

Karakterizacija sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka spektroskopijom elektronske paramagnetske rezonancije nakon sterilizacije

Grego, Timor

Doctoral thesis / Doktorski rad

2023

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Science / Sveučilište u Zagrebu, Prirodoslovno-matematički fakultet**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:217:207166>

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

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



Repository / Repozitorij:

[Repository of the Faculty of Science - University of Zagreb](#)





Sveučilište u Zagrebu

Prirodoslovno-matematički fakultet
Fizički odsjek

Timor Grego

**KARAKTERIZACIJA SINTETIČKIH
DENTALNIH KOŠTANIH
NADOMJESTAKA SPEKTROSKOPIJOM
ELEKTRONSKE PARAMAGNETSKE
REZONANCIJE NAKON STERILIZACIJE**

DOKTORSKI RAD

Mentor:
dr. sc. Nadica Maltar Strmečki

Zagreb, 2023.



University of Zagreb

Faculty of Science
Department of Physics

Timor Grego

**CHARACTERIZATION OF DENTAL
SYNTHETIC BONE SUBSTITUTES WITH
ELECTRON PARAMAGNETIC
RESONANCE SPECTROSCOPY AFTER
STERILIZATION**

DOCTORAL DISSERTATION

Supervisor:
dr. sc. Nadica Maltar Strmečki

Zagreb, 2023.

Životopis mentora

Dr. sc. Nadica Maltar Strmečki diplomirala je fiziku, smjer eksperimentalna fizika, na Prirodoslovno matematičkom fakultetu (PMF) Sveučilišta u Zagrebu 1997. g. Magistrirala je u području medicinske fizike 2002. g. te doktorirala 2005. godine na PMF-u u Zagrebu. Dr. sc. Maltar Strmečki je do 2011. radila na Veterinarskom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu u Zavodu za fiziku, gdje je 2008. godine izabrana za docenta iz područja prirodnih znanosti, polje fizika, a od 2011. do danas zaposlena je na Institutu Ruđer Bošković. Godine 2016. izabrana je u zvanje viši znanstveni suradnik, a 2022. u zvanje znanstveni savjetnik. U okviru programa “DAAD scholarship for experienced researcher” 2013. godine je boravila u Physical Department of the Universität Osnabrück, u Osnabrücku u Njemačkoj. Godinu dana 2014. provela je na stručnom usavršavanju na Martin-Luther-Universität Halle-Wittenberg, Institut für Chemie-Physikalische Chemie, Halle, Njemačka. Do danas je objavila više od 55 znanstvenih radova indeksiranih u bazi WoS/CC. Mentor je više diplomskih i doktorskih radova. Vodila je NATO Science for Peace and Security (SPS) projekt BioPhyMeTRE, a trenutno vodi HORIZON2020 PRIMA projekt FunTomP. Bila je suradnik na brojnim međunarodnim i domaćim projektima. Recenzent je brojnih znanstvenih radova u više međunarodnih časopisa, kao i većeg broja inozemnih znanstvenih projekata za područje kemije i fizike u okviru COST, FP7, HORIZON2020 i HORIZON EUROPE programa. Članica je međunarodnih i domaćih strukovnih udruga i to International Association of Biological and EPR Radiation Dosimetry, International Radiation Physics Society, European Radiation Dosimetry Group, Hrvatskoga biofizičkog društva te Hrvatskoga društva za zaštitu od zračenja.

Sažetak

Sintetički kalcijevi fosfati i sulfati koriste se u dentalnoj medicini pri liječenju koštanih oštećenja, a prije uporabe se steriliziraju gama zračenjem. Promjene u strukturi i sastavu istraživanih materijala nakon sterilizacije i izlaganja modelnim medijima (fiziološka otopina, umjetna slina, simulirana tjelesna tekućina) praćene su osnovnim metodama karakterizacije: difrakcijom rendgenskih zraka na prahu (PXRD), termogravimetrijskim analizama (TGA) i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR). Kao glavna metoda istraživanja korištena je metoda elektronske paramagnetske rezonancije (EPR) čija je prednost u osjetljivosti na paramagnetske tvari ugrađene prilikom sinteze i na zračenjem inducirane radikale. Istraživani su hidrati kalcijevog sulfata (CS): kalcijev sulfat dihidrat (CSDH) i kalcijev sulfat hemihidrat (CSHH) te kalcijevi fosfati: hidroksiapatit (HAP) i magnezijem supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP). Pokazano je da izlaganje CS fiziološkoj otopini i umjetnoj slini ima znatan utjecaj na koncentracije radikala u oba hidrata. EPR spektroskopijom su praćene promjene u strukturi HAP-a i Mg-HAP-a nakon zračenja i uranjanja u simuliranu tjelesnu tekućinu i fiziološku otopinu. Snimljeni su i EPR spektri uzoraka inkubirani 2 h na temperaturama do 373 K. Rezultati su potvrdili da zračenje ne uzrokuje promjene u sastavu ili strukturi na ispitivanim kalcijevim fosfatima. Smanjenje intenziteta ili potpuni nestanak EPR signala radikala nakon izlaganja modelnim medijima bio je popraćen nestankom ostalih faza nastalih kao nusproizvod tijekom sinteze uzoraka, što je potvrđeno PXRD i FTIR analizom. Uzorci su sterilizirani i hladnom plazmom, no metoda nije dovoljno istražena i standardizirana da bi se mogla usporediti s učinkovitosti sterilizacije zračenjem.

Ključne riječi

elektronska paramagnetska rezonancija, sterilizacija, gama zračenje, RF plazma, sintetički koštani nadomjesci, kalcijevi sulfati, kalcijevi fosfati, ionski supstituirani hidroksiapatit, umjetna slina, simulirana tjelesna tekućina, fiziološka otopina

Extended abstract

Introduction:

Synthetic calcium phosphate and sulphate ceramics in different shapes (pastes, powders, granules, etc.) have gained acceptance for various dental applications such as fillers for periodontal defects. Due to their resorption in the body and direct contact with tissues, they are usually sterilized by gamma irradiation to inactivate bacteria, fungal spores and viruses. During sterilization, there may be changes in the properties of the materials used. Therefore, the aim of this research is to contribute improving the quality of materials, that must be sterile, of high quality, effective and reliable before entering the oral cavity. Calcium sulfate (CS) hydrates, calcium sulfate dihydrate (CSDH), calcium sulfate hemihydrate (CSHH) are a reasonable alternative to autogenous dental bone graft and are used as a bone filler or to treat of bone defects. Calcium phosphates (CaP) are the most commonly used bioceramics for the regeneration of various bone tissues. In this dissertation, unsubstituted hydroxyapatite - HAP and magnesium-substituted hydroxyapatite Mg-HAP were investigated. According to the literature review, this is the first study on the influence of saline and artificial saliva on the concentration of gamma-induced radicals in dental bone substitutes based on calcium sulfate.

Materials and methods:

The changes in the structure and composition of the investigated materials during sterilization and exposure to model media were monitored using basic characterization methods, namely powder X-ray diffraction (PXRD), thermogravimetric analyzes (TGA) and Fourier-transform infrared spectroscopy. Electron paramagnetic resonance (EPR) spectroscopy was used as the main characterization method in this study due its sensitivity for detection of paramagnetic ions incorporated during synthesis and radiation induced radicals after sterilization, storage and interaction with model media. To this purpose, in this study, the changes in the concentration of radicals induced by sterilization of calcium sulfates and calcium phosphates with gamma-irradiation were monitored during exposure to model media (saline solution, artificial saliva and simulated body fluid).

Results and discussion:

The results show that saline and artificial saliva have a significant effect on the radical concentration in both hydrates, individually or as a mixture. The greatest decrease in radical concentration was observed for CSHH after mixing with saline or artificial saliva, while CSDH maintained a relatively high radical concentration. As for calcium phosphates, the changes in the local structure of non-substituted hydroxyapatite – HAP and magnesium substituted hydroxyapatite - Mg-HAP were monitored by EPR spectroscopy after irradiation and immersion in corrected simulated fluid and saline for 28 days. To better understand the stability of the radical species induced by sterilization, EPR spectra of samples kept for 2 h at temperatures up to 373 K were recorded to provide an insight into the stability of the sample storage conditions by the accelerated aging method. The results confirmed that irradiation does not cause changes in the composition or structure of any of the investigated materials. The fading or complete disappearance of the radical signal in the EPR spectra after immersion in both media was accompanied by the disappearance of other phases formed as a byproduct in the synthesis of substituted HAP, which was confirmed by PXRD and FTIR analysis.

Conclusion:

The results for calcium sulfates suggest that products designed for use as bone graft materials can be used more safely if the amount of more stable CSDH is minimized. The obtained results for calcium phosphates confirm the great potential of Mg-HAPs for biomedical applications, although more attention should be given to the processes related to the storage stability of the samples at different temperatures. In addition, the mentioned samples were also sterilized with cold plasma, but the method itself has not yet been sufficiently researched and standardized to be comparable with the efficiency of the gamma radiation sterilization method.

Keywords

electron paramagnetic resonance, sterilization, gamma irradiation, RF plasma, synthetic bone substitutes, calcium sulfate, calcium phosphate, ion substituted hydroxyapatite, artificial saliva, simulated body fluid, saline solution

Zahvale

Najveća zahvala mentorici dr.sc. Nadici Maltar-Strmečki na vodstvu, pomoći i strpljenju za vrijeme istraživanja i izrade doktorata. Hvala na pruženoj podršci, prenesenom znanju te na mentorstvu u pravom smislu te riječi.

Zahvaljujem se i djelatnicima Laboratorija za biokoloide i površinsku kemiju Instituta Ruđer Bošković, a posebno voditeljici dr. sc. Maji Dutour Sikirić. Također, hvala dr. sc. Lari Jurković i dr. sc. Božani Petrović na suradnji za vrijeme istraživanja. Hvala djelatnicima Laboratorija za radijacijsku kemiju i dozimetriju na suradnji u ozračivanju uzoraka. Hvala i mr. sc. Ivi Matkoviću, dr. med. dent. na svim savjetima vezanim uz dentalnu medicinu. Također, velika hvala i djelatnicima Laboratorija za fiziku plazme Instituta za fiziku, a posebno voditelju, dr. sc. Nikši Krstuloviću.

Na kraju, hvala mojoj obitelji, djeci Luki, Luciji i Marti, a posebno supruzi Ani na velikoj podršci, ljubavi i strpljenju. Bez toga ovaj rad ne bi bio moguć.



Ova doktorska disertacija je izrađena u Institutu Ruđer Bošković, u Zavodu za fizičku kemiju pod vodstvom dr. sc. Nadice Maltar-Strmečki u sklopu doktorskog studija Fizike, smjer Medicinska fizika na Prirodoslovno – matematičkom fakultetu Sveučilišta u Zagrebu.



Istraživanje je sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom HRZZ-IP-2018-01-1493 "Mehanizmi nastajanja kalcijevih fosfata na anorganskim nanomaterijalima. Biomimetski put priprave multifunkcionalnih nanokompozita za regeneraciju čvrstih tkiva, CaPBiomimNanocomp" voditeljice dr. sc. Maje Dutour Sikirić.

SADRŽAJ

1	UVOD	1
2	LITERATURNI PREGLED	5
2.1	STERILIZACIJA IONIZIRAJUĆIM ZRAČENJEM.....	5
2.2	STERILIZACIJA RF PLAZMOM.....	8
2.3	KOŠTANI NADOMJESNI MATERIJALI	9
2.3.1	<i>Autologni materijali</i>	9
2.3.2	<i>Alogeni materijali</i>	10
2.3.3	<i>Ksenogeni materijali</i>	10
2.3.4	<i>Aloplastični materijali</i>	10
2.4	KALCIJEVI SULFATI U DENTALNOJ MEDICINI.....	11
2.5	KALCIJEVI FOSFATI U DENTALNOJ MEDICINI.....	12
2.6	REZULTATI DOSADAŠNJIH ISTRAŽIVANJA DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA EPR SPEKTROSKOPIJOM.....	15
3	TEORIJSKA OSNOVICA	18
3.1	PRINCIPI ELEKTRONSKE PARAMAGNETSKE REZONANCIJE.....	18
3.2	SPINSKI HAMILTONIJAN	21
3.2.1	<i>Elektronska Zeemanova interakcija</i>	22
3.2.2	<i>Cijepanje u nultom polju</i>	23
3.2.3	<i>Nuklearna Zeemanova interakcija</i>	24
3.2.4	<i>Hiperfina interakcija</i>	24
3.3	g TENZOR	27
3.4	EPR SPEKTRI UZORAKA PRAHA	30
4	MATERIJALI I METODE	33
4.1	PRIPREMA UZORAKA	33
4.1.1	<i>Kalcijevi sulfati</i>	33
4.1.2	<i>Kalcijevi fosfati</i>	34
4.2	METODE KARAKTERIZACIJE	36
4.2.1	<i>Elektronska paramagnetska rezonancija – EPR</i>	36
4.2.2	<i>Računalna simulacija spektara</i>	38
4.2.3	<i>Osnovne metode karakterizacije</i>	40

4.3	METODE STERILIZACIJE	43
4.3.1	<i>Zračenje gama zračenjem</i>	43
4.3.2	<i>RF plazma</i>	45
5	REZULTATI I RASPRAVA	46
5.1	KARAKTERIZACIJA SINTETIČKIH DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA NA BAZI KALCIJEVIH SULFATA	46
5.2	KARAKTERIZACIJA SINTETIČKIH DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA NA BAZI KALCIJEVIH SULFATA NAKON IZLAGANJA MODELNIM MEDIJIMA	55
5.3	KARAKTERIZACIJA KALCIJEVIH SULFATA STERILIZIRANIH PLAZMOM.....	63
5.4	KARAKTERIZACIJA SINTETIČKIH DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA NA BAZI KALCIJEVIH FOSFATA	64
5.5	KARAKTERIZACIJA SINTETIČKIH DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA NA BAZI KALCIJEVIH FOSFATA IZLOŽENIH MODELNIM MEDIJIMA	76
5.6	TEMPERATURNNA OVISNOST SINTETIČKIH DENTALNIH KOŠTANIH NADOMJESTAKA NA BAZI KALCIJEVIH FOSFATA.....	84
5.7	KARAKTERIZACIJA KALCIJEVIH FOSFATA STERILIZIRANIH PLAZMOM.....	92
6	ZAKLJUČAK	93
7	LITERATURA	95
8	ŽIVOTOPIS	115

1 UVOD

Ova disertacija pripada grupi multidisciplinarnih istraživanja iz područja medicinske fizike s naglaskom na karakterizaciju materijala EPR spektroskopijom te praćenje utjecaja metoda sterilizacije, gama zračenjem i RF plazmom (engl. *radio-frequency plasma*), na materijale koji se primjenjuju u dentalnoj medicini. Cilj ovog istraživanja je karakterizirati te u konačnici poboljšati svojstva sintetičkih koštanih nadomjestaka koji se koriste u dentalnoj medicini. Istraživanje ove vrste na danim materijalima važno je zbog utjecaja na kvalitetu života pacijenata kojima se ugrađuju takvi materijali te zbog utjecaja na zdravstveni sustav. Također je bitno spomenuti socioekonomske učinke zbog eventualnih neuspjelih implantacija, neuspjele regeneracije kosti ili upalnih reakcija zbog neadekvatnih materijala.

Uporaba sintetičkih koštanih nadomjestaka u raznim farmaceutskim oblicima (tzv. formulacijama), od prahova, granula, pasta, cementa i slično, je sve rašireniji postupak za popravak koštanih defekata ili za regeneraciju željenog volumena kosti [1], [2]. U tu svrhu najrašireniji i opće prihvaćeni sintetički koštani nadomjesci se baziraju na kalcijevim fosfatima i kalcijevim sulfatima zbog toga što su biokompatibilni i pokazuju histomorfološku sličnost s ljudskom kosti [3]. Budući da se takvi pripravci resorbiraju u tijelu i direktno dolaze u kontakt s ljudskim tkivom prije kirurškog zahvata se svi implantati, bez obzira na podrijetlo, moraju sterilizirati. Najčešće se steriliziraju gama zračenjem u svrhu potpunog inaktiviranja mikroorganizama, bakterija, virusa, gljivica i plijesni. Utjecaj gama sterilizacije na implantate temeljene na kalcijevim fosfatnim materijalima do danas nije detaljno istražen [4-6], dok su rijetki podaci o učincima zračenja u kalcijevim sulfatima [7].

Kao što je poznato, gama zračenje uzrokuje stvaranje radikala u ozračenim materijalima [8]. Iako je gama zračenje učinkovitije od drugih metoda sterilizacije, ono može promijeniti svojstva koštanih implantata, nadomjestaka, što može rezultirati preranim kliničkim odbacivanjem implantata. Mehanizmi kojima sterilizacija gama zračenjem oštećuje materijale nisu dobro poznati, posebno za implantate temeljene na kalcijevim sulfatima. Istraživanja su pokazala da slobodni radikali mogu oštetiti i kolagen [9], [10]. Izravni učinak u tkivu zbog zračenjem induciranih radikala je razgradnja molekula kolagena, a neizravni učinak je

istovremeno umrežavanje u molekulama kolagena putem radiolize molekula vode nastalih u koštanom alograftu (ljudski alograft uzima se s kadavera, odnosno mrtvog tijela individualaca koji su donirali svoju kost u banke kostiju) zbog otpuštanja slobodnih radikala ovisno o dozi rendgenskog ili gama zračenja. Stoga je važna analiza svojstava koštanih implantata i njihovih kemijskih komponenti nakon zračenja jer gama sterilizacija može izazvati promjene u kristalnoj strukturi materijala, a time i promijeniti njihovu mehaničku stabilnost tijekom dužih vremenskih razdoblja.

Uobičajeno se svojstva raznih sintetičkih i prirodnih koštanih nadomjestaka proučavaju osnovnim metodama: metodom rendgenske difrakcije (XRD), infracrvenom apsorpcijskom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR), termogravimetrijskom analizom (TGA) i pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) [4]. Pokazano je da su svojstva i morfologija pripravaka različiti ovisno o namjeni. Uz nabrojane metode karakterizacije, naglasak ove disertacije je na korištenju spektroskopske metode elektronske paramagnetske rezonancije (EPR), koja zbog svoje osjetljivosti na paramagnetske tvari i na zračenjem inducirane radikale, može dati informacije o strukturi na atomskoj razini te se koristiti za kontrolu pripravaka tijekom sinteze, nakon sinteze i nakon postupka sterilizacije. Također, riječ je o nedestruktivnoj metodi koja omogućuje detekciju malih koncentracija paramagnetskih ionskih supstituenata i slobodnih radikala induciranih za vrijeme trajanja postupka zračenja.

EPR analize zračenjem induciranih sulfatnih radikala u materijalima su rađene u svrhu istraživanja ozračenih fosila, bisera ili derivata gipsa [11-13], ali nema istraživanja s osvrtom na pripravke na bazi kalcijevih sulfata koji se koriste u dentalnoj medicini. Na slučaju sintetičkog hidroksiapatita (HAP) EPR spektroskopijom pokazano je da je vrsta radikala koji nastaju nakon sterilizacije gama zračenjem ovisna i o načinu sinteze [5]. Unatoč navedenom, u literaturi nedostaje podataka o utjecaju gama zračenja na nastajanje i stabilnost induciranih radikala prije i poslije postupka ozračivanja. U dosadašnjim istraživanjima pokazano je da se oštećenja inducirana sterilizacijom gama zračenjem javljaju u raznim koštanim nadomjescima [9], [10], [14]. Stoga je neophodno praćenje ponašanja nakon sterilizacije, posebno iz razloga što stabilnost i vrsta radikala ovisi o sastavu te o uvjetima skladištenja kao što su temperatura, vlaga, svjetlost i duljina trajanja skladištenja. Osim navedenog, u dosadašnjim istraživanjima nema ni podataka da su sintetički koštani nadomjesci sterilizirani hladnom RF plazmom koja

postaje sve raširenija metoda sterilizacije prehrambenih proizvoda i medicinskih instrumenata [15-17]. U ovoj disertaciji hladna plazma je korištena za sterilizaciju navedenih pripravaka, ali ta vrsta sterilizacije u samom postupku mijenja svojstva uzorka te se pokazalo da sterilizacija hladnom plazmom nije usporediva niti će biti komercijalno efikasna u usporedbi sa sterilizacijom gama zračenjem jer su potrebne analize same RF plazme i uređaja što nije predmet ove disertacije. Stoga se ova disertacija detaljno usredotočuje na istraživanje potiče li sterilizacija gama zračenjem transformaciju hidrata kalcijevih sulfata i mijenjaju li se koncentracije radikala uzrokovane gama zračenjem u tim materijalima zbog interakcije materijala s modelnim medijima. Nadalje, za usporedbu je testiran komercijalno dostupan materijal BONDBONE® (MIS implants), koji je mješavina kalcijevog sulfata hemihidrata-CSSH i kalcijevog sulfata dihidrata - CSDH.

Vezano uz kalcijeve fosfate koji su razmatrani u ovom istraživanju, većina istraživanja Mg-supstituiranih HAP-ova (kao i drugih ion-supstituiranih HAP-ova) usmjerena je na razvoj učinkovitih tehnika pripreme, određivanje maksimalne količine supstitucije koja se može postići, kao i određivanje učinka ionske supstitucije na strukturu i biološko ponašanje ionski supstituiranih apatita [18-20]. Tek nedavno je porastao interes za istraživanje ionski-supstituiranih apatita u medijima relevantnim za njihovu primjenu. Na primjer, u radu [21] pokazalo se da brzina transformacije Mg-supstituiranog HAP-a u fosfatnoj puferskoj fiziološkoj otopini raste s povećanjem sadržaja Mg [21]. Pokazano je da se višestruko supstituirane HAP nanočestice (Mg, Zn, Sr, Si- HAP i Mg, Zn, Si- HAP) bolje otapaju u simuliranoj tjelesnoj tekućini – SBF (engl. *simulated body fluid*, SBF) i vodi zbog deformacije rešetke izazvane istovremenom višestrukom supstitucijom iona u strukturi HAP [22]. Međutim, do danas nisu objavljeni podaci o promjenama lokalne strukture Mg-supstituiranog HAP-a tijekom izlaganja različitim medijima. Karakterizacija ionski supstituiranih HAP-ova nakon sterilizacije i tijekom skladištenja također su ključni koraci za dobivanje boljeg uvida u učinak različitih supstitucija, kao i postupka sterilizacije i uvjeta skladištenja na njihova fizikalno-kemijska svojstva. Trenutačno najučinkovitija sterilizacijska metoda za inaktivaciju mikroorganizama (kao što su bakterije, virusi, plijesni, itd.) u biomaterijalima je gama zračenje, zbog načina međudjelovanja fotona s materijom, mogućnosti postizanja jednolike prostorne raspodjele i vremenski ovisne predaje potrebnih doza zračenja što povećava sigurnost proizvoda [23]. S druge strane, gama zračenje inducira različite vrste defekata ili slobodnih

radikala u materijalu, koje ovise o sastavu, uvjetima sinteze uzoraka i mogu se različito ponašati u fiziološkim otopinama [24]. Nadalje, kako bi se odredio rok trajanja materijala za biomedicinsku primjenu i uvjeti njihovog skladištenja, koristi se metoda ubrzanog starenja. Primarni razlog za korištenje metoda ubrzanog starenja u ispitivanju kvalitete materijala je brzo plasiranje proizvoda na tržište. Starenje materijala odnosi se na varijaciju njihovih svojstava tijekom vremena, a svojstva od interesa su ona koja se odnose na sigurnost i učinkovitost njihove primjene. Ubrzano starenje proizvoda može se definirati kao postupak kojim se nastoji odrediti reakcija materijala u normalnim uvjetima uporabe tijekom relativno dugog vremena na način da se proizvod izlaže puno kraće vrijeme stresovima, tj. višim temperaturama od normalnih okolišnih [25]. S obzirom na nedostatak istraživanja, EPR spektroskopijom su karakterizirani Mg-supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) i nesupstituirani HAP koji su sterilizirani gama zračenjem, prije i tijekom uranjanja u korigiranu simuliranu tjelesnu tekućinu (c-SBF) [26] i fiziološku otopinu. Osim toga, praćene su i promjene tijekom ubrzanog starenja. EPR spektroskopija je odabrana jer je to jedina metoda za detekciju i identifikaciju slobodnih radikala i defekata, bez obzira na agregatno stanje i boju materijala, s visokom osjetljivošću koja može doseći do 1 detektirani defekt na 10^7 molekula. Daljnje prednosti ove metode su neinvazivno mjerenje i mogućnost dugotrajnog praćenja uzoraka bez utjecaja na stabilnost [27]. U usporedbi s drugim metodama, EPR spektroskopija može dati uvid u mikrostrukturu i promjene lokalne okoline u rešetki materijala, u ovom slučaju CS-a i HAP-a izazvane različitim supstituentima, ali i postupkom sterilizacije, kao i otkriti promjene tijekom uranjanja u različite medije, tj. oponašanju fizioloških uvjeta ili uvjeta tijekom skladištenja.

2 LITERATURNI PREGLED

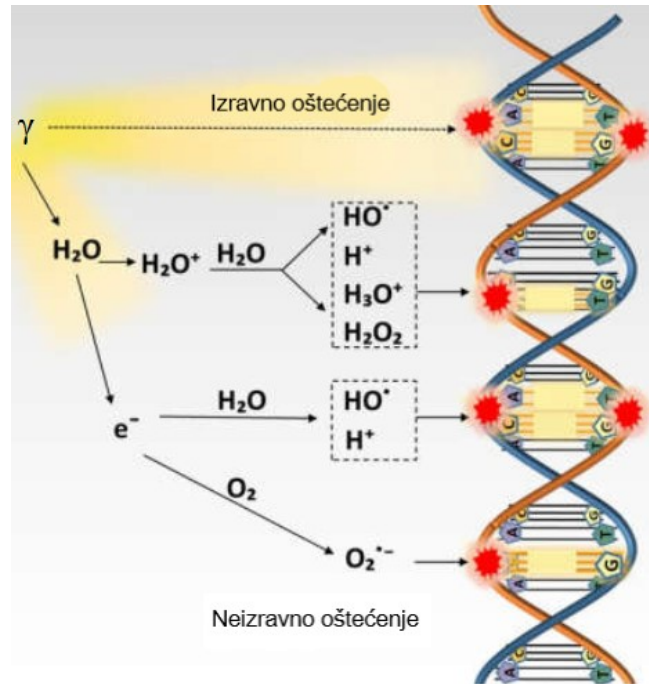
2.1 Sterilizacija ionizirajućim zračenjem

U medicinskim pripravcima i uređajima moguće je pronaći razne vrste mikroorganizama, uglavnom bakterija, a rjeđe plijesni i kvasaca [28]. Zbog sigurnosti pacijenata i medicinskih uređaja i pripravaka, nužna je potpuna inaktivacija mikroorganizama. Sterilizacija zračenjem kao fizički hladan proces tj. proces koji ne povećava temperaturu tretiranog materijala, u širokoj je upotrebi diljem svijeta posljednjih 60 godina za sterilizaciju medicinskih proizvoda. Ranije je u rutinskoj primjeni bila doza od minimalno 25 kGy za medicinske uređaje, farmaceutske proizvode i biološka tkiva. Danas, po preporuci Međunarodne organizacije za standardizaciju (engl. *International Organization for Standardization*, ISO) sterilizacijska doza mora biti određena za svaki tip proizvoda ovisno o njegovom bioopterećenju. Termin bioopterećenje definira se kao populacija mikroorganizama prisutnih u ili na proizvodu prije sterilizacije [29]. Općenito, određivanje sterilizacijske doze je odgovornost proizvođača medicinskog proizvoda koji mora imati pristup akreditiranom mikrobiološkom laboratoriju [29]. Sterilizacija zračenjem trenutno je regulirana putem dva standarda ISO 11137:1995 [30] i EN 552 [31]. Sterilni proizvod je onaj koji ne sadrži živuće mikroorganizme [29]. Predmeti proizvedeni u kontroliranim uvjetima mogu, prije sterilizacije, imati mikroorganizme na sebi, iako su oni obično prisutni u vrlo malom broju. Takvi su proizvodi, po definiciji, nesterilni. Svrha postupka sterilizacije je inaktivirati mikrobiološke kontaminacije na tim nesterilnim proizvodima. Sterilizacija je primjer procesa čija se učinkovitost ne može potvrditi retrospektivnim pregledom i ispitivanjem proizvoda. Važno je naglasiti da izlaganje validiranom i kontroliranom procesu sterilizacije nije jedini čimbenik povezan s osiguravanjem sterilnosti i prikladnosti za namjeravanu upotrebu. Pažnja se mora posvetiti i mikrobiološkom statusu sirovina i komponenti, svojstvima mikrobiološke barijere ambalaže i kontroli okoliša u kojem se proizvod proizvodi, sastavlja, pakira, skladišti i primjenjuje. Sterilizacija zračenjem proizvoda je po definiciji uništavanje svih živućih organizama prisutnih na datom proizvodu korištenjem ionizirajućeg zračenja. Za sterilizaciju zračenjem koriste se dva tipa ionizirajućeg

zračenja: gama zračenje iz radioaktivnih izvora ili elektronski snopovi iz linearnih akceleratora. Inaktivacija mikroorganizama odvija se po eksponencijalnom zakonu. Vjerojatnost preživljenja je funkcija broja i tipova organizma prisutnih na proizvodu (bioopterećenje), vrste korištenog zračenja te okoline u kojoj se mikroorganizmi nalaze [29]. Sterilnost individualnog proizvoda u ukupnoj populaciji ozračenih proizvoda nije moguće osigurati u apsolutnom smislu. Iz tog razloga se uvodi pojam stupnja osiguranja sterilnosti (engl. *sterility assurance level*, SAL). SAL je definiran kao vjerojatnost prisutstva živućeg organizma na individualnom proizvodu nakon procesa sterilizacije. SAL se izražava u 10^{-n} , te najčešće iznosi 10^{-6} , što znači da nakon sterilizacije preostane 1 živući mikroorganizam od početnih 1000000 [32]. Kada se nakupina mikroorganizama ozračuje u sukcesivnim dozama, broj preživjelih stanica nakon svake sukcesivne doze može se koristiti za izradu krivulje preživljavanja. Otpornost mikroorganizama na zračenje mjeri se takozvanom decimalnom redukcijskom dozom (D_{10} vrijednost), definiranom kao doza zračenja mjerena u kGy, potrebna da se broj tog mikroorganizma smanji za 10 puta tj. jedan log ciklus ili doza potrebna za uništavanje 90% od ukupnog broja mikroorganizama [33]. Postupak određivanja sterilizacijske doze [29] namijenjen je utvrđivanju minimalne doze potrebne za postizanje zahtijevane ili željene razine osiguranja sterilnosti (SAL). Sterilizacijska doza ovisi o: razini održivih mikroorganizama na proizvodu prije procesa sterilizacije (prirodno bioopterećenje), relativnoj mješavini raznih mikroorganizama s različitim D_{10} vrijednostima te stupnju sterilnosti, tj. razini osiguranja sterilnosti (SAL), potrebnoj za taj proizvod.

Inaktivacija mikroorganizama ionizirajućim zračenjem, temeljena je na djelovanju ionizirajućeg zračenja na DNK. Dva su najčešća mehanizma djelovanja ionizirajućeg zračenja s DNK [34] izravno predajući energiju na DNK lanac i neizravno, interakcijom zračenja s drugim atomima i molekulama u stanici ili izvan stanice (slika 2.1). U interakciji zračenja i molekula vode nastaju slobodni radikali: vodikov atom - H^+ , hidroksid radikal - OH^- i slobodni elektron e^- koji oštećuju DNK. Najvažniji je OH^- radikal koji je odgovoran za 90% oštećenja DNK. U živućoj stanici, indirektni učinci zračenja su dominantni. Smrt mikroorganizma je dakle posljedica procesa ionizacije visokoenergijskim zračenjem. Prokarioti - bakterije i eukarioti - plijesni i kvasci imaju sposobnost popravljavanja lomova u molekulama (lancima)

DNK [29]. Mikroorganizmi koji su osjetljivi na zračenje ne mogu popraviti dvostruki lom molekule (lanca) DNK, dok oni otporni na zračenje mogu.



Slika 2.1: Mehanizmi interakcije stanice s ionizirajućim zračenjem: izravni i neizravni učinci na DNK. Slika je obrađena i preuzeta iz reference [35]

Jedna od glavnih prednosti sterilizacije zračenjem proizlazi iz njene sposobnosti da uništi kontaminirajuće mikroorganizme uz neznatan porast temperature ozračenih materijala, čime se čuvaju njihova svojstva i karakteristike [29]. Nadalje, visoka prodornost zračenja omogućuje korištenje velikog broja materijala u proizvodnji i pakiranju medicinskih uređaja i lijekova. Proces sterilizacije zračenjem je pouzdan i siguran te u proizvodima ne ostaje radioaktivnost. Kontinuirana priroda procesa omogućuje mehaničko i potpuno automatizirano rukovanje proizvodima za obradu, čime se praktički eliminira ljudski faktor u procesu. Sterilizacijski proces je jednostavan i lako ga je kontrolirati te je potrebno kontrolirati samo jednu varijablu procesa (vrijeme izlaganja ili dozu).

2.2 Sterilizacija RF plazmom

U posljednjih nekoliko desetljeća plazma je postala važan medij za obradu materijala u mnogim modernim tehnologijama kao što su čišćenje površine [36], sterilizacija [37], [38], funkcionalizacija površine [39], [40], selektivno jetkanje [41], [42] i (nano)modifikacija površine [43]. Plazma se može podijeliti termodinamički i to na: visokotemperaturnu i niskotemperaturnu plazmu tzv. hladnu plazmu [44]. Visokotemperaturna plazma, u kojoj su čestice plina u termodinamičkoj ravnoteži, koristi se za plazma rezanje i zavarivanje, za sintezu keramike, za razgradnju opasnog kemijskog otpada, za raspršivanje plazmom, itd. [45], [46]. Termodinamički neuravnotežena plazma, tj. niskotemperaturna ili hladna plazma najčešće se koristi za obradu materijala. Primjeri primjene su: vakuumsko taloženje tankih filmova, laserska industrija, mikroelektronika, makroelektronika (npr. plazma zasloni), obrada silicija te sterilizacija [44].

Za obradu materijala mogu se koristiti različite vrste hladne plazme, koje se pobuđuju u različitim plinovima. Plazma se može stvoriti propuštanjem plina kroz električno polje. Takav je plin djelomično ioniziran, što znači da ne sadrži samo neutralne čestice već i slobodne elektrone i ione. Slobodni elektroni se ubrzavaju u električnom polju i sudaraju se s atomima ili molekulama. Pri sudarima se atomi i molekule pobuđuju iz osnovnog stanja u različita pobuđena stanja. Električna pražnjenja dalje se dijele prema frekvenciji električnog polja potrebnog za pobuđivanje plazme i to u području od 50 kHz do 2.5 GHz [47], [48]. Radiofrekvencijska (RF) plazma obično radi na dvije različite frekvencije 27.12 MHz ili 13.56 MHz. RF plazma se može podijeliti na kapacitivnu i induktivno spregnutu plazmu, ovisno o metodi koja se koristi za stvaranje električnog polja. U slučaju kapacitivne sprege električno polje se uspostavlja između dvije elektrode (tj. kondenzatora), dok je za induktivnu spregu potrebna zavojnica [47], [48].

Primjena plazme u medicini, prvenstveno za sterilizaciju medicinske opreme i ortopedskih implantata analizirana je u raznim studijama [16], [49], [50], gdje se sterilizacijski učinak plazme pripisuje reaktivnim kemijskim vrstama koje sadrže kisik: O, OH, HO₂⁻, O₂, HO₂, H₂O₂

i reaktivnim kemijskim vrstama koje sadrže dušik: NO, N₂, NO₂. Friedmann i sur. [51] ustanovili su da presudnu ulogu u procesu sterilizacije imaju kisikovi radikali zbog snažnog oksidacijskog djelovanja na membrane bakterijskih stanica. Osim kisikovih radikala, važnu ulogu u sterilizaciji imaju i ioni proizvedeni unutar plazme koji prilikom sudara dovode do puknuća u membranama stanica [52], [53]. Također, se uloga u procesu sterilizacije pripisuje i elektromagnetskim poljima koja utječu na promjenu elektronegativnosti molekula u stanicama [51], [54]. Što se tiče uloge ultraljubičastog (UV) zračenja u sterilizaciji plazmom, u studijama [55], [56] se pripisuje uloga UV zračenja, dok se u studijama [51], [57] opovrgava.

2.3 Koštani nadomjesni materijali

Koštane nadomjesne materijale dijelimo na autogenu kost, alogene i ksenogene koštane materijale te na aloplastične, prirodne i sintetske materijale koji nisu koštanog podrijetla [58].

