

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Janina Roknić i Anja Turkalj

**Utjecaj biokeramike na bioaktivnost okosnica kitozana za primjene
u tkivnom inženjerstvu**

Zagreb, 2023.

Ovaj rad izrađen je pod vodstvom doc. dr. sc. Anamarije Rogine (neposredni voditelj Luka Dornjak, mag. chem.) na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije i predan je na natječaj za dodjelu Rektorove nagrade u akademskoj godini 2022. / 2023.

SADRŽAJ

1. UVOD	1
2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA	2
2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva.....	2
2.2. Biomaterijali u inženjerstvu koštanog tkiva	3
2.2.1. Keramika.....	4
2.2.2. Biorazgradljivi i biokompatibilni polimeri	11
2.3. Metode ispitivanja bioaktivnosti	14
3. MATERIJALI I METODE	17
3.1. Materijali.....	17
3.2. Sinteza bioaktivnog stakla sol-gel postupkom	17
3.3. Sinteza hidroksiapatita	18
3.4. Priprema otopine kitozana	18
3.5. Priprema kompozitnih suspenzija	19
3.6. Priprava kompozitnih okosnica metodom toplinski inducirane fazne separacije uz sublimaciju.....	19
3.7. Ispitivanje bioaktivnosti u Hankovoj uravnoteženoj otopini soli	20
3.8. Identifikacija i karakterizacija materijala	20
3.8.1. Poroznost.....	20
3.8.2. Bubrenje.....	21
3.8.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)	21
3.8.4. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)	22
3.8.5. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) i energetsko disperzivna rendgenska analiza (EDS)	22
3.8.6. Statistička obrada rezultata.....	22
4. REZULTATI	23
4.1. Poroznost.....	23
4.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom.....	25
4.5. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) i energetsko disperzivna rendgenska analiza (EDS)	30
5. RASPRAVA	37
6. ZAKLJUČAK	41
7. ZAHVALE	42

8. POPIS LITERATURE	43
9. SAŽETAK	48
10. SUMMARY	49
11. ŽIVOTOPIS	50

POPIS KRATICA I SIMBOLA

CHT – kitozan

BG – bioaktivno staklo

HAp – hidroksiapatit

CHA – karbnonatni hidroksiapatit

OCP – oktokalcijev hidrogenfosfat pentahidrat

CaP – kalcijev fosfat

XRD – rendgenska difrakcijska analiza

FTIR – Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

SEM – Pretražna elektronska mikroskopija

EDS – Energetsko disperzivna rendgenska analiza

PBS – fosfatni pufer

HBSS – Hankova otopina soli

1. UVOD

U zadnjih nekoliko desetljeća inženjerstvo tkiva privuklo je veliku pažnju jer nudi rješenja za ozbiljne kliničke slučajeve kada spontana regeneracija tkiva nije moguća. Primjena inženjerstva koštanog tkiva jedna je od istraživanih grana. Cilj ove discipline je pripremiti biomaterijal koji će svojim svojstvima zadovoljiti glavne zahtjeve za razvoj tkiva *in vitro* (razvoj tkiva sličnih tkivu na kojem rastu nove stanice) i *in vivo* (stvaranje prikladne biološke okoline, uglavnom osigurane od živog organizma u svrhu obnavljanja tkiva) [1, 2].

Razvijeni biorazgradljivi i bioresorpcijski materijali, polimeri, keramike i njihovi kompoziti, imaju ulogu supstrata pri adheziji stanica, kao i depoziciju kalcij-fosfatne mineralne faze koštanog tkiva. Nadalje, moraju biti visokoporozni, prikladnih mehaničkih svojstava te strukturno što sličniji prirodnoj kosti na mikro i makro razini kako bi poboljšali staničnu proliferaciju i diferencijaciju [3].

Materijal koji se najčešće koristi za izradu okosnica je biokeramika, u koju se ubrajaju kalcijevi fosfati te pojedini kompoziti stakla i staklokeramike. Od kalcijevih fosfata, najčešće korišten je hidroksiapatit (HAp) zbog svoje kemijske sličnosti mineralnoj fazi koštanog tkiva. Bioaktivno staklo (BG) ubraja se u staklokeramiku, a zahvaljujući sloju karbonatnog hidroksiapatita koji nastaje njegovim otapanjem, vrlo je učinkovito u obnavljanju koštanih tkiva.

Kitozan je izrazito biokompatibilan prirodni polimer koji se često koristi za uzgoj tkiva zbog svoje kemijske sličnosti komponenti hrskavice. Može se oblikovati u visokoporozne materijale, filmove, hidrogelove, injekcijske gelove, a u kombinaciji s hidroksiapatitom i bioaktivnim staklom daje kompozitne materijale koji se koriste u liječenju mišićnih i koštanih tkiva. Nedostatak takvih kompozitnih materijala je niska mehanička čvrstoća zbog čega takvi kompoziti ne podnose veliko opterećenje te se primjenjuju za manja koštana oštećenja [3].

U ovom radu pripravljene su visokoporozne kompozitne okosnice na temelju kitozana i različite biokeramike (HAp i BG) metodom toplinski inducirane fazne separacije uz sublimaciju. Pojedina faza biokeramike sintetizirana je metodom precipitacije i sol-gel postupkom. Nadalje, istražen je utjecaj biokeramike na strukturu i fizikalna svojstva, dok je bioaktivnost pripremljenih kompozitnih okosnica ispitana u simuliranoj fiziološkoj otopini.

2. OPĆI I SPECIFIČNI CILJEVI RADA

2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Kost je kompleksno tkivo sa sposobnošću samoobnove. Glavne funkcije koštanog sustava su pružanje potpore okolnim mekim tkivima, kao i tijelu u cijelosti, zaštita unutarnjih organa, mogućnost kretanja te pohrana minerala i iona koji su važni za pravilno funkcioniranje metabolizma. Iako kosti imaju tendenciju za samostalnim obnavljanjem, pojedine ozljede mogu biti takve da njihova samostalna regeneracija nije dovoljna za oporavak [3, 4].

Prirodna kost je heterogeni anizotropni nanokompozit, čije su komponente hijerarhijski posložene u nekoliko strukturnih nivoa, od makro do nanometarske skale. Makro skali pripadaju vanjska geometrija, kompaktna i spužvasta kost, dok se na nano skali razlikuju kolagen i minerali koji se slažu u pravilne geometrijske oblike od vlakana (Slika 1.) [5, 6].



Slika 1. Hijerarhijska struktura prirodne kosti [6].

Inženjerstvo koštanog tkiva je disciplina kojom se principom biologije, fizike i inženjerstva kombiniraju biomaterijali, stanice i biomolekule. Predstavlja alternativan pristup za slučajeve u kojima ozljede zahtijevaju kirurške intervencije. Primjenom inženjerstva koštanog tkiva izbjegava se potreba za donorima [3]. Razvoj odgovarajuće trodimenzijske okosnice je jedan od fokusa inženjerstva koštanog tkiva. Uloga takve mikrostrukture je pružanje potpore za kontrolu i usmjeravanje staničnog ponašanja i promicanje staničnih interakcija. Važni uvjeti kojima okosnica podržava obnavljanje oštećenog tkiva, a koje mora zadovoljiti su: biološka aktivnost, biokompatibilnost, biološka razgradnja, pogodna mehanička svojstva, osteoindukcija i međusobna povezanost pora, kao i odgovarajuća veličina pora [4, 7].

