

Multifunkcionalni i hibridni sistemi na bazi kalcijum fosfata i hidroksiapatita za preventivnu i regenerativnu medicinu

DRAGANA L. MILOŠEVIĆ, Univerzitet u Beogradu,

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

NENAD L. IGNJATOVIĆ, Institut tehničkih nauka,

Srpske akademije nauka i umetnosti Beograd

DRAGAN P. USKOKOVIĆ, Institut tehničkih nauka,

Srpske akademije nauka i umetnosti Beograd

Pregledni rad

UDC: 616.71-089.843

615.466

DOI: 10.5937/tehnika1701011M

Zahvaljujući svojim specifičnim svojstvima, kao što su modifikacija strukture i provršine, kalcijum-fosfati (CaP) posebno hidroksiapatit (HAp) se široko upotrebljavaju u mnogim oblastima biomedicine. Pored hemijske modifikacije, koja uključuje dopiranje metalima, unapređene svojstva HAp-a se može postići i kombinovanjem sa velikim brojem polimera kao i terapijskih i/ili dijagnostičkih agenasa. Materijali na bazi CaP i HAp-a mogu se koristiti u inženjerstvu koštanog tkiva za rekonstrukciju kostiju kao grafitovi ali i kao sistemi za dostavu lekova, gena, antikancer agenasa, itd. Unapređena svojstva HAp-a ostvarena su dopiranjem sa različitim elementima (Co, Zn, Fe, Eu, Gd itd.). Sinteza, karakterizacija i primena nanoestice njihovih multifunkcionalnih i hibridnih sistema na bazi CaP i HAp-a predstavlja istraživački izazov mnogim istraživačkim grupama. Multifunkcionalne i hibridne estice na bazi HAp-a mogu da objedine medicinski preventivne/dijagnostičke i regenerativne potencijale u jednoj estici.

ključne reči: kalcijum-fosfat, hidroksiapatit, preventivna i regenerativna medicina, multifunkcionalni, hibridni, nanomaterijali

1. UVOD

Ljudska kost se sastoji iz neorganske komponente (~70 mas%) koju čini mineral kalcijum-fosfat (CaP), i organske komponente koju čine kolagen (20 mas%) kao i voda (9 mas%), i ostalih elemenata. Imaju i u vidu sastav ljudske kosti, materijali na bazi CaP se široko upotrebljavaju za reparaciju oštećenih kosti, pa je od ključne važnosti razumevanje procesa biomineralizacije CaP, kao i interakcije CaP sa biološkim okruženjem. U proteklih 15 godina na ovom polju je značajan napredak u istraživanju materijala na bazi CaP [1]. Za medicinske primene, među jedinjenjima iz grupe kalcijum-fosfata, do sada najviše istraživačke pažnje privukao je kalcijum-hidroksiapatit (HAp). Nanoestice hidroksiapatita (nHAp) određenog stehiometrijskog sastava, morfologije i veličine, poslednjih godina izazivaju veliko istraživačko interesovanje. Sintetski nHAp, čija je veličina estice manja od 100 nm, u

najmanje jednom pravcu, karakteriše velika površina kao i ultra fina struktura slična mineralnoj komponenti kosti. Do sada je sintetski HAp iskorišćen u istraživanjima regeneracije i reparacije koštanog tkiva u različitim formama poput: granula, blokova ili poroznih nosača. Robocasting tehnologijama i tehnologijama 3D štampanja dobijeni su blokovi pogodni za veće rekonstrukcije humane lobanje (slika 1).



Slika 1 - Koncept rekonstrukcije kosti glave sa 3D ođštampanim implantom na bazi CaP [1]

Novije studije pokazuju da materijali na bazi nHAp inhibiraju rast mnogih vrsta ćelija kancera [2]. Estice nHAp-a se mogu površinski funkcionalizovati

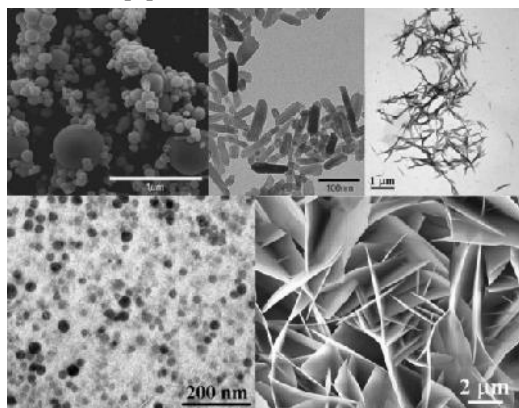
Adresa autora: Dragana Milošević, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Karmegijeva 4, milosevicdragana28@yahoo.com

Rad primljen: 10.01.2017.

Rad prihvaćen: 30.01.2017.

sa različitim amfifilnim molekulima, peptidima, proteinima ili nukleinskim kiselinama, magnetnim jonima, fluorescentnim molekulima itd. [3]. Tako e, mogu a je sinteza modifikovanih nano estica za primenu u regenerativnim [4] i preventivnim svrhama [5] sa mogu nostima funkcije nosa a u kontrolisanoj dostavi i otpuštanju terapijskih agenasa [6]. Kerami ki biomaterijali na bazi nHAp-a ispoljavaju sposobnost indukovanja elijske diferencijacije i proliferacije koja omogu ava regeneraciju tkiva [7, 8]. estice nanometarske veli ine imaju veliku aktivnu površinu u odnosu na ukupnu masu i zapreminu što za posledicu ima ve u aktivnost u odnosu na konvencionalne materijale. Sintezom hidroksiapatita sa nanometarskom veli inom estica mogu e je zna ajno unaprediti njegova mehani ka svojstva poput vrsto e, modula elastičnosti i mikrotvrdo e [9].

Radi proširenja potencijalne primene nHAp-a od velike je važnosti razvijanje novih metoda sinteze i procesiranja kao i uspostavljanje kontrole nad kristalografskim i hemijskim sastavom nanoprahova. U zavisnosti od metode sinteze mogu e je kreirati estice HAp-a razli ite veli ine, morfologije, sastava, stepena kristalini nosti, itd. Zahvaljuju i fleksibilnoj strukturi hidroksiapatita, mogu e je dobiti nanoprahove hidroksiapatita razli ite veli ine i morfologije od iglica, preko štapi a, do sfernih nano estica, što se može uoiti sa slike 2. [3].



Slika 2 - Prahovi HAp-a razli ite morfologije i veli ine estica, u zavisnosti od sinteze i uslova izvoenja sinteze [3]

2. METODE SINTEZE NANO ESTICA HAp-a

Vrsta i na in sinteze nHAp-a reperkutuje se na: geometriju, veli inu i raspodelu veli ine estica, kristalini nost, stehiometriju, aglomeraciju naelektrisanje površine itd. Postoje brojne metode sinteze koje se mogu grubo podeliti na:

1. suve postupke sinteze:
 - sinteza u vrstoj fazi (npr. mehanohemijska sinteza)
2. mokre postupke sinteze:

- precipitaciona metoda; metoda hidrolize; hidrotermalna metoda; sol- gel metoda; emulzionna metoda itd.

2.1. Suvi postupci sinteze

Suvi postupci sinteze obuhvataju sintezu u vrstoj fazi i mehanohemijsku sintezu. Jedna od sinteza u vrstoj fazi se bazira na zagrevanju kalcijum-fosfatnih soli, koje su prethodno kalcinisane na 1000°C, u odre enom odnosu, pri emu se dobija nova kristalna faza. Dobijene estice su mikrometarske veli ine nepravilnog oblika i esto sadrže primese drugih faza zbog spore difuzije jona u vrstom stanju [10]. Jedan od nedostataka ove metode je teško a dobijanja nanoesti nih prahova u neoaglomerisanoj formi. Nasuprot sintezi u vrstoj fazi kojom se dobijaju heterogene estice mehanohemijskom sintezom se mogu dobiti prahovi dobro definisane strukture. Reagensi, stehiometrijskog molarnog odnosa, se melju u planetarnom mlinu. Tokom mlevenja u materijalima dolazi do fizikih i hemijskih promena, tj. mlevenje dovodi do iniciranja i odvijanja hemijskih reakcija. Na tok mehanohemijske sinteze uti u faktori poput: vrste reagensa, tip mlina, parametri mlevenja: brzina rotacije planetarnog mlina, vreme mlevenja, odnos mase praha prema masi kugli, materijal od koga su kugle izra ene itd. Mehanohemijskom sintezom je mogu e dobiti nHAp [11, 12], dok su mogu i nedostaci ove metode sklonost ka aglomeraciji prahova, šira raspodela veli ine dobijenih estica kao i kontaminacija/zaprljenje prahova od strane medijuma za mlevenje.

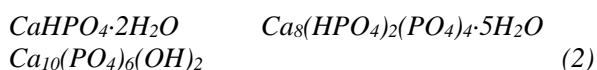
2.2. Mokri postupci sinteze

U pore enju sa suvim postupcima sinteze mokri postupci su do sada znatno više istraženi jer se njima dobijaju prahovi kontrolisanih svojstava, sa manjom prose nom veli inom estica, boljom uniformnoš u i ve om specifi nom površinom. Dobijanje nHAp-a mogu e je primenom precipitacionih metoda, koje su zasnovane na teorijskom sastavu kalcijum-hidroksiapatita, i to na više na ina. Zajedni ko za ove reakcije je da odnos Ca/P u reakcionoj smeši treba da bude 1,67, što je preduslov za dobijanje monofaznih prahova. Jedan od na ina je koriš enje razli itih kalcijumovih soli poput CaNO_3 , CaCl_2 ili $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, i fosfatnih soli poput $(\text{NH}_4)_2\text{PO}_4$.

