

Biološka aktivnost kalcijevih fosfata u koštanim nadomjestcima: oktakalcijev fosfat kao alternativa hidroksiapatitu

Samaržija, Maja

Undergraduate thesis / Završni rad

2016

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://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:499019>

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

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



FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ

Maja Samaržija

ZAVRŠNI RAD

Zagreb, srpanj 2016.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI PREDDIPLOMSKI STUDIJ KEMIJSKOG INŽENJERSTVA

Maja Samaržija

**BIOLOŠKA AKTIVNOST KALCIJEVIH FOSFATA U KOŠTANIM
NADOMJESTCIMA: OKTAKALCIJEV FOSFAT KAO ALTERNATIVA
HIDROKSIAPATITU**

ZAVRŠNI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

dr. sc. Anamarija Rogina

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Zagreb, srpanj 2016.

Sadržaj

1. Uvod	1
2. Bioaktivna resorbirajuća keramika	2
2.1. Kalcijevi fosfati.....	2
2.1.1. Stuktura hidroksiapatita	4
2.1.2. Struktura oktakalcijeva hidrogenfosfata pentahidrata	6
2.2. Transformacija oktakalcij hidrogenfosfat – hidroksiapatit.....	7
2.2.1. Utjecaj reakcijskih parametara	7
2.3. Bioaktivnost kalcijevih fosfata	11
2.3.1. Bioaktivnost u simuliranoj tjelesnoj tekućini.....	11
2.3.2. <i>In vitro</i> testiranje bioaktivnosti.....	14
2.3.3. <i>In vivo</i> testiranje bioaktivnosti	16
3. Zaključak.....	20
4. Literatura.....	21

Sažetak

U današnjem svijetu velika je potreba za biomaterijalima koji će zamijeniti dijelove i funkcije u ljudskom tijelu. Prednost se daje bioaktivnoj resorbirajućoj keramici na temelju različitih kalcijevih fosfata i njihovih kombinacija.

Najstabilnija faza kalcijevih fosfata je hidroksiapatit (HA) koji je svojom kemijskom strukturom sličan anorganskog fazi kostiju. Budući da se stehiometrijski hidroksiapatit pokazao slabo biorazgradiv, sve je veća primjena strukturno sličnog oktakalcijeva hidrogenfosfata pentahidrata (OCP) koji potiče obnovu i rast koštanog tkiva.

Laboratorijskim ispitivanjima dokazano je kako se OCP postupno transformira u hidroksiapatitnu strukturu pri određenim reakcijskim uvjetima uz razvoj različitih međufaza.

Brojni autori proučavali su biološku aktivnost kalcijevih fosfata u simuliranim tjelesnim tekućinama, staničnim uzgojima *in vitro* te *in vivo*. Istraživanjima je potvrđena njihova osteoinduktivnost, biokompatibilnost i sposobnost obnove koštanog tkiva. Najvažnija saznanja su dobivena *in vivo* testiranjima kojima se prednost daje oktakalcijevom fosfatu koji pokazuje bržu i bolju biorazgradivost i učinkovitost u liječenju.

Ključne riječi: bioresorbirajuća keramika, kalcijevi fosfati, oktakalcijev fosfat, hidroksiapatit, biološka aktivnost.

Biological activity of calcium phosphates in bone substituents: octacalcium phosphate as an alternative to hydroxyapatite

Summary

Nowadays, there is a great need for biomaterials which will replace parts and functions of the human body. The preference is given to the bioactive resorbable ceramics based on various calcium phosphates and their combinations.

The most stable phase of calcium phosphate is hydroxyapatite (HA) that is similar to the chemical structure of the bone inorganic phase. Since stoichiometric hydroxyapatite has shown to be poorly biodegradable, there is a greater use of structurally similar octacalcium phosphate pentahydrate (OCP) which promotes the regeneration and growth of bone tissue.

Laboratory analyses have proved that OCP is gradually transformed into hydroxyapatite structure under specific reaction conditions by producing various intermediates.

Many authors have studied the biological activity of calcium phosphate in simulated body fluids, *in vitro* cell culture and *in vivo* studies. Those investigations have confirmed their osteoinductivity, biocompatibility and the ability to regenerate bone tissue. The most important findings were obtained by *in vivo* evaluations which give priority to octacalcium phosphate that shows faster and better biodegradability, and the efficiency in the treatment.

Keywords: bioresorbable ceramics, calcium phosphates, octacalcium phosphate, hydroxyapatite, biological activity.

1. Uvod

Biomaterijali su materijali namijenjeni za povezivanje s biološkim sustavima *in vivo*, za poboljšanje ljudskog zdravlja ili zamjenu tkiva, organa i nekih funkcija u tijelu. Njihovo glavno svojstvo je biokompatibilnost, odnosno sposobnost da ne oštećuju biološko okruženje tijekom njihove primjene u živom organizmu [1].

Prema odgovoru organizma domaćina na ugradnju usatka, biomaterijali se mogu podijeliti na inertne biomaterijale (prva generacija materijala) te biokativne i biorazgrađive materijale (druga generacija materijala) [2].

Nakon ugradnje bioinertnog materijala, s namjerom da se zaštiti od stranih tijela, organizam okružuje usadak s mekim vlaknastim tkivom te se na taj način povezuje s materijalom. Nasuprot tome, ugradnja bioaktivnog i biorazgrađivog materijala u živi organizam omogućuje stvaranje čvrste kemijske veze između usatka i okolnog tkiva.

Danas biorazgrađivi materijali mogu zamijeniti gotovo sve dijelove i funkcije ljudskog organizma. Ovisno o vrsti tkiva, upotrebljavaju se i različiti materijali koji se dijele u četiri glavne skupine koje čine metali, polimeri, keramika te njihove mješavine, odnosno, kompoziti [1]. U medicini postoji velika potreba za materijalima kojima će se liječiti koštani defekti ili ozljede. Bioaktivna resorbirajuća keramika pokazala se kao vrlo dobar materijal u liječenju.

Kao obećavajući tip biokeramike pokazala se hidroksiapatitna keramika koja stvara direktnu vezu s okolnim koštanim tkivom živog organizma, dok druge vrste biokeramike tvore vezu preko sloja karbonatnog hidroksiapatita koji odgovara biološkom apatitu koštanog tkiva. Sposobnost bioresorbiranja omogućuje otapanje keramike s vremenom pri čemu se postepeno nadomješta prirodnim tkivom.

Osim navedenih biomaterijala koji se koriste u svrhu liječenja tkivnih oboljenja i oštećenja, sve je veći razvoj treće generacije materijala kojima je cilj potaknuti samoobnavljanje organa. Pri tom se izrađuje odgovarajući nosač koji nakon ugradnje u organizam potiče stanični odgovor na molekulskoj razini te usmjerava rast tkiva unutar nosača koji se postupno razgrađuje [2].

U ovom radu, predstaviti će se primjena bioaktivne resorbirajuće keramike kao materijala za liječenje koštanih defekata. Također, usporediti će se svojstva bioaktivnosti različitih bioaktivnih keramika u smislu poticanja rasta novog koštanog tkiva *in vitro* i *in vivo*.

2. Bioaktivna resorbirajuća keramika

Bioaktivna resorbirajuća keramika je materijal koji se u tjelesnoj tekućini kontrolirano otapa te postupno zamjenjuje obnovljenim tkivom unutar živog organizma. Njihova je mehanička čvrstoća i elastičnost vrlo slična prirodnoj kosti te takvi usadci nakon ugradnje izvrsno učvršćuju kost, nakon čega se počinju otapati do potpune razgradnje [3]. Zbog stalne potrebe za liječenjem i zamjenom tkiva, razvila se posebna znanost zvana inženjerstvo koštanog tkiva, čiji je cilj naći optimalan materijal koji će odgovoriti na sve tražene uvjete, odnosno, biti kemijski i strukturno najbližiji prirodnom koštanom tkivu. U tom polju se primjenjuju različiti kompoziti, od kojih su najčešći kalcijevi fosfati i njihove kombinacije.

2.1. Kalcijevi fosfati

Čisti kalcijevi fosfati mogu se podijeliti u tri skupine:

- Apatiti, formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{X}_2$ koji uključuju derivate hidroksiapatita pri čemu je $\text{X} = \text{OH}$ i fluorapatita gdje je $\text{X} = \text{F}$, te one koji posjeduju apatitnu strukturu (oktakalcij hidrogenfosfat pentahidrat (OCP) i tetrakalcijev fosfat (TTCP))
- Polimorfne modifikacije trikalcijeva fosfata (TCP)
- Spojevi s kalcij-fosfatnom (Ca-PO_4) skupinom među koje se ubrajaju dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD), dikalcijev fosfat anhidrid (DCPA), te monokalcijevi fosfati (MCP).

