

# BIOMIMETSKI POSTUPAK SINTEZE KALCIJUM HIDROKSIAPATITA

## BIOMIMETIC METHOD OF CALCIUM HYDROXYAPATITE SYNTHESIS

V. Jokanović<sup>1</sup>, B. Čolović<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Institut za nuklearne nauke "Vinča", Beograd, Srbija

### Izvod

Kalcijum hidroksiapatit (HAP) je sintetisan biomimetskim putem u simulirajućem telesnom fluidu (STF), kao i u STF-u kombinovanom sa serumom iz fetusa govečeta (Fetal Calf Serum-FCS) i sa Iglovim medijumom (Eagle's Minimum Essential Medium-EMEM). Jonski sastav korišćenog STF-a je sličan jonskom sastavu krvne plazme, uz blage razlike u koncentraciji pojedinih vrsta jona, dok je njegova pH vrednost podešena na 7.4 što odgovara fiziološkim uslovima. Kao supstrat na čijoj površini se odigrava biomimetska depozicija apatita korišćeni su tanki filmovi silicijum dioksida, prethodno naneti na čelične trake. Za analizu faza dobijenih na površini SiO<sub>2</sub> filmova nakon različitih perioda nukleacije korišćena je FTIR-ATR metoda. SEM ispitivanja ukazala su na mehanizam odigravanja nukleacije, dok je kombinacijom metode merenja mase filma i BET metode pokazano da debljina filma nukleiranog kalcijum hidroksiapatita zavisi od vremena boravka uzoraka u STF-u.

**Ključne riječi:** Kalcijum-hidroksiapatit, biomimetski postupak, nukleacija.

### Abstract

Calcium hydroxyapatite (CHA) has been synthesized biomimetically using simulated body fluid (SBF) alone and in combination with Fetal Calf Serum (FCS) and Eagle's Minimum Essential Medium (EMEM). Chemical composition of the used SBF is like composition of human plasma, with small differences in some ions concentrations, and pH value was adjusted to 7.4, that corresponds to pH of physiological media. As substrate for biomimetic deposition of apatite, thin films of silica, deposited on steel plates, were used. The analysis of phases obtained on the surface of SiO<sub>2</sub> films after different periods of CHA nucleation, was done by FTIR-ATR method. SEM investigations pointed out the mechanism of nucleation, while combination of the method of measurement of film mass and BET method showed that thickness of nucleated CHA films depend on time of sample soaking in SBF.

**Key words:** Calcium hydroxyapatite (CHA), Biomimetic method, Nucleation.

## 1. UVOD

U praksi se pokazalo da metalni implanti korišćeni u stomatologiji i ortopediji, uprkos nizu dobrih osobina kako što su biokompatibilnost, dobre mehaničke osobine i otpornost na koroziju, nisu u potpunosti zadovoljavajući, jer ne formiraju adekvatne veze sa tkivom kosti usled čega je osteointegracija nepotpuna [1, 2]. Znatno bolja osteointegracija postiže se oblaganjem metalne površine tankim filmom kalcijum fosfata zbog njihove naglašene bioaktivnosti i osteokonduktivnosti [3, 4]. Postoji niz fizičkih i hemijskih metoda deponovanja takvih prevlaka na površinama izabranih metalnih substrata ili pak njihovog deponovanja nakon prethodnog deponovanja na njima keramičkih prevlaka neke druge vrste ( $\text{SiO}_2$ ,  $\text{TiO}_2$  i  $\text{ZrO}_2$ ) medju kojima biomimetska metoda ima posebno mesto. Ona je zasnovana na korišćenju rastvora sličnog jonskog sastava kao krvna plazma i samim tim u sličnim uslovima dolazi do nukleacije hidroksiapatita, čime se dobija apatit sličnih strukturnih i morfoloških karakteristika kao prirodna kost [5-10]. Deponovanje apatita na metalne površine, olakšano je prethodnim prevlačenjem površine metala tankim slojem silicijum dioksida, koji deluje kao aktivator nukleacije apatita usled katalitičkog efekta silanolnih grupa prilikom akumulacije kalcijumovih i fosfatnih jona iz STF-a [11-13].