2.3.1 Autologni materijali

Autologni (ili autogeni) transplantat kosti ili autograft uključuje upotrebu kosti dobivene od iste osobe koja prima transplantat. Autogena kost smatra se zlatnim standardom među danas korištenim materijalima jer jedina ima mogućnost formirati novu kost procesima osteogeneze, osteoindukcije i osteokondukcije [59], [60]. Ti su materijali najpoželjniji prilikom augmentacije, odnosno nadogradnje kosti (tzv. regeneracije kosti) zbog svoje biokompatibilnosti kojom umanjuju šansu za odbacivanje transplantata jer transplantat potječe od samog pacijenta. Nedostatak autogenih transplantata njihova je ograničena količina i potreba za dodatnim operativnim područjem koje potencijalno predstavlja dodatno mjesto za postoperativnu bol i komplikacije te produžuje vrijeme zahvata [61].

2.3.2 Alogeni materijali

Alogeni materijali dobivaju se od jedinki iste vrste. Ljudski alograft uzima se s kadavera (mrtvog tijela) koji su donirali svoju kost u banke kostiju. Dostupni su kao suho smrznuti demineralizirani (engl. *demineralized freeze-dried bone allograft*, DFDBA) ili mineralizirani koštani transplantati (engl. *freeze-dried bone allograft*, FDBA) [61]. Iako nemaju osteogena svojstva, pozitivne karakteristike alogenih materijala su: njihova dostupnost u željenoj količini, zatim to što ne zahtijevaju još jedno operativno područje, a samim time ni produženo operativno vrijeme potrebno za uzimanje autogene kosti te njihova pristupačna cijena [59]. Za postizanje dobrih rezultata pri korištenju alografta važno je razmišljati o postupku pripreme i sigurnosti po pitanju djelovanja na imunološki sustav domaćina i prijenos zaraznih bolesti.

2.3.3 Ksenogeni materijali

Ksenogeni materijali koštani su nadomjesni materijali dobiveni iz konjskih, svinjskih ili govedih izvora koji se uglavnom deproteiniziraju i pažljivo obrađuju. Obradom se uklanja njihova organska komponenta da se ublaži imunološka reakcija odbacivanja ili prijenos patogena. Dobiveni minerali djeluju osteokonduktivno, odnosno kao nosač u koji će urasti stanice domaćina. Često se koriste u kombinaciji s faktorima rasta, autogenim i alogenim materijalima kako bi im se poboljšali rezultati [62].

2.3.4 Aloplastični materijali

Aloplastični zamjenski koštani materijali ili aloplasti u potpunosti su sintetski biomaterijali, zbog čega njihova dostupnost ne ovisi niti o jednoj živoj jedinci. Postoji više klasifikacija aloplasta, a u ovom radu preuzeta je podjela prema [63], prema kojoj se aloplasti dijele na:

- bioaktivno staklo;
- kalcijeve fosfate;
- hidroksiapatit;

- trikalcij fosfate;
- ostale kalcijeve fosfate (brushit, monetit, kalcij polifosfati);
- kalcijeve sulfate.

Ovisno o kemijskom sastavu, djelomično se ili potpuno razgrađuju. U primjeni mogu se koristiti sami ili u kombinaciji s autogenom kosti kako bi im se poboljšala svojstva. Na tržištu su dostupni u resorptivnom i neresorptivnom obliku, dolaze u obliku čestica različitih veličina i razina poroznosti [64].

U ovoj disertaciji istraživani su aloplastični materijali, odnosno sintetski biomaterijali na bazi kalcijevih sulfata i kalcijevih fosfata.

Iako su kalcijevi fosfati (CaP) najčešće korišteni aloplasti u dentalnoj medicini [4], [65], [66], [67], postoji sve veći interes za razvoj kalcijevih sulfata (CS) kao njihova alternativa zbog njihovih jedinstvenih svojstva [68]. Prvenstveno sirovine potrebne za njihovu sintezu su jeftine i ima ih u velikim količinama. Kalcijevi sulfati su također potpuno biorazgradivi i mogu funkcionirati kao membrana koja podupire vođenu regeneraciju tkiva [69]. Potonja je značajka vrijedna pažnje jer je nedavno motivirala stomatologe na povećano korištenja CS-a za postupke augmentacije kosti prije postavljanja implantata [70]. Osim toga, dokazi upućuju na to da CS koštani presaci potiču angiogenezu. Strocchi i suradnici su pronašli veću mikrovaskularnu gustoću krvnih žila u koštanim ispunama koštanih defekata kod kunića liječenih CS koštanim presacima u odnosu na one liječene s autograftima [71]. No, neki od najčešće navođenih nedostataka CS koštanih nadomjestaka na bazi CS su njihova brza resorpcija i njihova slaba biomehanička čvrstoća [72]. To ograničava njihovu upotrebu primarno na korekciju malih koštanih defekata koji nisu pod velikim opterećenjem.

2.4 Kalcijevi sulfati u dentalnoj medicini

Kalcijev sulfat je najčešći sulfatni mineral koji se može naći u prirodnom okruženju. Javlja se kao sedimentna naslaga na Zemlji i utječe na geokemijsku raspodjelu sulfata i kalcija. Kalcijev sulfat također se pojavljuje u brojnim industrijskim procesima. Osim što je važna komponenta

u građevinskim materijalima, pojavljuje se uglavnom kao nepoželjni produkt (pročišćavanje vode i otpadnih voda, procesi odsumporavanja, proizvodnja plina i ulja, desalinizacija itd.) [73].

Iako je utvrđeno postojanje šest različitih spojeva kalcijevog sulfata [74], obično se pojavljuje u obliku dihidrata ($\text{CaSO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CSDH), hemihidrata ($\text{CaSO}_4 \cdot 0.5\text{H}_2\text{O}$, CSHH, α i β) i anhidrida (CaSO_4 , CSAH, AI, AII i AIII) [73].

Dominantne faze su CSDH i α -CSHH, te je transformacija CSDH u α -CSHH i obrnuto proučavana u nizu radova [75-77]. Također je opaženo da se metastabilni kalcijev sulfat dihidrat (CSDH) i α -hemihidrat (α -CSHH) sutalože, i to redom $\text{CSDH} \rightarrow \alpha\text{-CSHH} \rightarrow \text{CSDH}$ [77]. Klinički, CS se obično koriste kao koštani implantati nakon miješanja s fiziološkom otopinom ili slinom [78-86]. Ta postavka omogućuje *in situ* formiranje krute strukture koja je visoko kristalna, unatoč za materijale nepovoljnom okruženju kao što su krv, proteini i slina [82], [83], [85], [86].

EPR spektroskopijom su proučavani sulfatni radikali (SO_3^- , SO_4^- i SO_2^-) inducirani gama zračenjem, u raznim područjima istraživanja, no nisu materijali koji se koriste u dentalnoj medicini. Primjerice, proučavani su minerali kalcijeva karbonata poput bisera iz školjaka, koji su potom ozračeni gama zračenjem te su pomoću elektronske paramagnetske rezonancije detektirani raznovrsni radikali inducirani gama zračenjem [13]. Prema EPR analizi, opažen je porast koncentracije radikala induciranih zračenjem kao što je primjerice CO_2^- , što se makroskopski manifestira u promjeni boje uzoraka [13].

2.5 Kalcijevi fosfati u dentalnoj medicini

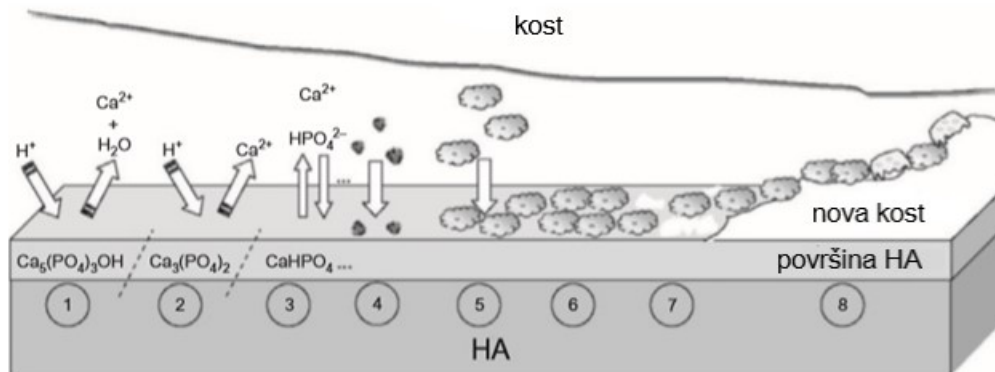
Općenito, pod pojmom keramike se smatraju polikristalni nemetalni anorganski materijali visoke čvrstoće i inertnosti. Primjer su silikati, metalni oksidi, karbidi, sulfidi, hidridi, selenidi ili prirodne strukture poput kostiju, zuba, itd. Biokeramika je keramika posebno razvijena za biomedicinske primjene [87], [88] kao što su punila za kosti, prevlake implantata, matrice (engl. *scaffold*), itd. Najraširenija bioresorptivna keramika uključuje kalcijeve fosfate (CaP). Kalcijevi

fosfati su prisutni u kostima, zubima, rogovima jelena i tetivama sisavaca, dajući tim organima tvrdoću i stabilnost [20].

Kao glavna mineralna komponenta ljudskih kostiju, kalcijevi fosfati (CaP) jedan su od najčešće korištenih materijala u dentalnim implantatima [4], [65-67]. CaP se javljaju u 13 različitih faza od kojih se za regeneraciju čvrstih tkiva najčešće koriste kalcijev hidrogenfosfat dihidrat (DCPD, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), trikalcijev fosfat (α -TCP i β -TCP, $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$), oktakalcijev fosfat (OCP), $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, hidroksiapatit (HAP, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$), kalcij deficitarni hidroksiapatit (CDHAP, $\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $0 < x < 1$) i amorfni kalcijev fosfat (ACP). Zbog svog složenog faznog ponašanja kalcijevi fosfati predstavljaju složene i zahtjevne implantacijske materijale [89].

Najčešće korišten član obitelji CaP je hidroksiapatit (HAP). Ostale poznate biomedicinske primjene CaP-a su: kao sredstvo za isporuku lijeka [90], [91], kao sredstvo za isporuku gena [92], kao punilo za biokompozite, kao matrica za razvijanje matičnih stanica i bioaktivne prevlake na metalnim koštanim implantatima [93]. Dodatno, nedavne studije također su pokazale da čestice HAP-a inhibiraju rast mnogih vrsta stanica raka [94]. Sintetički kalcijevi fosfati sa svojom izvrsnom biokompatibilnošću uobičajena su alternativa autogenim, ksenografskim ili alografskim koštanim materijalima. Koriste se za različite dentalne ili medicinske primjene koje uključuju, na primjer, punila za parodontalne defekte, za povećanje alveolarnog grebena, maksilofacijalnu rekonstrukciju, implantate uha, kralježnice te prevlake za metalne implantate [65]. Biološka svojstva sintetičkog materijala ovise o temeljnim parametrima: kemijskom sastavu, morfologiji i biorazgradivosti [95]. Bioaktivne kalcij fosfatne biokeramike - CaP često se primjenjuju u inženjeringu koštanog tkiva te se široko koriste u ortopediji i stomatologiji. Izlaganje tekućinama koje oponašaju sastav krvne plazme često se smatra prvim korakom prema razumijevanju ponašanja mineralizacije sintetičkih biomaterijala. U tom kontekstu, acelularna tekućina nazvana simulirana tjelesna tekućina (SBF) [26], s koncentracijama iona gotovo jednakim onima u ljudskoj krvnoj plazmi, intenzivno se koristi za proučavanje mineralizacije biomaterijala „*in vitro*“. Kokubo je [26] predložio da je ključni uvjet za vezivanje umjetnog materijala za živu kost stvaranje apatita nalik kosti na njegovoj površini kada se implantira u živo tijelo te da se to „*in vivo*“ formiranje apatita može reproducirati u SBF.

CaP biokeramike su i osteokonduktivne, usmjeravaju rast novog koštanog tkiva. Mogući mehanizam mineralizacije na površini HAP površina predložen je u radu [96] što je prikazano na slici 2.2. Također se pokazalo da određene vrste CaP keramike posjeduju osteoinduktivna svojstva (tj. sposobne su inicirati nastajanje novog koštanog tkiva na ektopičnim, odnosno neočekivanim mjestima implantacije). Točan mehanizam osteoindukcije CaP biokeramika nije u potpunosti razjašnjen iako je pokazano da topografija, geometrija, sastav i poroznost biokeramike mogu utjecati na osteoindukciju.



Slika 2.2: Mehanizam mineralizacije hidroksiapatita nakon implantacije: (1) solubilizacija površine hidroksiapatita (1 i 2), (2) izmjena iona (3 i 4), (3) Stanična adhezija i adsorpcija proteina (5 i 6), stvaranje nove kosti (7 i 8). Slika je obrađena i preuzeta iz reference [96].

Hidroksiapatit – HAP ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) je termodinamički najstabilnija faza kalcijevog fosfata (CaP) i često se smatra najsličnijim mineralnoj komponenti tvrdih tkiva kralježnjaka od svih vrsta kalcijevih fosfata [97]. Osim toga, HAP ima izvrsnu biokompatibilnost i osteokonduktivnost, što ga čini jednim od najistraživanijih materijala u inženjeringu koštanog tkiva [98], [99]. Međutim, mineralna komponenta tvrdih tkiva, tzv. biološki apatit je

nestehiometrijski, slabo kristalni, ionski supstituirani hidroksiapatit [97], [98]. Zbog specifične biološke uloge koju ioni supstituenti imaju u metabolizmu kostiju, njihova ugradnja u strukturu HAP-a privlači sve veću pozornost kao način povećanja njegove bioaktivnosti [18], [19], [98]. Kristalna struktura stehiometrijskog HAP-a dopušta supstituciju s različitim anionima i kationima [18], [19]. Iako su poznata dva polimorfa HAP-a, heksagonalni i monoklinski, monoklinski je nestabilan čak i kada je prisutna mala količina stranih iona te se općenito ne nalazi u biološkim apatitima [19]. Jedinična ćelija HAP sadrži 10 kalcijevih iona, 6 fosfatnih iona i dvije OH^- skupine [18], [100]. U heksagonalnom polimorfu prisutna su dva različita kationska mjesta (Ca(I) i Ca(II)), kao i jedno neovisno fosfatno mjesto. Mali kationi uz male količine većih kationa mogu se smjestiti na mjesto Ca(I), dok se veliki kationi mogu smjestiti na mjesto Ca(II). Anioni poput F^- i Cl^- mogu zamijeniti OH^- ili PO_4^{3-} , dok se CO_3^{2-} mogu smjestiti na oba mjesta [19]. Budući da se ioni različitih valencija mogu koristiti kao supstitucije, da bi se održala elektroneutralnost, položaji OH^- skupina mogu ostati prazni [19], [100]. U biološkim apatitima Ca^+ ioni mogu biti supstituirani s Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} , PO_4^{3-} ili HPO_4^{2-} ionima s CO_3^{2-} i OH^- s F^- , Cl^- , CO_3^{2-} [18]. Među različitim mogućim zamjenskim ionima, Mg^{2+} privlači posebnu pozornost jer je važan element u tragovima u kostima i zubima [97], [101] [102]. Magnezij ima ključnu ulogu u metabolizmu kostiju jer utječe na aktivnost osteoblasta i osteoklasta, a time i na rast kostiju. Štoviše, nedostatak magnezija povezan je sa smanjenom aktivnošću osteoblasta, krhkošću kostiju i osteoporozom [103-106]. Magnezij je također koristan u procesima poput stanične proliferacije i diferencijacije, kao i u procesima osteokonduktivnosti i resorpcije [98].

2.6 Rezultati dosadašnjih istraživanja dentalnih koštanih nadomjestaka EPR spektroskopijom

EPR detekcija radikala u ozračenim kostima i zubima korištena je u raznim dozimetrijskim primjenama, kao što je detekcija ozračene hrane, dozimetrija nuklearnih nesreća, procjena doze žrtava atomske bombe u Hirošimi i Nagasakiju, datiranje fosilnih kostiju i zuba itd. [107].

Također, poznato je da CO_2^- radikali u biološkim čvrstim tkivima nastaju u mineralnom dijelu građenom od biološkog apatita [19].

Djelovanjem ionizirajućeg zračenja na prirodni i sintetski hidroksiapatit nastaju ne samo rompski CO_2^- radikali, već i na primjer, aksijalni CO_2^- , izotropni CO_2^- , CO_3^- i CO_3^{3-} radikali koji potječu iz prisutnih karbonatnih iona [108], [109]. Povremeno je njihov intenzitet toliko jak da ometa EPR detekciju rompskog CO_2^- signala. U radu [5], istraženo je stvaranje radikala u sintetskim hidroksiapatitima, i pronađena je bliska veza između molekula vode i izotropnih CO_2^- radikala koji se detektiraju samo u vlažnom hidroksiapatitu. U nekim vlažnim uzorcima hidroksiapatita, izotropni CO_2^- signal postaje toliko intenzivan da prekriva signal rompskog CO_2^- signala. Meko tkivo oko kosti ili zuba obično sadrži obilje vode, a čvrsto tkivo također sadrži vodu [110], [111]. U takvim okolnostima dolazi do prijenosa mase između anorganskog mineralnog dijela i organskog dijela. U takvim kompleksnim sustavima, nastajanje radikala također može biti kompleksno i ovisno o okolini.

U studiji [5] istraživano je stvaranje radikala u sintetičkom hidroksiapatitu pomoću šest uzoraka različitog podrijetla. EPR, XRD i IR mjerenja otkrila su da je izotropni CO_2^- nastao samo u slabo kristaliničnom hidroksiapatitu koji sadrži vodu. Dupletni signal H detektiran je u izrazito kalcij deficitarnom hidroksiapatitu. Rezultati EPR i IR sugeriraju da su molekule vode u slabo kristaliničnom hidroksiapatitu ugrađene u kristalnu rešetku hidroksiapatita. Izotropni CO_2^- i H° mogu biti povezani s takvim molekulama vode [5].

U studiji [6] proučavani su kalcij fosfatni cementi (engl. *calcium phosphate cements*, CPC) koji su sve više koriste kao injekcijski cementi zbog njihove učinkovite dostave na ciljno mjesto implantacije. Za ortopedsku upotrebu od izuzetne je važnosti da svojstva ovih CPC-ova nisu promijenjena sterilizacijom zračenjem. U radu je proučavan utjecaj sterilizacije zračenjem na različite CPC-ove, s naglaskom na poboljšanje roka trajanja proizvoda upotrebom optimalnih konfiguracija pakiranja i postupka žarenja. Elektronska paramagnetska rezonancija potvrdila je prisutnost slobodnih radikala u anorganskoj fazi CPC paste nakon ozračivanja. Kao jedina uspješna metoda za smanjenje stvaranja slobodnih radikala pokazalo se 24-satno žarenje [6].

U studiji [4] istraživana su kemijska i fizikalna svojstva nekih od komercijalno dostupnih materijala za regeneraciju kosti, EPR spektroskopijom te su uspoređena s rezultatima

rendgenske difrakcije na prahu (PXRD), infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (FTIR) i termogravimetrijske analize (TGA). Istraživani materijali su bili sterilizirani gama zračenjem. U bifaznom komercijalnom materijalu (čiji je sastav bio: 60% HAP i 40% β -TCP) pronađene su paramagnetske vrste Mn^{2+} , Fe^{3+} , zarobljeni H° -atomi i CO_2^- dok su u β -TCP materijalima detektirani: u EasyGraftTM, Mn^{2+} , Cr^{3+} , i zarobljeni H° -atomi, u Bioresorbs Macropore, Cr^{3+} , zarobljeni H° -atomi, dok u Poresorbs-TCP i Cerasorbs samo ioni Mn^{2+} [4].

3 TEORIJSKA OSNOVICA

3.1 Principi elektronske paramagnetske rezonancije

Elektronska paramagnetska rezonancija (engl. *electron paramagnetic resonance*, EPR) je fizikalna metoda kojom se proučava interakcija spinskog magnetskog momenta nesparenog elektrona s vanjskim magnetskim poljem u uzorku. Detektira se apsorpcija energije mikrovalnog zračenja kada se paramagnetske čestice nalaze u vanjskom magnetskom polju. Spektar apsorbiranoga mikrovalnog zračenja (broj, položaj, širina i relativni intenzitet spektralnih linija te međusobni razmak) odražava stanje okoline u izravnoj blizini nesparenog elektrona [107].

Spin elektrona ima iznos $1/2$ pa postoje dvije moguće orijentacije elektronskih spinova u odnosu na smjer vanjskog magnetskog polja B : paralelni α ($S = \frac{1}{2}$) i antiparalelni β ($S = -\frac{1}{2}$) elektroni. Pripadne su energije tih elektrona:

$$\begin{aligned} E_{\alpha} &= \frac{1}{2} g\beta_e B, \\ E_{\beta} &= -\frac{1}{2} g\beta_e B, \end{aligned} \tag{1}$$

gdje je β_e Bohrov magneton.

Razlika u energiji između dva stanja iznosi:

$$\Delta E = g\beta_e B. \tag{2}$$

Ako uzmemo da je $g_e=2$ tada je razlika $2\beta_e B$. Takvo cijepanje stanja po energiji kod elektrona u prisutnosti magnetskog polja nazivamo elektronsko Zeemanovo cijepanje.

Da bi došlo do rezonancije, energije fotona radiovalova moraju imati upravo vrijednost danu jednadžbom (2):

$$h\nu = \hbar\omega = g_e\beta_e B. \quad (3)$$

Energija koja daje različita spinska stanja pod utjecajem vanjskog magnetskog polja B poznata je pod imenom Zeemanova energija i ovisi o veličini B i magnetskom momentu elektrona $\mu_e = g\beta_e M$, gdje je β_e Bohrov magneton, M magnetski kvantni broj, g -tenzor za paramagnetski centar koji za slobodni elektron iznosi $g_e=2.0023$. Zeemanova energija, $E_Z = -\mu_e B$, dana je sljedećom relacijom:

$$E_Z = g\beta_e BM \quad (4)$$

Orijentacija spina mijenja se apsorpcijom mikrovalova kada je razlika energija spinova ($\Delta E_Z = g\beta_e B$) jednaka kvantu energije elektromagnetskog vala $h\nu$, gdje je ν frekvencija elektromagnetskog vala, a h Plankova konstanta. Takva apsorpcija elektromagnetskih valova, tj. mikrovalova od strane nesparenih elektrona naziva se elektronska paramagnetska rezonancija (engl. *electron paramagnetic resonance*, EPR) ili elektronska spinska rezonancija (engl. *electron spin resonance*, ESR) [107].

Elektronski spin koji je pobuđen na višu energijsku razinu apsorpcijom mikrovalnog kvanta, relaksira se u nižu razinu vibracijom rešetke u vremenu koje se naziva “spin-rešetka relaksacijsko vrijeme” (T_1). Relaksacija spinova događa se i zbog međusobne interakcije između spinova i to vrijeme se naziva “spin-spin relaksacijsko vrijeme” (T_2). U slučaju kada je snaga mikrovalova toliko velika da su izbačeni spinovi iz niže razine, ili je relaksacijsko vrijeme predugo za obnovu populacije spinova, EPR signala se smanjuje. Ta pojava se zove saturacija [107].

g -faktor karakteristično je svojstvo promatrane tvari i različit je za različite tvari. Stvarna vrijednost g -faktora ovisna je o magnetskoj spin-orbitalnoj interakciji (λLS), gdje je L orbitalna kutna količina gibanja, a λ spin-orbitalna konstanta vezanja. Stoga, g -faktor pruža informaciju o elektronskoj strukturi i o simetriji sustava te se može smatrati svojevrsnim “otiskom prsta” pojedine tvari. Kod čvrstih tvari, koje su i predmet ovog istraživanja, g -faktor malo odstupa od faktora slobodnog elektrona (g_e) zbog doprinosa orbitalne kutne količine gibanja putem tzv.

magnetske spin-orbitalne interakcije. Točno određivanje g -faktora je baza EPR spektroskopije [107]. Uvjet rezonancije je dan s relacijom:

$$g\beta_e B_0 = h\nu, \quad (5)$$

pri čemu je B_0 rezonantno magnetsko polje.

U slučaju kad imamo dva elektronska spina, različitih g -faktora g_1 i g_2 , te kako su različiti magnetski momenti te Zemanova energija, a s obzirom na to da je frekvencija mikrovalova konstantna na EPR spektrometru, pojava rezonancije se događa na magnetskim poljima B_{01} i B_{02} . Korištenjem jednadžbe (5), moguće je odrediti g :

$$g = \frac{h \nu}{\beta_e B} \quad (6)$$

Budući da su frekvencija mikrovalova (ν) i magnetsko polje (B) poznati spektroskopski parametri, g -faktor nepoznatog signala se može odrediti korištenjem standardnog signala s poznatim g . Koristeći rezonantni uvjet, iz jednadžbi (5) i (6) slijedi [107]:

$$g_1 B_{01} = g_2 B_{02} = \frac{h\nu}{\beta_e}, \quad (7)$$

$$g_2 = \frac{g_1}{\left(1 - \frac{\Delta B}{B_{01}}\right)},$$

gdje je g_1 faktor poznatog signala, g_2 nepoznatog, B_{01} i B_{02} pripadajuća magnetska polja, a „ ΔB ” njihova razlika. Primjerice, *difenil-picril-hidrazil* (DPPH) koji se često koristi kao standardni uzorak ima EPR signal na $g=2.0036$.

g faktor je također ovisan smjeru magnetskog polja. Za smjer određen kutovima θ i α , g iznosi [107]:

$$g(\theta, \alpha) = \left(g_{zz}^2 \cos^2 \theta + g_{xx}^2 \sin^2 \theta \cos^2 \alpha + g_{yy}^2 \sin^2 \theta \sin^2 \alpha\right)^{1/2}. \quad (8)$$

U slučaju rompske simetrije, g se izražava putem g_{xx} , g_{yy} i g_{zz} , dok se za aksijalnu simetriju izražava putem $g_{||}$ i g_{\perp} , pri čemu su $g_{||} = g_{zz}$ i $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$. U tom slučaju vrijedi [107]:

$$g(\theta) = (g_{||}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta)^{1/2}. \quad (9)$$

U slučaju kada radikal s anizotropnim g faktorom ima rotaciju oko z osi, rompska simetrija se usrednji te vrijedi [107]:

$$\begin{aligned} g_{||} &= g_{zz}, \\ g_{\perp} &= \left(\frac{g_{xx}^2 + g_{yy}^2}{2} \right)^{1/2}. \end{aligned} \quad (10)$$

U slučaju slobodne rotacije radikala, usrednjeni g faktor (g_{av}) za sustav s aksijalnom simetrijom iznosi:

$$g_{av} = \left(\frac{g_{||}^2 + 2g_{\perp}^2}{3} \right)^{1/2} \quad (11)$$

a za rompsku simetriju:

$$g_{av} = \left(\frac{g_{xx}^2 + g_{yy}^2 + g_{zz}^2}{3} \right)^{1/2}. \quad (12)$$

3.2 Spinski hamiltonijan

Spinski hamiltonijan sustava s elektronskim spinom S i m jezgara s nuklearnim spinom I izražen je relacijom [112]:

$$\begin{aligned} H_0 &= H_{EZ} + H_{ZFS} + H_{HF} + H_{NZ} + H_{NQ} + H_{NN}, \\ H_0 &= \beta_e \vec{B}_0^T \mathbf{g} \vec{S} / \hbar + \vec{S}^T \mathbf{D} \vec{S} + \sum_{k=1}^m \vec{S}^T \mathbf{A}_k \vec{I}_k \\ &- \beta_n \sum_{k=1}^m g_{n,k} \vec{B}_0^T \vec{I}_k / \hbar + \sum_{I_k > 1/2} \vec{I}_k^T \mathbf{P}_k \vec{I}_k + \sum_{i \neq k} \vec{I}_i^T \mathbf{d}^{(i,k)} \vec{I}_k \end{aligned} \quad (13)$$

Članovi hamiltonijana H_0 opisuju redom; H_{EZ} : elektronsku Zeemanovu interakciju, H_{ZFS} : cijepanje u nultom polju (engl. *zero field splitting*), H_{HF} : hiperfinu interakciju između elektronskog spina i m nuklearnih spinova, H_{NN} : spin-spin interakciju između različitih nuklearnih spinova, H_{NZ} : nuklearnu Zeemanovu interakciju, H_{NQ} : nuklearnu kvadrupolnu interakciju [113].

3.2.1 Elektronska Zeemanova interakcija

Kao što je navedeno u poglavlju 3.1, interakcija između elektronskog spina i vanjskog magnetskog polja \vec{B}_0 , opisana je relacijom [113]:

$$H_{EZ} = \frac{\beta_e \vec{B}_0^T \mathbf{g} \vec{S}}{\hbar}. \quad (14)$$

\mathbf{g} je simetrični tenzor sa šest nezavisnih veličina, tri glavne vrijednosti g_{xx} , g_{yy} i g_{zz} , te tri Eulerova kuta koji opisuju orijentaciju glavnih osi u koordinatnom sustavu. Kako je gore navedeno (poglavlje 3.1), za kubičnu simetriju vrijedi $g_{xx} = g_{yy} = g_{zz}$, za aksijalnu: $g_{||} = g_{zz}$ i $g_{\perp} = g_{xx} = g_{yy}$, te za rompsku $g_{xx} \neq g_{yy} \neq g_{zz}$. Odstupanje glavnih vrijednosti od g_e vrijednosti za slobodni elektron uzrokovano je interakcijom osnovnog i pobuđenog stanja vezanjem spina elektrona i orbitalne kutne količine gibanja L . Ovaj učinak je opisan hamiltonijanom [113]:

$$H_Z + H_{LS} = \frac{\beta_e \vec{B}_0^T (\vec{L} + g_e \vec{S})}{\hbar} + \lambda \vec{L}^T \vec{S}, \quad (15)$$

gdje je H_Z elektronski Zeemanov član s uključenom orbitalnom kutnom količinom gibanja, a $H_{LS} = \lambda \vec{L}^T \vec{S}$ spin-orbitalna interakcija sa spin-orbita konstantom vezanja λ . T označuje transponirani vektor. Tenzor \mathbf{g} se može izraziti preko drugog reda računa smetnje [114]:

$$\mathbf{g} = \mathbf{g}_e \mathbf{1} + 2\lambda \mathbf{\Lambda}, \quad (16)$$

gdje je $\mathbf{\Lambda}$ tenzor izražen s:

$$\Lambda_{ij} = \sum_{n \neq 0} \frac{\langle \psi_0 | L_i | \psi_n \rangle \langle \psi_n | L_j | \psi_0 \rangle}{\varepsilon_0 - \varepsilon_n}. \quad (17)$$

Osnovno stanje nesparenog elektrona, opisano je valnom funkcijom ψ_0 dok ψ_n označuje n-to pobuđeno stanje. ε_0 i ε_n su pripadajuće energije.

3.2.2 Cijepanje u nultom polju

Za sustave sa spinom $S > \frac{1}{2}$ i nekubičnom simetrijom, dipol-dipol interakcija između elektronskih spinova otklanja $(2S+1)$ degeneraciju osnovnog stanja. Hamiltonijan cijepanja dan je relacijom [113]:

$$H_{ZF} = \vec{S}^T \mathbf{D} \vec{S}, \quad (18)$$

gdje je \mathbf{D} tenzor interakcije u nultom polju. \mathbf{D} je simetrični tenzor, čiji trag iščezava te se u sustavu glavnih osi jednađba (15) može zapisati kao:

$$\begin{aligned} H_{ZF} &= D_x S_x^2 + D_y S_y^2 + D_z S_z^2, \\ H_{ZF} &= D \left[S_z^2 - \frac{1}{2} S(S+1) \right] + E (S_x^2 - S_y^2), \end{aligned} \quad (19)$$

gdje je $D = 3D_z/2$ i $E = (D_x - D_y)/2$. Za kubičnu simetriju vrijedi $D = E = 0$, za aksijalnu $D \neq 0, E = 0$, dok za sustave sa simetrijom niže od aksijalne, vrijedi $D \neq 0, E \neq 0$.

3.2.3 Nuklearna Zeemanova interakcija

Vežanje nuklearnog spina I s vanjskim poljem \vec{B}_0 , opisano je hamiltonijanom nuklearne Zeemanove interakcije [113]:

$$H_{NZ} = -\frac{g_n \beta_n \vec{B}_0^T \vec{I}}{\hbar}, \quad (20)$$

gdje je su spinski kvantni broj I i nuklearni g_n faktor svojstveni jezgri. I obuhvaća vrijednosti od $\frac{1}{2}$ do 6, a nuklearni g_n faktor od 0.097 do 5.58.

Nuklearna Zeemanova interakcija ima vrlo slab utjecaj na EPR spektar te za protone iznosi 1/658 Zeemanove interakcije za elektrone. Mjerljivi pomaci u spektru se opažaju samo kada je nuklearna Zeemanova interakcija jednakog reda veličine kao i hiperfina interakcija.

3.2.4 Hiperfina interakcija

Hiperfina interakcija između elektrona i nuklearnog spina opisana je hamiltonijanom [113]:

$$H_{HF} = \vec{S}^T \mathbf{A} \vec{I}, \quad (21)$$

gdje je \mathbf{A} tenzor hiperfine interakcije. Hamiltonijan (21) može se izraziti kao zbroj hamiltonijana Fermijeve kontaktne interakcije H_F i hamiltonijana koji opisuje interakciju dipola između elektrona i jezgre H_{DD} .

Hamiltonijan Fermijeve kontaktne interakcije dan je relacijom:

$$H_F = a_{iso} \vec{S}^T \vec{I}, \quad (22)$$

gdje je a_{iso} hiperfina konstanta vezanja izražena kao [113]:

$$a_{iso} = \frac{2}{3} \frac{\mu_0}{\hbar} g_e \beta_e g_n \beta_n |\psi_0(0)|^2. \quad (23)$$

U gornjoj jednadžbi (23), $|\psi_0(0)|^2$ predstavlja gustoću vjerojatnosti nalaženja spina elektrona u jezgri. Hamiltonijan dipol-dipol interakcije elektrona i jezgre dan je jednadžbom:

$$H_{DD} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \beta_e g_n \beta_n \left[\frac{3\vec{S}^T \vec{r} \vec{r}^T \vec{I}}{r^5} - \frac{\vec{S}^T \vec{I}}{r^3} \right], \quad (24)$$

gdje je \vec{r} , vektor koji povezuje elektronski i nuklearni spin. Integracijom po prostornoj raspodjeli elektrona dobiva se hamiltonijan anizotropne dipol-dipol interakcije:

$$H_{DD} = \vec{S}^T \mathbf{T} \vec{I}, \quad (25)$$

gdje je \mathbf{T} tenzor dipolne interakcije:

$$T_{ij} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \beta_e g_n \beta_n \left\langle \psi_0 \left| \frac{3r_i r_j - \delta_{ij} r^2}{r^5} \right| \psi_0 \right\rangle. \quad (26)$$

T_{ij} su elementi simetričnog tenzora \mathbf{T} , čiji trag iščezava, a ψ_0 je valna funkcija osnovnog stanja. Za udaljenosti R_k između jezgre N i k -te orbitale koja je manja od 0.25 nm, H_{DD} se može aproksimirati razvojem u red po r/R_k , gdje je r udaljenost između jezgre i k -te orbitale. U slučaju gdje je R_k veći od 0.25 nm, tenzor \mathbf{T} se može aproksimirati relacijom [113]:

$$\mathbf{T} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \beta_e g_n \beta_n \sum_{k \neq N} \frac{\rho_k (3\vec{n}_k \vec{n}_k^T - \mathbf{1})}{R_k^3}, \quad (27)$$

gdje je ρ_k gustoća spinova na k -tom atomu, a \vec{n}_k jedinični vektor koji označuje smjerove kosinusa \vec{R}_k u molekularnom sustavu. Kod iona prijelaznih metala, nesparni elektron je

uglavnom smješten blizu centralnog iona, te je u gornjoj jednadžbi (27), dovoljno sumirati po tim jezgrama. Tenzor \mathbf{T} je tada dan s:

$$\mathbf{T} = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} g_e \beta_e g_n \beta_n \frac{\rho_k (3\vec{n}_M \vec{n}_M^T - \mathbf{1})}{R_M^3} \quad (28)$$

Jednadžba (28) koja je samo gruba aproksimacija za dipolno vezanje, često se primjenjuje za procjenu R_M i \vec{n}_M i stoga za dodjeljivanje hiperfinskih tenzora odgovarajućim protonima. U sustavu hiperfinskih glavnih osi, dipolna interakcija dana je dijagonalnim tenzorom [113]:

$$T^d = \frac{\mu_0}{4\pi\hbar} \frac{g_e \beta_e g_n \beta_n}{R_M^3} \begin{pmatrix} -1 & & \\ & -1 & \\ & & 2 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} -T & & \\ & -T & \\ & & 2T \end{pmatrix}. \quad (29)$$

Iako taj izraz strogo vrijedi samo za izotropnu Zeemanovu interakciju elektrona, često se koristi kao aproksimacija u slučajevima kada je anizotropija g -tenzora mala. U mnogim paramagnetskim spojevima, postoji znatan orbitalni magnetski moment koji dodaje pseudo-izotropni kao i pseudo-anizotropni doprinos hiperfinoj interakciji. Ti se doprinosi mogu opisati razmatranjem članova drugog reda oblika opisanih s [113]:

$$\langle \psi_0 | H_{LI} | \psi_n \rangle \langle \psi_n | H_{LS} | \psi_0 \rangle, \quad (30)$$

gdje je H_{LS} dan jednadžbom:

$$H_{LS} = \lambda \vec{L}^T \vec{S}, \quad (31)$$

a H_{LI} :

$$H_{LI} = g_e \beta_e g_n \beta_n \mu_0 \frac{\vec{L}^T \vec{I}}{4\pi \hbar r^3}. \quad (32)$$

3.3 g tenzor

Ako se odabere Kartezijev koordinatni sustav, orijentacija kristala u magnetskom polju se može izraziti orijentacijom polja s obzirom na fiksni koordinatni sustav. Magnetsko polje se tada može izraziti jednadžbom [115]:

$$\vec{B} = B_0 \vec{I}, \quad (33)$$

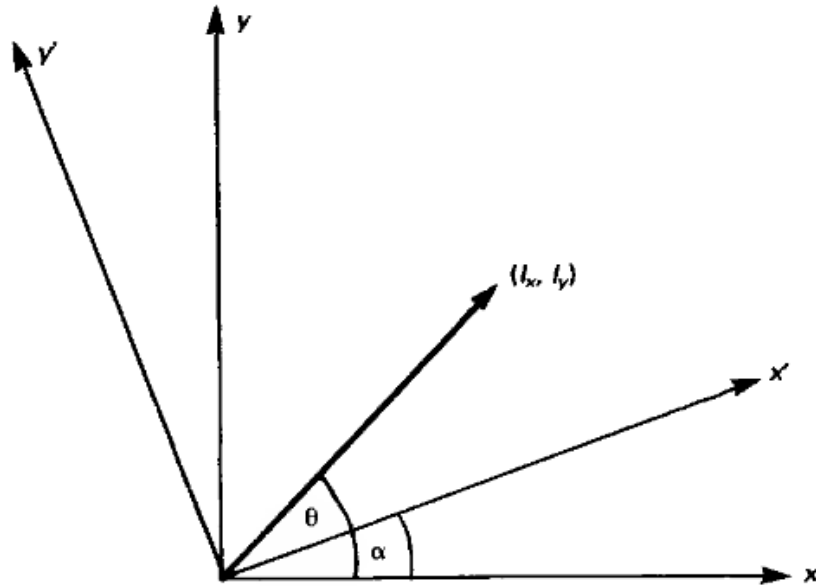
gdje su \vec{I} kosinusi kutova koje vektor \vec{B} čini s x , y i z osima koordinatnog sustava. $\vec{I} = (I_x, I_y, I_z)$, a komponente su dane s: $I_z = \cos \theta$, $I_x = \sin \theta \cos \alpha$, $I_y = \sin \theta \sin \alpha$ te podliježu uvjetu normalizacije: $I_x^2 + I_y^2 + I_z^2 = 1$.