U tablici 1 dani su postojeći kalcijevi fosfati te njihove kemijske formule, svojstva topivosti i pH stabilnost. Vidljivo je da će određeni omjer kalcija i fosfora (Ca/P omjer) dati odgovarajući kalcijev fosfatni spoj određene kemijske i toplinske stabilnosti, ali i određena svojstva bioaktivnosti i resorpcije.

Pored čistih faza, moguće su dvofazne, trofazne ili višefazne kombinacije danih kalcijevih fosfata [1]. Ovi spojevi talože se u mokrom stanju pri rasponu temperatura od 30 do 70 °C i pri različitim pH vrijednostima medija, od kiselog do lužnatog ($3 < \text{pH} < 12$) [6].

Tablica 1. Postojeći kalcijevi fosfati i njihova osnovna svojstva [1].

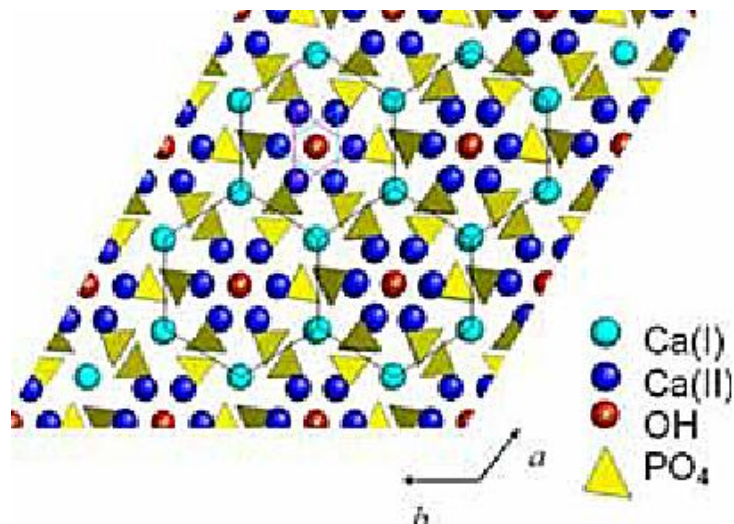
Ca/P omjer	Spoj i njegova skraćena	Kemijska formula	Topljivost pri 25 °C, -log K	Raspon pH stabilnosti u vodenoj otopini pri 25 °C
0,5	Monokalcijev fosfat monohidrat, MCPM	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$	1,14	0,0 – 2,0
0,5	Monokalcijev fosfat anhidrid, MCPA ili MCP	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	stabilan pri temperaturi iznad 100 °C
1,0	Dikalcijski fosfat dihidrat, DCPD	$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	6,59	2,0 – 6,0
1,0	Dikalcijski fosfat anhidrid, DCPA ili DCP	CaHPO_4	6,90	stabilan pri temperaturi iznad 100 °C
1,33	Oktakalcijev fosfat pentahidrat, OCP	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$	69,6	5,5 – 7,0
1,5	α -trikalcijski fosfat, α -TCP	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	ne može taložiti iz vodene otopine
1,5	β -trikalcijski fosfat, β -TCP	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	ne može taložiti iz vodene otopine
1,2 – 2,2	Amorfni kalcijev fosfat, ACP	$\text{Ca}_X\text{H}_Y(\text{PO}_4)_Z \times n \text{H}_2\text{O}; n = 3 - 4,5$	nemoguće precizno izmjeriti	~ 5 – 12 uvijek metastabilan
1,5 – 1,67	Hidroksiapatit s manjkom kalcija, CDHA	$\text{Ca}_{10X}(\text{HPO}_4)_X(\text{PO}_4)_{6-X}(\text{OH})_{2-X}; 0 < X < 1$	~ 85	6,5 – 9,5
1,67	Hidroksiapatit, HA (HAp, OHAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	9,5 – 12
1,67	Fluorapatit, FA (FAp)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120,0	7 – 12
1,67	Oksiapatit, OA (OAp, OXA)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	~ 69	ne može taložiti iz vodene otopine
2,0	Tetrakalcijev fosfat, TTCP (TetCP)	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38,44	ne može taložiti iz vodene otopine

Procesi nastajanja i rasta koštanog tkiva uključuju reakcije taloženja kalcijevih fosfata najčešće u obliku hidroksiapatita. Međutim, za taloženje apatitnih spojeva potrebna je kontrola brojnih uvjeta, od kojih su najvažniji temperatura i pH vrijednost medija (okoline). Apatiti opće formule $M_{10}(XO_4)_6Y_2$ (pri čemu je M = metalni ion alkalijskih ili zemnoalkalijskim metala, X = ionske skupine elemenata 14. i 15. skupine, Y = OH ili halogeni elementi) omogućuju različite modifikacije i supstitucije iona u svoju kristalnu rešetku. Među kalcijevim fosfatima, apatiti su najstabilnija faza i produkt su mnogih reakcija [4].

2.1.1. Struktura hidroksiapatita

Hidroksiapatit (HA) kemijske formule $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$ (slika 1) koristi se kao model za anorganske komponente kostiju i zubi. Mathew i Takagi [4] iznose da se hidroksiapatit najčešće nalazi u svom nestehimetrijskom obliku ($Ca/P \neq 1,67$) kojem odgovara kristalna heksagonska rešetka s parametrima kristalne ćelije $a = b = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$ i $z = 1$, dok se rijetko nalazi u svom stehimetrijskom obliku u kojem Ca/P omjer iznosi 1,67. Stehiometrijski oblik hidroksiapatita stvara se samo pod povoljnim termalnim uvjetima pri čemu kristalizira u monoklinskom sustavu s parametrima ćelije $a = 9,4214 \text{ \AA}$, $b = 2a$, $c = 6,8814 \text{ \AA}$ i $\gamma = 120^\circ$. Arellano-Jiménez i sur. [5] bilježe parametre heksagonske rešetke s vrijednostima $a = 9,45 \text{ \AA}$ i $c = 6,87 \text{ \AA}$ uz veličinu kristala $16,9 \pm 0,2 \text{ nm}$.

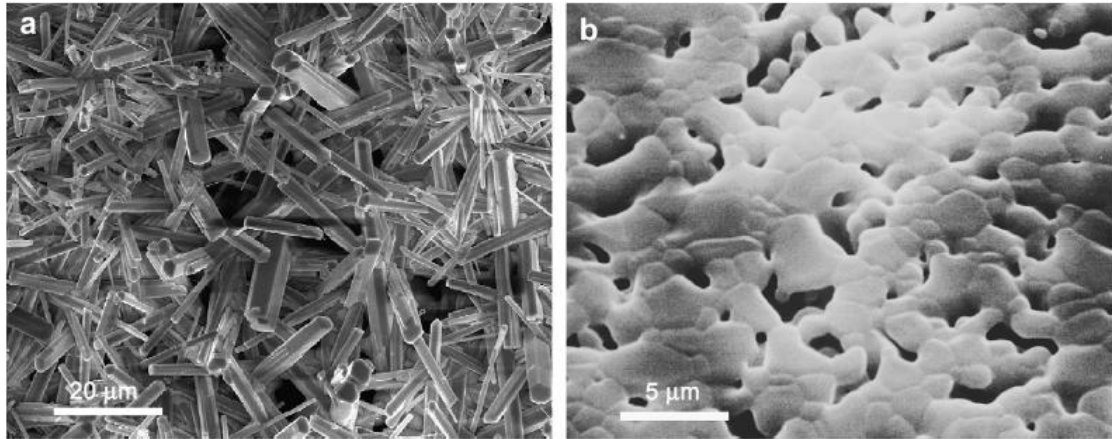
Hidroksiapatit se može sintetizirati suhim procesom, mokrim taloženjem, hidrolizom kalcijevih fosfata, hidrotermalnom sintezom, pirolizom, sol-gel postupkom, elektrokemijskom depozicijom itd. Od nabrojanih mogućih načina pripreve, mokro taloženje je najjednostavniji proces zbog niske cijene, jednostavne primjene u industriji uz dobre konačne produkte te lakše kontrole procesnih parametara [6].



Slika 1. Kristalna struktura hidroksiapatita [7].

U strukturu hidroksiapatita mogu se ugraditi različiti ioni. Ionska izmjena moguća je na mjestima kalcijevih iona ili fosfatnih i hidroksilnih skupina što rezultira promjenama svojstava, parametara kristalne rešetke, topivosti, morfologije, ali bez promjena u simetriji. Za hidroksiapatit najvažnija je ionska izmjena s karbonatnom skupinom koja može doći na položaj hidroksilne skupine (A – tip supstitucije) ili na položaj fosfatne skupine (B – tip supstitucije) [2].