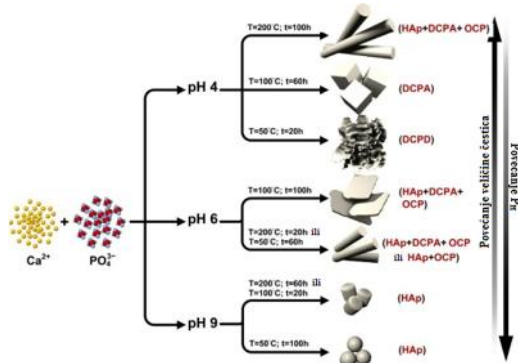
Kao izvor fosfatnih jona može se koristiti i H_3PO_4 . Nitratni i hloridni anjoni iz kalcijumovih soli se ugra uju u strukturu hidroksiapatita tokom sinteze, pa se umesto CaNO_3 i CaCl_2 esto koristi $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, zbog nemogu nosti acetatnog anjona da se ugradi u strukturu hidroksiapatita [13]. Drugi na in kojim se može izvršiti sinteza nHAp-a je metoda neutralizacije. Prekursori koji se obi no koriste u ovoj metodi su $\text{Ca}(\text{OH})_2$ i H_3PO_4 . Dobijanje nanoprahova, metodom neutralizacije, odgovaraju e stehiometrije, oblika,

veli ine i raspodele veli ine estica, kristalini nosti itd. veoma zavise od uslova izvo enja sinteze poput pH vrednosti, temperature na kojoj se sinteza izvodi kao i temperature starenja taloga [3], brzine ukapavanja kiseline [14], inertne atmosfere [15], isto e reaktanata [16], itd.

HAp se može dobiti procesom hidrolize kalcijum-ortofosfata u vodenoj sredini, što je obi no pra eno procesima rastvaranja i taloženja. Naj eš e koriš ene kalcijum-fosfatne soli su: anhidrovani dikalcijum-fosfat (DCPA), dikalcijum-fosfat dihidrat (DCPD), -trikalcijum fosfat (-TCP), -trikalcijum fosfat (-TCP). DCPA i DCPD su termodinami ki nestabilniji pri pH vrednostima iznad 6-7, i podležu transformaciji u stabilniju fazu tj. HAp, što je prikazano jedna inama (1) i (2), [17]:



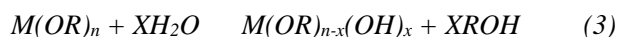
Hidrotermalna metoda je jedna od do sada naj eš e koriš enih metoda za dobijanje nano estica hidroksiapatita i obi no se odvija reakcijama u vodenim rastvorima na povišenoj temperaturi i pritisku [18, 19]. Produkti mogu biti visokog stepena kristalinitosti, jasno definisane i esto uniformne strukture, a variranjem parametara sinteze može se uticati na svojstva dobijenih produkata. Mogu a je kontrola nukleacije, rasta i procesa starenja dobijenog precipitata. Na osnovu brojnih eksperimentalnih podataka [18], utvr eno je da su parametri sinteze, koji imaju najzna ajniji uticaj na strukturna i morfološka svojstva HAp-a: temperatura, pH i vreme trajanja sinteze, što je prikazano na slici 3. Modifikovanom hidrotermalnom metodom izvršena je sinteza jednodimenzionalnog (1D) hidroksiapatita, i to u dva koraka. Dikalcijum-fosfat sintetizovan u prvom koraku je koriš en kao prekursor za sintezu 1D HAp-a u drugom koraku [19].



Slika 3 - Uticaj temperature, pH vrednosti i vremena na strukturu i morfologiju kalcijum-fosfatnih prahova [18]

Sol-gel metoda podrazumeva prelaz koloidnog rastvora (sol) u gel, uklju uju i procese poput hidrolize,

kondenzacije, starenja, sušenja i kalcinacije. estice sola koje su nanometarske veli ine, se me usobno povezuju lancima polimera mikrometarske veli ine, na taj na in formiraju i vrstu, poroznu mrežu submikrometarskih pora. Alkoksidi u prisustvu vode lako podležu hidrolizi, što se može prikazati slede om reakcijom:



Nakon hidrolize sledi proces kondenzacije tokom kojeg dolazi do formiranja M-O-M veza putem dehidratacije:



Nakon završene faze geliranja sledi proces sušenja koji se odvija na relativno niskim temperaturama, pri emu se uklanja te na faza. Završna faza je kalcinacija osušenih uzoraka kojom se postiže uklanjanje zaostale koli ine rastvara a i pove anje gustine. Prahovi dobijeni na ovakav na in su stehiometrijske strukture sa velikom specifi nom površinom i nanometarskom veli inom estica [20].

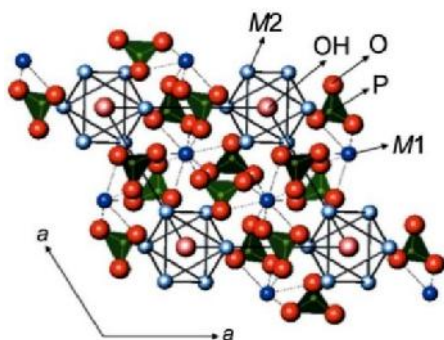
Emulziona metoda tako e izaziva veliko istraživa ko interesovanje jer pruža mogućnost dobijanja neaglomerisanih prahova nanometarske veli ine uz kontrolu mikrostrukture i morfologije dobijenih estica. Emulzija predstavlja disperzni sistem dve te -nosti, koje se me usobno ne mešaju, u kojoj je jedna te nost u obliku kapi dispergovana u drugoj. Za razliku od nanoemulzija, mikroemulzije su termodinami ki stabilne disperzije dve nemešljive te nosti (obi no vode i ulja), me usobno stabilisane prisustvom surfaktanata tj. površinski aktivnih supstanci.

3. MODIFIKACIJA HAp-a

Hidroksiapatit, hemijske formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ sa stehiometrijskim odnosom Ca/P=1,67 je heksagonalne kristalografske strukture [21]. Modifikacija HAp-a dopiranjem ili supstitucijom anjona ili katjona proširuje potencijalnu biomedicinsku primenu ovog materijala. Metal-dopirani HAp pokazao je veliki osteogenetski potencijal [22], tako e i antimikrobna svojstva [23], a može biti pogodan i za dobijanje prevlaka [24], sistema za dostavu medikamenata [25], biomarkera za nanomedicinske aplikacije [26], itd. Katjon poput Ca^{2+} i anjoni poput PO_4^{3-} i OH^- jona, iz strukture HAp-a, se mogu delimi no ili potpuno zameniti drugim jonima, bez narušavanja kristalografske simetrije. Joni kalcijuma se mogu izmeniti sa velikim brojem jednovalentnih i viševalentnih katjona, dok se hidroksilni anjon uglavnom supstituiše sa F^- i CO_3^{2-} jonima, fosfatni anjon se može zameniti sa CO_3^{2-} jonima.

Veli ina, vrsta i koli ina jona supstituenta uti e na fizi ko-hemijska svojstva dopiraniog HAp, tj. na

njegovu termičku stabilnost, parametre rešetke, veličinu i morfologiju kristalita, rastvorljivost itd. Jedinici na površini HAP sadrži dva kristalografski nezavisna Ca položaja: M_1 i M_2 (slika 4). $Ca(M_1)$ se nalaze u $4f$ Wyckoffovom (Wyckoff) položaju i povezani su sa devet atoma O koji grade PO_4 tetraedre, dok se $Ca(M_2)$ nalaze u $6h$ Wyckoffovom položaju i koordinirani su sa 6 atoma O koji grade PO_4 tetraedre i jednog OH^- jona smeštenog u kanalu duž $[001]$ pravca [27].



Slika 4 - Prikaz kristalne strukture hidroksiapatita duž pravca $[001]$ [27]

3.1. Modifikacija HAP-a katjonima

Do sada su poznate različite metode pomoću kojih se joni metala mogu površinski ili po celoj zapremini ugraditi u estice HAP-a. Dobijanje monofaznih estica sa homogenom raspodelom jona metala od posebnog je značaja za primenu ovakvih materijala u medicinske svrhe.

U cilju unapređenja svojstava HAP-a ispitane su mogućnosti dopiranja sa različitim metalnim jonima. Supstitucijom dvovalentnih jona ne remeti se elektroneutralnost elementarne jedinice HAP-a, dok supstitucija jednovalentnih katjona poput Na^+ i K^+ izaziva promenu naelektrisanja koja se može kompenzovati formiranjem vakancija.

Supstitucija kalcijumovih jona drugim katjonima može da prouzrokuje promene u parametrima kristalne rešetke, zavisno od veličine jona. Koje veličine jona metala koji se ugrađuje u strukturu HAP-a zavisi od primenjene metode i uslova izvođenja sinteze, ali i od vrste, periodičnosti i elektronegativnosti jona metala. Supstitucija Ca^{2+} jona u položaju M_2 mogla bi biti energetski povoljnija. Joni metala sa većim prenikom i većom elektronegativnošću prvenstveno supstituišu jone metala u položaju M_2 , dok se joni metala sa manjim prenikom i manjom elektronegativnošću supstituišu u položaju M_1 [28]. Katjoni Ba^{2+} , Pb^{2+} i Sr^{2+} , koji su veći od Ca^{2+} jona smeštaju se u položaje M_2 [29].

3.2. Co-dopirane nano estice HAP-a (Co-HAP)

Najčešće korišćene metode za dobijanje kobaltom dopiranog hidroksiapatita (Co-HAP-a) su hidrotermalna sinteza [22, 27, 30, 31], kao i precipitacija [32].

Primenom hidrotermalne metode, na temperaturi od 473K, izvršena je sinteza Co-dopiranih nano estica HAP-a. ICP spektroskopska analiza je pokazala da Co^{2+} joni supstituišu jone Ca^{2+} do 12 at.%, i da se daljim povećanjem koncentracije jona kobalta ne povećava sadržaj Co^{2+} u kristalnoj strukturi HAP-a. Vrednosti parametara jedinice HAP-a su se postepeno smanjivale sa povećanjem sadržaja kobalta, što odgovara činjenici da su joni kobalta manji od jona kalcijuma. Na slici 5. je prikazana struktura HAP-a u koju je ugrađen joni kobalta [27]. Primenom iste sinteze izvršena je modifikacija HAP-a esticima kobalta u različitim masenim odnosima, i postignuto značajno poboljšanje osteogenetskog potencijala, pri čemu su dobijeni prahovi sfernih estica veličine manje od 100 nm. Materijal Co-HAP dobijen na ovaj način je upotrebljen za rekonstrukciju većim delom izazvanih osteoporoznih defekata, a rezultati histomorfometrijske, hemijske i histološke analize su pokazali da se osteogenetski potencijal korišćenih materijala povećava sa povećanjem sadržaja kobalta [22].



