

Ida Dulińska-Molak*, Joanna Ryszkowska

Politechnika Warszawska, Wydział Inżynierii Materiałowej, ul. Wołoska 141, 02-507 Warszawa, Poland

* Corresponding author. E-mail: idad@meil.pw.edu.pl

Otrzymano (Received) 15.02.2009

POLIURETANOWE PIANKI KOMPOZYTOWE Z KALCYTEM PRZEZNACZONE DO HODOWLI TKANEK KOSTNYCH

Przedmiotem prezentowanych wyników badań były trójwymiarowe rusztowania przeznaczone do hodowli komórkowych: poliuretanowe (PUR) i kompozytowe (PUR/kalcyt), wytworzone różnymi metodami. W wyniku badań stwierdzono, że rusztowania PUR/kalcyt cechuje wyższy moduł sprężystości niż rusztowań z PUR, a badania *in vitro* potwierdziły biogodność tego materiału. Oceniono zdolność rusztowań do mineralizacji w wyniku oddziaływania z roztworem SBF. Badania rusztowań przeprowadzono z użyciem mikroanalizatora rentgenowskiego EDS oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR-ATR. Dla wszystkich rodzajów skafoldów wyznaczono stopień porowatości metodą Archimedesesa. Wykonano obserwacje mikrostruktury porowatych rusztowań oraz warstwy apatytowej na ich powierzchni za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego (SEM). Przeprowadzono także badania termicznych właściwości mechanicznych (DMA).

Słowa kluczowe: rusztowania, kalcyt, poliuretan, kompozyty

POLYURETHANE COMPOSITE FOAMS WITH CALCITE FOR BONE TISSUES CULTURES

The main function of a tissue engineering scaffolds is to act as a substrate for deposition of cells, and their subsequent growth and proliferation. The basic requirements for the scaffold material are biocompatibility, degradability, mechanical integrity and osteoconductivity. Novel biodegradable scaffolds made of poly (ϵ -caprolactone) urethane (PCL_PUR) porous matrix and calcite were developed and studied for bone tissue engineering. The scaffolds were prepared by *in situ* polymerization. Porous structure of the scaffolds was obtained by combining leaching and coagulation techniques, using NaCl with the grain size 250-500 μm as a porogen. An influence of solution concentration on scaffolds structure and properties was evaluated. The structure and properties of scaffolds were studied by scanning electron microscopy. The scaffolds were incubated in a buffered simulated body fluid (SBF) at 37°C for certain periods of time to allow for apatite formation and potential improvement of osteoconductivity. Calcium phosphates formation of the apatite layer on three dimensional scaffolds was investigated by Scanning Electron Microscope (SEM) equipped with Energy-Dispersive Spectrometer (EDS) and Fourier transformed infrared spectroscopy-attenuated total reflectance (FTIR-ATR). The *in vitro* research showed the highest biocompatibility of the PUR/ calcite composite, which was confirmed by the mole Ca/P ratio of the apatite layer on the scaffolds' surface. The mechanical properties of composites were investigated using Dynamic Mechanical Analysis (DMA). Porosity of the scaffolds were investigated with Archimedes method. The viability of cell was performed with commercial test.

Keywords: scaffolds, calcite, polyurethane, composite

WPROWADZENIE

Jednym z priorytetowych kierunków badań współczesnej medycyny, w którym zastosowanie znalazły syntetyczne materiały, jest dynamicznie rozwijająca się inżynieria tkankowa i genetyczna [1, 2]. W ostatnich latach prowadzi się intensywne badania w obszarze technologii biodegradowalnych i bioresorbowalnych związków wielkocząsteczkowych stosowanych w produkcji materiałów biomedycznych, mających bezpośredni kontakt z wewnętrznymi tkankami organizmu. Naukowcy takich dziedzin, jak biologia, chemia czy inżynieria materiałowa ściśle współpracują ze sobą w celu wytworzenia materiału dostosowanego pod względem funkcji i właściwości do miejsca uszkodze-

nia. Zakłada się, iż owe biomateriały powinny spełniać podstawowe założenia, takie jak wysoka biogodność, oraz określone wymagania mechaniczne (moduł sprężystości, odkształcenie, wytrzymałość) i użytkowe (łatwość sterylizacji). Wydaje się, że regeneracja uszkodzonych lub całkowicie zniszczonych tkanek oraz narządów to najbardziej perspektywiczny kierunek aplikacji materiałów polimerowych. W grupie tych biomateriałów istotną rolę odgrywają poliuretany (PUR), których główną zaletą jest duży stopień swobody w projektowaniu właściwości fizycznych i mechanicznych szczególnie użytecznych w znaczącym obszarze inżynierii tkankowej, jakim jest rekonstrukcja tka-