2.2. Biomaterijali u inženjerstvu koštanog tkiva

Biomaterijali se često koriste za konstruiranje umjetnih organa, implantata ili rehabilitacijskih uređaja. Biomaterijali s primjenom u inženjerstvu koštanog tkiva definiraju se kao bioaktivni organski ili anorganski materijali koji se implantiraju u živi organizam kako bi zamijenili ili regenerirali oštećeno tkivo [2]. U području inženjerstva koštanog tkiva imaju ulogu supstrata te obavljaju dvije glavne funkcije: (1) kao privremena potpora koštanim stanicama koje stvaraju novo tkivo i (2) kao stanični nosač tijekom implantacije kako bi se osigurala njihova isporuka na željeno područje. Sukladno funkcijama, biomaterijali dizajnom i svojstvima moraju osigurati maksimalnu održivost stanica. Također, njihova stopa razgradnje/resorpcije mora biti usporediva s onom tkiva domaćina [1].

Nakon implantacije, biomaterijali su u bliskom ili direktnom dodiru s biološkom tekućinom organizma zbog čega su neophodne biokompatibilnost i netoksičnost materijala. Biokompatibilnost predstavlja sposobnost materijala da pobudi prikladan odgovor na području primjene. Dva glavna faktora koja ukazuju na stupanj biokompatibilnosti su odgovor organizma potaknut implantacijom te razgradnja materijala unutar organizma. Općenito se netoksičnost odnosi na nekancerogene, apirogene, antialergenske, kompatibilne s krvlju i neupalne materijale. Biomaterijal ne bi smio davati ništa više svoje mase od one za koju je projektiran, navode Raghavendra i sur [8]. Nadalje, biorazgradljivost je još jedna važna karakteristika biomaterijala s primjenom u inženjerstvu tkiva. Biološku razgradnju potiču živi organizmi koji uzrokuju kemijsku

razgradnju materijala, što rezultira promjenama fizikalnih svojstava. Cilj inženjerstva tkiva je povratak ili poboljšanje inicijalnih funkcija oštećenog tkiva. Postiže se implantacijom biorazgradljivih okosnica koje bi se, nakon obavljanja svoje funkcije, trebale razgraditi, biti apsorbirane i u konačnici potpuno izlučene iz organizma [7]. Podudaranje mehaničkih svojstava i strukture biomaterijala s okolinim tkivom, uvjet je koji je nužan kako bi biomaterijal služio svrsi. Dakle, biomaterijali su dizajnirani u skladu sa svojstvima tkiva i okoline u kojoj će obnašati svoju funkciju [8]. Dizajn okosnice u inženjerstvu koštanog tkiva zahtjeva visoku poroznost strukture (< 90 %), pri čemu pore moraju biti otvorene i međusobno povezane. Takav dizajn omogućava nesmetanu difuziju hranjivih tvari, plinova i metaboličkog otpada te ravnomjerno raspoređivanje i migraciju stanica unutar okosnice [7]. Stoga, glavni izazov s kojim se susreću znanstvenici i inženjeri u inženjerstvu koštanog tkiva, je proizvodnja biomaterijala koji imitira prirodni izvanstanični matriks koštanog tkiva [1, 6].

2.2.1. Keramika

Keramika je naziv za anorganski materijal sastavljen od neusmjerenih ionskih ili kovalentnih veza, koji se uglavnom dobiva pri povišenim temperaturama [9]. Zahvaljujući tvrdoći, visokoj tlačnoj čvrstoći, maloj gustoći, mogućnosti oblikovanja u različite oblike, poroznosti i otpornosti na habanje i koroziju, može se koristiti kao zamjena za dijelove mišićno – koštanih sustava. Krtost i niska vlačna čvrstoća ograničavaju njenu primjenu jer ne podnosi veliko opterećenje što može uzrokovati lom materijala [8].

Kalcij-fosfatna (CaP) keramika ima najširu primjenu u biomedicini. Koristi se pri izradi dentalnih implantata i transdermalnih uređaja, u liječenju parodonta i oštećenja/lomova kostiju, kao potpuna zamjena za zglobove, u ortopediji, maksilofacijalnoj rekonstrukciji, otorinolaringologiji te operaciji kralježnice. Nadalje, hidroksiapatit se koristi kao punilo na području koštanih defekata te kao implantat u dijelu koštanog sustava koji nije pod velikim opterećenjem. Također, HAp može prevlačiti implantate od nehrđajućeg čelika i titanija te njegovih legura s ciljem poticanja fiksacije implantata u kosti [1].

Keramika se prema biomedicinskoj primjeni dijeli na (1) bioinertnu (mpr. korund, ZrO_2), koja je specifična po tome što ne izaziva negativne imunološke reakcije domaćina te zadržava svoju strukturu unutar organizma [10], (2) bioaktivnu (bioaktivno staklo ili biostaklo) i (3)

bioresorbirajuću (CaP). Keramika na temelju kalcijevog fosfata najbližnja je mineralnoj komponenti kostiju, ima visoku biokompatibilnost i dobro svojstvo oseintegracije [6, 8].

2.2.1.1. Bioaktivna keramika: bioaktivno staklo

Bioaktivno staklo (biostaklo, BG) naziv je za vrstu bioaktivne keramike temeljnog sastava $\text{SiO}_2\text{--P}_2\text{O}_5\text{--CaO--Na}_2\text{O}$. Od konvencionalnog stakla razlikuje se zahvaljujući visokoj reaktivnosti i topljivosti u fiziološkim otopinama, pri čemu svojim produktima otapanja može izazvati specifične terapijske učinke [11]. Dijeli se na silikatna bioaktivna stakla, fosfatna bioaktivna stakla, boratna i borosilikatna bioaktivna stakla te crna stakla, a podjela se temelji na sastavu i razlici u udjelima komponenata, što im posljedično daje različita svojstva i prednosti u primjeni [12]. Silikatna stakla primjenjuju se u maksilofacijalnoj kirurgiji, fosfatna se koriste u inženjerstvu mekih tkiva, a dopirana antibakterijskim ionima galija, cinka, srebra ili bakra koriste se za terapijsko liječenje. Boratna i borosilikatna stakla koriste se pri liječenju oštećenja trabekularnih kostiju, a crna stakla koriste se kao visokokvalitetni premazi za bioinertne implantate [13].

Prvo sintetizirano bioaktivno staklo, Hench i sur. (1969.) [14], kojemu je kasnije dodijeljen naziv 45S5 ili Bioglass[®], ima molarni sastav od 46,1 mol.% SiO_2 , 24,4 mol.% Na_2O , 26,9 mol.% CaO i 2,6 mol.% P_2O_5 te može stvarati vezu s kosti domaćina toliko snažnu da ju je moguće ukloniti jedino lomom kosti [14]. Otapanjem stakla nastaje sloj karbonatnog hidroksiapatita (CHA) koji reagira s vlaknima kolagena kosti domaćina stvarajući čvrstu vezu između materijala i tkiva. CHA sloj može se usporediti s koštanim mineralima te pridonosi proliferaciji i diferencijaciji koštanog tkiva [15]. Hench i sur. [13] predložili su mehanizam koji objašnjava procese nukleacije i precipitacije kristalnog hidroksiapatita, odnosno apatitnih faza na površini bioaktivnog stakla. Otapanje ionskih vrsta sadržanih u staklenoj mreži temelj je mehanizma koji je podijeljen u pet faza [13]:

(1) Izmjena kationa Na^+ i Ca^{2+} iz stakla s H^+ iz otopine prema reakciji:



Po završetku reakcije pH otopine raste i stvara se sloj bogat silicijevim dioksidom. Ako su u staklu prisutni fosfatni ioni, dolazi i do njihovog otpuštanja iz mreže.

