

Nove metode pripreme bioimplantata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka

Vida Čadež

Institut Ruđer Bošković, Zavod za istraživanje mora i okoliša, 10000 Zagreb

Autor za prepisku:

Vida Čadež

Adresa: Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

e-mail: Vida.Cadez@irb.hr

Telefon: 01 4680 124

Pregledni članak

UDK 616.71-089.843:57.089

Prispjelo: 16. veljače 2011.

Unatoč dugogodišnjem istraživanju i upotrebi zamjenskih koštanih materijala, prirodni biomaterijali i dalje pokazuju najbolje rezultate. Uzimajući u obzir da kosti kralješnjaka kao zamjenski materijal predstavljaju potencijalni izvor zaraze, istraživači ispituju i druge biominerale manje srodnih organizama. Istraživanja provedena na morskim beskralješnjacima dovela su do razvoja i aplikacije implantata kao što je to Pro Osteon® ili Algipore®, koji postižu dobre kliničke rezultate.

U ovom radu dan je prikaz najpoznatijih materijala dobivenih iz morskih organizama koji se već koriste u kliničkoj medicini ili imaju dobar potencijal za upotrebu. Navedene su i dodatne mogućnosti istraživanja morskih organizama u proučavanju patoloških procesa biomineralizacije u ljudskom organizmu.

Ključne riječi: mineralizacija, morski organizmi, implantati, biomimetika, kosti, kamenci, urolitijaza, biokompatibilni materijali, hiperkalciurija

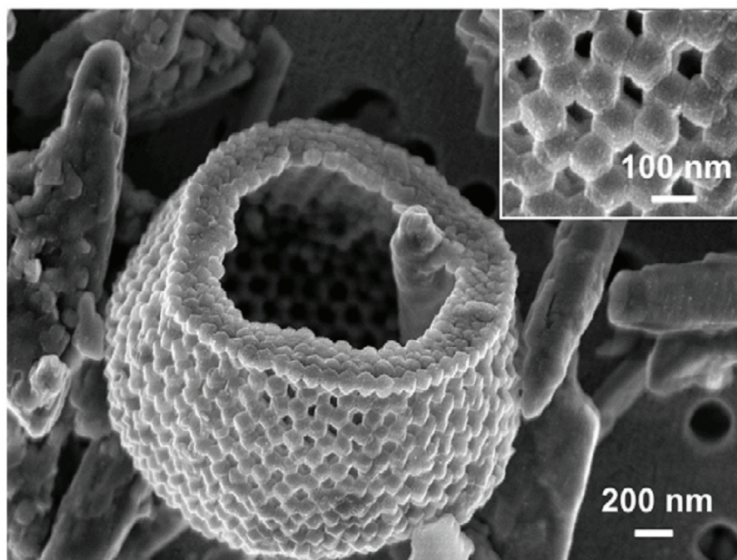
1. Uvod

Ugradnja koštanih implantata rutinski se koristi u dentalnoj i ortopedskoj kirurgiji. Iako se implantati i lijekovi dizajnirani za ortopedsku patologiju konstantno usavršavaju, još nije pronađen materijal koji bi svojim svojstvima bio jednak zdravoj kosti. Zbog toga je težište mnogih istraživanja na pronalasku kompatibilnih materijala koji će uz svojstvo bioaktivnosti biti osteokonduktivni te idealno i osteoinduktivni. Anorganski kompoziti rijetko imaju ta svojstva, a često je njihova izrada preskupa da bi bili ekonomični. Nadalje, značajni problemi stabilnih polimera jesu nedegradabilnost i potreba za drugom operacijom na mjestu ugradnje zbog njihovoga uklanjanja.

Iako je osnovna uloga kostiju oblikovanje, kretanje i zaštita, one su također i proizvođači krvnih stanica, u njima se pohranjuju masti, minerali i faktori rasta, a imaju ulogu i u detoksikaciji te acidobaznom balansu krvi (1). Kod izrade koštanih implantata potrebno je zadovoljiti i

fizikalna svojstva kostiju: tvrdoću, elastičnost i vodljivost. Trenutačno je najbolji zamjenski materijal autolog; kost iste osobe uzeta s drugog mjesta u tijelu. Međutim, u slučaju bolesti, većega gubitka dijela koštanoga tkiva, te ako se radi o starijoj osobi, ovakav nadomjestak nije preporučljiv, a često i nije moguć. Odgovarajući materijal koji će upotpuniti takvo tkivo i služiti kao odgovarajuća zamjena nije jednostavno nabaviti. Kostii drugih ljudi predstavljaju potencijalni izvor zaraznih bolesti kao što su sida, hepatitis i sifilis, često su teško dobavljive, a zbog nedovoljnih kontrola dolazi i do incidenata, te je i zakonska regulativa posljedično sve stroža. Slični se problemi javljaju i kod ugradnje kostiju drugih sisavaca, pogotovo goveda zbog mogućnosti zaraze s prijenosnom spongiformnom encefalopatijom (2). Pritom se javlja i problem odbacivanja stranoga materijala nakon transplantacije.

Kako bi se spriječila mogućnost zaraze, istražuju se razni organsko-anorganski kompoziti, ali i materijali koji



SLIKA 1.

SEM fotomikrografska slika heterotrofnog protozoa koja pokazuje nanostrukturirani oblik njegove lorike (uzorak potječe iz sedimenta morskoga jezera Malo Jezero, otok Mljet, Jadransko more). Slika je preuzeta uz dopuštenje autora (5).

IMAGE 1

SEM photomicrography of heterotrophic protozoa showing precise nanostructure of its lorica (sample originates from the sediment of sea lake Malo Jezero on the island of Mljet, Adriatic Sea). Picture is adapted from (5) with the courtesy of authors.

su u potpunosti organskoga podrijetla. Vrlo popularni sintetski materijali trenutačno u upotrebi građeni su od kalcijeve fosfatne keramike, svojim kemijskim sastavom bliske koštanom hidroksiapatitu, sa svojstvima biokompatibilnosti i osteokonduktivnosti, ali s nepouzdanom čvrstoćom (3). U kliničkim ispitivanjima i dalje ne postižu rezultate slične implantatima od prirodne kosti jer dolazi do djelomične resorpcije, nekompletne zamjene, a keramički materijali ostaju *in situ* više godina (2). Jedna od glavnih karakteristika koju idealan zamjenski materijal treba posjedovati je veličina pora od 200 do 500 μm , kako bi bila optimalna za neovaskularizaciju (2, 4). No, s povećanjem veličine pora, materijal gubi dio svoje čvrstoće, a to predstavlja problem prilikom dizajna takvoga sintetskog materijala.