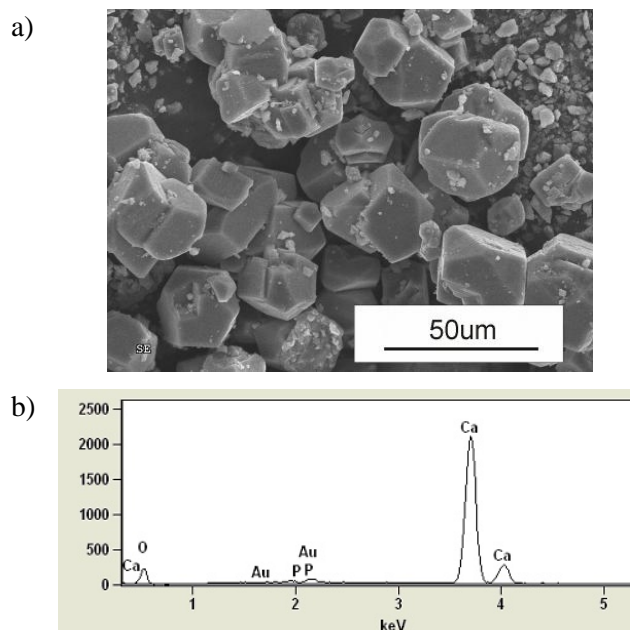
nek miękkich, chrząstek czy regeneracja kości [3, 4]. Poliuretany charakteryzuje dwufazowa mikrostruktura, na którą składa się faza uporządkowanych domen sztywnych, przenikająca się z fazą segmentów giętkich [5]. Stosunek zawartości segmentów, ich długość oraz rodzaj zastosowanych substratów ma istotny wpływ na właściwości otrzymanych materiałów. Szczególnie interesującą grupę polimerów resorbowalnych stanowią poliuretany na bazie poli(ϵ -kapolaktanu) (PUR/PCL), który uważany jest za tkankowo zgodny, ulegający biodegradacji i nietoksyczny [6, 7]. W wyniku coraz bardziej złożonych wymagań stawianych biomateriałom odpowiedzią współczesnej inżynierii materiałowej są biokompozyty. Specyfiką tych materiałów jest możliwość uzyskania niestandardowych właściwości implantów, takich jak: jednoczesna wysoka wytrzymałość mechaniczna, niski moduł sprężystości oraz wysoka biogodność, co jest trudne do osiągnięcia dla innych materiałów. Obiecującą grupą materiałów kompozytowych są kompozyty resorbowalne. Niniejsza praca dotyczy trójwymiarowych resorbowalnych rusztowań (*ang.* scaffolds). Przedmiotem badań są układy złożone z resorbowalnej poliuretanowej osłony na bazie poli(ϵ -kapolaktanu), wzmocnione fazą ceramiczną w postaci węglanów wapnia [8]. Węglany wapnia często stosuje się do poprawy biogodności i przyspieszenia osteointegracji z naturalną tkanką kostną.

MATERIAŁY

Poliuretany otrzymano metodą prepolimerową z następujących substratów: 4,4'-diizocyjanianu dicykloheksylometanu (H_{12} MDI), poli(ϵ -kapolaktano)diolu (PCL) o masie cząsteczkowej $M_n = 530$ firmy Sigma-Aldrich sp. z o.o., proszku kalcytowego o średniej wielkości ziaren $50 \pm 20 \mu m$ (rys. 1), pochodzącego z Instytutu Szkła i Ceramiki w Warszawie. Polioli z proszkiem kalcytowym poddano procesowi odwadniania w próżni 2-5 hPa przez 2 h w temperaturze $120^\circ C$. Następnie dodano HMDI i mieszano z pozostałymi substratami, utrzymując przez 45 minut stałą temperaturę reakcji na poziomie $60^\circ C$. Ostatnim składnikiem syntezy, jakiego dodano, był środek wydłużający i całość mieszano przez 10 minut. Jako środka wydłużającego łańcuch prepolimeru użyto glikolu etylenowego (EG) firmy POCH z Gliwic. Odlaną mieszanekę polimerową utwardzano w temperaturze $110^\circ C$ przez 16 h. Polimer wytworzono przy stosunku molowym substratów $H_{12}MDI:PCL:EG$ równym 2:1:1. Wytworzone kompozyty zawierały 10% wagowych proszku kalcytowego.