Okuda i sur. [8] potvrđuju kako stehiometrijski hidroksiapatit, kada se koristi za obnavljanje kostiju, nije biorazgradiv, međutim razlog tome im nije poznat. Iz tog razloga, sinteza hidroksiapatitnih faza usmjerila se na dobivanje biološki aktivnijih i resorbirajućih apatita sličnih biološkom karbonatnom apatitu, te dobivanje hidroksiapatita s manjkom kalcija (engl. *calcium-deficient hydroxyapatite*, CDHA) niže kemijske i toplinske stabilnosti. Sinteza CDHA najčešće se provodi hidrotermalnom metodom iz drugih kalcijevih fosfata (npr. TCP) pri čemu su dovoljne niže temperature pripreve u odnosu na sintezu stehiometrijskog hidroksiapatita. Tako hidrotermalno sintetizirani CDHA pri temperaturi od 200 °C pokazuje štapičaste kristale duljine 20 μm, dok stehiometrijski HA dobiven sinteriranjem na 1000 °C pokazuje sferične čestice veličine 5 μm (slika 2). Termalnom obradom CDHA na 900 °C dokazalo se da je sintetiziran hidroksiapatit Ca/P omjera različitog od 1,67 zbog pojave TCP faze koja nastaje toplinskim raspadom nestehiometrijskog hidroksiapatita.



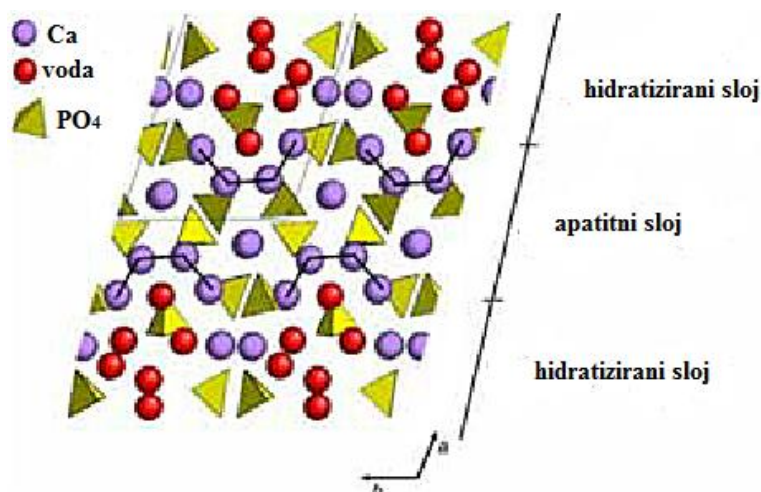
Slika 2. Mikrostruktura: a) nestehiometrijskog i b) stehiometrijskog hidroksiapatita [8].

Zbog strukturne sličnosti stehiometrijskom i biološki aktivnijem nestehiometrijskom hidroksiapatitu (CHA i CDHA) postavlja se pitanje primjene oktakalcijevog hidrogenfosfata (OCP) kao potencijalne alternativne bioaktivne resorbirajuće keramike za poticanje obnove i rasta koštanog tkiva.

2.1.2. Struktura oktakalcijeva hidrogenfosfata pentahidrata

Oktakalcijev hidrogenfosfat pentahidrat (OCP) formule $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$, kristalizira u triklinskom kristalnom sustavu (slika 3) s parametrima kristalne rešetke $a = 19,692 \text{ \AA}$, $b = 9,523 \text{ \AA}$, $c = 6,835 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,15^\circ$, $\beta = 92,54^\circ$, $\gamma = 108,65^\circ$ i $z = 2$ kako su odrediti Mathew i Takagi [4]. Prema Arellano-Jiménezu i sur. [5] parametri rešetke se minimalno razlikuju i iznose: $a = 19,70 \text{ \AA}$, $b = 9,50 \text{ \AA}$, $c = 6,85 \text{ \AA}$, $\alpha = 90,03^\circ$, $\beta = 92,48^\circ$, $\gamma = 108,32^\circ$ uz veličinu kristala $13,5 \pm 0,2 \text{ nm}$.

U strukturi OCP-a paralelno se izmjenjuju hidratizirani i apatitni sloj pri čemu voda može ulaziti ili izlaziti iz kristalne strukture. Tseng i sur. [9] kompjuterskom analizom su pokazali da je apatitni sloj oktakalcijeva fosfata strukturno vrlo sličan hidroksiapatitu. Strukturna sličnost OCP i HA razlog je mogućeg epitaksijalnog (slojevitog) rasta i stvaranja slojevite ili lamelarne smjese dviju faza ukoliko su slojevi pojedine faze vrlo tanki. Postojanje takvih slojevitih struktura OCP – HA omogućile su uvid u proces biomineralizacije kosti, odnosno, utjecaj stehiometrije i strukture na stvaranje bioloških apatita i amorfne kalcij fosfatne faze kao primarne faze u ranom nastajanju apatitnih struktura. Uslijed toga se pretpostavlja da je upravo oktakalcij hidrogenfosfat glavna međufaza nastajanju hidroksiapatita pri fiziološkim uvjetima i *in vivo* [4, 9].



Slika 3. Struktura oktakalcijevog hidrogenfosfata pentahidrata [7].

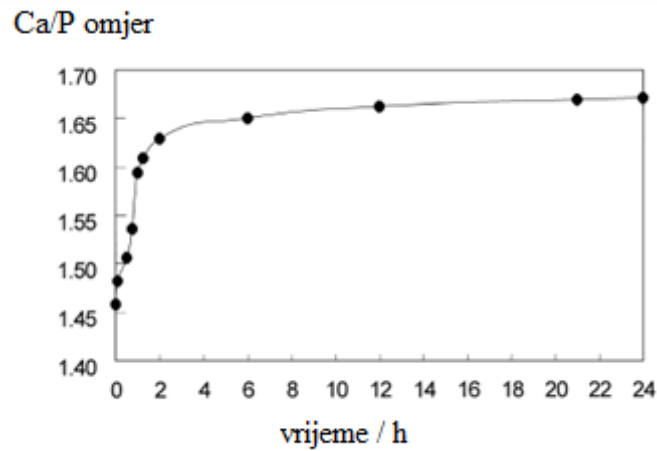
2.2. Transformacija oktakalcij hidrogenfosfat – hidroksiapatit

2.2.1. Utjecaj reakcijskih parametara

Veliki broj znanstvenih istraživanja pripreve bioaktivne keramike temelji se na sintezi hidroksiapatita iz različitih kalcijevih fosfata. Jedna od zanimljivijih problematika je poznavanje nastanka hidroksiapatita pri fiziološkim uvjetima i *in vivo*. Međutim, prisutnost bioloških molekula, soli i ostalih pomoćnih tvari fizioloških otopina otežavaju razrješavanje mehanizma transformacije. Stoga je veliki broj radova usmjeren na ispitivanje utjecaja reakcijskih parametara (vrijeme, temperatura, pH vrijednost reakcijskog medija) na transformaciju oktakalcijevog fosfata u hidroksiapatit u vodenom mediju, te konačni sastav dobivenog transformiranog produkta.

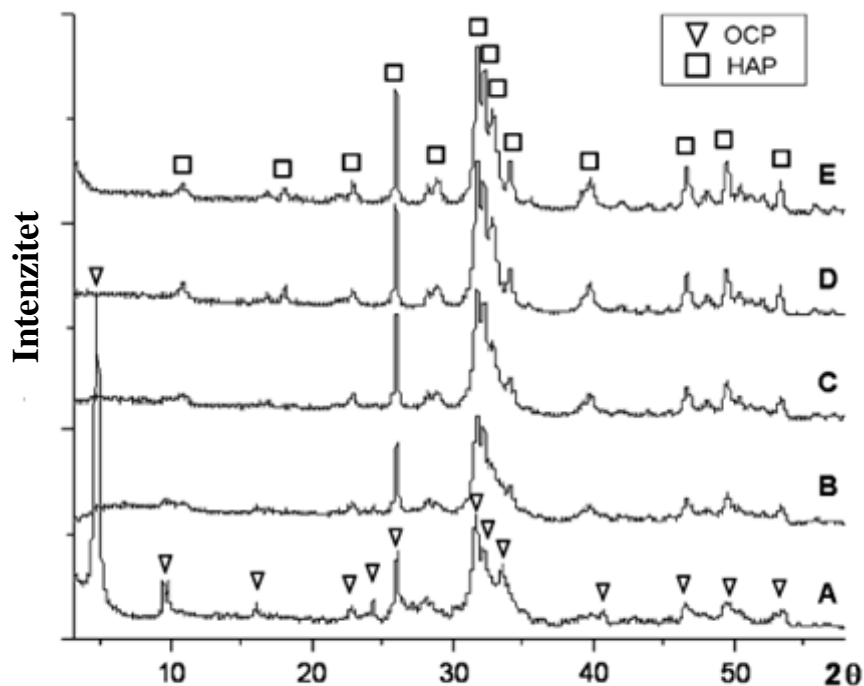
Liu i sur. [6] proučavali su mehanizam i kinetiku taloženja HA pri pH vrijednosti od 10 – 11 i došli do spoznaje da se prilikom transformacije OCP-a najprije stvara amorfni kalcijev fosfat, ACP, nakon kojeg slijedi stvaranje CDHA, te na kraju hidroksiapatitna faza. Kao što je vidljivo na slici 4, pri konstantnoj temperaturi od 35 °C, Ca/P omjer se povećava s vremenom reakcije stvaranja hidroksiapatita. Već nakon 10 minuta reakcije, Ca/P omjer je dosegnuo vrijednost od 1,5, dok je za stehiometrijsku vrijednost od 1,67 bilo potrebno oko 12 sati reakcije. Početna niža vrijednost Ca/P omjera ukazuje na stvaranje OCP faze

