

Višefazni kalcij-fosfatni keramički materijali za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva

Suknaić, Monika

Undergraduate thesis / Završni rad

2022

Degree Grantor / Ustanova koja je dodijelila akademski / stručni stupanj: **University of Zagreb, Faculty of Chemical Engineering and Technology / Sveučilište u Zagrebu, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije**

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:543873>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-22**



Repository / Repozitorij:

[Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb](#)



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Monika Suknaić

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, rujan 2022.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI STUDIJ KEMIJSKO INŽENJERSTVO

Monika Suknaić

Višefazni kalcij-fosfatni keramički materijali za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva

Završni rad

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. prof.dr.sc. Hrvoje Ivanković
2. doc.dr.sc. Anamarija Rogina
3. dr.sc. Leonard Bauer

Zagreb, rujan, 2022.

Zahvala

Zahvaljujem svojem mentoru, prof.dr.sc. Hrvoju Ivankoviću na stručnom vodstvu i prilici za izradu ovog Rada.

Najveće hvala mojoj mami, tati i baki, na svoj ljubavi, podršci, strpljenju i vodstvu koje su mi pružili tijekom dosadašnjeg života i studiranja. Bez vas ne bih uspjela.

SAŽETAK

Ovaj rad bavi se višefaznim kalcij-fosfatnim keramičkim materijalima te njihovom primjenom u inženjerstvu koštanog tkiva. Radi se o dosad nedovoljno istraženom području koje sve više zaokuplja interes stručnjaka raznih znanstvenih područja. Takvo što ne čudi imajući na umu ubrzani razvoj biomedicinske industrije povezane s težnjom svih ljudi za čim duljim i kvalitetnijim životnim vijekom.

Jedna od bitnih sastavnica ljudskog organizma jest koštano tkivo koje služi ponajprije za kretanje i zaštitu unutrašnjih organa. Ono, međutim, djelovanjem vanjskih čimbenika, genetike i bolesti često biva oštećeno uzrokujući brojne tegobe narušavajući ove temeljne funkcije. U svrhu obnove koštanog tkiva, razvilo se polje „Inženjerstvo koštanog tkiva“. Ono osmišljava i proizvodi biološke nadomjestke koji služe obnovi, poboljšanju i održavanju koštanog tkiva. Za navedenu svrhu koriste se biomaterijali (za tvrdo i meko koštano tkivo) koji oponašajući izvanstaničnu matricu omogućuju stanicama da se za njih prihvate s ciljem formiranja novog tkiva. Osim metala koji se najčešće koriste, tu su još i različiti tipovi polimera te biokeramike. Ovaj rad temelji se na pregledu dostupne literature koja proučava biokeramiku. Najčešći tip biokeramike jest kalcij-fosfatna biokeramika koja se dijeli na jednofazne i višefazne kalcij-fosfatne sustave. Da bi bili primjenjivi u inženjerstvu koštanog tkiva moraju posjedovati određene mehaničke i biološke karakteristike. Najpoznatiji predstavnici jednofazne kalcij-fosfatne biokeramike su: amorfni kalcijev fosfat (ACP), oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP), trikalcijev fosfat (TCP) i hidroksiapatit (HA). Osim jednofaznih kalcij-fosfatnih biomaterijala postoje i oni višefazni. Budući da pojedinačni kalcijevi fosfati ne pokazuju obilježje oponašanja sastava kosti s njenim svojstvima, razvijaju se višefazni kalcij-fosfatni keramički materijali. Oni, ovisno o omjeru i vrsti pojedinih faza imaju mogućnost pružanja poboljšanih bioloških svojstava.

Ključne riječi: koštano tkivo, inženjerstvo koštanog tkiva, biomaterijal, biokeramika, kalcijev fosfat, višefazni sustav

ABSTRACT

This paper deals with multiphase calcium-phosphate ceramic materials and their application in bone tissue engineering. It is a hitherto insufficiently researched area that is increasingly attracting the interest of experts in various scientific fields. This is not surprising, bearing in mind the accelerated development of the biomedical industry associated with the desire of all people for a longer and better quality of life.

One of the essential components of the human organism is the bone tissue, which serves primarily for movement and protection of internal organs. However, it is often damaged by external factors, genetics and diseases, causing numerous ailments, disrupting these fundamental functions. In order to restore bone tissue, the field of „Bone tissue engineering“ has been developed. It designs and produces biological substitutes that serve to restore, improve and maintain bone tissue. For this purpose, biomaterials (for hard and soft bone tissue) are used, which, imitating the extracellular matrix, enable cells to accept them with the aim of forming new tissue formation. In addition to the most commonly used metals, there are also different types of polymers and bioceramics. This paper is based on a review of the available literature that studies bioceramics. The most common type of bioceramics is calcium-phosphate bioceramics, which is divided into single-phase and multi-phase calcium-phosphate systems. In order to be applicable in bone tissue engineering, they must possess certain mechanical and biological characteristics. The best-known representatives of single-phase calcium-phosphate bioceramics are: amorphous calcium phosphate (ACP), octacalcium phosphate pentahydrate (OCP), tricalcium phosphate (TCP) and hydroxyapatite (HA). In addition to single-phase calcium-phosphate biomaterials, there are also multi-phase ones. Since individual calcium phosphates do not show the feature of imitation of bone composition with its properties, multiphase calcium phosphate ceramic materials are being developed. Depending on the ratio and type of individual phases, they have the possibility of providing improved biological properties.

Keywords: bone tissue, bone tissue engineering, biomaterial, bioceramics, calcium phosphate, multiphase system

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI PREGLED	1
2.1 Koštano tkivo	1
2.2. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	3
2.3. Biomaterijali.....	4
2.3.1. Kalcij- fosfatna biokeramika	7
2.3.1.1. Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	11
2.3.1.2. Oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP)	11
2.3.1.3. Trikalcijev fosfat (TCP)	12
2.3.1.4. Hidroksiapatit (HA).....	13
2.4. Višefazni sustavi.....	14
2.4.1.1. Priprema višefaznih sustava	14
2.4.1.2. Stabilnost i svojstva višefaznih sustava.....	16
2.4.1.3. Primjena višefaznih sustava	18
3. ZAKLJUČAK	18
4. LITERATURA	19
5. POPIS SIMBOLA I KRATICA	24

1. UVOD

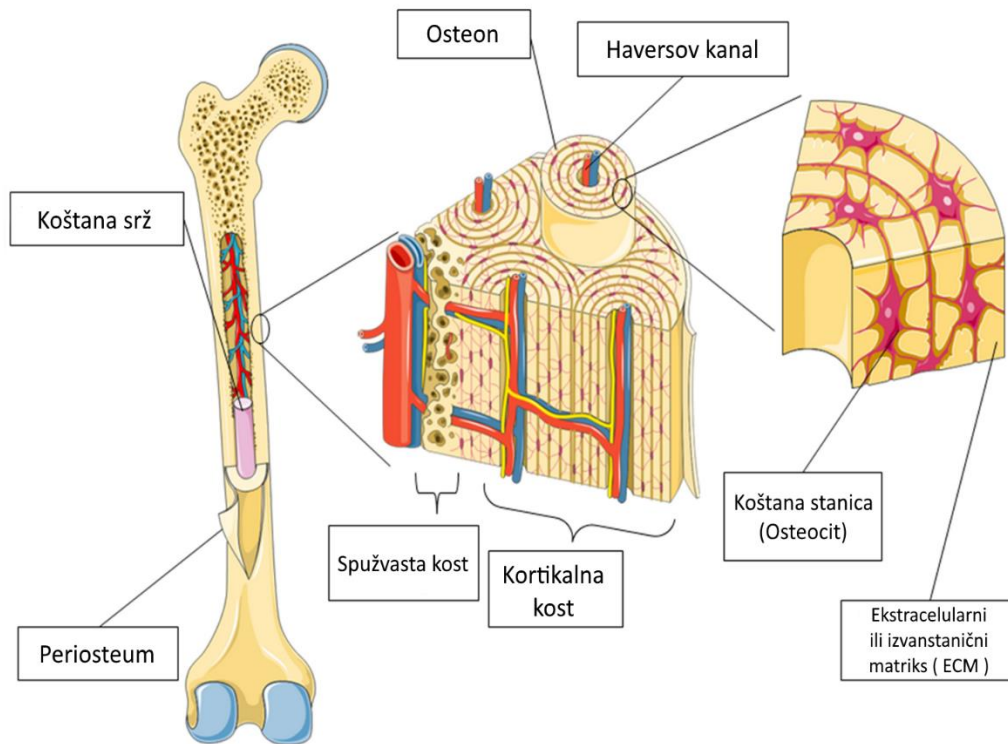
Ljudsko je tijelo sazdano od mnoštva stanica. Najnovija znanstvena istraživanja govore kako ih svaki čovjek u sebi sadrži na desetke milijardi. Stanice se međusobno prema vrsti, zajedno sa sebi sličnima, povezuju u tkiva. Pa tako svaki čovjek ima mišićno, živčano, žljezdano, koštano i mnogo drugih vrsta tkiva. Zbog određenih bolesti ili ozljeda javlja se potreba za regeneracijom ili zamjenom svojevrsnih funkcija ili tkiva u ljudskom tijelu. U tu svrhu primjenjuju se određeni biomaterijali kao što je biokeramika. Ovo se znanstveno područje, zbog očitih razloga s ciljem poboljšanja kvalitete ljudskih života kao i njihovog trajanja, sve više razvija. Tome u prilog govore i sve brojnija istraživanja u ovom području koja zaokupljaju pažnju znanstvenika diljem svijeta. Njihov je zajednički cilj pronalazak što kvalitetnijeg koštanog implantata. Ovaj rad daje pregled dosad najvažnijih ostvarenih dosega na ovom polju. Jedan od najčešćih tipova biokeramike jest kalcij- fosfatna biokeramika. Ona se dijeli na jednofazne i višefazne kalcij-fosfatne keramičke materijale. U ovom radu naglasak će biti na primjeni višefaznih kalcij – fosfatnih keramičkih materijala u koštanom tkivu te njihovim svojstvima.