S obzirom da toplokrvni organizmi predstavljaju mogući izvor zaraze, asintetski materijali za sada ne mogu poslužiti kao zamjena za prirodne materijale. Znanstvenici intenzivno istražuju ostale organizme koji mogu biti odgovarajuća supstitucija za kost, odnosno koji posjeduju biomineralne strukture sa zadovoljavajućim fizikalnim svojstvima. Na prvi pogled beskralješnjaci možda i ne djeluju kao idealan kandidat za rješavanje problema koštanoga sustava kralješnjaka. Međutim, ako pogledamo građu relativno jednostavnih organizama kao što su protozoe, vidljivo je da se radi o visoko reguliranim nanostrukturama koje je vrlo teško dobiti laboratorijskim

postupcima (Slika 1.) (5). Većina morskih organizama od interesa za biomimetiku ima tvrda tkiva građena od kalcijevoga karbonata, u obliku jednoga od njegova dva najrasprostranjenija polimorfa, kalcita ili aragonita. Kalcijev karbonat je općenito dobro prihvaćen od strane ljudskoga tkiva pa znanstvenici vrlo aktivno proučavaju proces njegove konverzije u kalcijevu fosfatnu biokeramiku (2, 6). Iako se ovdje radi o relativno novim istraživanjima, zanimljivo je da su prvi implantati sastavljeni od tkiva morskih organizama, ugrađeni još u doba civilizacije Maja (oko 600 godina prije nove ere), kada je sedef školjkaša korišten kao zubni implantat (7-9). Sedef se još uvijek istražuje za upotrebu kao biokompatibilno i osteoinduktivno tkivo (9-12). Iz njega su ekstrahirani lipidi koji se koriste u kozmetici i dermatologiji (13). Osim istraživanja sedefa mekušaca, popularna su istraživanja i na koraljima. Implantati sastavljeni od morskih organizama ugrađeni su već ljudima u kosti. Pro Osteon® u sebi sadrži dijelove skeleta koralja i uspješno se koristi kao zamjenski materijal za kost (14). Takve implantate tijelo bolje prihvaća jer imitiraju mikrostrukturu ljudske kosti, ona brže raste i eliminira rizik kontaminacije bolje od starih tipova bioimplantata (7, 11, 14). Slična istraživanja provode se i s koraligenskim algama, koje imaju vrlo obećavajuće mogućnosti primjene. To su samo neki od primjera kako se biomimetska istraživanja morskih organizama mogu koristiti u medicinske svrhe. Kroz ovaj rad će se prikazati dio tih istraživanja kako bi

se naglasila važnost interdisciplinarnosti u suvremenom istraživačkom radu.

2. Biomineralizacija

Kada govorimo o biomineralizaciji, podrazumijevamo proces selektivne ekstrakcije i unosa elemenata iz okoliša i njihovu ugradnju u funkcionalne mineralne strukture, uz strogu biološku kontrolu (1). S kemijskoga aspekta, proces mineralizacije temelji se na procesima taloženja: sastav, oblik i veličina kristala ovise o mehanizmima i relativnim brzinama pojedinih stupnjeva taloženja (nukleacija, kristalni rast, agregacija i transformacija) (15). Sami mehanizmi i brzine spomenutih taložnih procesa ovise o uvjetima taloženja: sastavu otopine (početne koncentracije reaktanata, prezasićenost, pH, ionska jakost, prisutnost nečistoća ili stranih iona, aditiva), vremenu starenja, temperaturi, miješanju i sličnome (1).

Mineralizirana tkiva daju čvrstoću i služe za pohranu različitih iona, posebice kalija i fosfata. Mineralizacijski procesi, bilo fiziološki ili patološki, uvjetovani su procesima taloženja. Taložnje je proces nastajanja krute faze iz vodenih, uglavnom elektrolitnih otopina, a ako nastala kruta faza ima kristalnu strukturu, proces nazivamo kristalizacijom. Faze taložnih procesa jesu nukleacija, kristalni rast te sekundarni procesi kao što su agregacija, starenje ili transformacija.

Dugo je vladalo mišljenje da i biominerali nastaju uglavnom direktno iz prezasićene otopine, no otkriće prijelaznih prekursora mineralne faze otvorilo je mnogo fascinantnih strukturalnih pitanja. Pokazalo se da biominerali mogu rasti iz nestabilne koloidne faze, gotovo bez prisutnosti vode (što uklanja inače logistički problem viška tekućine u tijelu) nakon čega nastaje amorfni oblik koji nukleira i stvara zreli kristal (16). Također, provedena su mnoga istraživanja koja ispituju utjecaj pojedinih enzima uključenih u proces mineralizacije na stvaranje polimorfa kalcijeva karbonata (17, 18). Time je pokazano kako glavnu ulogu u nukleaciji biominerala ima organski matriks. On je izrazito važan u kontroliranju veličine, oblika, orijentacije, faze, teksture i lokalizacije biominerala (17-19). To je netopiva mreža kompleksnoga skupa makromolekula prostorno organizirana u trodimenzionalni okvir. Sadrži komponente koje služe kao predložak za nukleaciju minerala, oblikovanje i rast, a sastoji se od topivoga i netopivoga dijela (20, 21). Topiv matriks sastavljen je od makromolekula kao što su proteini, glikoproteini, ugljikohidrati, proteoglikani i lipidi. On je pretežno zadužen za staničnu aktivnost; transport iona, reguliranje enzima i stimulaciju hormona, kontrolu stupnja prezasićenosti, odabir tipa polimorfa, a svojim kiselim makromolekulama oblikuje mjesto za aktivnu

nukleaciju. Netopiv matriks sadrži molekule koje služe kao strukturalna mreža za mehaničku potporu kristalu u nastanku, a time i modeliranje samoga oblika kristala (1, 22).

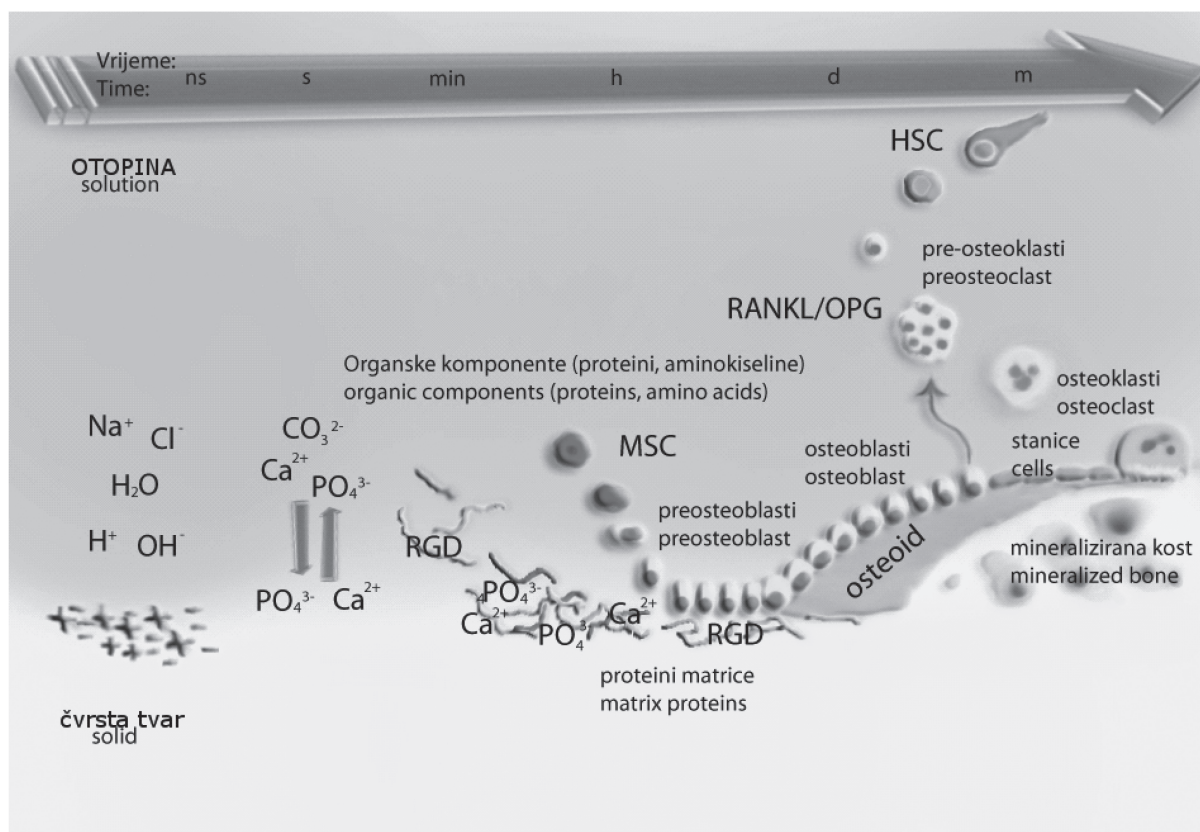
Biomineralizacijski procesi u organizmu čovjeka relativno su dobro proučeni; kako fiziološki tako i patološki. Već petnaestak godina ispituje se mogućnost nadomještanja mineralizacijskih defekata u ljudskom organizmu upotrebom biominerala morskih organizama. Glavni predmet istraživanja jesu kosti, odnosno pronalazak odgovarajućega medija za njihovu zamjenu nakon traume ili bolesti. Kosti imaju znatno složeniju strukturu sa sedam razina hijerarhije, a glavni građevni elementi jesu mineralizirana kolagenska vlakna, uz anorgansku komponentu – precizno orijentirane nanokristale karbonat apatita smještene u matrici kolagenskih vlakana (23). S obzirom na to da je i sama kost kompozitni materijal koji je istovremeno i elastičan i tvrd, ne može se pretpostaviti da će ga samo jedan materijal moći zamijeniti. Kako je ovakav medij vrlo teško sintetizirati dovoljno precizno da ga organizam prihvati kao svoj sastavni dio, veliki dio novijih istraživanja bazira se na mogućnostima ugradnje prirodnih skeletnih materijala u koštano tkivo (24).