Trójwymiarowe rusztowania PUR i PUR/kalcyt wytwarzano metodą wymywania cząstek stałych z rozpuszczonego polimeru. Do wytworzenia rusztowań stosowano roztwory polimeru w 1-metylo-2-pirolidonu o różnym stężeniu 15 i 20%. Schłodzony w ciekłym azocie kompozyt PUR/kalcyt zmielono i rozpuszczono. Jako poroforu użyto kryształów NaCl o rozmiarach $300 \div 420 \mu m$. Stosunek masowy PUR i kompozytu do

NaCl wynosił 1:1. Mieszanekę polimer/sól/rozpuszczalnik odlano do foremek w środowisku wody destylowanej i pozostawiono na 24 h. Podczas procesu moczenia dochodziło do wytrącania polimeru i wymywania cząsteczek soli i resztek rozpuszczalnika. W celu dokładniejszej penetracji wody destylowanej w głąb porowatej struktury materiału przez kolejne 24 h próbki mieszano z użyciem mieszadła magnetycznego, zmieniając wodę co 6 h. Otrzymane porowate próbki PUR i PUR/kalcyt suszono pod próżnią.



Rys. 1. Obrazy SEM struktury proszku kalcytowego (a), skład chemiczny proszku kalcytowego (b)

Fig. 1. SEM images the surface of calcite powder (a), EDS analyses of the surface calcite powder (b)

Wykonano trzy typy rusztowań: typ 1 - rusztowanie z PUR wykonane z roztworu o 15% stężeniu polimeru w rozpuszczalniku, typ 2 - z kompozytu PUR/kalcyt wykonane z 15% stężenia kompozytu w rozpuszczalniku, typ 3 - z kompozytu PUR/kalcyt wykonane z 20% roztworu kompozytu. Wytworzone kompozyty zawierały 10% wagowych napelnacza w postaci proszku kalcytowego. Parametry wytwarzania rusztowań z PUR opracowano w trakcie wcześniej prowadzonych badań. Wprowadzenie napelnacza do polimerowej osnowy zmienia lepkość roztworu, z którego wykonywane są rusztowania, dlatego zaproponowano wykonanie rusztowań z 15 i 20% roztworu kompozytu, aby dobrać optymalne parametry procesu wytwarzania rusztowań.

W ramach pracy oceniono wpływ kalcytowego napelnacza oraz sposobu wykonania kompozytowych rusztowań na ich bioaktywność.

METODYKA BADAŃ

Jedną z głównych właściwości, która decyduje o przydatności materiału do hodowli tkanki kostnej, jest jego bioaktywność, rozumiana jako zdolność do mine-

ralizacji, czyli wytwarzania apatytu w wyniku oddziaływania z płynem ustrojowym [9]. Badania *in vitro* przeprowadzono w roztworze (SBF) o stężeniu jonów zbliżonym do plazmy krwi (tab. 1), sporządzonym według receptury Kokubo [10].

TABELA 1. Stosunek jonów w roztworze SBF i w plazmie krwi ludzkiej

TABLE 1. Ionic concentrations of SBF and human blood plasma

	Stężenie, mM							
	Na ⁺	K ⁺	Ca ²⁺	Mg ²⁺	HPO ₄ ²⁻	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	SO ₄ ²⁻
Plazma krwi	142,0	5,0	2,5	1,5	1,0	103,0	27,0	0,5
SBF	142,0	5,0	2,5	1,5	1,0	125,0	27,0	0,5

Próbki inkubowano w roztworze SBF w temperaturze 37°C przez 7, 14 i 28 dni. Po odpowiednim czasie inkubacji porowate materiały dokładnie płukano w wodzie destylowanej i suszono w temperaturze 37°C. Zmiany powierzchni poliuretanowych pianek po inkubacji obserwowano za pomocą elektronowego mikroskopu skaningowego (SEM) Hitachi S-2600 i S-5500. W celu analizy warstwy osadzonej na powierzchni pianek po inkubacji w SBF wykonano analizę składu chemicznego z użyciem mikroanalizatora rentgenowskiego EDS oraz spektroskopii w podczerwieni FTIR-ATR (spektrometr Nicolet 6700, zakres widma od 400 do 4000 cm⁻¹). Poliuretanowe rusztowania poddano cyklicznemu ścisnaniu w celu wyznaczenia właściwości mechanicznych, używając do tego celu urządzenia DMA Q800 firmy TA Instruments. Do badań wykorzystano walcowe próbki o wymiarach $\varnothing = 8$ mm i grubości $h = 3,2 \div 3,7$ mm. Próbki ścisniano z amplitudą 15 μ m w trakcie ogrzewania do temperatury 80°C z prędkością 3°C/min.