Slika 5 - Kobalt-dopirani hidroksiapatit [27]

Ispitane su mogućnosti sinteze magnetnih nano estica HAP-a, supstitucijom jona Ca^{2+} magnetnim jonima poput Fe^{2+} i Co^{2+} jona, što ih čini pogodnim za različite primene kao što su magnetno-rezonantni imidžing, manipulacija pomoću magnetnog polja za tretman jedinice kancera hipertermijom, ciljane dostava medikamentata, itd [33]. Bakterijske infekcije na mestu implantacije su jedan od problema koji se javljaju u inženjerstvu koštanog tkiva. U cilju sprečavanja infekcije bakterijama *Staphylococcus aureus* i *Escherichia coli* vrši se dopiranje nHAP-a jonima metala poput Co^{2+} , za koje je potvrđeno, [34] da poseduju antimikrobna svojstva protiv pomenutih sojeva bakterija u odnosu na čist HAP i HAP/PLGA.

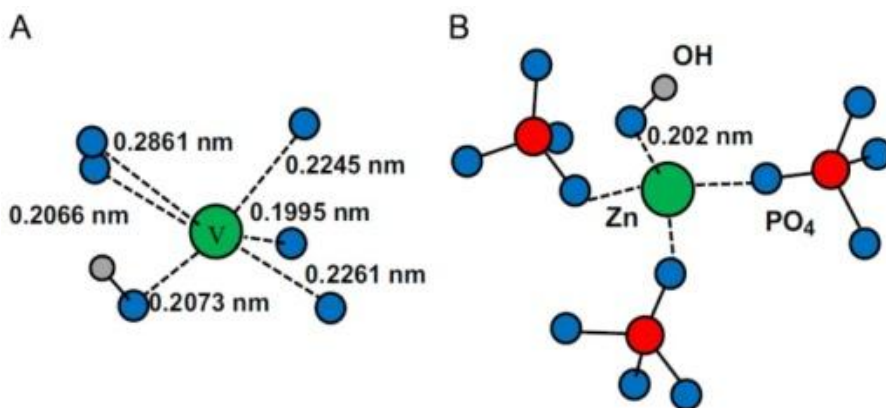
3.3. Zn-dopirane nano estice HAP-a (Zn-HAP)

Sinteza Zn-HAP se pretežno izvodi metodom precipitacije [35-37], jonskom izmenom [38], hidrotermalnom sintezom [39], kao i sol-gel procesima [40]. Jonski radijus Zn^{2+} jona iznosi 0,074 nm i manji je u

pore enju sa Ca^{2+} jonskim radijusom koji iznosi 0,099 nm, pa je i o ekivano da se parametri rešetke Zn-HAp promene.

Parametar kristalne rešetke c , [41] opada sa porastom sadržaja cinka, dok se parameter a poveća za koncentracije cinka iznad 5 mol%. Povećanje vrednosti parametra a pri većim koncentracijama cinka pripisano je supstituciji OH^- jona molekula vode. Joni Ca^{2+} se supstituišu jonima Zn^{2+} u položaju $\text{Ca}(\text{M}_2)$ [37].

Sude i po nekim autorima cink je oktaedarski koordinisan, slika 6a, dok je prema Tang-u i saradnicima [37] tetraedarski koordinisan, slika 6b. Na osnovu slike 6b se može uočiti da je cink povezan sa tri atoma kiseonika koji potiču iz susednih fosfatnih grupa i jednim atomom kiseonika koji potiče iz hidroksilne grupe. U cilju povećanja antimikrobnog potencijala ispitana je i mogućnost ugradnje drugih elemenata (Ag^+ , Zn^{2+} , Cu^{2+} , itd.) u strukturu HAp-a [42].



Slika 6 - Koordinacija cinka inkorporiranog u strukturu HAp-a, a) oktaedarska koordinacija; b) tetraedarska koordinacija [37]

3.4. Fe-dopirane nano estice HAp-a (Fe-HAp)

Magnetne nano estice Fe-HAp se mogu sintetizovati metodom koprecipitacije iz vodenih rastvora, sa različitim koncentracijama Fe^{2+} jona [43, 33], ili metodama u mikrotalasnom polju [44]. Faktori koji utiču na magnetna svojstva ovih estica su mikrostruktura, anizotropija i orijentacija. Dokazano je da prisustvo Fe^{2+} jona sa radijusom od 0,0835 nm koji je manji od radijusa Ca^{2+} utiče na parametre rešetke [43].

Dopiranje HAp-a jonima gvožđa (sa 10% i 50%) uzrokuje smanjenje kristaliniteta i povećanje a i c parametara kristalne rešetke i ispoljava superparamagnetna svojstva. Fe-HAp mogao bi potencijalno da se primeni kao grejni medijator u lečenju karcinoma hipertermijom [45], ovakve estice se mogu usmeriti na tačno određeno mesto u organizmu upotrebom spoljašnjeg magnetnog polja, mogu se koristiti i kao kontrastni agensi u magnetno-rezonantnom imidžingu. Magnetne nano estice HAp-a pomešane sa fosfatnim puferским rastvorom su bile testirane *in vivo* injektiranjem u tumor koji je na ovaj način bio tretiran unutrašnjim magnetnim poljem, radi izazivanja hipertermije. U periodu od dve nedelje testiranja zapaženo je dramatično smanjenje tumora [2].

3.5. Nano estice HAp-a dopirane lantanidima (Ln-HAp)

Metalni joni se mogu unositi kao dopanti u kristalnu rešetku HAp-a za razne tehnološke aplikacije zasnovane na luminiscenci. Luminiscenca je pojava da

se, nakon pobuđivanja molekula ili atoma u eksitovano elektronsko stanje od strane nekog izvora energije, molekul tj. atom vraća u osnovno stanje, emitujući energiju u formi svetlosti.

Ln-dopirani HAp takođe ispoljavaju svojstva luminiscence, pa se može koristiti za biološko fluorescentno obeležavanje, kao kontrastni agensi u bioimidžingu, magnetno-rezonantnom imidžingu, multidektorskoj kompjuterizovanoj tomografiji, itd.

Emisioni spektri HAp-a dopirani Ln^{3+} jonima se sastoje od uskih emisionih traka, visoke fotohemijske stabilnosti, i dugačkog vremena života. Ispoljavaju veoma male toksične efekte u *in vivo* uslovima pa su pogodni za biomedicinske primene kako u dijagnostici tako i u terapiji (tzv. teranostici). Zbog jake luminescence i male citotoksičnosti mnoga istraživanja su usmerena ka pronalazenju primena Ln-HAp-a u bioimidžingu.

Joni Ca^{2+} mogu biti supstituisani Ce^{3+} jonima, jer su vrednosti elektronegativnosti metalnog cerijuma kao i jonskog radijusa (0,107 nm) slične vrednostima kalcijuma. Takođe je potvrđeno da Ce^{3+} joni ispoljavaju antimikrobno dejstvo [46, 47].

Cerijumom dopirane nHAp-a sintetisane metodom koprecipitacije [47], ispoljavaju značajnu antibakterijsku aktivnost prema bakterijskim vrstama *Staphylococcus aureus* i *Scherichia coli*, u odnosu na uzorak istog HAp-a. Rezultati XRD analize su pokazali da je došlo do kontinualnog povećanja a i c

parametara jedini ne elije sa pove anjem koncentracije cerijuma. Dizajn i sinteza multifunkcionalnih nanostrukturnih sistema visoke biokompatibilnosti je od izuzetnog zna aja za dijagnostiku i terapiju i intenzivno se ispituje kroz teranostici ki pristup. Nano estice koje se koriste u teranostici privla e veliku pažnju jer se ovakvi materijali mogu spontano i selektivno akumulirati na specifi nim tumorskim mestima i simultano unaprediti dijagnozu i le enje [48]. Joni lantanida poput Eu^{3+} i Gd^{3+} pokazuju potencijal u le enju osteoporoze [49]. Joni Eu, zahvaljuju i intraorbitalnim elektronskim prelazima, dovode do pojave fotoluminiscencije dopiranih nano estica i kao takve se mogu koristiti u biološkom imidžingu. Sa druge strane, Gd se može koristiti kao kontrastni agens i obezbe ivati bolji magnetno-rezonantni signal. Dizajn i sinteza multifunkcionalnih sistema su od velikog zna aja za budu a klini ka ispitivanja. Multifunkcionalni sistem [50], kakav je $\text{Gd}^{3+}/\text{Eu}^{3+}$ -HAp nanocevi, je sintetizovan mikrotalasno radi ispitivanja njegove potencijalne primene u dijagnostici, kroz *in vivo* imidžing i istovremenoj terapiji, kao nosilac leka. Sa pove anjem koncentracije jona Gd^{3+} magnetizacija dopiranog nHAp-a se tako e pove ava. $\text{Eu}^{3+}/\text{Gd}^{3+}$ dopirane nanocevi HAp-a poseduju veliki adsorpcioni kapacitet prema medikamentima i mogu se koristiti kao sistemi sa neprekidnim otpuštanjem medikamenata. Istraživanja u *in vitro* i *in vivo* uslovima su pokazala da ovaj materijal ima potencijal za primenu u magnetno-rezonantnom imidžingu, fotoluminiscentnom imidžingu i tomografiji. Veli ina kristala i kristalini nost [51] HAp-a su se smanjivale supstitucijom Eu^{3+} i/ili Gd^{3+} . Eu-HAp je emitovao narandžasto-crvenu boju zahvaljuju i $^5\text{D}_0 \rightarrow ^7\text{F}_j$ prelazima jona Eu^{3+} , dok je Gd-HAp ispoljavao paramagnetna svojstva, pa je i o ekivano da HAp dopiran ovim jonima ispoljava oba navedena svojstva i bude dobar kontrastni agens za opti ki i magnetno-rezonantni imidžing. Nanocevi HAp-a, zbog svoje potvr ene biokompatibilnosti, bioaktivnosti i osteokonduktivnosti obe avaju e su u dijagnostici i terapiji kancera kao magnetni-radioizotopni nosa i. Gd^{3+} dopirane nanocevi HAp-a (Gd-HAp) [52], se intenzivno ispituju kao potencijalni nosa i radioizotopa za tretman rane faze kancera kroz teranostici ki pristup, odnosno za dijagnostiku i le enje tumora magnetno-rezonantnim imidžingom i tomografijom.