(Ca/P = 1,33) koja je u kratkom vremenu transformirana u amorfni kalcijev fosfat Ca/P omjera 1,5.



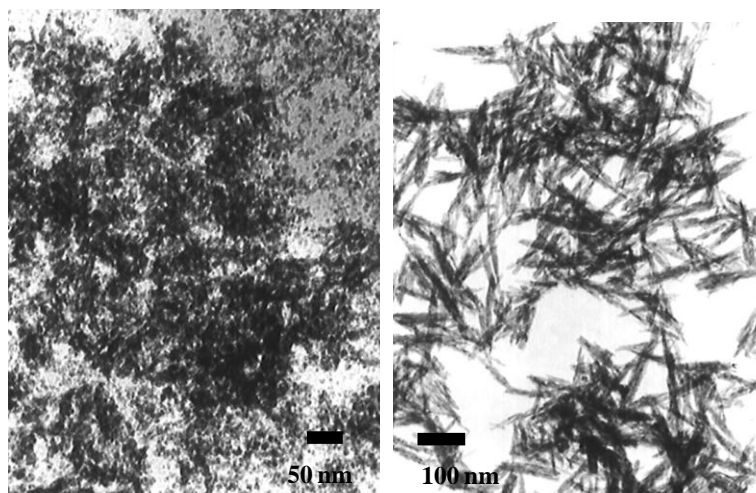
Slika 4. Ovisnost Ca/P omjera o vremenu reakcije pri 35 °C [6].

Ispitivanjem kinetike hidrolize OCP praška, Arellano-Jiménez i sur. [5] rendgenskom difrakcijskom analizom su ustanovili dvofazni sustav OCP-a i hidroksiapatita nakon 30 minuta hidrolize, dok nakon sat vremena reakcije nastaje nisko-kristalična faza HA (slika 5). Povećanje kristalnosti prvotno nastale HA faze uočeno je većim i užim difrakcijskim maksimuma nakon 6 sati hidroliziranja OCP praška. Predlažu transformaciju faza na kristalnoj plohi minimalne površinske energije, te da je za potpunu transformaciju OCP-a u HA potrebno 6 sati hidrolize čime su se usprotivili zaključcima Grahama i Browna [10] koji za transformaciju predviđaju 15 sati reakcije.



Slika 5. Rendgenski difraktogram OCP praška (a) prije, i nakon hidrolize u vremenu od (b) 30 min, (c) 1 h, (d) 6 h i (e) 12 h [5].

Proučavajući utjecaj temperature, Liu i sur. [6] su došli do zaključka da se njezinim povećanjem ubrzava stvaranje hidroksiapatita iz primarno nastale OCP faze. Vrijeme potrebno za faznu transformaciju pri temperaturi od 25 °C iznosi 24 sata, dok je za transformaciju pri temperaturi od 60 °C potrebno samo 5 minuta. Osim na brzinu fazne transformacije, temperatura utječe i na morfologiju konačnog produkta. Tako se pri temperaturi od 15 °C stvaraju kristali veličine manje od 10 nm, dok pri 60 °C nastaju igličasti kristali duljine i do 100 nm (slika 6) .



Slika 6. Utjecaj temperature na morfologiju hidroksiapatita: a) 15 °C, b) 60 °C [6].

U svom radu, Clarkin i sur. [11] zaključuju da je dikalcijev fosfat dihidrat (DCPD) faza koja se najčešće primarno taloži te djeluje kao prekursor za stvaranje OCP faze, odnosno u konačnici hidroksiapatita. Istraživanjem različitih uvjeta temperature i pH vrijednosti, ustanovili su da je DCPD faza najstabilnija pri pH vrijednosti 5 i pri nižoj temperaturi (40 °C), dok su OCP, ACP i HA stabilniji pri višim pH vrijednostima i višoj temperaturi. Također, rendgenskom difrakcijskom analizom su pokazali postojanje amorfnе faze tijekom transformacije OCP-a u HA. Sama kvaliteta krajnjih produkata ovisna je o uvjetima taloženja kao što su koncentracija iona, ionska jakost, pH vrijednost i temperatura reakcijskog medija itd. Dobiveno je da pri nižim temperaturama (30 – 50 °C) i pH vrijednosti od 4 do 6 primarno nastaje DCPD faza iz polaznih tvari. Povećanjem pH vrijednosti na 7 stvaraju se OCP kristali, dok pri pH vrijednosti 8 DCPD maksimumi nestaju sa difrakcijskog spektra uzorka. Povećanjem temperature na 60 °C i pH vrijednosti na 6 – 8 dolazi do pojave amorfnе kalcij-fosfatne faze, ACP-a. Daljnje povećanje temperature pri pH 6 ukazuje na istovremeno postojanje OCP-a i HA, dok se pri pH vrijednosti 8 OCP u potpunosti transformira u hidroksiapatit.

Zhang i sur. [12] dobili su hidroksiapatit taloženjem pri različitim temperaturama otopine polaznih komponenata. Dobili su kristale duljine 50 – 150 μm iz umjereno kisele otopine pri temperaturama od 85 – 95 °C za vrijeme trajanja reakcije od 48 do 120 h. Rezultati prikazani u tablici 2 pokazuju da je pri temperaturi od 95 °C potrebno 48 sati za dobivanje HA Ca/P omjera od 1,62, dok je pri samo 10 °C nižoj temperaturi potrebno dvostruko duže vrijeme .

Tablica 2. Rezultati taloženja pri različitim temperaturama i vremenu reakcije [12].

Temperatura, °C	Vrijeme, h	Ca/P omjer	Fazni sastav
85	8	1,59	HA, OCP, CDHA
	100		HA
90	6	1,61	HA, OCP, CDHA
	72		HA
95	4	1,62	OCP, CDHA
	20		HA, OCP, CDHA
	48		HA

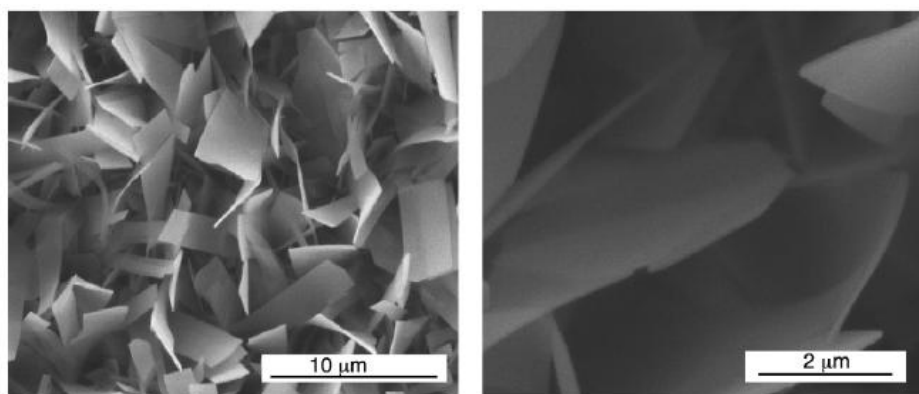
2.3. Bioaktivnost kalcijevih fosfata

Bioaktivnost materijala definirana je kao specifični odgovor površine materijala koji vodi prema stvaranju veze između materijala i okolnog tkiva [13]. Ispitivanje bioaktivnosti materijala najčešće se promatra *in vitro* i *in vivo*, pri čemu bioaktivnost *in vitro* služi kao indikacija mogućeg ponašanja materijala *in vivo*. Međutim, kao bioaktivnost materijala također se podrazumijeva sposobnost materijala na stvaranje apatitnog sloja (sličan biološkom apatitu) nakon ugradnje u živi organizam [14]. Prema Kokubu i Takadami [15] sposobnost direktnog vezanja materijala *in vivo* može biti ocijenjen stvaranjem apatitnog sloja u simuliranim fiziološkim tekućinama sastava sličnog ljudskoj plazmi. Razvili su simuliranu tjelesnu otopinu (engl. *simulated body fluid*, SBF) bez staničnih proteina za predviđanje bioaktivnosti materijala *in vivo*.