Porowatość otwartą wyznaczono metodą Archimedes'a zgodnie z normą PN-76/E/06307, korzystając ze wzoru

$$P = (m_2 - m_1) / (m_2 - m_3) \times 100, \%$$

gdzie: m_1 - masa próbki suchej, g, m_2 - masa próbki nasączonej, g, m_3 - masa próbki w wodzie, g.

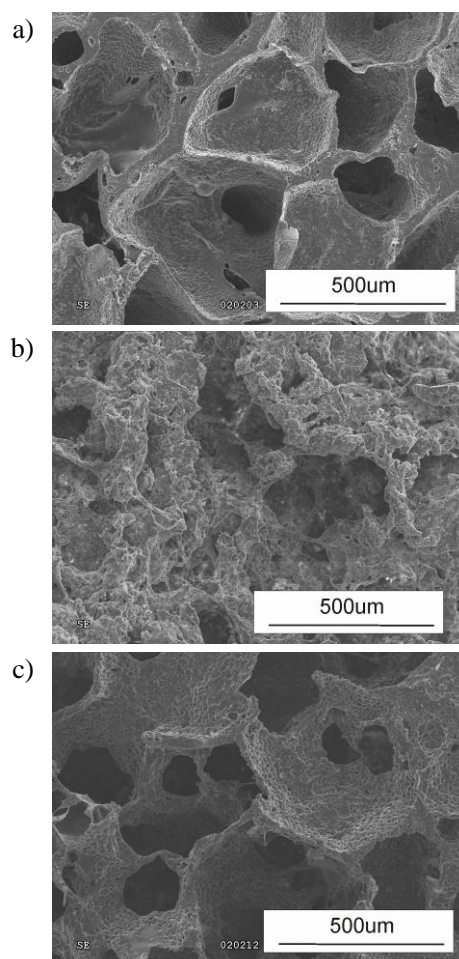
Do badań wykorzystano walcowate próbki o wymiarach $\varnothing = 6$ mm i grubości $h = 5$ mm.

Przeprowadzono także test przeżywalności komórkowej w warunkach *in vitro* w hodowli z ludzkimi osteoblastami linii SaOS-2. Próbki umieszczono w płytce 24-studzienkowej i zasiedlono komórkami (8000 komórek/studzienkę) w 1 ml pożywki hodowlanej (Dulbecco's Modified Eagle's medium, Sigma) wzbogaconej 10% bydlęcej surowicy płodowej, 1% penicyliny oraz 10 μ g/ml streptomycyny. Po 3 dniach hodowli w standardowych warunkach zbadano żywotność komórek za pomocą testu WST-1. Przed badaniami *in vitro* i *in vivo* porowate materiały poddano procesowi

sterylizacji radiacyjnej dawką 25 kGy w Instytucie Chemii i Techniki Jądrowej w Warszawie w akceleratorze Elektronika 10/10. Promieniowanie o tej dawce nie wpływa na zmianę właściwości poliuretanów [11, 12].

WYNIKI BADAŃ

Na rysunku 2 przedstawiono przykładowe obrazy struktury trzech typów rusztowań stosowanych do hodowli komórkowych. Rusztowania poliuretanowe (PUR) (rys. 2a) i kompozytowe (PUR/kalcyt) (rys. 2c), cechuje regularna i otwartokomórkowa struktura porowata, w przeciwieństwie do kompozytu typu 2 (rys. 2b) gdzie pory mają nieregularne i często zamknięte kształty. Różnice w strukturze kompozytów wynikają ze sposobu ich wykonania. Korzystniejszą strukturę ze względu na przeznaczenie do hodowli tkanek kostnych mają rusztowania kompozytowe wykonane z roztworu o stężeniu 20%.