U ovom radu proučavan je mehanizam nukleacije kalcijum hidroksiapatita na čeličnim trakama presvučenim slojem  $\text{SiO}_2$ , koristeći STF, kao i STF u kombinaciji sa FCS-om i EMEM-om koji usled prisustva amino grupa povoljno utiču na kinetiku nukleacije HAP-a.

## 2. EKSPERIMENTALNI DEO

Depozicija  $\text{SiO}_2$  filmova na čelične trake: Filmovi silicijum dioksida deponovani su na trake od nerđajućeg čelika koristeći dvofluidnu mlaznicu za raspršavanje. Koloidni rastvor  $\text{SiO}_2$ , koji su činile čestice uniformne veličine od 6.7 nm [14], koncentracije 13.5 %, uveden je u staklenu mlaznicu prečnika 0.2mm i raspršavan je dovođenjem struje vazduha u mlaznicu kontrolisanom brzinom. Mlaznica je pomerana duž čelične trake (Sandvik OC 404, debljina 35  $\mu\text{m}$ , širina 3 cm, dužina 10 cm) raspršavajući rastvor  $\text{SiO}_2$  po njenoj površini. Proces je kompjuterski kontrolisan, omogućavajući podešavanje brzine i pravca kretanja mlaznice. Brzina mlaznice od 1  $\text{cm s}^{-1}$  obezbedila je dovoljno vremena da deponovane kapi  $\text{SiO}_2$  prođu kroz nekoliko uzastopnih procesa: otparavanje rastvarača, taloženje  $\text{SiO}_2$ , sušenje, piroliza  $\text{SiO}_2$  i rast filma. Debljina deponovanog  $\text{SiO}_2$  filma iznosila je 22.5  $\mu\text{m}$ . Priprema simuliranog telesnog fluida: STF je pripremljen po Kokubovoj recepturi pri čemu su koncentracije pojedinih jona bile:

$$c_{\text{Cl}^-} = 0.054 \text{ mol dm}^{-3}; c_{\text{Na}^+} = 0.0542 \text{ mol dm}^{-3}; c_{\text{Ca}^{2+}} = 0.0025 \text{ mol dm}^{-3}; c_{\text{PO}_4^{3-}} = 0.001 \text{ mol dm}^{-3}; c_{\text{Mg}^{2+}} = 0.0003 \text{ mol dm}^{-3}; c_{\text{NO}_3^-} = 0.0006 \text{ mol dm}^{-3} \text{ and } c_{\text{K}^+} = 0.0014 \text{ mol dm}^{-3} [3].$$

Može se primetiti da su koncentracije  $\text{PO}_4^{3-}$  i  $\text{Ca}^{2+}$  jona nešto veće, a koncentracije  $\text{Na}^+$  i  $\text{Cl}^-$  jona nešto manje nego kod originalnog STF-a. pH vrednost STF-a podešena je na 7.4. Formiranje biomimetskog HAP-a: Čelične trake sa deponovanim  $\text{SiO}_2$  filmom su isečene na deliće, od kojih je jedan deo potopljen u STF, drugi deo u STF sa dodatkom FCS-a, dok je treći deo potopljen u STF sa dodatkom EMEM-a. Uzorci su ostavljeni da stoje u STF-u do isteka određenog vremena (10, 14, 20, 33 i 43 dana), pri čemu je dolazilo do samonukleacije HAP-a na njihovoj površini. Nakon vađenja iz STF-a uzorci su isprani dejonizovanom vodom i analiziran je fazni sastav nukleiranog filma. Metode karakterizacije formiranog HAP-a: Faze nukleirane na površini  $\text{SiO}_2$  filmova nakon različitih perioda nukleacije analizirane su FTIR-ATR metodom (Nicollet 380 FT-IR, Thermo Electron Corporation). Morfologija i struktura  $\text{SiO}_2$  filmova kao i filmova nukleiranog HAP-a analizirane su SEM mikroskopijom (SEM JEOL 5300).