2.3.1. Bioaktivnost u simuliranoj tjelesnoj tekućini

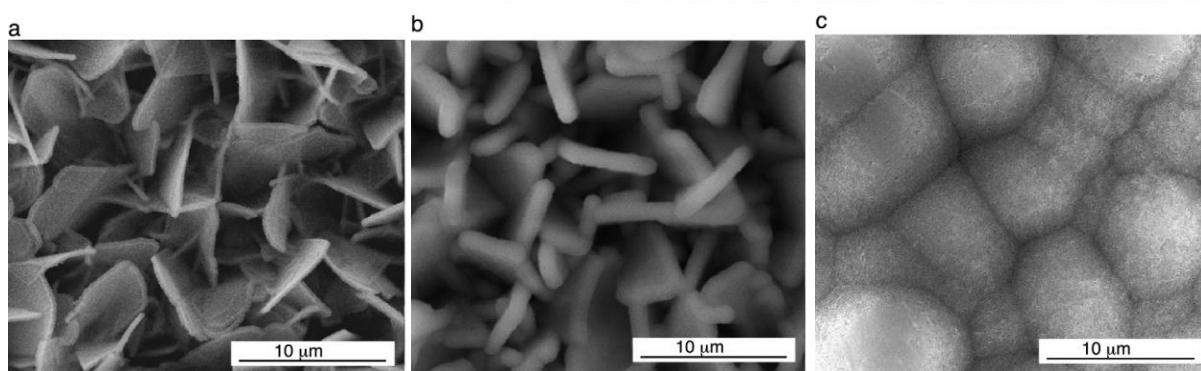
Bioaktivnost kalcijevih fosfata moguće je istražiti na samim uzorcima kalcijeva fosfata ili na tankim prevlakama kalcijevih fosfata na titanskim usadcima.

Horváthová i sur. [16] istraživali su bioaktivnost titanskih usadaka prevučениh premazima bioaktivnog OCP-a (slika 7). Rezultati pretražne elektronske mikroskopije (SEM) ukazuju na stvaranje otvorene mreže pločastih nanometarskih kristala na površini titanskog nosača, dok je rendgenska difrakcijska analiza potvrdila triklinski kristalni sustav OCP-a.



Slika 7. Kristali OCP-a na površini titanskih usadaka [16].

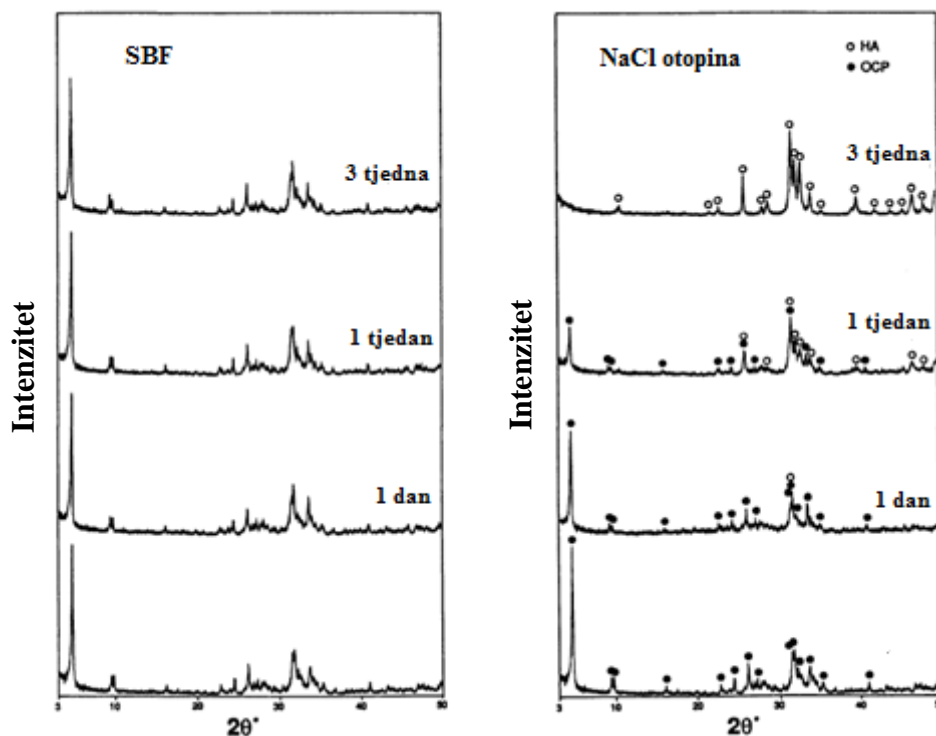
Tako prevučeni usadak ispitan je u SBF otopini u periodu od 168 sati pri čemu su promatrane biološke aktivnosti i biomineralizacija. SEM analiza prikazuje zadržavanje izvorne morfologije pločastog oktakalcijevog fosfata i nakon 10 sati namakanja pri čemu dolazi do povećanja debljine kristala na 0,35 µm (slika 8). Nakon 24 sata tretiranja u simuliranoj biološkoj otopini debljina kristala se poveća do 1,2 µm. Nakon 100 h vidljiva je transformacija OCP kristala u homogeni sloj povezanih nanometarskih kristala koji stvaraju sferične agregate promjera do 8 µm. Gravimetrijskom analizom je potvrđeno kako težina nastalog sloja raste s vremenom namakanja u SBF otopini. Hidroliza OCP faze popraćena je potrošnjom kalcijevih iona iz okolne otopine i oslobađanjem fosfatnih iona natrag u otopinu [16]. Difrakcijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom utvrđeno je nastajanje karbonatnog hidroksiapatita sličnog biološkom apatitu te zaključeno da OCP-titanski usadak posjeduje svojstvo osteokonduktivnosti, odnosno, sposobnost nastajanja koštanog tkiva.



Slika 8. Kristali OCP-a nakon a) 10 h, b) 24 h i c) 100 h u SBF otopini [16].

Ban i sur. [17] testirali su utjecaj različitog fiziološkog medija na bioaktivnost oktakalcijevog fosfata namakanjem u SBF otopini i 1%-tnoj otopini natrijeva klorida (NaCl) pri 37 °C kroz tri tjedna. Zaključili su da otopina NaCl-a povoljnije utječe na morfološke

promjene OCP-a u odnosu na SBF otopinu. S vremenom namakanja, difrakcijski maksimumi OCP-a izostaju, dok se istovremeno pojavljuju maksimumi hidroksiapatita (slika 9). Elementarnom analizom uz pomoć SEM mikroskopije dokazali su da se Ca/P omjer primarnog oktakalcijevo fosfata puno brže povećava u otopini NaCl-a. Stoga su zaključili da magnezijevi ioni koji su prisutni u SBF otopini inhibiraju transformaciju OCP-a, budući da se Mg^{2+} ioni natječu s Ca^{2+} ionima za ulazak u kristalnu rešetku. Kontrolom sastava okolne otopine moguće je kontrolirati i proces transformacije OCP-a u HA.



Slika 9. Rendgenski difraktogram pripremljenih OCP kristala te nakon 1 dan, 1 tjedna i 3 tjedna u SBF otopini (lijevo) i 1 %-tnoj NaCl otopini (desno) pri 37 °C [17].

Xie i sur. [18] ugradili su biološki aktivne kalcijeve ione na površinu titana. Svoj rad temeljili su na istraživanju Liu i sur. [19] i Hanawa i sur. [20] gdje je ustanovljeno da kalcijevi ioni poboljšavaju sposobnost titana da potakne nastajanje kalcijevih fosfatnih minerala. Tako prevučeni titanski usadak inkubiran je u SBF otopini pri čemu se istaložio površinski sloj kalcijevih fosfata nakon 7 dana inkubacije. Rendgenskom difrakcijskom analizom na tankom filmu potvrđeno je stvaranje OCP-a na titanskoj površini uslijed povoljnije nukleacije. Nakon 14 dana u SBF otopini istaložio se termodinamički stabilniji HA, odnosno, došlo je do OCP-HA transformacije .