Rys. 2. Struktury porów rusztowań: a) poliuretanowego (PUR) typ 1, b) PUR/kalcyt typ 2, c) PUR/kalcyt typ 3

Fig. 2. Polymers foams: a) polyurethane (PUR) Type 1, b) composites PUR/calcite Type 2, c) PUR/calcite Type 3

W tabeli 2 przedstawiono wyniki badań porowatości otwartej metodą Archimedes'a, które potwierdziły obserwacje mikrostruktury wykonane z zastosowaniem

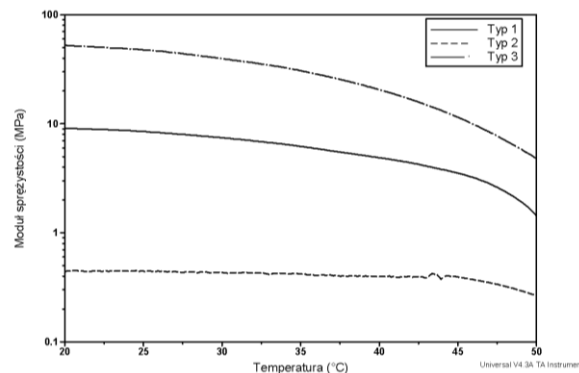
SEM. Kompozyty typu 2 charakteryzują się najmniejszą porowatością otwartą. Rusztowania polimerowe typu 1 i kompozyty typu 3 mają porównywalnie wysoką porowatość w ok. 80%.

TABELA 2. Wartości porowatość otwartej
TABLE 2. Porosity of scaffolds

	PUR (typ 1)	PUR/CaCO ₃ (typ 2)	PUR/CaCO ₃ (typ 3)
porowatość otwarta, %	78,8	37,2	79,4

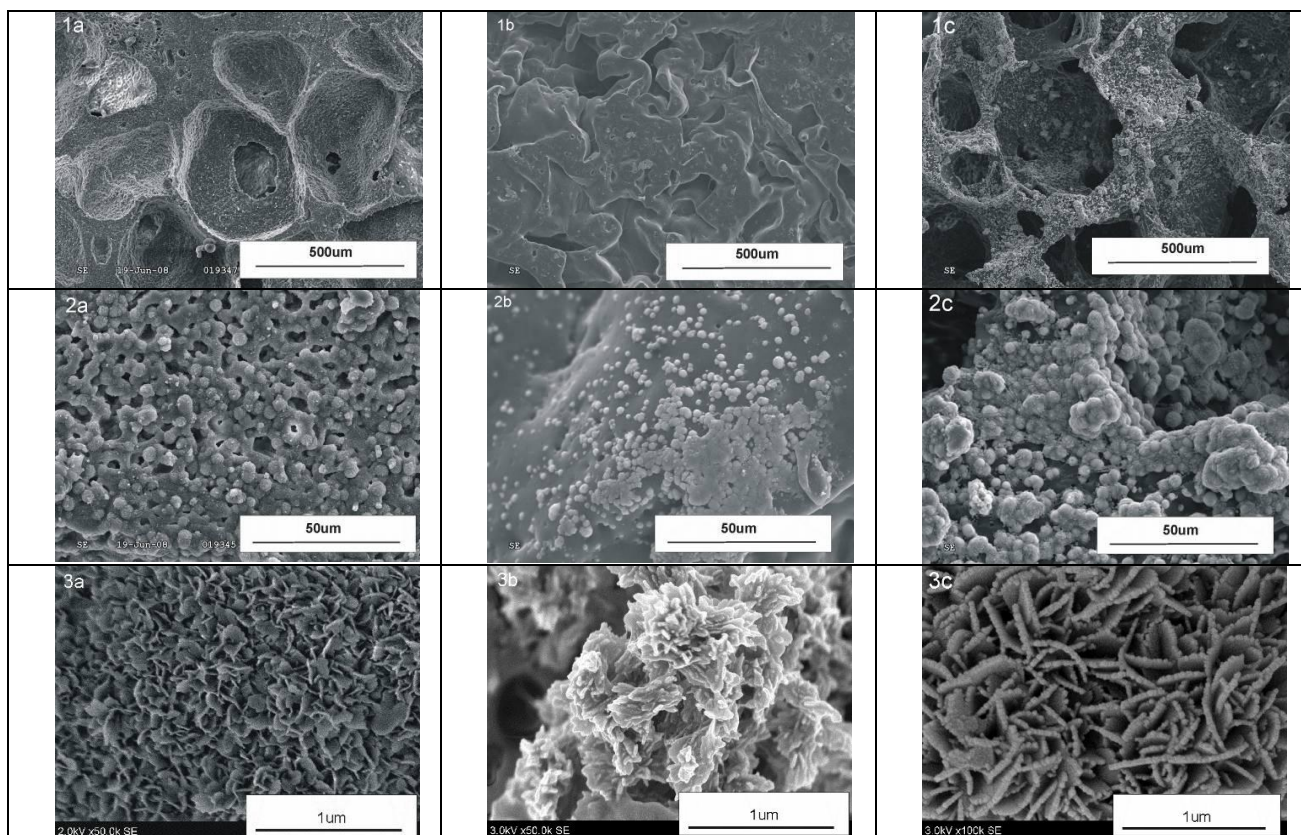
Poliuretanowe rusztowania poddano cyklicznej próbie ściskania w celu porównania właściwości mechanicznych trzech typów materiałów (rys. 3). Najwyższą wartością modułu sprężystości dynamicznej (SM) charakteryzuje się kompozyt typu 3. Ze wzrostem temperatury jednak wartości te ulegają szybkiemu spadkowi w przeciwieństwie do poliuretanowych próbek, dla których moduł sprężystości jest najniższy, natomiast ze wzrostem temperatury nie rejestruje się znaczącego spadku. Pożądane jest, aby materiał miał moduł sprężystości zbliżony do kości. Z badań wynika, że wprowadzenie napełniacza poprawia właściwości mechaniczne rusztowań w interesujących nas temperaturach (od 35 do 45°C). Następnym etapem, mającym na celu porównanie wytworzonych materiałów, były badania *in vitro*, na rysunku 4 pokazano obrazy porowatych materiałów