Hamiltonijan iz jednadžbe (13), može se izraziti jednadžbom:

$$H = B_0 \beta_e \vec{I} \vec{g} \vec{S}, \quad (34)$$

iz koje slijedi:

$$H = \beta_e B_0 \{ (I_x g_{xx} + I_y g_{yx} + I_z g_{zx}) S_x + (I_x g_{xy} + I_y g_{yy} + I_z g_{zy}) S_y + (I_x g_{xz} + I_y g_{yz} + I_z g_{zz}) S_z \} \quad (35)$$



Slika 3.1: Rotacija koordinatnog sustava. Slika je preuzeta iz reference [112].

U slučaju rotacije koordinatnog sustava prikazanog na slici 3.1, vrijede sljedeće relacije:

$$(l_x, l_y) = (\cos \theta, \sin \theta),$$

$$l_{x'} = \cos(\theta - \alpha) = \cos \theta \cos \alpha + \sin \theta \sin \alpha = l_x \cos \alpha + l_y \sin \alpha, \quad (36)$$

$$l_{y'} = -l_x \sin \alpha + l_y \cos \alpha.$$

A u slučaju tri dimenzije, iz jednadžbi (36) može se izraziti sljedeće:

$$\begin{bmatrix} l_{xx'} & l_{yx'} & l_{zx'} \\ l_{xy'} & l_{yy'} & l_{zy'} \\ l_{xz'} & l_{yz'} & l_{zz'} \end{bmatrix} \begin{bmatrix} l_x \\ l_y \\ l_z \end{bmatrix} = \begin{bmatrix} l_{x'} \\ l_{y'} \\ l_{z'} \end{bmatrix} \quad (37)$$

Slijedeći jednadžbu (37), hamiltonijan (35) se može izraziti kao:

$$H = \beta_e B_0 \{ (l_{\alpha} g_{\alpha x}) S_x + (l_{\alpha} g_{\alpha y}) S_y + (l_{\alpha} g_{\alpha z}) S_z \} \quad (38)$$

Za $S=1/2$, vrijednosti hamiltonijana su dane sljedećom tablicom:

$$\begin{array}{cc}
 & \left| +\frac{1}{2} \right\rangle & \left| -\frac{1}{2} \right\rangle \\
 \left\langle +\frac{1}{2} \right| & \frac{1}{2} \beta_e B_0 l_\alpha g_{\alpha z} & \frac{1}{2} \beta_e B_0 (l_\alpha g_{\alpha x} - i l_\alpha g_{\alpha y}) \\
 \left\langle -\frac{1}{2} \right| & \frac{1}{2} \beta_e B_0 (l_\alpha g_{\alpha z} + i l_\alpha g_{\alpha y}) & -\frac{1}{2} \beta_e B_0 l_\alpha g_{\alpha z}
 \end{array} \quad (39)$$

Iz (36), se mogu dobiti svojstvene vrijednosti hamiltonijana koje su dane s:

$$E = \pm \frac{1}{2} \beta_e B_0 \left\{ (l_\alpha g_{\alpha x})(l_\alpha g_{\alpha x}) + (l_\alpha g_{\alpha y})(l_\alpha g_{\alpha y}) + (l_\alpha g_{\alpha z})(l_\alpha g_{\alpha z}) \right\}^{\frac{1}{2}}. \quad (40)$$

Član pod korijenom iz gornje jednadžbe (40), može se zapisati kao:

$$g = \{ l_\alpha g_{\alpha \gamma} g_{\gamma \beta} l_\beta \}^{\frac{1}{2}} = \{ l_\alpha (\vec{g} \vec{g})_{\alpha \beta} l_\beta \}^{\frac{1}{2}} \quad (41)$$

U slučaju kada referentni koordinatni sustav odgovara sustavu u kojem je \vec{g} dijagonalan, kvadrat \vec{g} je također dijagonalan te se jednadžba (41) može izraziti kao:

$$g = \{ l_x^2 g_{xx}^2 + l_y^2 g_{yy}^2 + l_z^2 g_{zz}^2 \}^{\frac{1}{2}}, \quad (42)$$

gdje x, y i z označuju glavne osi. U slučaju kada \vec{g} ima aksijalnu simetriju, vrijedi da je $g_{zz} = g_{||}$, $g_{xx} = g_{yy} = g_{\perp}$ te se jednadžba (42) može zapisati kao:

$$g = \{ g_{\perp}^2 \sin^2 \theta + g_{||}^2 \cos^2 \theta \}^{\frac{1}{2}}, \quad (43)$$

gdje θ označava kut između primijenjenog polja i osi simetrije.

3.4 EPR spektri uzoraka praha

U praktičnoj primjeni nije uvijek moguće imati uzorak u kristalnom obliku te se često radi spektroskopska analiza uzoraka praha. Većina spektara praha sustava sa $S=1/2$ odražava ne samo anizotropiju g -tenzora, već i onu hiperfinskih interakcija. U sustavu s aksijalno simetričnim g -tenzorom ovisnost rezonantnog polja, B_{rez} o kutu θ dana je s [115]:

$$B_{rez}(\theta) = \frac{h\nu}{\beta_e} [g_{\parallel}^2 \cos^2 \theta + g_{\perp}^2 \sin^2 \theta] \quad (44)$$

Vrijednosti g_{\parallel} i g_{\perp} , određuju raspon polja u kojem dolazi do apsorpcije. Ako je, na primjer, $g_{\parallel} > g_{\perp}$, tada nema apsorpcije na poljima nižim od B_{\parallel} danim s:

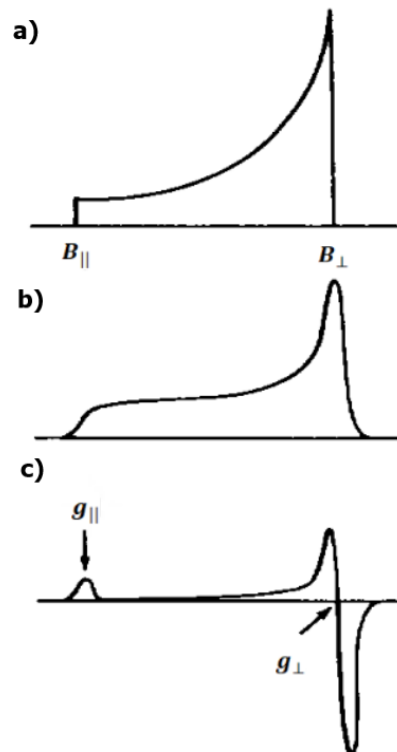
$$B_{\parallel} = \frac{h\nu}{\beta_e g_{\parallel}}, \quad (45)$$

a također ni na poljima višim od B_{\perp} danim s:

$$B_{\perp} = \frac{h\nu}{\beta_e g_{\perp}}. \quad (46)$$

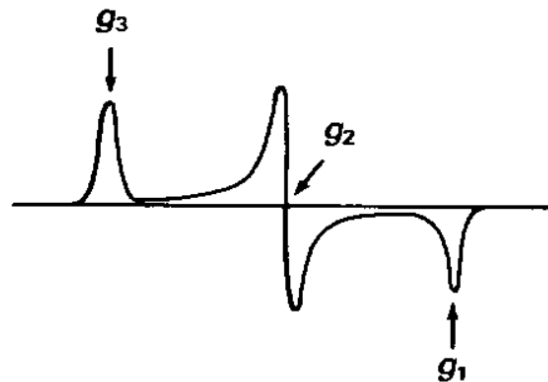
Kako se polje povećava iznad B_{\parallel} , prvi spinovi koji dolaze u rezonanciju su oni u molekulama za koje polje leži duž osi simetrije, tako da dolazi do naglog početka apsorpcije na B_{\parallel} . Ako se polje smanji od B_{\perp} , slijedi početak apsorpcije na B_{\perp} , ali budući da postoji cijela ravnina orijentacije gdje je polje okomito na os simetrije, intenzitet ove apsorpcije je mnogo veći od onog koji javlja se na B_{\parallel} . Sve je to sažeto na slici 3.2 a), koja prikazuje idealizirani apsorpcijski spektar, tako da su pretpostavljene beskonačno uske linije. Slika 3.2 b). u kojem je dopuštena konačna širina linije, je realističniji oblik apsorpcijske linije. Njegova prva derivacija, koja je

najčešće korišteni prikaz, prikazan je na slici 3.2 c). Jasno je da ako se mogu odabrati odgovarajuće značajke spektra na slici 3.2 c), mogu se izmjeriti g_{\parallel} i g_{\perp} .



Slika 3.2: Spektar uzorka praha s aksijalnim g tenzorom, gdje je $g_{\parallel} > g_{\perp}$. Slika je preuzeta iz reference [115].

Dobra procjena g_{\parallel} općenito se može dobiti iz malih vrijednosti polja, kao što je prikazano na slici 3.2 c), ali točna lokacija g_{\perp} na velikim vrijednostima polja, donekle je osjetljiva na širinu linije korištenu u simulaciji. Često se koristi točka g_{\perp} naznačena na slici 3.2 c). Kada je g -tenzor rompski a glavne komponente dobro odvojene, spektar praha je strukturiraniji. Postoje značajke visokog i niskog polja, poput onih na B_{\parallel} , koje odgovaraju najmanjem i najvećem elementu g -tenzora. Između ovih ekstrema dolazi do povećanja intenziteta, a maksimum odgovara srednjem tenzorskom elementu kao što je prikazano na slici 3.3. Mogućnost mjerenja na više od jedne frekvencije je od velike koristi za tumačenje i analizu spektra uzorka praha [115].



Slika 3.3: Prva derivacija spektra uzorka praha sustava s rompskim g tenzorom. Slika je preuzeta iz reference [115].

Snimanjem spektara na višim frekvencijama, povećava se rezolucija. Na primjer, kada je g -tenzor rompski, ali su dvije glavne vrijednosti prilično slične, spektar u X-pojasu (~ 9.5 GHz), možda neće omogućiti razlikovanje između dvije slične g -vrijednosti. Međutim, spektar mjeren/snimljen na Q-pojasu (EPR spektrometar u području rada frekvencije mikrovalova ~ 34 GHz) ili, po mogućnosti, na mnogo višim frekvencijama pokazat će više strukture tako da je olakšano njegovo izravno očitavanje ili simuliranje pomoću računalne simulacije [115].

4 MATERIJALI I METODE

4.1 Priprema uzoraka

4.1.1 Kalcijevi sulfati

Kalcijev klorid (CaCl_2) i natrijev sulfat (Na_2SO_4) analitičke čistoće nabavljeni su od tvrtke Sigma-Aldrich odnosno Alkaloid. Komercijalno dostupan sintetički dentalni koštani nadomjestak, BONDBONE®, mješavina kalcijevih sulfata, dobiven je od MIS Implants Technologies GmbH. Fiziološka otopina, tj. intravenska otopina za infuziju 0.9% natrijevog klorida, kupljena je od B. Braun.

Cilj sinteze je bio dobiti čiste uzorke dvije faze kalcijevog sulfata Ca_2SO_4 – CS, a to su kalcijev sulfat dihidrat $\text{CaSO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ – CSDH te kalcijev sulfat hemihidrat $\text{CaSO}_4 \cdot \frac{1}{2} \text{H}_2\text{O}$ – CSHH. Ishodne otopine CaCl_2 i Na_2SO_4 koncentracije 1 mol/dm^3 pripremljene su u deioniziranoj vodi visoke čistoće, tj. s vodljivošću manjom od $0.055 \mu\text{S/cm}$. Uzorci su sintetizirani brzim dodavanjem otopina CaCl_2 u otopinu Na_2SO_4 uz konstantno miješanje pomoću magnetske miješalice. Za pripremu kalcijevog sulfata hemihidrata reakcija je izvedena na $25 \text{ }^\circ\text{C}$, a za pripremu kalcijevog sulfata dihidrata na $70 \text{ }^\circ\text{C}$, obzirom da je dihidrat termodinamički stabilan na višim temperaturama [73]. Otopina umjetne sline svježije je pripremljena prema tablici 4.1 [116].

Tablica 4.1: Kemijski sastav pripremljene umjetne sline [116].

Spoj	Količina
Na_2HPO_4	0.426 g
NaHCO_3	1.68 g
CaCl_2	0.147 g
H_2O	800 ml
HCl-1M	2.5 ml

Talog sintetiziranog kalcijevog sulfata je osušen u pećnici pri temperaturi od 50°C prema uobičajenom protokolu za sušenje hidrata. Pripremljene su smjese uzoraka CSDH i CSHH u različitim masenim omjerima (0%, 20%, 40%, 60%, 80% i 100%).

U ovoj disertaciji četiri eksperimentalne skupine i jedna kontrolna skupina tretirane su prije mjerenja kako slijedi:

- 1) ozračeni osušeni uzorci smjesa CSDH i CSHH različitih sastava (0%, 20%, 40%, 60%, 80% i 100%), praćeni su kao kontrole;
- 2) ozračeni osušeni uzorci smjesa CSDH i CSHH različitih sastava pomiješani s 1 ml fiziološke otopine;
- 3) uzorci pomiješani s fiziološkom otopinom (opisani u točki 2) stavljeni su u 1 ml umjetne slinje na 24 sata pri temperaturi od 37 °C;
- 4) ozračeni uzorci smjesa CSDH i CSHH različitih sastava pomiješani s 1 ml umjetne slinje.

Nakon miješanja, uzorci kalcijevih sulfata su odvojeni od medija centrifugiranjem. Uzorci su zatim osušeni u struji dušika prije EPR analize.

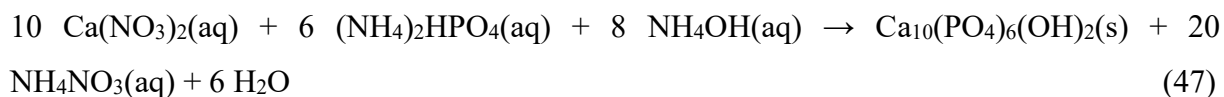
Od komercijalnih pripravaka korišten je BONDBONE® (MIS-implants), koji je mješavina CSDH i CSDD u nepoznatom omjeru, stoga je u ovom radu TGA analizom utvrđen omjer 38% CSDH i 62% CSHH, što je opisano u poglavlju 5.

4.1.2 Kalcijevi fosfati

4.1.2.1 *Sinteza nesupstituiranog hidroksiapatita i Mg- supstituiranog hidroksiapatita*

Hidroksiapatit je sintetiziran prema proceduri opisanoj u studiji [117]. Reakcija je dana s: otopina di-amonijevog fosfata $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ kontrolirano je dodavana u otopinu kalcijevog nitrata $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, u reaktor uz mehaničko miješanje. Otopina amonijaka korištena je za

održavanje alkalnih uvjeta (pH=8) u reakcijskoj smjesi. Reakcija opisana jednadžbom (47) odvijala se na 50 °C tijekom 20 sati:



Otopina je zatim filtrirana, a kruta tvar sušena na 90 °C tijekom 48 h.

Mg supstituirani hidroksiapatit sintetiziran je dodavanjem otopine $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ o u otopinu koja sadrži $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ i $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$. Reakcijska smjesa je zagrijavana na 100 °C tijekom 5 sati. Tijekom zagrijavanja dodana je urea i ureaza te je pH reakcijske smjese bio 8.8. Talog je filtriran, opran vodom i etanolom te sušen na 120 °C [118].

4.1.2.2 Simulirana tjelesna tekućina i umjetna slina

Za provedbu eksperimenta s kalcijevim fosfatima, korištene su korigirana simulirana tjelesna tekućina (engl. *corrected simulated body fluid*, c-SBF) i fiziološka otopina. Navedene otopine su odabrane kao medij za simulaciju ljudske sline i krvne plazme. Korigirana simulirana tjelesna tekućina (c-SBF) je pripremljena prema proceduri opisanoj u radu [26], a njen kemijski sastav je dan u tablici 4.2.

U Eppendorf cjevčicama od 2 mL u 1 ml c-SBF dodano je 10 mg HAP-a i Mg supstituiranog HAP-a. Uzorci su termostatorani u vodenoj kupelji na 37 °C tijekom 28 dana. c-SBF se svakodnevno izmjenjivala centrifugiranjem i dekantiranjem. Čvrsta faza filtrirana je 1., 14. i 28. dan na Millipore filter papiru 0.45 μm, isprana 3 puta MiliQ vodom, jednom etanolom te osušena u struji dušika. Uzorci su držani u eksikatoru do daljnje analize.

Tablica 4.2: Koncentracije anorganskih iona u krvnoj plazmi i simuliranoj tjelesnoj tekućini (SBF) koja je odabrana kao medij za simulaciju ljudske sline i krvne plazme [26].

Ion	Koncentracija iona (mM)	
	Krvna plazma	Simulirana tjelesna tekućina (SBF)
Na ⁺	142.0	142.0
K ⁺	5.0	5.0
Mg ²⁺	1.5	1.5
Ca ²⁺	2.5	2.5
Cl ⁻	103.0	147.8
HCO ₃ ⁻	27.0	4.2
HPO ₄ ²⁻	1.0	1.0
SO ₄ ²⁻	0.5	0.5
pH	7.2-7.4	7.4

4.2 Metode karakterizacije

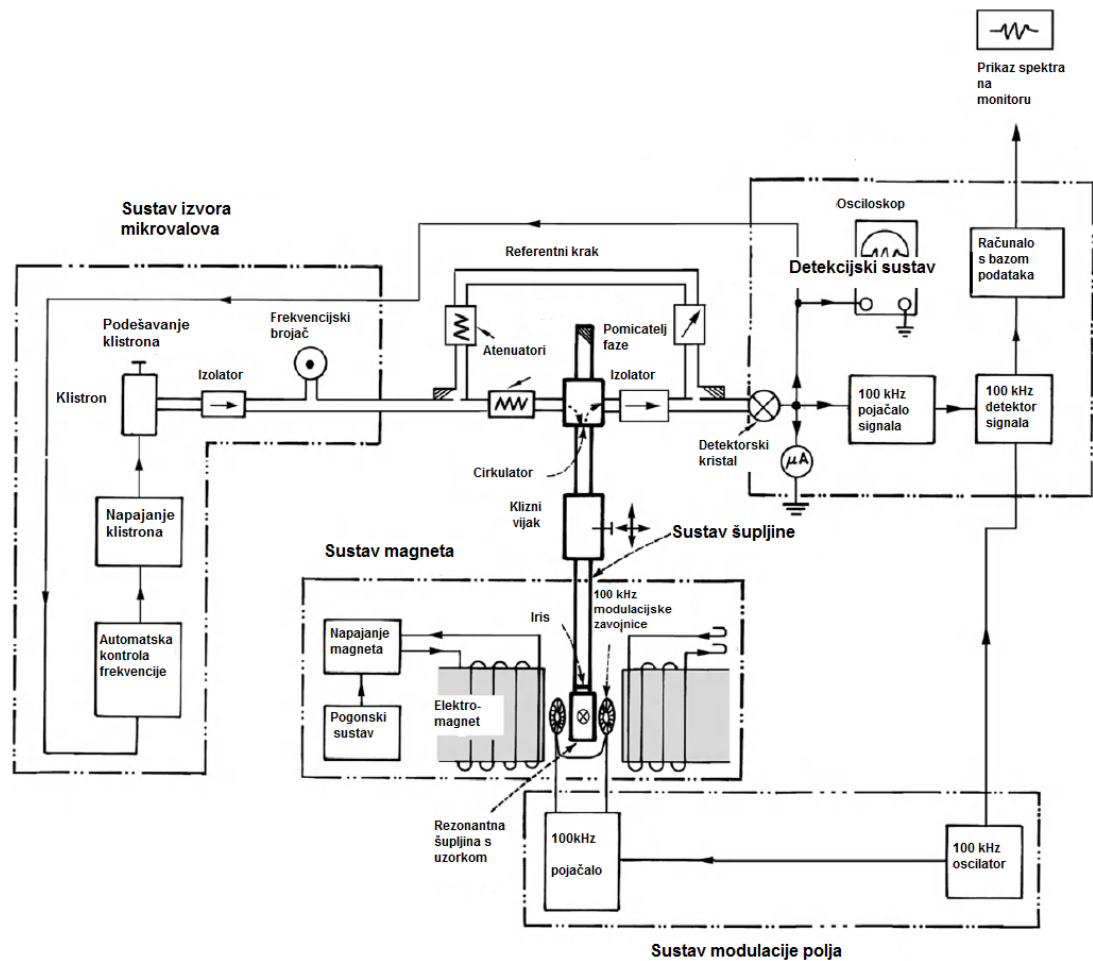
4.2.1 Elektronska paramagnetska rezonancija – EPR

EPR spektri snimljeni su na Varian E109 X-pojasnom spektrometru opremljenim s Bruker ER041XG mikrovalnim mostom i Bruker TE102 pravokutnom šupljinom. Frekvencija mikrovalova je iznosila 9.5 GHz s modulacijom frekvencije 100 kHz. Mjerenja identifikacije radikala su provedena pri sobnoj temperaturi. Za kalibraciju magnetskog polja, korišten je manganov referentni uzorak Mn²⁺ u MgO spoju. Korišteni eksperimentalni parametri u eksperimentu s kalcijevim sulfatima su bili: 1 mW mikrovalna snaga, 0.1 mT amplituda modulacije i 4 ms vremenska konstanta. Spektroskopski parametri eksperimenta s kalcijevim fosfatima bili su sljedeći: amplituda modulacije 0.11 mT i snaga mikrovalnog polja 1.99 mW. Eksperimenti s temperaturnom ovisnošću napravljeni su na 343 K, 353 K, 363 K i 373 K za sve uzorke bez prethodnog uranjanja u medij. Temperatura je kontrolirana korištenjem temperaturne jedinice Bruker ER4111VT s kontinuiranim protokom dušika. Uzorci su stavljeni

pojedinačno u suprasil kvarcne cijevi vanjskog promjera 4 mm 707-SQ-100M (Wilma LabGlass). Koncentracija radikala, A_N , procijenjena je dvostrukom integracijom EPR spektara i normalizirana na masu uzorka. EPR eksperimenti su provedeni u Zavodu za fizičku kemiju Instituta Ruđer Bošković.

4.2.1.1 Opis instrumenta

Tipični EPR spektrometar s tehnikom snimanja kontinuiranog vala (engl. *continuous wave*) prikazan je na slici 4.1 prema sustavima komponenti: sustav izvora mikrovalova, detekcijski sustav, sustav magneta, sustav šupljine te sustav modulacije polja [114]. Sustav magneta osigurava stabilno i homogeno i magnetsko polje koje je linearno promjenjivo unutar željenog raspona. Sustav s izvorom mikrovalova sadrži komponente koje proizvode elektromagnetske valove. U sustavu šupljine drži se paramagnetski uzorak te se usmjerava mikrovalno zračenje prema uzorku i od uzorka. Sustavima modulacije (u ovoj shemi odabrana je frekvencija modulacije od 100 kHz) i detekcije prati se, pojačava i snima signal. Koncept modulacije signala se bazira na tome da modulacija magnetskog polja „kodira“ spektralne informacije o mikrovalnom signalu. Fazno osjetljiv sustav detekcije izvlači ovu „kodiranu“ informaciju te se na taj način uklanja većinu „šuma“ u EPR signalu. Na slici 4.1 je također prikazana korisna značajka, tzv. referentni krak ili prenosni krak (engl. *reference arm, bypass arm*) koji je prisutan u mnogim spektrometrima. U referentnom kraku uzima se mikrovalna snaga iz valovoda prije cirkulatora te se podešavaju snaga i faza mikrovalova. S odgovarajućim postavkama, ovaj referentni krak omogućuje ne samo odgovarajuće pomicanje razine snage na detektoru (čak i kada je snaga reflektirana od rezonatora vrlo mala), već i odabir hoće li se detektirati apsorpcijski ili disperzijski signal iz spinskog sustava [114].



Slika 4.1: Shematski prikaz EPR spektrometra. Slika je obrađena i preuzeta iz reference [114].

4.2.2 Računalna simulacija spektara

U ovoj disertaciji za računalnu simulaciju spektara korišten je softverski paket Easyspin [119]. Korišteni softverski paket Easyspin pruža sve potrebne alate od osnovne obrade podataka i funkcionalnosti vizualizacije do spektralne simulacije. Temelji se na Matlabu (The Mathworks, Natick, MA, SAD), komercijalnom programibilnom numeričkom i softverskom okruženju za vizualizaciju, iz sljedećih razloga; programski jezik Matlab temelji se na matricama i vrlo učinkovitim matričnim algoritmima, čime se korisnik oslobađa od implementacija tih osnovnih numeričkih tipova i postupaka. Matlab ima jednostavnu sintaksu, a svaka nova eksperimentalna

ideja može se vrlo brzo kodirati i evaluirati s nekoliko dodatnih funkcija specifičnih za EPR. Mogućnosti vizualizacije su opsežne i vrlo fleksibilne [119].

EasySpin uključuje nekoliko funkcija za simulacije: *pepper* za krute EPR spektre pojedinačnih kristala i neuređenih sustava, *garlic* za otopine i EPR spektre brzog gibanja i *salt* za krute ENDOR spektre [120]. U ovom radu korištena je funkcija *pepper* za simulaciju EPR spektra kontinuiranih valova za čvrste uzorke. Funkcija *pepper* koristi spinski hamiltonijan H opisan u 3. poglavlju (jednadžba (13)). Spinski Hamiltonian se može izraziti kao linearna funkcija magnetskog polja opisana s izrazom:

$$H(B) = F + \vec{B}_0^T \vec{G}, \quad (48)$$

gdje su u član F ugrađeni svi članovi neovisni o polju, a \vec{G} je vektorski operator spinskih magnetskih momenata: $\beta_e \mathbf{g} \vec{S} / \hbar - \beta_n \sum_{k=1}^m g_{n,k} \vec{I}_k / \hbar$. U matricnoj reprezentaciji, F i tri elementa \vec{G} su matrice. Budući da su neovisni o B , potrebno ih je izračunati samo jednom pri simulaciji praškastog uzorka. Tijekom EPR eksperimenta s promjenom polja, magnituda magnetskog polja B i posljedično spinski hamiltonijan $H(B)$ mijenjaju se kontinuirano. Rezonantna polja dana su s: $H(B)|u\rangle = E_u|u\rangle$, $H(B)|v\rangle = E_v|v\rangle$, $\Delta_{uv} = E_v - E_u = \nu_{mw}$, gdje je ν_{mw} frekvencija, a $E_v > E_u$. Opće, numeričko rješenje dane jednadžbe, zahtjeva iterativne metode.

EasySpin funkcije *resfields* i *pepper* implementiraju novu proceduru modeliranja razine energije temeljenu na iterativnim adaptivnim bisekcijama, kao što je detaljno opisano u radu [121]. Ovaj postupak, koji pronalazi sva rezonantna polja unutar zadanog raspona polja $B_{min} \leq B \leq B_{maks}$, radi na sljedeći način; metoda počinje s intervalom $[B_{min}, B_{maks}]$. Prvo, energije stanja E_u i njihove derivacije $\frac{\partial E_u}{\partial B}$ na granicama intervala izračunavaju se dijagonalizacijom pridruženih Hamiltonijana. Derivacije se dobivaju korištenjem Feynmanova teorema: $\frac{\partial E_u}{\partial B} = \left\langle u \left| \frac{\partial H}{\partial B} \right| u \right\rangle = \langle u | G_{zL} | u \rangle$. Rezultati se koriste za izračun Hermite-ove *spline* reprezentacije dijagrama razine energije u rasponu polja. Zatim se Hamiltonijan dijagonalizira u središtu intervala $B_{centar} = (B_{min} + B_{maks})/2$, a dobivene energije se uspoređuju s onima dobivenim *spline* interpolacijom iz dviju graničnih vrijednosti polja. Ako je pogreška ispod određenog praga ili

se rezonancije mogu isključiti, modeliranje se zaustavlja. Ako nije, dva pod-intervali $[B_{min}, B_{centar}]$ i $[B_{centar}, B_{maks}]$ pročišćavaju se dijagonalizacijom Hamiltonijana u njihovim središnjim poljima i provjerom u odnosu na interpolirane aproksimacije. Ta podjela se ponavlja sve dok sve središnje pogreške intervala ne budu ispod zadanog praga [119].

4.2.3 Osnovne metode karakterizacije

4.2.3.1 Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom – FTIR

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. *Fourier transform infrared spectroscopy*, FTIR) je spektroskopska metoda u kojoj se dio infracrvenog zračenja pri prolasku kroz uzorak apsorbira u uzorku, a dio se transmitira. Apsorpcijske vrpce u spektru odgovaraju frekvencijama vibracija funkcionalnih skupina molekula od kojih se promatrani materijal sastoji. Vibracije molekula su rastezanje i svijanje, a mogu biti simetrične ili antisimetrične. Budući da je svaki materijal jedinstvena kombinacija molekula, dva spoja nemaju potpuno jednaki infracrveni spektar. Stoga se infracrvena spektroskopija koristi za kvalitativnu analizu različitih vrsta materijala. Osim toga, intenzitet vrpce u spektru je odraz količine prisutnog materijala te se može koristiti i za kvantitativnu analizu. Frekvenciju i valni broj vibracije određuju jačina veze i mase povezanih atoma u radovima [122], [123]. Dobiveni infracrveni spektar je u vremenskoj domeni pa se pomoću Fourierove transformacije pretvara u spektar u frekvencijskoj domeni. Za snimanje spektara korištena je FTIR metoda prigušene totalne refleksije (engl. *attenuated total reflection*, ATR). ATR je metoda snimanja FTIR spektara koja se temelji na fenomenu totalne unutrašnje refleksije. Rezultirajuće prigušeno zračenje mjeri se kao funkcija valnog broja čime se dobiva apsorpcijski spektar karakterističan za uzorak [124], [125]. Za snimanje ATR-FTIR spektara korišten je Bruker, Tensor II spektrometar u rasponu od 4000 do 400 cm^{-1} , s rezolucijom od 1 cm^{-1} . ATR-FTIR mjerenja su napravljena u Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković.

4.2.3.2 Rendgenska difrakcija na prahu

Rendgenskom difrakcijom na prahu (engl. *powder X-ray diffraction*, PXRD) dobivaju se informacije o kristalnoj strukturi, kemijskom sastavu i fizičkim svojstvima materijala [126]. Metoda se temelji na Braggovu zakonu:

$$2d \sin\theta = \lambda, \quad (49)$$

gdje je λ valna duljina snopa rendgenskih zraka, θ upadni kut, a d razmak među plohama jedinične ćelije kristala. Kao rezultat analize, dobiva se difraktogram koji prikazuje ovisnost intenziteta raspršenog zračenja o kutu 2θ [126]. Dobiveni difraktogrami su uspoređivani s onima iz baze podataka rendgenske difrakcije na prahu (engl. *Powder Diffraction File*, PDF), a koja je u sastavu Međunarodnog centra za difrakcijske podatke (engl. *International Centre for Diffraction Data*, ICDD), prijašnjeg Zajedničkog odbora za standarde difrakcije na prahu (engl. *Joint Committee on Powder Diffraction Standards*, JCPDS).

Za analizu kalcijevih sulfata, podaci su prikupljeni na difraktometru Rigaku Ultima IV u Bragg-Brentano parafokusirajućoj geometriji pomoću Cu K_{α} zračenja ($\lambda = 0.154$ nm). Korišten je Ni filter za uklanjanje K_{β} linije, s 5° Sollerovih proreza za oblikovanje snopa, a intenzitet snopa je mjeran proporcionalnim brojačem. Intenziteti difrakcije mjereni su u kutnom području od 10° do 60° . Veličina koraka postavljena je na $2\theta 0.01^{\circ}$ s brzinom skeniranja od 1° po minuti. Podaci su obrađeni na pripadajućem Rigaku softveru (PDXL 2). Nakon analize, uzorci su pohranjeni na sobnoj temperaturi u mračnoj prostoriji s relativnom vlažnosti između 30% i 50%. Kontrolni eksperiment je ponovljen nakon godinu dana. Mjerenja su napravljena u Centru za istraživanje mora Instituta Ruđer Bošković u Rovinju.

Za analizu kalcijevih fosfata, PXRD obrasci su snimljeni na Panalytical Aeris Research Edition u Bragg – Brentano geometriji korištenjem Cu K_{α} zračenja u 2θ području od 5° do 70° . Veličina koraka je bila od $2\theta 0.02^{\circ}$, a brzina skeniranja od 1° po minuti. Mjerenja su napravljena u Zavodu za fizičku kemiju, Institut Ruđer Bošković.

4.2.3.3 Termogravimetrijska analiza

Termogravimetrijska analiza (engl. *thermogravimetric analysis*, TGA) je analitička metoda u kojoj se mjeri promjena mase uzorka u ovisnosti o temperaturi [127]. Uzorak se postupno zagrijava u uvjetima kontrolirane atmosfere. Kao rezultat analize dobiva se krivulja ovisnosti mase uzorka o temperaturi. Uz promjenu mase, kao parametri termogravimetrijske analize se koriste početna (T_o), vršna (T_p) i krajnja temperatura (T_e) gubitka mase. Početna temperatura se definira kao točka presjeka osnovne linije prije toplinskog učinka i tangente na najstrmijem dijelu krivulje. Krajnja temperatura je definirana kao ekstrapolirani kraj završetka procesa izlaska vode iz kristalne rešetke, odnosno točka presjeka tangente s osnovnom linijom nakon završetka procesa [128]. Vršna temperatura označuje točku na krivulji u kojoj je najveća promjena mase s porastom temperature. To je ujedno i točka infleksije krivulje. Termogrami su snimljeni na Mettler TG 50 uređaju s TC 11 TA procesorom u temperaturnom rasponu od 25 °C do 300 °C, s brzinom grijanja od 5 °C i 10 °C po minuti. Uzorci su mjereni u sintetskom zraku u Al₂O₃ posudicama (Mettler ME-24123, 70 µl). Mjerenja su napravljena u Zavodu za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković.

4.2.3.4 Pretražna elektronska mikroskopija i energijski disperzivna rendgenska spektroskopija

U elektronskom mikroskopu se snop elektrona pomoću sustava elektromagnetskih leća usmjerava na površinu uzorka, a razlučivanje i dubina prodiranja elektrona ovise o naponu, materijalu uzorka i veličini točke presjeka snopa na mjestu dodira s uzorkom [129]. Ako se snopom elektrona pretražuje površina, podaci se mogu pretvoriti u vidljivu skenirajuću sliku čime se omogućuje analiza topografije površine. U sklopu pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), najčešće se nalazi i uređaj za energijski disperzivnu rendgensku spektroskopiju (EDS)

kojom se određuje elementni sastav uzorka na temelju emitiranog rendgenskog zračenja iz pobuđenog uzorka.