Park i sur. [21] istraživali su bioaktivnost premaza kalcijevih fosfata dobivenih elektrodepozicijom nakon jednog sata u modificiranoj SBF otopini pri 60 °C, mijenjajući katodni potencijal od 1,5 do 2,5 V. Rezultati difrakcijske analize potvrđuju da korištenjem nižeg potencijala (1,5 V) dolazi do stvaranja višefaznog filma sastavljenog od amornog kalcijevog fosfata (ACP) i dikalcijevog fosfata dihidrata (DCPD) koji su uranjanjem u SBF otopinu pri 36,5 °C na pet dana transformirani u trofazni sustav sastavljen od OCP, HA i DCPD faza. Namakanjem premaza dobivenog pri većem potencijalu (2,0 V) utvrđena je veća prisutnost hidroksiapatita u novostvorenom sloju uz vrlo malu količinu OCP-a i DCPD-a što znači da se takav premaz *in vivo* može transformirati u hidroksiapatit kristalnosti i gustoće slične ljudskim kostima. Konačno, korištenjem potencijala od 2,5 V, u premazu je primijećena mala količina HA, dok je novostvoreni sloj nakon pet dana u SBF otopini pokazao jednofazni sustav sastavljen samo od hidroksiapatitne faze što ukazuje na potpunu transformaciju primarno stvorenog premaza.

Lu i Leng [22] analizirali su pokretačku silu i brzinu nukleacije kalcijevih fosfata u simuliranim tjelesnim tekućinama različitog sastava na temelju klasične teorije kristalizacije. Njihova analiza pokazuje da je taloženje OCP-a kinetički vrlo povoljno te je njegova brzina nukleacije puno veća od brzine nukleacije HA. Nasuprot tome, hidroksiapatit termodinamički je stabilniji u SBF otopini. Porastom pH vrijednosti u simuliranim tjelesnim tekućinama razlika u brzini nukleacije se smanjuje, pri čemu se brzina nukleacije hidroksiapatita približava brzini nukleacije OCP-a (pH = 10). U konačnici je zaključeno da taloženje oktakalcijevog fosfata u simuliranim tjelesnim tekućinama je kinetički povoljnije u odnosu na hidroksiapatit.

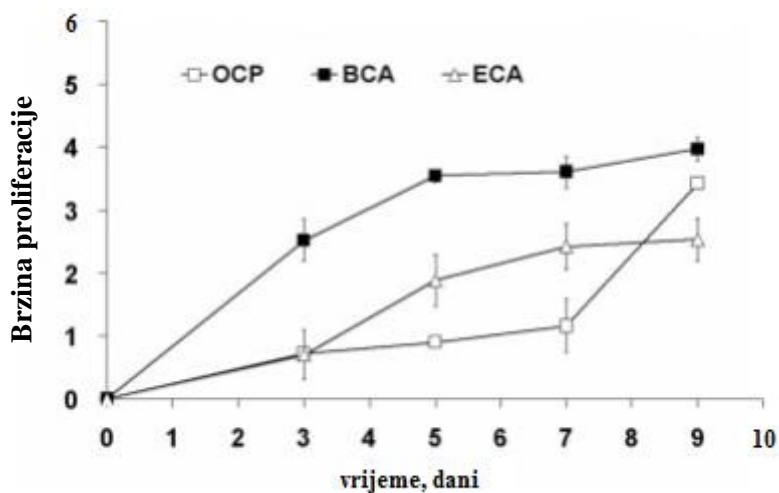
2.3.2. *In vitro* testiranje bioaktivnosti

Ispitivanje bioaktivnosti materijala u simuliranim tjelesnim tekućinama široko je primjenjiv alat za pretpostavljanje ponašanja materijala *in vivo*. Međutim, izostanak živih organizama u takvim otopinama i manjak kompleksnih bioloških procesa koji se odvijaju prilikom uzgoja stanica na materijalu onemogućuju ispitivanje biokompatibilnosti materijala. Također, kompleksni sastav medija za uzgoj stanica kao i produkti metaboličkih procesa stanica tijekom rasta i razvoja uvelike utječu na ponašanje materijala.

Smith je sa svojim suradnicima [23] proučavao ponašanje potencijalnih koštanih nosača proizvedenih sinteriranjem nanometarskih i mikrometarskih čestica hidroksiapatita. S

obzirom na već dobro dokumentiranu bioaktivnost hidroksiapatita, testirali su utjecaj različite mikrostrukture sinteriranih nosača na umnažanje (proliferaciju) mišjih preosteoblastnih stanica MC3T3-E1 tijekom 1, 3 i 7 dana uzgajanja. Pokazalo se da nosač sastavljen od nanometarskih čestica HA pogoduje većem umnažanju stanica budući da su mikrometarski HA nosači imali veličinu čestica od $8,6 \pm 1,9 \mu\text{m}$ što je bilo gotovo 15 puta veće od veličine čestica nanometarskog HA nosača ($588 \pm 55 \text{ nm}$).

Wang i sur. [24] usporedili su utjecaj biomimetički i elektrolitički pripremljenih premaza karbonatnog apatita i OCP premaza na proliferaciju i diferencijaciju osteoblastnih MC3T3-E1 stanica miša. Rezultati su pokazali kako je biomimetički pripremljen premaz karbonatnog apatita (BCA) imao najveću brzinu proliferacije, dok su premazi OCP-a i elektrolitički pripremljeni premazi karbonatnog apatita (ECA) u prva tri dana imali istu brzinu. Nakon 5 i 7 dana uzgoja, elektrolitički premaz apatita je imao veću brzinu, nakon čega OCP presteže njegovu brzinu proliferacije. Promjene su grafički prikazane na slici 10.



Slika 10. Vremenska promjena brzine proliferacije MC3T3-E1 stanica uzgojenih na OCP i HA premazima [24].

Razlike u diferencijaciji u prvih 7 dana nije bilo, dok je nakon 10 i 14 dana biomimetički pripremljen premaz karbonatnog apatita imao veću aktivnost od ostalih. Zaključili su da je OCP premaz imao srednju brzinu proliferacije zbog svoje nestabilnosti i pretvaranja u apatit. Vjeruju kako se zbog hidrolize OCP-a u hidroksiapatit stvara kisela sredina koja potencijalno utječe na proliferaciju i diferencijaciju. Biomimetički pripremljen premaz karbonatnog apatita

pokazao se najboljom površinom za širenje i diferencijaciju MC3T3-E1 stanica čemu svakako pridonosi i njegova najviša vrijednost hrapavosti površine.

Suzuki i sur. [25] ispitivali su učinak sintetskog OCP-a i hidroliziranog OCP produkta (CDHA) na proliferaciju i diferencijaciju osteoblastnih ST-2 stanica i primarnih osteoblastnih stanica miša. U početku je OCP inhibirao proliferaciju i diferencijaciju što se mijenjalo kako se OCP pretvarao u hidroksiapatit. Spoznali su da se promjer OCP premaza smanjivao s vremenom. Pretpostavili su da je to zbog pretvorbe oktakalcijevog fosfata u apatitnu strukturu. U usporedbi s kontrolnom grupom, OCP i CDHA prvih 7 dana su imali manji utjecaj na diferencijaciju i proliferaciju, dok je nakon 20 dana njihov utjecaj bio usporediv s utjecajem kontrolne skupine. Zabilježena je velika aktivnost primarnih osteoblastnih stanica i veća aktivnost ST-2 stanica nasadenih na OCP-u u odnosu na CDHA. Zaključili su kako OCP ima veliku sposobnost da unaprijedi stvaranje i obnovu kostiju [25].