2. TEORIJSKI PREGLED

2.1 Koštano tkivo

Koštano tkivo je mineralizirano potporno tkivo, a odlikuje se specifičnim biomehaničkim karakteristikama poput čvrstoće i elastičnosti. Uloga koštanog tkiva u organizmu je višestruka; omogućuje kretanje, pruža potporu i zaštitu tijela i vitalnih organa, održava homeostazu, pohranjuje minerale, podržava aktivnost proizvodnje krvi [1]. Koštano se tkivo, kao i ostale vrste tkiva, sastoji od stanica i međustanične tvari [2]. Ubraja se, prema vrsti tkiva, u vezivno tkivo kojeg karakterizira mala količina stanica i velika količina izvanstanične matrice [3]. U međustaničnoj tvari koštanog tkiva postoji organski i anorganski dio te voda. Organski dio zauzima, ovisno o izvoru od 30 do 40 %, a anorganski (mineralni) od 60 do 70 % prostora te uz vodu čine međustaničnu tvar koštanog tkiva [2]. Anorganski dio koštane matrice sastoji se od soli kalcijevih fosfata od kojih je najviše zastupljen hidroksiapatit, dok se organski dio sastoji od približno 90% kolagena tipa 1 [1]. Temeljna podjela unutar koštanog tkiva jest ona na zrelo i nezrelo. Nezrelo tkivo se u tijelu odraslog čovjeka nalazi u zubnom cementu, u području šavova lubanje, koštanom labirintu i u području insercija tetiva na kost. Drugi naziv za nezrelo koštano tkivo jest isprepletano koštano tkivo zbog sadržavanja kolagenskih vlakana

različitih debljina i usmjerenja. Ono što razlikuje nezrela koštana tkiva od zrelih je njihova veća brojnost po jedinici volumena te njihov nepravilan raspored u međustaničnoj tvari. Zrelo koštano tkivo naziva se još i lamelarno te je ono relativno zastupljenije u odraslom organizmu čovjeka u odnosu na organizme u razvoju (djeca). Za razliku od nezrelih koštanih tkiva zrela koštana tkiva karakterizira pravilnost u rasporedu elemenata međustanične tvari i stanica [2]. Razlikuju se dva oblika koštane tvari; tvrda koštana tvar i spužvasta koštana tvar [4]. Tvrda ili kompaktna koštana tvar građena je od osteona, gusto zbijenih jedinica koje su zaslužne za čvrstoću kostiju te za njenu otpornost na deformaciju. Spužvastu koštanu tvar, građenu od matričnih vlakana, karakterizira visoka poroznost i mogućnost deformacije uslijed određenih naprezanja [5]. Postoje 4 tipa stanica koje čine koštano tkivo a to su: osteoblasti, osteoklasti, osteociti te stanice koje oblažu kost [6]. Osteoblasti su stanice zadužene za formiranje i mineralizaciju kosti. Mezenhimalnog su podrijetla te se nalaze na površini kosti. Obilježava ih visoka metabolička aktivnost ; sinteza kolagena i nekolagenskih proteina matrice [7]. Osteoklasti su koštane stanice koje posjeduju više jezgara. Funkcija osteoklasta jest razgradnja koštanog tkiva, a potječu iz stanica monocitno-makrofagne linije. Resorpcijska aktivnost osteoklasta ovisna je i regulira se aktivnošću osteoblasta. Osteociti su stanice mezenhimalnog podrijetla nastale diferencijacijom osteoblasta [2]. Oni sudjeluju u procesu stvaranja i resorpcije kosti te regulacije taloženja minerala na nivou koštane matrice [8]. Stanice koje oblažu kost prekrivaju površinu kosti. Stanice koje oblažu kost su zapravo umirući osteoblasti, odgovorni za kontrolu procesa remodeliranja kosti, hematopoeze te homeostaze kalcija [9]. Slika 1. prikazuje kost te strukturu njene građe [10].

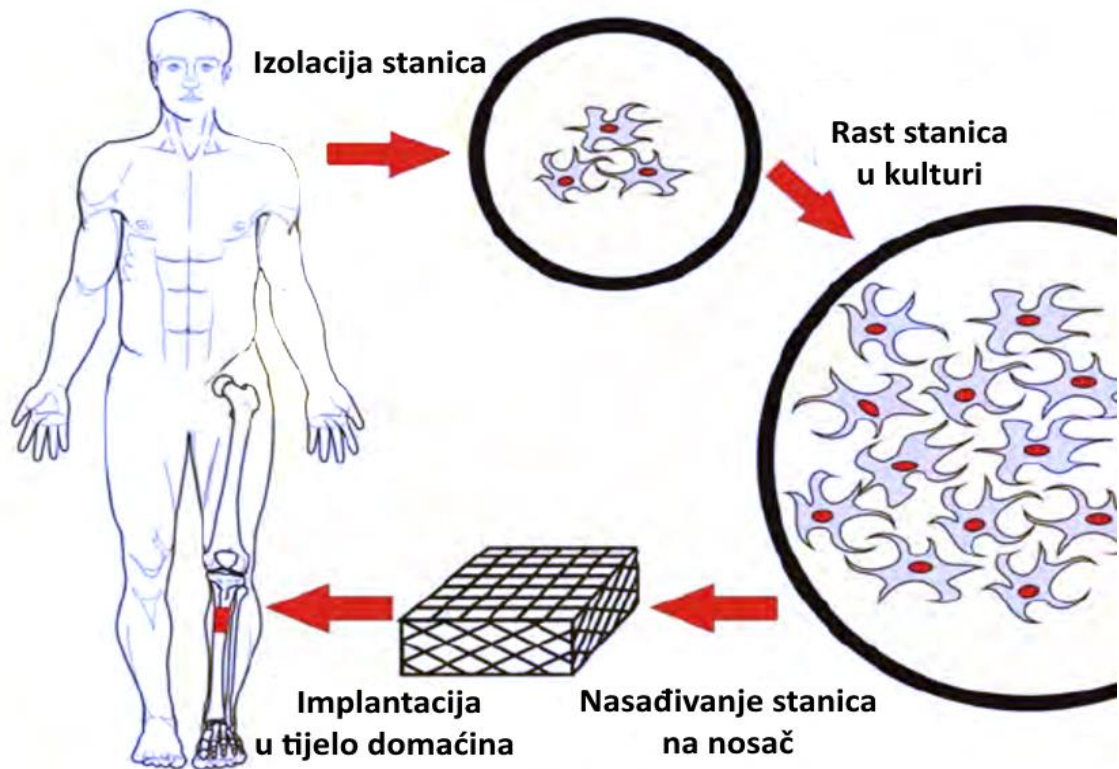


Slika 1. Kost i struktura kosti [10].

2.2. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo koštanog tkiva je znanstveno područje koje u svojim istraživanjima zahtjeva sinergiju ostalih znanosti poput kemije, fizike, biologije i medicine. Služi se principima inženjerstva u svrhu razvitka bioloških nadomjestaka za obnovu, poboljšanje ili održavanje tkiva [1]. Inženjerstvo koštanog tkiva za cilj svojih istraživanja postavlja razvoj trodimenzionalnih (3D) biokompatibilnih nosača u svrhu obnove koštanog tkiva koje je oštećeno uslijed različitih trauma, bolesti ili infekcija [11]. Princip na kojemu se temelji inženjerstvu koštanog tkiva sastoji se od izolacije stanica, rasta stanica u kulturi (in vitro), zatim nasađivanja stanica na nosač te ugradnje nosača u tijelo domaćina (in vivo) na željeno mjesto [12]. Slika 2. prikazuje princip inženjerstvu koštanog tkiva [13]. Ključni uvjeti u inženjerstvu koštanog tkiva koji moraju biti zadovoljeni su : biokompatibilni nosač za oponašanje izvanstanične matrice, postojanje osteogenih stanica za polaganje matrice koštanog tkiva i morfogenih signala za usmjeravanje stanica na fenotipski poželjan tip te dovoljna vaskularizacija za opskrbu tkiva hranjivim tvarima i njegovim potrebama za čišćenjem [14]. Inženjerstvo koštanog tkiva koristi mnoge biomaterijale (prirodne ili sintetske), bioaktivne

molekule te stanice pojedinačno ili skupno za stimulaciju signala diferencijacije. Ti biomaterijali, od kojih je građen nosač, moraju posjedovati određena svojstva kako bi se mogli povezati s kosti u koju su implantirani. Najbitnije osobine nosača su: biokompatibilnost, sposobnost integracije u kost, poroznost, osteoinduktivnost, osteokonduktivnost te mehanička svojstva slična onima kosti za koju su predviđeni [15]. Biomaterijali u širokoj zastupljenosti korištenja u inženjerstvu tkiva su metali, polimeri te biokeramika [1].