- (2) Paralelno s reakcijom izmjene kationa i porastom pH, hidroksilni ioni napadaju Si–O–Si veze. Kada su sve četiri veze silicijevog atoma prekinute, topljivi silicij otpušta se u otopinu čime raste broj silanolnih skupina na međupovršini staklo/otopina.
- (3) Sljedeća faza temelji se na kondenzaciji i polimerizaciji silanolnih skupina. Nastaje silicijem bogat amorfni sloj, tzv. silika gel. Pogodan je za apsorpciju iona iz otopine i precipitaciju hidroksiapatita.
- (4) Difuzijom kalcijevih i fosfatnih iona iz otopine kroz silika gel, na njegovoj površini nastaje amorfni sloj bogat kalcijevim oksidom i fosforovim (V) oksidom. Nakon toga, amorfni kalcij-fosfatni sloj počinje kristalizirati.
- (5) Kristalizacija kalcij-fosfatnog sloja i precipitacija hidroksiapatita. Prisutnost ionskih vrsta poput karbonata, koji migriraju iz otopine prema površini stakla, i fluoridnih iona, otpuštenih iz stakla ako ih ono sadrži, utječe na stehiometriju nastalog hidroksiapatita koji je zapravo mješavina apatita – karbonatnog hidroksiapatita i fluoroapatita.

Koncentracija silicija i kalcija u otopini raste zahvaljujući otapanju silicijevog dioksida i kationskoj izmjeni. Nasuprot tome, koncentracija fosfora se smanjuje nakon precipitacije amornih fosfatnih oksida na površini sloja silika gela. Povezivanje H^+ iona sa Si–O skupinama rezultira porastom pH do 8. Iako je navedeni iznos pH citotoksičan, kontinuirani tok tjelesnih tekućina razrjeđuje otopinu stakla i time sprječava ugrožavanje tjelesnih stanica [13]. Nukleacija prvih kristala hidroksiapatita, za razliku od procesa otapanja stakla i stvaranja kristalnog HAp sloja, odvija se u kraćem vremenskom periodu te ovisi o molarnom udjelu SiO_2 prisutnog u staklu. Ako je molarni udio SiO_2 manji od 53 mol.%, hidroksiapatit kristalizira za manje od 2 h te se staklo može povezati preko HAp sloja s kosti, kao i s mekim tkivom kolagena. Molarni udio do 58 mol.% rezultira sporijom kristalizacijom za koju su potrebna dva dana. Takva vrsta stakla povezuje se samo s kostima. Molarni udio viši od 60 mol.% znači da staklo više nije bioaktivno i ne povezuje se s kostima i mekim tkivima [13].

Kemijska postojanost stakla je ključna za svojstvo bioaktivnosti. Brzina otapanja mora biti kompatibilna sa staničnim procesima, kao i s brzinom stvaranja nove kosti. Otapanje stakla u tjelesnim tekućinama i otpuštanje kalcijevih i fosfatnih iona važni su za biomineralizaciju stakla. Stoga, način na koji se odvija proces otapanja ima ključnu ulogu u bioaktivnosti stakla. S obzirom da bioaktivno staklo u organizmu treba pružiti privremenu potporu te potpomoći rast i regeneraciju

koštanog tkiva, brzina otapanja BG-a mora biti optimalna. Presporo otapanje rezultira nedovoljnom koncentracijom iona koji bi potaknuli proliferaciju i diferencijaciju koštanih stanica. Suprotno tome, prebrzim otapanjem bioaktivnog stakla koncentracija iona može biti previsoka da bi bila učinkovita. Kinetika otapanja i otpuštanja iona ovisi o strukturi staklene mreže i tipu iona prisutnih u staklu. Visokopolimerizirano staklo otapa se sporo, i obrnuto [16]. Staklo gradi amorfnu mrežu SiO_4^- tetraedara međusobno povezanih premošćujućim kisicima. Dodatkom modifikatora u mreži nastaju nepremošćujući kisici (Na_2O i CaO) koji otvaraju silikatnu mrežu. Povećanjem koncentracije nepremošćujućih kisika smanjuje se kemijska stabilnost BG-a rezultirajući povećanjem kristalnosti sustava [15, 17].

Broj premošćujućih kisikovih veza silicijevog tetraedra može se izraziti kao Q^n , gdje n predstavlja broj premošćujućih veza. Fitzgerald i sur. [18] dokazali su da mreža 45S5 Bioglass® sadrži uglavnom Q^2 lance i prstene, što znači da gotovo 70 % tetraedara ima samo dvije premosne veze, dok je preostali dio stakla Q^3 . Pomoću sastava jednostavnih bioaktivnih stakala može se predvidjeti mrežna povezanost, NC (eng. *network connectivity*), a time i bioaktivnost stakla. NC opisuje stupanj polimerizacije staklene mreže uzimajući u obzir samo silikatnu povezanost, uz pretpostavku da sve fosfatne vrste u staklu postoje u obliku ortofosfata, PO_4^{3-} [16]. Formula za mrežnu povezanost je definirana kao [13]:

$$NC = \frac{4[\text{SiO}_2] - 2[M_2^I\text{O} + M^{II}\text{O}] + 6[\text{P}_2\text{O}_5]}{[\text{SiO}_2]} \quad (2)$$

gdje $M_2^I\text{O}$ i $M^{II}\text{O}$ predstavljaju mono- i dvovalentne okside prisutne u staklu. Kako bismo staklo mogli smatrati bioaktivnim, NC vrijednost mora biti u području 1,8 – 2,6. S obzirom da u strukturi staklene mreže ne postoje Si–O–P veze, može se zaključiti da fosfati postoje u formi ortofosfata te se smatraju Q^0 [13].

Dvije su različite metode pripreme bioaktivnog stakla: tradicionalno kaljenje taline i sol-gel postupak. Razlika je u radnoj temperaturi, koja je u postupku kaljenja taline vrlo visoka ($T > 1300$ °C), dok se sol-gel metoda provodi pri sobnoj temperaturi. Štoviše, sol-gel metoda rezultira poroznim bioaktivnim staklom slične kompozicije 45S5 stakla, dok se tradicionalnim postupkom taljenja dobiva bioaktivno staklo guste strukture [14].

2.2.1.2. Bioresorbirajuća keramika: hidroksiapatit

Za razliku od bioaktivnog stakla, koje ima veći potencijal za poticanje regeneracije kostiju u usporedbi s drugim vrstama bioaktivne keramike i koje tvori vezu preko CHA sloja, hidroksiapatit tvori direktnu vezu s okolnim tkivima te se ubraja u topljivu keramiku. Osteoinduktivan je, netoksičan te ne izaziva upale. Nedostatak mu je krtoš koja otežava oblikovanje [19]. Otapanjem se oslobađa mjesto i pritom nastaje mineralni dio kosti. Nastali mineralni dio može biti HAp, amorfni CaP, vitlokit, OCP (oktokalcijev hidrogenfosfat pentahidrat) ili dr. koji potom prelaze faze transformacije tijekom starenja.