z warstwą apatytową, wytworzoną na powierzchni rusztowań w wyniku 28-dniowej inkubacji w roztworze SBF. Narastająca warstwa, na każdej z powierzchni porowatych rusztowań, charakteryzuje się inną mikrostrukturą. Na powierzchni kompozytu typu 2 obserwujemy małe skupiska apatytu nieregularnie rozmieszczone na powierzchni. Rusztowania poliuretanowe typu 1 i kompozyty typu 3 są regularnie i jednolicie pokryte warstwą apatytu. Jego „płatkowa” budowa może wskazywać, że jest to przejściowa forma krystaliczna (OCP), występująca często w procesie tworzenia się hydroksyapatytu (HA) [13].



Rys. 3. Wykres DMA trójwymiarowych rusztowań poddanych próbie cyklicznego ściskania

Fig. 3. DMA curie of scaffolds



Rys. 4. Obrazy SEM struktury powierzchni trójwymiarowych rusztowań po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF: a) poliuretanowych (PUR) typ 1, b) PUR/kalcyt typ 2, c) PUR/kalcyt typ 3

Fig. 4. SEM images of the surface HAP layer grown after 28 days in SBF scaffolds: a) polyurethane (PUR) Type 1, b) composites PUR/calcite Type 2, c) PUR/calcite Type 3

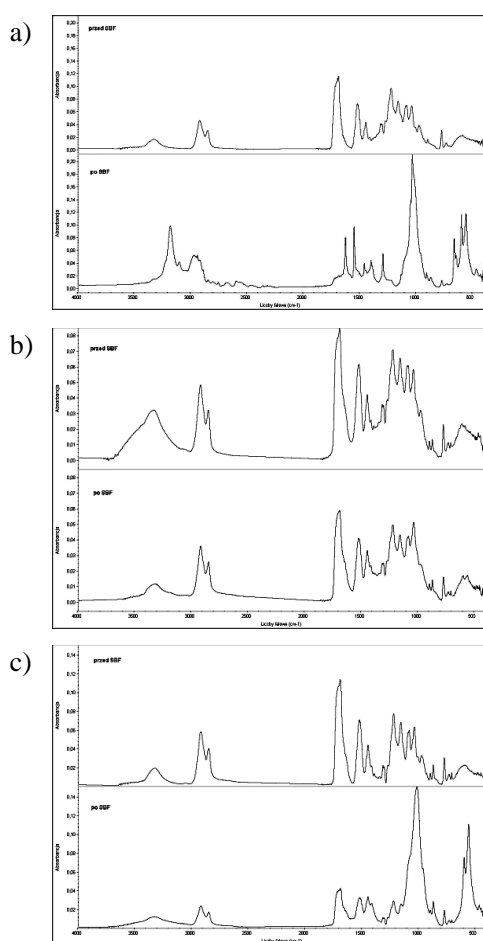
Jedną z metod określania rodzaju apatyty tworzącego się na powierzchni materiału, w wyniku inkubacji w SBF, jest wyznaczenie stosunku molowego Ca/P badanej warstwy. W tym celu na podstawie pomiarów EDS wyznaczono stosunek Ca/P badanych materiałów (tab. 3).