Slika 2. Princip inženjerstva koštanog tkiva[13].

2.3. Biomaterijali

U današnje vrijeme, biomaterijali su postali nezamjenjivi dio svakidašnje medicine. Njihova je uloga olakšati čovjeku oporavak nakon određene bolesti ili ozljede. Primjenom

biomaterijala u medicinske svrhe, omogućena je zamjena ili poboljšanje određenih funkcija ili tkiva u ljudskom organizmu. Koriste se kao medicinski implantati, biosenzori, molekularne sonde i nanočestice za probijanje bioloških barijera, u metodama pospješivanja zacjeljivanja i regeneracije tkiva, te kao sustavi za isporuku i primjenu lijekova do određenog mjesta u organizmu [16]. Biomaterijali se od ostalih materijala razlikuju po svojoj sposobnosti da okolno tkivo u koje su ugrađeni, a time i sam materijal, ostane neoštećeno. Polje biomaterijala osniva se na povezanosti te poznavanju i razumijevanju znanosti o materijalima, medicinskih, bioloških, kemijskih te mehaničkih znanosti [17]. Temeljna sposobnost koju određeni biomaterijal treba posjedovati jest oponašanje izvanstanične matrice za koji se stanice prihvate kako bi se mogle usmjeriti k formaciji tkiva [18]. Od visoke je važnosti da oni budu biokompatibilni i ne izazivaju alergijske, toksične niti kancerogene reakcije u tijelu čovjeka [19]. Razlikujemo dvije vrste biomaterijala koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva. Prvi od njih su materijali za tvrdo koštano tkivo u koje se ubrajaju ortopedski i dentalni materijali. Drugi su materijali za meko koštano tkivo koji se primjenjuju u plastičnoj kirurgiji i kao kardiovaskularni implantati [20].

Biomaterijali su u odnosu na tehničke materijale skuplji jer je njihova uloga osiguravanje dugotrajnog opstanka pri fiziološkim uvjetima. Prva generacija biomaterijala s početkom u 50-im i 60-im godinama prošlog stoljeća sastojala se od većinski gotovih i dostupnih industrijskih materijala koji prethodno nisu bili zamišljeni za primjenu u medicinske svrhe. Zbog fizičkih svojstava i bioinertnosti smatrani su biokompatibilnima i pogodnima za kliničku upotrebu. No, zbog svoje bioinertnosti nisu tvorili vezu s okolnim tkivom i uzrokovali su oštećenja tkiva [20].

Druga generacija biomaterijala nastala je iz ranijih biomaterijala te je obuhvaćala bioaktivne i resorbirajuće materijale. Namjena druge generacije biomaterijala bila je usmjerena ka izazivanju određene kontrolirane reakcije s tkivima u koja su implantirani kako bi se postigao željeni učinak. U 80-im godinama prošlog stoljeća ti su materijali bili primjenjivani kao različiti sastavi bioaktivnog stakla i keramike u ortopediji i dentalnoj medicini. Razvoj resorpcijskih materijala uključivao je materijale koji posjeduju prilagodljivu stopu razgradnje ovisno o zahtjevu primjene. Iz toga slijedi da bi se sveza između mjesta ugradnje i samog tkiva mogla eliminirati zbog razgradnje samog materijala od strane organizma u koji je implantiran. To su primjerice polimeri građeni od poliglikolne i polimljične kiseline. Primjer navedenog je biorazgradivi konac sastavljen od poliglikolne kiseline, s početkom upotrebe u 60-im

godinama. Posebnost treće generacije biomaterijala je u tome da potiče stanični odgovor na razini molekule, a to omogućuje aktivaciju gena koji pomažu u obnavljanju koštanog tkiva [19].

Kao biomaterijali koji se najčešće koriste u inženjerstvu koštanog tkiva ističu se metali. Uz metale tu su još i polimeri te biokeramika. Prednosti metala u inženjerstvu koštanog tkiva su njihova mehanička čvrstoća i integracija, ali također postoje i brojni problemi vezani uz njihovo korištenje kao što su razlika u modulu elastičnosti kosti i implantata, otpornost na deformaciju, višestruke operacije s ciljem uklanjanja metalnih stabilizatora, infekcije i kronična bol. Metali koji su u širokoj zastupljenosti kao biomplantati su nehrđajući čelik, nitinol te titan i njegove ostale legure [1].

Polimere za primjenu u inženjerstvu tkiva dijelimo na prirodne i one sintetske. Prirodne biopolimere možemo podijeliti u tri kategorije. Prva kategorija su polipeptidni i proteinski biopolimeri u koje spadaju kolagen, fibrinogen, fibrin, svila, elastin, želatina te miozin, keratin i aktin. Drugu kategoriju čine biopolimeri na bazi polisaharida, a to su hijaluronska kiselina, hitin, kitozan, alginat, celuloza, agaroz, dekstran i glikozaminglikan. U treću kategoriju spadaju oni biopolimeri koji se sastoje od polinukleotida kao što je DNA, linearni plazmid DNA i RNA. Prednosti prirodnih biopolimera su u tome što se sastoje od funkcionalnih molekula koje imaju svojstva bioaktivnosti i prirodnog uklapanja te su biomimetičke prirode. Nadalje, od visoke je važnosti što su biokompatibilni te pokazuju svojstva antigenosti, 3D geometrije i ne stvaraju toksične nusprodukte. Nedostaci koji ih opisuju su slaba mehanička čvrstoća, nemogućnost kontrole stope razgradnje, potencijalna opasnost kontaminacije mikrobima te smanjena prilagodljivost i imunogenska reakcija. Druga skupina biopolimera, oni sintetski, imaju niz prednosti u odnosu na prirodne biopolimere. Komercijalno su dostupniji, njihova kemijska i fizikalna svojstva čine ih jednostavnijim za sintetiziranje, posjeduju mogućnost beskrajnih oblika, utvrđene su strukture te imaju veću sposobnost prilagodbe. Sintetski biopolimeri su svojim kemijskim i mehaničkim osobinama slični biološkim tkivima. Mane sintetskih biopolimera su što zahtijevaju podlijeganje kemijskim promjenama za poboljšanje stanične adhezije obzirom da im za istu nedostaje mjesta [21].

Biokeramika jest posebno konstruirana vrsta keramike koja za cilj ima zamjenu ili popravak dijelova tijela uslijed ozljede ili bolesti. Oblici koji se trenutno primjenjuju su čvrsti dijelovi, prašci i granule, premazi, nosači te formulacije za injektiranje. Obzirom na odgovor tkiva, biokeramiku možemo svrstati u tri skupine. U prvu skupinu spada biokeramika koja je gotovo inertna kao što je glinica ili cirkonijev oksid. Drugoj skupini pripada bioaktivna keramika, primjerice bioaktivno staklo dok treću skupinu čini resorpcijska biokeramika kao što su α i β

trikalcijevi -fosfati. Slika 3. prikazuje komercijalne primjere biokeramike korištene u medicinske svrhe [17].



Slika 3. Komercijalni primjere biokeramike za medicinske svrhe [17].

2.3.1. Kalcij- fosfatna biokeramika

Najčešći oblici biokeramike su kalcijevi fosfati (CaP, (engl. *calcium phosphates*)), grupa minerala koju čine kationi (Ca^{2+}) zajedno s ortofosfatnim (PO_4^{3-}), metafosfatnim (PO_3^-) ili pirofosfatnim ($\text{P}_2\text{O}_7^{4-}$) anionima, ali ponekad i u prisutnosti hidroksilnih (H^+) ili hidroksidnih (OH^-) iona. Oni s atomskim omjerom kalcija i fosfata između 1.5 i 1.67 nazivaju se apatiti [22]. Širok spektar spojeva kalcijevih fosfata nalazi se u prirodi i živim organizmima. Primjerice, tu su karbonatni hidroksiapatit (CHA) različite kristaliničnosti sa svojom prisutnošću u mineralnoj fazi kostiju i zuba te fluor – karbonatni apatit u sastavu ribljeg durodentina. Karbonatni hidroksiapatit (CHA) egzistira u normalnim kalcifikatima organizma kao što su dentin, caklina i cement kostiju dok se neki od ostalih tipova kalcijevih fosfata nalaze u patološkim ili abnormalnim kalcifikatima, primjerice zubni kamenac, bubrežni kamenac i kalcifikacija mekog tkiva srca i pluća [23]. Najvažniji predstavnici CaP biokeramike su amorfni kalcijev fosfat

(ACP), hidroksiapatit (HA) , oktakalcijev fosfat (OCP), α -trikalcijev fosfat (α - TCP) te β -trikalcijev fosfat (β -TCP) [24].

Kalcijevi fosfati koji se koriste u biomedicini dolaze u obliku nosača, premaza, paste i cemenata. Za primjenu u medicini moraju posjedovati svojstva bioaktivnosti, biokompatibilnosti, bioaktivne fiksacije, biostabilnosti, kristaliničnosti, stabilnosti međupovršine i dobro prijanjanje, resorpcije, oseointegracije, osteokondukcije, osteoindukcije, vlaženja te terapijskih učinaka. Tablica 1. prikazuje svojstva kalcijevih fosfata za medicinsku primjenu. Jedno od najvažnijih svojstava CaP biokeramike jest bioaktivnost što znači da se kalcijevi fosfati moraju djelomično otapati i otpuštati ionske produkte in vivo. Također, osobina bioaktivnosti jest podizanje lokalnih koncentracija kalcijevih i fosfatnih iona te stvaranje biološkog apatita na površini keramike [22].

