem. Soc.* 85 (1963) 3533–3539.
- [176] N.B. Milić. Kompleksi i klasterna jedinjenja. Prirodno-matematički fakultet Kragujevac, 1998, 304–315.
- [177] S.Y. Liao, D.C. Read, W.J. Pua, J.R. Furr, A.D. Russell, Interaction of silver nitrate with readily identifiable groups relationship to the antibacterial action of silver ions, *Lett. Appl. Microbiol.* 25 (1997) 279–283.
- [178] W.K. Jung, H.C. Koo, K.W. Kim, S. Shin, S.H. Kim, Y.H. Park, Antibacterial activity and mechanism of action of the silver ion in *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microb.* 74 (2008) 2171–2178.
- [179] R.E. Gross, P. Pugno, W.M. Dugger, Observations on the mechanism of copper damage in *Chlorella*, *Plant Physiol.* 46 (1970) 183–185.

- [180] A. Cedeno-Maldonado, J.A. Swader, Studies on the mechanism of copper toxicity in *Chlorella*, *Weed Sci.* 22 (1974) 443–449.
- [181] D.F. Sargent, C.P.S. Taylor, The effect of cupric and fluoride ions on the respiration of *Chlorella*, *Can. J. Bot.* 50 (1972) 905–907.
- [182] D.C.H. McBrien, K.A. Hassall, The effect of toxic doses of copper upon respiration, photosynthesis and growth of *Chlorella vulgaris*, *Physiol. Plant.* 20 (1967) 113–117.
- [183] E.S. Nielsen, L. Kamp-Nielsen, S. Wium-Andersen, The effect of deleterious concentrations of copper on the photo-synthesis' of *Chlorella pyrenoidosa*, *Physiol. Plant.* 22 (1969) 1121–1133.
- [184] Y. Ohsumi, K. Kitamoto, Y. Anraku, Changes induced in the permeability barrier of the yeast plasma membrane by cupric ion, *J. Bacteriol.* 170 (1988) 2676–2682.
- [185] W.J.A. Schreurs, H. Rosenberg, Effect of silver ions on transport and retention of phosphate by *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 152 (1982) 7–13.
- [186] J.P. Guggenbichler, M. Böswald, S. Lugauer, T. Krall, A new technology of microdispersed silver in polyurethane induced antimicrobial activity in central venous catheters, *Infection* 27 (1999) S16–S23.
- [187] K.B. Holt, A.J. Bard, Interaction of Silver(I) ions with the respiratory chain of *Escherichia coli*: an electrochemical and scanning electrochemical microscopy study of the antimicrobial mechanism of micromolar Ag^+ , *Biochemistry* 44 (2005) 13214–13223.
- [188] A.L. Semeykina, V.P. Skulachev, Submicromolar Ag^+ increases passive Na^+ permeability and inhibits the respiration-supported formation of Na^+ gradient in *Bacillus* FTU vesicles, *FEBS* 269 (1990) 69–72.
- [189] M. Yamanaka, K. Hara, J. Kudo, Bactericidal actions of a silver ion solution on *Escherichia coli*, studied by energy-filtering transmission electron microscopy and proteomic analysis, *Appl. Environ. Microb.* 71 (2005) 7589–7593.
- [190] R.M. Izatt, J.J. Christensen, J.H. Rytting, Sites and thermodynamic quantities associated with proton and metal ion interaction with ribonucleic acid, deoxyribonucleic acid, and their constituent bases, nucleosides, and and nucleotides, *Chem. Rev.* 71 (1971) 439–481.
- [191] S.R.K. Pandian, V. Deepak, K. Kalishwaralal, P. Viswanathan, S. Gurunath, Mechanism of bactericidal activity of silver nitrate – a concentration dependent bifunctional molecule, *Braz. J. Microbiol.* 41 (2010) 805–809.
- [192] Q.L. Feng, J. Wu, G.Q. Chen, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.O. Kim, A mechanistic study of the antibacterial effect of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus aureus*, *J. Biomed. Mater. Res.* 52 (2000) 662–668.