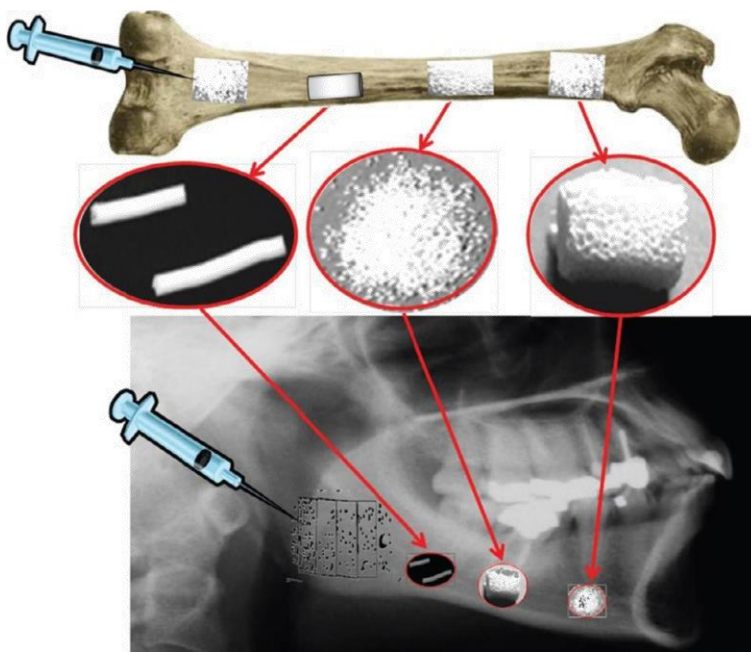
Hidroksiapatit je glavna anorganska komponenta tvrdih tkiva, kostiju i zubi, koja zauzima 60 – 70% mineralne faze ljudske kosti. Zahvaljujući sličnosti s mineralnom koštanom fazom, istražuje se i primjenjuje u obliku implantata već dugi niz godina. Pažnja je posebno usmjerena na hidroksiapatitnu poroznu keramiku jer kao takva omogućava vaskularizaciju, invaziju osteoblasta i angiogenezu. HAp implantati primjenjuju se u obnovi tvrdih koštanih tkiva jer ubrzavaju osteointegraciju na području implantacije i u njenoj okolini. Takvi materijali, da bi se smatrali biokompatibilnima i bioaktivnima, moraju biti porozni i podnositi opterećenje jednako kao tkiva koja zamjenjuju [20]. Visok stupanj međusobne povezanosti pora je ključ za uspješnu regeneraciju koštanog tkiva. Međusobna povezanost pora olakšava transport hranjivih tvari, potiče staničnu migraciju i međustaničnu komunikaciju, tzv. „*cell-to-cell communication*“ te omogućava urastanje koštanog tkiva. Razlikuju se makroporoznost, veličine pora u rasponu od 50 do 200 μm i mikroporoznost, pore veličine $< 10 \mu\text{m}$. Makroporoznost osigurava dovoljno prostora za kolonije stanica i urastanje novih tkiva. Dimenzije makropora nužne su za smještaj stanica i stvaranje krvnih žila i novih tkiva. Mikroporoznost pruža potrebnu hrapavost površine i povećava permeabilnost okosnice. Smatra se da pozitivno utječe na adsorpciju proteina i „usidrenje“ osteoblasta, stoga je važna za tkiva koštanih okosnica [21]. Istraživanja su pokazala da istovremena prisutnost oba tipa poroznosti izrazito poboljšava staničnu proliferaciju na okosnicama [22, 23].

Kalcijevi fosfati često se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva zahvaljujući dobroj biokompatibilnosti, netoksičnosti i sposobnosti vezanja za živu kost organizma. Potiču proliferaciju, diferencijaciju i adheziju koštanih stanica, odnosno osteoblasta [24].

Kalcij-fosfatni spojevi ionskog omjera $Ca/P > 1$ primjenjuju se u biomedicini, dok oni čiji je omjer manji od 1, imaju otežanu implantaciju zbog visoke topljivosti i niskog pH [25]. Najpoznatiji kalcij-fosfatni spojevi s navedenom primjenom su [26]:

- a) Dikalcijev fosfat dihidrat, $CaHPO_4 \times H_2O$, koji je stabilan u slabo kiselom mediju pH područja 4 – 6, a koristi se kao prekursor za sintezu hidroksiapatita. Omjer Ca/P iznosi 1;
- b) Trikalcijev fosfat, $Ca_3(PO_4)_2$, koji postoji u dvije alotropske modifikacije, α - i β -trikalcijev fosfat, a Ca/P omjer za svaku modifikaciju iznosi 1,5;
- c) Hidroksiapatit, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$, koji je najpogodniji za primjenu u biomedicini jer mu pH oscilira oko fiziološkog pH (7,2 – 7,6), a omjer Ca/P iznosi 1,67.

Hidroksiapatitna keramika upotrebljava se u raznim oblicima, kao što su prah, prevlake na metalnim površinama implantata ili porozni materijal (Slika 2.).

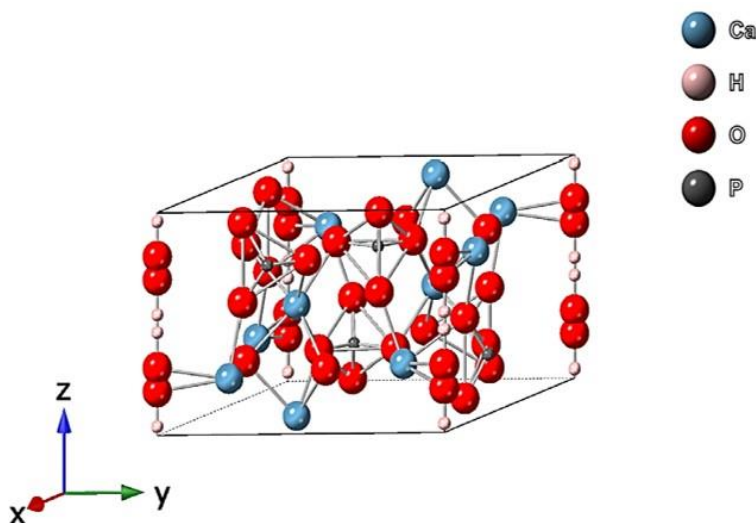


Slika 2. Primjene kalcij-fosfatne biokeramike u biomedicini [25].

Kristalna struktura hidroksiapatita, kao i njegova kemijska svojstva, vrlo su slični biološkom apatitu sadržanom u kostima živih organizama. Biološki HAp je gotovo potpuno nanokristalan i posjeduje piezoelektrična svojstva. Kemijska formula biološkog hidroksiapatita

može se izraziti kao $(Ca,M)_{10}(PO_4,CO_3,Y)_6(OH,F,Cl)_2$, gdje M predstavlja elemente koji mogu zamijeniti Ca^{2+} (Mg^{2+} , Na^+ , K^+) i elemente u tragovima (Sr, Si). Elemente koji mogu zamijeniti PO_4^{3-} predstavlja Y. Dosad je, dopiranjem s elementima u tragovima, pripremljen niz sintetički modificiranih apatita s ciljem što boljeg terapijskog učinka na regeneraciju tkiva *in vivo* [13].