Tablica 1. Prikaz svojstava kalcijevih fosfata za medicinsku primjenu [22].

Svojstvo	Definicija / Funkcija
Bioaktivnost	Sposobnost materijala da sudjeluje u specifičnim biološkim reakcijama ili ima učinak na živim tkivima.
Biokompatibilnost	Sposobnost materijala da u specifičnoj primjeni djeluje uz odgovarajući odgovor domaćina.
Bioaktivna fiksacija	Smanjenje stvaranja fibrozne kapsule zbog kemijske veze reaktivne površine s kostima.
Biostabilnost	Sposobnost materijala da zadrži svojstva in vivo.
Kristaliničnost	Viša razina kristaliničnosti sprječava brzu resorpciju biomaterijala u tjelesnim tekućinama.
Stabilnost međupovršine i dobro prijanjanje	Sprječavanje mehaničkih oštećenja u uvjetima nosivosti.

Tablica 1. (nastavak) Prikaz svojstava kalcijevih fosfata za medicinsku.

Oseointegracija	Izravno učvršćenje implantata stvaranjem koštanog tkiva oko implantata, bez rasta fibroznog tkiva na spoju kost / implantat.
Osteokondukcija	Sposobnost stvaranja nosača za formaciju nove kosti.
Osteoindukcija	Induciranje osteogeneze. Primitivne, nediferencirane, pluripotentne stanice su simulirane kako bi razvile staničnu liniju za stvaranje kosti.
Resorpcija	Postupna razgradnja biomaterijala tijekom vremena s ciljem zamjene prirodnim tkivom domaćina.
Terapijski učinci	Predložci za isporuku lijekova i faktora rasta u traženo vrijeme rastu in situ.
Vlažnost	Sposobnost materijala da privuče ili odbije mol vode.

Bitan podatak kako se CaP biokeramika ponaša u fiziološkim uvjetima organizma jest topljivost. Topljivost utječe na brzinu resorpcije biokeramike. Primjenom višefaznih kalcij - fosfatnih sustava omogućeno je izjednačavanje brzine resorpcije biokeramike i brzine stvaranja novog tkiva [25]. Tablica 2. prikazuje kemijsku formulu, Ca/P omjer, topljivost te pH u vodenim otopinama postojećih kalcijevih ortofosfata [26].

Tablica 2. Postojeći kalcijevi ortofosfati i njihova kemijska formula, Ca/P omjer, topljivost pri 25 °C u g / L te pH u vodenim otopinama pri 25 °C [26].

Naziv	Kemijska formula	Ca / P omjer	Topljivost pri 25 °C u g / L	pH u vodenim otopinama pri 25 °C
Monokalcijev fosfat monohidrat (MCPM)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	~ 18	0.0 – 2.0
Monokalcijev fosfat anhidrat (MCPA)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	~ 17	Stabilan na temperaturi iznad 100°C
Dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	~ 0.088	2.0 – 6.0
Dikalcijev fosfat anhidrat (DCPA)	CaHPO_4	1.0	~ 0.048	Stabilan na temperaturi iznad 100°C
Oktakalcijev fosfat (OCP)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	~ 0.0081	5.5 – 7.0
α – trikalcijski fosfat (α – TCP)	$\alpha - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	~ 0.0025	Ne može se istaložiti iz vodenih otopina.
β – trikalcijski fosfat (β – TCP)	$\beta - \text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	~ 0.0005	Ne može se istaložiti iz vodenih otopina.
Amorfni kalcijev fosfat (ACP)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3 - 4.5 ; 15 - 20 \%$ H_2O	1.2 – 2.2	Ne može se precizno izmjeriti.	~ 5 – 12 (uvijek metastabilno)
Hidroksiapatit s manjim udjelom Ca (CDHA)	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, ($0 < x < 1$)	1.5 – 1.67	~ 0.0094	6.5 – 9.5
Hidroksiapatit (HA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1.67	~ 0.0003	9.5 - 12
Fluorapatit (FA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	1.67	~ 0.0002	7 - 12
Tetrakalcijev fosfat (TTCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	2.0	~ 0.0007	Ne može se istaložiti iz vodenih otopina.

2.3.1.1. Amorfni kalcijev fosfat (ACP)

Amorfni kalcijev fosfat, ACP (engl. *amorphous calcium phosphate*), od esencijalne je važnosti u procesu formiranja mineralizirane kosti. Zbog svoje amorfne strukture, ACP, odlikuje se svojstvima visoke topljivosti i resorpcije što ga čini pogodnim za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva [27]. Morfološki oblik, struktura i difrakcije X – zraka ukazuju na njegovu kratkotrajnu periodičku pravilnost. Proučavanjem sintetičkih čestica ACP-a elektronskim mikroskopom uočeno je da su čestice sferičnog oblika veličine od 300 do 1000 Å. Te sfere sastoje se od ionskih grupa promjera 9.5 Å sukladno njihovom kemijskom sastavu $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Također, ustanovljeno je da se voda s prisutnošću 15-20% nalazi u međuprostorima između skupina $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. ACP je veoma nestabilan, taloži se iz prezasićene otopine kalcijevih fosfata u uvjetima dovoljno visoke pH vrijednosti što rezultira stvaranjem ACP-a Ca/P molarnog omjera od 1.34 do 1.50 pri različitim pH vrijednostima te 1.50 do 1.67 pri dodavanju različitih količina karbonata. Ubrzo nakon taloženja hidrolizira u stabilnije faze; oktakalcijev fosfat i apatit [28]. U području pH vrijednosti iznad 9, ACP prelazi u hidroksiapatit dok je u pH vrijednostima između 7 i 9 on prekursor u nastajanju oktakalcijevog fosfata koji zatim prelazi u hidroksiapatit [29]. Pokazalo se da ACP posjeduje svojstva bolje osteokonduktivnosti od hidroksiapatita te bolje biorazgradivosti od trikalcijevog fosfata [28]. Čimbenici koji ograničavaju uporabu ACP-a su njegova nestabilnost i ograničena poroznost, ali zbog svog učinka u biomineralizaciji kosti predstavlja bitan faktor u daljnim primjenama inženjerstva tkiva [30].

2.3.1.2. Oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP)

Oktakalcijev fosfat pentahidrat, OCP (engl. *octacalcium phosphate pentahydrate*) ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5 \text{H}_2\text{O}$), primjenjiv je u polju inženjerstva tkiva zbog svojstava koja mu omogućuju regeneraciju prirodne kosti. Smatra se prekursorom nastajanja hidroksiapatita što mu daje osobit značaj u razumijevanju mehanizma mineralizacije kosti [31]. OCP posjeduje triklinu kristalnu rešetku. Jedinичna ćelija određena je s $a = 19.692 \text{ \AA}$, $b = 9.523 \text{ \AA}$, $c = 6.835 \text{ \AA}$, $\alpha = 90.15^\circ$, $\beta = 92.54^\circ$, $\gamma = 108.65^\circ$ uz $Z = 2$. Kristalnu strukturu čine dva sloja naizmjenično povezana prema osi-a jedinичne ćelije sustava; sloj s nedostatkom kalcija strukture slične apatitu ($4 [\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot 0.5 \text{H}_2\text{O}]$) te hidratizirani sloj ($4 [\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}]$),

strukture slične brušitu odnosno dikalcijevom fosfatu dihidratu, DCPD (engl. *dicalcium phosphate dihydrate*). U svojoj strukturi ima sadržanu veliku količinu vode što za posljedicu ima nižu toplinsku stabilnost od HA-a ili β -TCP-a. OCP potpuno prelazi u HA na temperaturi iznad 300°C dok se hidratizirani sloj počinje skupljati, zbog dehidracije, ne temperaturi od približno 170°C kreirajući „dezintegrirani“ OCP. Zamjenom kalcijevih iona s magnezijevim, cinkovim ili stroncijevim ionima (Mg^{2+} , Zn^{2+} ili Sr^{2+}), moguće je smanjiti njegovu toplinsku stabilnost i na taj način povećati količinu „dezintegriranog“ OCP-a pri visokim temperaturama. Stehiometrijski molarni omjer Ca/P oktakalcijeva fosfata jednak je 1.33 [32]. U fiziološkom području pH vrijednosti OCP pokazuje veću topljivost od apatita [33]. Uvjeti pripreme OCP-a uvelike utječu na njegovu morfologiju te kristalnu strukturu [32]. OCP pokazuje svojstva biokompatibilnosti, osteokonduktivnosti te potiče diferencijaciju osteoblasta i regeneraciju kosti. Također, utvrđeno je da može intenzivirati proces formacije nove kosti zahvaljujući vlastitim stanicama sličnim osteoklastima. Prijelaz iz OCP-a u hidroksiapatit bitan je faktor u poboljšavanju, njegovih, već postojećih bioloških svojstava [34]. Pri navedenom prijelazu, u fiziološkim uvjetima, dolazi do povećanja biološke aktivnosti OCP-a što dovodi do bolje regeneracije kosti [32].