- [193] L. Lu, R. W.Y. Sun, R. Chen, C.K. Hui, C.M. Ho, J.M. Luk, G.K.K. Lau, C.M. Che, Silver nanoparticles inhibit hepatitis B virus replication, *Antiv. Ther.* 13 (2008) 253–262.
- [194] Y. Haraguchi, H. Sakurai, S. Hussain, B. M. Anner, H. Hoshino. Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds, *Antivir. Res.* 43 (1999) 123–133.
- [195] S.J. Stohs, D. Bagchi, Oxidative mechanisms in the toxicity of metal ions, *Free Radic. Biol. Med.* 18 (1995) 321–336.
- [196] J.L. Sagripanti, Metal-based formulations with high microbicidal activity, *Appl. Environ. Microbiol.* 58 (1992) 3157–3162.
- [197] L. Rodriguez-Montelongo, L.C. de la Cruz-Rodriguez, R.N. Fariás, E.M. Massa, membrane-associated redox cycling of copper mediates hydroperoxide toxicity in *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1144 (1993) 77–84.
- [198] J.L. Sagripanti, L.B. Routson, C.D. Lytle, Virus inactivation by copper or iron ions alone and in the presence of peroxide, *Appl. Environ. Microbiol.* 59 (1993) 4374–4376.
- [199] J.L. Sagripanti, L.B. Routson, C.D. Lytle, A.C. Bonifacino, C.D. Lytle, Mechanism of copper-mediated inactivation of *Herpes simplex virus*, *Antimicrob. Agents Ch.* 41 (1997) 812–817.
- [200] R.L. Davies, S.F. Etris, The development and functions of silver in water purification and disease control, *Catal. Today* 36 (1997) 107–114.
- [201] M. Radetić, V. Ilić, V. Vodnik, S. Dimitrijević, P. Jovančić, Z. Šaponjić, J.M. Nedeljković, Antibacterial effect of silver nanoparticles deposited on coronatreated polyester and polyamide fabrics, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008) 1816–1821.
- [202] Y. F. Dufrêne, AFM for nanoscale microbe analysis, *Analyst* 133 (2008) 297–301.
- [203] M.J. Parnham, H. Wetzig, Toxicity screening of liposomes, *Chem. Phys. Lipids.* 64 (1993) 263–274.
- [204] L. Yinghui, C. Xiguang, W. Qizhao, W. Ye, Z. Jing, L. Chengsheng, L. Chenguang, M. Xianghong, Y. Lejun, Synthesis and characterization of chitosan-based biomaterials modified with different active groups and their relationship with cytotoxicity, *J. Wuhan Univ. Technol.* 22 (2007) 695–700.
- [205] Y. Li, J. Ho, C.P. Ooi, Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles, *Colloid. Surf. A* 142 (1998) 107–116.
- [206] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, Densification behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites, *J. Eur. Ceram. Soc.* 20 (2000) 2377–2387.