Teorijska debljina filma određena je iz merenja promene mase uzorka čelične trake tokom procesa deponovanja CHA filma. Ta promena mase odgovara masi samonukleiranog CHA. Budući da su izabrane čelične pločice definisane geometrije (pravougaone forme), iz date vrednosti i specifične gustine CHA ( $\rho = 3.156 \text{ g/cm}^3$ ) određena je prividna zapremina, a potom i prividna debljina filma, koristeći proste izraze  $V=m/\rho$  i  $d=V/S$ , gde su  $m$  masa filma,  $V$ , prividna zapremina filma,  $\rho$  specifična gustina filma,  $S$  površina filma, a  $d$  prividna debljina filma.

Da bi se odredila stvarna debljina filma, korišćen je BET metod, na osnovu koga je određena ukupna zapremina pora u zapremini filma. Potom, zbir zapremine filma dobijen iz merenja mase filma i zapremine pora određen BET metodom dao je stvarnu ukupnu zapreminu filma. Iz odnosa te zapremine i površine filma napokon dobijena je stvarna debljina CHA filma.

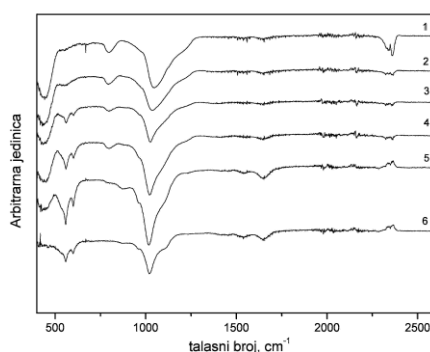
Za određivanje ukupne zapremine pora u CHA filmu korišćena je BET metoda zasnovana na adsorpciji azota (uredjaj Sorptomatic 1990, Thermoquest CE Instruments) Uzorci (0.20–0.22 g) za adsorpciona merenja su prethodno degazirani na  $150^\circ\text{C}$  u toku 3 h. Na osnovu adsorbovane  $\text{N}_2$  zapremine (čistoće 99.99%), određena je prvo specifična površina CHA filma koristeći korelaciju  $p/(V_{\text{ads}}(p_0 - p))$  vs.  $p/p_0$ , gde je  $p_0$  pritisak zasićenja, a  $p$  ravnotežni pritisak  $\text{N}_2$ , dok je  $V_{\text{ads}}$  adsorbovana količina azota). Kumulativna zapremina pora određena je korišćenjem Lecloux i Pirard-ova metoda zasnovanog na Dollimore Heal standardnoj adsorpcionoj izotermi.

### 3. REZULTATI I DISKUSIJA

#### 3.1. Rezultati FTIR analiza

Trake na IR spektru na  $2340 \text{ cm}^{-1}$  mogu se pripisati istežućim vibracijama  $\text{OH}^-$  grupa koje se nalaze na krajevima  $\text{SiO}_2$  lanaca.. Trake od  $1643$  do  $1649 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju savijajućim vibracijama  $\text{OH}^-$  grupa i iz  $\text{SiO}_2$  lanaca i iz HAP-a, a trake na  $600$  do  $662 \text{ cm}^{-1}$  slobodnim vibracijama  $\text{OH}^-$  grupa (Slika 1.). Trake između  $1018$  i  $1043 \text{ cm}^{-1}$  odgovaraju transverzalnim