TABELA 3. Stosunek molowy Ca/P wyznaczony z widm EDS
TABLE 3. Ca/P ratio of scaffolds surfaces following immersion in SBF as determined by EDS analysis

	PUR (typ 1)	PUR/CaCO ₃ (typ 2)	PUR/CaCO ₃ (typ 3)
stosunek Ca/P	1,44	1,47	1,68

Efektom pożądanym jest uzyskanie na powierzchni apatyty o budowie jak najbardziej zbliżonej do naturalnego HA o stosunku molowym Ca/P równym 1,67 [14]. Kompozyt PUR/kalcyt z 20% roztworu (typ 3) charakteryzuje się najwyższą wartością stosunku Ca/P i jest najbliższy pożądaney wartości.

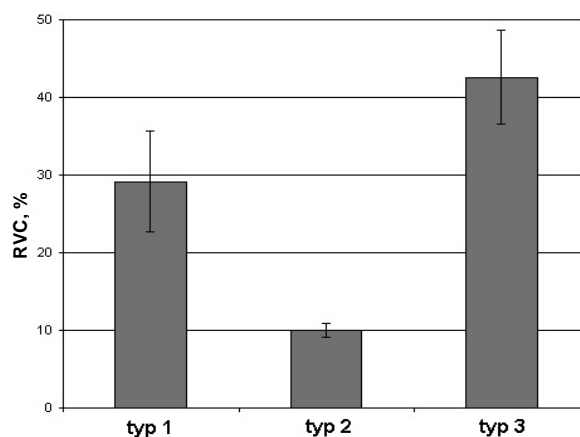
Rysunek 5 przedstawia wyniki badania FTIR-ATR wykonane w celu analizy budowy chemicznej powierzchni rusztowań po inkubacji w SBF.



Rys. 5. Widma FTIR-ATR przed i po 28 dniach inkubacji w roztworze SBF trójwymiarowych rusztowań: a) poliuretanowych (PUR) typ 1, b) PUR/kalcyt typ 2, c) PUR/kalcyt typ 3

Fig. 5. FTIR-ATR spectra of the surface of scaffolds before degradation and after 28 days in SBF: a) polyurethane (PUR) Type 1, b) composites PUR/calcite Type 2, c) PUR/calcite Type 3

Widma FTIR-ATR zestawiono dla każdego rodzaju rusztowań przed i po 28-dniowej inkubacji w roztworze SBF. Na widmach widoczne są charakterystyczne piki typowe dla apatyty w okolicach 560÷600 cm⁻¹ oraz w okolicach 1020÷1040 cm⁻¹, odpowiadające zginającym i rozciągającym drganiom grup PO₄. Ponadto na widmach przedstawiających rusztowania po inkubacji pojawia się pik w okolicach 873 cm⁻¹, odpowiadający drganiom grup węglanowych świadczących o tworzeniu się na powierzchni węglanów wapnia [15]. Z badań *in vivo* wynika, że najlepszą bioaktywność wykazuje kompozytowe rusztowanie wykonane z roztworu o stężeniu 20% (typ 3). Te kompozytowe rusztowania mają procentowo największą porowatość, a w wyniku oddziaływania z płynem SBF charakteryzują się największą zdolnością do mineralizacji. Badania wskazują, iż mają one najwyższy z przebadanych materiałów współczynnik Ca/P oraz najwyższy moduł sprężystości. Kolejnym etapem pracy były badania *in vitro* na ludzkich osteoblastach, których wyniki przedstawiono na rysunku 6. Z testu WST-1 (rys. 6) wynika, że najlepszymi wynikami przeżywalności komórkowej charakteryzują się osteoblasty hodowane na podłożach kompozytowych typu 3.