Hidroksiapatit je mineral ionskog karaktera koji kristalizira u heksagonskoj kristalnoj rešetci ($P6_3/m$ rešetka) sačinjenoj od atoma kisika s metalima koji popunjavaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u kristalnoj rešetci (Slika 3.). Približne vrijednosti parametara rešetke iznose: $a = b = 9,37 \text{ \AA}$, $c = 6,88 \text{ \AA}$; $\alpha = \beta = 90^\circ$, $\gamma = 120^\circ$ [4, 27, 28].



Slika 3. 3D prikaz kristalne strukture hidroksiapatita [17].

Uvjeti sinteze hidroksiapatita imaju značajan utjecaj na strukturu, morfologiju i veličinu kristala. Metode sinteze podijeljene su u tri skupine: sinteze u suhom ili mokrom stanju te visokotemperaturni procesi [4, 28]. Sinteze u suhom stanju, za razliku od onih u mokrom, ne koriste otapalo. Većina metoda u suhom stanju ne zahtjeva precizno kontrolirane uvjete, što ih čini pogodnima za masovnu proizvodnju praškastih oblika. Prednost sinteza u mokrom stanju je dobra kontrola nad morfologijom i srednjom veličinom praha. Najčešće se koriste za proizvodnju nanopraha HAp-a. Visokotemperaturni procesi podrazumijevaju visoke temperature pri kojima prekursori djelomično ili u potpunosti izgaraju, a dijele se na izgaranje i pirolizu [6].

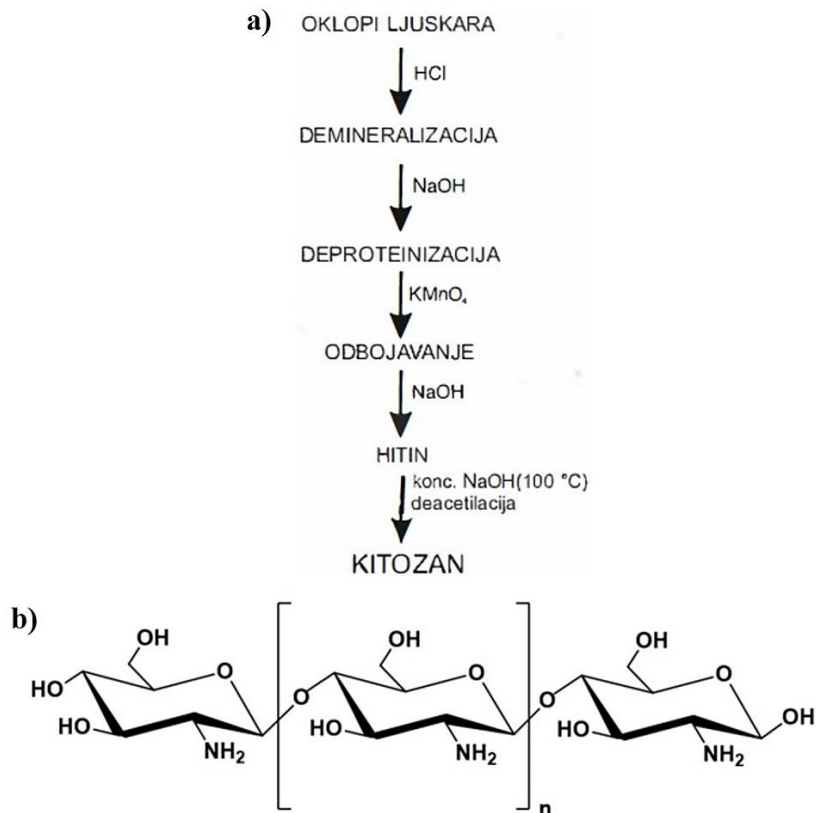
2.2.2. Biorazgradljivi i biokompatibilni polimeri

Biorazgradljivi polimeri su još jedna vrsta materijala koja nalazi primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Mogu biti prirodnog (polisaharidi i proteini, npr. kitozan (CHT) i kolagen) i sintetskog podrijetla (npr. polilaktična kiselina, polikaprolakton, poliglikolna kiselina). Podliježu procesu biorazgradnje reakcijom hidrolize ili djelovanjem enzima, a unutar organizma razgrađuju se metaboličkim procesima, pri čemu nastale manje molekulske jedinice nisu štetne za svoju okolinu. Biokompatibilni su, a njihova mehanička svojstva mogu se poboljšati dodatkom punila ili ojačavala te modifikacijom strukture polimera [15, 29].

2.2.2.1. Kitozan

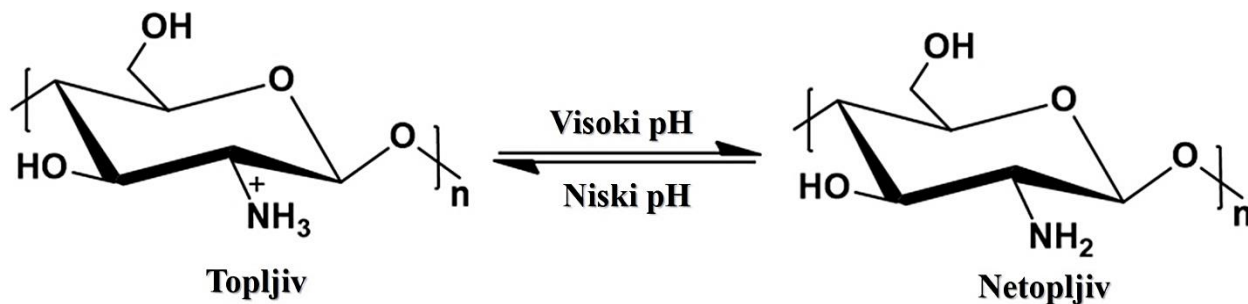
Prirodni polimeri poželjne su komponente u proizvodnji umjetnih tkiva zbog toga što posjeduju svojstvo biorazgradljivosti i biokompatibilnosti. Kitozan se primjenjuje u biomedicini upravo zbog svoje biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i antibakterijskog djelovanja. Također, poželjan je biomaterijal jer se može oblikovati u razne oblike poput filmova, vlakana, spužvi pa čak i u kompleksnije oblike koji se koriste u ortopedskom liječenju [30].

Kitozan se dobiva deacetilacijom hitina, dugolančanog polisaharida, primarnog strukturnog polimera egzoskeleta rakova, kutikula insekata te staničnih stijenki gljiva [31]. Hitin, dugolančani polisaharid, je osnovna strukturna komponenta beskralješnjaka i nižih biljaka. Procesom deacetilacije hitina nastaju novi linearni polisaharidi skupnog naziva kitozan (Slika 4 a.). Međusobno se razlikuju prema molekulskoj masi i duljini polimernog lanca te gustoći i raspodjeli naboja, što uvjetuje njihova funkcionalna svojstva [32].



Slika 4. Shematski prikaz a) sinteze kitozana i b) njegove kemijske strukture [32].