Morfologija čvrstih faza određena je skenirajućim elektronskim mikroskopom s primjenom polja (FE-SEM; mikroskop JEOL JSM-7000F). Za SEM analizu potrebna količina praha stavljena je na držač uzorka prekriven ugljikovim ljepljivom, a višak praha je uklonjen blagim strujanjem plina dušika. EDS analiza provedena je sustavom Eds Inca Energy 350 (Oxford Instruments, High Wycombe, UK) spojenim na FE-SEM. Mjerenja su napravljena u Zavodu za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković.

4.2.3.5 Atomska apsorpcijska spektroskopija

Atomska apsorpcijska spektroskopija (AAS) koristi se za kvalitativno i kvantitativno određivanje elementnog sastava u tekućim ili čvrstim uzorcima, a temelji se na apsorpciji ultraljubičastog i vidljivog zračenja čije frekvencije pobuđuju prijelaze elektrona pri valnim duljinama karakterističnim za pojedini element. Za AAS analizu svi su uzorci otopljeni u otopini HCl(konc.):H₂O u omjeru 1:1. Određivanje sadržaja Mg provedeno je na PerkinElmer Analyst 200 atomskom apsorpcijskom spektrometru. Mjerenja su napravljena u Zavodu za kemiju materijala, Institut Ruđer Bošković.

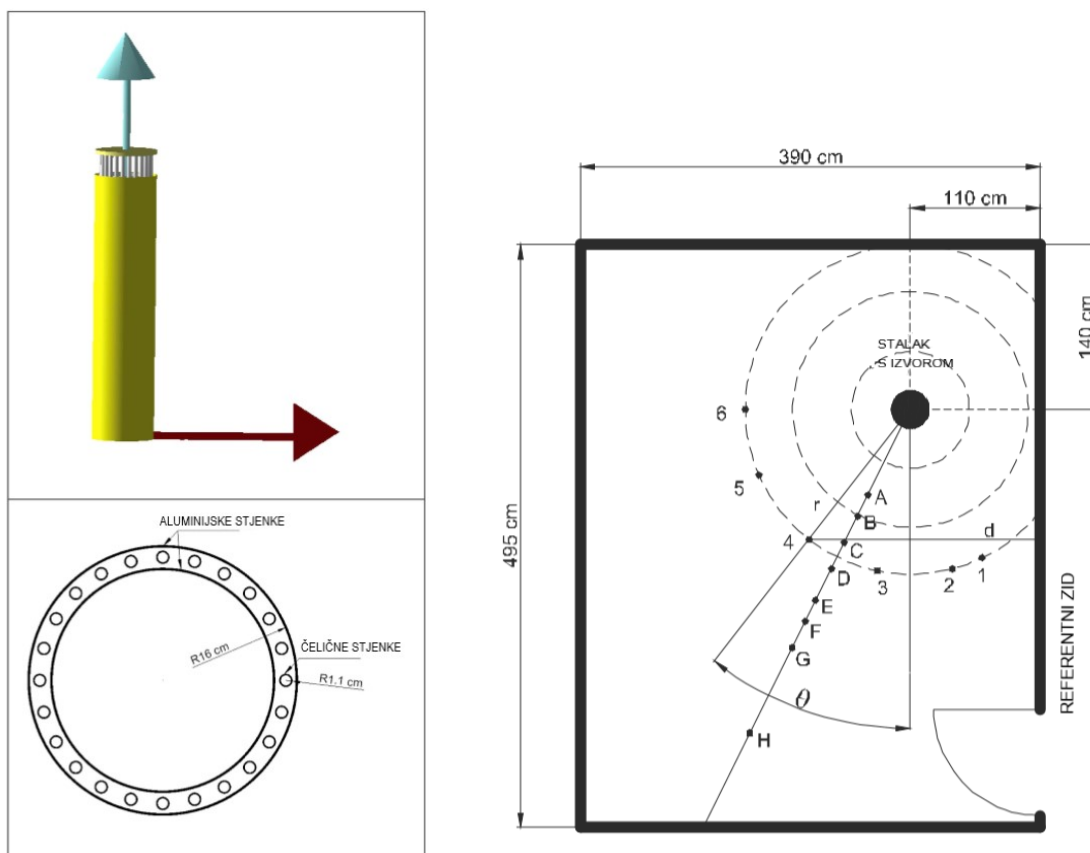
4.3 Metode sterilizacije

4.3.1 Zračenje gama zračenjem

Svi uzorci su ozračeni gama zračenjem u zraku na sobnoj temperaturi korištenjem panoramskog ozračivača s zatvorenim radioaktivnim izvorom Co-60 Zavodu za kemiju materijala Instituta Ruđer Bošković. Cilindrični nosač izvora izrađen od aluminijske debljine je 1 mm i montiran je

na pod komore za ozračivanje. Izgled komore za ozračivanje i nosača izvora s 24 cijevi prikazan je na slici 4.2.

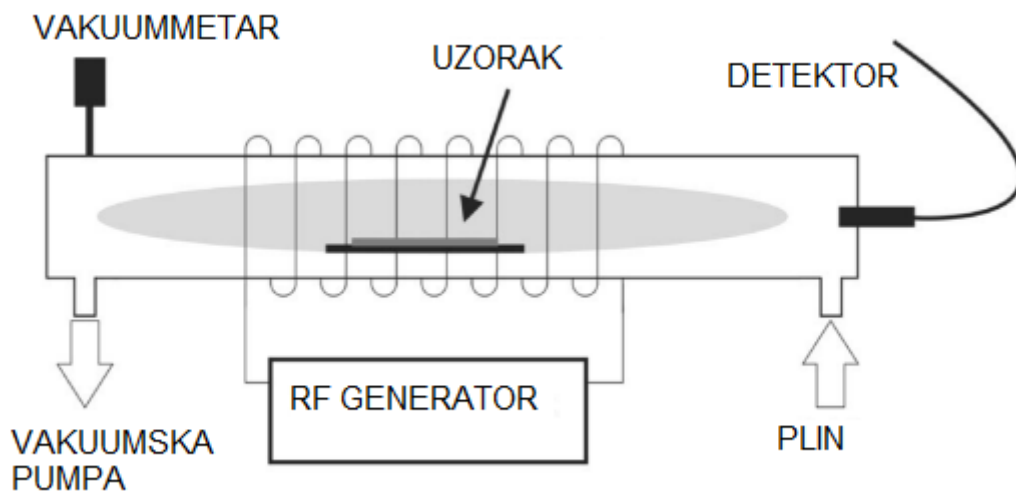
Ukupna doza kojom su ozračeni svi uzorci, iznosila je 25 kGy. Određivanje prostorne raspodjele brzine doze oko panoramskog izvora napravljeno je mjerenjem ionizacijskom komoricom te Monte Carlo simulacijama [130]. Ukupna aktivnost izvora Co-60 na dan 20. veljače 2018. godine iznosila je 2.59 PBq. Tlocrt i model panoramskog izvora prikazani su na slici 4.2.



Slika 4.2: Model i tlocrt panoramskog ozračivača sa zatvorenim radioaktivnim izvorom Co-60. Slika je preuzeta i obrađena iz reference [130].

4.3.2 RF plazma

Za sterilizaciju hladnom plazmom korišteni su uređaji Laboratorija za laserska istraživanja hladne plazme, Instituta za fiziku. Uzorci su tretirani RF plazmom korištenjem plinova Ar, O, i He. Korištena je snaga od 250 W, a uzorci su tretirani s dva različita trajanja i to 60 sekundi i 300 sekundi.



Slika 4.3: Shema eksperimentalnog postava sterilizacije uzoraka korištenjem RF plazme. Slika je preuzeta i obrađena iz reference [131].

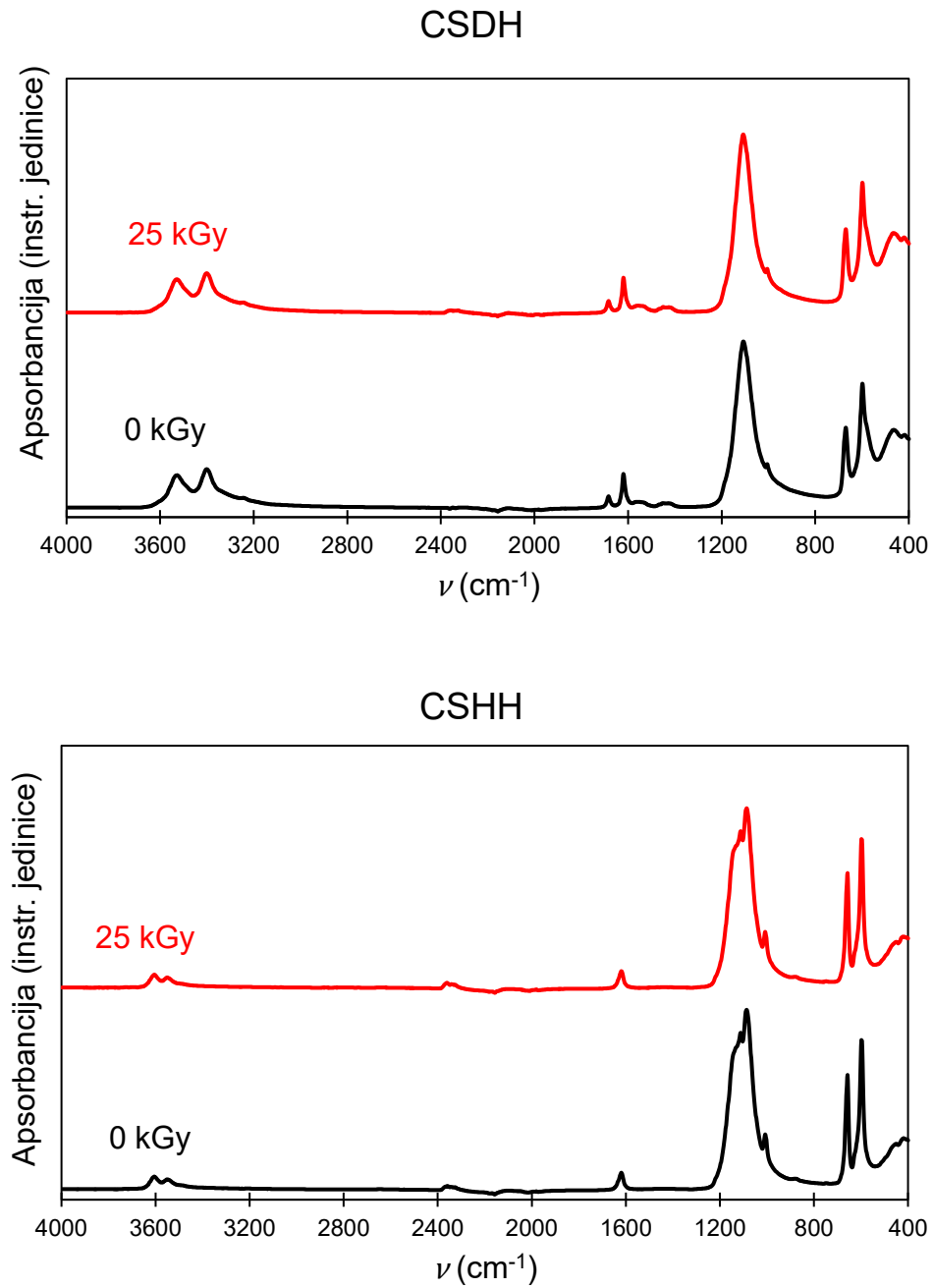
Eksperimenti su izvedeni u posudi za pražnjenje prikazanoj na slici 4.3 [131]. Uzorci su umetnuti u područje tinjajućeg pražnjenja i bili su na plutajućem potencijalu kako bi se spriječilo bilo kakvo dodatno ubrzanje iona i zagrijavanje površine uzorka. Posuda za pražnjenje bila je staklena cijev izrađena od borosilikatnog stakla koje ima vrlo nizak koeficijent rekombinacije za heterogenu površinsku rekombinaciju atoma kisika. Za postizanje vakuuma u komori za pražnjenje, korištena je dvostupanjska rotacijska pumpa, dok je s druge strane kroz ventil propuštani odabrani plin. Plazma tinjajuće pražnjenje stvoreno je induktivno spregnutim RF generatorom s izlaznom snagom od 250 W.

5 REZULTATI I RASPRAVA

5.1 Karakterizacija sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka na bazi kalcijevih sulfata

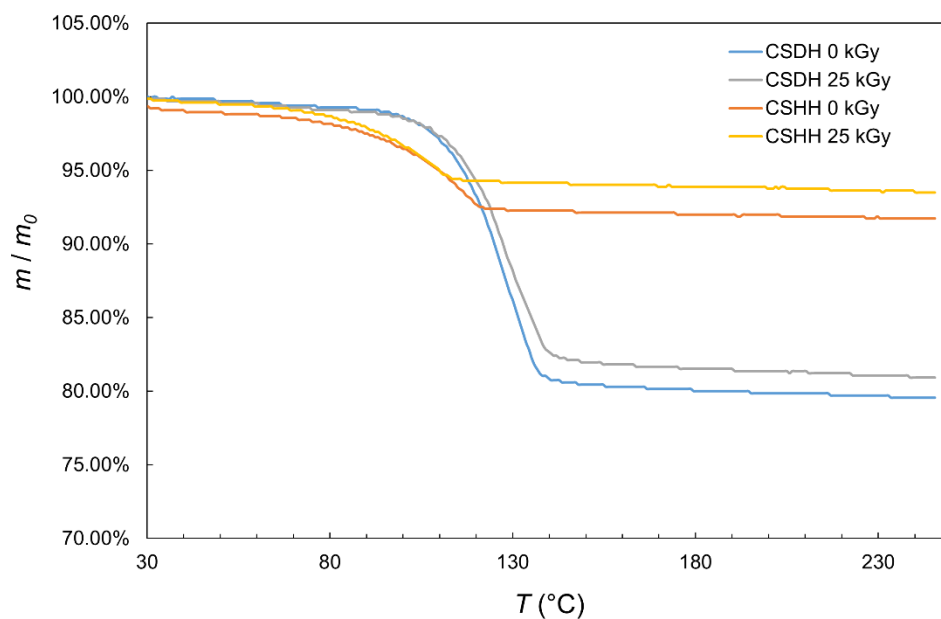
Sastav i struktura kalcijevih sulfata određena je infracrvenom spektroskopijom, termogravimetrijskom analizom te difrakcijom rendgenskih zraka. Uzorci su ozračeni dozom od 25 kGy koja je tzv. „zlatni standard“ za sterilizaciju [132] i stoga nisu očekivana oštećenja na materijalima, no za potvrdu navedenog, provedene su analitičke metode opisane u poglavlju 4.

Na slici 5.1, prikazani su FTIR spektri dobiveni ATR-FTIR metodom koja je korištena za karakterizaciju faza kalcijevog sulfata dihidrata i hemihidrata prije i poslije ozračivanja navedenom dozom. Nakon zračenja nisu uočene značajnije promjene u infracrvenom spektru pojedinih faza. Karakteristične vrpce vibracije O-H skupina u vodi uočene su na 1620 cm^{-1} u slučaju CSHH, te na 1620 cm^{-1} i 1680 cm^{-1} u slučaju CSDH [133]. Također, u obje hidratne faze, u infracrvenom dijelu spektra, prisutne su široke vrpce S-O na 1088 cm^{-1} i 1109 cm^{-1} te uže vrpce na 658 cm^{-1} i 594 cm^{-1} .



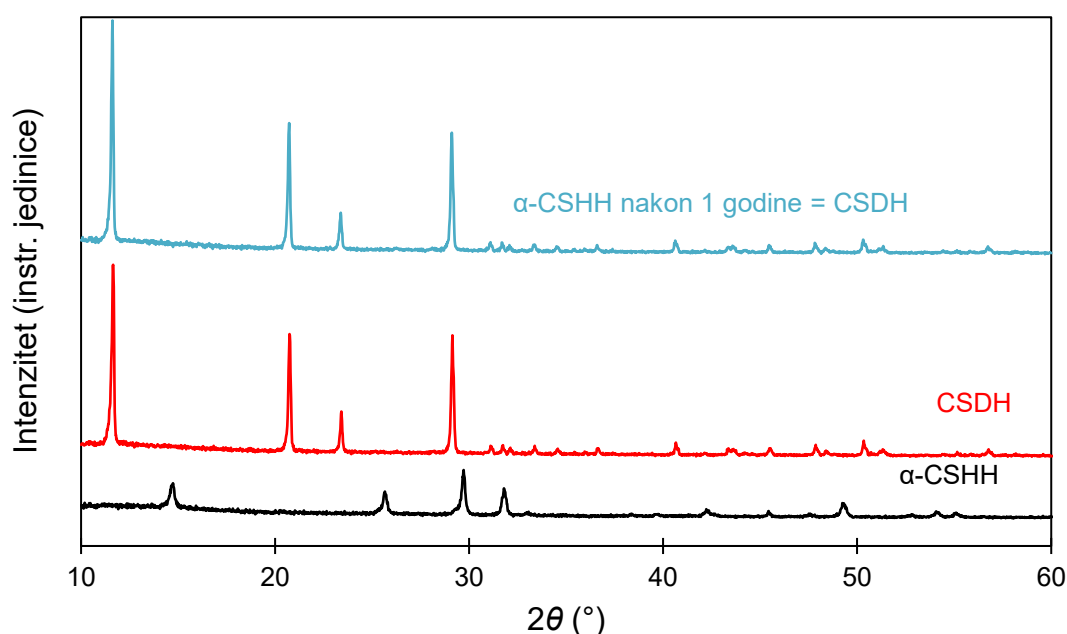
Slika 5.1: ATR-FTIR spektri kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH i kalcijevog sulfata hemihidrata – CSHH prije (0 kGy – crna linija) i nakon gama zračenja (25 kGy – crvena linija)

Na slici 5.2 prikazani su termogrami CSHH i CSDH. Termogravimetrijskom analizom nije uočena značajna promjena nakon gama zračenja. Prije i nakon zračenja, brzina gubitka vode za obje kristalne faze materijala u temperaturnom rasponu od 100 °C do 150 °C bila je slična prilikom brzine zagrijavanja od 5 °C/min. To ukazuje da nema utjecaja gama zračenja na vezivanje vode u tim materijalima pri brzini i dozi koje su korištene u ovoj disertaciji. Prema literaturnim podacima, pri brzini snimanja od 12 °C/min, CSHH prolazi proces dehidracije u jednom koraku, dok CSDH slijedi proces u dva koraka [134]. CSDH prvo gubi 3/2 vode što olakšava njegovu transformaciju u CSHH pri 150 °C, a zatim gubi ostatak vode na 197 °C. Termogram dobiven eksperimentalno u ovom radu za CSDH pokazuje samo jedan široki korak iako se proteže u rasponu koji je veći od raspona za CSHH i pomaknut je na višu temperaturu. Razlika dobivenih termograma i literaturno opisanih posljedica je različitih uvjeta snimanja kao što su atmosfera, brzina zagrijavanja uzoraka i granulacija uzoraka.



Slika 5.2: Termogrami uzoraka kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH i kalcijevog sulfata hemihidrata – CSDH. Prikazane su relativne masene promjene uzoraka kao funkcije temperature prije (0 kGy, plava i narančasta linija) i nakon (25 kGy, siva i žuta linija) gama zračenja.

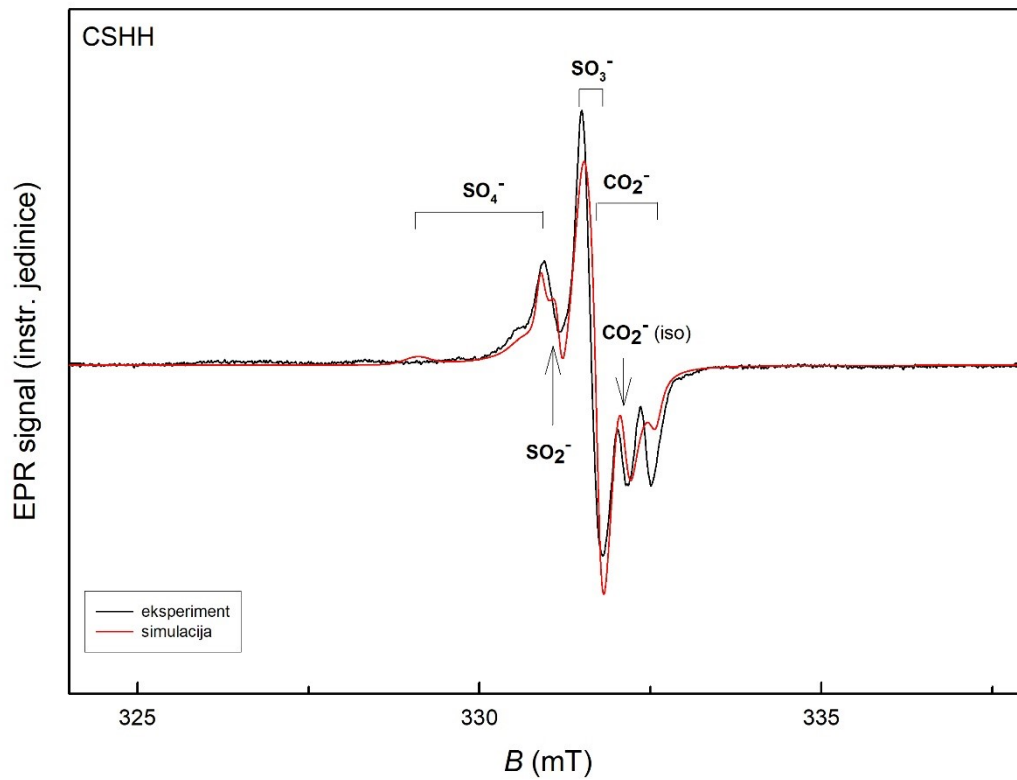
Na slici 5.3, prikazani su PXRD spektri sintetiziranih CSDH i α -CSHH hidrata te α -CSHH nakon jedne godine starenja. Analiza kristalne strukture promatranih hidrata difrakcijom rendgenskih zraka na prahu, potvrdila je da je u uzorcima prisutna samo jedna faza CS. Vremensko ponašanje dvaju hidrata tijekom razdoblja od jedne godine pokazalo je da se uzorak CSHH tijekom vremena transformirao u CSDH, što ukazuje da je CSHH izvorno bio prisutan kao α -CSHH [77]. Za CSDH nije zabilježena vremenska promjena što ukazuje da je to stabilnija faza. Transformacija α -CSHH se svakako mora imati na umu pri skladištenju CSHH gdje je potrebno svesti vlagu na najmanju moguću mjeru.



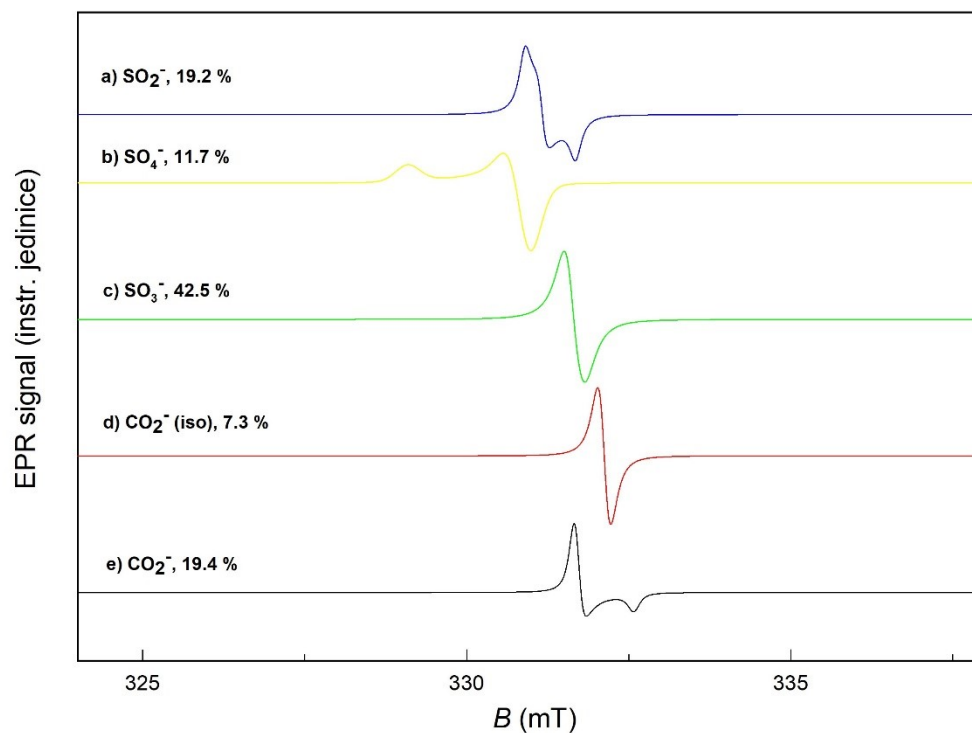
Slika 5.3: PXRD spektara neposredno sintetiziranih uzoraka kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH (crvena linija) i kalcijevog sulfata hemihidrata – α -CSHH (crna linija) te α -CSHH nakon godinu dana koji se transformirao u CSDH (plava linija).

Prije analize utjecaja gama zračenja na koncentraciju radikala u uzorcima na bazi kalcijevih sulfata, napravljena su EPR mjerenja neozračenih uzoraka. Kao što je i bilo očekivano, EPR mjerenjem CSHH i CSDH nije detektiran EPR signal, tj. nisu pronađeni slobodni radikali. Na

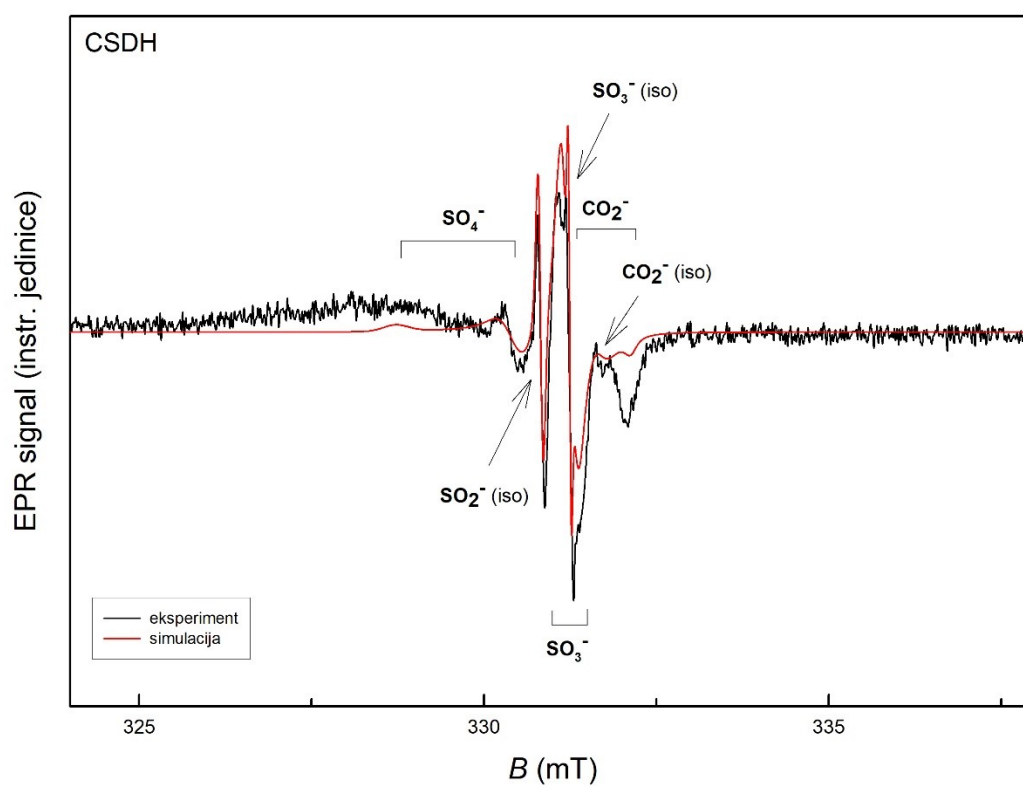
slici 5.4 prikazani su eksperimentalni i simulirani EPR spektri CSHH s označenim radikalima. Na slici 5.6 prikazani su spektri za CSDH. Vidljiva je prisutnost radikala koji su inducirani ionizirajućim zračenjem.



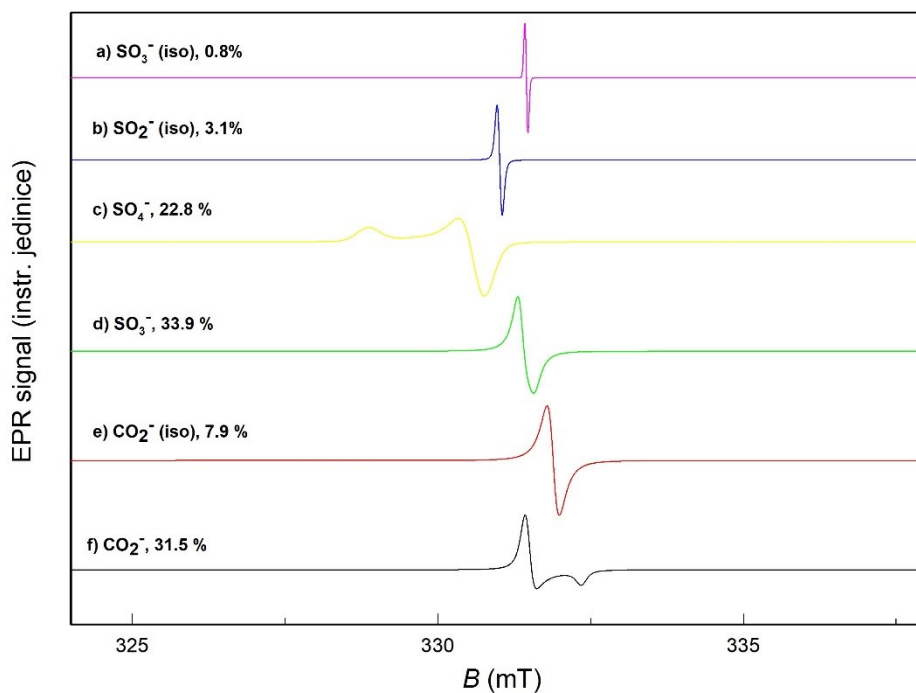
Slika 5.4: Eksperimentalni (crna linija) i simulirani (crvena linija) EPR spektar kalcijevog sulfata hemihidrata – CSHH ozračenog dozom od 25 kGy. Strelicama su označeni radikali inducirani gama zračenjem.



Slika 5.5: Komponente simuliranog spektra CSHH prikazanog na slici 5.5. Radikali s odgovarajućim udjelima su dani redom: a) SO_2^- radikal, b) SO_4^- radikal, c) SO_3^- radikal, d) CO_2^- radikala, d) izotropni CO_2^- radikal.



Slika 5.6 : Eksperimentalni (crna linija) i simulirani (crvena linija) EPR spektar kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH ozračenog dozom od 25 kGy. Strelicama su označeni radikali inducirani gama zračenjem.



Slika 5.7: Komponente simuliranog spektra CSDH prikazanog na slici 5.7. Radikali s odgovarajućim udjelima su dani redom: a) izotropni SO_3^- radikal, b) izotropni SO_2^- radikal, c) SO_4^- radikal, d) SO_3^- radikal, e) izotropni CO_2^- radikal, f) CO_2^- radikal

Korištenjem programskog paketa Easyspin [119] u računalnom programu Matlab (The MathWorks, Inc., Natick, Massachusetts, USA) simulirani su EPR spektri za CSHH i CSDH. Simulacijom su utvrđeni parametri spektara (vrsta radikala i relativni udio) koji su prikazani u tablici 5.1. Navedeni parametri su u skladu s literaturnim podacima (tablica 5.1). Na slikama 5.4 i 5.6 prikazani su simulirani spektri pojedinih radikala u CSHH i CSDH. Ukupni EPR spektri su sume pojedinih komponenata (slike 5.5 i 5.7).

Tablica 5.1: Vrijednosti g -faktora dobivene simulacijom EPR spektara za CSHH i CSDH

Radikal	g_x	g_y	g_z	CSHH*	Relativ- ni udio u CSHH	CSDH*	Relativ- ni udio u CSDH	Referenca
CO_2^-	$g_{\perp}=2.0031$		$g_{\parallel}=1.9978$	+	19.4%	+	31.5%	[11] [13] [107] [135] [136] [137]
CO_2^-		$g_{iso}=2.0006$		+	7.3%	+	7.9%	[11] [135] [136] [137] [138]
SO_3^-	$g_{\perp}=2.0031$		$g_{\parallel}=2.0024$	+	42.5%	+	33.9%	[11] [107] [136] [139]
SO_4^-	$g_{\perp}=2.008$		$g_{\parallel}=2.019$	+	11.7%	+	22.8%	[140]
SO_2^-	n.d.	n.d.	$g_{zz}=2.0063$	+	19.2%	-	-	[141]
SO_2^-		$g_{iso}=2.0058$		-	-	+	3.1%	[11] [13] [107] [140]
SO_3^-		$g_{iso}=2.0033$		-	-	+	0.8%	[11] [13] [107]

* oznake + i - označuju prisutnost ili odsutnost navedenog radikala u uzorku

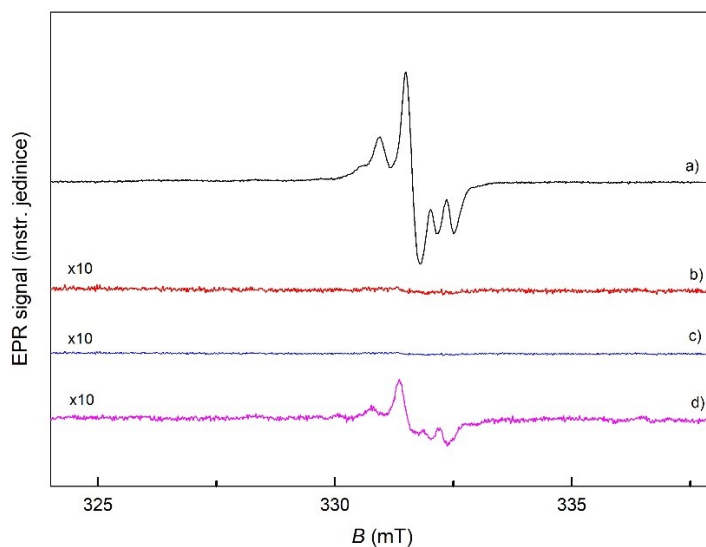
Nepouzdanost je procijenjena prema rezoluciji magnetskog polja korištenog EPR spektrometra odnosno $B(x_i) = B_{\max}/N_{\max}=20.02 \mu\text{T}$, gdje je B_{\max} raspon snimanja, ovdje 0.2 mT, a N_{\max} broj snimljenih točaka za navedeni raspon magnetskog polja, a iznosio je 999. Iz toga proizlazi da je procijenjena nepouzdanost g -vrijednosti na 4. decimali odnosno iznosi $g(x_i)=0.0001$.

EPR spektri ozračenih CSDH i CSHH uzoraka prikazanih na slikama 5.4 i 5.6 mogu se objasniti postojanjem radikala SO_2^- , SO_4^- , SO_3^- , CO_2^- s različitim g -faktorima. Glavni doprinos u spektrima oba uzorka je radikal SO_3^- , koji je aksijalan, s g -faktorima $g_{\perp}=2.0031$ i $g_{\parallel}=2.0024$.

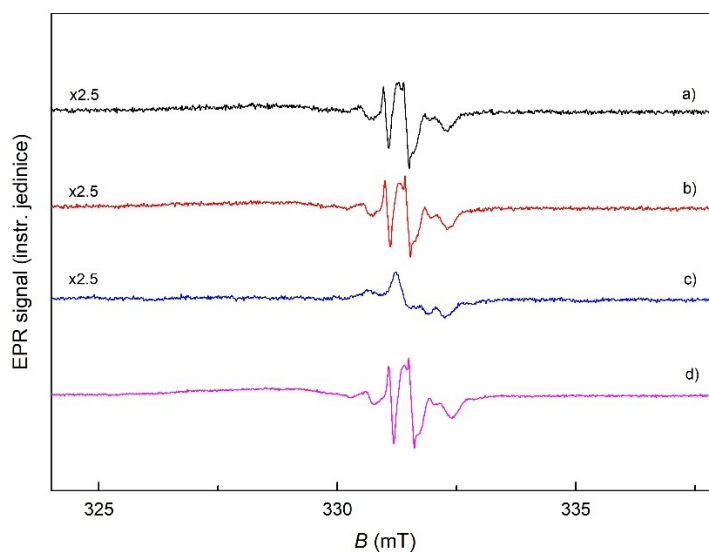
Iz navedenih radikala, vidljivo je da se radikali nalaze u drugačijem okruženju u kristalnim rešetkama CSDH i CSHH. U oba materijala, signal s faktorima $g_{\perp}=2.008$ i $g_{\parallel}=2.019$ pripisan je aksijalnom radikal SO_4^- . Signal na $g_{\perp}=2.0031$ i $g_{\parallel}=1.9978$ pripisan je aksijalnom CO_2^- , dok je signal s $g = 2.0006$ pripisan slobodno rotirajućem radikal CO_2^- . Dobiveni spektri se razlikuju po tome što je, rompski radikal SO_2^- opažen samo u CSHH, dok su izotropni radikali SO_2^- ($g_{iso}=2.0058$) i SO_3^- ($g_{iso}=2.0033$) opaženi samo u spektru CSDH.