3. Tkiva morskih organizama kao zamjenski materijali za koštano tkivo

Glavna je prednost ugradnje biominerala morskih organizama u odnosu na koštano tkivo drugih sisavaca u tome što ne postoji mogućnost horizontalnoga prijenosa patogena kao što su HIV ili hepatitis virusi (25), s obzirom na to da se radi o hladnokrvnim organizmima koji žive u vodenom mediju, te ne dijele iste patogene s ljudima. Iako postoje deseci tisuća morskih organizama koji proizvode biominerale, svega šest koljena morskih beskralješnjaka (točnije nekoliko vrsta iz par razreda svakoga koljena) testirano je za upotrebu kao mogući zamjenski materijal za ljudsku kost. Radi se o člankonošcima (rakovi), bodljikašima (ježinci i zvjezdače), mekušcima (sipe, puževi i školjkaši), koraljima, spužvama i crvenim algama (2). Pregled dosadašnjih istraživanja spomenutih organizama u ovom radu poredan je sistematski, prema koljenima. Iako nisu zastupljene sve ispitivane vrste, ovaj pregledni rad daje uvid u trenutačno stanje istraživanja biominerala morskih organizama za upotrebu u biomedicinske svrhe.

3.1. Vapnenačke alge

Hidrotermalno tretirane vapnenačke alge imaju skelet od kalcijeva karbonata koji se nakon tretmana s amonijevim fosfatom, konvertira u hidroksiapatit ili β -trikalcijev fosfat čime se očuva porozna struktura algi (24, 25).



SLIKA 2.

Razvoj koštanoga tkiva na mjestu preklapanja biomaterijala i tkiva koje vodi daljnjem razvoju kosti. Slika moderirana prema (27).

IMAGE 2

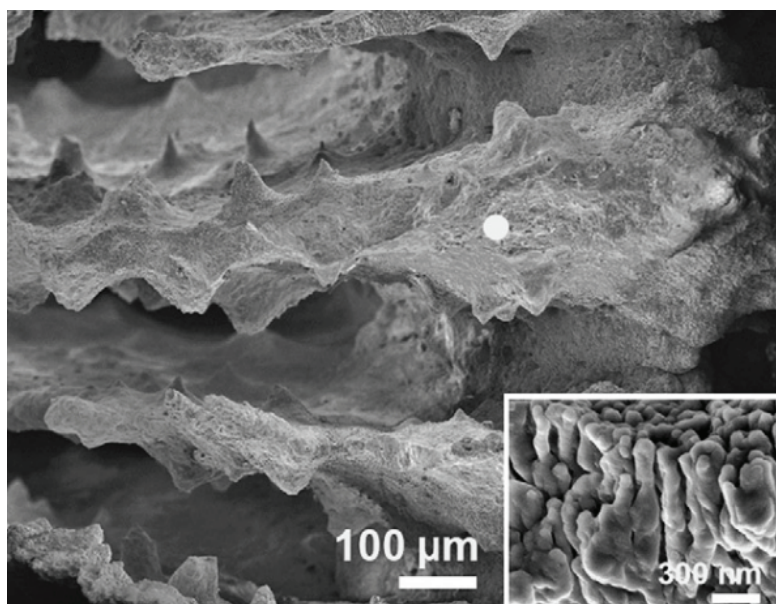
Development of bone tissue at the interaction site of biomaterial and tissue leading to further bone development. Picture is moderated according to (27).

Tako dobivene granule proizvode se pod imenom Algipore® i pokazuju dobre uspjehe u kliničkim studijama, pogotovo u oralnoj kirurgiji, a njihova se svojstva mogu poboljšati miješanjem s autolognim koštanim čipovima. Na površini Algipore® strukture oblikuje se proteinski sloj, što dovodi do resorpcije Algipore® implantata koji se tijekom vremena resorbira i zamijeni s novo oblikovanom kosti (26). Na Slici 2. prikazani su procesi koji dovode do ponovnog oblikovanja koštanoga tkiva na mjestu kontaktne površine implantata i kosti (27). Takav sustav relativno se dugo koristi u kliničkoj medicini pri nadomještavanju kostiju maksilarnih sinusa; Ewers (26) izvještava kako je ugradio 209 koštanih nadomjestaka koji sadrže Algipore® u 118 pacijenata kroz razdoblje od 14 godina. On tvrdi da je taj nadomjestak dovoljan da se potakne rast nove kosti u roku od 6 mjeseci, uz omogućavanje osteointegracije implantata kroz sljedećih 6 mjeseci i veliku stopu preživljavanja samoga usatka. Vapnenačke alge koje se koriste za izradu Algipore® sustava imaju brz rast i mogu se relativno jednostavno i jeftino uzgajati u laboratoriju te nema opasnosti za prirodne populacije, što ih čini odgovarajućim organizmima za

dugoročnu upotrebu kao zamjenski biomaterijal u maksilofacijalnoj kirurgiji.

3. 2. Spužve

Prema Greenu (28) (2008), vrlo dobar kandidat za zamjenski materijal je i kolagenska morska spužva koju se može upotrijebiti kao predložak za oblikovanje skeletnoga tkiva. To omogućuje njena struktura sastavljena od fibroznih mreža s velikim površinskim dijelom i međusobno povezanim šupljinama. Većina spužvi ima skelet napravljen od spongina, isprepleten silikatnim spikulama (29). Spongina je usporediv s ljudskim kolagenom, što tu kompleksnu mješavinu čini visoko kompatibilnom za *invitro* pokuse s ljudskim stanicama. Predložak od spongina poboljšava regeneraciju inicijalnih stadija koštanoga tkiva, promovira prihvaćanje, proliferaciju i omogućuje tkivnu diferencijaciju (28, 30). Green (28) napominje da strukturna organizacija spužvi ima bolja svojstva u usporedbi s poliglikolnim (PGA) vlaknima koja se koriste kao nadomjestak hrskavičnoga tkiva; tkivo morske spužve ima bolju povezanost vlakana s većom usklađenošću cijele strukture.



SLIKA 3.

FESEM mikrofotografija bio-anorganske strukture koralja *Cladocoracaespitosa*, trodimenzionalna morfologija površine gornjega septalnog dijela kaliksa. Umetnuta slika: visoko-rezolucijski prikaz površinske morfologije područja označenoga bijelom točkom. Slika je preuzeta uz dopuštenje autora (35).