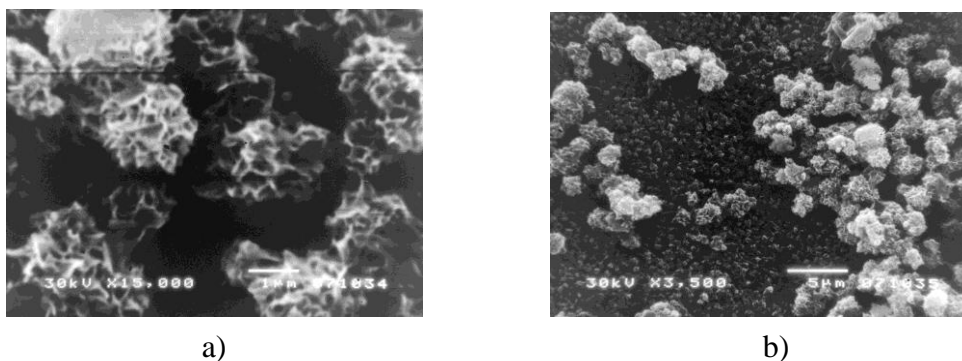
asimetričnim vibracijama Si-O-Si lanaca, a trake od  $791$  do  $802\text{ cm}^{-1}$  pripadaju ljujajućim vibracijama Si-O-Si lanaca, dok trake od  $432$  do  $451\text{ cm}^{-1}$  odgovaraju transverzalnim ljujajućim vibracijama Si-O-Si lanaca. Trake koje se pojavljuju na  $1018$  do  $1043\text{ cm}^{-1}$  pripadaju asimetričnim istežućim vibracijama  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa, dok trake od  $550$  do  $563\text{ cm}^{-1}$  potiču od  $\nu_2$  simetričnih istežućih vibracija. Trake od  $432$  do  $451\text{ cm}^{-1}$  delom pripadaju  $\nu_2$  simetričnim vibracijama  $\text{PO}_4^{3-}$  grupa.



Slika 1. IR spektri nukleiranog apatitnog filma nakon različitog vremena boravka u STF-u: 1- 10 dana; 2- 20 dana; 3- 33 dana; 4- 43 dana; 5- 14 dana, dodatak EMEM-a; 6- 14 dana, dodatak FCS-a

### 3.2 SEM ispitivanja

Na slici 2.a) i 2.b) vidi se jasno način nukleacije apatita sedimentiranjem slojeva jedan na drugi sve do završne debljine apatitnog filma.



Slika 2. a), b) SEM snimci nukleiranog apatitnog filma

### 3.3. Debljina filma nukleiranog HAP-a

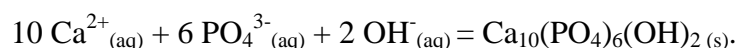
Debljina nukleiranog apatitnog filma zavisi od vremena boravka traka u STF-u, kao što se može videti u Tabeli 1.

Tabela1. Debljine samonukleiranog apatitnog filma nakon različitih perioda nukleacije

Medijum	Vreme nukleacije apatita, dani	Masa apatitnog filma, mg	Specifična površina, m <sup>2</sup> /g	Zapremina pora, cm <sup>3</sup> /g	Debljina apatitnog filma, μm
STF	10	0.2	-	-	-
	20	0.6	94	0.116	2.7
	33	1.2	102	0.107	4.9
	43	1.4	112	0.097	6.2
STF+EMEM	14	1.3	110	0.100	4.8
STF+FCS	14	1.1	105	0.110	4.1

### 3.4 Mehanizam formiranja HAP-a

Kada se čelične trake sa SiO<sub>2</sub> prevlakama potope u STF dolazi do samonukleacije HAP-a na njihovoj površini. To je uslovljeno prisustvom Na<sup>+</sup> jona u STF-u, koji se inkorporiraju u nanopore SiO<sub>2</sub> filma dovodeći do porasta lokalne pH vrednosti na površini filma što favorizuje heterogenu nukleaciju HAP-a prema reakciji [15]:



Prvo pozitivni Ca<sup>2+</sup> joni bivaju privučeni na površinu SiO<sub>2</sub> filma, gde se u sledećem koraku vezuju negativno naelektrisani PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> joni, što dovodi do formiranja kalcijum fosfata. Kada se HAP formira na površini SiO<sub>2</sub> filma, dalja nukleacija se spontano dešava pošto je energija aktivacije za heterogenu nukleaciju na površini manja od energije aktivacije za homogenu nukleaciju u rastvoru [16]. Dalje dolazi do rasta nukleiranog apatitnog filma simultanim privlačenjem kalcijumovih i fosfatnih jona iz STF-a.