- [207] A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri, Isomorphous substitutions in β -tricalcium phosphate: the different effects of zinc and strontium, *J. Inorg. Biochem.* 58 (1995) 49–58.
- [208] R.Z. LeGeros, C.B. Bleiwas, M. Retino, R. Rohanizadeh, J.P. LeGeros, Zinc effect on the in vitro formation of calcium phosphates: relevance to clinical inhibition of calculus formation, *Am. J. Dent.* 12 (1999) 65–71.
- [209] A. Antić-Jovanović, *Molekulska spektroskopija*, Fakultet za fizičku hemiju, Beograd, 2002, 176.
- [210] M.J. Phillips, J.A. Darr, Z.B. Luklinska, I. Rehman, Synthesis and characterization of nanobiomaterials with potential osteological applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 14 (2003) 875–882.
- [211] S. Koutsopoulos, Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods, *J. Biomed. Mater. Res.* 62 (2002) 600–612.
- [212] T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Doremus, R.W. Siegel, R. Bizios, Enhanced functions of osteoblasts on nanophase ceramics, *Biomaterials* 21 (2000) 1803–1810.
- [213] M. Thorwarth, S. Schultze-Mosgau, P. Kessler, J. Wiltfang, K.A. Schlegel, Bone regeneration in osseous defects using a resorbable nanoparticulate hydroxyapatite, *J. Oral Maxillofac. Surg.* 63 (2005) 1626–1633.
- [214] W. Xue, S. Tao, X. Liu, X. Zheng, C. Ding, In vivo evaluation of plasma sprayed hydroxyapatite coatings having different crystallinity, *Biomaterials* 25 (2004) 415–421.
- [215] I. Mayer, J.D.B. Featherstone, Dissolution studies of Zn-containing carbonated hydroxyapatites, *J. Cryst. Growth* 219 (2000) 98–101.
- [216] B. Sutter, L.R. Hossner, D.W. Ming, Dissolution kinetics of iron-, manganese-, and copper-containing synthetic hydroxyapatites, *Soil Sci. Soc. Am. J.* 69 (2005) 362–370.
- [217] D. Campoccia, L. Montanaro, C.R. Arciola, The significance of infection related to orthopedic devices and issues of antibiotic resistance, *Biomaterials* 27 (2006) 2331–2339.
- [218] P. Hardy, R. Kania, S. Verliac, A. Lortat-Jacob, J. Benoit, Infection following the use of porous hydroxyapatite ceramic as a bone defect filler in articular fractures, *Eur. J. Orthop. Surg. Traumatol.* 7 (1997) 63–67.
- [219] A. Leonhardt, S. Renvert, G. Dahlén, Microbial findings at failing implants, *Clin. Oral. Impl. Res.* 10 (1999) 339–345.
- [220] C.S.P. Tsang, H. Ng, A.S. McMillan, Antifungal susceptibility of *Candida albicans* biofilms on titanium discs with different surface roughness, *Clin. Oral Invest.* 11 (2007) 361–368.

- [221] F. Arias, S. Mata-Essayag, M.E. Landaeta, C.H. de Capriles, C. Pérez, M.J. Núñez, A. Carvajal, M. Silva, *Candida albicans* osteomyelitis: case report and literature review, *Int. J. Infect. Dis.* 8 (2004) 307–314.
- [222] A. Mo, J. Liao, W. Xu, S. Xian, Y. Li, S. Bai, Preparation and antibacterial effect of silver-hydroxyapatite/titania nanocomposite thin film on titanium, *Appl. Surf. Sci.* 255 (2008) 435–438.
- [223] Q. Chang, H. He, Z. Ma, Efficient disinfection of *Escherichia coli* in water by silver loaded alumina, *J. Inorg. Biochem.* 102 (2008) 1736–1742.
- [224] J.S. Kim, E. Kuk, K.N. Yu, J.H. Kim, S.J. Park, H.J. Lee, S.H. Kim, Y.K. Park, Y.H. Park, C.Y. Hwang, Y.K. Kim, Y.S. Lee, D.H. Jeong, M.H. Cho, Antimicrobial effects of silver nanoparticles, *Nanomedicine* 3 (2007) 95–101.
- [225] S. Shrivastava, T. Bera, A. Roy, G. Singh, P. Ramachandrarao, D. Dash, Characterization of enhanced antibacterial effects of novel silver nanoparticles, *Nanotechnology* 18 (2007) 225103.
- [226] W.K. Son, J.H. Youk, T.S. Lee, W.H. Park, Preparation of antimicrobial ultrafine cellulose acetate fibers with silver nanoparticles, *Macromol. Rapid Commun.* 25 (2004) 1632–1637.
- [227] M. Kostić, N. Radić, B. M. Obradović, S. Dimitrijević, M. M. Kuraica, P. Škundrić, Silver-loaded cotton/polyester fabric modified by dielectric barrier discharge treatment, *Plasma Process. Polym.* 5 (2008) 58–67.
- [228] M. Radetić, V. Ilić, V. Vodnik, S. Dimitrijević, P. Jovančić, Z. Šaponjić, J. M. Nedeljković, Antibacterial effect of silver nanoparticles deposited on corona-treated polyester and polyamide fabrics, *Polym. Adv. Technol.* 19 (2008) 1816–1821.
- [229] W. Chen, Y. Liu, H.S. Courtney, M. Bettenga, C.M. Agrawal, J.D. Bumgardner, J.L. Ong, In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating, *Biomaterials* 27 (2006) 5512–5517.
- [230] R.J. Chung, M.F. Hsieh, C.W. Huang, L.H. Perng, H.W. Wen, T.S. Chin, Antibacterial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings, *J. Biomed. Mater. Res.* 76B (2006) 169–178.
- [231] Q.L. Feng, F.Z. Cui, T.N. Kim, J.W. Kim, Ag-substituted hydroxyapatite coatings with both antimicrobial effects and biocompatibility, *J. Mater. Sci. Lett.* 18 (1999) 559–561.
- [232] Q.L. Feng, T.N. Kim, J. Wu, E.S. Park, J.O. Kim, D.Y. Lim, F.Z. Cui, Antibacterial effects of Ag-HAp thin films on alumina substrates, *Thin Solid Films* 335 (1998) 214–219.