2.3.1.3. Trikalcijev fosfat (TCP)

Trikalcijev fosfat, TCP (engl. *tricalcium phosphate*) kemijske formule $Ca_3(PO_4)_2$, široko je primjenjiv u postupcima regeneracije kosti, izradi koštanih nadomjestaka te biokompatibilnih nosača zbog svojih bioaktivnih i osteokonduktivnih svojstava [35]. TCP pokazuju svojstva bolje poroznosti od hidroksiapatita što im posljedično omogućuje izvrsna resorpcijska svojstva [36]. S Ca/P omjerom 1.5, razlikuju se dvije kristalne konfiguracije trikalcijeva fosfata; α i β -TCP (engl. *α and β -tricalcium phosphate*) [37]. β -TCP romboedarske je kristalne strukture s prostornom skupinom R3/c, jedinične ćelije određene s $a = 10.4352 \text{ \AA}$, $b = 10.4352 \text{ \AA}$, $c = 37.4029 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 90^\circ$ i $\gamma = 120$ [38]. Dobiva se reakcijom u čvrstom stanju pri visokim temperaturama (od 900°C do 1100° C) ili toplinskom konverzijom drugih fosfata. Stabilan je do 1125°C, a nakon toga prelazi u α -TCP [33] [37]. Druga kristalna konfiguracija, α -TCP, monoklinske je kristalne strukture s prostornom skupinom P2₁/a, jedinične ćelije određene s $a = 12.87271 \text{ \AA}$, $b = 27.28034 \text{ \AA}$, $c = 15.21275 \text{ \AA}$, $\alpha = 90^\circ$, $\beta = 126.2078^\circ$ i $\gamma = 90$ [39]. α -TCP pokazuje svojstva veće reaktivnosti te bolje topljivosti i resorpcije od β -TCP-a [40]. Također, zbog bolje reaktivnosti u vodenim otopinama, α -TCP

jednostavnije hidrolizira u stabilnije kalcijeve fosfate te je zbog svoje biorazgradivosti pogodan za izradu koštanih nadomjestaka [33] [40]. β -TCP zahvaljujući visokoj poroznosti, koja mu omogućuje dobru biomineralizaciju i staničnu adheziju, stimulira proliferaciju osteoblasta i stromalnih stanica koštane srži [37]. U svrhu poboljšanja bioloških, mehaničkih te fizikalno – kemijskih svojstava β -TCP-a, moguće ga je dopirati magnezijem, cinkom i stroncijem te silicijem (Mg, Zn, Sr, Si) [41].

2.3.1.4. Hidroksiapatit (HA)

Hidroksiapatit, (HA), kemijske formule $(Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2)$, jedan je od glavnih gradivnih elemenata prirodne kosti [42]. Kristalna struktura HA-a je heksagonalna (s iznimkom u monoklinskoj strukturi). Heksagonalne je prostorne skupine $P6_3/m$ dok je jedinična ćelija određena s $a = 9.418 \text{ \AA}$, $b = 9.418 \text{ \AA}$, $c = 6.884 \text{ \AA}$ [43]. Ca/P molarni omjer HA-a iznosi 1.667. Do odstupanja od navedenog stehiometrijskog molarnog omjera može doći prilikom toplinske obrade pojavom drugih faza što za posljedicu ima nepovoljan utjecaj na biološki odgovor tijela na implantat. Ukoliko je molarni omjer ispod 1.667, moguća je pojava α ili β -TCP-a, a ukoliko je on iznad 1.667 postoji mogućnost nastanka kalcijeva oksida (CaO) koji egzistira zajedno s hidroksiapatitnom fazom [44]. Mnogo je načina pripreme HA-a, te iako uvjeti pripreme mogu biti različiti, dvije su glavne tehnike koje ih opisuju. Prva metoda podrazumijeva stehiometrijsku titraciju suspenzije kalcijeva hidroksida ($Ca(OH)_2$) fosfornom kiselinom (H_3PO_4), u bazičnoj sredini, do neutralizacije. Druga metoda sastoji se od dodavanja otopine amonijeva ($(NH_4)_2HPO_4$) ili natrijeva monohidrogenfosfata (Na_2HPO_4) (kap po kap) otopini kalcijeva nitrata ($Ca(NO_3)_2$) ili acetata ($Ca(Ac)_2$) ili obrnuto. Kako bi pH vrijednost bila iznad 9, nerijetko se otopini dodaje amonijev (NH_4OH) ili natrijev hidroksid ($NaOH$). Obje metode trebaju se provoditi na temperaturi od $100^\circ C$. Ispod navedene temperature dolazi do smanjenja količine kristalnog produkta i/ili pojave amornog produkta. Također, na veličinu kristala i kristaliničnost utječe vrijeme provođenja same reakcije; dulje vrijeme rezultira nastankom većih kristala i veće kristaliničnosti. HA također se može dobiti i transformacijom topljivijih, metastabilnih fosfata u mokrom okruženju [33]. Uslijed posjedovanja brojnih svojstava kao što su bioaktivnost, biokompatibilnost, osteokonduktivnost, oseointegracija te netoksičnost, HA nalazi široku primjenu u inženjerstvu tkiva, medicini i stomatologiji u obliku nosača, koštanih nadomjestaka, punila za kosti, dentalnih proteza i sl. [45].

2.4. Višefazni sustavi

Pod pojmom višefaznog sustava podrazumijeva se nekoliko faza istog kemijskog spoja koje egzistiraju istovremeno u jednom sustavu pritom međusobno imajući što manje moguće razlike u sastavu i/ili strukturi [46]. U polju inženjerstva tkiva, pojedinačni kalcijevi fosfati ne pokazuju mogućnost oponašanja sastava prirodne kosti paralelno s njenim svojstvima. Iz tog razloga primjenjuju se višefazni kalcij-fosfatni sustavi. Oni se sastoje od pojedinačnih kalcijevih fosfata različite topljivosti i bioresorpcije. Zastupljenost pojedine faze odnosno optimalni omjer među fazama ovisan je o primjeni. Zasada su u području kalcij-fosfatne biokeramike najpoznatiji dvofazni i trofazni kalcij-fosfatni sustavi koji se sastoje od visokotemperaturnih faza; α -trikalcijska fosfata, β -trikalcijska fosfata, hidroksiapatita te također s mogućnošću postojanja visokotemperaturnih faza kao što su amorfni kalcijev fosfat, oksiapatit i tetrakalcijev fosfat [47].

2.4.1.1. Priprema višefaznih sustava

U današnje vrijeme dostupni su mnogi sintetski načini pripreme višefaznih kalcij-fosfatnih sustava. Priprema dvofaznih sustava (BCP (engl. *biphasic calcium phosphates*)) koji se sastoje od HA te α - ili β -TCP-a podrazumijeva sinteriranje sintetskog ili biološkog apatita s nedostatkom kalcija (stehiometrijski molarni omjer Ca/P niži je od 1.67 za čisti HA), gdje upravo nedostatak kalcija i temperatura samog sinteriranja određuju omjer pojedine faze BCP-a. Veći nedostatak kalcija u apatitu rezultira nižim Ca/P omjerom. Sinteriranje apatita provodi se na temperaturama od 750°C i iznad, a nedostatak kalcija u apatitu određen je tehnikom pripreme, temperaturom i pH vrijednošću pri kojima se provodila reakcija [47] [48]. Također, tu su i brojne varijacije sinteriranja poput sinteriranja u dva koraka i mikrovalne toplinske obrade. Ukoliko se sinteriranje provodi na temperaturi do 1200°C može se pripremiti BCP koji se sastoji od HA i β -TCP-a, a ako temperatura doseže 1300°C ili iznad, moguća je priprema BCP-a koji se sastoji od HA i α -TCP-a. Drugi način pripreme BCP-a odnosi se na reakcije u čvrstom stanju među čvrstim reagensima (miješaju se određeni omjeri spojeva koji sadrže Ca i PO₄, primjerice TCP i kalcijev hidroksid (Ca(OH)₂), za željeni omjer Ca/P) nakon čega slijedi sinteriranje pri visokim temperaturama. Dvofazni sustavi kalcijevih fosfata sastava α -TCP + β -