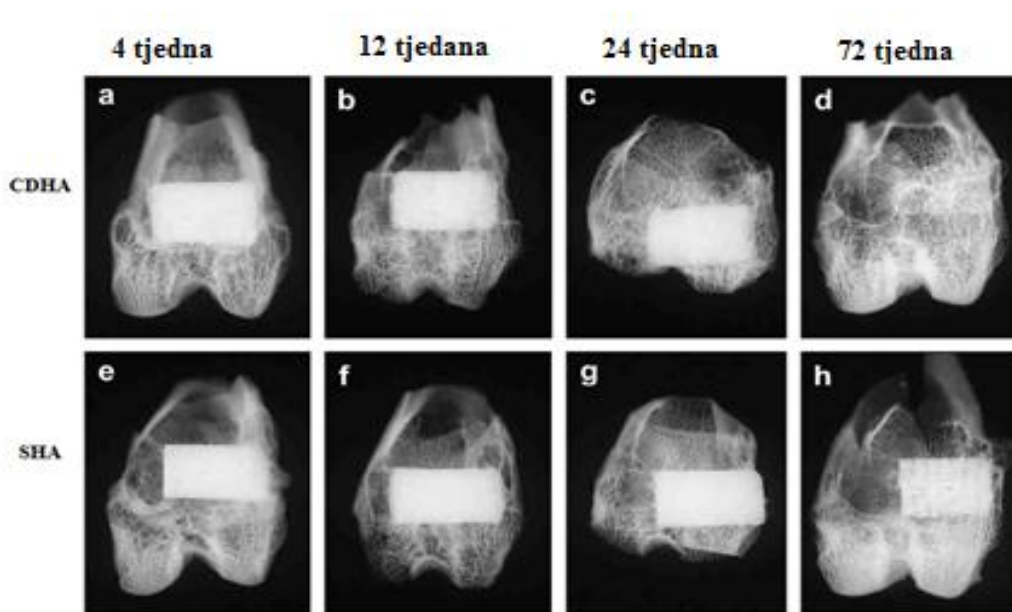
2.3.3. *In vivo* testiranje bioaktivnosti

In vitro testiranja bioaktivnosti materijala u simuliranim tjelesnim tekućinama i staničnim kulturama na nosačima predstavljaju važnu biološku karakterizaciju materijala potencijalno primjenjivih za koštana oštećenja. Vrlo su korisna za eliminiranje nekompatibilnih i citotoksičnih materijala kako bi se smanjio broj *in vivo* testiranja „loših“ materijala i time umanjio broj testiranih životinja i troškova ispitivanja. Međutim, kao konačna stavka u biološkoj karakterizaciji materijala je istraživanje bioaktivnosti, biokompatibilnosti i imunološke reakcije različitih životinjskih subjekata za što bolje poznavanje interakcije materijala i okolnog tkiva živog organizma. Do danas, veliki broj *in vivo* istraživanja s različitim životinjama proveden je upravo na materijalima temeljenima na kalcijevim fosfatima.

Istraživanje utjecaja vrste oktakalcijeva fosfata na stvaranje nove kosti u štakoru tijekom 12 tjedana proveli su Suzuki i suradnici [25]. Njihov rad temeljio se na ispitivanju transformacije sintetskog OCP i hidroliziranog OCP produkta (OCP-HA međufaze, CDHA) u apatitnu fazu *in vivo*. Rezultati analize novostvorene kosti štakora ukazali su na veću stimulaciju rasta od strane sintetskog OCP-a u odnosu na hidroksiapatit s manjkom kalcija kao hidrolizirane međufaze OCP-a. Pretpostavlja se da hidroliza OCP-a ugrađenog u živi organizam uvelike utječe na stvaranje nove koštane izvanstanične matrice, uslijed utjecaja OCP – HA konverzije na adsorpciju proteina i stanica.

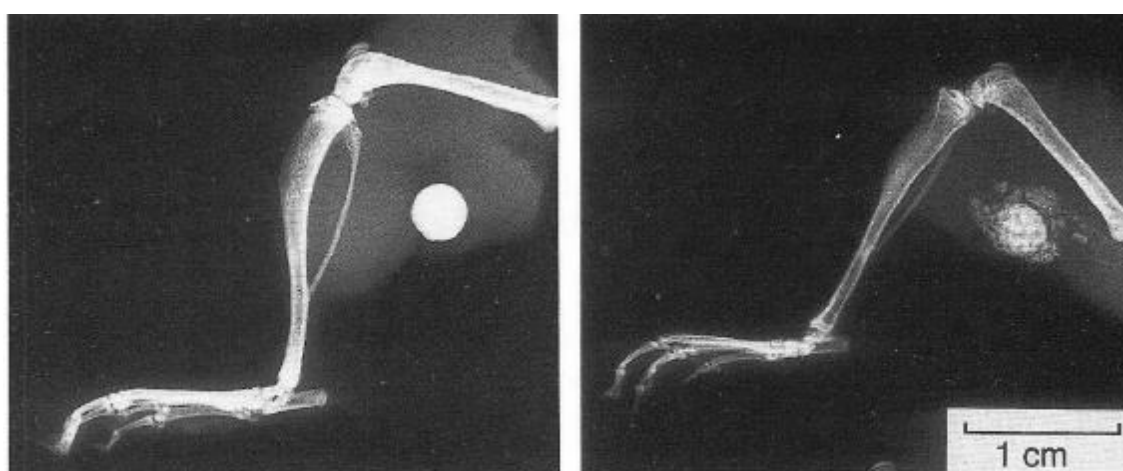
Kamakura i sur. [26] ugradili su OCP granule promjera 300 – 500 μm u oštećene kosti lubanje štakora. Nakon četiri tjedna *in vivo* uzgoja OCP granule su se raspršile diljem oštećenja, te su vidljivi i osteoblasti na novostvorenoj kosti oko OCP-a. Nakon 12 tjedana dolazi do međusobnog spajanja granula koje se okružuju novonastalom kosti. Nakon 24 tjedna dolazi do spajanja usatka s rubovima kostiju i oštećenje lubanje je gotovo potpuno ispunjeno novostvorenom kosti i preostalim OCP-om. Osim toga, Kamakura i sur. [27] usporedili su biološku resorpciju OCP-a u odnosu na uobičajeno korištene usatke HA i drugih kalcijevih fosfata unutar šest mjeseci nakon ugradnje u životinjski organizam. U slučaju OCP usatka, nakon 6 mjeseci uzgoja oštećenja su popunjena novostvorenim koštanim tkivom oko ugrađenog OCP-a koje se jedva razlikuje od okolne kosti domaćina. Liječenje defekta s HA usatkom pokazuje stvaranje kompaktne koštane matrice pri čemu preostali dio HA usatka se nalazi u novostvorenoj kosti i vezivnom tkivu. Ti rezultati upućivali su na bržu resorpciju OCP usatka *in vivo* u odnosu na HA, te da njegova ugradnja više potiče stvaranje kosti u domaćinu. Pored dobrih bioloških svojstava, navode i njegov glavni nedostatak mehaničkih svojstava, odnosno lomljivost zbog čega se isključuje iz primjene za koštane defekte velikih nosivosti, na čemu se u budućnosti treba raditi.

Bioaktivnost hidroksiapatitnih faza različitog Ca/P omjera istražili su Okuda i suradnici [8] ugradnjom hidroksiapatita s manjkom kalcija (CDHA) i stehiometrijskog hidroksiapatita (SHA) u kosti kunića. Na slici 11 prikazane su rendgenske fotografije operiranog dijela kosti kunića tijekom 72 tjedna. Četiri tjedna nakon ugradnje nema većih morfoloških razlika između SHA i CDHA, dok u 12. tjednu rubovi CDHA usatka postaju nejasni u odnosu na SHA. Nakon 24 tjedna od ugradnje, 80 % ugrađenog CDHA usatka ostaje neresorbirano. Međutim, u 72. tjednu većina CDHA usatka se resorbirala, dok je kod SHA usatka zabilježena tek blaga nepravilnost i proširenje pora. Rezultati istraživanja su dokazali da SHA nije biološki razgradljiv od strane osteoklastnih stanica u kostima već da su oni detektirani na njegovoj površini. Time su potvrdili da Ca/P omjer kalcijeva fosfata utječe na biološku aktivnost koštanih stanica (osteoklasta), tj. na resorpciju usatka. Iako je biološka resorpcija i aktivnost CDHA usatka vrlo spora, veći dio ga se razgradi unutar 72 tjedna nakon ugradnje.



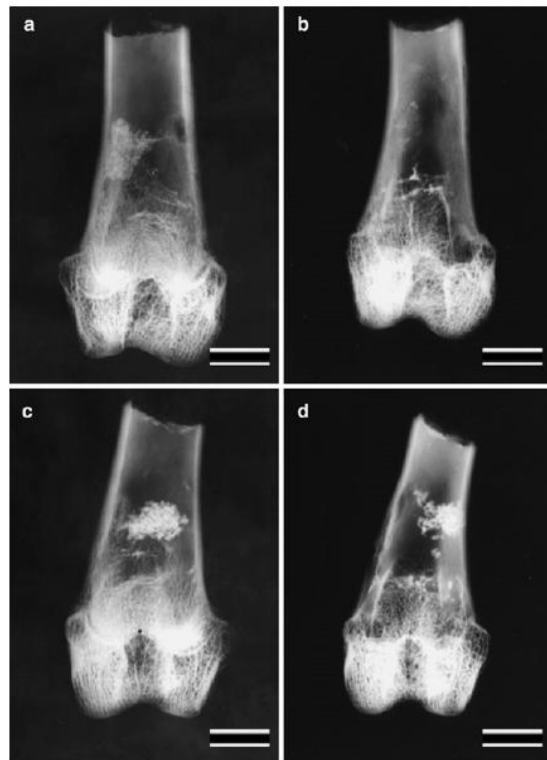
Slika 11. Kost kunića nakon 4 tjedna (a, e), 12 tjedana (b, f), 24 tjedna (c, g) i 72 tjedna (d, h) od ugradnje CDHA (gore) i SHA (dolje) usadaka [8].