Trodimenzijska struktura kitozana odgovara tzv. α -zavojnici, koja predstavlja jedan od dva glavna oblika sekundarnih proteinskih struktura, a stabilizirana je inter- i intramolekulskim vodikovim vezama. Linearan je i kristalasti polisaharid građen od D-glukozaminskih i N-acetil-D-glukozaminskih strukturnih jedinica (Slika 4 b.). Deacetilirani hitin naziva se kitozanom kada sadrži barem 60 % D-glukozaminskih podjedinica, što odgovara stupnju deacetilacije od 60 % [28]. Kitozan je biokompatibilan, netoksičan i biorazgradljiv polisaharid koji je osjetljiv na pH vrijednost. Otapa se u niskom pH području, dok u visokom pH području nije topljiv. Slaba je polibaza pK_a vrijednosti $\sim 6,5$, a pH područje u kojem se odvija prijelaz iz topljivog u netopljiv proteže se između 6 i 6,5 (Slika 5.) [32, 33].



Slika 5. Topljivost kitozana u ovisnosti o pH [33].

Zahvaljujući biokompatibilnosti i fizikalno-kemijskim svojstvima, kitozan je vrlo prikladan polimerni materijal koji ima brojne primjene, npr. u membranama za hemodijalizu i umjetnoj koži. Koristi se kao nosač djelatne tvari te za izradu poroznih okosnica koji se koriste u inženjerstvu tkiva.

S obzirom da kitozan posjeduje sposobnost raznolikog oblikovanja poput mikrosfera, pasta, membrana, spužvi ili poroznih okosnica koje se primjenjuju u inženjerstvu tkiva, postoji nekoliko metoda priprava. Najpoznatija metoda priprave poroznih okosnica je toplinski inducirana fazna separacija uz sublimaciju (engl. *thermally-induced phase separation*, TIPS), odnosno liofilizacija. Metoda se temelji na smrzavanju otopine kitozana pri čemu takvi uvjeti potiču odvajanje faza, acetatne soli kitozana od kristala leda, koji se potom sublimiraju stvarajući poroznu strukturu. Međutim, nastale porozne strukture i dalje sadrže acetatnu sol kitozana koja može uzrokovati bubrenje i otapanje u neutralnom vodenom mediju, no to se može spriječiti fizikalnim umreživanjem nakon uranjanja u natrijev hidroksid, natrijev sulfat ili tripolifosfat. Nadalje, ova metoda zahtjeva strogu kontrolu temperature jer ako temperatura nije dovoljno niska, okosnica neće postati dovoljno kruta da podnese međupovršinsku napetost nastalu isparavanjem otapala te postoji mogućnost raspadanja [31].

Također, navedeni oblici kitozana mogu se pripraviti metodom mokrog ispredanja koja omogućuje stvaranje vlakana, a zbog jake međulančane sile, koja potječe od hidroksil- i amino-skupina, kitozan se može razgraditi pri temperaturi ispod temperature taljenja, što ograničava njegovu preradljivost za metode taljenja ili suhog ispredanja. Metodom elektroispredanja kitozan se može preraditi u poroznu strukturu nanovlakana [31].

Kitozan se može oblikovati u hidrogelove, kao i u spužve koje u kombinaciji s, primjerice, bioaktivnim staklom ili hidroksiapatitom daje kompozitne materijale visoke biokompatibilnosti i biofunktionalnosti koji se koriste u liječenju mišićnih i koštanih tkiva [32]. Peter i sur. [34] sintetizirali su α -hitin/BG i CHT/BG kompozitne okosnice primjenom tehnike liofilizacije. Dobivene su makroporozne kompozitne okosnice s porama veličine 150 – 500 μm . *In vitro* ispitivanjem uzoraka dokazano je taloženje apatita na površini okosnice što ukazuje na dobru bioaktivnost. Nadalje, Li i sur. [21] sintetizirali su CHT/HAp kompozitne okosnice metodom toplinski inducirane fazne separacije uz sublimaciju te CAP (eng. *cold atmospheric plasma*) metodom. Rezultati su pokazali visoku poroznost okosnica s dimenzijama pora 80 – 180 μm (TIPS) te ≤ 10 μm (CAP), visok stupanj bubrenja od ≥ 80 % (TIPS) i ≥ 300 % (CAP), kao i visoku biokompatibilnost i bioaktivnost [21].

2.3. Metode ispitivanja bioaktivnosti

Bioaktivnost materijala može se definirati kao specifični odgovor površine materijala koji može stvarati vezu između materijala i okolnog tkiva [35]. Bioaktivnost se može ispitati *in vivo* i *in vitro*, a pritom se podrazumijeva stvaranje apatitnog sloja na površini materijala nakon ugradnje u živi organizam [36].

Umjetni materijali poput keramike, kojima se liječe koštana tkiva, okruženi su fibroznim tkivima koja otežavaju povezivanje s koštanim sustavom. Osim toga, mehanička svojstva keramike ne podudaraju se s mehaničkim svojstvima kostiju. Iako se keramike poput hidroksiapatita i bioaktivnog stakla spontano povezuju s kostima u organizmu, potrebno je ispitati u kojoj mjeri. Kako bi se izbjeglo ispitivanje provedeno na životinjama, simulirane su tjelesne tekućine koje potiču taloženje apatita važnog za diferencijaciju i proliferaciju koštanih stanica [37].

Simulirana tjelesna tekućina, SBF (eng. *simulated body fluid*), sadrži gotovo jednaku koncentraciju iona kao i ljudska krvna plazma (Slika 6.). Kokubo i sur. [37] navode kako je 90-ih godina prošlog stoljeća otkriveno da SBF potiče *in vivo* nastajanje apatita ključnog za povezivanje biomaterijala sa živućim kostima. S godinama je utvrđeno da materijali u SBF-u, na čijoj se površini stvara sloj apatita, mogu tvoriti vezu s kostima u živom organizmu putem novonastalog sloja sve dok ne izazivaju toksične reakcije ili reakcije antitijela. Apatitni sloj u korelaciji je sa

simuliranom tjelesnom tekućinom, što omogućava kvalitativno i kvantitativno ispitivanje *in vivo* bioaktivnosti biomaterijala [37].

No, treba napomenuti da je SBF otopina prezasićena u odnosu na apatit, što znači da nije lako pripremiti bistru otopinu SBF-a, a da pritom ne dođe do precipitacije. Stoga, detaljan recept za pripremu SBF-a objavili su Cho i sur. [37] 1995. godine kojeg su znanstvenici kroz godine pokušavali ispraviti, što je prikazano na slici 6.