TCP (BTCP (engl. *biphasic tricalcium phosphates*)), mogu se pripremiti kalciniranjem ACP-a gdje se na omjer α -TCP/ β -TCP utječe temperaturom, vremenom starenja i pH vrijednošću pri kojima se provodila sinteza ACP-a. BTCP moguće je pripremiti i sinteriranjem α -TCP-a na temperaturama od 1000°C do 1200°C obzirom na temperaturnu stabilnost α i β -TCP-a (β -TCP stabilan je na temperaturama od 1000°C do 1200°C, a α -TCP na temperaturama iznad 1300°C). Sustavi dikalcij fosfat dihidrat/hidroksiapatit s nedostatkom kalcija (DCPD/CDHA (engl. *calcium deficient hydroxyapatite*)), pripremaju se sporom hidrolizom DCPD kristala u otopini koja sadrži amonijev hidrogenkarbonat (NH_4HCO_3) dok se sustavi oktakalcijev fosfat/dikalcijev fosfat dihidrat (OCP/DCPD) dobivaju prilikom dodatka kap po kap otopine dinatrijeva hidrogen fosfata (Na_2HPO_4) otopini kalcijeva acetata ($\text{Ca}(\text{Ac})_2$), uz filtraciju i sušenje na sobnoj temperaturi. Trofazni sustavi koji se sastoje od α - i β -TCP-a te HA-a, mogu se pripremiti postupkom hidrotermalne sinteze, *in situ* tehnikom preparacije iz kalcijeva hidroksida (CaOH_2) i fosforne kiseline (H_3PO_4) uz pH vrijednosti između 7 i 9 te sinteriranjem BCP-a (β -TCP i HA) na temperaturama iznad 1200°C. Višefazne kalcij-fosfatne sustave moguće je pripremiti dodavanjem koncentriranog amonijeva hidroksida (NH_4OH) u vruću otopinu monokalcijeva fosfata monohidrata (MCPM (engl. *monocalcium phosphate monohydrate*)) i kalcijeva klorida (CaCl_2), uz udio limunske kiseline ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7$), s Ca/P omjerom 1.67 nakon čega slijedi sinteriranje. Na spomenuti način moguće je pripremiti dvofazne sustave (β -TCP i kalcijev pirofosfat ($\text{Ca}_2\text{O}_7\text{P}_2$)), a pri nižim temperaturama trofazne (dikalcij fosfat anhidrat (DCPA (engl. *dicalcium phosphate anhydrate*)), hidroksiapatit s nedostatkom kalcija (DCHA) i oktakalcijev fosfat (OCP)) i četverofazne sustave (dikalcij fosfat dihidrat (DCPD), dikalcij fosfat anhidrat (DCPA), oktakalcijev fosfat (OCP) i hidroksiapatit s nedostatkom kalcija (CDHA)) [46]. Uz navedene metode pripreme višefaznih sustava tu su još i mehaničko miješanje pojedinačnih prahova kalcijevih fosfata, piroliza plamenim raspršivanjem, tehnike sol gel i tekuća mješavina uz sinteriranje, sinteza izgaranjem, hidrotermalni tretman (podrazumijeva suspendirani kalcijev karbonat (CaCO_3) u vodenoj otopini amonijeva dihidrogen fosfata ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$) tijekom 20 sati pri 300°C i pH 5 te tlaku od 35 atm) [47], nepotpuna toplinska razgradnja na umjerenim temperaturama nestehiometrijskih kalcijevih fosfata te dopiranje ionima u slučaju pripreme višefazne ionsko supstituirane kalcij-fosfatne biokeramike. Višefaznu kalcij-fosfatnu biokeramiku moguće je pripremiti i korištenjem prirodnih izvora (sipina kost, goveđa kost, koralji) [46].

2.4.1.2. Stabilnost i svojstva višefaznih sustava

Pojam višefaznog sustava uzima u obzir samo one sustave koji su stabilni. Jednofazni sustavi kalcijevih fosfata, bliskih Ca/P omjera, imaju mogućnost formiranja stabilnih višefaznih sustava. Do danas su poznate stabilne formulacije sljedećih višefaznih kalcij-fosfata; HA (Ca/P=1.67) + β -TCP (Ca/P=1.50), HA (Ca/P=1.67) + α -TCP (Ca/P=1.50), α -TCP (Ca/P=1.50) + β -TCP (Ca/P=1.50), HA (Ca/P=1.67) + FA (fluorapatit (engl. *fluorapatite*), (Ca/P=1.67)), MCPM (Ca/P=0.50) + DCPD (Ca/P=1.00), HA (Ca/P=1.67) + α -TCP (Ca/P=1.50) + β -TCP (Ca/P=1.50), HA (Ca/P=1.67) + TTCP (tetrakalcijev fosfat (engl. *tetracalcium phosphate*), (Ca/P=2.00)), gdje je potonje pripremljeno samo visokotemperaturnim tehnikama.

Svojstva višefaznih sustava nalaze se između svojstava jednofaznih sustava od kojih su građeni te su zavisna o njihovoj zastupljenosti u spoju [46]. Kako bi bili primjenjivi u biomedicinskom području, višefazni sustavi kalcij-fosfatne biokeramike moraju posjedovati određena mehanička i biološka svojstva. Svojstva koja ih čine potencijalnim nosačima u inženjerstvu tkiva su: odgovarajuća mehanička čvrstoća i krtost, poroznost, biokompatibilnost, biorazgradivost, bioaktivnost, osteoinduktivnost, sposobnost pregrupiranih stanica u stvaranju vlastitog okolnog matriksa prilikom resorpcije materijala nosača i procesa stvaranja nove kosti. Specifičnost višefaznih sustava nalazi se u sposobnosti manipulacije omjerima faza od kojih se sastoje što im omogućava kontrolu resorpcije i bioaktivnosti *in vivo*. Bioresorpcijska i osteoinduktivna svojstva pokazala su se boljima u višefaznim sustavima u usporedbi s jednofaznim sustavima. Godine 1985. prvi put se pojavljuje pojam dvofaznog sustava kalcijevih fosfata (BCP), a odnosio se na smjesu hidroksiapatita i trikalcijeva fosfata. Navedena smjesa bila je rezultat pripreme TCP-a, a sastojala se od 80% β -TCP-a i 20% HA-a [49]. BCP se može podijeliti u dvije skupine; kalcijevi ortofosfati s istim stehiometrijskim molarnim omjerom Ca/P (α -TCP i β -TCP) te oni s različitim omjerom Ca/P (α -TCP i HA, β -TCP i HA) [46]. U fiziološkim uvjetima, α -i β -TCP pokazuju svojstva veće topljivosti, odnosno bolja resorpcijska svojstva u usporedbi s HA. Budući da je HA manje topljiv, a samim time ima i sporiju resorpciju, on predstavlja stabilniju komponentu u BCP sustavima (α -TCP + HA, β -TCP + HA), kao i u trofaznim sustavima (α -TCP + β -TCP + HA) [50]. Najveću stopu biorazgradnje pokazuje α -TCP, kojeg redom slijede β -TCP te HA [51]. Kontroliranjem omjera pojedine faze moguće je pospješiti reaktivnost BCP-a i trofaznih sustava, obzirom da njihova reaktivnost raste s omjerom TCP/HA [52]. Iz navedenog razloga BCP sustavi su pogodni za izradu koštanih nosača. Ideja BCP nosača je da, tijekom biorazgradnje, stabilnija komponenta

sustava (HA), podupire nosač i stvaranje nove kosti, dok nestabilnija faza (TCP) stvara okolinu za formaciju nove kosti. Nakon ugradnje BCP-a, otapanjem CaP kristala i taloženjem CDHA-a, započinje proces njegove biorazgradnje. CDHA će u procesu biorazgradnje, tijekom svog otapanja, biti zamijenjen novom kosti tijekom njenog cijeljenja. Prezasićenost kalcijevim (Ca^{2+}), hidrogenfosfatnim (HPO_4^{2-}) i fosfatnim (PO_4^{3-}) ionima u lokalnom okruženju, pospješena je većom razgradnjom TCP-a i djelomičnim otapanjem HA-a. Zbog prezasićenosti otopine, dolazi do taloženja i stvaranja mikrokristala CDHA koji uključuje karbonatne (CO_3^{2-}), magnezijeve (Mg^{2+}) i natrijeve (Na^+) ione što za posljedicu ima mineralizaciju izvanstaničnog matriksa tijekom procesa stvaranja koštanog tkiva. Biorazgradnja BCP-a ovisna je o kemijskom sastavu, veličini čestica, poroznosti, specifičnoj površini te kristaliničnosti. U slučaju slične veličine čestica i poroznosti, proces biorazgradnje ovisan je o vrsti i omjeru pojedinih faza BCP-a. Manja specifična površina i poroznost ili veća kristaliničnost i veće čestice rezultiraju nižom stopom biorazgradnje BCP-a. Postizanjem optimalne ravnoteže sustava BCP-a moguće je poboljšati mehanička i biološka svojstva nosača [51]. Mnoge studije proučavale su omjere između pojedinih komponenti navedenog sustava u svrhu poboljšanja njegovih svojstava. Studija Yamade i sur. [53] pokazala je da je resorpcija osteoklasta najveća pri HA/ β -TCP omjera 25/75 u odnosu na veće omjere te da navedeni BCP sustav ima bolja resorpcijska svojstva od čistog β -TCP-a što je vjerojatno posljedica stanične aktivnosti povezane s otpuštenim kalcijevim i fosfatnim ionima u okolinu [48]. Nadalje, studija Arinze i sur. [54] pokazala je da BCP nosači na nekoštanim mjestima, HA/ β -TCP omjera 20/80, nasađeni mezenhimalnim matičnim stanicama, imaju u odnosu na HA/ β -TCP omjere 76/24, 63/37, 56/44, te čisti HA i β -TCP, najvišu stopu formiranja kosti. Također, omjeri 30/70 i 20/80 HA/ β -TCP su pokazali osteoinduktivna svojstva. Moguće je da je spomenuto svojstvo osteoinduktivnosti potaknuto dovoljnom količinom endogenih koštanih morfogenetskih proteina kao posljedicom kritične geometrije, a ne samog BCP-nosača [48] [51]. Fizičke i biološke značajke ne predstavljaju karakteristiku samo jednog određenog omjera HA/ β -TCP, već nekoliko sličnih omjera. Konkretno, HA/ β -TCP omjer 20/80 pokazuje sličnost sa sljedećim omjerima; 15/85 [55], 25/75 [56], 30/70 [57]. Isto, slični omjeri HA/ β -TCP, 50/50 i 60/40, pokazuju poboljšanu proliferaciju stanica. Klinička istraživanja primijenjena na ljudima, HA/ β -TCP omjera 65/35, 60/40 i 50/50, potvrdila su se najuspješnijima [51]. Trofazni sustavi, sastava HA + α -TCP + β -TCP, u usporedbi s BCP sustavima imaju mogućnost unaprjeđenja svojstava bioaktivnosti i sposobnosti regeneracije kosti [58]. Studija Bajpai i sur. [59] pokazuje poboljšanje svojstva bioaktivnosti *in vitro* zbog prisutnosti α -TCP-a kao topljivije komponente.