Rys. 6. Wyniki testu przeżywalności komórkowej ludzkich osteoblastów

Fig. 6. Relative viability of SaOs-2 measured using the WST-1 assay after 3 days of culture on modified scaffolds

PODSUMOWANIE

Wytworzono i przebadano trzy typy porowatych rusztowań: poliuretanowe (PUR) oraz kompozytowe (PUR/kalcyt), które wytworzono z roztworu o różnym stężeniu - 15 i 20%. Wykazano, że istotnym parametrem wpływającym na strukturę rusztowań jest stężenie roztworu polimer/rozpuszczalnik. Konieczność doboru stężenia roztworu do wytwarzania kompozytowych rusztowań wynika ze zmian lepkości roztworów spowodowanych wprowadzeniem napełniacza. Przeprowadzone badania dowiodły, że można wytworzyć porowate kompozyty z napełniaczem kalcytowym o wysokim - 80% stopniu porowatości otwartej, polepszając jednocześnie właściwości mechaniczne scaffoldów, m.in.

zwiększając moduł sprężystości materiału. Wykazano, iż wprowadzenie do poliuretanu napełniacza w postaci proszku kalcytowego powoduje polepszenie bioaktywności, rozumianej zarówno jako zdolność do mineralizacji w wyniku oddziaływania z płynem ustrojowym, jaki i przeżywalności komórkowej.

Podziękowania

Szczególne podziękowania dla dra Zbigniewa Jaegermanna z Instytutu Szkła i Ceramiki w Warszawie za udostępnienie proszku.

Praca finansowana w ramach projektu badawczego R1301901.

LITERATURA

- [1] Kim B.S., Atala A., Biomaterials for tissue engineering, World Journal of Urology 2000, 18, 2-9.
- [2] Liu X., Ma P.X., Polymeric scaffolds for bone tissue engineering, Annals of Biomedical Engineering 2004, 32, 477-486.
- [3] Guan J., Fujimoto K.L., Sacks M.S., Wagner W.R., Preparation and characterization of highly porous, biodegradable polyurethane scaffolds for soft tissue applications, Biomaterials 2005, 26, 3961-3971.
- [4] Grad S., Kupcsik L., Gorna K., Gogolewski S., Alini M., The use of biodegradable polyurethane scaffolds for cartilage tissue engineering: potential and limitations, Biomaterials 2003, 24, 5163-5171.
- [5] Gruin I., Ryszkowska J., Boczkowska A., Markiewicz B., Zależność właściwości makroskopowych od budowy lanych elastomerów nitrylomocznikowouretanowych, Polimery 1994, 39, 4.
- [6] Grosvenor M.P., Staniforth J.N., The effect of molecular weight on the rheological and tensile properties of poly(ϵ -caprolactone), International Journal of Pharmaceutics 1996, 135, 103-109.
- [7] Shimao M., Biodegradation of plastics, Current Opinion in Biotechnology 2001, 12, 242-247.
- [8] Olah L., Filipczak K., Jaegermann Z., Czigany T., Borbas L., Rosiak J.M., Synthesis, structural and mechanical properties of porous polymeric scaffolds for bone tissue regeneration based on neat poly(ϵ -caprolactone) and its composites with calcium carbonate, Polym. Adv. Technol. 2006, 17(9), 1-9.
- [9] Kokubo T., Apatite formation on surfaces of ceramics, metals and polymers in body environment, Biomaterials 1991, 12(2), 155-163.
- [10] Kokubo T., Kushitani H., Sakka S., Kitsugi T., Yamamuro T., Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res. 1990, 24, 721-734.
- [11] Przybytniak G., Kornacka E., Bil M., Ryszkowska J., Sterylizacja radiacyjna poliuretanów stosowanych w inżynierii tkankowej, Inżynieria Biomateriałów 2005, 47-53, 154-157.
- [12] Ryszkowska J., Bil M., Przybytniak G., Wpływ sterylizacji radiacyjnej na właściwości fizykochemiczne poliuretanów do zastosowań biomedycznych, Inżynieria Biomateriałów 2005, 47-53, 157-159.
- [13] Martinez-Perez C.A., Garcia-Casillas P.E., Martinez-Villafane A., Romero-Garcia J., Hydroxyapatite coating on porous polyurethane facilitated by tetraethoxysilane, Silicon Chemistry 2003, 2, 179-184.
- [14] Kokubo T., Ito S., Huang Z.T., Hayashi T., Sakka S., Ca,P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic A-W, J. Biomed. Mater. Res. 1990, 24, 331-343.
- [15] Radin S., Ducheyne P., Rothman B., Conti A., The effect of in vitro modeling conditions on the surface reactions of bioactive glass, J. Biomed. Mater. Res. 1997, 37, 363-375.