5.2 Karakterizacija sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka na bazi kalcijevih sulfata nakon izlaganja modelnim medijima

Na slikama 5.8 i 5.9 prikazani su EPR spektri netretiranih, čistih CSDH i CSHH, te nakon njihovog tretmana fiziološkom otopinom, umjetnom slinom ili kombinacijom oboje.

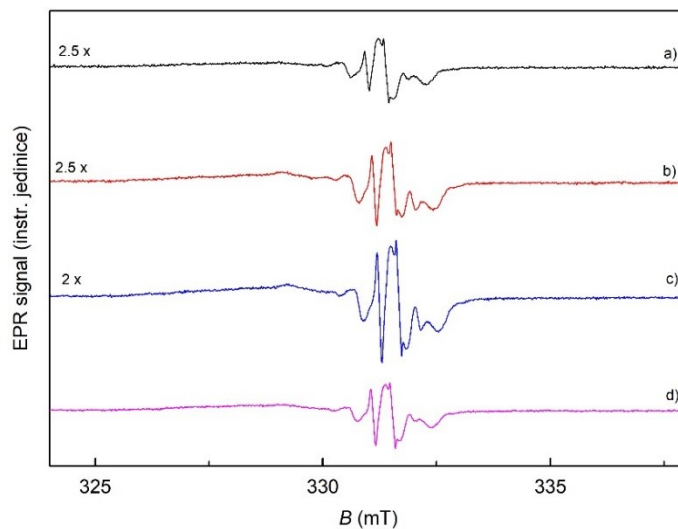


Slika 5.8: EPR signali za a) gama ozračeni CSHH, b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom

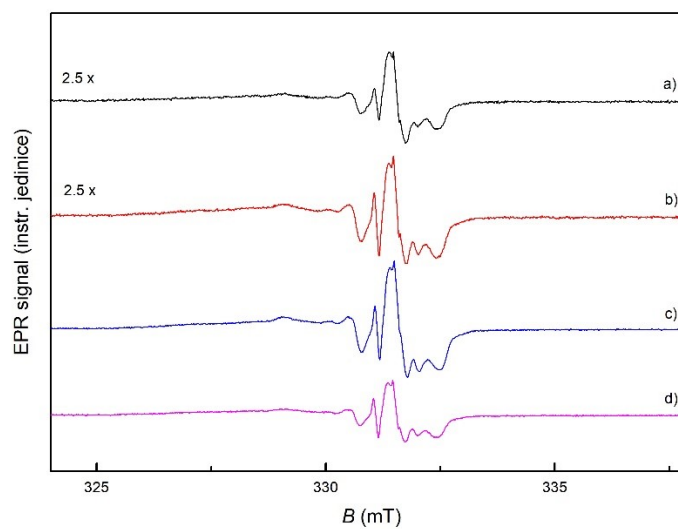


Slika 5.9: EPR signali za a) gama ozračeni kalcijev sulfat dihidrat (CSDH), b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom.

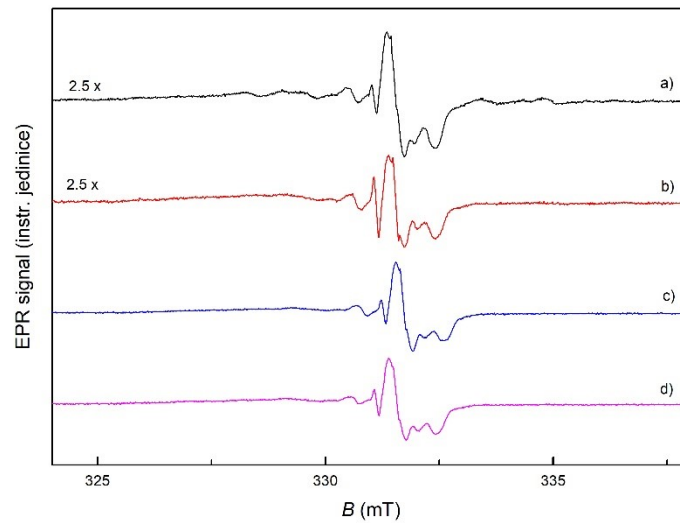
Utjecaj na koncentraciju radikala je izraženiji za CSHH. Također, na slikama 5.10 - 5.12 prikazani su EPR spektri za smjese CSDH i CSHH u odgovarajućim omjerima: 80% CSDH i 20% CSHH (slika 5.10), 60% CSDH i 40% CSHH (slika 5.11), 40% CSDH i 60% CSHH (slika 5.12) te 20% CSDH i 80% CSHH (slika 5.13). Prikazani su ozračeni netretirani uzorci te uzorci tretirani modelnim medijem.



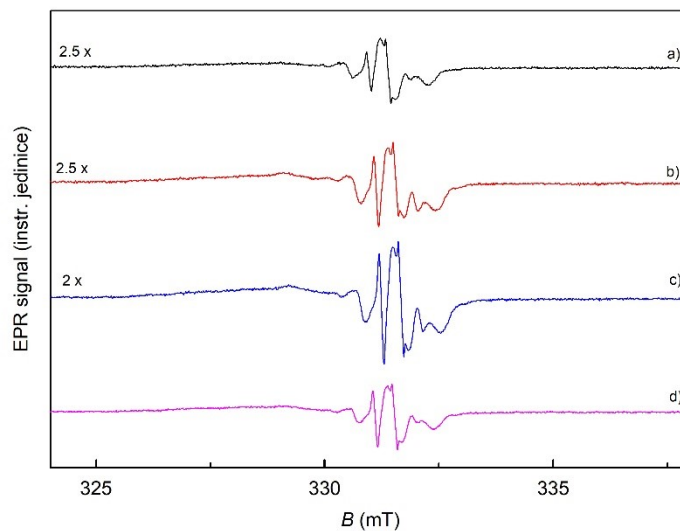
Slika 5.10: EPR signali za a) gama ozračenu mješavinu 80% kalcijevog sulfata dihidrata (CSDH) i 20% kalcijevog sulfata hemihidrata (CSHH), b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom



Slika 5.11: EPR signali za a) gama ozračenu mješavinu 60% kalcijevog sulfata dihidrata (CSDH) i 40% kalcijevog sulfata hemihidrata (CSHH), b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom

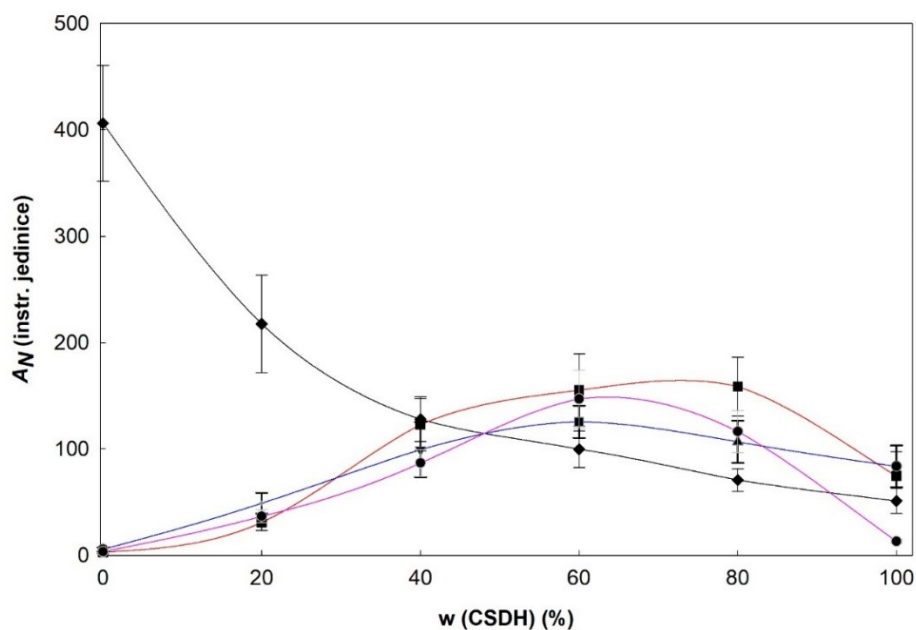


Slika 5.12: EPR signali za a) gama ozračenu mješavinu 40% kalcijevog sulfata dihidrata (CSDH) i 60% kalcijevog sulfata hemihidrata (CSHH), b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom



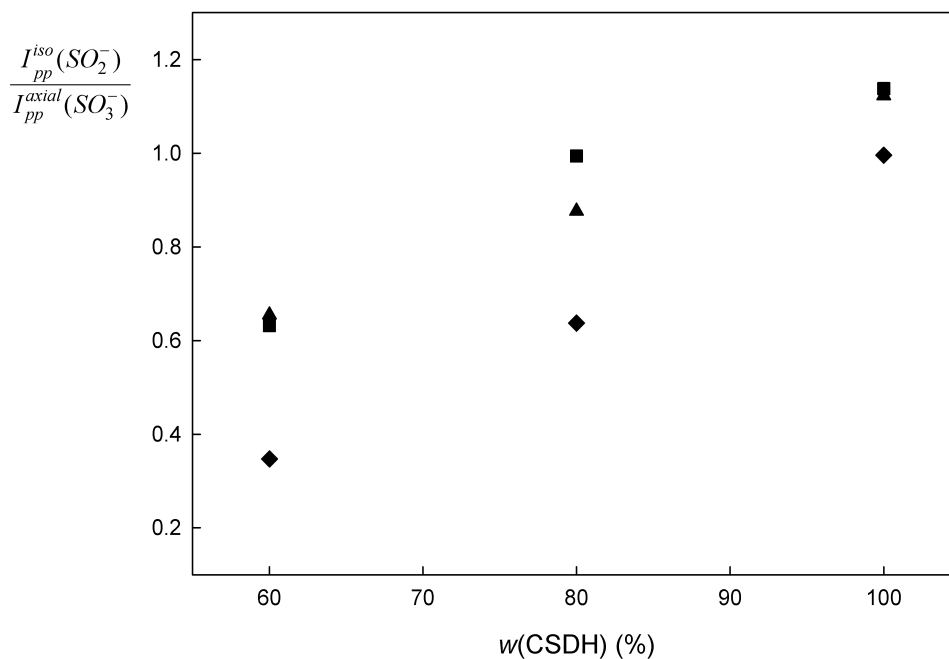
Slika 5.13: EPR signali za a) gama ozračenu mješavinu 20% CSDH i 80% CSHH, b) s dodanom fiziološkom otopinom, c) s dodanom fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, d) s umjetnom slinom

Radi boljeg razumijevanja smanjenja koncentracije radikala u različitim medijima, ukupne koncentracije radikala A_N , određene su iz EPR spektra u različitim smjesama gama ozračenih CSDH i CSHH. Na slici 5.14 prikazane su ukupne koncentracije radikala A_N , kao funkcija masenog udjela CSDH u CSHH, nakon različitih tretmana. Najveća koncentracija radikala, $A_N=406$ instr. jedinica, je zabilježena za čisti CSHH koji je služio kao kontrolni uzorak. Ona se brzo smanjivala s povećanjem udjela CSDH u smjesi. Dodavanjem fiziološke otopine ili umjetne slina, koncentracija radikala u CSHH smanjila se na vrlo niske vrijednosti ($A_N=3-6$ instr. jedinica) i rasla s povećanjem količine CSDH u smjesi. U smjesama u kojima je količina CSDH bila veća od 40%, nakon tretmana medijem, koncentracije radikala bile su veće od koncentracija u netretiranim smjesama. Maksimalne koncentracije radikala izmjerene su u smjesama koje su sadržavale 60 % i 80 % CSDH.



Slika 5.14: Ovisnost koncentracije radikala (A_N) o masenom udjelu kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH u smjesi s kalcijevim sulfatom hemihidratom – CSHH. Dijamant – kontrolni uzorak (netretirani), kvadrat – fiziološka otopina, trokut – umjetna slina, krug – umjetna slina i fiziološka otopina

Kao što se može vidjeti u tablici 5.1, u EPR spektrima CSDH opaženi EPR signali odgovaraju izotropnim komponentama CO_2^- , SO_2^- i SO_3^- , dok EPR spektri CSHH sadrže samo signal jedne izotropne komponente, odnosno CO_2^- . Stoga u uzorcima u kojima je količina CSDH veća od CSHH miješanje s različitim medijima (fiziološka otopina, slina i kombinacija oboje) može utjecati na stupanj pokretljivosti, a time i na dinamiku koja se očituje u EPR spektru promjenom intenziteta linija, a također se odražava u povećanju koncentracije radikala. Kako bi se to potvrdilo, na slici 5.15 prikazan je omjer intenziteta vrha do vrha, I_{pp} , (engl. *peak to peak*), izotropnog SO_2^- i aksijalnog SO_3^- .

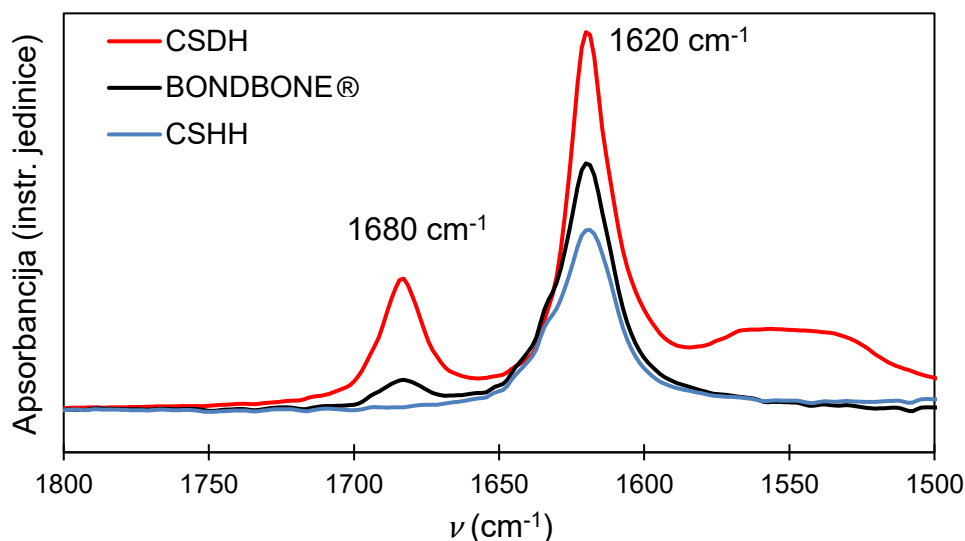


Slika 5.15: Omjer intenziteta vrha do vrha, I_{pp} , (engl. *peak to peak*), izotropnog SO_2^- i aksijalnog SO_3^- u ovisnosti o masenom udjelu kalcijevog sulfata dihidrata CSDH. Dijamant – kontrolni uzorak (netretirani), kvadrat – fiziološka otopina, trokut – umjetna slina.

Omjer raste linearno s povećanjem sadržaja dihidrata, kao i nakon tretmana slinom ili fiziološkom otopinom. Pri višim udjelima CSDH, zabilježeno je smanjenje koncentracije

radikala samo za čisti uzorak (100% CSDH) tretiran fiziološkom otopinom i umjetnom slinom. To se može objasniti većom mogućnošću rekombinacije radikala u vodi, ali i putem fosfatnih i karbonatnih iona u slini zbog veće topljivosti čistog CSDH u otopini najveće ionske jakosti tj. otopine s najvećom koncentracijom iona [142]. Zaključak je da bi količina CSDH trebala biti što manja u komercijalnom proizvodu. PXRD metodom je potvrđena transformacija u CSDH (slika 5.3), što predstavlja praktični problem zbog skladištenja uzoraka.

Također je analiziran komercijalno dostupni uzorak BONDBONE® (Mis-implants), koji je mješavina CSDH i CSHH. BONDBONE® je imao značajno veću koncentraciju radikala od obje komponente ($A_N=1511$ instr. jedinica), ali ga se ne može izravno uspoređivati s drugim uzorcima jer su točan sastav i uvjeti sterilizacije gama zračenjem nepoznati. Nakon tretiranja fiziološkom otopinom i umjetnom slinom, opaženo je smanjenje koncentracije radikala u nizu fiziološka otopina (73,33 %) < fiziološka otopina i umjetna slina (85,14 %) < umjetna slina (87,14 %). Na slici 5.16 prikazan je ATR-FTIR spektar BONDBONE®-a. Iz spektra (slika 5.16) se mogu uočiti obje karakteristične vrpce, na 1620 cm^{-1} i 1680 cm^{-1} . Iz navedenog može se zaključiti da je BONDBONE® mješavina dvaju hidratiziranih oblika kalcijevog sulfata.



Slika 5.16: ATR-FTIR spektri uzoraka kalcijevog sulfata dihidrata – CSDH (crvena linija), kalcijevog sulfata hemihidrata – CSHH (plava linija) i komercijalnog uzorka BONDBONE® (crna linija).

Prema tablici 5.2 gubitak mase BONDBONE®-a je između vrijednosti dobivenih za CCDH i CCHH, što ukazuje daje taj materijal mješavina hidrata CSDH i CDHH. Iz dobivenih podataka za Δm (%) određen je omjer hidratiziranih oblika u BONDBONE®-u koji iznosi 38% CSDH prema 62% CSHH. Taj rezultat je potvrđen mjerenjem i analizom kontrolnog uzorka pripremljenog miješanjem čistog CSDH i CSHH u istom omjeru kao što je određen za BONDBONE®.

Tablica 5.2: Podaci dobiveni termogravimetrijskom analizom

Vrijednosti ¹	CSDH 0 kGy	CSDH 25 kGy	CSHH 0 kGy	CSHH 25 kGy	BOND BONE 25 kGy	Kontrolni uzorak ² 0 kGy	Kontrolni uzorak ² 25 kGy
T_o (°C)	85.7	90.0	57.5	64.0	62.9	59.7	101.9
T_p (°C)	129.0	129.0	116	107.3	122.5	95.4	120.3
T_e (°C)	150.7	157.2	131.2	118.2	133.3	101.9	133.3
Δm (mg)	-1.27	-1.15	-0.50	-0.38	-0.68	-0.21	-0.47
Δm (%)	-18.81	-18.67	-5.19	-5.07	-10.20	-3.23	-7.22

¹ T_o , T_p i T_e označuju redom početnu, vršnu i krajnju temperaturu, dok Δm označuje promjenu mase

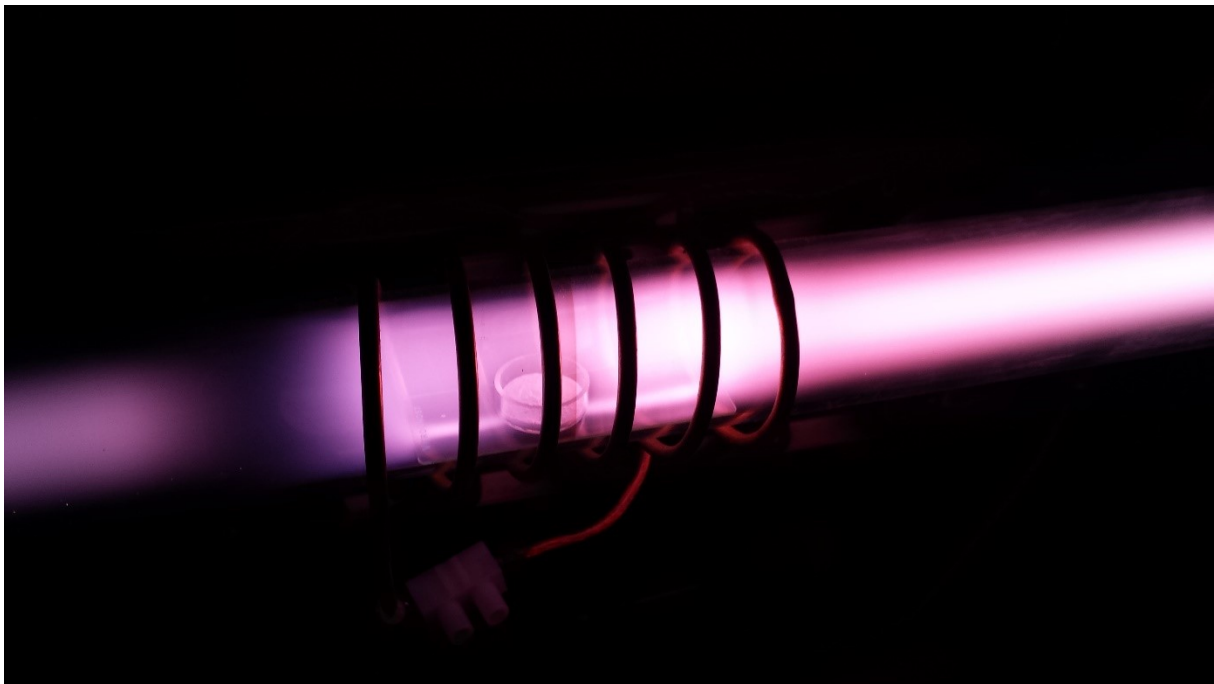
² Nakon što je dobiven maseni omjer CSHH i CSDH u komercijalnom uzorku BONDBONE®, pripremljen je isti maseni omjer mješavine koji je mjeren kao kontrolni uzorak

Zaključno, EPR analizom je pokazano da fiziološka otopina i umjetna slina imaju značajan utjecaj na koncentracije radikala u oba hidrata, korištenih pojedinačno ili u smjesi. Najveće smanjenje koncentracije radikala zabilježeno je za CSHH nakon miješanja s fiziološkom otopinom ili umjetnom slinom, dok je CSDH održavao relativno visoku koncentraciju radikala. Ovime se pokazuje da se sigurnost upotrebe komercijalnog proizvoda može povećati smanjenjem količina stabilnijeg CSDH u smjesi. Stoga se prema ovim rezultatima kvaliteta

materijala na bazi gama steriliziranog kalcijevog sulfata može poboljšati prilagođavanjem njihovog sastava kako bi se smanjio broj radikala nastalih zračenjem, na način da imaju manji udio CSDH u konačnom proizvodu.

5.3 Karakterizacija kalcijevih sulfata steriliziranih plazmom

Uz sterilizaciju ionizirajućim zračenjem koja je poznata i etablirana metoda, u ovom radu je razmatrana i opcija sterilizacije RF plazmom. Sterilizacija plazmom se pokazala učinkovitom metodom za inaktivaciju bakterija i mikroorganizama u različitim materijalima [131], [143-149].



Slika 5.17: Sterilizacija uzoraka RF plazmom

Uzorci su tretirani RF plazmom koristeći plinove Ar, He i O₂. Na slici 5.17 prikazan je proces sterilizacije plazmom. U svim razmatranim slučajevima, RF plazma se pokazala kao neprimjerena metoda za promatrane materijale. Za vrijeme tretiranja, došlo je do gorenja

uzoraka te do makroskopskih promjena uzoraka (slika 5.18), stoga nije provedena daljnja analiza metodama opisanim u poglavlju 4.



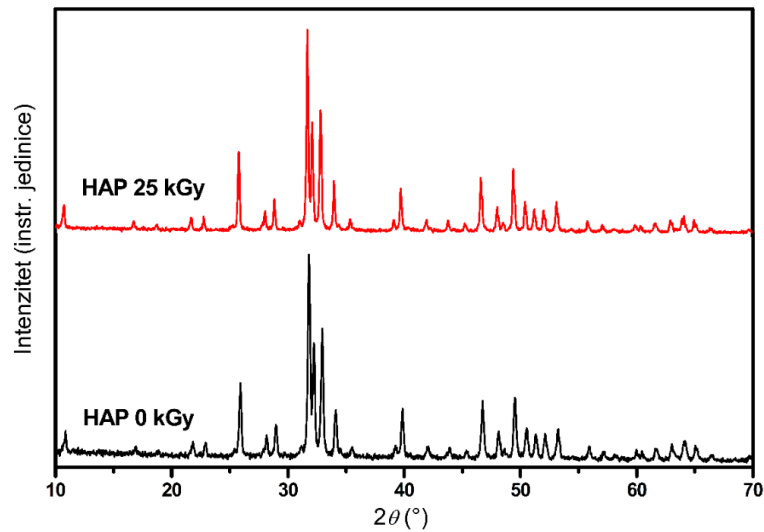
Slika 5.18: Usporedba netretiranog uzorka i uzorka tretiranog RF plazmom

5.4 Karakterizacija sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka na bazi kalcijevih fosfata

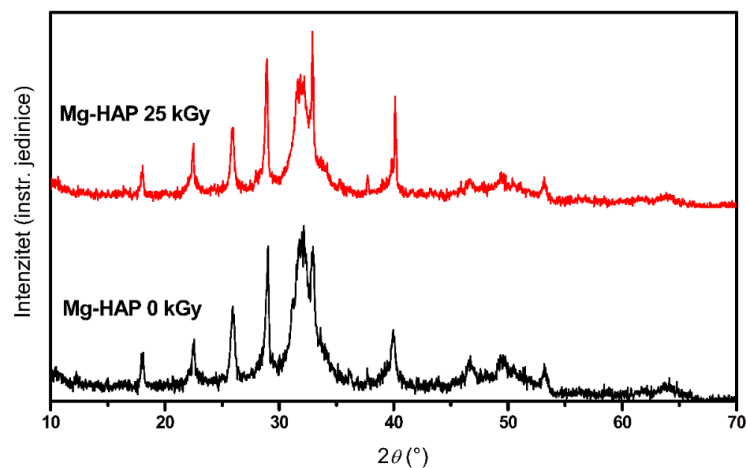
Uz EPR metodu, za karakterizaciju materijala na bazi hidroksiapatita (HAP), korištena je difrakcija rendgenskih zraka na polikristalnom uzorku (PXR), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) i pretražna elektronska mikroskopija (SEM).

Na slikama 5.19 i 5.20 prikazani su spektri neozračenih uzoraka i uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) i Mg supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP). PXR spektar (slika 5.19) nedopiranog HAP-a sadrži niz oštih difrakcijskih maksimuma, što ukazuje na dobru kristaliničnost. Najintenzivniji maksimumi na 2θ su: 10.86° , 25.91° , 31.81° , 32.25° i 32.95° te odgovaraju

(100), (002), (211), (112) i (300) refleksijama HAP-a (JCPDS 09-0432), a prikazani su u tablici 5.3.



Slika 5.19: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) za neozračeni uzorak i uzorak ozračen dozom od 25 kGy.



Slika 5.20: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za Mg supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) za neozračeni uzorak i uzorak ozračen dozom od 25 kGy.

Tablica 5.3: Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u uzorcima hidroksiapatita (HAP) prikazanih za netretirani uzorak, uzorak ozračen dozom od 25 kGy te za uzorke tretirane 1 do 28 dana na temperaturi od 37 °C, korigiranom simuliranom tjelesnom tekućinom (c-SBF) i fiziološkom otopinom.

Millerovi indeksi pojedinih Braggovih ravnina*	2θ (°)							
	HAP		c-SBF			Fiziološka otopina		
	netretirani uzorak	ozračeni uzorak (25 kGy)	1d	14d	28d	1d	14d	28d
100	10.86	10.76	10.86	10.86	10.81	10.80	10.89	10.90
				13.67	13.47		13.72	13.67
101	16.9	16.76	16.87	16.89	16.8	16.83	16.91	16.86
110	18.86	18.82	18.86	19.32	18.79	18.74		
200	21.83	21.71	21.82	21.87	21.74	21.73	21.81	21.78
111	22.9	22.77	22.88	22.95	22.82	22.83	22.94	22.85
002	25.91	25.79	25.90	25.97	25.85	25.85	25.95	25.91
102	28.18	28.05	28.12	28.19	28.11	28.10	28.20	28.13
210	28.97	28.84	28.93	29.02	28.91	28.89	28.98	28.97
	31.17	31.02	31.14	31.19		31.20		
211	31.81	31.69	31.78	31.85	31.75	31.74	31.82	31.80
112	32.25	32.11	32.2	32.27	32.17	32.16	32.25	32.21
300	32.95	32.83	32.96	23.99	32.89	32.88	32.97	32.94
202	34.11	33.99	34.07	34.13	34.05	34.03	34.12	34.08
311	35.51	35.86	35.49	35.52	35.42	35.45	35.51	35.46
212	39.24	39.11	39.22	39.25	39.2	39.20	39.20	39.24
310	39.85	39.72	39.82	39.89	39.78	39.77	39.86	39.84
311	42.07	41.93	42.01	42.08	41.95	41.95	42.05	42.00
113	43.95	43.79	43.90	43.87	43.83	43.82	43.92	43.92
203	45.34	45.23	45.43	45.46	45.43	45.35	45.49	45.46
222	46.75	46.61	46.70	46.78	46.68	46.66	46.76	46.71
312	48.12	48.00	48.09	48.16	48.07	48.06	48.14	48.11
320	48.63	48.52	48.58	48.60	48.58	48.57	48.63	48.67
213	49.53	49.40	49.51	49.56	49.45	49.44	49.54	49.51
321	50.54	50.42	50.50	50.58	50.46	50.45	50.53	50.51
410	51.31	51.19	51.31	51.35	51.25	51.25	51.31	51.28
402, 303	52.13	52.01	52.11	52.15	52.07	52.06	52.16	52.09
004, 411	53.24	53.11	53.21	53.26	53.17	53.16	53.25	53.23
322, 223	55.93	55.79	55.90	55.98	55.84	55.82	55.92	55.99
313	57.13	57.05	57.16	57.14	57.09	57.07	56.53	57.14
420	59.98	59.98	59.96	59.99	59.89	59.92	60.01	59.99

REZULTATI I RASPRAVA

214, 421	61.61	61.62	61.77	61.69	61.62	61.37	64.74	61.68
405	63.02	62.92	62.98	63.09	62.97	62.94	63.04	63.03
304, 323	64.15	64.09	64.03	64.09	64.12	64.12	64.20	64.18
511	65.05	64.94	65.02	65.1	65.01	64.99	65.03	65.05
422	66.45	66.26	66.36	66.39	66.39	66.39	66.41	66.39

*prazne kućice u tablici se odnose na neassignirane maksimume

Difraktogram praha Mg-HAP sadrži maksimume karakteristične za HAP (slika 5.19), najintenzivnije na 2θ od 25.90° , 29.01° , 31.19° , 32.17° , 32.95° što odgovara (002), (210), (211), (112) refleksijama HAP-a (tablica 5.4, JCPDS 09-0432). Maksimumi su prošireni u usporedbi s nesupstituiranim HAP-om (slike 5.19 i 5.20), što je u skladu s literaturnim podacima [106], [150-152], a posebno je izraženo za difrakcijske maksimume u 2θ području od 30° do 35° . Dodatno, nekoliko HAP maksimuma niskog intenziteta nije opaženo. Osim slabije kristaliničnosti, to ukazuje na stvaranje apatitne faze [152-154]. Osim difrakcijskih maksimuma HAP-a, opažen je i maksimum niskog intenziteta na 2θ od 37.71° karakterističan za $\text{Mg}(\text{OH})_2$ [155], [156]. Opažene razlike u difraktogramima ozračenih i neozračenih uzoraka Mg-HAP mogu se pripisati nehomogenosti uzorka i manje uređenoj strukturi u odnosu na HAP.

Tablica 5.4: Asignacija opaženih difrakcijskih maksimuma u uzorcima Mg supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) prikazanih za netretirani uzorak, uzorak ozračen dozom od 25 kGy te za uzorke tretirane 1 do 28 dana na temperaturi od 37°C , korigiranom simuliranom tjelesnom tekućinom (c-SBF) i fiziološkom otopinom.

Millerovi indeksi pojedinih Braggovih ravnina*	2θ ($^\circ$)							
	Mg-HAP		c-SBF			Fiziološka otopina		
	netretirani uzorak	ozračeni uzorak (25kGy)	1d	PXRD maksimumi	netretirani uzorak	ozračeni uzorak (25kGy)	1d	PXRD maksimumi
				12.14- 15.18			12.06- 14.49	12.47- 15.18
HAP (110)	18.1	18.04						

REZULTATI I RASPRAVA

HAP (111)	22.54	22.49						
HAP (002)	25.90	25.94	25.90	25.86	25.87	25.83	25.86	25.97
				27.34			27.43	27.41
HAP (210)	29.01	28.91	28.32					
HAP (211)	31.19	31.84	31.77	31.70	31.63	31.71	31.74	31.75
HAP (112)	32.17	32.89						
MgOH ₂	37.71	37.74						
HAP (310)	39.96	39.85						
HAP (203)				45.42	45.39	45.44	45,46	45.45
HAP (222)	46.73	46.6	46.71	46.70	46.66	46.58	46.67	46.62
HAP (213)	49.34	49.43	49.4	49.56	49.79	49.52	49.47	49.46
HAP (004)	53.17	53.17	53.07	53.17	53.14.	53.07	53.19	53.31
HAP				56.48			56.5	56.48

*prazne kućice u tablici se odnose na neassignirane maksimume

U FTIR spektrima (slike 5.21 i 5.22) uočene su vibracijske vrpce fosfatnih i hidroksilnih skupina karakteristične za HAP (tablica 5.5). Vibracije fosfatnih skupina opažene su na 1087 cm⁻¹ i 1024 cm⁻¹ što odgovara ν_{3a} i ν_{3c} trostruko degeneriranom asimetričnom načinu istezanja veza P-O, odnosno 963 cm⁻¹ što odgovara ν_1 , nedegeneriranom simetričnom načinu istezanja P-O veza, 599 cm⁻¹, 564 cm⁻¹ što odgovara ν_{4a} i ν_{4c} trostruko degeneriranom načinu savijanja O-P-O veza, odnosno na 474 cm⁻¹ ν_{2a} dvostruko degeneriranom načinu savijanja O-P-O veze

[157]. Uočene su dvije vrpce karakteristične za vibraciju hidroksilne skupine, pri 3573 cm^{-1} ν_s što odgovara istežanju i pri 629 cm^{-1} što odgovara vibracijskom modu hidroksilne skupine [157].

Tablica 5.5: Asignacija opaženih vibracijskih vrpca u FTIR spektrima uzorcima hidroksiapatita (HAP). Prikazane su za netretirani uzorak, uzorak ozračen dozom od 25 kGy te za uzorke tretirane 1 do 28 dana na temperaturi od $37\text{ }^\circ\text{C}$, korigiranom simuliranom tjelesnom tekućinom (c-SBF) i fiziološkom otopinom.

Asignirana vrpca	$\nu\text{ (cm}^{-1}\text{)}$							
	HAP		c-SBF			Fiziološka otopina		
	netretirani uzorak	ozračeni uzorak (25kGy)	1d	14d	28d	1d	14d	28d
OH^-	3573	3573	3573	3573	3573	3573	3573	3573
$\text{PO}_4^{3-}\nu_{3a}$	1087	1087	1087	1087	1087	1087	1087	1087
$\text{PO}_4^{3-}\nu_{3c}$	1024	1026	1028	1024	1027	1024	1024	1024
$\text{PO}_4^{3-}\nu_1$	963	963	963	963	963	963	963	963
OH^-	629	630	630	629	630	630	629	630
$\text{PO}_4^{3-}\nu_{4a}$	599	599	599	599	599	599	599	599
$\text{PO}_4^{3-}\nu_{4c}$	564	565	566	562	565	564	564	562
$\text{PO}_4^{3-}\nu_{2b}$	474	474	473	473	473	474	474	474

Uz vrpce karakteristične za vibracije fosfatne grupe i molekule vode uočene u FTIR spektru nesupstituiranog HAP-a (slika 5.21), u FTIR spektru Mg-HAP (slika 5.22) opažene su vrpce karakteristične za vibracije H_2O na $3564 - 3000\text{ cm}^{-1}$ i 1633 cm^{-1} , CO_3^{2-} vrpce na 1426 cm^{-1} ,

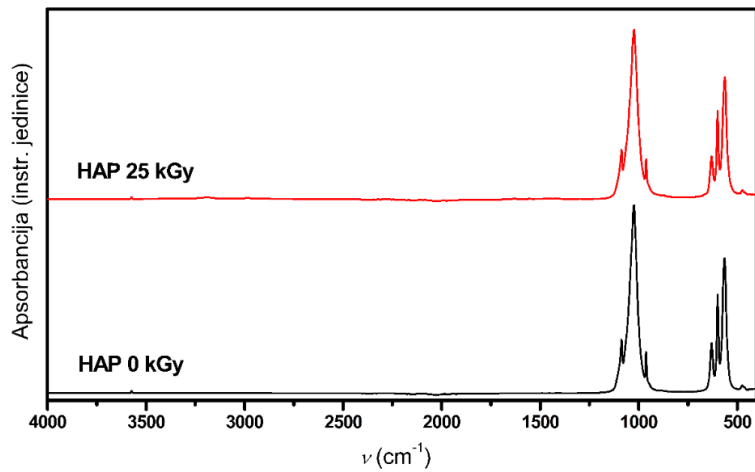
REZULTATI I RASPRAVA

1321 cm^{-1} i 873 cm^{-1} [106], [155], $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ vrpce na 828 cm^{-1} i vrpce na 715 cm^{-1} (slika 5.21 i 5.22). Prisutnost vrpce vibracije vode, u području 3564 – 3000 cm^{-1} , ukazuje na veći afinitet površine Mg-HAP za vezanje molekula vode [158]. Osim toga, izgubljena je hiperfina struktura fosfatnih vrpce u području 1134 – 914 cm^{-1} , što također ukazuje na manju kristaliničnost Mg-HAP-a u usporedbi s HAP-om.