2.4.1.3. Primjena višefaznih sustava

Trenutno, u području višefaznih sustava, zabilježena je komercijalna dostupnost samo onih dvofaznih. BCP sustavi, različitih omjera HA/ β -TCP, a odnedavno i β -TCP/ α -TCP, svoju primjenu nalaze u obliku granula ili prilagođenih oblika poput čunjeva za kralježnicu i koljeno, umetaka za fuziju vertebralnog kralješka, klinova za osteotomiju otvora tibije i sl. [22]. Razlikuju se tri tipa granulometrije BCP-a ; submikronska, okrugla mikroporozna (80-200 μ m) te makro mikroporozna (0.5-1 mm) koje, hidratizirane vodom, mogu služiti kao punila za kosti odnosno injektabilne koštane nadomjestke s mogućnošću oblikovanja. Isto tako, praškasti ili granulirani BCP-ovi svoju uporabu nalaze u kombinaciji sa sintetskim ili prirodnim polimerima za već spomenute injektabilne koštane nadomjestke ili kalcij-fosfatne cemente u svrhu poboljšanja svojstava makroporoznosti i osteokonduktivnosti [47]. Različite formulacije BCP-a mogu se primijeniti kao dijelovi koji zadržavaju svoj oblik tijekom vremena u nosivim područjima, u slučajevima oštećenja kosti. Upotrebljavaju se i prilikom ugradnje zubnog implantata u procesu podizanja sinusa te u popunjavanju zubnih kanala. Općenito, BCP sustavi nalaze svoju primjenu u ortopedskom, maksilofacijalnom te dentalnom području [22]. Većina *in vivo* primjene multifaznih kalcij-fosfatnih keramičkih materijala limitirana je na eksperimentalne pokuse s BCP sustavima u umjetno stvorenim koštanim oštećenjima i/ili kod životinjskih kavitacija. Provedena su uspješna testiranja u ortopedskoj, traumatološkoj te periapikalnoj kirurgiji, kod saniranja oštećenja bedrene kosti, dijafize i lubanjske svodi, defekata nosnog septuma, vertebralne lamine, karlične čašice, bedrene kosti, donje čeljusti, zuba, metafize, te kod kavitacije srednjeg uha, valgizacijske osteotomije tibije, cervikalne spondiloze, augmentacije jagodične kosti, sinusa i dr. [47].

3. ZAKLJUČAK

Dosadašnja istraživanja pokazala su da primjena višefaznih kalcij-fosfatnih keramičkih materijala utječe na unapređenje kvalitete, načina i trajanja ljudskog života. Za izradu koštano tkivnih nosača, višefazni sustavi kalcijevih fosfata moraju posjedovati odgovarajuća svojstva poput bioaktivnosti, osteoinduktivnosti, biokompatibilnosti, biorazgradivosti, poroznosti, određene mehaničke čvrstoće te krtosti. Obzirom da višefazni kalcij-fosfatni sustavi imaju svojstvo kombinacije omjera pojedinih faza, moguće je utjecati na poboljšanje bitnih osobina

za razvoj bionosača; topljivosti i bioresorpcije. U području kalcij-fosfatne biokeramike najpoznatiji su dvofazni i trofazni kalcij-fosfatni sustavi koji se sastoje od α -trikalcijska fosfata, β -trikalcijska fosfata, hidroksiapatita te amornog kalcijeva fosfata, oksiapatita i tetrakalcijeva fosfata. Trenutno najistraživaniji i komercijalno najdostupniji sustavi su oni dvofazni. Posjedujući različite omjere HA/ β -TCP te β -TCP/ α -TCP, dvofazni kalcijevi fosfati široko su zastupljeni u medicinskom i dentalnom području. Daljnja istraživanja inženjerstva koštanog tkiva temelje se na pronalasku onog kalcij-fosfatnog sustava koji će moći izgraditi idealni koštano tkivni nosač.

4. LITERATURA

- [1] Bhattarai, D., Aguilar, L., Park, C., Kim, C., A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering, *Membr.*, **62** (2018) 1-24.
- [2] Đudarić, L., Zoričić Cvek, S., Cvijanović, O., Fužinac-Smojver, A., Čelić, T., Martinović, D., Osnove biologije koštanog tkiva, *Medicina fluminensis*, **50** (2014) 21-38.
- [3] Oregon State University, Anatomy & physiology, open.oregonstate.edu/aandp/chapter/6-3-bone-structure/ (pristup 16. srpnja 2022.)
- [4] National Cancer Institut, Anatomy & physiology, <https://training.seer.cancer.gov/anatomy/skeletal/tissue.html> (pristup 18. srpnja 2022.)
- [5] Lin, C.-Y., Kang, J.-H., Mechanical properties of compact bone defined by the stress-strain curve measured using uniaxial tensile test: A concise review and practical guide, *Mater.*, **14** (2021) 1-16.
- [6] Mohamed Marny, A., An overview of bone cells and their regulating factors of differentiation, *Malays. J. Med. Sci.*, **15** (2008) 4-12.
- [7] Smith, R., Wordsworth, P., The Physiology and Pathology of Bone, u: Smith, R., Wordsworth, P., Oxford Textbook of Clinical and Biochemical Disorders of the Skeleton 2nd ed., Oxford, 2016., str 5-58.
- [8] Schaffler, M.B., Kennedy, O.D., Osteocyte signaling in bone, *Curr. Osteoporos. Rep.*, **10** (2012) 118-125.

- [9] Dall'Ara, E., Cheong, V.S., Bone Biomechanics, u: Innocenti, B., Galbusera, F., Human Orthopaedic Biomechanics, Fundamentals, Devices and Applications, Academic Press, Cambridge, 2022., str 97-120.
- [10] Bao, C.L.M., teo, E.Y., Chong, M.S.K., Liu, Y., Choolani, M., Chan, J.K.Y., Advances in Bone Tissue Engineering, u: Andrades, J.A., Regenerative Medicine and Tissue Engineering, IntechOpen, London, 2013., str 1-16.
- [11] Awad, H.A., O'Keefe, R.J., Lee, C.H., Mao, J.J., Bone Tissue Engineering: Clinical Challenges and Emergent Advances in Orthopedic and Craniofacial Surgery, u: Lanza, R., Langer, R., Vacanti, J., Principles of Tissue Engineering 4th ed., Academic Press, Cambridge, 2014., str 1733-1743.
- [12] El-Sherbini, I.M., Yacoub, M.H., Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.*, **38** (2013) 1-27.
- [13] Tverdkohlebov, S.I., Bolbasov, E.N., Shesterikov, E.V., Scaffold Materials Based on Fluorocarbon Composites Modified with RF Magnetron Sputtering, u: Lin, Y., Osteogenesis, IntechOpen, London, 2014., str 83-116.
- [14] Amini, A.R., Laurencin, C.T., Nukavarapu, S.P., Bone tissue engineering: Recent advances and challenges, *Crit. Rev. Biomed. Eng.*, **40** (2012) 383-408.
- [15] El-Ghannam, A., Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering, *Expert Rev. Med. Devices*, **2** (2005) 87-101.
- [16] Chen, F.-M., Liu, X., Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering, *Prog. Polym. Sci.*, **53** (2016) 86-168.
- [17] Dorozhkin, S.V., Bioceramics of calcium ortophosphates, *Biomater.*, **31** (2010) 1465-1485.
- [18] Clarke, D.E., McCullen, S.D., Chow, A.G.Y., Stevens, M.M., Functional Biomaterials, u: Moo-Young, M., Comprehensive Biotechnology 2nd ed., Academic Press, Cambridge, 2011., str 3-10.
- [19] Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala, *Kem. Ind.*, **54** (2005) 131-134.