- [233] M. Díaz, F. Barba, M. Miranda, F. Guitián, R. Torrecillas, J. S. Moya. Synthesis and antimicrobial activity of a silver-hydroxyapatite nanocomposite, *J. Nanomater.* 2009, doi:10.1155/2009/498505.
- [234] Y. Zhang, Q.S. Yin, H.F. Zhao, J. Li, Y.T. Wei, F.Z. Cui, H.Y. Huang, Antibacterial and biological properties of silver-loaded coralline hydroxyapatite, *Front. Mater. Sci. China* 4 (2010) 359–365.
- [235] T.N. Kim, Q.L. Feng, J.O. Kim, J. Wu, H. Wang, G.C. Chen, F.Z. Cui, Antimicrobial effects of metal ions (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+}) in hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 9 (1998) 129–134.
- [236] R.J. Chung, M.F. Hsieh, K.C. Huang, L.H. Perng, F.I. Chou, T.S. Chin, Anti-microbial hydroxyapatite particles synthesized by a sol–gel route, *J. Sol-Gel Sci. Techn.* 33 (2005) 229–239.
- [237] Y. Li, J. Ho, C. P. Ooi, Antibacterial efficacy and cytotoxicity studies of copper (II) and titanium (IV) substituted hydroxyapatite nanoparticles, *Mater. Sci. Eng. C* 30 (2010) 1137–1144.
- [238] H. Tanaka, S. Ebara, K. Otsuka, K. Hayashi, Adsorption of saliva-coated and plain streptococcal cells to the surfaces of hydroxyapatite beads, *Archs Oral Biol* 41 (1996) 505–508.
- [239] E.D. Berry, G.R. Siragusa, Hydroxyapatite adherence as a means to concentrate bacteria, *Appl. Environ. Microbiol.* 63 (1997) 4069–4074.
- [240] W.B. Clark, L.L. Bammann, R.J. Gibbons, Comparative estimates of bacterial affinities and adsorption sites on hydroxyapatite surfaces, *Infect. Immun.* 19 (1978) 846–853.
- [241] S.Tsuro, N. Shinomiya, Y. Katsura, Y. Uwabe, M. Noritake, M. Rokutanda, Adsorption and preparation of human viruses using hydroxyapatite column, *Biomed. Mater. Eng.* 1 (1991) 143–147.
- [242] M. Kuiper, R.M. Sanches, J.A. Walford, N.K.H. Slater, Purification of a functional gene therapy vector derived from moloney murine leukaemia virus using membrane filtration and ceramic hydroxyapatite chromatography, *Biotechnol. Bioeng.* 80 (2002) 445–453.
- [243] D. Albert, Materials characterization as an integral part of global biocompatibility, *Med. Plast. Biomater.* 11 (1997) 16–23.
- [244] Z. Ajduković, A. Dimić, S. Stanković, N. Krunic, Lj. Aleksov, N. , Mineralne materije u kostanom tkivu i krvi pacijentkinja sa osteoporozom, *Med. Pregl.* 9-10 (2009) 402–406.