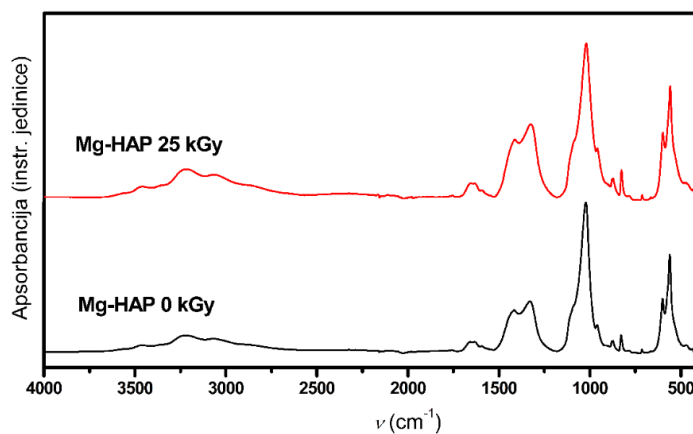
Tablica 5.6: Asignacija opaženih vibracijskih vrpce u FTIR spektrima uzorcima Mg supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP). Prikazane su za netretirani uzorak, uzorak ozračen dozom od 25 kGy te za uzorke tretirane 1 do 28 dana na temperaturi od 37 °C, korigiranom simuliranom tjelesnom tekućinom (c-SBF) i fiziološkom otopinom.

Asignirane vrpce*	ν (cm^{-1})							
	Mg-HAP		c-SBF			Fiziološka otopina		
	netretirani uzorak	ozračeni uzorak (25kGy)	1d	14d	28d	1d	14d	28d
H_2O	3564 - 3000	3560 - 2812						
H_2O	1633	1633						
CO_3^{2-}	1417	1416	1448	1451	1450	1447	1448	1449
CO_3^{2-}	1329	1326	1418	1417	1417	1418	1417	1417
$\text{PO}_4^{3-} \nu_{3a}$	1092	1086	1107	1098	1104	1100	1090	1104
$\text{PO}_4^{3-} \nu_{3c}$	1022	1021	1022	1020	1020	1022	1020	1022
$\text{PO}_4^{3-} \nu_1$	961	961	961	961	961	961	961	961
CO_3^{2-}	873	873	873	873	873	874	873	873
	828	828						
$\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$	715	715						
$\text{PO}_4^{3-} \nu_{4a}$	601	600	601	600	601	601	600	601
$\text{PO}_4^{3-} \nu_{4c}$	561	561	561	560	560	561	560	561
$\text{PO}_4^{3-} \nu_{2b}$	472	473	470	471	471	465	471	471

*prazne kućice u tablici se odnose na neasignirane vrpce



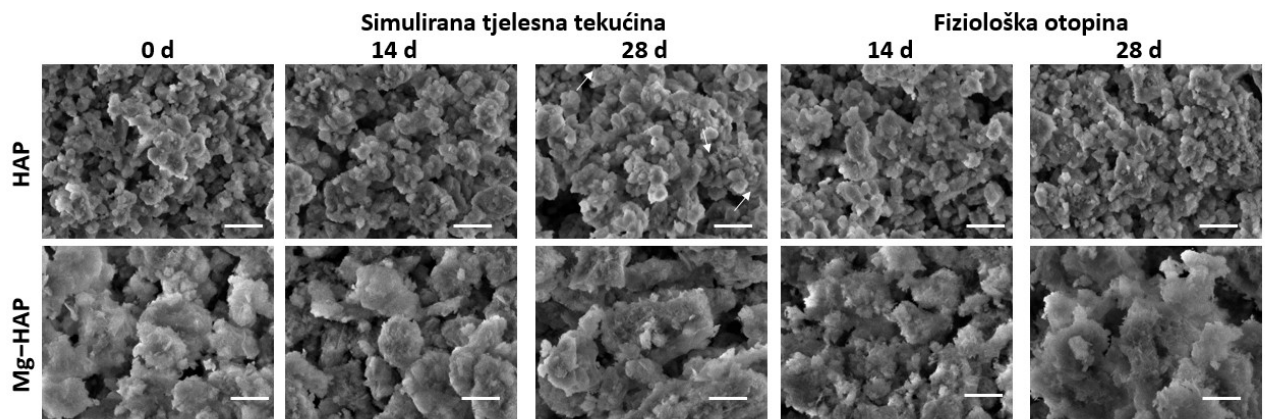
Slika 5.21: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) za neozračeni uzorak i uzorak ozračen dozom od 25 kGy.



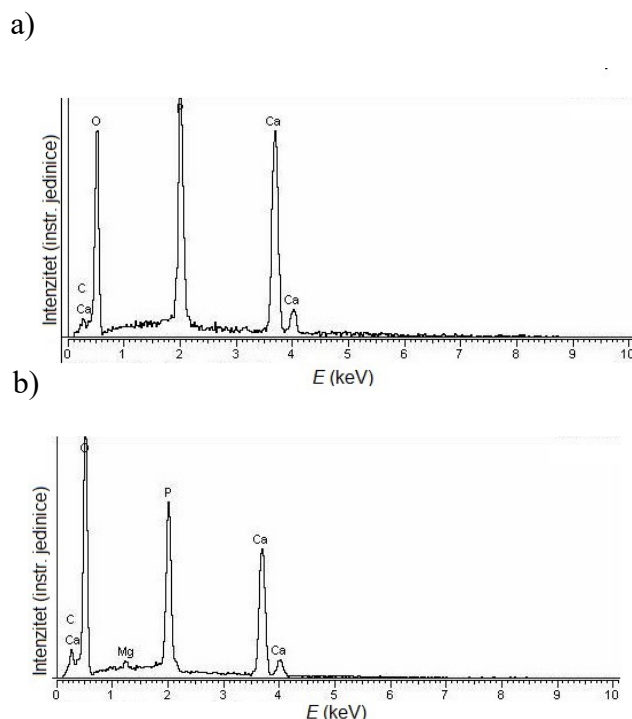
Slika 5.22: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za Mg supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) za neozračeni uzorak i uzorak ozračen dozom od 25 kGy.

Kao što se i očekivalo, nije otkrivena nikakva značajna promjena u strukturi i sastavu oba uzorka nakon ozračivanja, kao što je prikazano u PXRD difraktogramima i FTIR spektrima (slike 5.19-5.22 i tablice 5.3-5.6).

SEM mikrografije pokazuju da je HAP nastao u obliku nepravilnih prizmatičnih kristala (slika 5.23). EDS analiza potvrdila je prisutnost Ca, P i O (slika 5.24a), dok je SEM mikrografijom otkriveno stvaranje agregiranih kristala poput lista (slika 5.23). EDS spektri potvrđuju prisutnost magnezija u materijalu (slika 5.24b). Sadržaj Mg u uzorku bio je 0.25 % utvrđen atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS).



Slika 5.23: SEM slike: nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) i Mg-supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) nakon uranjanja u c-SBF i fiziološku otopinu tijekom 14 - 28 dana pri temperaturi od 37 °C.

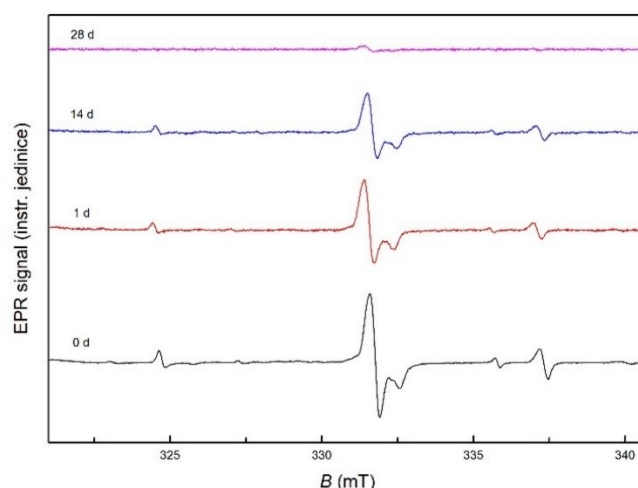


Slika 5.24: EDS analiza: a) hidroksiapatita (HAP) i b) Mg-supstituiranog HAP-a

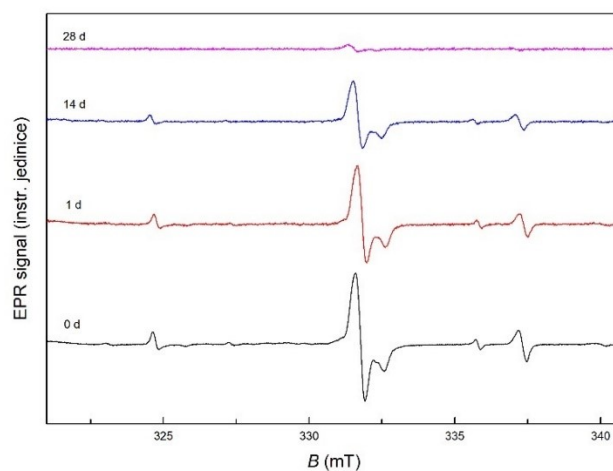
EPR spektri neozračenog hidroksiapatita (HAP) i Mg-supstituiranog HAP-a nisu pokazivali signal, što je potvrdilo čistoću sinteze i odsutnost metala i iona u tragovima u navedenim uzorcima. EPR spektri nesupstituiranog HAP i Mg-supstituiranog HAP ozračenog do 25 kGy prikazani su na slikama 5.25 - 5.28. Dva dominantna signala opažena u EPR spektrima oba uzorka pripisana su radikalima CO_2^- i NO_3^{2-} . Radikal CO_2^- najvjerojatnije je ugrađen tijekom sinteze provedene u prisutnosti zraka [159], [160]. g -vrijednosti CO_2^- signala nesupstituiranog HAP-a i Mg-supstituiranog HAP-a razlikuju se unutar nepouzdanosti mjerenja i iznose $g_x = 2.0035 \pm 0.0002$, $g_z = 2.0015 \pm 0.0002$ i $g_y = 1.9976 \pm 0.0002$, što je u skladu s prethodnim EPR studijama koje su istraživale slobodne radikale i defektima u kalcijevim fosfatima, kostima i zubnoj caklini [4], [14], [107], [160-162]. Nepouzdanost g -vrijednosti povezana je s rezolucijom magnetskog polja koja je opisana u poglavlju 5.1. Također, radikal NO_3^{2-} je vjerojatno ugrađen tijekom sinteze i to prvenstveno u nesupstituirani HAP. Njegove g -

vrijednosti bile su: $g_x = g_y = 2.0057 \pm 0.0002$ i $g_z = 2.0017 \pm 0.0002$, u skladu s već objavljenim vrijednostima [163], [164].

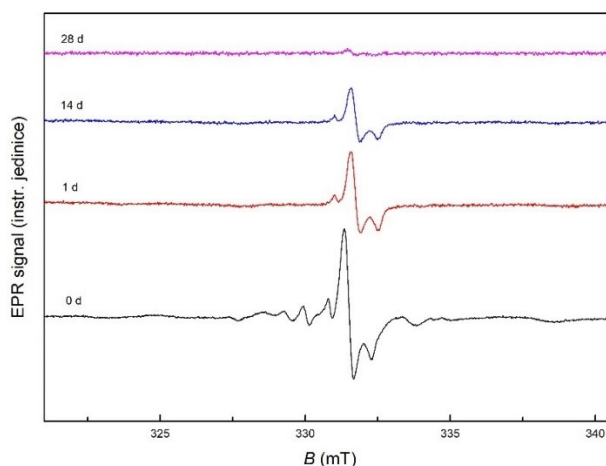
Osim ta dva signala, u EPR spektrima Mg-supstituiranog HAP-a uočeni su dodatni signali, u odnosu na nesupstituirani HAP, različitog intenziteta u području magnetskog polja od 328.67 mT do 331.01 mT, što odgovara rasponu g -vrijednosti od 2.0199 do 2.0056. Manjak istraživanja EPR spektroskopijom Mg supstituiranog HAP otežava usporedbu i identifikaciju radikala induciranih gama zračenjem. Izmjereni EPR spektar Mg-supstituiranog HAP-a pokazao se sličnim onom hidroksiapatita iz goveđe kosti [164].



Slika 5.25: EPR spektri ozračenog (25 kGy) nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) prije (crna linija) i nakon uranjanja u simuliranu tjelesnu tekućinu tijekom: 1 dana (crvena linija), 14 dana (plava linija) i 28 dana (ljubičasta linija) pri temperaturi od 37 °C. EPR signal je normiran na masu i pojačanje EPR instrumenta te zbog toga dolazi do vizualne razlike u omjeru signala i šuma između pojedinih spektara.

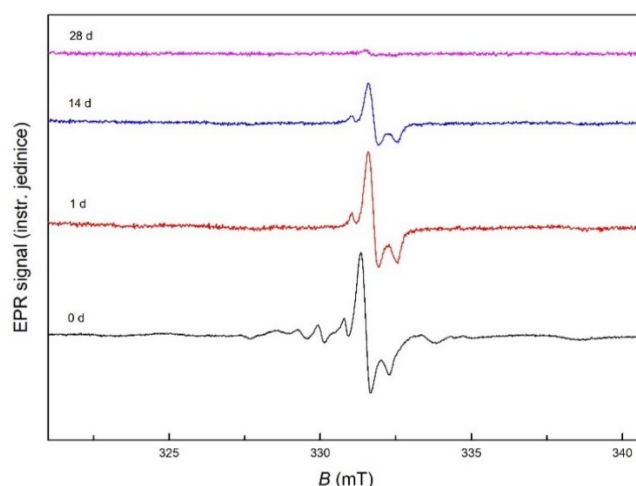


Slika 5.26: EPR spektri ozračenog (25 kGy) nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) prije (crna linija) i nakon uranjanja u fiziološku otopinu tijekom: 1 dana (crvena linija), 14 dana (plava linija) i 28 dana (ljubičasta linija) pri temperaturi od 37 °C. EPR signal je normiran na masu i pojačanje EPR instrumenta te zbog toga dolazi do vizualne razlike u omjeru signala i šuma između pojedinih spektara.



Slika 5.27: EPR spektri ozračenog (25 kGy) magnezijem supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) prije (crna linija) i nakon uranjanja u simuliranu tjelesnu tekućinu tijekom: 1 dana (crvena

linija), 14 dana (plava linija) i 28 dana (ljubičasta linija) pri temperaturi od 37 °C. EPR signal je normiran na masu i pojačanje EPR instrumenta te zbog toga dolazi do vizualne razlike u omjeru signala i šuma između pojedinih spektara.

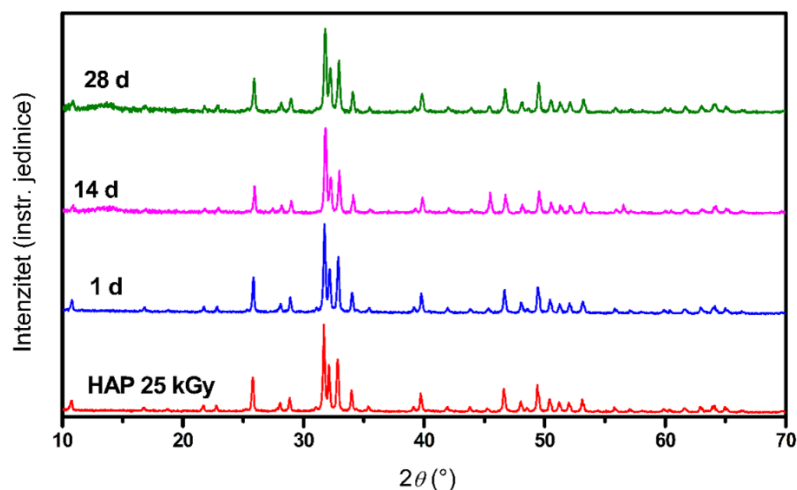


Slika 5.28: EPR spektri ozračenog (25 kGy) magnezijem supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) prije (crna linija) i nakon uranjanja u fiziološku otopinu tijekom: 1 dana (crvena linija), 14 dana (plava linija) i 28 dana (ljubičasta linija) pri temperaturi od 37 °C. EPR signal je normiran na masu i pojačanje EPR instrumenta te zbog toga dolazi do vizualne razlike u omjeru signala i šuma između pojedinih spektara.

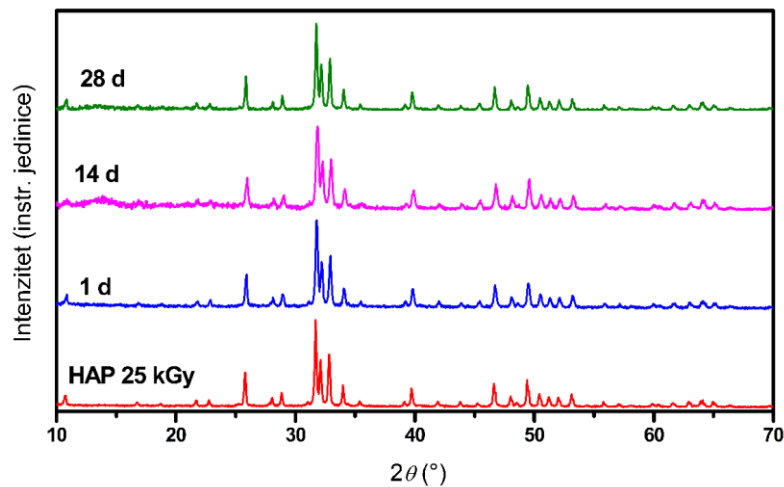
5.5 Karakterizacija sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka na bazi kalcijevih fosfata izloženih modelnim medijima

Na slikama 5.29 - 5.32 prikazani su spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXRD) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) i Mg supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) prije i nakon uranjanja u c-SBF i fiziološku otopinu. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy tretiranih od 1 do 28 dana pri temperaturi od 37 °C. Nakon 14 dana izlaganja HAP-a c-SBF-u i fiziološkoj otopini detektiran je amorfnu maksimum niskog intenziteta u rasponu od 2θ 13°-15°. Intenzitet tog maksimuma opada s vremenom, što bi moglo ukazivati na stvaranje nove

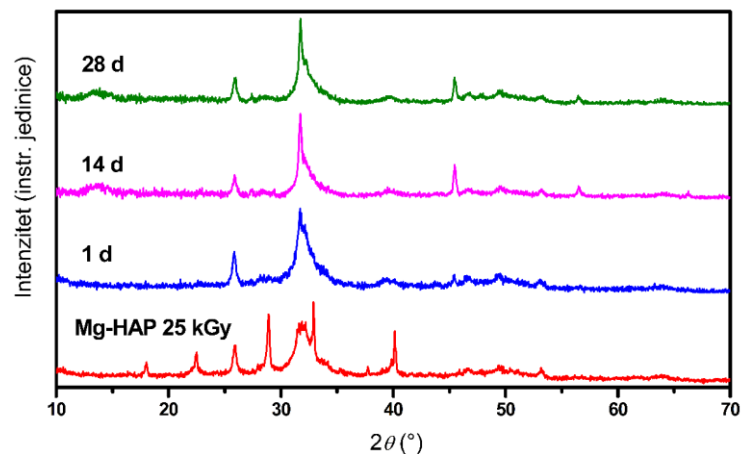
faze (slike 5.29 - 5.32). U slučaju Mg-HAP, nakon uranjanja u c-SBF i fiziološku otopinu, nisu detektirani maksimumi koji odgovaraju (110), (111), (210), (112) i (310) HAP refleksija. Također nije uočen $\text{Mg}(\text{OH})_2$ maksimum nakon 1 dana izlaganja (slike 5.38-5.41). Amorfni maksimum niskog intenziteta u rasponu od 2θ 12° - 15° opažen je nakon 14 dana uranjanja u oba medija, slično kao i kod nesupstituiranog HAP-a. Osim toga, uočeni su i maksimumi niskog intenziteta na oko 45.5° i 56.5° , koji nisu prisutni u netretiranom Mg supstituiranom HAP-u. Također, poznato je da su ionski supstituirani HAP-ovi termodinamički nestabilniji od nesupstituiranih HAP-ova te da su i topljiviji zbog toga je za očekivati da je njihova transformacija u modelnim medijima brža [18].



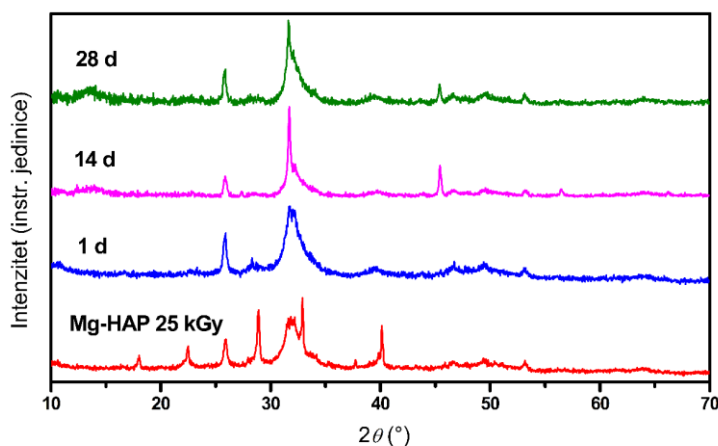
Slika 5.29: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) prije i nakon tretiranja fiziološkom otopinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37°C .



Slika 5.30: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) prije i nakon tretiranja simuliranom tjelesnom tekućinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37°C .

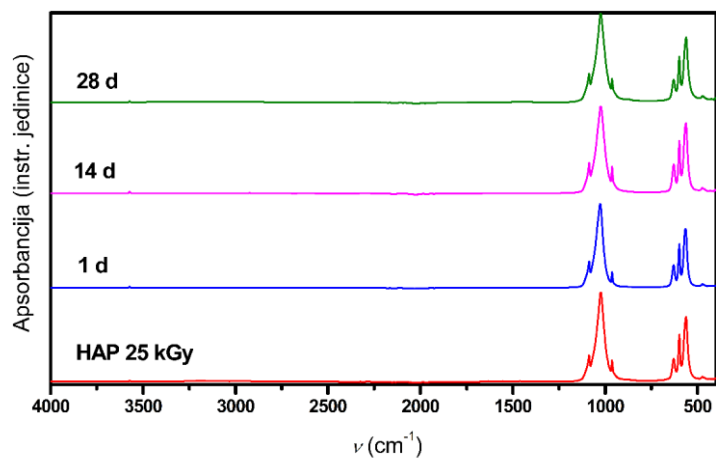


Slika 5.31: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za magnezijem supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) prije i nakon tretiranja fiziološkom otopinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37°C .

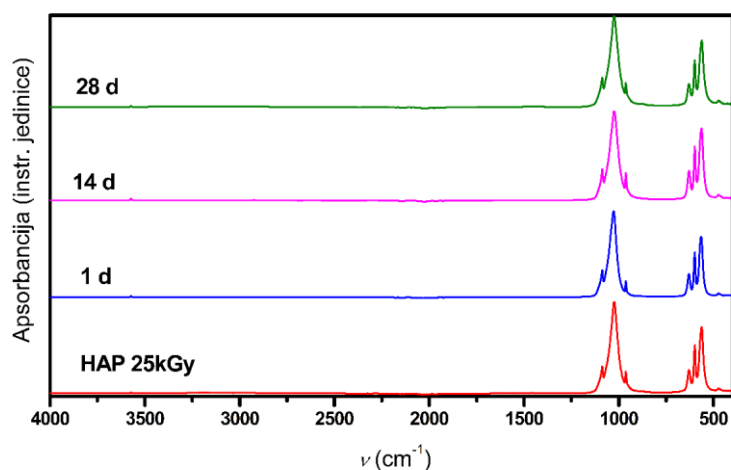


Slika 5.32: Spektri dobiveni difrakcijom rendgenskih zraka (PXR) za magnezijem supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) prije i nakon tretiranja simuliranom tjelesnom tekućinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zeleno linija) pri temperaturi od 37°C .

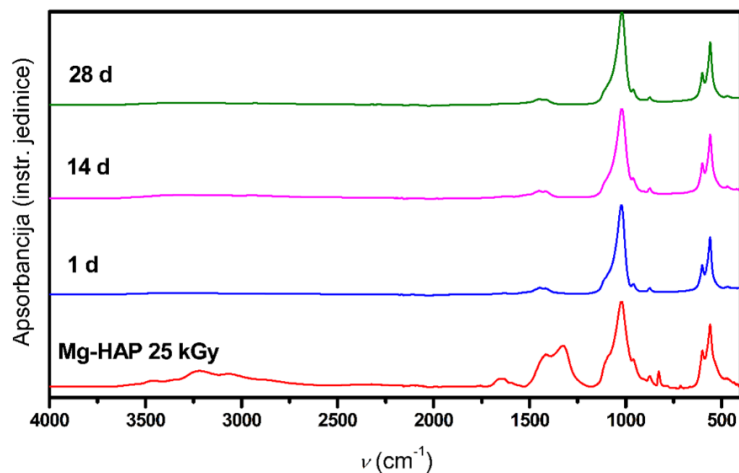
Nakon uranjanja HAP-a u c-SBF i fiziološku otopinu, nisu uočene promjene u FTIR spektrima (slike 5.33 - 5.36 i tablica 5.5). Osim toga, nije primijećena značajna promjena u morfologiji HAP-a (slika 5.23), osim nakon 28 dana izlaganja c-SBF. U tom su se slučaju na površini HAP kristala formirali mali, tanki kristali nalik listićima. Opaženo ponašanje moglo bi biti posljedica toga što je HAP termodinamički najstabilnija faza kalcijevog fosfata u fiziološkim uvjetima [153], [165]. FTIR spektri uzoraka izloženih modelnim medijima ne sadrže vrpce vibracija vode u području $3564 - 3000\text{ cm}^{-1}$, vrpcu na 1633 cm^{-1} , kao ni vrpcu na 828 cm^{-1} . $\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$ vrpca pri 715 cm^{-1} prisutna je u spektrima netretiranog Mg-HAP-a što se vidi na slikama 5.33 - 5.36 i u tablici 5.6. Također, smanjio se intenzitet vrpce CO u području $1450 - 1330\text{ cm}^{-1}$. Kristali nalik listićima izgledali su razvijeniji nakon uranjanja u c-SBF tijekom 14 i 28 dana nego u fiziološkoj otopini nakon 28 dana (slika 5.23). Nije primijećena značajna promjena u morfologiji uzorka izloženog fiziološkoj otopini nakon 28 dana.



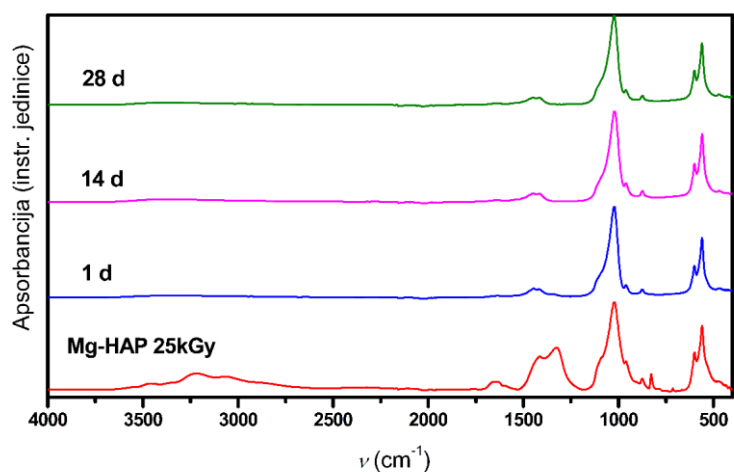
Slika 5.33: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) prije i nakon tretiranja simuliranom tjelesnom tekućinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37 °C.



Slika 5.34: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) prije i nakon tretiranja fiziološkom otopinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37 °C.

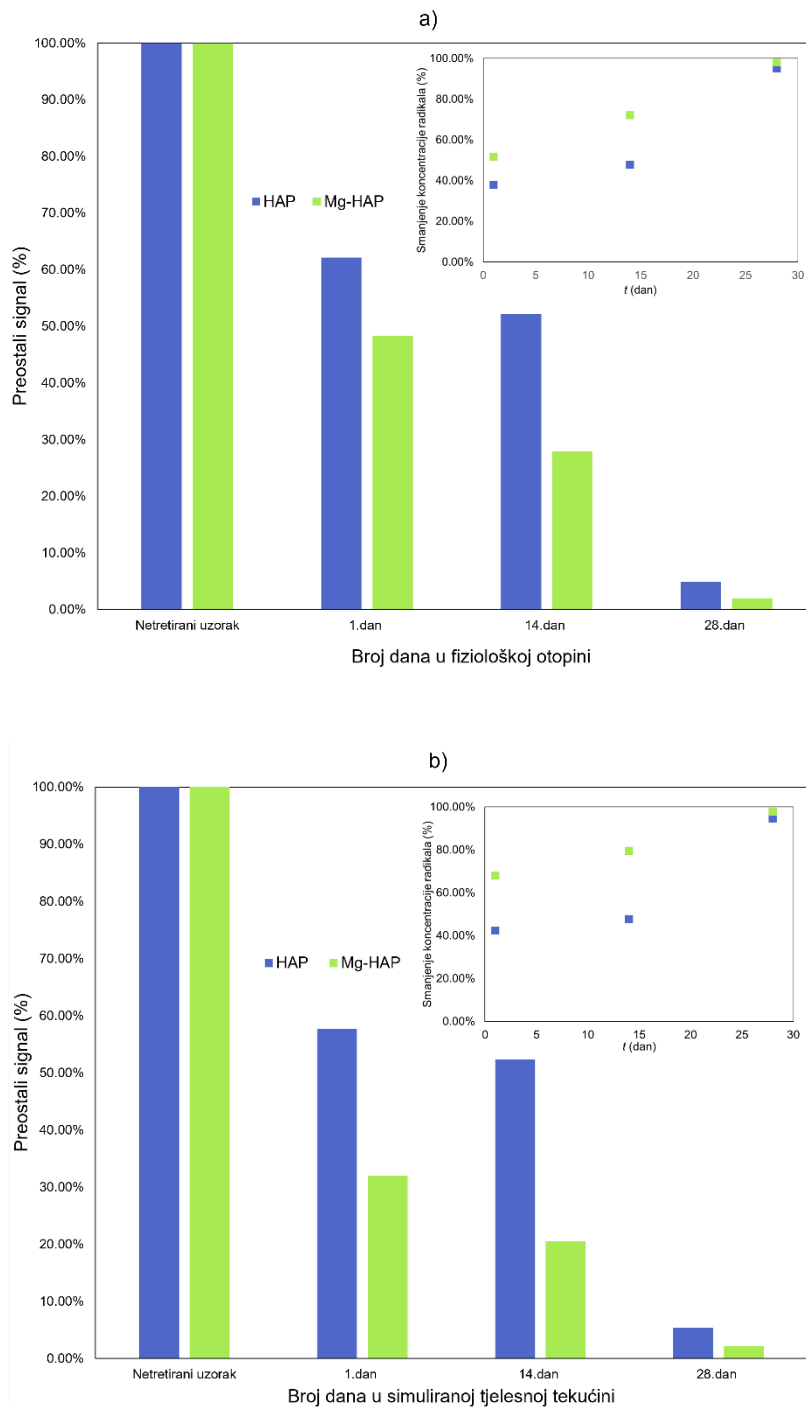


Slika 5.35: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za magnezijem supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) prije i nakon tretiranja simuliranom tjelesnom tekućinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37 °C.



Slika 5.36: Spektri dobiveni infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom (FTIR) za magnezijem supstituirani hidroksiapatit (Mg-HAP) prije i nakon tretiranja fiziološkom otopinom. Prikazani su spektri uzoraka ozračenih dozom od 25 kGy (crvena linija) te uzoraka koji su odstajali 1 dan (plava linija), 14 dana (ljubičasta linija) te 28 dana (zelena linija) pri temperaturi od 37 °C.

EPR signali HAP-a i Mg-HAP-a izloženih SBF-u ili fiziološkoj otopini smanjivali su se tijekom vremena i nakon 28 dana su uglavnom ili u potpunosti nestali (slike 5.25 - 5.28). Smanjivanje ili nestajanje EPR signala implicira mogućnost nekog oblika stabilizacije uzoraka putem rekombinacije radikala u uvjetima koji imitiraju fiziološke, što je dosta obećavajuće s obzirom na moguću medicinsku primjenu Mg supstituiranog ili nesupstituiranog hidroksiapatita. Uočen je brži pad EPR signala Mg-HAP-a u odnosu na EPR signal HAP-a kod izlaganja uzoraka modelnim medijima za 1. i 14. dan što je u skladu s većom topljivosti i termičkom nestabilnosti Mg-HAP-a prema samom HAP-u [18]. Iako 28 dana nakon uranjanja, razlika između smanjenja signala za uzorke tretirane c-SBF i fiziološkom otopinom unutar je mjerne nesigurnosti koja uključuje mjerne nesigurnosti vaganja, ograničenje rezolucije EPR spektrometra, mjerne nesigurnosti zbog omjera signala i šuma (engl. *signal to noise ratio*, S/N) koji je temperaturno ovisan te mogućnosti variranja temperature pri održavanju EPR instrumenta na zadanoj temperaturi u dužem vremenskom periodu. Na slici 5.37 prikazano je smanjenje dvostrukog integrala signala u ovisnosti o vremenu izlaganja fiziološkoj otopini i c-SBF pri temperaturi od 37 °C za oba uzorka. To ukazuje da bi oba medija mogla imati sličan učinak na radikale nastale zračenjem HAP-a i Mg-supstituiranog HAP-a. Ta bi se analiza mogla iskoristiti za predviđanje ponašanja i drugih sintetičkih dentalnih nadomjestaka na bazi kalcijevih fosfata kada se primjenjuju kao implantati za regeneraciju kosti.



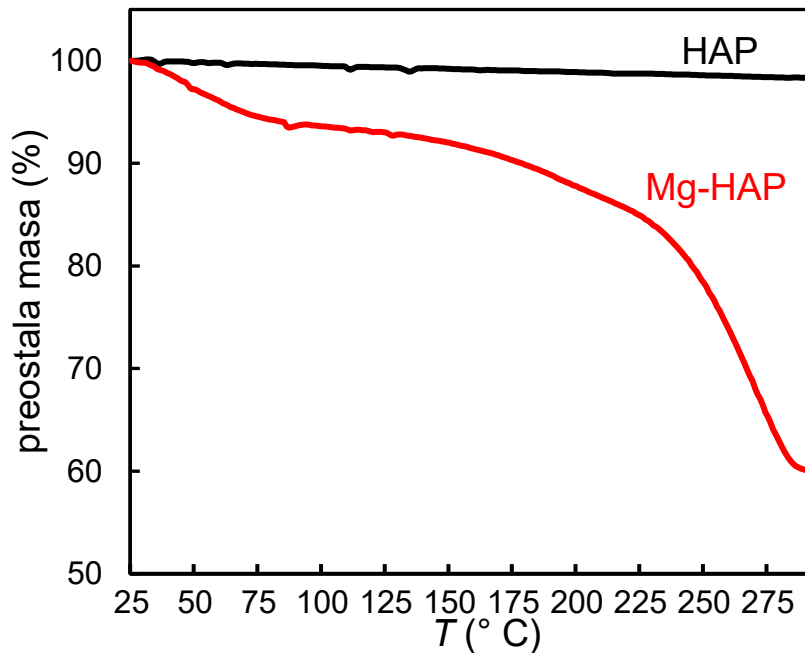
Slika 5.37: Ovisnost dvostrukog integrala EPR signala o vremenu izlaganja: a) fiziološkoj otopini i b) simuliranoj tjelesnoj tekućini (c-SBF) pri temperaturi od 37 °C za nesupstituirani hidroksiapatit (HAP) i Mg-supstituirani HAP (Mg-HAP) ozračenih dozom od 25 kGy. U

gornjem desnom kutu, prikazano je smanjenje koncentracije radikala za HAP i Mg-HAP ovisno o vremenu izlaganja uzoraka u pojedinom modelnom mediju.