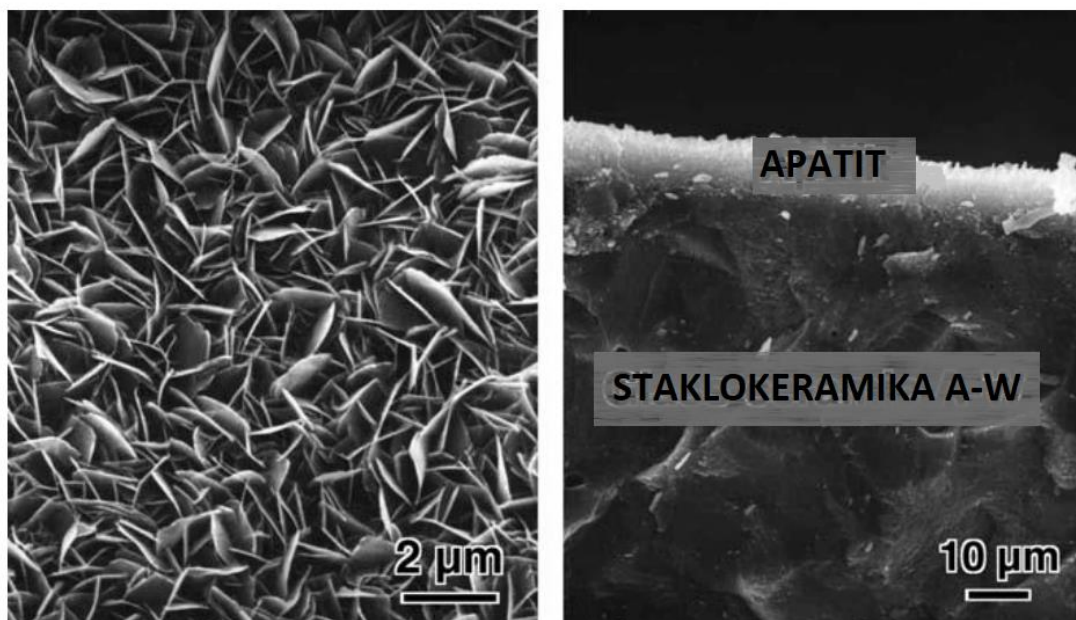
	Koncentracija iona (mM)							
	Na ⁺	K ⁺	Mg ²⁺	Ca ²⁺	Cl ⁻	HCO ₃ ⁻	HPO ₄ ²⁻	SO ₄ ²⁻
Ljudska krvna plazma	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Originalan SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	148.8	4.2	1.0	0
Korigirani SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	147.8	4.2	1.0	0.5
Obrađeni SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	27.0	1.0	0.5
Poboljšani SBF	142.0	5.0	1.5	2.5	103.0	4.2	1.0	0.5

Slika 6. Koncentracije iona u simuliranoj tjelesnoj tekućini i ljudskoj krvnoj plazmi [37].

Prema slici 6. može se vidjeti da korigirani SBF ima više Cl⁻ iona, a manje HCO₃⁻ iona od krvne plazme što su pokušali ispraviti Oyane i sur. [37] pripremvši korigirani SBF u kojemu su koncentracije Cl⁻ iona i HCO₃⁻ iona bile usklađene s onima u ljudskoj krvnoj plazmi. No, pojavio se novi problem, a to je da kalcijev karbonat taloži iz tako pripremljene otopine SBF-a. Problem su ispravili Takadama i sur. [37] pripravljanjem nove poboljšane SBF otopine u kojoj su smanjili samo koncentraciju Cl⁻ iona na onu koja je prisutna u krvnoj plazmi, a koncentraciju HCO₃⁻ iona ostavili su istu onoj u korigiranoj otopini SBF-a. Ovakvim testiranjem dobila se pažljivo provjerena metoda dobivanja SBF otopine.

Hench i sur. [37] pokazali su da bioaktivno staklo, čiji je sastav Na₂O–CaO–SiO₂–P₂O₅, stvara oblik apatita na površini u SBF tekućini te je potvrđeno da se navedeno staklo veže za kosti kroz sloj kalcijevog fosfata. Također, utvrđeno je da sinterirani hidroksiapatit ima novostvoreni sloj apatita na svojoj površini nakon inkubacije u SBF otopini te je potvrđeno da se veže za kost kroz sloj apatita *in vivo*. Za kompozite poput onih koji sadrže čestice staklokeramike A-W dispergirane u polietilenskoj matrici također je dokazano stvaranje apatita na površini u SBF otopini, što je vidljivo na slici 7 [37].

Može se zaključiti da je za navedene biokeramike stvaranje apatita na njihovim površinama u SBF otopini u dobroj korelaciji s njihovim svojstvom biokativnosti.



Slika 7. SEM mikrografija površine (lijevo) i poprečnog presjeka (desno) sloja apatita stvorenog na staklokeramici A-W u SBF otopini [37].

S obzirom da je izuzetno zahtjevno pripraviti SBF bez precipitacije karbonata, kao dobra zamjena za ispitivanje bioaktivnosti pokazala se Hankova uravnotežena otopina soli, HBSS (eng. *Hank's Balanced Salt Solution*). HBSS je izotonična puferska otopina koja se sastoji od anorganskih soli i ugljikohidrata [38]. Kao i SBF otopina, HBSS otopina sadrži anorganske komponente ljudske krvne plazme, a kemijski sastav navedenih otopina odabran je tako da je koncentracija iona izjednačena s koncentracijom tjelesnih tekućina i pH vrijednost što bliža pH vrijednosti ljudske krvi. Eslami i sur. [39] navode kako je HBSS otopina pogodna za *in vitro* ispitivanja površinskog stvaranja apatita, čime se poboljšava i biokompatibilnost kompozitnih biomaterijala. Također navode kako je korisna za *in vivo* oseointegraciju implantnih uređaja [39].

3. MATERIJALI I METODE

3.1. Materijali

Za sintezu kompozitnih okosnica kitozan/hidroksiapatiti (CHT/HAp) i kitozan/bioaktivno staklo (CHT/BG) korišteni su sljedeći materijali i kemikalije:

- Kitozan, $(C_6H_{11}NO_4)_n$, $M_w = 190\text{--}310$ kDa, Sigma-Aldrich
- Octena kiselina, CH_3COOH , 99,8 %, Lach-ner d.o.o.
- Natrijev hidroksid, $NaOH$, Gram-mol d.o.o.
- Amonijev dihidrogenfosfat, $NH_4H_2PO_4$, Lach-ner d.o.o.
- Kalcijev karbonat, $CaCO_3$, Lach-ner d.o.o.
- Tetraetil ortosilikat (TEOS), $C_8H_{20}O_4Si$, 98 %, BDH PROLABO
- Trietil fosfat (TEP), $(C_2H_5)_3PO_4$, 99,8 %, Sigma-Aldrich
- Dušična kiselina, HNO_3 , 65 %, POCH S.A.
- Kalcijev nitrat, $Ca(NO_3)_2 \times 4 H_2O$, Kemika
- Amonijak, NH_3 , 28 %, VWR CHEMICALS
- Etanol, C_2H_5OH , apsolutni, Gram-mol d.o.o.

3.2. Sinteza bioaktivnog stakla sol-gel postupkom

Bioaktivno staklo pripremljeno je sol-gel postupkom. Polazna otopina silicijevih iona pripremljena je dodatkom 10 mL otopine TEOS-a, 1,4 mL dušične kiseline (2 mol/dm^3) i 6,95 mL vode te se tako pripravljena smjesa miješala na magnetskoj miješalici 1 h. Nakon 1 h miješanja, dodano je 1,075 mL TEP-a te se otopina miješala 20 min. Potom je dodano 7 g $Ca(NO_3)_2$ uz miješanje do otapanja. Geliranje otopine provelo se postepenim dodatkom 5 mL otopine amonijaka (1 mol/dm^3). Dobiveni gel sušio se pri $60 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 24 h. Dobiveni kserogel se potom termički obradio na $600 \text{ }^\circ\text{C}$ tijekom 2 h.

3.3. Sinteza hidroksiapatita

Sinteza hidroksiapatita provedena je metodom precipitacije. Kao prekursori kalcija i fosfora korišteni su kalcijev karbonat i amonijev dihidrogen fosfat. Sinteza hidroksiapatita provedena je pri sobnoj temperaturi uz regulaciju pH vrijednosti otopine dodatkom otopine amonijaka. Sinteza pri sobnoj temperaturi započela je otapanjem kalcijeva karbonata u 2 %-tnoj octenoj kiselini. Nakon toga, dodan je amonijev dihidrogen fosfat kako bi se postigao omjer kalcija i fosfora $Ca/P = 1,67$ te je uslijedilo miješanje tijekom 24 sata uz prilagodbu pH vrijednosti na početku reakcije i nakon 4 sata dokapavanjem amonijaka ($pH = 9$) uz snažno miješanje. Konačni produkt je filtriran, ispran destiliranom vodom i osušen pri atmosferskim uvjetima.