IMAGE 3

FESEM microphotographs of bio-inorganic structures of *Cladocoracaespitosa* coral: three-dimensional morphologies of the upper part of septal unit within the calyx. Inserted high-resolution image displays the surface morphology of the marked section. Picture is adapted from (35) with the courtesy of authors.

Značajan problem kod veće eksploatacije spužvi u tu svrhu jest održivost vrsta pogodnih za industrijsku upotrebu. Spužve se već sada koriste u kozmetičkoj industriji i biomedicini zbog čega se izlovljavaju u velikim količinama. Za neke vrste kao što je *Spongia officinalis* (istraživana u implantologiji) potražnja industrije ne može biti zadovoljena izlovom prirodnih populacija, te se istražuju načini uzgoja takvih spužvi (31). Ako se ne pronade odgovarajući uzgojni sistem, dugoročna uporaba tih spužvi neće biti moguća (2).

3.3. Koralji

Od 80-tih godina prošloga stoljeća, koralji se koriste kao zamjenski materijali za koštano tkivo u obliku prirodnoga koralja, ali i kao konvertirani koralinski hidroksiapatiti (32). Njihova porozna struktura s veličinom pora od 100 do 500 µm u promjeru (Slika 3) i visokim stupnjem povezivosti uz dobru stopu resorpcije omogućuje uspješnu uporabu u raznim kliničkim istraživanjima (samostalno ili kao dio kompozita), uz male stope komplikacija (2, 32-35). Tran i suradnici (34) već duži niz godina upotrebljavaju koraljne predloške od koralja *Porites lutea* s izoliranim stanicama ljudske koštane srži i specifičnim faktorima rasta u kliničkim ispitivanjima, koje su uspješno primijenili na preko tisuću pacijenata s različitim koštanim patologijama. Provedena su uspješ-

na istraživanja u kojima je koraljni matriks ugrađivan u razna tkiva za npr. rekonstrukciju acetabule kod 17 pacijenata koristeći ProOsteon® 500(14), ili kod 71 pacijenta koji su bolovali od tumora kostiju (36). ProOsteon® 500 jest materijal koji kopira unutarnju strukturu ljudske kosti, napravljen djelomičnim konvertiranjem koraljnoga kalcijeva karbonata u hidroksiapatit; na taj način porozna struktura koralja ostaje netaknuta u unutrašnjosti, a izvana se nalazi hidroksiapatitni sloj koji sprječava prebrzu resorpciju koralja, stvarajući idealnu podlogu za rast nove kosti (37).

Ipak, znanstvenici napominju da koralji imaju naznake slabije učinkovitosti u usporedbi sa sedefom pri indukciji oblikovanja ljudskih kosti (38), što bi se vjerojatno moglo evolucijski objasniti (39). Također, koralji imaju sporu stopu rasta u prirodi i postoji opasnost od ugrožavanja prirodne raznolikosti ako bi se počeli masovno koristiti u te svrhe. Prema Ritteru (40) samo proizvođači ProOsteona™ zahtijevaju 2 do 4 tone koralja godišnje, a za očekivati je da će i zakonska regulativa vezana uz zaštitu koralja u budućnosti biti još više restriktivna, što dodatno komplicira mogućnosti iskorištavanja toga organizma u implantologiji.

3.4. Člankonošci

Od svih morskih člankonožaca, svega nekoliko vrsta dekapodnih rakova ima pozornost znanstvenika kada je u pitanju istraživanje novih materijala za koštane implantate. Iako korištenje njihovih egzoskeleta još uvijek nije ispitano za upotrebu kao zamjenski materijal za kost, prema Clarke i suradnicima (2) strukture mineraliziranih egzoskeleta pokazuju odlična materijalna svojstva koja bi mogla biti odgovor na problem dugotrajne resorpcije materijala.

Vjerojatno najpoznatiji materijal dobiven iz oklopa rakova, a široko korišten u medicini je hitosan. Venkatesan i Kim (41) predstavili su zanimljiv način upotrebe hitosana dobivenoga iz hitina rakova za stvaranje kompozitnih koštanih nadomjestaka. Autori navode da iako nema osteoinduktivna svojstva i dovoljnu čvrstoću, hitosan posjeduje visoka biokompatibilna, biodegradacijska, osteokonduktivna i porozna svojstva. Nadalje, hitosan je već kombiniran s raznim materijalima kako bi se napravio kompozitni materijal zadovoljavajućih svojstava za upotrebu u ortopediji; neki od tih materijala su i hidroksiapatit, alginat, hijaluronska kiselina, kalcijev fosfat te faktori rasta. Iako hitosan sam po sebi ne može imitirati sva svojstva prirodne kosti, u kombinaciji s tvarima poput hidroksiapatita pokazuje dobra svojstva. Autori (41) navode da su egzoskeleti rakova potrebni za proizvodnju hitosana lako dostupni u cijelom svijetu, s obzirom na to da se radi o vrstama koje se koriste u prehrani, a njihovi egzoskeleti pri tome predstavljaju otpadni materijal.

3.5. Mekušci

Mekušci su jedno od rijetkih koljena u kojima je ispitan veći broj vrsta za upotrebu u implantologiji. To se prije svega odnosi na školjkaše, makar je i na puževima napravljeno nekoliko zanimljivih istraživanja. Od ostalih skupina potrebno je istaknuti istraživanja na glavonošcima, ponajprije na sipi.

3.5.1. Školjkaši

Jedan od dobro prihvaćenih materijala od strane organizma sisavaca jest sedef školjkaša, koji uz svojstvo biokompatibilnosti ima i osteoinduktivne supstance (42, 43). Sedef je građen od aragonitnih kristalnih ploha prekrivenih topivim organskim matriksom. Osim same osteogenske aktivnosti, sedefni matriks inhibira proteaze (cisteinsku, proteazu K), povećava aktivnost alkalne fosfataze koja inducira oblikovanje koštanih nodula, stimulira proliferaciju, diferencijaciju i ranu mineralizaciju (43). Još su 1997. godine napravljeni pokusi ugradnje sedefnoga materijala u koštano tkivo čeljusti ljudi (44).

Kada se taj materijal ugradi u kost, dolazi do privlačenja i aktiviranja matičnih stanica koštane srži i osteoblasta, odnosno do oblikovanja nove koštane mase, bez upalnih reakcija i fibroznih tvorevina, a s vremenom dolazi do resorpcije sedefa uz inducirano oblikovanje nove koštane mase.

Sedef se koristi u obliku praha, no prema istraživanjima popravaka većih koštanih defekata u femuru ovce i cijeli komadi sirovoga sedefa mogu biti učinkoviti; oblik implantata se ne mijenja nakon 12 mjeseci, a dolazi i do osteogeneze na kontaktnoj površini (10, 43). Dodatna prednost sedefa jest mogućnost njegova oblikovanja u željeni oblik. Tako su Vecchio i suradnici (6) napravili vijke od sedefa koji su termalno konvertirali u hidroksiapatit i ugradili štakorima. Nakon 6 tjedana novooblikovana kost prožela je implantat. Zaključuju da taj materijal ima dobru biokompatibilnost i osteokonduktivnost te da bi se mogao koristiti i za zahvate koji imaju značajnu nosivost, te za facijalnu rekonstrukciju i popravak velikih koštanih defekata, uz potencijalnu zamjenu kostiju prstiju. Lipidi iz sedefa induciraju ponovno oblikovanje unutarstaničnoga cementa ljudskoga stratum corneuma zbog čega je sedef proučavan i u dermatologiji (43). Ekstrakt sadrži masne kiseline, trigliceride, kolesterol i ceramide u maloj gustoći. Primjena takvoga ekstrakta na prethodno djelomično dehidrirane eksplantate ljudske kože inducira hiperekspresiju filagrina (odgovornoga za hidrataciju stratum corneuma) i smanjivanje ekspresije transglutaminaze koja je previše izražena kod upalnih procesa na koži. Također, takvi ekstrakti induciraju obnavljanje unutarstaničnoga cementa stratum corneuma (13).