4. SINTEZA I DIZAJNIRANJE MULTIFUNKCIONALNIH I HIBRIDNIH KOMPOZITNIH MATERIJALA NA BAZI nHAp-A ZA PRIMENU U REGENERATIVNOJ MEDICINI

Površinskom modifikacijom estica može se uticati na njihovo površinsko naelektrisanje, hidrofilnost, koloidnu stabilnost, a samim tim i na njihova

biološka svojstva. Funkcionalnost nHAp-a se tako e može poboljšati njegovom modifikacijom sa amino-kiselinama, kao i hidrofilnim organskim prevlakama poput albumina, dekstrina itd. Radi postizanja bolje interakcije izme u elija i biomaterijala i unapre ivanja svojstava, nHAp se može površinski ili zapreminski modifikovati peptidima [53]. Naj eš e koriš eni peptid za biomimicnu površinsku modifikaciju je RGD (Arg-Gly-Asp), koji ini sastavni deo proteina ekstracelularnog matriksa i omogu ava bolju adheziju mnogih vrsta elija. Površina nosa a se može konjugovati specifi nim ligandima, za ciljanu dijagnostiku i terapiju, poput monoklonskih antitela, tako e može se konjugovati sa zaštitnim polimerima poput PEG (polyethylene glycol) ili BSA (bovine serum albumin) i na taj na in pove ati vreme cirkulacije nananosa a u krvi. Pored peptida površina HAp-a se može funkcionalizovati oligonukleotidima i DNK. Kompozitni materijal na bazi CaP i DNK je dobijen jednostavnim postupkom koprecipitacije [54]. Inženjerstvo koštanog tkiva neprekidno razvija nove na ine sinteze u cilju dobijanja multifunkcionalnih i hibridnih sintetskih materijala, od kojih se o ekuje da pruže potporu oštećenom koštanom tkivu, da budu privremeni supstrat, da imaju ulogu matrice za rast i diferencijaciju elija, ali i da imaju sposobnost kontrole nad brzinom otpuštanja medikamenata u okolno tkivo. Implanti poput alograftova i ksenograftova se sve više zamenjuju multifunkcionalnim sintetskim materijalima koji smanjuju rizik od infekcija i odbacivanja implanta na minimum.

estice nanometarske veli ine imaju ve i resorpcioni kapacitet u pore enju sa istim esticama mikrometarske veli ine [55]. Jedna od strategija dizajniranja materijala, na bazi nHAp-a je njihovo oja vanje sintetskim polimernim matricama poput poli-laktida (PLLA) [56, 57], poli(laktid-ko-glikolida), (PLGA) [58] ili prirodnim polimerima poput hitozana [59, 60], kolagena [61], celuloze, elastina, keratina itd. [62]. Multifunkcionalni i hibridni nano esti ni sistemi na bazi nHAp-a i polimera u kome je dispergovana aktivna supstanca ine posebnu grupu sistema za kontrolisano otpuštanje lekova u inženjerstvu koštanog tkiva. U ovakvim sistemima estice nHAp mogu imati ulogu aktivnog punioca koštanog defekta, dok je kontrolisano osloba anje aktivne supstance/leka omogu eno pomo u polimera.

Upravo ovakav koncept je primenjen u dizajniranju nHAp-a za lokalnu dostavu tigeckiklina a u cilju le enja osteomijelitisa [63, 64]. Kompozitni biomaterijal na bazi HAp/PLLA [65], sa visoko kristalnom HAp fazom, je sintetizovan u dva koraka. U prvom koraku je sintetisan materijal sa željenim odnosom faza, dok je u drugom koraku materijal oblikovan toplim i hladnim presovanjem. Utvr eno je

da se primenom toplog presovanja, na temperaturi topljenja PLLA, može uticati na poroznost, molsku masu PLLA, kao i odnos amorfnosti i kristalne faze, što je od izuzetnog značaja za strukturu i svojstva ovakve vrste kompozitnog materijala.

Nakon implantacije u koštani defekt, polimerna komponenta, koja je hidrokksiapatit, se u tkivu resorbira i na taj način ustupa svoje mesto novotvoranom tkivu, dok je faza HAP-a stabilna u ispitivnom vremenskom intervalu [66].

Kompozitni biomaterijali na bazi CaP i bioresorbibilnih/bioneresorbibilnih polimera su do sada bili predmet brojnih istraživanja u cilju dobijanja biomaterijala sa zadovoljavajućim mehaničkim i biokompatibilnim svojstvima, pa je u tom cilju istraživana injektibilna kompozitna materija na bazi polisiloksana i HAP-a u formi cementa [67]. Nanokristalni CaP su se pokazali kao pogodni za sintezu kompozitnih biomaterijala na bazi CaP i bioresorbibilnog polimera a za primenu u inženjerstvu koštano tkiva [68].

Kompozitni materijal na bazi bifaznog kalcijumfosfata (BCP, koji sadrži HAP i trikalcijumfosfat) i PLGA je ispitan u rekonstrukcijama osteoporoze oštećenog koštano tkiva [69]. Utvrđeno je da BCP/PLGA indukuje formiranje nove kosti i zahvaljujući njegovom osteokonduktivnom potencijalu može uspešno zameniti koštano tkivo. Korišćenje kompozitnog biomaterijala, BCP/PLGA u formi granula u lečenju defekata alveolarne kosti je takođe ukazalo na njegov potencijal koštane regeneracije. *In vitro* istraživanja na lečenju miševa takođe su potvrdila uspešnu adheziju elija fibroblasta na površini ovog materijala [70]. Jedno od značajnih svojstava BCP je njegova hemijska stabilnost sa neorganskom komponentom humane kosti, dok PLGA karakteriše visok stepen biokompatibilnosti i netoksičnosti [71].

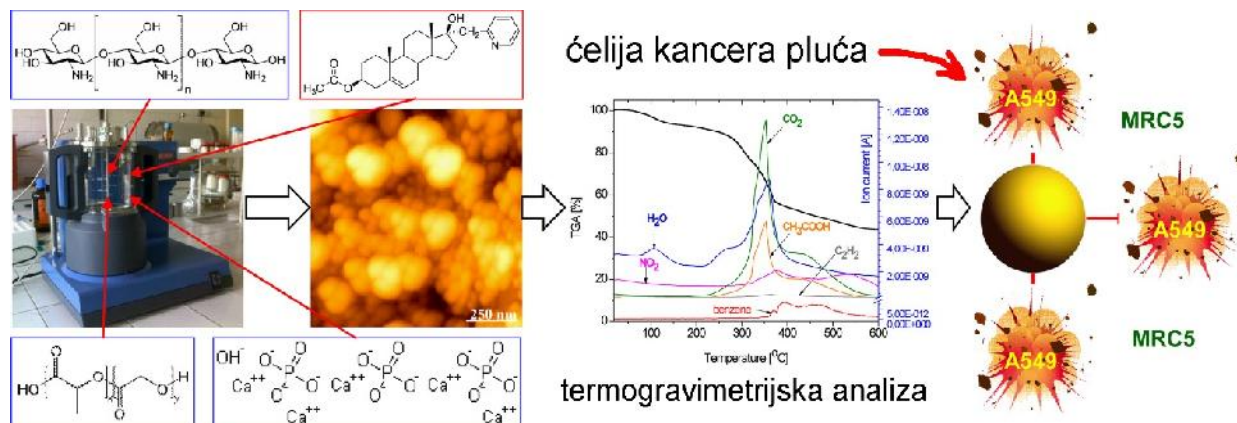
Tumori pluća, dojki, prostate, pankreasa, želuca, jetre i debelog creva su najčešći uzroci smrti pacijenata širom sveta. Tradicionalno lečenje kancera, koje uključuje: operaciju, radioterapiju, imunoterapiju, gensku terapiju ili hormonsku terapiju, ima svoja ograničenja u zavisnosti od vrste kancera. Radi poboljšanja dijagnostike i terapije ove vrste bolesti poslednjih godina intenzivno se razvijaju metode zasnovane na dostavi lekova upotrebom različitih nanosistema. nHAP kao i kompozitni materijali na bazi nHAP se široko ispituju kao nosači i lekova za lečenje tumora, jer obezbeđuju kontrolisano oslobađanje lekova na specifičnim ciljanim mestima bez neželjenih efekata. Zahvaljujući i sistemima za dostavu lekova mnoge vrste lekova i terapijskih agenasa poput hormona, proteina, antibiotika, polipeptida, gena, kao i anticancer lekova se mogu koristiti u *in vivo* uslovima. Ispitane su mogućnosti

sinteze i procesiranja hibridnih sistema na bazi nHAP-a i polimera hitozana (Ch) i PLGA, u cilju dobijanja materijala (nHAP/Ch; nHAP/Ch/PLGA) za lečenje bolesti organa [72]. Radi ispitivanja biodistribucije kao i krajnjeg odredišta estica, razvijena je nova metoda obeležavanja pomenutih sistema radioaktivnim ¹²⁵I. Nakon intravenoznog injektiranja u miševima, estice na bazi nHAP/Ch i nHAP/Ch/PLGA pokazale različito ponašanje u *in vivo* uslovima u odnosu na čist nHAP. nHAP estice su uglavnom bile usmerene ka jetri, nHAP/Ch ka jetri i slezini, dok su nHAP/Ch/PLGA bile usmerene ka plućima.

Dizajniranje sistema koji sa jedne strane ispoljava visoku aktivnost prema lečenju kancera, a sa druge strane nisku aktivnost prema zdravim lečenju, predstavlja veliki izazov. Estice na bazi nHAP/Ch/PLGA su korišćene kao nosači jedinjenja A, (17 β -hidroksi-17 β -picoil-androsta-5-en-3 β -ol acetate) hemoterapeuskog derivata androstana, koji pokazuje selektivnu antikancerogenu aktivnost prema lečenju karcinoma pluća [60]. Kompozitni materijal A-HAP/Ch-PLGA bi potencijalno mogao da se koristi za selektivnu terapiju malignih elija pluća (slika 7).