Ugradnja OCP sfera u tijelo i bedrenu kost miša pokazuje morfološke promjene usatka nakon tri tjedna *in vivo* uzgoja pri čemu se primjećuje veća poroznost usatka (slika 12) [17]. Elementarnom analizom potvrđeno je postojanje i male količine natrija, magnezija, klora, sumpora i kalija. Također, dokazano je da se OCP usadak nakon tri tjedna potpuno transformira u apatit supstituiran karbonatnim, magnezijevim i natrijevim ionima niske kristalnosti te da sadrži Na i Mg ione.



Slika 12. Rendgenska snimka bedrene kosti miša odmah (lijevo) i 3 tjedna nakon (desno) ugradnje OCP sfera [17].

Još jednu potvrdu brže resorpcije OCP-a u odnosu na HA dali su Imaiuzumi i suradnici [28] ugrađivanjem materijala u koštano srž kunića. Spoznali su da se nakon 2 – 3 tjedna nakon ugradnje pojavljuje apozicijsko koštano tkivo na velikim područjima OCP-a, što je usporedivo s površinom HA usatka tek nakon 4 – 6 tjedana. Nakon 12 tjedana, područje aktivne površine OCP-a se smanjuje u odnosu na HA što je znak da se apozicijska kost brže resorbira na OCP usatku (slika 13). OCP je dokazano biološki razgradiv, dok HA usadak nakon 4 i 12 tjedana ostaje gotovo nepromijenjen.



Slika 13. Rendgenska snimka kosti kunića 4 tjedna (a, c) i 12 tjedana (b, d) nakon ugradnje OCP (a, b) i HA usadaka (c, d). Skala: 9 mm [28].

3. Zaključak

Ovim preglednim radom pokazana je važnost kalcijevih fosfata kao bioaktivne resorbirajuće keramike za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva.

Kontrolom različitih reakcijskih uvjeta moguće je dobiti zadovoljavajuću strukturu i biološka svojstva potencijalnih nadomjestaka. Testiranjima u simuliranim tjelesnim tekućinama, sustavima *in vitro* i *in vivo* potvrđena je njihova bioaktivnost, biokompatibilnost i bioresorpcija.

Iako je hidroksiapatit strukturno najbliži kostima, istraživanja idu u prilog oktakalcijevom hidrogenfosfatu koji se povoljnije biološki razgrađuje te potiče obnavljanje i rast koštanih stanica. U tijelu oktakacijev fosfat se transformira u hidroksiapatit, te osigurava kraće vrijeme liječenja koštanih defekata i ozljeda.

4. Literatura

- [1] S.V. Dorozhkin, Calcium orthophosphate-based bioceramics, *Materials* **6** 2013, 3840 – 3942.
- [2] S. Orlić, Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne biokeramike, doktorska disertacija, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2012.
- [3] A. Moguš-Milanković, Tri generacije biomaterijala, izazovi i poticaji, *Kemija u industriji* **54** (3) 2005, 131 – 134
- [4] M. Mathew, S. Takagi, Structures of biological minerals in dental research, *Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology* **106** 2001, 1035 – 1044.
- [5] M.J. Arellano-Jiménez, R. García-García, J. Reyes-Gasga, Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction, *Journal of Physics and Chemistry of Solids* **70** 2009, 390 – 395.
- [6] C. Liu, Y. Huang, W. Shen, J. Cui, Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11, *Biomaterials* **22** 2001, 301 – 306.
- [7] https://www.researchgate.net/figure/221912471_fig1_Fig-1-HA-structure-along-the-c-axis-Black-lines-connect-CaI-columns-in-hexagonal , 22.lipnja 2016.
- [8] T. Okuda, K. Ioku, I. Yonezawa, H. Minagi, Y. Gonda, G. Kawachi, M. Kamitakahara, Y. Shibata, H. Murayama, H. Kurosawa, T. Ikeda, The slow resorption with replacement by bone of a hydrothermally synthesized pure calcium-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials* **29** 2008, 2719 – 2728.
- [9] Y. Tseng, C. Mou, J.C.C. Chan, Solid-state NMR study of the transformation of octacalcium phosphate to hydroxyapatite: A mechanistic model for central dark line formation, *Journal of the American Chemical Society* **128** 2006, 6909 – 6918.
- [10] S. Graham, P.W. Brown, Reactions of octacalcium phosphate to form hydroxyapatite, *Journal of Crystal Growth* **165** 1996, 106 – 115.
- [11] O.M. Clarkin, M.R. Towler, G.M. Insley, M.E. Murphy, Phase transformations of calcium phosphates formed in wet field environments, *Journal of Materials Science* **42** 2007, 8357 – 8362.

- [12] H. Zhang, Y. Yan, Y. Wang, S. Li, Morphology and formation mechanism of hydroxyapatite whiskers from moderately acid solution, *Materials Research* **6** 2002, 111 – 115.
- [13] W. Cao, L.L. Hench: Bioactive materials, *Ceramics International* **22** 1996, 493 – 507.
- [14] R. Narayan, P.Colombo: Advances in bioceramics and porous ceramics, p.60, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 2009.
- [15] T. Kokubo, H. Takadama, How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity?, *Biomaterials* **27** 2006, 2907 – 2915.
- [16] R. Horváthová, L. Müller, A. Helebrant, P. Greil, F.A. Müller, *In vitro* transformation of OCP into carbonated HA under physiological conditions, *Materials Science and Engineering C* **28** 2008, 1414 – 1419.
- [17] S. Ban, T. Jinde, J. Hasegawa, Phase transformation of octacalcium phosphate *in vivo* and *in vitro*, *Dental Materials Journal* **11** (2) 1992, 130 – 140.
- [18] Y. Xie, X. Liu, P.K. Chu, C. Ding, Nucleation and growth of calcium–phosphate on Ca-implanted titanium surface, *Surface Science* **600** 2006, 651 – 656.
- [19] X.Y. Liu, P.K. Chu, C.X. Ding, Surface modification of titanium, titanium alloys, and related materials for biomedical applications, *Materials Science & Engineering R* **47** 2004, 49 – 121.
- [20] T. Hanawa, H. Ukai, K. Murakami, K. Asaoka, Structure of surface-modified layers of calcium-ion-implanted Ti-6AL-4V and Ti-56NI, *Materials Transactions, JIM* **36** 1995, 438 – 444.
- [21] J. Park, D. Lee, K. Oh, Y. Lee, K. Kim, K. Kim, Bioactivity of calcium phosphate coatings prepared by electrodeposition in a modified simulated body fluid, *Materials Letters* **60** 2006, 2573 – 2577.
- [22] X. Lu, Y. Leng, Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid, *Biomaterials* **26** 2005, 1097 – 1108.
- [23] I.O. Smith, L.R. McCabe, M.J. Baumann, MC3T3-E1 osteoblast attachment and proliferation on porous hydroxyapatite scaffolds fabricated with nanophase powder, *International Journal of Nanomedicine* **1**(2) 2006, 189 – 194.

- [24] J. Wang, J. de Boer, K. de Groot, Proliferation and differentiation of osteoblast-like MC3T3-E1 cells on biomimetically and electrolytically deposited calcium phosphate coatings, *Journal of Biomedical Materials Research Part A* **90**(3) 2009, 664 – 670.
- [25] O. Suzuki, S. Kamakura, T. Katagiri, M. Nakamura, B. Zhao, Y. Honda, R. Kamijo, Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials* **27** 2006, 2671 – 2681.
- [26] S. Kamakura, Y. Sasano, O. Suzuki, Synthetic octacalcium phosphate (OCP) is an effective scaffold to regenerate bone, *International Congress Series* **1284** 2005, 290 – 295.
- [27] S. Kamakura, S. Nakajo, O. Suzuki, Y. Sasano, New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2, *Journal of Biomedical Materials Research A* **71** 2004, 299 – 307.
- [28] H. Imaizumi, M. Sakurai, O. Kashimoto, T. Kikawa, O. Suzuki, Comparative Study on Osteoconductivity by Synthetic Octacalcium Phosphate and Sintered Hydroxyapatite in Rabbit Bone Marrow, *Calcified Tissue International* **78** 2006, 45 – 54.