3.5.2. Puževi

Slično školjkašima, puževi također imaju ljušturu djelomično izgrađenu od sedefa. Razlika između ta dva razreda je u tome što kod puževa uglavnom prevladava sedef poredan u obliku stupova s bržim vertikalnim rastom, dok školjkaši većinom imaju listasti sedef s bržim lateralnim rastom (22, 45)

U istraživanju Vecchia i suradnika (6) paralelno sa školjkašima, i iz puževa (*Strombus gigas*) je uzet sedef, konvertiran u hidroksiapatit pri različitim laboratorijskim uvjetima i apliciran u koštano tkivo štakora. Dobiveni rezultati kritičnoga naprezanja usred pritiska su slični (~137-218 MPa) sedefu školjkaša (~70-150 MPa), odnosno bliski mehaničkoj snazi ljudske kosti, te je zaključeno da se sedef puževa može koristiti kao potencijalan zamjenski materijal za ljudsku kost. Također, jednako kao i sedef školjkaša, sedef puževa se može oblikovati u

vijke ili u bilo koji drugi željeni oblik, pod uvjetom da je početni uzorak u pitanju dovoljno velik.

3.5.3. Glavonošci

Sipe su organizmi koji imaju veliku pozornost u implantologiji, i to prije svega obična sipa (*Sepia officinalis*), odnosno konverzija njene sipovine iz aragonita u karbonizirani hidroksiapatit, koristeći razne laboratorijske postupke (2, 46, 47). Sipovina je složeni materijal koji se sastoji od aragonita isprepletenoga organskim β -hitinom, s visokom poroznošću (80-94%) i veličinom pora od 200 do 600 μm (2, 47). Iako takvi materijali još uvijek nisu upotrijebljeni za klinička ispitivanja na ljudima, oni pokazuju dobre rezultate u preliminarnim istraživanjima provedenim na femuru kunića, s boljim rezultatima od trikalcijsva fosfata i demineralizirane koštane srži (48). Autori toga istraživanja zaključuju da je sipovina lako dostupan materijal koji se može jednostavno oblikovati, a ima značajan osteokonduktivni kapacitet, te bi se mogla klinički koristiti kao zamjenski materijal za poboljšanje osteogeneze i osteokondukcije. U sličnom istraživanju od strane Kim i suradnika na sipovini sipe *Sepia esculenta* potvrđeno je da je sipovina dobar materijal za proizvodnju poroznoga hidroksiapatita koji bi trebao imati dobru biokompatibilnost (49). Niske cijene proizvodnje, laka dostupnost sirovine u cijelom svijetu, uz navedena svojstva biokompatibilnosti, poroznu strukturu i sastav sličan ljudskoj kosti sipovinu čini vrlo zanimljivim materijalom za upotrebu u biomedicinske svrhe (50).

3.6. Bodljikaši

Bodljikaši jesu zanimljiva skupina morskih organizama jer u svoja tvrda tkiva ugrađuju magnezijски kalcit, s različitim postotkom magnezija čak i unutar tkiva iste jedinke (51). Iako je za sada samo par vrsta ježinaca istraženo, postoje naznake da bi tkiva bodljikaša mogla biti korisna za upotrebu u implantologiji za popravak manjih defekata koštanoga tkiva.

3.6.1. Ježinci

Iglice ježinaca su vrlo zanimljiv materijal za istraživanje. Građene su od poroznog magnezijevog kalcita s koncentracijom magnezija koja varira od 3 do 15 mol%; pretpostavlja se da je uloga magnezija sprječavanje pucanja iglice preblizu ljušturi ježinaca (51). Vecchio i suradnici (52) pripremili su porozni β -trikalcijski fosfat hidrotermalnom konverzijom iglica dviju vrsta ježinaca (*Heterocentrotus mammillatus* i *Heterocentrotus trigonarius*) s ciljem ispitivanja njihovih mehaničkih svojstva i biokompatibilnosti *in vivo* testiranjem u femuru štakora. Iglice tih vrsta dovoljno su velike da se mogu oblikovati

u potreban oblik, a s obzirom da se ponašaju kao monokristali imaju glatke, zaobljene površine. Autori studije navode kako se u roku od 6 tjedana oko usatka oblikovala nova kost te da takav materijal ima dobre bioaktivne i osteokonduktivne karakteristike. Ipak, Clarke i suradnici (2) navode da većina vrsta ježinaca ima iglice koje su premalene za takvu praktičnu upotrebu, te dovodi u pitanje održivost populacija ispitivanih vrsta.

3.6.2. Zvezdače

Martina i suradnici (53) prvi su istražili mogućnosti iskoristavanja dermalnih skeletalnih elemenata zvezdače *Pisaster giganteus*, takozvanih osikula, koje su odabrane jer imaju promjer pora sličan komercijalno dostupnom preparatu Algipore®, uz određene strukturne razlike. Rezultati te *in vitro* studije pokazali su kako su osikule kompatibilne s ljudskim stanicama te kako bi se uz daljnja istraživanja mogle koristiti u obliku čestica kao zamjenski materijal za kost. Nažalost, daljnje informacije o zvezdačama nisu pronađene, iako bi bilo zanimljivo istražiti može li sposobnost regeneracije krakova zvezdača imati utjecaja na obnovu koštanoga tkiva.

Istraživanje biominerala morskih organizama kao zamjenskoga materijala za ljudsku kost pruža nove mogućnosti u pronalasku usatka koji bi mogao zamijeniti „zlatni standard“, autolognu kost. Potrebno je produbiti istraživanja ovdje opisanih vrsta, a postoji još niz drugih vrsta morskih organizama koje nisu istražene. Nadalje, potrebno je pronaći i odgovarajući biomineral morskih organizama koji svojim dimenzijama odgovara zahtjevima velikih koštanih defekata, te vrstu koja se može dugoročno upotrebljavati bez opasnosti od narušavanja prirodne bioraznolikosti (52).

4. Morski organizmi kao model za proučavanje patološke biomineralizacije ljudi

Prema novijim istraživanjima, degradacija koštanoga tkiva uzrokovana osteoporozom dovodi se u vezu s još jednom patološkom biomineralizacijom – urolitijazom (54). Ona je jedan od vodećih medicinskih problema modernoga društva. Zna se da biomineralizacija mekoga tkiva – urolitijaza ovisi o fizikalno-kemijskim faktorima, kao što je prezasićenje urina, manjak inhibitora i slično (55). Najvažniji faktor za nastanak urolitijaze jest prezasićenje urina koje dovodi do vezanja kristala soli za stijenke urinarnoga trakta. Jedan od važnih čimbenika koji utječe na razvoj simptoma visok je unos natrija prehranom, uglavnom u obliku natrijeva klorida, što dovodi do aktivacije mehanizama za održavanje osmolarnosti krvi u normalnim granicama (oko 300 mOsmol/L). Time dolazi do smanjenja reapsorpcije natrija, odnosno do

povećanja njegove koncentracije u urinu i povećane ekskrecije mokraćom. To stvara negativan balans natrija i kalcija, jer su njihove reapsorpcije međusobno povezane u proksimalnim kanalčićima i uzlaznim krakovima Henleovih petlja bubrega ljudi. Taj disbalans posebno šteti osobama s bubrežnim kamencima koje su osjetljivije na kalciurijski učinak soli (56). Hiperkalciurija, hiperkalce-mija i hiperoksalurija glavni su metabolički poremećaji koji dovode do nastanka kalcitnih kamenaca sastavljenih uglavnom od kalcijevih oksalata, CaOx, i kalcijevih fosfata, CaP (57).