5.6 Temperaturna ovisnost sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka na bazi kalcijevih fosfata

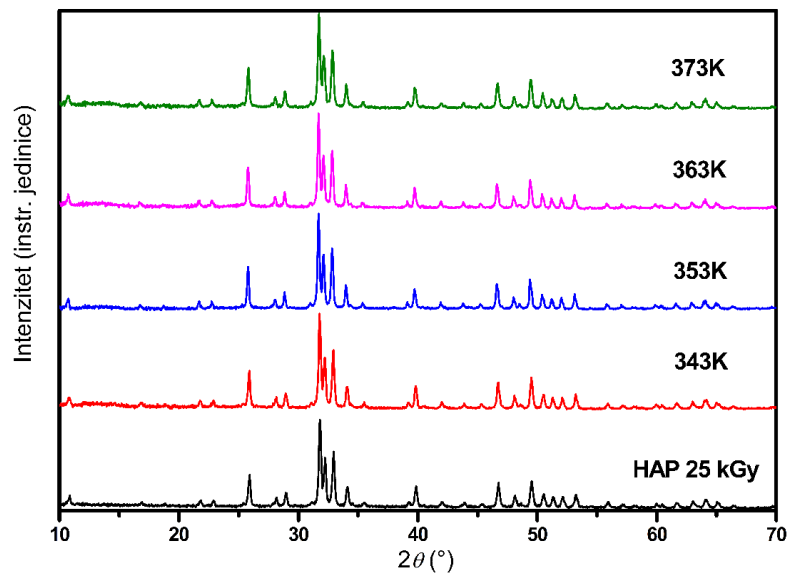
Za utvrđivanje stabilnosti radikala nastalih sterilizacijom gama zračenjem, snimljeni su EPR spektri nesupstituiranog HAP-a i Mg-supstituiranog HAP-a na četiri različite temperature: 343 K, 353 K, 363 K i 373 K tijekom najmanje 2 sata grijanja. Ti rezultati mogli bi pružiti dodatne informacije o ponašanju slobodnih radikala u uvjetima kao što su skladištenje i transport [25].

Uzorci su podvrgnuti termogravimetrijskoj analizi kako bi se utvrdile eventualne promjene koje se očituju kroz gubitak mase (slika 5.38). Takvi bi podaci mogli pomoći pri interpretaciji rezultata dobivenih EPR-om. Slika 5.38 prikazuje TGA krivulje uzoraka HAP-a i Mg-HAP-a u smislu rezidualne mase. HAP ne prolazi nikakvu značajnu promjenu, tj. pokazuje manje od 2% gubitka mase s povećanjem temperature do 300 °C. Međutim, suprotno ponašanje uočeno je za Mg-supstituirani HAP. Kada je dostignuta temperatura od 100 °C, uzorak je izgubio oko 6 % svoje mase. Razlika u toplinskom ponašanju u području do 100 °C može se pripisati većoj sposobnosti vezanja vode Mg-supstituiranog HAP-a [158], kao što se i vidi iz FTIR spektra prikazanog na slikama 5.21 i 5.22. Na oko 250 °C otkriven je nagli gubitak mase. Na 300 °C ostalo je oko 60 % rezidualne mase. Uočena razlika u toplinskom ponašanju slijedi ponašanje nesupstituiranog i Mg-supstituiranog HAP kao što je i opisano u studijama [166] i [167].

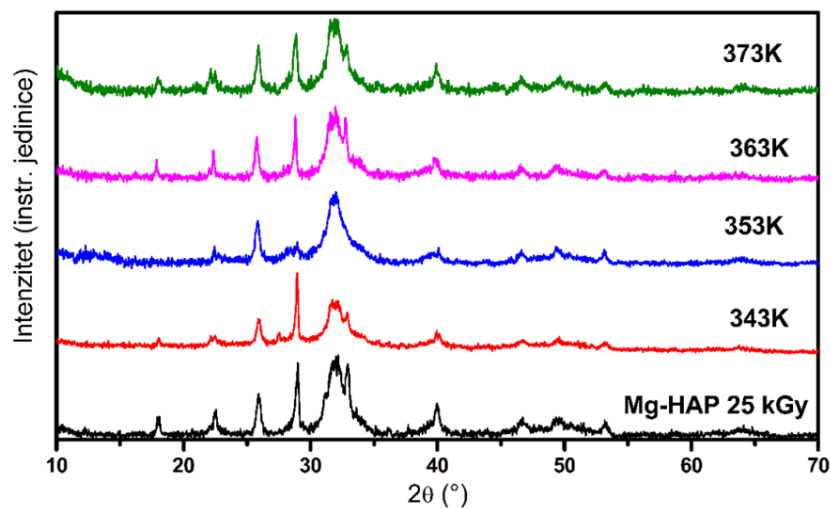


Slika 5.38: TGA krivulje nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) i Mg supstituiranog HAP (Mg HAP).

Kako bi se utvrdilo da nije došlo do strukturnih ili sastavnih promjena u hidroksiapatitima, snimljeni su difraktogrami praha nakon 2 sata zagrijavanja na željenoj temperaturi (slike 5.39 i 5.40). U difraktogramima HAP-a nisu uočene promjene (slika 5.39). U slučaju Mg-HAP (slika 5.40) intenzitet difrakcijskog maksimuma na 2θ od 32.95° se mijenjao s promjenom temperature. Budući da se nije mogao odrediti izravan odnos između promjena intenziteta i porasta temperature, ta bi promjena mogla biti uzrokovana s nehomogenošću uzorka.



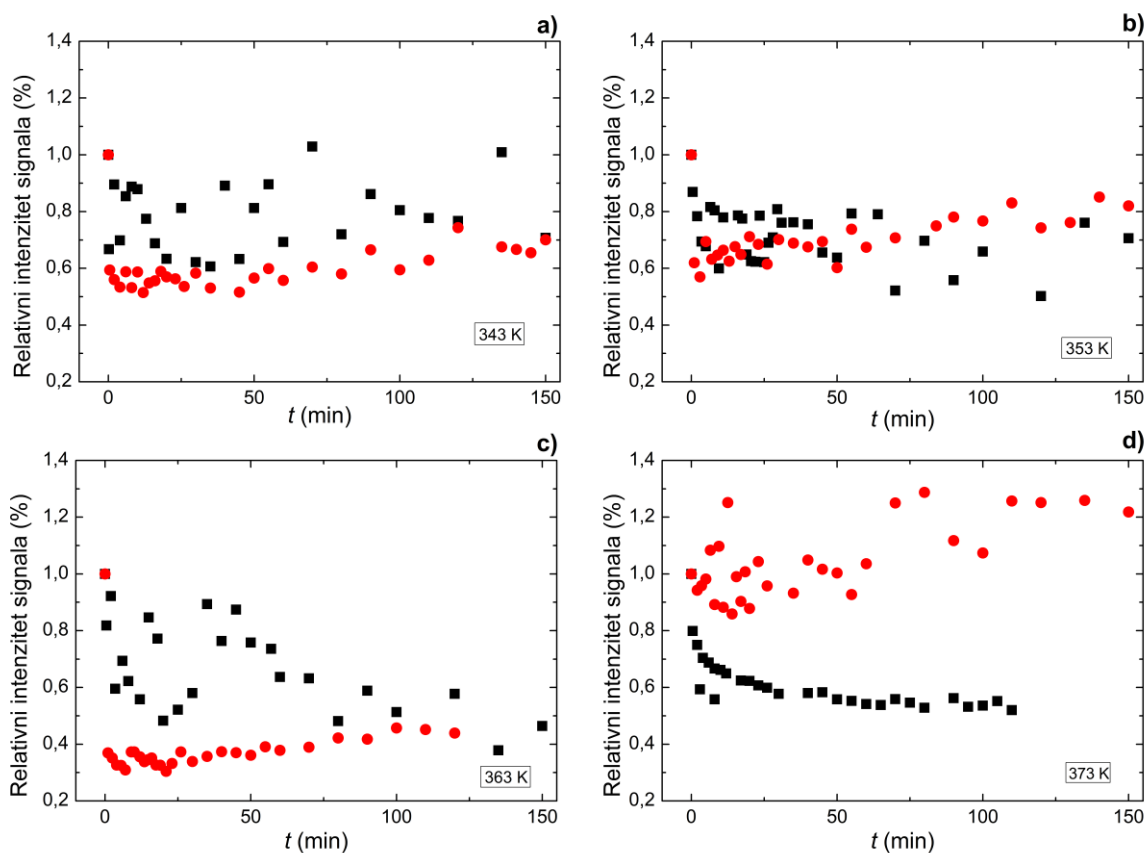
Slika 5.39: PXRĐ spektri ozračenih uzoraka nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) kontrolnog uzorka (crna linija) i nakon zagrijavanja na temperaturama od: 343 K (crvena linija), 353 K (plava linija), 363 K (ljubičasta linija) i 373 K (zelena linija) tijekom 2 sata.



Slika 5.40: PXRĐ spektri ozračenih uzoraka magnezijem supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) kontrolnog uzorka (crna linija) i nakon zagrijavanja na temperaturama od: 343 K (crvena linija), 353 K (plava linija), 363 K (ljubičasta linija) i 373 K (zelena linija) tijekom 2 sata.

Slika 5.41 prikazuje promjene u odnosu na početnu vrijednost dvostrukog integrala EPR spektara za oba uzorka na četiri različite temperature. Može se vidjeti da EPR signali nesupstituiranog HAP-a i Mg-supstituiranog HAP-a slijede različite trendove s promjenom temperature. Relativni intenzitet signala nesupstituiranog HAP-a smanjio se kad je uzorak zagrijavan na temperaturu višu od sobne. To je jedva primjetno na 343 K i 353 K, dok je značajnije slabljenje signala primijećeno na 363 K i 373 K (slika 5.41). Također, nije se promijenio oblik i relativni intenzitet signala, kao ni u slučaju Mg-supstituiranog HAP-a.

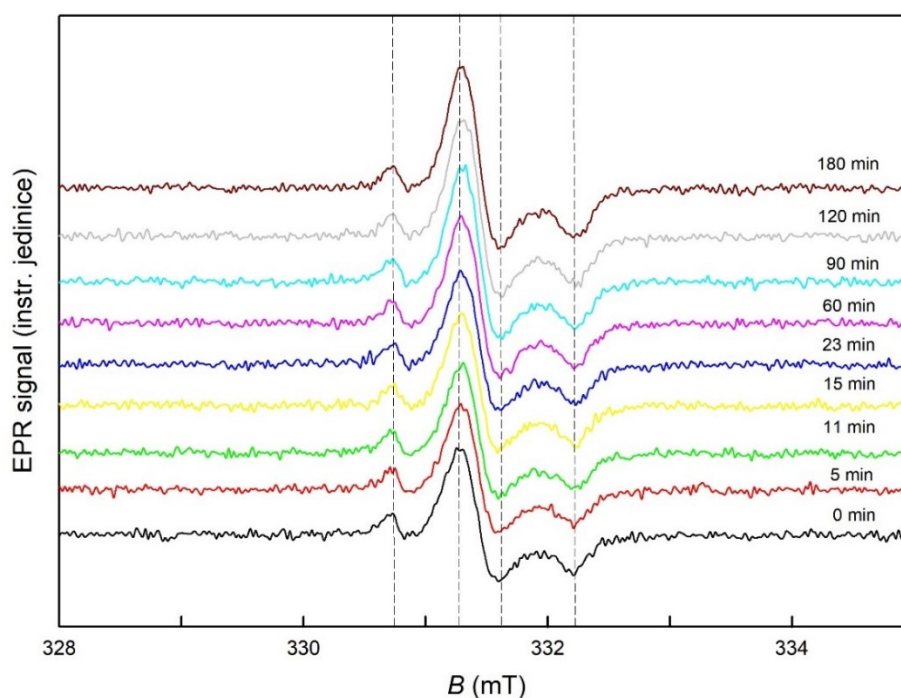
Što se tiče Mg-supstituiranog HAP-a, otkriven je prilično neočekivan fenomen. Na temperaturama 343 K, 353 K i 363 K signal se smanjuje na oko 30 % - 60 % i nakon toga se povećava na oko 50 % - 75 % u odnosu na početnu vrijednost. Ta promjena je bila vidljiva već nakon oko 7 - 12 minuta od početka zagrijavanja. Kada je uzorak držan na 373 K, početno smanjenje signala nije toliko vidljivo jer je unutar mjerne nesigurnosti EPR instrumenta, opisane u poglavlju 5.5. Ipak, porast signala je u tom slučaju najintenzivniji. Konačni signal (nakon 150 minuta) je većeg je intenziteta od početnog za oko 25 %.



Slika 5.41: Vremenska ovisnost dvostrukog integrala EPR spektra nesupstituiranog hidroksiapatita (HAP) (crni kvadratići), i magnezijem supstituiranog hidroksiapatita (Mg-HAP) (crveni kružići). Ovisnosti su prikazane za temperature: a) 343 K, b) 353 K, c) 363 K i d) 373 K.

Iako su različiti mehanizmi pomoću kojih se magnezij apsorbira tj. inkorporira tijekom kristalizacije hidroksiapatita već proučavani [163], utjecaj magnezija na EPR signal supstituiranog hidroksiapatita još uvijek nije u potpunosti razjašnjen, osobito na temperaturama iznad sobne. Štoviše, točna lokacija CO_2^- i CO_3^- radikala u biološkim i sintetskim apatitima još uvijek je predmet rasprave. Oni mogu zamijeniti hidroksilnu skupinu, fosforni tetraedar ili neutralni CO_2 koji se može nalaziti na površini kristala. Prema istraživanju [168], redistribucija

doprinosu signala aksijalnih i rompskih CO_2^- radikala u prvobitnom HAP-u vidi se iznad 200 °C. To je najvjerojatnije povezano s velikim gubitkom mase Mg-supstituiranog HAP-a zabilježenog u tom temperaturnom rasponu. Autori su primijetili da termički inducirani i zračenjem inducirani radikali daju jednaki signal. Također je takvo ponašanje primijećeno i za sintetske i biološke hidroksiapatite što dodatno potvrđuje veliku sličnost između ta dva materijala [168]. U našem slučaju, kod Mg-supstituiranog HAP-a vidi se isti učinak samo pri nižem temperaturnom rasponu. Poznato je da uklanjanje vode tijekom sušenja može rezultirati naknadnim skupljanjem rešetke hidroksiapatita, a zbog lokalnih varijacija u sadržaju vode mogu se javiti i male strukturne promjene [169]. Unatoč tome, uočeni gubitak mase, koji je vjerojatno povezan s gubitkom vode [167], [170], a koji je potvrđen TGA analizom, relativno je malen i nije izazvao promjenu u opaženoj širini linije EPR-a, što bi se očekivalo za tu vrstu učinaka (slika 5.42).



Slika 5.42: EPR spektri ozračenog hidroksiapatita supstituiranog s 0.25% Mg, zagrijavanog na 373 K u različitim vremenima

Destabilizacija kristalne strukture hidroksiapatita pokazana je u nekoliko radova koji se bave interakcijom i svojstvima magnezija i hidroksiapatita u različitim uvjetima. Na primjer, u radu [171] iskorišten je strukturni defekt koji je pogodovao adsorpciji poliakrilne kiseline. Štoviše, pokazalo se da je Mg-supstitucija u rešetki dovela do stvaranja slabe intergranularne veze i poboljšanja plastičnih svojstava u dopiranoj keramici hidroksiapatita. Uvođenje magnezija pospješuje slabljenje granularne veze i mijenja način loma pripremljene keramike [172]. U studiji [173] opisan je učinak supstitucije hidroksiapatita magnezijem. Toplinska vodljivost dopiranog materijala pokazala je povećanje toplinske vodljivosti koje je izravno povezano s povećanjem postotka magnezija [173]. To zapažanje ukazuje na različite fenomene koji se javljaju u izvornom i Mg-supstituiranom hidroksiapatitu predstavljenom u ovoj disertaciji. Nažalost, do danas objavljeni članci ne opisuju odnos između prisutnosti magnezija, slobodnih radikala izazvanih gama zračenjem i ponašanja na temperaturama malo iznad sobne kao što je ovdje proučavano. S druge strane, Mg-supstituirani hidroksiapatit usporediv je sa zubnom caklinom i obraćanje pozornosti na radove na tom materijalu moglo bi ponuditi novu perspektivu učinka promatranog u ovom istraživanju. U istraživanju [174] uočeno je povećanje intenziteta EPR signala za glavne vrste radikala koji se javljaju u ozračenoj zubnoj caklini, na temperaturi od oko 180 °C. U navedenom radu, apsorbirana doza uzoraka bila je 3 kGy što je oko 8 puta niže od sterilizacijske doze od 25 kGy koja je korištena u ovoj disertaciji. Autori su taj učinak pripisali žarenju, ali uz objašnjenje da je ispod 230 °C došlo do pretvorbe neuređenih CO₂⁻ radikala u usmjerene. Opažanje je bilo popraćeno promjenama oblika EPR linije u rasponu temperature od 160 °C do 230 °C, što u ovom slučaju nije opaženo (slika 5.42). Učinak se može povezati sa sadržajem magnezija, jer je dobro poznato da ima važnu ulogu u biomineralizaciji zubne cakline. Sadržaj magnezija znatno varira unutar cakline različitih životinjskih vrsta i sukladno tome utječe na druga svojstva poput tvrdoće [20], [89], [175]. Nadalje, u radu [176] uočen je porast intenziteta EPR signala tijekom praćenja temperaturnih promjena karbonatne strukture u zubnoj caklini u temperaturnom rasponu do 250 °C. Jedno od predloženih objašnjenja tog učinka bilo je raspadanje elektronskih zamki izazvanih žarenjem, koje mogu uhvatiti sekundarne elektrone stvorenih zračenjem, a koji sudjeluju u formiranju CO₂⁻ radikala, a raspad zamki pojačava signal izazvan zračenjem. Priroda tih zamki još nije razjašnjena, ali slabo vezana voda može pobjeći s površine i ispod površine kristalita. Stoga su autori

prepostavili da gore navedene zamke elektrona imaju površinsko ili potpovršinsko podrijetlo i da su povezane sa spojevima koji uključuju vodu [176].

Gubitak vode u ovoj disertaciji vjerojatno nije dovoljno značajan da izazove slične promjene i očitovao bi se kao promjena oblika signala, što nije uočeno (slika 5.42). Dodatno objašnjenje uočenog povećanja količine CO_2^- radikala uključuje smanjenje volumena amorfnih područja u hidroksiapatitu tijekom žarenja [177]. Iz rezultata NMR-a, predlaže se da se karbonat u tim područjima ne može transformirati u CO_2^- radikale pod utjecajem ionizirajućeg zračenja, ali transformacija amorfnih područja u uobičajenu strukturu hidroksiapatita s CO_2^- ionima može povećati njihov ukupni broj, odnosno količinu povezanih CO_2^- radikala, i sukladno tome povećanje intenziteta EPR signala.

Kada je riječ o EPR signalu Mg-supstituiranog hidroksiapatita u ovoj disertaciji, veliki je izazov objasniti objavljene rezultate budući da odnos između prisutnosti magnezija i slobodnih radikala još nije utvrđen. Štoviše, shvaćanje istovremenog postojanja tih vrsta dodatno je otežano činjenicom da slični rezultati do danas nisu objavljeni. Može se nagađati o postojanju dvaju različitih kinetičkih obrazaca u Mg-supstituiranom hidroksiapatitu koji se odvijaju malo iznad sobne temperature: rekombinacija i stvaranje slobodnih radikala. Nedostatak promjena širine linije u EPR signalu Mg-supstituiranog hidroksiapatita tijekom 2 sata zagrijavanja na 343 K, 353 K, 363 K i 373 K podupire hipotezu da nema promjena u dinamici kretanja radikala kao i nedostatak promjena u spektralnom obliku kao što je prikazano na slici 5.42. Ovi procesi mogu biti uzrokovani prisutnošću magnezija, budući da se takav fenomen ne očituje u nesupstituiranom hidroksiapatitu. Nasuprot tome, nesupstituirani hidroksiapatit pokazuje neke promjene u EPR spektru samo na višim temperaturama, kao što je i istaknuto u literaturi [168]. Što se tiče analize metodom ubrzanog starenja, Mg-supstituirani hidroksiapatit pripremljen na način kako je opisano u ovoj disertaciji trebalo bi dodatno poboljšati i istražiti prije razmatranja pretkliničkih ispitivanja.

5.7 Karakterizacija kalcijevih fosfata steriliziranih plazmom

Kao i u slučaju kalcijevih sulfata RF plazma uzrokuje razgradnju uzorka takvi uzorci nisu daljnje analizirani jer metoda nije pogodna za njih.

6 ZAKLJUČAK

U ovoj disertaciji karakterizirani su hidrati kalcijevog sulfata, kao što su dihidrat - CSDH i hemihidrat - CSHH spektroskopijom elektronske paramagnetske rezonancije nakon postupka sterilizacije, uz korištenje osnovnih karakterizacijskih metoda: difrakcijom rendgenskih zraka, termogravimetrijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom. Pregledom literature, ovo je prva studija o utjecaju fiziološke otopine i umjetne sline na koncentraciju gama induciranih radikala u zubnim koštanim nadomjescima na bazi kalcijevih sulfata. Rezultati pokazuju da fiziološka otopina i umjetna slina imaju značajan utjecaj na koncentracije radikala u oba hidrata, bilo pojedinačno ili kao mješavine. Najveće smanjenje koncentracije radikala zabilježeno je za CSHH nakon miješanja s fiziološkom otopinom ili umjetnom slinom, dok je CSDH održavao relativno visoku koncentraciju radikala. To može značiti da se sigurnost upotrebe proizvoda za regeneraciju kostiju može povećati smanjenjem količina stabilnijeg CSDH u smjesi. Stoga, dobiveni rezultati nude smjer u kojem se kvaliteta materijala za regeneraciju dentalnih tkiva na bazi gama steriliziranog kalcijevog sulfata može poboljšati prilagođavanjem njihovog sastava kako bi se smanjio broj radikala nastalih zračenjem, na način da imaju manji udio CSDH u konačnom proizvodu. Što se tiče sterilizacije hladnom plazmom, u ovom radu je ustanovljeno da nije primjerena za ove tipove uzoraka zbog makroskopskih promjena koje uzrokuje, što je svakako bitno za biomedicinske materijale.

Što se tiče istraživanih kalcijevih fosfata, Mg-supstituirani HAP-ovi dobivaju sve veću pozornost kao biomimetički i bioaktivni materijali za regeneraciju čvrstog tkiva. Također se mogu smatrati sustavom za dostavu lijekova za Mg^{2+} ione s korisnim biološkim učincima. Istraživanje svojstava tih materijala ključno je za utvrđivanje njihovog pravog potencijala za biomedicinsku primjenu. Iako je broj studija o Mg-supstituiranim HAP-ovima u porastu, postoji nekoliko tema koje su slabo istražene, iako su od iznimne važnosti za njihovu uspješnu primjenu kao materijala za implantaciju. To uključuje određivanje stabilnosti materijala nakon sterilizacije, u modelnim medijima i tijekom ubrzanog starenja. Utjecaj gama zračenja, kao tipične tehnike sterilizacije, nakon čega slijedi uranjanje u korigiranu simuliranu tjelesnu tekućinu i fiziološku otopinu, kao i ubrzano starenje, proučavani su za nesupstituirani HAP i

Mg-supstituirani HAP s obzirom na sastav, strukturu i unutrašnje uređenje. Pokazano je da zračenje ne utječe na sastav i strukturu HAP-a. Nakon uranjanja u modelni medij, mala količina nusproizvoda sinteze nestala je već nakon 1 dana ostavljajući Mg-HAP kao jedinu preostalu fazu. Slično, signali radikala u EPR spektrima se smanjuju ili potpuno nestaju nakon 28 dana u modelnom mediju. Međutim, prilično neobično i prethodno neistraženo ponašanje primijećeno je za Mg-supstituirani HAP nakon ozračivanja na temperaturama ispod 373 K i na 373 K, budući da je do 373 K opažen pad, a na 373 K porast EPR signala. Svakako je preporučljivo dodatno istražiti opažene učinke rasta i pada signala za različite uvjete skladištenja materijala prije primjene na pacijentima. Sveukupno, dobiveni rezultati pokazuju da istraživani Mg-supstituirani HAP ima dobar potencijal za biomedicinsku primjenu s obzirom na njegovo ponašanje u medijima koji oponašaju fiziološke uvjete, ali njegovo ponašanje u određenim uvjetima skladištenja i transporta potrebno je detaljnije proučiti.

Nadalje, navedeni uzorci sterilizirani su i hladnom plazmom, ali sama metoda nije dovoljno istražena i standardizirana da bi se mogla usporediti s efikasnošću metode sterilizacije gama zračenjem. U svim razmatranim slučajevima, RF plazma se pokazala kao neprimjerena metoda za promatrane materijale zbog gorenja uzoraka za vrijeme tretiranja. Za određivanje parametara tretiranja koji su nedestruktivni, trebalo bi napraviti dodatna istraživanja te provesti mikrobiološku karakterizaciju.

7 LITERATURA

- 1 Dorozhkin, S. V. Bioceramics based on calcium orthophosphates. *Glass and Ceramics*, 64, 11-12 (2007.), 442-447.
- 2 Dorozhkin, S. V. Bioceramics of calcium orthophosphates. *Biomaterials*, 31, 7 (2010.), 1465-1485.
- 3 Singh, A. V. *Clinical implantology*. Elsevier India, India, 2013.
- 4 Matković, I., Maltar-Strmečki, N., Babić-Ivančić, V., Dutour Sikirić, M., and Noethig-Laslo, V. Characterisation of β -tricalcium phosphate-based bone substitute materials by electron paramagnetic resonance spectroscopy. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 10 (2012.), 1621-1628.
- 5 Murata, T., Shiraishu, K., Ebina, Y., and Miki, T. An ESR study of defects in irradiated hydroxyapatite. *Applied Radiation and Isotopes*, 47, 11-12 (1996.), 1527-1531.
- 6 Murray, K. A., Collins, M. N., O'Sullivan, R. P. et al. Influence of gamma and electron beam sterilization on the stability of a premixed injectable calcium phosphate cement for trauma indications. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 77 (2018.), 116-124.
- 7 Grego, T., Jurković, L., Lyons, D. M., Kralj, D., and Maltar-Strmečki, N. The influence of the saline and artificial saliva on gamma induced radical concentration in dental bone graft materials based on calcium sulfate studied by EPR spectroscopy. *Radiation Physics and Chemistry*, 177 (2020.), 109138.
- 8 Box, Harold C. *Radiation Effects: ESR and ENDOR Analysis*. Academic Press, New York, San Francisco, London, 1977.

- 9 Akkus, O., Belaney, R. M., and Das, P. Free radical scavenging alleviates the biomechanical impairment of gamma radiation sterilized bone tissue. *Journal of Orthopaedic Research*, 23, 4 (2005.), 838-845.
- 10 Nguyen, H., Morgan, D. A. F., and Forwood, M. R. Sterilization of allograft bone: effects of gamma irradiation on allograft biology and biomechanics. *Cell Tissue Banking*, 8 (2007.), 93-105.
- 11 Köseoğlu, R., Köksal, F., and Çiftçi, E. EPR study of radicals produced by gamma-irradiation in marine mollusc (*Venus* sp.) fossils. *Radiation effects and defects in solids*, 159, 8-9 (2004.), 497-502.
- 12 Khasanov, R. A., Nizamutdinov, N. M., Khasanova, N. M., Salimov, R. I., Kadyrov, R. I., and Vinokurov, V. M. Phase states of the gypsum thermal-annealing derivatives according to electron spin resonance spectra. *Crystallography Reports*, 59, 3 (2014.), 399-406.
- 13 Kim, H., Hanifehpour, Y. K., Banerjee, A. N., Min, B. K., Joo, S. W., and Jung, W. G. Structural studies and optical properties of pearl nucleus irradiated by γ -ray. *Radiation effects and defects in solids*, 168, 9 (2013.), 696-704.
- 14 Fattibene, P. and Callens, F. EPR dosimetry with tooth enamel: A review. *Applied Radiation and Isotopes*, 68, 11 (2010.), 2033-2116.
- 15 Messerer, P., Halfmann, H., Czichy, M., Schulze, M., and Awakowicz, P. Plasma sterilisation and surface modification of thermolabile materials. In *In Proc. of the 2005 TMS Annual Meeting* (2005.), 205-215.
- 16 Laroussi, M. Nonthermal decontamination of biological media by atmospheric-pressure plasmas: review, analysis, and prospects. *IEEE Transactions on plasma science*, 30, 4 (2002.), 1409-1415.

- 17 O'Connor, N., Cahill, O., Daniels, S., Galvin, S., and Humphreys, H. Cold atmospheric pressure plasma and decontamination. Can it contribute to preventing hospital-acquired infections? *Journal of hospital infection*, 88, 2 (2014.), 59-65.
- 18 Bigi, A., Boanini, E., and Gazzano, M. Ion substitution in biological and synthetic apatites. Woodhead Publishing, Boston, 2016.
- 19 Caciotti, I. Cationic and Anionic Substitutions in Hydroxyapatite BT. In *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*. Springer International Publishing, Cham, 2016.
- 20 Šupova, M. Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review. *Ceramics International*, 41, 8 (2015.), 9203-9231.
- 21 Andrés, N. C., D'Elía, N. L., Ruso, J. M., Campelo, A. E., Massheimer, V. L., and Messina, P. V. Manipulation of Mg²⁺-Ca²⁺ switch on the development of bone mimetic hydroxyapatite. *ACS applied materials & interface*, 9, 18 (2007.), 15698-15710.
- 22 Mocanu, A., Cadar, O., Frangopol, P. T. et al. Ion release from hydroxyapatite and substituted hydroxyapatites in different immersion liquids: In vitro experiments and theoretical modelling study. *Royal Society open science*, 8 (2022.), 201785.
- 23 Singh, R., Singh, D., and Singh, A. Radiation sterilization of tissue allografts: A review. *World journal of radiology*, 8, 4 (2016.), 355-369.
- 24 Rokhmistrov, D. V., Nikolov, O. T., Gorobchenko, O. A., and Loza, K. I. Study of structure of calcium phosphate materials by means of electron spin resonance. *Applied Radiation and Isotopes*, 70, 11 (2012.), 2621-2626.
- 25 Fouad, H., Elleithy, R., and Alothman, O. Y. Thermo-mechanical, wear and fracture behavior of high-density polyethylene/hydroxyapatite nano composite for biomedical applications: effect of accelerated ageing. *Journal of Materials Science & Technology*, 29, 6 (2013.), 573-581.

- 26 Kokubo, T. and Takadama, H. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? *Biomaterials*, 27 (2006.), 2907-2915.
- 27 Desrosiers, M. and Schauer, D.A. Electron paramagnetic resonance (EPR) biodosimetry. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research Section B: Beam Interactions with Materials and Atoms*, 184, 1-2 (2001.), 219-218.
- 28 Takehisa, M. Radiation resistance of the bioburden from medical devices. *Radiation Physics and Chemistry*, 52, 1-6 (1998.), 21-27.
- 29 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Trends in Sterilization of Health Care Products*. Vienna, 2008.
- 30 INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION. *Sterilization of Health Care Products - Requirements for validation and routine control, ISO 11137:1995*. Geneva, 1995.
- 31 EUROPEAN COMMITTEE FOR STANDARDIZATION. *Sterilization of Medical Devices - Validation and Routine Control of Sterilization by Radiation, EN 552:1994*. Brussels, 1994.
- 32 Lambert, B. and Martin, J. Chapter III.1.2 - Sterilization of Implants and Devices. In *Biomaterials Science (Third Edition) An Introduction to Materials in Medicine*. Academic Press, 2013.
- 33 THE INTERNATIONAL COMMISSION ON MICROBIOLOGICAL SPECIFICATION FOR FOODS. *Microbial Ecology of Foods*. Academic Press, New York, 1980.
- 34 Yarmonenko, S. P. Direct and indirect effect of ionizing radiation. In *Radiobiology of Human and Animals*. G. Mir Publisher, Moscow, 1988.
- 35 Wang, H., Jiang, H., Van De Gucht, M., and De Ridder, M. Hypoxic radioresistance: can ROS be the key to overcome it? *Cancers*, 11, 1 (2019.), 112.

- 36 Mozetič, M. and Zalar, A. Discharge cleaning of aluminum components. *Vacuum*, 71, 1-2 (2003.), 233-236.
- 37 Vujošević, D., Vranica, Z., Vesel, A. et al. Oxygen plasma sterilization of bacteria. *Materiali in Tehnologije*, 40, 6 (2006.), 227.
- 38 Elersic, K., Junkar, I., Spes, A., Vujosevic, D., Vratnica, Z., and Cvelbar, U. Etching of Bacterial Capsule and Cell Wall by Oxygen Plasma Afterglow. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 39, 11 (2011.), 2972-2973.
- 39 Wang, M. J., Chang, Y. I., and Poncin-Epaillard, F. Acid and basic functionalities of nitrogen and carbon dioxide plasma-treated polystyrene. *Surface and Interface Analysis: An International Journal devoted to the development and application of techniques for the analysis of surfaces, interfaces and thin films*, 37, 3 (2005.), 348-355.
- 40 Médard, N., Soutif, J. C., and Poncin-Epaillard, F. CO₂, H₂O, and CO₂/H₂O plasma chemistry for polyethylene surface modification. *Langmuir*, 18, 6 (2002.), 26-2253.
- 41 Gunde, M. K., Kunaver, M., Mozetic, M., Pelicon, P., Simcic, J., Budnar, M., and Bele, M. Microstructure analysis of metal-effect coatings. *Surface Coatings International Part B: Coatings Transactions*, 85, 2 (2002.), 115-121.
- 42 Kunaver, M., Mozetič, M., and Klanjšek-Gunde, M. Selective plasma etching of powder coatings. *Thin solid films*, 459, 1-2 (2004.), 115-117.
- 43 Hassanien, A., Tokumoto, M., Umek, P. et al. Selective etching of metallic single-wall carbon nanotubes with hydrogen plasma. *Nanotechnology*, 16, 2 (2005.), 278.
- 44 Zaplotnik, R. and Vesel, Al. Radiofrequency induced plasma in large-scale plasma reactor. *Mater. tehnol.*, 45, 3 (2011.), 227-31.
- 45 Mihovsky, M. Thermal plasma application in metallurgy. *Journal of the University of Chemical Technology and Metallurgy*, 45, 1 (2010.), 3-18.

- 46 Heberlein, J. and Murphy, A. B. Thermal plasma waste treatment. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 41, 5 (2008.), 053001.
- 47 Fridman, A. *Plasma chemistry*. Cambridge university press, 2008.
- 48 d'Agostino, R., Favia, P., Kawai, Y., Ikegami, H., Sato, N., and Arefi-Khonsari, F. *Advanced Plasma Technology*. Wiley, Weinheim, 2008.
- 49 Laroussi, M. Sterilization of contaminated matter with an atmospheric pressure plasma. *IEEE Transactions on plasma science*, 24, 3 (1996.), 1188-1191.
- 50 Laroussi, M. Low-temperature plasma jet for biomedical applications: a review. *IEEE transactions on plasma science*, 43, 3 (2015.), 703-712.
- 51 Fridman, G., Peddinghaus, M., Balasubramanian, M., Ayan, H., Fridman, A., Gutsol, A., and Brooks, A. Blood coagulation and living tissue sterilization by floating-electrode dielectric barrier discharge in air. *Plasma Chemistry and plasma processing*, 26 (2006.), 425-442.
- 52 Mendis, D. A., Rosenberg, M., and Azam, F. A note on the possible electrostatic disruption of bacteria. *IEEE transactions on plasma science*, 28, 4 (2000.), 1304-1306.
- 53 Stoffels, E., Sakiyama, Y., and Graves, D. B. Cold atmospheric plasma: charged species and their interactions with cells and tissues. *IEEE Transactions on plasma science*, 36, 4 (2008.), 1441-1457.
- 54 Šantak, V. *Utjecaj atmosferske plazme na tvrda zubna tkiva. Doktorska disertacija*. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2016.
- 55 Park, B. J., Lee, D. H., Park, J. C. et al. Sterilization using a microwave-induced argon plasma system at atmospheric pressure. *Physics of Plasmas*, 10, 11 (2003.), 4539-4544.

- 56 Lee, K. Y., Park, B. J., Lee, D. H., Lee, I. S., Hyun, S. O., Chung, K. H., and Park, J. C. Sterilization of Escherichia coli and MRSA using microwave-induced argon plasma at atmospheric pressure. *Surface and Coatings Technology*, 193, 1-3 (2005.), 35-38.
- 57 Kostov, K. G, Rocha, V, Koga-Ito, C. Y et al. Bacterial sterilization by a dielectric barrier discharge (DBD) in air. *Surface and Coatings Technology*, 204, 18-19 (2010.), 2954-2959.
- 58 Wolf, H. F., Rateitschak-Pluss, E. M., and Rateitschak, K. H. *Parodontologija. 3. izdanje*. Naklada Slap, Jastrebarsko, 2009.
- 59 Fillingham, Y. and Jacobs, J. Bone grafts and their substitutes. *The bone & joint journal*, 98, 1 (2016.), 6-9.
- 60 Misch, C. E. and Dietsch, F. Bone-grafting materials in implant dentistry. *Implant dentistry*, 2, 3 (1993.), 158-166.
- 61 Kumar, P., Vinitha, B., and Fathima, G. Bone grafts in dentistry. *Journal of pharmacy & bioallied sciences*, 5 (2013.), S125.
- 62 Saima, S., Jan, S. M., Shah, A. F., Yousuf, A., and Batra, M. Bone grafts and bone substitutes in dentistry. *Journal of Oral Research and Review*, 8, 1 (2016.), 36-38.
- 63 Sheikh, Z., Hamdan, N., Ikeda, Y., Grynepas, M., Ganss, B., and Glogauer, M. Natural graft tissues and synthetic biomaterials for periodontal and alveolar bone reconstructive applications: a review. *Biomaterials research*, 21, 1 (2017.), 1-20.
- 64 Strasser, V. and Dutour Sikirić, M. Bone Regeneration With Ceramics Scaffold. *Encyclopedia of Materials: Technical Ceramics and Glasses* (2021.), 646-661.
- 65 Tadic, D. and Epple, M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials*, 25, 6 (2004.), 987-994.