- [245] R. Riihonen, S. Nielsen, H. K. Väänänen, T. Laitala-Leinonen, T. H. Kwon, Degradation of hydroxyapatite in vivo and in vitro requires osteoclastic sodium-bicarbonate co-transporter NBCn1, *Matrix Biol.* 29 (2010) 287–294.
- [246] S. Yamada, D. Heymann, J.M. Bouler, G. Daculsi, Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro, *J. Biomed. Mater. Res.* 37 (1997) 346–352.
- [247] S.A. Redey, S. Razzouk, C. Rey, D. Bernache-Assollant, G. Leroy, M. Nardin, G. Cournot, Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: relationship to surface energies, *J. Biomed. Mater. Res.* 45 (1999) 140–147.
- [248] L. Zolla, G. Lupioll, G. Amiconi, Effect of mercuric ions on human erythrocytes. 1. rate of haemolysis induced by osmotic shock as a function of incubation time, *Toxicol. In Vitro* 8 (1994) 483–490.
- [249] K. Gwoździński, H. Roche, G. Pérès, The comparison of the effects of heavy metal ions on the antioxidant enzyme activities in human and fish *dicentrarchus labrax*, *Comp. Biochem. Phys. C* 102 (1992) 57–60.
- [250] E.G. Ball, Hemolytic action of silver occurring as an impurity in chemically pure sodium chloride, *Biol. Bull.* 3 (1933) 277–288.
- [251] A. Wadhera, M. Fung, Systemic argyria associated with ingestion of colloidal silver, *Dermatol. Online J.* 11 (2005) 12–21.
- [252] J. Wiessner, G. Mandel, P. Halverson, N. Mandel, The effect of hydroxyapatite crystallinity on hemolysis, *Calcif. Tissue Int.* 42 (1988) 210–219.
- [253] Y. Lijian, J. Huafang, Y. Lin, Blood compatibility of nano-hydroxyapatite dispersed using various agents, *J. Wuhan Univ. Technol.* 15 (2010) 350–354.
- [254] Y. Chen, X. Zheng, Y. Xie, C. Ding, H. Ruan, C. Fan, Anti-bacterial and cytotoxic properties of plasma sprayed silver-containing HA coatings, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (2008) 3603–3609.
- [255] L.R. Woodhouse, L.J. Lederer, N.M. Lowe, J.C. King, The effects of zinc status on the osmotic fragility of human erythrocytes, trace elements in man and animal - 9: “Proceedings of the ninth international symposium on trace elements in man and animals.”, 1997 636–638.
- [256] Y.F. Dufrêne, AFM for nanoscale microbe analysis, *Analyst* 133 (2008) 297–301.
- [257] X. Yang, W. Yang, Q. Wang, H. Li, K. Wang, L. Yang, W. Liu, Atomic force microscopy investigation of the characteristic effects of silver ions on *Escherichia coli* and *Staphylococcus epidermidis*, *Talanta* 81 (2010) 1508–1512.

Прилог 1.

Изјава о ауторству

Изјављујем да је докторска дисертација под насловом:

**Испитивање антимикуробних активности материјала на бази калцијум
хидроксиапатита**

- резултат сопственог истраживачког рада,
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио интелектуалну својину других лица.

Потпис

У Београду, 16.04.2014.

Вјислав Сиванић

Прилог 2.

Изјава о коришћењу

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

Испитивање антимикробних активности материјала на бази калцијум хидроксиапатита

која је моје ауторско дело.

Сагласан/на сам да електронска верзија моје дисертације буде доступна у отвореном приступу.

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 следећој страници.)

Потпис



У Београду, 16.04.2014.