Pretpostavlja se da zaštitni sloj glikozaminoglikana prekriva unutarnje bubrežne stijenske kod zdravih bubrega; tamo gdje ih nema, dolazi do nagomilavanja i pričvršćivanja kristala s posljedičnim rastom bubrežnih kamenaca (58). Dakle, za razliku od fizioloških procesa biomineralizacije u kojima organski matriks kontrolira početak nukleacije, u nekim oblicima patološke mineralizacije (kao što je oblikovanje bubrežnih kamenaca) kristali se originalno oblikuju u tjelesnoj tekućini, a zatim se pričvršćuju na organski matriks, odnosno na defektne dijelove bubrežnih stijenki gdje nastavljaju rast i agregaciju u urolite (55, 58). S obzirom na to da je cilj ovoga rada fokusiran na biomineralizacijske procese, uzroci oštećenja stijenske bubrega neće biti dodatno obrađeni, već je naglasak stavljen na proučavanje ionskoga transporta koji dovodi do patoloških stanja.

Nobelovac August Krogh još je 1929. zaključio kako postoji idealna životinja za rješavanje svakoga fiziološkog problema, misao koja je postala poznata kao Kroghov princip. Pritom je i sam naglasio da se problemi ekskrecije mogu riješiti samo kada se pronađu sve njihove esencijalne modifikacije, misleći na evolucijske prilagodbe. Kada se govori o osmoregulaciji, transportu tekućina i iona, funkciji bubrega i regulaciji volumena, ribe i morski beskralješnjaci pokazali su se kao važni modeli (59). Škrge raka *Carcinusmaenas* koristan su model za shvaćanje regulacije analognih transportera natrija pronađenih u bubrežima sisavaca (60), a za istraživanje same funkcije bubrega čovjeka korištena je i jegulja *Anguilla-rostrata* te morski pas *Squalusacanthias* (59). S obzirom na to da su jegulje i morski psi komplicirani za dobavu i održavanje u eksperimentalnim uvjetima, rak *Carcinusaestuariai* mogao bi poslužiti kao zamjenski modelni organizam za invitro ispitivanja. On je fiziološki gotovo identičan raku *Carcinusmaenas*, nalazi se prirodno u Jadranu i jednostavno ga je držati u laboratoriju. Jedan od aspekata koji bi bilo zanimljivo dodatno istražiti, a moglo bi koristiti razumijevanju procesa nastanka bubrežnih kamenaca, jest utjecaj unosa različitih koncentracija iona natrija na aktivne transportere koji kontroliraju biomineralizacijske procese modelnoga organizma raka *Carcinusaestuariai*.

Stanice većine organizama imaju isti adaptivni odgovor na povišenu slanost; nakupljaju unutarstanične organske osmolite. Izvanstanična tekućina ljudi uglavnom je regulirana na oko 300 mOsmol/L, urin ima osmolarnost od 1200 mOsmol/L, ali neke bubrežne stanice izložene su koncentracijama i do 3000 mOsmol/L; to su ionske koncentracije u kojima i rakovi roda *Carcinus* mogu preživjeti prilagođavajući koncentraciju svoje hemolimfe (59). Ti rakovi imaju mogućnost regulacije iona natrija i klorida čime se prilagođavaju različitim osmotskim koncentracijama, što im u prirodi omogućuje preživljavanje u ekstremnim slanostima, od 4 do 54 psu.

Dodatna zanimljivost toga raka jest ta da ne može reapsorbirati sol iz urina pa ne može ni ispuštati urin različite koncentracije od hemolimfe. To znači da gubi puno soli preko urina kada je u razrijeđenoj morskoj vodi (oko 313 mOsmol/L). On nadoknađuje taj gubitak aktivnim unosom soli te održava ionsku koncentraciju i osmotski tlak hemolimfe viši od onoga u razrijeđenom okolišu (oko 615 mOsmol/L - umjereni hiperosmoregulator). Na⁺, K⁺ ATP-aza je odgovorna za pobudu aktivnoga izbacivanja natrija iz energetski bogatih kloridnih stanica u hemolimfu, koja postaje hiperosmotska u odnosu na vanjski medij (u ovom slučaju razrijeđena morska voda); to potiče volumnu regulaciju stanica i preživljavanje u novim uvjetima. Takva regulacija kod rakova roda *Carcinus* učinkovita je do donje granice slanosti od 8 psu.

S obzirom na to da se prevelik unos natrija smatra jednim od glavnih etioloških faktora za nastanak bubrežnih kamenaca, vrlo je vjerojatno da se tada prilagođava aktivnost Na⁺, K⁺ ATP-aze u epitelnim stanicama Henleove petlje, koja uzrokuje i promjene u aktivnosti drugih aktivnih nosača kao što su H⁺ ATP-aze, ugljikova anhidraza, te protuizmjene Cl⁻/HCO₃⁻ i Na⁺/H⁺.

Povećani unos natrija pogoduje i nizu drugih patogenez, od kojih je za aspekt obrađen u ovom radu nužno spomenuti razgradnju kostiju zbog izlučivanja kalcija kao posljedicu kompenzacije povišenoga unosa natrija, pogotovo izraženu kod žena u postmenopauzi. Zbog gubitka estrogena, promjene epitela gastrointestinalnoga sustava i smanjene sinteze D vitamina nema hormonalne reakcije koja bi potaknula porast crijevne apsorpcije kalcija te dolazi do razgradnje kostiju kao posljedice izlučivanja kalcija povišenjem unosa natrija (56).

Navedeno bi moglo pridonijeti razumijevanju patofizioloških temelja nastanka bubrežnih kamenaca, kalciurije i osteoporoze ljudi. Prema Moeu (61), još uvijek nije jasna veza između kemije urina, funkcionalnih abnormalnosti koje uzrokuju hiperkalciuriju i anatomskoga pronalaska naslaga kalcijeva fosfata oko Henleove petlje. Poznato je

da postoje dva oblika hiperkalciurije (62); prvi je uzrokovan povećanim unosom kalcija te se naziva nutritivna kalcij–ovisna hiperkalciurija. Drugi je oblik idiopatska metabolička hiperkalciurija koja se očituje povećanom kalcijском ekskrecijom, unatoč normalnom ili smanjenom unosu kalcija. Ona nema poznatih metaboličkih uzroka i trenutačno nisu poznati točni patogeni mehanizmi i čimbenici povezani s gubitkom koštane mase u tih bolesnika (54). Simptomatski je poznato da bolesnici s urolitijazom imaju višu razinu koštane resorpcije i nižu razinu mineralnoga koštanog sastava uz posljedično smanjenu koštanu gustoću (63, 64). Potrebno je dodatno ispitati koliko je to međusobno povezano. S obzirom na to da je vrlo teško obavljati medicinska ispitivanja na ljudima, važno je interdisciplinirati znanstvena istraživanja kako bi znanstvenici iz različitih područja mogli sagledati isti problem iz različitih perspektiva, s ciljem donošenja zajedničkoga pozitivnog rješenja tog problema.