- 66 Ebrahimi, M., Botelho, M. G., and Dorozhkin, S. V. Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact of standardization of study protocols in biomaterials research. *Materials Science and Engineering: C*, 71 (2017.), 1293-1312.
- 67 Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates (CaPO₄): occurrence and properties. *Progress in biomaterials*, 5, 1 (2016.), 9-70.
- 68 Barone, A. W., Andreana, S., and Dziak, R. Current use of calcium sulfate bone grafts. *Medical Research Archives*, 8, 11 (2020.).
- 69 Pecora, G., Andreana, S., Margarone III, J. E., Covani, U., and Sottosanti, J. S. Bone regeneration with a calcium sulfate barrier. *Oral surgery, Oral medicine, Oral pathology, Oral radiology, and Endodontology*, 84, 4 (1997.), 424-429.
- 70 Rodríguez-Sendra, J., Jiménez, N., Picó, R., Faus, J., and Camarena, F. Monitoring the setting of calcium sulfate bone-graft substitute using ultrasonic backscattering. *IEEE transactions on ultrasonics, ferroelectrics, and frequency control*, 66, 10 (2019.), 1658-1666.
- 71 Strocchi, R., Orsini, G., Iezzi, G., Scarano, A., Rubini, C., Pecora, G., and Piattelli, A. Bone regeneration with calcium sulfate: evidence for increased angiogenesis in rabbits. *Journal of oral implantology*, 28, 6 (2002.), 273-278.
- 72 Beuerlein, M. J. and McKee, M. D. Calcium sulfates: what is the evidence? *Journal of orthopaedic trauma*, 24 (2010.), 46-51.
- 73 Kontrec, J., Kralj, D., and Brečević, Lj. Transformation of anhydrous calcium sulphate into calcium sulphate dihydrate in aqueous solutions. *Journal of crystal growth*, 240, 1-2 (2002.), 203-211.

- 74 Gilbert Jr., R. L. Stability of Calcium Sulfate Hydrates in Wet-Process Phosphoric Acid. *Industrial & Engineering Chemistry Process Design and Development*, 6, 3 (1967.), 371-374.
- 75 Christensen, A. N., Olesen, M., Cerenius, Y., and Jensen, T. R. Formation and transformation of five different phases in the CaSO₄- H₂O system: crystal structure of the subhydrate β-CaSO₄· 0.5 H₂O and soluble anhydrite CaSO₄. *Chemistry of Materials*, 20, 6 (2008.), 2124-2132.
- 76 Freyer, D. and Voigt, W. Crystallization and phase stability of CaSO₄ and CaSO₄- based salts. *Monatshefte für Chemie/Chemical Monthly*, 134 (2003.), 693-719.
- 77 Fu, H., Jia, C., Chen, Q., and Jiang, G. Calcium sulfate polymorph evolution dominated by competitive nucleation in gypsum metastable zone. *Journal of Crystal Growth*, 470 (2017.), 143-148.
- 78 Ahmet, S., Alper Gultekin, B., Karabuda, Z. C., and Olgac, V. Two composite bone graft substitutes for maxillary sinus floor augmentation: histological, histomorphometric, and radiographic analyses. *Implant Dentistry*, 3 (2016.), 313-321.
- 79 Bagoff, R., Mamidwar, S., Chesnoiu-Matei, I., Ricci, J. L., Alexander, H., and Tovar, N. M. Socket preservation and sinus augmentation using a medical grade calcium sulfate hemihydrate and mineralized irradiated cancellous bone allograft composite. *Journal of Oral Implantology*, 39, 3 (2013.), 363-371.
- 80 Damien, C. J. and Parsons, J. R. Bone graft and bone graft substitutes: A review of current technology and applications. *Journal of applied biomaterials*, 2, 3 (1991.), 187-208.
- 81 Harris, R. J. Clinical evaluation of a composite bone graft with a calcium sulfate barrier. *Journal of periodontology*, 75, 5 (2004.), 685-692.
- 82 Jinno, Y., Jimbo, R., Hjalmarsson, J., Johansson, K., Stavropoulos, A., and Becktor, J. P. Impact of surface contamination of implants with saliva during placement in augmented

- bone defects in sheep calvaria. *British journal of oral and maxillofacial surgery*, 51, 1 (2019.), 41-46.
- 83 Lombardo, G., Corrocher, G., Rovera, A., Pighi, J., Marincila, M., Lehrberg, J., and Nocini, P. F. Decontamination using desiccant with air powder abrasion followed by biphasic calcium sulfate grafting: a new treatment for peri-implantitis. *Case Reports in Dentistry*, 2015 (2015.), 474839.
- 84 Turri, A. and Dahlin, C. Comparative maxillary bone-defect healing by calcium-sulphate or deproteinized bovine bone particles and extra cellular matrix membranes in a guided bone regeneration setting: an experimental study in rabbits. *Clinical Oral Implants Research*, 26, 5 (2014.), 501-506.
- 85 Machtei, E. E., Rozitsky, D., Zigon-Giladi, H., and Levin, L. Bone preservation in dehiscence-type defects using composite biphasic calcium sulfate plus biphasic hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate graft: A histomorphometric case series in canine mandible. *Implant dentistry*, 22, 6 (2013.), 590-595.
- 86 Mayer, Y., Zigon-Giladi, H., and Machtei, E. E. Ridge preservation using composite alloplastic materials: a randomized control clinical and histological study in humans. *Clinical implant dentistry and related research*, 18, 6 (2016.), 1163-1170.
- 87 Kim, J., Bhattacharyya, S., and Ducheyne, P. *Bioactive Ceramics and Bioactive Ceramic Composite Based Scaffolds*. Elsevier, 2011.
- 88 Xiao, Z., Wang, Z., Yang, B., and Zhang, X. Bioceramic scaffolds. In Ma, P.X, ed., *Biomaterials and Regenerative Medicine*. Cambridge University Press, Cambridge, 2013.
- 89 Boanini, E., Gazzano, M., and Bigi, A. Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature. *Acta Biomaterialia*, 6, 6 (2010.), 1882-1894.
- 90 Prem, V. S. and Chandra, S. Calcium phosphates as drug delivery system. *Journal of Biomaterials and Tissue Engineering*, 2, 4 (2012.), 269-279.

- 91 Sahdev, P., Podaralla, S., Kaushik, R. S., and Perumal, O. Calcium phosphate nanoparticles for transcutaneous vaccine delivery. *Journal of Biomedical Nanotechnology*, 9, 1 (2013.), 132-141.
- 92 Donghyun, L., Kalpesh, U., and Prashant, N. K. Nano-sized calcium phosphate (CaP) carriers for non-viral gene delivery. *Materials Science and Engineering B*, 177, 3 (2012.), 289-302.
- 93 Keshri, A. K. and Agarwal, A. Plasma processing of nanomaterials for functional applications-A review. *Nanoscience and Nanotechnology Letters*, 4, 3 (2012.), 228-250.
- 94 Ezhaveni, S., Yuvakkumar, R., Rajkumar, M., Sundaram, N. M., and Rajendran, V. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite nanomaterials for liver cancer cell treatment. *Journal of Nanoscience and Nanotechnology*, 13, 3 (2013.), 1631-1638.
- 95 Hench, L. L. *An Introduction to Bioceramics*. World Scientific Book, 1993.
- 96 Bertazzo, S., Zambuzzi, W. F., Campos, D. D. P., Ogeda, T. L., Ferreira, C. V., and Bertran, C. A. Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 78, 2 (2010.), 177-184.
- 97 Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, 2, 2 (2009.), 399-498.
- 98 Omema, U., Khalid, H., and Chaudhry, A. A. Magnesium-substituted hydroxyapatite. In *Woodhead Publishing series in Biomaterials*. Woodhead Publishing, 2020.
- 99 Ratner, B. D., Hoffman, A. S., Schoen, F. J., and Lemons, J. E. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Elsevier, 2004.
- 100 Cacciotti, I. Multisubstituted hydroxyapatite powders and coatings: The influence of the codoping on the hydroxyapatite performances. *International Journal of Applied Ceramic Technology*, 5 (2019.), 1864-1884.

- 101 LeGeros, R. Z. Calcium Phosphates in Oral Biology and Medicine. In *Monograph in Oral Science*. Karger, Basel, 1991.
- 102 Kazakova, G., Safronova, T., Golubchikov, D., Shevtsova, O., and Rau, J. V. Resorbable Mg²⁺-containing phosphates for bone tissue repair. *Materials*, 14, 17 (2021.), 4857.
- 103 Omema, U., Khalid, H., and Chaudhry, A. A. Magnesium-substituted hydroxyapatite. In *Handbook of Ionic Substituted Hydroxyapatites*. Woodhead Publishing, Sawston, UK, 2020.
- 104 Castiglioni, S, Cazzaniga, A, Albisetti, W, and Maier, J. Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions. *Nutrients*, 5, 8 (2013.), 3022-3033.
- 105 Lin, S. H., Zhang, W. J., and Jiang, X. Q. Applications of bioactive ions in bone regeneration. *Chin J Dent Res*, 22, 2 (2019.), 93-104.
- 106 Landi, E., Tampieri, A., Mattioli-Belamonte, M. et al. Biomimetic Mg- and Mg₂CO₃-substituted hydroxyapatites: synthesis characterization and in vitro behaviour. *Journal of the European Ceramic Society*, 13 (2005), 2593-2601.
- 107 Ikeya, M. *New Applications of Electron Spin Resonance*. World Scientific, 1993.
- 108 Ishii, H. and Ikeya, M. Defects in synthesized apatite powder and sintered material. *Applied Radiation and Isotopes*, 44 (1993), 95-100.
- 109 Callens, F. J., Verbeeck, R. M. H., Matthys, P. F. A., Martens, L. C., Boesman, E. R., and Driessens, F. C. M. The ESR spectrum near g= 2 of carbonated calciumapatites synthesized at high temperature. *Bulletin des Sociétés Chimiques Belges*, 95, 8 (1986.), 589-596.
- 110 Boskey, A. L. and Robey, P. G. The composition of bone. In Clifford, J. Rosen, ed., *Primer on the metabolic bone diseases and disorders of mineral metabolism*. Wiley, 2013.

- 111 Ott, S. M. Bone Biology and Effects of Pharmaceutical Intervention on Bone Quality. In *Materials for Bone Disorders*. Academic Press, 2017.
- 112 Abragam, A. and Pryce, M. H. L. Theory of the nuclear hyperfine structure of paramagnetic resonance spectra in crystals. *Royal Society of London. Series A. Mathematical and Physical Sciences*, 205, 1080 (1951.), 135-153.
- 113 Schweiger, A. and Jeschke, G. *Principles of Pulse Electron Paramagnetic Resonance*. Oxford University Press, 2001.
- 114 Weil, J. A., Bolton, J. R., and Wertz, J. E. *Electron paramagnetic resonance*. Wiley, New York, 1994.
- 115 Atherton, N. M. *Principles of Electron Spin Resonance*. Ellis Horwood Limited, Chichester, 1993.
- 116 Mariano, N. A., Oliveira, R. G., Fernandes, M. A., and Rigo, E. C. S. Corrosion behavior of pure titanium in artificial saliva solution. *Matéria (Rio de Janeiro)*, 14 (2009.), 878-880.
- 117 Chamary, S., Hautceour, D., Hornez, J., Leriche, A., and Cambier, F. Bio-inspired hydroxyapatite dual core-shell structure for bone substitutes. *Journal of the European Ceramic Society*, 37, 16 (2017.), 5321-5327.
- 118 Vidotto, M., Grego, T., Petrović, B. et al. A Comparative EPR Study of Non-Substituted and Mg-Substituted Hydroxyapatite Behaviour in Model Media and during Accelerated Ageing. *Crystals*, 2 (2022.), 297.
- 119 Stoll, S. and Schweiger, A. EasySpin, a comprehensive software package for spectral simulation and analysis in EPR. *Journal of Magnetic Resonance*, 178, 1 (2006.), 42-55.
- 120 Stoll, S. *Spectral Simulations in Solid-State Electron Paramagnetic Resonance*. ETH Zürich, PhD thesis no. 15059, 2003.

LITERATURA

- 121 Stoll, S. and Schweiger, A. An adaptive method for computing resonance fields for continuous-wave EPR spectra. *Chemical Physics Letters*, 380, 3-4 (2003.), 464-470.
- 122 Gunzler, H. and Gremlich, H. U. *IR Spectroscopy*. Wiley-VCH, Weinheim, 2002.
- 123 Erceg, I. *Utjecaj aminokiselina na spontano taloženje kalcijevih fosfata*. Diplomski rad. Repozitorij Prirodoslovno-matematičkog fakulteta, Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2017.
- 124 Erceg, I. *Biomimetska sinteza i karakterizacija nanokompozita kalcijevih fosfata i titanatnih nanomaterijala*. Doktorska disertacija. Sveučilište u Zagrebu, Zagreb, 2022.
- 125 Larkin, P. *Infrared and Raman spectroscopy: principles and spectral interpretation*. Elsevier, 2017.
- 126 Kurajica, S. *Rendgenska difrakcija na prahu*. Hrvatsko društvo kemijskih inženjera i tehnologa, Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020.
- 127 Redfern, J. P. A. C. and Coats, A. Thermogravimetric analysis. *Analyst* (1963.), 906-924.
- 128 Wagner, M. *Thermal analysis in practice: fundamental aspects*. Carl Hanser Verlag GmbH Co KG, Munich, 2017.
- 129 Russell, P., Batchelor, D., and Thornton, J. SEM and AFM: complementary techniques for high resolution surface investigations. *European Microscopy and Analysis*, 7 (2001.), 17-20.
- 130 Majer, M., Roguljić, M., Knežević, Ž., Starodumov, A., Ferenček, D., Brigljević, V., and Mihaljević, B. Dose mapping of the panoramic ⁶⁰Co gamma irradiation facility at the Ruđer Bošković Institute – Geant4 simulation and measurements. *Applied Radiation and Isotopes*, 154 (2019.).

- 131 Vujošević, D, Mozetič, M, Cvelbar, U, Krstulović, N, and Milošević, S. Optical emission spectroscopy characterization of oxygen plasma during degradation of Escherichia coli. *Journal of applied physics*, 101, 10 (2007), 103305.
- 132 INTERNATIONAL ATOMIC ENERGY AGENCY. *Radiation Sterilization of Tissue Allografts: Requirements for Validation and Routine Control a Code of Practice*. International Atomic Energy Agency (IAEA), Vienna, 2007.
- 133 Lanzón, M. and García-Ruiz, P. A. Effect of citric acid on setting inhibition and mechanical properties of gypsum building plasters. *Construction and Building Materials*, 28, 1 (2012.), 506-511.
- 134 Clifton, J. R. Thermal analysis of calcium sulfate dihydrate and supposed alpha and beta forms of calcium sulfate hemihydrate from 25 to 500 °C. *Journal of Research of the National Bureau of Standards-A. Physics and Chemistry*, 76A, 1 (1972.), 41-49.
- 135 Schellmann, G. and Radtke, U. Problems encountered in the determination of dose and dose rate in ESR dating of mollusc shells. *Quaternary Science Reviews*, 18, 13 (1999.), 1515-1527.
- 136 Strzelczak, G., Vanhaelewyn, G., Stachowicz, W., Goovaerts, E., Callens, F., and Michalik, J. Multifrequency EPR study of carbonate-and sulfate-derived radicals produced by radiation in shells and corallite. *Radiation Research*, 155, 4 (2001.), 619-624.
- 137 Wencka, M., Lijewski, S., and Hoffmann, S. K. Dynamics of CO₂⁻ radiation defects in natural calcite studied by ESR, electron spin echo and electron spin relaxation. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 20, 25 (2008.), 255237.
- 138 Aydas, C., Engin, B., Kapan, S., Komut, T., Aydin, T., and Paksu, U. Dose estimation, kinetics and dating of fossil marine mollusc shells from northwestern part of Turkey. *Applied Radiation and Isotopes*, 105 (2015.), 72-79.

- 139 Dhabekar, B., Menon, S., Raja, A. E., Sanaye, S.S., Rao, G. T.K., Bhatt, B. C., and Kher, R. K. ESR and TL mechanism in CaSO₄ : Ag co-doped phosphors. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 39, 12 (2006.), 2488.
- 140 Nagar, Y. C., Sastry, M. D., Bhushan, B. et al. Chronometry and formation pathways of gypsum using Electron Spin Resonance and Fourier Transform Infrared Spectroscopy. *Quaternary Geochronology*, 5, 6 (2010.), 691-704.
- 141 Marfunin, A. S. Spectroscopy, Luminescence and Radiation Centers in Minerals. In *Electron paramagnetic resonance*. Springer, Berlin, Heidelberg, 1979.
- 142 Wiley, J. D. The Effect of Ionic Strength on the Solubility of an Electrolyte. *Journal of Chemical Education*, 11 (2004.), 1644.
- 143 Sharma, A., Pruden, A., Stan, O., and Colins, G. J. Bacterial Inactivation Using an RF-Powered Atmospheric Pressure Plasma. *IEEE Transactions on Plasma Science*, 34, 4 (2006.), 1290-1296.
- 144 Rahul, R., Stan, O., Rahman, A. et al. Optical and RF electrical characteristics of atmospheric pressure open-air hollow slot microplasmas and application to bacterial inactivation. *Journal of Physics D: Applied Physics*, 38, 11 (2005.), 1750.
- 145 Purevdorj, D., Igura, N., Ariyada, O., and Hayakawa, I. Effect of feed gas composition of gas discharge plasmas on *Bacillus pumilus* spore mortality. *Letters in Applied Microbiology*, 37, 1 (2003.), 31-34.
- 146 Hury, S., Vidal, D. R., Desor, F., Pelletier, J., and Lagarde, T. A parametric study of the destruction efficiency of *Bacillus* spores in low pressure oxygen-based plasmas. *Letters in Applied Microbiology*, 26, 6 (1998.), 417-421.
- 147 Hong, Y. F., Kang, J. G., Lee, H. Y., Uhm, H. S., Moon, E., and Park, Y. H. Sterilization effect of atmospheric plasma on *Escherichia coli* and *Bacillus subtilis* endospores. *Letters in Applied Microbiology*, 48, 1 (2009.), 33-37.

- 148 Shintani, H., Sakudo, A., Burke, P., and McDonnell, G. Gas plasma sterilization of microorganisms and mechanisms of action. *Experimental and Therapeutic Medicine* (2010.), 731-738.
- 149 Puač, N., Miletić, M., Mojović, M. et al. Sterilization of bacteria suspensions and identification of radicals deposited during plasma treatment. *Open Chemistry* (2015.), 332-338.
- 150 Cacciotti, I., Bianco, A., Lombardi, M., and Montanaro, L. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour. *Journal of the European Ceramic Society*, 29, 14 (2009.), 2969-2978.
- 151 Kannan, S., Lemos, I. A. F., Rocha, J.H.G., and Ferreira, J. M. F. Synthesis and characterization of magnesium substituted biphasic mixtures of controlled hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Journal of Solid State Chemistry*, 178 (2005.), 3190-3196.
- 152 Stipniece, L., Salma-Ancane, K., Borodajenko, N., Sokolova, M., Jakovlevs, D., and Berzina-Cimdina, L. Characterization of Mg-substituted hydroxyapatite synthesized by wet chemical method. *Ceramics International*, 40, 2 (2014.), 3261-3267.
- 153 Dorozhkin, S. V. Calcium Orthophosphates in Nature, Biology and Medicine. *Materials*, 2, 2 (2009.), 399-498.
- 154 Buljan Meić, I., Kontrec, J., Domazet Jurašin, D. et al. Comparative study of calcium carbonates and calcium phosphates precipitation in model systems mimicking the inorganic environment for biomineralization. *Crystal Growth & Design*, 17, 3 (2017.), 1103-1117.
- 155 Farzadi, A., Bakhshi, F., Solani-Hashjin, M., Asadi-Eydivand, M., and Azuan abu Osman, N. Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization. *Ceramics International*, 40, 4 (2014.), 6021-6029.

- 156 Suchanek, W. L., Byrappa, K., Shuk, P., Riman, R. E., Janas, V. F., and Ten Huisen, K. S. Preparation of magnesium-substituted hydroxyapatite powders by the mechanochemical–hydrothermal method. *Biomaterials*, 25, 19 (2004.), 4647-4657.
- 157 Koutsopoulos, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite crystals: A review study on the analytical methods. *Journal of Biomedical Materials Research*, 62, 4 (2002.), 600-612.
- 158 Spiro, S., Tampieri, A., Landi, E., Sandri, M., Martorana, S., Celotti, G., and Logroscino, G. Physico-chemical properties and solubility behaviour of multi-substituted hydroxyapatite powders containing silicon. *Materials Science and Engineering: C*, 28, 1 (2008.), 179-187.
- 159 Buljan Meić, I., Kontrec, J., Domazet Jurašin, D. et al. How similar are amorphous calcium carbonate and calcium phosphate? A comparative study of amorphous phase formation conditions. *CrystEngComm*, 20, 1 (2018.), 35-50.
- 160 Baran, I. P., Vorona, I. P., Ishchenko, S. S., Nosenko, V. V., Zatovskii, I. V., Gorodilova, N. A., and Povarchuk, V. Y. NO₃²⁻ and CO₂-centers in synthetic hydroxyapatite: Features of the formation under γ - and UV-irradiations. *Physics of the Solid State*, 53 (2011.), 1891-1894.
- 161 Van Doorslaer, S., Moens, P., Callens, F., Matthys, P., and Verbeeck, R. 31P and 1H powder ENDOR study of ozonide radicals in carbonated apatites, synthesized from aqueous solutions. *Applied Magnetic Resonance*, 10 (1996.), 87-102.
- 162 Nosenko, V. V., Vorona, I. P., Ischenko, S. S., Baran, N. P., Zatovsky, I. V., Gorodilova, N. A., and Povarchuk, V. Y. Effect of pre-annealing on NO₃²⁻ centers in synthetic hydroxyapatite. *Radiation Measurements*, 47, 10 (2012.), 970-973.

- 163 Vorona, I. P., Ischenko, S. S., Baran, N. P., Rudko, V. V., Zatovskii, I. V., Gorodilova, N. A., and Povarchuk, V. Y. NO₃²⁻-centers in synthetic hydroxyapatite. *Physics of the Solid State*, 52 (2010.), 2364-2368.
- 164 Kusrini, E. and Sontang, M. Characterization of x-ray diffraction and electron spin resonance: Effects of sintering time and temperature on bovine hydroxyapatite. *Radiation Physics and Chemistry*, 81, 2 (2012.), 118-125.
- 165 Wang, L. and Nancollas, G. H. Calcium orthophosphates: crystallization and dissolution. *Chemical Reviews*, 108, 11 (2008.), 4628-4669.
- 166 Ren, F., Leng, Y., Xin, R., and Ge, X. Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite. *Acta Biomaterialia*, 6, 7 (2010.), 2787-2796.
- 167 Cox, S. C., Jamshidi, P., Grover, L. M., and Mallick, K. K. Preparation and characterisation of nanophase Sr, Mg, and Zn substituted hydroxyapatite by aqueous precipitation. *Materials Science and Engineering: C*, 35, 1 (2014.), 106-114.
- 168 Rudko, V. V., Baran, N. P., Vorona, I. P., Ischenko, S. S., Okulov, S. M., and Chumakova, L. S. Structure and properties of CO₂⁻ centers in biological and synthetic hydroxyapatite. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, 15, 1 (2010.), 012032.
- 169 Park, J. *Bioceramics Properties, Characterizations, and Applications*. Springer, New York, 2008.
- 170 Lazić, S., Zec, S., Miljević, N., and Milonjić, S. The effect of temperature on the properties of hydroxyapatite precipitated from calcium hydroxide and phosphoric acid. *Thermochimica Acta*, 374, 1 (2001.), 13-22.
- 171 Bertoni, E., Bigi, A., Cojazzi, G., Gandolfi, M., Panzavolta, S., and Roveri, N. Nanocrystals of magnesium and fluoride substituted hydroxyapatite. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 72, 1-2 (1998.), 29-35.

- 172 Zyman, Z., Takachenko, M., Epple, M., Polyakov, M., and Naboka, M. Magnesium-substituted hydroxyapatite ceramics. *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*, 37, 6 (2006.), 474-477.
- 173 Suciu, O., Ioanovici, T., and Bereteu, L. Mechanical properties of hydroxyapatite doped with magnesium, used in bone implants. *Applied Mechanics and Materials*, 430 (2013.), 222-229.
- 174 Vorona, I. P., Ischenko, S. S., and Baran, N. P. The effect of thermal treatment on radiation-induced EPR signals in tooth enamel. *Radiation Measurements*, 39, 2 (2005.), 137-141.
- 175 Kis, V. K., Sulyok, A., Hegedus, M., Kovacs, I., Rozsa, N., and Kovacs, Z. Magnesium incorporation into primary dental enamel and its effect on mechanical properties. *Acta Biomaterialia*, 120 (2021), 104-115.
- 176 Ishchenko, S. S., Vorona, I. P., Baran, N. P., Okulov, S. M., and Rudko, V. V. Thermally induced changes of the carbonate structure in biological hydroxyapatite studied by EPR and ENDOR. *Ukrainian Journal of Physics*, 54, 3 (2009.), 231-237.
- 177 Beshah, K., Glimcher, M. J., Schimizu, M., and Griffin, R. G. Solid state carbon-13 and proton NMR studies of carbonate-containing calcium phosphates and enamel. *Journal of Solid State Chemistry*, 84, 1 (1990.), 71-81.

8 ŽIVOTOPIS

Osobni podaci

- ime i prezime: Timor Grego
- datum i mjesto rođenja: 6. 12. 1984, Rijeka
- adresa: Zadarska 73, 10000 Zagreb
- e-mail: timorgrego@gmail.com

Obrazovanje

- 2011. - : Doktorski studij iz medicinske fizike, Prirodoslovno-matematički fakultet, Fizički odsjek
- 2003. - 2010: Diplomirani inženjer fizike, Prirodoslovno-matematički fakultet, Fizički odsjek
- 1999. - 2003: Gimnazija Andrije Mohorovičića Rijeka, prirodoslovno matematički smjer

Radno iskustvo

- 2010. - danas: Medicinski fizičar, Klinički bolnički centar Zagreb
- 2018. - danas: Viši stručni savjetnik, Odjel zaštite na radu, zaštite od požara i zaštite od zračenja, Institut Ruđer Bošković

Objavljeni znanstveni radovi

- Turjanski, Sarah; Par, Matej; Bergman, Lana; Soče, Majana; Grego, Timor; Klarić Sever, Eva, *Influence of Ionizing Radiation on Fluoride-Releasing Dental Restorative Materials*, Polymers, 15 (2023), 632, 17 doi:10.3390/polym15030632
- Klarić, Eva; Tarle, Andro; Vukelja, Josipa; Soče, Majana; Grego, Timor; Janković, Bernard, *Remineralization effects of Er,Cr:YSGG and/or bioactive glass on human enamel after radiotherapy-an in vitro study*, Lasers in medical science, 38 (2023), 65, 12 doi:10.1007/s10103-023-03726-0

- Vidotto, Monica*; Grego, Timor*; Petrović, Božana; Somers, Nicolas; Antonić Jelić, Tatjana; Kralj, Damir; Matijaković Mlinarić, Nives; Leriche, Anne; Dutour Sikirić, Maja; Erceg, Ina; Maltar-Strmečki, Nadica, *A Comparative EPR Study of Non-Substituted and Mg-Substituted Hydroxyapatite Behaviour in Model Media and during Accelerated Ageing*, Crystals, 12 (2022), 2; 297, 15 doi:10.3390/cryst12020297, *jednaki doprinos autora
- Klarić Sever, Eva; Tarle, Andro; Vukelja, Josipa; Soče, Majana; Grego, Timor, *Direct Induced Effects of Standard and Modified Radiotherapy Protocol on Surface Structure of Hard Dental Tissue*, Acta stomatologica Croatica, 55 (2021), 4; 335-345 doi:10.15644/asc55/4/1
- Klarić Sever, Eva; Tarle, Andro; Soče, Majana; Grego, Timor, *Direct Radiotherapy-Induced Effects on Dental Hard Tissue in Combination With Bleaching Procedure*, Frontiers in Dental Medicine, 2 (2021), 714400, 13 doi:10.3389/fdmed.2021.714400
- Grego, Timor; Jurković, Lara; Lyons, Daniel Mark; Kralj, Damir; Maltar-Strmečki, Nadica, *The influence of the saline and artificial saliva on gamma induced radical concentration in dental bone graft materials based on calcium sulfate studied by EPR spectroscopy*, Radiation physics and chemistry, 177 (2020), 109138, 8 doi:10.1016/j.radphyschem.2020.109138
- Bišof, Vesna; Rakušić, Zoran; Bibić, Juraj; Grego, Timor; Soče, Majana, *Comparison of intensity modulated radiotherapy with simultaneous integrated boost (IMRT-SIB) and a 3-dimensional conformal parotid gland- sparing radiotherapy (ConPas 3D-CRT) in treatment of nasopharyngeal carcinoma: a mono- institutional experience*, La radiologia medica, 123 (2017), 3; 217-226 doi:10.1007/s11547-017-0824-9
- Hršak, Hrvoje; Majer, Marija; Grego, Timor; Bibić, Juraj; Heinrich, Zdravko, *Correction of measured Gamma-Knife output factors for angular dependence of diode detectors and PinPoint ionization chamber*, Physica medica, 30 (2014), 8; 914-919 doi:10.1016/j.ejmp.2014.09.002

Sažeci u zbornicima skupova

- Klarić, Eva; Špiljak, Bruno; Šimunović, Luka; Majana, Soče; Grego, Timor; Par, Matej, *Influence of ionizing radiation on restorative materials with fluoride release effect* PER IADR Abstract book , Marseille, Francuska, 2022. str. 265-265
- Vidotto, Monica; Erceg, Ina; Grego, Timor; Chamaray, Shaan; Antonić Jelić, Tatjana; Lasgorcei, Marie; Leriche, Anne; Čolović, Božana; Dutour Sikirić, Maja; Maltar-Strmečki, Nadica, *Thermal stability of gamma radiation induced radicals in ion-substituted hydroxyapatites*, 27th Croatian Meeting of Chemists and Chemical Engineers and 5th Symposium Vladimir Prelog : Book of Abstracts, Zagreb: Croatian Chemical Society, 2021. str. 384-384
- Klarić Sever, Eva; Tarle, Andro; Soče, Majana; Grego, Timor , *Direct radiotherapy induced effects on dental hard tissue*, Acta stomatologica Croatica, Zagreb, 2021. str. 218-219
- Vidotto, Monica; Grego, Timor; Erceg, Ina; Čolović, Božana; Dutour Sikirić, Maja; Maltar-Strmečki, Nadica, *Effects of saline solution and simulated body fluid on ion substituted hydroxyapatites EPR spectra*, Ninth international conference on radiation in various fields of research : book of abstracts, Niš: RAD Centre, 2021. str. 12-12 doi:10.21175/rad.abstr.book.2021.4.3
- Grego, Timor; Erceg, Ina; Čolović, Božana; Dutour Sikirić, Maja; Maltar-Strmečki, Nadica, *OSL study of ion substituted hydroxyapatites*, Book of Abstracts, 8th International Conference on Radiation in Various Field of Research, Herceg Novi, Crna Gora, 2020. 549, 1
- Grego, Timor; Čolović, Božana; Erceg, Ina; Dutour Sikirić, Maja; Maltar-Strmečki, Nadica, *EPR study of ion substituted hydroxy apatites*, Molecular Biophysics: ABC of the puzzle of Life, Book of Abstracts ; March 18-20, 2019, Zagreb, Croatia: Ruđer Bošković Institute; Croatian Biophysical Society, 2019. str. 103-104
- Grego, Timor; Štajner, Lara; Kralj, Damir; Maltar-Strmečki, Nadica, *Role of EPR spectroscopy in synthesis and sterilization of dental bone graft materials based on calcium sulfate*, 14th Greta Pifat Mrzljak International School of Biophysics "ABC of

- Physics of Life" : Book of Abstracts, Zagreb: Ruđer Bošković Institute ; Croatian Biophysical Society, 2018. str. 54-54
- Grego, Timor; Maltar-Strmečki, Nadica , *Role of EPR spectroscopy in synthesis and sterilization of dental bone graft materials*, The Joint International Symposium on EPR dosimetry and dating (EPR) and the International Conference on Biological Dosimetry (BioDose) : Abstracts, Munich: Helmholtz Centre Munich, 2018. str. 144-144
 - Grego, Timor; Maltar-Strmečki, Nadica , *Spektroskopija metodom elektronske paramagnetske rezonancije pri postupku sterilizacije sintetičkih dentalnih koštanih nadomjestaka*, Prvi simpozij studenata doktorskih studija PMF, Zagreb, Hrvatska, 26. 02. 2015., Zagreb: PMF Sveučilišta u Zagrebu, 2015. str. 26-26
 - Bibić, Juraj; Grego, Timor; Buinac, Ana; Barišić, Lovro; Hršak, Hrvoje; Kovačević, Nenad , *Evaluation of dose distribution due to setup uncertainties for bilateral head and neck radiotherapy treatment planning*, 6th Alpe-Adria Medical Physics Meeting : abstracts, Budimpešta, Mađarska, 2014.
 - Kos, Sandra; Grego, Timor; Bibić, Juraj; Barišić, Lovro; Kovačević, Nenad , *IMRT and 3D CRT DVH plan comparison for head and neck cancer treatment*, 5th Alpe-Adria Medical Physics Meeting : abstracts, Trst, 2012.
 - Murković, Miljenko; Grego, Timor; Bibić, Juraj; Buinac, Ana; Barišić, Lovro; Babić, Julijan; Hršak, Hrvoje, *Evaluation of patient specific imrt qa gamma passing rates to mlc penumbra modelling errors*, 7th Alpe Adria Medical Physics Meeting - Proceedings, Zagreb, 2016. str. 41-43. (<https://www.bib.irb.hr/899178>)
 - Hršak, Hrvoje; Majer, Marija; Grego, Timor; Bibić, Juraj; Heinrich, Zdravko, *Kutna zavisnost detektora u dozimetriji za gama- nož radiokirurgiju*, Zbornik radova 10.Simpozija Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb: HDZZ, 2015. str. 89-93
 - Grego, Timor; Hršak, Hrvoje; Majer, Marija; Bibić, Juraj; Heinrich; Zdravko, *Mjerenje profila kompozitnih raspodjela doze gama- noža - preliminarni rezultati*, 10. Simpozij Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja, Zagreb: HDZZ, 2015. str. 95-99
 - Barišić, Lovro; Grego, Timor; Bibić, Juraj; Buinac, Ana; Murković, Miljenko; Kovačević, Nenad; Babić, Julijan; Hršak, Hrvoje , *3d conformal radiation therapy (3d - crt) versus intensity modulated radiation therapy (imrt) for anal carcinoma case at uhc – zagreb*, 10. Simpozij Hrvatskog društva za zaštitu od zračenja

Stručna usavršavanja u inozemstvu

- Varian Advanced Techniques Clinical School IMRT/RapidArc, Milano, 3. 5. 2023 - 5. 5. 2023.
- Varian Advanced Techniques Physics IMRT/RapidArc, Steinhausen, 20. 9. 2023 - 23. 9. 2022.
- Train the Trainers Regional Training Course for Radiation Protection Officers, Tallinn 14. 10. 2019. - 18. 10. 2019.
- Joint ICTP-IAEA Advanced School on IAEA/AAPM Code of Practice for the Dosimetry of Static and Small Photon Fields, Trst 12. 4. 2018 - 16. 4. 2018.
- Advanced treatment planning, ESTRO training course, Barcelona 3. 9. 2017. -7. 9. 2017.
- Hands-on course on Image Guided Radiation Therapy, IN Holland training course, Haarlem 4. 4. 2017. - 8. 4. 2017.
- ESMPE European School for Medical Physics Experts -Imaging in radiotherapy, Prag 26. 1. 2017. - 28. 1. 2017.
- Volumetric Modulated Arc Therapy Treatment Planning, IN Holland training course, Haarlem 31. 10. 2016. - 4. 11. 2016.
- IMRT and other conformal techniques , ESTRO training course, Brussels 4. 10. 2015. - 8. 10. 2015.
- Dose modelling and verification for external beam radiotherapy, ESTRO training course, Barcelona 15. 3. 2015. - 19. 3. 2015.

Članstva u stručnim društvima

- Hrvatsko društvo za zaštitu od zračenja
- Hrvatsko društvo za medicinsku fiziku