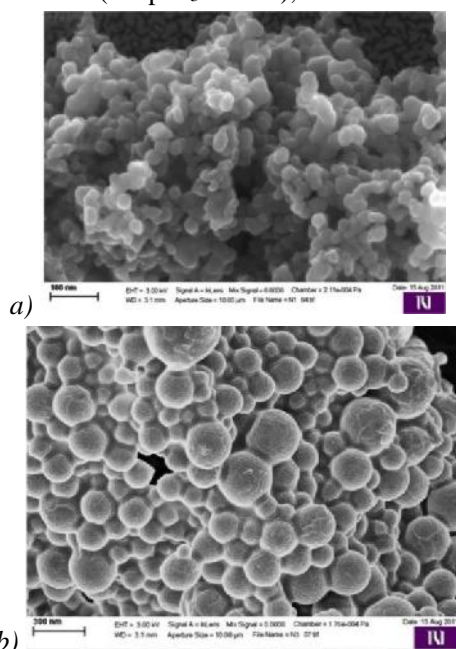
Modifikovanom hidrotermalnom metodom [73], u kojoj je umesto amonijaka korišćen natrijum-hidroksid, je izvršena sinteza nHAP-a u cilju dobijanja nosača i lekova: 5-fluorouracil- (5-FU), široko korišćenog za tretman gastrointestinalnih kancera. Rezultati su potvrdili mogućnost korišćenja 5-FU/nHAP za tretman kancerogenih elija želuca. Najčešći i maligni tumor mozga je glioma i poslednjih godina na njemu je značajan napredak u postavljanju dijagnoze i njegovom lečenju, ali njegovo ponavljanje nakon resekcije i dalje predstavlja značajan problem. Razvojem nanotehnologije, pokazano je da nHAP-a inhibiraju proliferaciju elija različitih vrsta tumora, ali njihov uticaj na ljudske gliome nije dovoljno istražen. U cilju postavljanja teorijskih osnova za kliničku upotrebu ispitan je inhibički efekat nHAP-a na rast ljudskih elija glioma (U251 i SHG44), pri čemu je pokazano da nHAP indukuje apoptozu tumorskih elija glioma *in vitro* i *in vivo*, a u kombinaciji sa hemoterapeuskim lekom: BCNU (1,3-bis(2-chloroethyl)-1-nitrosourea) značajno smanjuje nuspojave [74].

Vitamin D spada u grupu liposolubilnih vitamina i sintetizuje se u našem organizmu, ali se može unositi i putem hrane. Stvara se u koži iz 7-dehidroholesterolu pod uticajem UV zračenja. Nedostatak vitamina D dovodi do hipokalcemije, hipofosfatemije, demineralizacije kostiju, bolova u kostima, fraktura, slabosti mišića, osteoporoze, itd. Pokazano je da vitamin D, koji se koristi u tretmanu osteoporoze povoljno utiče na zarastanje preloma.



Slika 7 - Sinteza, karakterizacija i in vitro ispitivanja A-HAp/Ch-PLGA na ćelijama tumora pluća [60]

Multifunkcionalni sistem na bazi nHAp-a [75] sintetizovan je kao direktni nosa holekalciferola (HAp/D₃) u cilju njegove pulsne dostave, kao i nosa na bazi nHAp-a i PLGA u cilju kontrolisane dostave holekalciferola (HAp/D₃/PLGA), slika 8.



Slika 8 - SEM mikrografija multifunkcionalnog i hibridnog sistema na bazi nHAp-a: a) nHAp/D₃, b) nHAp/D₃/PLGA [75]

Razvoj ovakvih nano estinih materijala omogućava simultanu regeneraciju kosti kao i lokalnu dostavu medikamenta. Nakon isporuke vitamina D₃, nosa nHAp ima ulogu aktivnog punioca uz postepenu supstituciju sa novom kosti.

5. KONJUGOVANI HAP

5.1. Konjugovani nHAp za primenu u terapiji

Nanomaterijali zbog svojih specifičnih svojstava [76] mogu proširiti potencijal svoje primene konjugovanjem sa raznim grupama i jedinjenjima [77]. Zbog svojih specifičnih osobina, antitela (imunoglobulini-

Ig) su jedni od izabranih molekula za ciljanu terapiju [78]. Zahvaljujući i mogući nosi konjugacije nHAp-a sa antitelima (At), svojstva nano estice se kombinuju sa specifičnim i selektivnim sposobnostima antitela da prepoznaju antigene [4]. Postoji mogućnost da se nosa na bazi nHAp-a biomimno dizajnira tj. funkcionalizuje antitelima i koristi za ciljanu dostavu medikamenta do specifičnih mesta (tumora). Istraživači širom sveta pokušavaju da razviju nove metode sinteze i dizajniranja na bazi prirodnih i poznatih procesa. Biomimna metoda pokazala se pogodnom za sintezu materijala složenih oblika i struktura, pogodnih za korišćenje u biološkim sistemima [79]. Antitela, poput ljudskog imunoglobulina IgG, se mogu konjugovati tj. adsorbovati na površini nHAp-a, uz pretpostavku da se usled sternih smetnji, adsorpcija vrši preko Fc fragmenta [80], kako je prikazano na slici 9.



Slika 9 - Konjugovani nHAp-IgG [4]

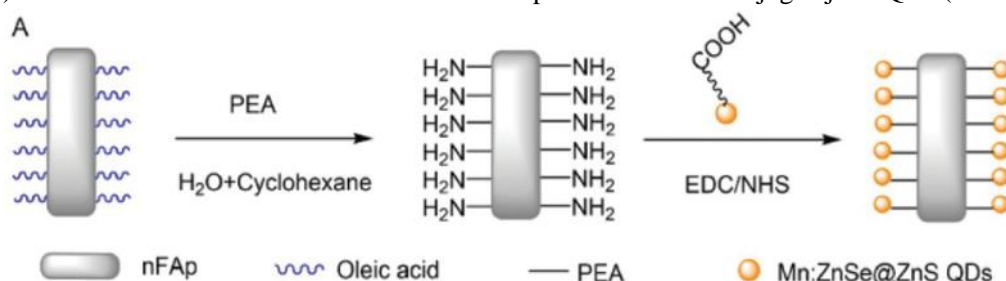
Utvrđeno je da je maksimalni adsorpcioni kapacitet nHAp-IgG iznosio 2,3 mg/m². Uzimajući u obzir namotarsku veličinu estice HAp-a, pretpostavlja se da bi on nesmetano mogao da cirkuliše u krvotoku, izbegavajući pri tome ćelije fagocita, i da je stoga pogodan nosa molekula poput antitela. Pored konjugacije sa imunoglobulinima moguće je izvršiti konjugaciju HAp-a sa albuminom iz govećeg seruma (BSA-bovine serum albumin) i dobiti sistem (BSA-HAp) sa kontrolisanim otpuhtanjem proteina [81].

5.2. Konjugovani nHAp za primenu u dijagnostici

Organski fluorescentni molekuli i radioaktivni izvori koji su se do sada koristili za biološko obeležavanje, teže da budu zamenjeni neuporedivo efikasnijim nanostrukturama poput kvantnih tačaka (QDs) kakve su npr. QDs Se. Emisioni spektar kvantnih tačaka je veoma uzak i iznosi ~30 nm, pa usled kvantnog ograničenja boja, odnosno talasna dužina koju kvantna tačka emituje zavisi od njene veličine. QDs poput CdSe ili CdTe mogu ispoljavati i toksičnost u *in vivo* uslovima [82]. Toksičnost ne QDs se mogu dopirati sa Mn i tako unaprediti u netoksičnu i pogodnu za širu upotrebu npr. u bioimidžingu [83, 84]. U cilju sprečavanja toksičnosti QDs se mogu oblagati i sa različitim prevlakama koje sprečavaju izloženost i oksidaciju koje bi mogle da dovedu do povećanja toksičnosti. Jedna od strategija sprečavanja otpuštanja Cd kod široko ispitivanih QDs CdSe je stabilizacija kvantnih tačaka pomoću HAp-a [5]. Poboljšanje biokompatibilnosti CdSe/ZnS kvantnih tačaka koje se koriste u bioimidžingu, je postignuto konjugacijom sa HAp-om [85].

Komercijalno dostupne jezgro-omota kvantne tačke CdSe/ZnS talasne dužine 600 nm i prečnika ~20 nm i CdSeTe/ZnS talasne dužine 800 nm su površinski funkcionalizovane amino-grupama radi lakše konjugacije sa nHAp-om [5].

Konjugacija se vrši kovalentnim vezivanjem između amino grupa i OH grupa koje potiču iz nHAp-a (slika 10).

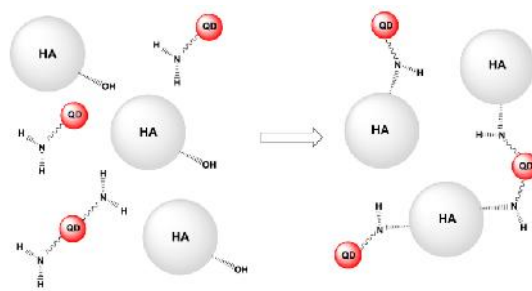


Slika 11 - Šematski prikaz modifikacije nFHAp-a i njegova konjugacija sa QDs. (PEA- fosfoetanol- amin; EDC- 1-(3-dimetilamino-propil)-3-etilkarbodiimid hidrohlorid; NHS- N- hidroksisukcinimid) [85]

Rezultati su pokazali da monodisperzne nFHAp-QDs estice ispoljavaju visoku luminiscencu, zadovoljavaju u biokompatibilnost, nisku toksičnost i mogu se potencijalno koristiti u *in vivo* imidžingu u svrhu dijagnoze i terapije tumora

5.3. HAp za primenu u inženjerstvu materijala

HAp ili kompozitni biomaterijali na bazi HAp-a ukazali su na opravdanost istraživanja u oblasti inženjerstva materijala. Dosadašnja istraživanja jasno su utvrdila da svojstva HAp-a kao nosača, značajno utiču na ponašanje i diferencijaciju materijala [86]. HAp u različitim kombinacijama sa drugim materijalima može takođe da utiče na diferencijaciju materijala putem TNF- α mehanizma [87].