5. Zaključak

Iako na prvi pogled ljudi nemaju puno zajedničkih poveznica s morskim organizmima, evolucijski gledano, oni koriste slične mehanizme mineralizacije. Iako to ne znači da svi odgovori leže u proučavanju morskih organizama, takva istraživanja ipak mogu znatno pridonijeti razumijevanju određenih aspekata mineralizacijskih procesa u ljudi. Treba imati na umu da se radi o znatno složenijim procesima od onih koje možemo proizvesti u laboratoriju. Zbog toga se koriste već nastali biominerali morskih organizama kao predlošci za implantate. Postoji i niz laboratorijskih istraživanja koji se baziraju na oponašanju cjelokupnoga procesa nastanka biominerala, i to se smatra jednim od udarnih pravaca u znanostima o materijalima. Bioinspirirane pripreve naprednih materijala u mnogim su poljima uzrokovale napredak industrije, a sve češće se predlaže upotreba takvih materijala i u medicini. Zbog svega navedenoga potrebno je naglasiti nužnost interdiscipliniranoga istraživanja kako bi se pridonijelo razvoju materijala koji mogu bolje zamijeniti trenutačne koštane i dentalne implantate, preparata koji se koriste u dermatologiji, metoda za istraživanje fiziologije i patofiziologije mineralizacijskih procesa ljudi te novih metoda preventive i liječenja oboljenja vezanih uz nastanak kamenaca. Takva se istraživanja provode duži niz godina. Postoji bogat literaturni pregled trenutačnoga stanja, koji je djelomično obrađen i u ovom radu, iako su mnogi kvalitetni radovi ostali u sjeni jer se literaturni popis bazirao na preglednim radovima i knjigama kako bi se čitatelji uputili na šire objašnjenje pojedinih dijelova rada.

LITERATURA

1. Mann S. *Biom mineralization: principles and concepts in bioinorganic materials chemistry*. Oxford: Oxford University Press, 2001. str. XII, 198.
2. Clarke SA, Walsh P, Maggs CA, Buchanan F. Designs from the deep: marine organisms for bone tissue engineering. *Biotechnol Adv*. 2011;29:610-7.
3. Johnson AJW, Herschler BA. A review of the mechanical behavior of CaP and CaP/polymer composites for applications in bone replacement and repair. *Acta Biomater*. 2011;7:16-30.
4. Wiesmann HP, Joos U, Meyer U. Biological and biophysical principles in extracorporeal bone tissue engineering Part II. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004;33:523-30.
5. Sondi I, Skapin SD. A Biomimetic Nano-Scale Aggregation Route for the Formation of Submicron-Size Colloidal Calcite Particles. *Biomimetics learning from nature*. InTech; 2010. str. 534.
6. Vecchio KS, Zhang X, Massie JB, Wang M, Kim CW. Conversion of bulk seashells to biocompatible hydroxyapatite for bone implants. *Acta Biomater*. 2007;3:910-8.
7. Ratner BD, Hoffman AS, Schoen FJ, Lemons JE. *Biomaterials science: an introduction to materials in medicine*. Academic Press; 2004; str 864.
8. Bobbio A. The first endosseous alloplastic implant in the history of man. *Bull Hist Dent*. 1972;20:1-6.
9. Chateigner D, Ouhenia S, Krauss C, Hedegaard C, Gil O, Morales M, i sur. Voyaging around nacre with the X-ray shuttle: From bio-mineralisation to prosthetics via mollusc phylogeny. *Materials Science and Engineering A*. 2010;528:37-51.
10. Atlan G, Delattre O, Berland S, LeFaou A, Nabias G, Cot D i sur. Interface between bone and nacre implants in sheep. *Biomaterials*. 1999;20:1017-22.
11. Denkena B, Koehler J, Moral A. Ductile and brittle material removal mechanisms in natural nacre-A model for novel implant materials. *J Mater Process Technol*. 2010;210:1827-37.
12. Tang Z, Kotov NA, Magonov S, Ozturk B. Nanostructured artificial nacre. *Nat Mater*. 2003;2:413-8.
13. Rousseau M, Bedouet L, Lati E, Gasser P, Le Ny K, Lopez E. Restoration of stratum corneum with nacre lipids. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2006;145:1-9.
14. Wasielewski RC, Sheridan KC, Lubbers MA. Coralline hydroxyapatite in complex acetabular reconstruction. *Orthopedics*. 2008;31:367.
15. Lowenstam HA, Weiner S. *On biomineralization*. New York: Oxford University Press; 1989.
16. Weiner S. Biomineralization: A structural perspective. *J Struct Biol*. 2008;163:229-34.
17. Sondi I, Skapin SD, Salopek-Sondi B. Biomimetic precipitation of nanostructured colloidal calcite particles by enzyme-catalyzed reaction in the presence of magnesium ions. *Cryst Growth Des*. 2008;8:435-41.
18. Sondi I, Salopek-Sondi B. Influence of the primary structure of enzymes on the formation of CaCO₃ polymorphs: A comparison of plant (*Canavalia ensiformis*) and bacterial (*Bacillus pasteurii*) ureases. *Langmuir*. 2005;21:8876-82.
19. Tong H, Ma WT, Wang L, Wan P, Hu J, Cao L. Control over the crystal phase, shape, size and aggregation of calcium carbonate via a L-aspartic acid inducing process. *Biomaterials*. 2004;25:3923-9.
20. Ren DN, Feng QL, Bourrat X. Effects of additives and templates on calcium carbonate mineralization in vitro. *Micron*. 2011;42:228-45.
21. Gries K, Heinemann F, Gummich M, Ziegler A, Rosenauer A,