- [20] Ratner, B.D., *Biomaterials Science: An Interdisciplinary Endeavor*, u: Ratner, B.D., Hoffman, A.S., Schoen, F.J., Lemons, J.E., *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, Academic Press, Cambridge, 1996., str 1-8.
- [21] Reddy, M.S., Ponnamma, D., Choudhary, R., Sadasivuni, K.K., A comparative review of natural and synthetic biopolymer composite scaffolds, *Polym.*, **13** (2021) 1-51.
- [22] Eliaz, N., Metoki, N., Calcium phosphate bioceramics: A review of their history, structure, properties, coating technologies and biomedical applications, *Mater.*, **10** (2017) 1-104.
- [23] LeGeros, R.Z., LeGeros, J.P., Calcium phosphate bioceramics, past, present and future, *Key Eng. Mater.*, **Vol. 240-242** (2003) 3-10.
- [24] Naga, S.M., El-Maghraby, H.F., Sayad, M., Saad, E.A., Highly porous scaffolds made of nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshells, *J. Ceram. Sci. Tech.* **6** (2015) 1-8.
- [25] Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterization of 14 calcium phosphate – based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomater.*, **25** (2004) 1-8.
- [26] Dorozhkin, S.V., Calcium orthophosphates, *J. Mater. Sci.*, **42** (2007) 1061-1095.
- [27] Vecstaudza, J., Gasik, M., Locs, J., Amorphous calcium phosphate materials; Formation, structure and thermal behaviour, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **39** (2019) 1642-1649.
- [28] Zhao, J., Liu, Y., Sun, W., Zhang, H., Amorphous calcium phosphate and its application in dentistry, *Chem. Cent. J.*, **5** (2011) 1-7.
- [29] Eanes, E.D., *Amorphous Calcium Phosphate: Thermodynamic and Kinetic Considerations*, u: Amjad, Z., *Calcium Phosphates in Biological and Industrial Systems*, Springer, New York, 1998., str. 21-39.
- [30] Sun, R., Åhlen, M., Tai, C.W., Bajnóczi, É.G., de Kleijne, F., Ferraz, N., Persson, I., Strømme, M., Cheung, O., Highly porous amorphous calcium phosphate for drug delivery and bio-medical applications, *Nanomater.*, **10** (2019) 1-18.
- [31] Murray, K.A., Döbelin, N., Albadarin, A.B., Sadło, J., Ren, G., Collins, M.N., O'Neill, C., The Influence of Sterilization on Octacalcium Phosphate for Clinical Applications, u:

Suzuki, O., Insley, G., Octacalcium Phosphate Biomaterials, Understanding of Bioactive Properties and Application, Woodhead Publishing, Sawston, 2020., str 55-84.

[32] Suzuki, O., Shiwaku, Y., Hamai, R., Octacalcium bone substitute materials: Comparison between properties of biomaterials and other calcium phosphate materials, *Dent. Mater. J.*, **39** (2020) 187-199.

[33] Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.*, **6** (2010) 1882-1894.

[34] Honda, Y., Anada, T., Kamakura, S., Morimoto, S., Kuriyagawa, T., Suzuki, O., The effect of microstructure of octacalcium phosphate on the bone regenerative property, *Tissue Eng., Part A*, **15** (2009) 1965-1973.

[35] Tanimoto, Y., Nishiyama, N., Preparation and physical properties of tricalcium phosphate laminates for bone-tissue engineering, *J. Biomed. Res. A*, **85** (2008) 427-433.

[36] Ogose, A., Hotta, T., Kawashima, H., Kondo, N., Gu, W., Kamura, T., Endo, N., Comparison of hydroxyapatite and beta tricalcium phosphate as bone substitutes after excision of bone tumors, *J. Biomed. Res. B*, **72** (2004) 94-101.

[37] Jeong, J., Kim, J.H., Shim, J.H., Hwang, N.S., Heo, C.Y., Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration, *Biomater. Res.*, **23** (2019) 1-11.

[38] Yashima, M., Sakai, A., Kamiyama, T., Hoshikawa, A., Crystal structure analysis of β -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ by neutron powder diffraction, *J. Solid State Chem.*, **175** (2003) 272-277.

[39] Yashima, M., Kawaike, Y., Tanaka, M., Determination of precise unit-cell parameters of the α -tricalcium phosphate $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ through high-resolution synchrotron powder diffraction, *J. Am. Ceram. Soc.*, **90** (2007) 272-274.

[40] Carrodeguas, R.G., De Aza, S., α -tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomater.*, **7** (2011) 3536-3546.

[41] Basu, S., Basu, B., Doped biphasic calcium phosphate: synthesis and structure, *J. As. Cer. S.*, **7** (2019) 265-283.

[42] Shi, H., Zhou, Z., Li, W., Fan, Y., Li, Z., Wei, J., Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: A brief and comprehensive introduction, *Cryst.*, **11** (2021) 1-18.

- [43] Uz Zaman, S., Irfan, M., Irfan, M., Muhammad, N., U Zaman, M.K., Rahim, A., Ur-Rehman, S., Overview of hydroxyapatite: composition, structure, synthesis, methods and its biomedical uses, *Biomed. Lett.*, **6** (2020) 84-99.
- [44] Best, S.M., Porter, A.E., Thian, E.S., Huang, J., Bioceramics: Past, present and for the future, *J. Eur. Ceram. Soc.*, **28** (2008) 1319-1327.
- [45] LeGeros, R.Z., LeGeros, J.P., Hydroxyapatite, u: Kobuko, T., Bioceramics and their clinical applications, Woodhead Publishing, Sawston, 2008., str 367-394.
- [46] Dorozhkin, S.V., Biphasic, triphasic and multiphasic calcium ortophosphates, *Acta Biomater.*, **8** (2012) 963-977.
- [47] Dorozhkin, S.V., Multiphasic calcium ortophosphate (CaPO₄) bioceramics and their biomedical applications, *Ceram. Int.*, **42** (2016) 6529-6554.
- [48] LeGeros R.Z., Lin, S., Rohanizadeh, R., Mijares, D., LeGeros, J.P., Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, **14** (2003) 201-209.
- [49] Canillas, M., Pena, P., de Aza, A., Rodríguez, M.A., Calcium phosphates for biomedical applications, *Bol. Soc. Esp. Ceram. Vidrio*, **56** (2017) 91-112.
- [50] Dorozhkin, S.V., Calcium ortophosphates: occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications, *Biomatter.*, **1** (2011) 121-164.
- [51] Ebrahimi, M., Botelho, M.G., Dorozhkin, S.V., Biphasic calcium phosphates bioceramics (HA/TCP): Concept, physicochemical properties and the impact pf standardization of study protocols in biomaterials research, *Mater. Sci. Eng. C*, **71** (2017) 1293-1312.
- [52] Dorozhkin, S.V., Medical application of calcium orthophosphate bioceramics, *Bio.*, **1** (2011) 1-51.
- [53] Yamada, S., Heymann, D., Bouler, J.M., Dalcusi, G., Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/beta-tricalcium phosphate ratios, *Biomater.*, **18** (1997) 1037-1041.
- [54] Arinzeh, T.L., Tran, T., Mcalary, J., Dalcusi, G., A comparative study of biphasic calcium phosphate ceramics for human mesenchymal stem-cell-induced bone formation, *Biomater.*, **26** (2005) 3631-3638.

- [55] Nery, E.B., LeGeros, R.Z., Lynch, K.L., Lee, K., Tissue response to biphasic calcium phosphate ceramic with different ratios of HA/ β TCP in periodontal osseous defects, *J. Periodontol.*, **63** (1992) 729-735.
- [56] Tanimoto, Y., Shibata, Y., Murakami, A., Miyazaki, T., Nishiyama, N., Effect of varying HAP/TCP ratios in tape-cast biphasic calcium phosphate ceramics on response *in vitro*, *J. Hard Tissue Biol.*, **18** (2009) 71-76.
- [57] Hahn, B.-D., Park, D.-S., Choi, J.-J., Ryu, J., Yoon, W.-H., Lee, B.-K., Kim, H.-E., Effect of the HA/ β -TCP ratio on the biological performance of calcium phosphate ceramic coatings fabricated by a room-temperature powder spray in vacuum, *J. Am. Ceram. Soc.*, **92** (2009) 793-799.
- [58] Jamil, M., Elouahli, A., Abida, F., Khallok, H., Gourri, E., Kheribech, A., Hatim, Z., Development of triphasic hydroxyapatite/ (α and β) tricalcium phosphate based composites by sintering powder of calcium-apatite in the presence of montmorillonite, *J. Inorg. Organomet. Polym. Mater.*, **30** (2020) 2489-2498.
- [59] Bajpai, I., Kim, D.Y., Kyong-Jin, J., Song, I.-H., Kim, S., Response of human bone marrow-derived MSCs on triphasic Ca-P substrate with various HA/TCP ratio, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.*, **105** (2015) 72-80.

5. POPIS SIMBOLA I KRATICA

ACP- amorfnj kalcijev fosfat (engl. *amorphous calcium phosphate*)

BCP- dvofazni kalcijevi fosfati (engl. *biphasic calcium phosphates*)

BTCP- dvofazni trikalcijevi fosfati (engl. *biphasic tricalcium phosphates*)

CaP- kalcijevi fosfati (engl. *calcium phosphates*)

CDHA- hidroksiapatit s nedostatkom/manjim udjelom kalcija (engl. *calcium deficient hydroxyapatite*)

DCPA- dikalcijev fosfat anhidrat (engl. *dicalcium phosphate anhydrate*)

DCPD- dikalcijev fosfat dihidrat (engl. *dicalcium phosphate dihydrate*)

FA- fluorapatit (engl. *fluorapatite*)

HA- hidroksiapatit (engl. *hydroxyapatite*)

MCPA- monokalcijev fosfat anhidrat (engl. *monocalcium phosphate anhydrate*)

MCPM- monokalcijev fosfat monohidrat (engl. *monocalcium phosphate monohydrate*)

OCP- oktakalcijev fosfat pentahidrat (engl. *octacalcium phosphate pentahydrate*)

α -TCP- α -trikalcijev fosfat (engl. *α -tricalcium phosphate*)

β -TCP- β -trikalcijev fosfat (engl. *β -tricalcium phosphate*)

TCP- trikalcijev fosfat (engl. *tricalcium phosphate*)

TTCP- tetrakalcijev fosfat (engl. *tetracalcium phosphate*)