Slika 10 - Šematski prikaz konjugacije nHAp sa površinski funkcionalizovanim QDs [5]

Primenom fluorescentne mikroskopije je potvrđeno da suspenzija nHAp-CdSe/ZnS pokazuju intenzivnu fluorescenciju na 350 nm. Studije u *in vivo* uslovima su takođe pokazale da uzorci ispoljavaju jaku luminiscencu i da bi potencijalno mogli da se koriste kao biomarkeri za rano otkrivanje, dijagnozu i tretman kancera.

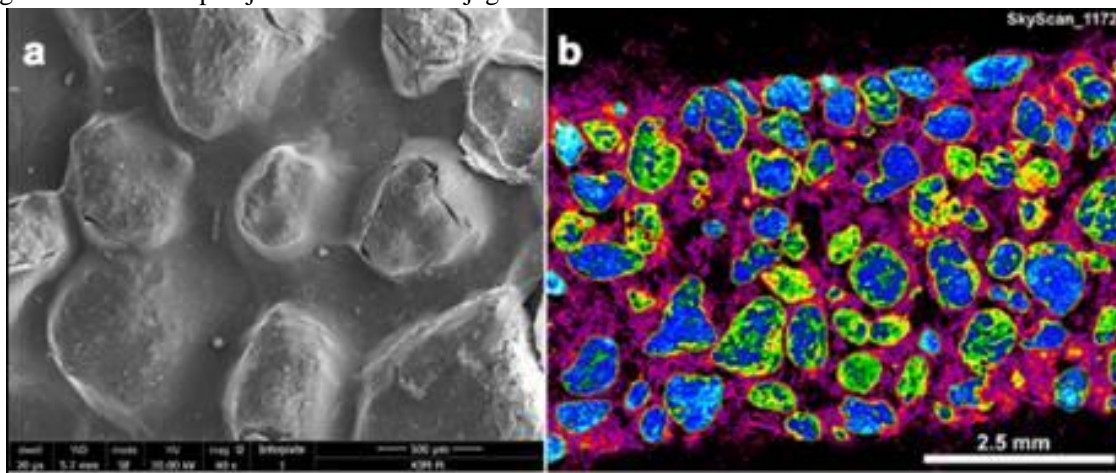
Jezgro-omota QDs dopirane manganom (Mn-ZnSe/ZnS) su konjugovane sa nHAp-om prethodno dopiranim fluorom, pri čemu je dobijen materijal: Mn-ZnSe/ZnS-nFHAp, sa ciljem da se razvije netoksičan i biokompatibilan fluorescentni materijal za bioimidžing [85]. ZnSe QDs su prvo dopirane manganom i funkcionalizovane karboksilnom grupom, a zatim obložene tankim slojem ZnS formiraju i na taj način jezgro-omota strukturu. nFHAp je aktiviran oleinskom kiselinom, a zatim funkcionalizovan amino grupama radi lakše konjugacije sa QDs (slika 11.).

Ova vrsta materijala može biti perspektivna u rekonstrukcijama kostiju jer se pokazala kao induktivna za osteoblaste uz supresiju zapaljenskih procesa (slika 12). Efektivna i bezbedna indukcija i diferencijacija materijala ključne su za kontrolu i uspešnost potencijala njihove primene. Istraživači su utvrdili važan uticaj površinske topografije HAp-a na osteogenetsku diferencijaciju materijala u potencijalnim primenama [88].

Optimalna promocija osteogenetske diferencijacije je ostvarena prilikom vrednosti prosečne hrpačnosti (Ra) od 0,77 do 1,09 μm kao i za vrednosti prosečnog rastojanja distance max/min (RSm) od 53,9 do 39,3 μm . Pozitivan uticaj HAp-a na diferencijaciju

matu njih elija potvrđeno je i kod polistirenskih posuda koje su obložene HAp-om prilikom testiranja [89]. Sinergetski efekat HAp-a je utvrđeno i kod njegovih

hibridnih sistema sa poli-l-laktidom (PLA) a na osteogenezu matu njih elija [90].



Slika 12 - Ch/gly/HAp materijal: a) SEM, b) MicroCT (HAp-plave boje) [87]

6. ZAKLJUČAK

Nano estice hidroksiapatita (nHAp) se mogu sintetisati različitim hemijskim postupcima, pri čemu se dobijaju prahovi različite morfologije i dimenzija. Nove strategije dobijanja nHAP-a i poboljšanja njegovih svojstava su kombinovane metode koje podrazumevaju kombinacije poput: hidrotermalne sinteze sa mehanohemijom, hidrotermalne sinteze sa hidrolizom, hidrotermalne sinteze sa emulzionim tehnikama i sl. U cilju poboljšanja bioloških svojstava HAp-a aktuelna je jonska supstitucija kroz modifikaciju hemijskih, strukturnih i morfoloških svojstava materijala, koristeći i pri tome dijagnostičke i terapijske sposobnosti supstituisanih jona. Mogućnost dopiranja nHAP-a metalnim jonima koji ispoljavaju magnetna i fotosenzitivna svojstva je od velikog značaja za uspostavljanje simultane dijagnoze i potencijalne terapije. Takođe, sinteza multifunkcionalnih i hibridnih materijala na bazi nHAP-a i prirodnih ili sintetskih polimera ima izuzetan potencijal u sistemima za ciljanu dostavu lekova. Posebno aktuelna istraživanja u oblasti nanomedicine ukazala su na visok potencijal korišćenja nHAP-a u dijagnostici i terapiji tumora.

Može se zaključiti da je razvoj nanotehnologija mnogome doprineo daljim progresima u nauci o HAp-u. Manipulacija sastava, strukture i površine HAp-a na nano skali mnogome je unapredila svojstva HAp-a i ukazala na njegove potencijale u specifičnim primenama preventivne i regenerativne medicine.

7. ZAHVALNICA

Ova istraživanja su podržana od strane Ministarstva za prosvetu, nauku i tehnološki razvoj Republike Srbije u okviru projekta III45004 koje finansira.

LITERATURA

- [1] Habraken W, Habibovic P, Epple M, Bohner M. Calcium phosphates in biomedical applications: materials for the future?, *Mater. Today*, Vol. 19, pp. 69-87, 2016.
- [2] Hou CH, Hou SM, Hsueh YS, Lin J, Wu HC, Lin FH. The in vivo performance of biomagnetic hydroxyapatite nanoparticles in cancer hyperthermia therapy, *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 3956-3960, 2009.
- [3] Uskoković V, Uskoković D. Nanosized hydroxyapatite and other calcium phosphates: Chemistry of formation and application as drug and gene delivery agents, *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.*, Vol. 96B, pp. 152-191, 2011.
- [4] Iafisco M, Varoni E, Foggia MD, Pietronave S, Fini M, Roveri N, Rimondini L, Prat M. Conjugation of hydroxyapatite nanocrystals with human immunoglobulin G for nanomedical applications, *Colloids Surf., B*, Vol. 90, pp. 1-7, 2012.
- [5] Guo Y, Shi D, Lian J, Dong Z, Wang W, Cho H, Liu G, Wang L, Ewing RC: Quantum dot conjugated hydroxylapatite nanoparticles for in vivo imaging, *Nanotechnol.*, Vol. 19, 175102, 2008.
- [6] Vukomanović M, Škapin SD, Janar B, Maksin T, Ignjatović N, Uskoković V, Uskoković D. Poly(D,L-lactide-co-glycolide)/hydroxyapatite core-shell nanospheres. Part 1: A multifunctional system for controlled drug delivery, *Colloids Surf., B*, Vol. 82, pp. 404-413, 2011.
- [7] Cai Y, Liu Y, Yan W, Hu Q, Tao J, Zhang M. Role of hydroxyapatite nanoparticle size in bone cell proliferation, *J. Mater. Chem.*, Vol. 17, pp. 3780-3787, 2007.