- Fritz M. Influence of the Insoluble and Soluble Matrix of Abalone Nacre on the Growth of Calcium Carbonate Crystals. *Cryst Growth Des.* 2011;11:729-34.
22. Gower LB. Biomimetic Model Systems for Investigating the Amorphous Precursor Pathway and Its Role in Biomineralization. *Chem Rev.* 2008;108:4551-627.
23. Dutour Sikirić N, Babić-Ivančić V, Filipović-Vinceković N. Međudjelovanje na međupovršini anorgansko/organsko - od biomineralizacije do implant materijala za čvrsta tkiva. *Med Vjesn.* 2010;42(3-4):73-86.
24. Epple M. U: E B, M E, urednici. *Handbook of biomineralization: medical and clinical aspects*: Wiley-VCH; 2007. str. 81-92.
25. Tadic D, Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. *Biomaterials.* 2004;25:987-94.
26. Ewers R. Maxilla sinus grafting with marine algae derived bone forming material: a clinical report of long-term results. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005;63:1712-23.
27. Shchukarev A, Ransjo M, Mladenovic Z. To Build or Not to Build: The Interface of Bone Graft Substitute Materials in Biological Media from the View Point of the Cells. U: Pignatello R, urednik. *Biomaterials Science and Engineering*; 2011.
28. Green DW. Tissue bionics: examples in biomimetic tissue engineering. *Biomed Mater.* 2008;3(3):034010.
29. Castro P, Huber ME. *Marine Biology*. New York: McGraw-Hill Higher Education, 2008.
30. Cunningham E, Dunne N, Walker G, Maggs C, Wilcox R, Buchanan F. Hydroxyapatite bone substitutes developed via replication of natural marine sponges. *J Mater Sci Mater Med.* 2010;21:2255-61.
31. Celik I, Cirik S, Altinagac U, Ayaz A, Celik P, Tekesoglu H, i sur. Growth performance of bath sponge (*Spongia officinalis* Linnaeus, 1759) farmed on suspended ropes in the Dardanelles (Turkey). *Aquacult Res.* 2011;42:1807-15.
32. Ben-Nissan B. *Biomimetics and Bioceramics*. U: Reis RL, Weiner S, urednici. *Learning from nature how to design new implantable biomaterials: from biomineralization fundamentals to biomimetic materials and processing routes*. Kluwer Academic Publishers; 2004: str. 233.
33. Louisia S, Stromboni M, Meunier A, Sedel L, Petite H. Coral grafting supplemented with bone marrow. *J Bone Joint Surg Br.* 1999;81(4):719-24.
34. Tran CT, Gargiulo C, Thao HD, Tuan HM, Filgueira L, Michael Strong D. Culture and differentiation of osteoblasts on coral scaffold from human bone marrow mesenchymal stem cells. *Cell Tiss Bank.* 2011;12:247-61.
35. Sondi I, Salopek-Sondi B, Skapin SD, Segota S, Jurina I, Vukelić B. Colloid-chemical processes in the growth and design of the bio-inorganic aragonite structure in the scleractinian coral *Cladocora caespitosa*. *J Colloid Interface Sci.* 2011;354:181-9.
36. Irwin RB, Bernhard M, Biddinger A. Coralline hydroxyapatite as bone substitute in orthopedic oncology. *Am J Orthop.* (Belle Mead NJ) 2001;30:544-50.
37. White E, Shors EC. Biomaterial aspects of Interpore-200 porous hydroxyapatite. *Dent Clin North Am.* 1986;30:49-67.
38. Dupoirieux L, Costes V, Jammet P, Souyris F. Experimental study on demineralized bone-matrix (DBM) and coral as bone - graft substitutes in maxillofacial surgery. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1994;23:395-8.
39. Westbroek P, Marin F. A marriage of bone and nacre. *Nature.* 1998;392:861-2.
40. Ritter SK. Boning up. *Chem Eng News.* 1997;75:27-32.
41. Venkatesan J, Kim SK. Chitosan Composites for Bone Tissue Engineering-An Overview. *Mar Drugs.* 2010;8:2252-66.
42. Silve C, Lopez E, Vidal B, Smith DC, Camprasse S, Camprasse G, i sur. Nacre initiates biomineralization by human osteoblasts maintained in vitro. *Calc Tissue Int.* 1992;51:363-9.
43. Rousseau M. Nacre, a natural biomaterial. U: Pignatello R, urednik. *Biomaterials Applications for Nanomedicine*; 2011.
44. Atlan G, Balmain N, Berland S, Vidal B, Lopez E. Reconstruction of human maxillary defects with nacre powder: histological evidence for bone regeneration. *C R Acad Sci III.* 1997;320:253-8.
45. Heinemann F, Launsbach M, Gries K, Fritz M. Gastropod nacre: Structure, properties and growth - Biological, chemical and physical basics. *Biophys Chem.* 2011;153:126-53.
46. Ivankovic H, Ferrer GG, Tkalec E, Orlic S, Ivankovic M. Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone. *J Mat Sci Mat Med.* 2009;20:1039-46.
47. Dutta A, Fermani S, Tekalur SA, Vanderberg A, Falini G. Calcium phosphate scaffold from biogenic calcium carbonate by fast ambient condition reactions. *J Cryst Growth.* 2011;336:50-5.
48. Okumus Z, Yildirim OS. The cuttlefish backbone: A new bone xenograft material? *Turk J Vet Anim Sci.* 2005;29:1177-84.
49. Kim JJ, Kim HJ, Lee KS. Evaluation of Biocompatibility of Porous Hydroxyapatite Developed from Edible Cuttlefish Bone. *Key Eng Mater.* 2008;361-363:155-8.
50. Rocha JHG, Lemos AF, Agathopoulos S, Kannan S, Valerio P, Ferreira JM. Hydrothermal growth of hydroxyapatite scaffolds from aragonitic cuttlefish bones. *J Biomed Mater Res A.* 2006;77:160-8.
51. Magdani U, Gies H. Single crystal structure analysis of sea urchin spine calcites: Systematic investigations of the Ca/Mg distribution as a function of habitat of the sea urchin and the sample location in the spine. *Eur J Mineral.* 2004;16:261-8.
52. Vecchio KS, Zhang X, Massie JB, Wang M, Kim CW. Conversion of sea urchin spines to Mg-substituted tricalcium phosphate for bone implants. *Acta Biomater.* 2007;3:785-93.
53. Martina M, Subramanyam G, Weaver JC, Huttmacher DW, Morse DE, Valiyaveetil S. Developing macroporous bicontinuous materials as scaffolds for tissue engineering. *Biomaterials.* 2005;26:5609-16.
54. Bilić-Čurčić I, Kizivat T, Milas-Ahić J, Smolić M, Smolić R, Mihaljević I i sur. Urolitijaza i osteoporoza: klinička važnost i terapijske indikacije. *Med Vjesn.* 2010;43(3-4):273-8.
55. Füredi-Milhofer H. Physiological and pathological mineralization: some problems and possible solutions. *Med Vjesn.* 2010;42:33-44.
56. Saric M, Piasek M. Utjecaj natrijeva klorida na kost. *Arhiv za higijenu rada i toksikologiju.* 2005;56:39-44.
57. Bassi P. Stone formation. U: Epple M, Bäuerlein E, urednici. *Handbook of biomineralization - medical and clinical aspects*, 2007. str. 329-48.
58. Sohnel O, Grases F. Calcium-oxalate monohydrate renal calculi. Formation and development mechanism. *Adv Colloid Interface Sci.* 1995;59:1-17.
59. Health CotOsRiH, Council NR. From monsoons to microbes: understanding the ocean's role in human health. The National Academies Press; 1999.
60. Towle DW, Rushton ME, Heidysch D, Magnani JJ, Rose MJ, Amstutz A, i sur. Sodium/proton antiporter in the euryhaline crab *Carcinus maenas*: molecular cloning, expression and tissue distribution. *J Exp Biol.* 1997;200:1003-14.
61. Moe OW. Kidney stones: pathophysiology and medical management. *Lancet.* 2006;367:333-44.
62. Worcester EM, Coe FL. New insights into the pathogenesis of idiopathic hypercalciuria. *Semin Nephrol.* 2008;28:120-32.

63. Cvijetic S, Furedi-Milhofer H, Babic-Ivancic V, Tucak A, Galic J, Dekanic-Ozegovic D. Bone mineral density loss in patients with urolithiasis: a follow-up study. Arch Med Res. 2002;33:152-7.
64. Tucak A, Cvijetic S, Babic-Ivancic V, Dekanic-Ozegovic D, Karner I, Zoric I. Bone mineral density and calcium metabolism in patients with urolithiasis. Period Biol. 2000;102:77-81.

NEW METHODS FOR BIOIMPLANT PREPARATION: SIGNIFICANCE OF BIOMINERAL STRUCTURE RESEARCH IN MARINE AVERTEBRATES FOR FURTHER CLARIFICATION OF VERTEBRATE MINERALIZATION PROCESSES

Vida Čadež

Ruder Boskovic Institute, Division for Marine and Environmental Research, 10000 Zagreb

Correspondence to:

Vida Čadež

Bijenička cesta 54, 10000 Zagreb

e-mail: Vida.Cadez@irb.hr

Telefon: 01 4680 124

Review

ABSTRACT

Despite years of bone replacement material research, most suitable implants still originate from natural resources. Considering the potential harmfulness of vertebrate bones as replacement materials, the attention of researchers has been oriented toward more diverse biomineral structures, like those extracted from marine invertebrates. Investigations of marine organisms have led to development and application of materials like Pro Osteon® or Algipore®, with good clinical results.

The article presents a short overview of materials from marine invertebrates that are used in clinical medicine, or have good potential for medical application. Additional usage of marine invertebrates in human pathological biomineralization is also discussed.

Keywords: mineralization, marine organisms, implants, biomimetics, bone, kidney stone, urolithiasis, biocompatible material, hypercalciuria