U uslovima nukleacije apatita u mešovitim medijima STF i EMEM i FCS pored nukleacije čiji je mehanizam već opisan prethodno, izuzetno značajan uticaj je i prisutnih amino grupa u FCS i delova naelektrisanih proteina u EMEM koji deluju kao dodatni i vrlo efikasni centri nukleacije svojim polarnim dejstvom, koje po mehanizmu „PILP-polymer induced liquid precursor“ uslovljava ubrzanu nukleaciju apatita kroz proces vezivanja Ca<sup>2+</sup> na datim aktivnim centrima, a potom simultanog vezivanja PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> jona.

## 4. ZAKLJUČAK

Kalcijum hidroksiapatit je sintetisan biomimetski na tankom filmu SiO<sub>2</sub> koji je deponovan na površini čeličnih traka, što je potvrđeno FTIR-ATR ispitivanjima. SEM mikroskopijom utvrđena je struktura samonukleiranog apatitnog filma. Kombinovanjem metode

merenja mase filma i BET metode pokazano je da debljina nukleiranog filma zavisi od vremena boravka traka u STF-u, kao i da dodatak FCS i EMEM medijuma ubrzava proces samonukleacije apatitnog filma.

### LITERATURA

- [1] M. Niinomi: *Metall. Mater. Trans. A*, 2002, 33, 477-486.
- [2] T. J. Webster: 'Nanophase ceramics: the future of orthopedic and dental implant material', in: Ying JY, editor. *Nanostructured materials*, 125-166; 2001, New York: Academic Press.
- [3] T. Kokubo, H. Takadama: *Biomaterials*, 2006, 27, 2907–2915.
- [4] R. Z. Le Geros: *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 2002, 395, 81-98.
- [5] A. C. Tas: *Biomaterials* 2000, 21, 1429-1438.
- [6] F. Barrere, C. M. van der Valk, R. A. J. Dalmeijer, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot , P. Layrolle: *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 64, 378-387.
- [7] M. Uchida, H. M. Kim , T. Kokubo, T. Nakamura: *J. Am. Ceram. Soc.*, 2001, 84, 2041-2044.
- [8] P. Li, C. Ohtsuki, T. Kokubo: *J. Am. Ceram. Soc.*, 1992, 75, 2094–2097.
- [9] A. Oyane, H. K. Kim, T. Furuya, T. Kokubo, T. Miyazaki, T. Nakamura: *J. Biomed. Mater. Res.*, 2003, 65A, 188–195.
- [10] A. Bigi, E. Boanini, B. Bracci, A. Facchini, S. Panzavolta, F. Segatti, et al.: *Biomaterials*, 2005, 26, 4085-4089.
- [11] L.L. Hench, in: *CRC Handbook of Bioactive Ceramics*, Vol. 1, ed. T. Yamamoto, L.L. Hench and J. Wilson, p. 7; 1990, CRC, Boca Raton, FL.
- [12] L.L. Hench, in: *Ceramics in Substitutive and Reconstructive Surgery*, ed. P. Vincenzini, p. 259; 1991, Elsevier, Amsterdam.
- [13] P. Li , C. Ohtsuki , T. Kokubo , K. Nakanishi , N. Soga, T. Nakamura, et al.: *J. Biomed. Mater. Res.*, 1994, 28, 7-15.
- [14] V. Jokanović, B. Jokanović. *J. Optoelec. Advanc. Mater.*, 2008, 10, 2684 - 2693
- [15] X. Cheng, B. Nie, S. Kumar: *Trans. Nonferrous Met. Soc. China*, 2008, 18, 627-630.
- [16] P. Li , I. Kangasniemi , K. de Grot, T. Kokubo: *J. Am. Ceram. Soc.*, 1994, 77, 1307-1312.