- [8] Wang Y, Liu L, Guo S. Characterization of biodegradable and cytocompatible nano-hydroxyapatite/polycaprolactone porous scaffolds in degradation in vitro, *Polym. Degrad. Stab.*, Vol. 95, pp. 207-213, 2010.
- [9] Chen F, Zhu Y, Wu J, Huang P, Cui D. Nanostructured calcium phosphates: Preparation and their application in biomedicine, *Nano. Biomed. Eng.*, Vol. 4, pp. 41-49, 2012.
- [10] Pramanik S, Agarwal AK, Rai KN, Garg A. Development of high strength hydroxyapatite by solid-state-sintering process, *Ceram. Int.*, Vol. 33, pp. 419-426, 2007.
- [11] Yeong KCB, Wang J, Ng SC. Mechanochemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite from CaO and CaHPO₄, *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 2705-2712, 2001.
- [12] Silva CC, Pinheiro AG, Miranda MAR, Goes JC, Sombra ASB. Structural properties of hydroxyapatite obtained by mechanosynthesis, *Solid State Sci.*, Vol. 5, pp. 553-558, 2003.
- [13] Wei M, Ruys AJ, Milthorpe BK, Sorrell CC. Precipitation of hydroxyapatite nanoparticles: Effects of precipitation method on electrophoretic deposition, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, Vol. 16, pp. 319-324, 2005.
- [14] Gouveia DS, Bressiani AHA, Bressiani JC. Phosphoric acid rate addition effect in the hydroxyapatite synthesis by neutralization method, *Mater. Sci. Forum*, Vol. 530-531, pp. 593-598, 2006.
- [15] Afshar A, Ghorbani M, Ehsani N, Saeri MR, Sorrell CC. Some important factors in the wet precipitation process of hydroxyapatite, *Mater. Design*, Vol. 24, pp. 197-202, 2003.
- [16] Bernard L, Freche M, Lacout JL, Biscans B. Preparation of hydroxyapatite by neutralization at low temperature-influence of purity of the raw material, *Powder Technol.*, Vol. 103, pp. 19-25, 1999.
- [17] Shih WJ, Chen YF, Wang MC, Hon MH. Crystal growth and morphology of the nano-sized hydroxyapatite powders synthesized from CaHPO₄·2H₂O and CaCO₃ by hydrolysis method, *J. Cryst. Growth*, Vol. 270, pp. 211-218, 2004.
- [18] Shojai MS, Khorasani MT, Jamshidi A. Hydrothermal processing of hydroxyapatite nanoparticles-a Taguchi experimental design approach, *J. Cryst. Growth*, Vol. 361, pp. 73-84, 2012.
- [19] Stojanovi Z, Ignjatovi N, Wu V, Zunji Z, Skapin S, Veselinovi Lj, Miljkovi M, Uskokovi V, Uskokovi D, Hydrothermally processed 1D hydroxyapatite: Mechanism of formation and biocompatibility studies, *Mater. Sci. Eng. C.*, Vol. 68, 746-757, 2016.
- [20] Kuma AR, Kalainathan S. Sol-gel synthesis of nanostructured hydroxyapatite powder in presence of polyethylene glycol, *Physica B*, Vol. 405, pp. 2799-2802, 2010.
- [21] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphates in nature, *Biol. Med. Mater.*, Vol. 2, pp. 399-498, 2009.
- [22] Ignjatovi N, Ajdukovi Z, Rajkovi J, Najman S, Mihailovi D, Uskokovi D. Enhanced Osteogenesis of Nanosized Cobalt-substituted Hydroxyapatite, *J. Bionic Eng.*, Vol. 12, pp. 604-612, 2015.
- [23] Swetha M, Sahithi K, Moorthi A, Saranya N, Saravanan S, Ramasamy K, Srinivasan N, Selvamurugan N. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of nano-hydroxyapatite-zinc for bone tissue engineering applications, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Vol. 12, pp. 167-172, 2012.
- [24] Dorozhkin SV. Calcium orthophosphate coatings on magnesium and its biodegradable alloys, *Acta Biomater.*, Vol. 10, pp. 2919-2934, 2014.
- [25] Lin K, Zhou Y, Zhou Y, Qu H, Chen F, Zhu Y, Chang J. Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release, *J. Mater. Chem.*, Vol. 21, pp. 16558-16565, 2011.
- [26] Oviedo MJ, Contreras O, Duhalt RV, Carbajal-Arizona GG, Hirata GA, McKittrick J. Photoluminescence of europium-activated hydroxyapatite nanoparticles in body fluids, *Sci. Adv. Mater.*, Vol. 4, pp. 558-562, 2012.
- [27] Veselinovi Lj, Karanovi Lj, Stojanovi Z, Bra ko I, Markovi S, Ignjatovi N, Uskokovi D. Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing, *J. Appl. Cryst.*, Vol. 43, pp. 320-327, 2010.
- [28] Zhu K, Qiu J, Ji H, Yanagisawa K, Shimanouchi R, Onda A, Kajiyoshi K. Crystallographic study of lead-substituted hydroxyapatite synthesized by high-temperature mixing method under hydrothermal conditions, *Inorg. Chim. Acta*, Vol. 363, pp. 1785-1790, 2010.
- [29] Zhu K, Yanagisawa K, Shimanouchi R, Onda A, Kajiyoshi K. Preferential occupancy of metal ions in the hydroxyapatite solid solutions synthesized by hydrothermal method, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 26, pp. 509-513, 2006.

- [30] Stojanovi Z, Veselinovi Lj, Markovi S, Ignjatovi N, Uskokovi D. Hydrothermal Synthesis of Nano-sized Pure and Cobalt-Exchanged Hydroxyapatite, *Mater. Manuf. Processes*, Vol. 24, pp. 1096-1103, 2009.
- [31] Ignjatovi N, Ajdukovi Z, Savi V, Najman S, Mihailovi D, Vasiljevi P, Stojanovi Z, Uskokovi V, Uskokovi D. Nanoparticles of cobalt-substituted hydroxyapatite in regeneration of mandibular osteoporotic bones, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, Vol. 24, pp. 343-354, 2013.
- [32] Kulanthavel S, Roy B, Agarwal T, Giri S, Pramanik K, Pal K, Ray SS, Maiti TK, Banerjee I. Cobalt doped proangiogenic hydroxyapatite for bone tissue engineering application, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 58, pp. 648-658, 2016.
- [33] Wu HC, Wang TW, Sun JS, Wang WH, Lin FH. A novel biomagnetic nanoparticle based on hydroxyapatite, *Nanotechnol.*, Vol. 18, 165601, 2007.
- [34] Ajdukovi ZR, Krstev TM, Ignjatovi NL, Stojanovi Z, Mladenovi AS, Koci BD, Najman S, Petrovi ND, Uskokovi DP. In vitro evaluation of nanoscale hydroxyapatite-based bone reconstructive materials with antimicrobial properties, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Vol. 16, pp. 1420-1428, 2016.
- [35] Cox SC, Jamshidi P, Grover LM, Mallick KK. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 35, pp. 106-114, 2014.
- [36] Ito A, Ojima K, Naito H, Ichinose N, Tateishi T. Preparation, solubility, and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics, *J. Biomed. Mater. Res.*, Vol. 50, pp.178-183, 2000.
- [37] Tang Y, Chappell HF, Dove MT, Reeder RJ, Lee YJ. Zinc incorporation into hydroxylapatite, *Biomaterials*, Vol. 30, pp. 2864-2872, 2009.
- [38] Hayakawa S, Ando K, Tsuru K, Osaka A, Fujii E, Kawabata K. Structural characterization and protein adsorption property of hydroxyapatite particles modified with zinc ions, *J. Am. Ceram. Soc.*, Vol. 90, pp. 565-569, 2007.
- [39] Li M, Xiao X, Liu R, Chen C, Huang L. Structural characterization of zinc-substituted hydroxyapatite prepared by hydrothermal method, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, Vol. 19, pp. 797-803, 2008.
- [40] Kalita SJ, Bhatt HA. Nanocrystalline hydroxyapatite doped with magnesium and zinc: synthesis and characterization, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 27, pp. 837-848, 2007.
- [41] Miyaji F, Kono Y, Suyama Y. Formation and structure of zinc-substituted calcium hydroxyapatite, *Mater. Res. Bull.*, Vol. 40, pp. 209-220, 2005.
- [42] Anwar A, Akbar S, Sadiqa A, Kazmi M. Novel continuous flow synthesis, characterization and antibacterial studies of nanoscale zinc substituted hydroxyapatite bioceramics, *Inorg. Chim. Acta*, Vol. 453, pp. 16-22, 2016.
- [43] Zuo KH, Zeng YP, Jiang D. Synthesis and magnetic property of irons-doped hydroxyapatite, *J. Nanosci. Nanotechnol.*, Vol. 12, pp. 7096-7100, 2012.
- [44] On WP, Meejoo S, Tang M. Incorporation of iron into nano hydroxyapatite particles synthesized by the microwave process, *Int. J. Nanosci.*, Vol. 06, pp. 9-16, 2007.
- [45] Ito A, Shinkai M, Honda H, Kobayashi T. Medical application of functionalized magnetic nanoparticles, *J. Biosci. Bioeng.*, Vol. 100, pp. 1-11, 2011.
- [46] Yingguang L, Zhuoru Y, Jiang C. Preparation, characterization and antibacterial property of cerium substituted hydroxyapatite nanoparticles, *J. Rare Earths*, Vol. 25, pp. 452-456, 2007.
- [47] Ciobanu CS, Popa CL, Predoli D. Cerium-doped hydroxyapatite nanoparticles synthesized by the coprecipitation method, *J. Serb. Chem. Soc.*, Vol. 81, pp. 433-446, 2016.
- [48] Bardhan R, Lal S, Joshi A, Halas NJ, Theranostic nanoshells: from probe design to imaging and treatment of cancer, *Acc. Chem. Res.* Vol. 44, pp. 936-946, 2011.
- [49] Barta CA, Barrable KS, Jia J, Thompson KH, Wasan KM, Orvig C. Lanthanide containing compounds for therapeutic care in bone resorption disorders, *Dalton Trans.* Vol. 43, pp. 5019-5030, 2007.
- [50] Chen F, Huang P, Zhu YJ, Wu J, Zhang CL, Cui DX. The photoluminescence, drug delivery and imaging properties of multifunctional Eu³⁺/Gd³⁺ dual-doped hydroxyapatite nanorods, *Biomaterials*, Vol. 32, pp. 9031-9039, 2011.
- [51] Karthi S, Kumar G S, Thamizhavel A, Girija E K. Biocompatible Luminomagnetic Hydroxyapatite Nanoparticles for Dual Model Bioimaging, *J. Bionanosci.*, Vol. 10, pp. 267-274, 2016.
- [52] Cipreste MF, Peres AM, Cotta AC, Aragon FH, Antunes AM, Leal AS, Macedo WA, Sousa EB. Synthesis and characterization of ¹⁵⁹Gd-doped hydroxyapatite nanorods for bioapplications as theranostic systems, *Mater. Chem. Phys.*, Vol. 181, pp. 301-311, 2016.

- [53] Mistry AS, Mikos AG. Tissue engineering strategies for bone regeneration, *Adv. Biochem. Eng./Biotechnol.*, Vol. 94, pp. 1-22, 2005.
- [54] Sokolova V, Epple M. Inorganic nanoparticles as carriers of nucleic acids into cells, *Angew. Chem. Int. Ed.*, Vol. 47, pp. 1382-1395, 2008.
- [55] Ignjatovic N, Ajdukovic Z, Savic V, Uskokovic D. Size effect of calcium phosphate coated with poly-DL-lactide-co-glycolide on healing processes in bone reconstruction, *J. Biomed. Mater. Res. B*, Vol. 94B, pp. 108-117, 2010.
- [56] Ignjatovi N, Tomi S, Daki M, Miljkovi M, Plavši M, Uskokovi D. Synthesis and properties of hydroxyapatite/poly-Llactide composite biomaterials, *Biomaterials*, Vol. 20, pp. 809-816, 1999.
- [57] Ajdukovi Z, Najman S, Ordevic Lj, Savi V, Mihailovi D, Petrovi D, Ignjatovi N, Uskokovi D. Repair of bone tissue affected by osteoporosis with hydroxyapatite/poly-l-lactide (HAp-PLLA) with and without blood plasma, *J. Biomater. Appl.*, Vol. 20, pp. 179-190, 2005.
- [58] Ignjatovi N, Ninkov P, Koji V, Bokurov M, Srđi V, Krnojelac D, Selakovi S, Uskokovi D. Cytotoxicity and fibroblast properties during in vitro test of biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide biocomposites and different phosphate materials, *Microsc. Res. Tech.*, Vol. 69, pp. 976-982, 2006.
- [59] Ignjatovi N, Wu V, Ajdukovi Z, Krstev TM, Uskokovi V, Uskokovi D. Chitosan-PLGA polymer blends as coatings for hydroxyapatite nanoparticles and their effect on antimicrobial properties, osteoconductivity and regeneration of osseous tissues, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 60, pp. 357-364, 2016.
- [60] Ignjatovi N, Gaši KP, Wu V, Ajdukovi J, Koji V, Radovi DV, Kuzmanovi M, Uskokovi V, Uskokovi D. Selective anticancer activity of hydroxyapatite/chitosan-poly(D,L)-lactide-co-glycolide particles loaded with an androstane-based cancer inhibitor, *Colloids Surf., B*, Vol. 148, pp. 629-639, 2016.
- [61] Uskokovi V, Ignjatovi N, Petranovi N. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-collagen biocomposite materials, *Mater. Sci. Forum*, Vol. 413, pp. 269-274, 2003.
- [62] Samandari SS, Nezafati N, Samandaric SS. The effective role of hydroxyapatite-based composites in anticancer drug-delivery systems, *Crit. Rev. Ther. Drug Carrier Syst.*, Vol. 33, pp. 41-75, 2016.
- [63] Ignjatovi NL, Ninkov P, Sabetrasekh R, Uskokovi DP. A novel nano drug delivery system based on tige-cycline-loaded calcium phosphate coated with poly-DL-lactide-co-glycolide, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, Vol. 21, pp. 231-239, 2010.
- [64] Ignjatovic N, Ninkov P, Sabetrasekh R, Lyngstadaas SP, Uskokovic D. In vitro evaluation of multifunctional nano drug delivery system based on tige-cycline-loaded calcium phosphate/poly-DL-lactide-co-glycolide, *Bio-Med. Mater. Eng.*, Vol. 24, pp. 1647-1658, 2014.
- [65] Ignjatovi N, Savi V, Najman S, Plavsi M, Uskokovi D. A study of HAp/PLLA composite as a substitute for bone powder, using FT-IR spectroscopy, *Biomaterials*, Vol. 22, pp. 571-575, 2001.
- [66] Ignjatovi N, Uskokovi D. Synthesis and Application of Composite Biomaterial Hydroxyapatite/Poly-lactide, *Appl. Surf. Sci.*, Vol. 238, pp. 314-319, 2004.
- [67] Ignjatovi N, Jovanovi J, Suljovruji E, Uskokovi D. Injectable polydimethylsiloxane/hydroxyapatite composite cement, *Bio-Med. Mater. Eng.*, Vol. 13, pp. 401-410, 2003.
- [68] Ignjatovi N, Uskokovi D. Biodegradable composites based on nano-crystalline calcium phosphate and bioresorbable polymers, *Adv. Appl. Ceram.*, Vol. 107, pp. 142-147, 2008.
- [69] Ignjatovi N, Ajdukovi Z, Uskokovi D. New biocomposite [biphasic calcium phosphate/poly-DL-lactide-co-glycolide/biostimulative agent] filler for reconstruction of bone tissue changed by osteoporosis, *J. Mater. Sci.: Mater. Med.*, Vol. 16, pp. 621-626, 2005.
- [70] Ignjatovi N, Ninkov P, Ajdukovi Z, Radovi DV, Uskokovi D. Biphasic calcium phosphate/poly-dl-lactide-co-glycolide composite biomaterial as bone substitute, *J. Eur. Ceram. Soc.*, Vol. 27, pp. 1589-1594, 2007.
- [71] Ignjatovi NL, Liu CZ, Czernuszka JT, Uskokovi DP. Micro and nano/injectable composite biomaterials of calcium phosphate coated with poly(dl-lactide-co-glycolide), *Acta Biomater.*, Vol. 3, pp. 927-935, 2007.
- [72] Ignjatovi N, Djuri SV, Miti Ž, Jankovi D, Uskokovi D. Investigating an organ-targeting platform based on hydroxyapatite nanoparticles using a novel in situ method of radioactive ¹²⁵Iodine labeling, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 43, pp. 439-446, 2014.
- [73] Yoon J, Kim D, Siregar A, Lee BY, Kwon KY, Byun J, Woo DK. 5-Fluorouracil-coated hydroxyapatite nanoparticles as anticancer drug delivery carriers, *Bull. Korean Chem. Soc.*, Vol. 36, pp. 445-446, 2015.
- [74] Chu SH, Feng DF, Ma YB, Li ZQ. Hydroxyapatite nanoparticles inhibit the growth of human glioma

- cells in vitro and in vivo, *Int. J. Nanomed.*, Vol. 7, pp. 3659-3666, 2012.
- [75] Ignjatovi N, Uskokovi V, Ajdukovi Z, Uskokovi D. Multifunctional hydroxyapatite and poly(D,L-lactide-co-glycolide) nanoparticles for the local delivery of cholecalciferol, *Mater. Sci. Eng. C*, Vol. 33, pp. 943-950, 2013.
- [76] Leucuta SE. Nanotechnology for delivery of drugs and biomedical applications, *Curr. Clin. Pharmacol.*, Vol. 5, pp. 257-280, 2010.
- [77] Petros RA, DeSimone JM. Strategies in the design of nanoparticles for therapeutic applications, *Nat. Rev. Drug Discov.*, Vol. 9, pp. 615-627, 2010.
- [78] Lavie IZ, Michaeli Y, Reiter Y. Novel antibodies as anticancer agents, *Oncogene*, Vol. 26, pp. 3714-3733, 2007.
- [79] Dujardin E, Mann S. Bio-inspired materials chemistry, *Adv. Mater.*, Vol. 14, pp. 775-788, 2002.
- [80] Arruebo M, Valladares M, Fernandez AG. Antibody-conjugated nanoparticles for biomedical applications, *J. Nanomater.*, Vol. 2009, p. 24, 2009.
- [81] Kumar Swain S, Sarkar D. Study of BSA protein adsorption/release on hydroxyapatite nanoparticles, *Appl. Surf. Sci.*, Vol. 286, pp. 99-103, 2013.
- [82] Yong KT, Law WC, Hu R, Ye L, Liu L, Swihart MT, Prasad PN. Nanotoxicity assessment of quantum dots: from cellular to primate studies, *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 42, pp. 1236-1250, 2013.
- [83] Wu P, Yan XP. Doped quantum dots for chemo/bio-sensing and bioimaging, *Chem. Soc. Rev.*, Vol. 42, pp. 5489-5521, 2013.
- [84] Ding K, Jing LH, Liu CY, Hou Y, Gao MY. Magnetically engineered Cd-free quantum dots as dual-modality probes for fluorescence/magnetic resonance imaging of tumors, *Biomaterials*, Vol. 35, pp. 1608-1617, 2014.
- [85] Zhou R, Li M, Wang S, Wu P, Wu L, Hou X. Low-toxic Mn-doped ZnSe@ZnS quantum dots conjugated with nano-hydroxyapatite for cell imaging, *Nanoscale*, Vol. 6, pp. 14319-14325, 2014.
- [86] Xiao D, Guo T, Yang F, Feng G, Shi F, Li J, Wang D, Duan K, Weng, J. In situ formation of nano-structured calcium phosphate coatings on porous hydroxyapatite scaffolds using a hydrothermal method and the effect on mesenchymal stem cell behavior, *Ceram. Int.*, Vol. 43, pp. 1588-1596, 2017.
- [87] Przekora A, Ginalska G. Chitosan/ -1,3-glucan/hydroxyapatite bone scaffold enhances osteogenic differentiation through TNF- α -mediated mechanism, *Mater. Sci. Eng. C.*, Vol. 73, pp 225-233, 2017.
- [88] Yang W, Han W, He W, Li J, Wang J, Feng H, Qian Y. Surface topography of hydroxyapatite promotes osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells, *Mater. Sci. Eng. C.*, Vol. 60, pp 45-53, 2016.
- [89] Iijima K, Suzuki R, Izuka A, Ueno-Yokohata H, Kiyokawa N, Hashizume M. Surface functionalization of tissue culture polystyrene plates with hydroxyapatite under body fluid conditions and its effect on differentiation behaviors of mesenchymal stem cells, *Colloids Surf. B*, Vol. 147, pp. 351-359, 2016.
- [90] Amjadian S, Seyedjafari E, Zeynali B, Shabani I. The synergistic effect of nano-hydroxyapatite and dexamethasone in the fibrous delivery system of gelatin and poly(l-lactide) on the osteogenesis of mesenchymal stem cells, *Int. J. Pharm.*, Vol. 507, pp. 1-11, 2016.

SUMMARY

MULTIFUNCTIONAL AND HYBRID SYSTEMS BASED ON CALCIUM-PHOSPHATE AND HYDROXYAPATITE FOR PREVENTIVE AND REGENERATIVE MEDICINE

Thanks to its special characteristics, such as relatively easy chemical modification of structure and surface, calcium phosphates (CaP) especially hydroxyapatite (HAp) is found widely used in various fields of biomedicine. Beside of the ease chemical modification, which includes metal doping, enhancement of properties of the HAp can be accomplished by combinations with various therapeutic and/or diagnostic agents. Materials base on CaP or HAp can be used in bone tissue engineering for reconstruction of bone damages as bone graft substitute as well as bone drug delivery systems. The improved properties of HAp were realized by doping with different elements (Co, Zn, Fe, Eu, Gd etc.). Synthesis, characterization and application of nanoparticulate multifunctional and hybrid materials based on CaP and HAp, is currently receiving tremendous attention. Multifunctional hybrid systems based on HAp could integrate medical preventive and regenerative potential in a single particle.

Key words: calcium phosphates, hydroxyapatite, preventive and regenerative medicine, multifunctional, hybrid, nanomaterials