3.4. Priprema otopine kitozana

Otopina kitozana pripravljena je dodatkom određene mase kitozana u 0,5 % (v/v) otopini octene kiseline uz konstantno miješanje tijekom 24 h na 700 o/min. Nakon potpunog otapanja, otopina se profiltrirala kako bi se uklonile nečistoće (Slika 8.). Otopina kitozana bez dodatka biokeramike služila je za pripravu kontrolnog uzorka.



Slika 8. Priprema otopine kitozana i filtracija.

3.5. Priprema kompozitnih suspenzija

Kompozitni materijali pripremljeni su iz suspenzija s različitim masenim udjelom biokeramike (HAp ili BG) u omjeru CHT/biokeramika: 100/0, 90/10, 80/20 i 70/30. Mase pojedinih komponenata u kompozitu dane su u tablici 1.

Tablica 1. Mase pojedinih komponenti u kompozitnim materijalima.

Sustav	$m(\text{CHT})/\text{g}$	$m(\text{BG})/\text{g}$	$m(\text{HAp})/\text{g}$
100/0	2,0	0	0
90/10	1,8	0,05	0,05
80/20	1,6	0,10	0,10
70/30	1,4	0,15	0,15

Otopina kitozana pripravljena je otapanjem odgovarajuće mase kitozana u 200 mL octene kiseline. Kompozitne suspenzije pripravljene su dodatkom odgovarajuće mase biokeramike u prethodno pripravljenu otopinu kitozana uz konstantno miješanje na magnetskoj miješalici. Daljnja homogenizacija suspenzija postignuta je pomoću ultrazvučne sonde Sonopuls Bandelin HD 4000 u vremenskim intervalima od 2 minute pri amplitudi od 40 %.

3.6. Priprava kompozitnih okosnica metodom toplinski inducirane fazne separacije uz sublimaciju

Pripremljene suspenzije CHT/HAp i CHT/BG izlivena su u mikrotitarske pločice s 24 bunarića te smrznute pri $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ na 24 h. Tako smrznute suspenzije su stavljene u liofilizer LIO-5 PLT u trajanju od 72 h pri temperaturi $-100\text{ }^{\circ}\text{C}$ i tlaku 0,2 mbar u svrhu sublimacije nastalih kristala leda, odnosno u svrhu stvaranja porozne mikrostrukture. Potom, dobivene strukture su

neutralizirane otopinom NaOH (0,5 mol/dm³) tijekom noći, višestruko isprane destiliranom vodom do neutralnog pH te potom smrznute i liofilizirane.

3.7. Ispitivanje bioaktivnosti u Hankovoj uravnoteženoj otopini soli

Bioaktivnost kompozitnih okosnica ispitana je u Hankovoj otopini soli (HBSS) pri čemu je svrha evaluirati stvaranje sloja kalcij-fosfatne faze na površini okosnice. Inkubacija kompozitnih okosnica provedena je pri temperaturi od 37 °C tijekom četiri tjedna. Otopina soli izmijenjena je svaka tri dana.

HBSS otopina pripravljena je otapanjem 8 g NaCl, 0,4 g KCl, 0,14 g CaCl₂, 0,1 g MgSO₄ × 7 H₂O, 0,1 g MgCl₂ × 6 H₂O, 0,09 g Na₂HPO₄ × 7 H₂O, 0,06 g K₂HPO₄, 1 g glukoze i 0,35 g NaHCO₃ u 1 L miliQ vode uz podešavanje pH vrijednosti na 7,4 otopinom 1 mol/dm³ HCl.

3.8. Identifikacija i karakterizacija materijala

3.8.1. Poroznost

Poroznost okosnica procijenjena je primjenom Arhimedove metode. Kao tekući medij korišten je apsolutni etanol, a za postizanje vakuuma koristila se plastična šprica od 50 mL. Primjenom vakuuma osigurava se prodiranje medija u sve pore okosnica radi potpunog ispunjenja. Poroznost se procijenila za svaki sustav CHT/BG i CHT/HAp na tri replike prema sljedećem izrazu:

$$\varphi [\%] = \frac{V_{pore}}{V_{pore} + V_{okosnica}} = \frac{\frac{m_{mokri\ uзорak} - m_{suhi\ uзорak}}{\rho_{etanol}}}{\frac{m_{suhi\ uзорak}}{\rho_{okosnica}} + \frac{m_{mokri\ uзорak} - m_{suhi\ uзорak}}{\rho_{etanol}}} \cdot 100 \quad (3)$$

φ – poroznost

V_{pore} – volumen pora okosnice

$V_{okosinca}$ – volumen okosnice

$m_{suhi\ uozrak}$ – masa suhe okosnice

$m_{mokri\ uozrak}$ – masa mokre okosnice

ρ_{etanol} – gustoća otapala

$\rho_{okosnica}$ – gustoća kompozita

3.8.2. Bubrenje

Bubrenje kompozitnih okosnica ispitano je u fosfatnom puferu, PBS (eng. *Phosphate Buffer Saline Solution*), pH vrijednosti 7,4, pri temperaturi 37 °C nakon 24 h inkubacije. Stupanj bubrenja (*SB*) procijenjen je na pet replika gravimetrijskom metodom iz razlika mase suhog i mokrog uzorka prema sljedećem izrazu:

$$SB [\%] = \frac{m_{mokri\ uozrak} - m_{suhi\ uozrak}}{m_{suhi\ uozrak}} \cdot 100 \quad (4)$$

SB – stupanj bubrenja

$m_{suhi\ uozrak}$ – masa okosnice prije bubrenja

$m_{mokri\ uozrak}$ – masa okosnice nakon bubrenja.

3.8.3. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR)

Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom je metoda infracrvene spektrometrije kod koje infracrveno zračenje odgovara energiji vibracije molekule te se koristi za određivanje funkcionalnih skupina na temelju izrađenih spektara. FTIR analiza provedena je na Bruker VERTEX 70 instrumentu s ATR nastavkom u rasponu mjernog područja 4000 – 400 cm^{-1} , uz rezoluciju od 2 cm^{-1} i temperaturi snimanja od 20 °C.

3.8.4. Rendgenska difrakcijska analiza (XRD)

Rendgenska difrakcijska analiza (eng. *X-ray diffraction analysis*, XRD) provedena je u svrhu identifikacije anorganske faze, odnosno određuje se prisutnost kristalnih faza u sustavu. XRD analiza provedena je na uređaju Shimadzu XRD 6000 s CuK_α zračenjem pri naponu od 40 kV i struji od 30 mA u rasponu kutova 2θ od 5 do 60° s korakom od $0,02^\circ$ i zadržavanjem od 0,6 s.

3.8.5. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) i energetska disperzivna rendgenska analiza (EDS)

Pretražnom elektronskom mikroskopijom istražena je morfologija uzoraka. Prethodno SEM analizi uzorci su napareni zlatom/paladijem u plazmi argona tijekom 120 s pomoću Quorum SC 7620 naprivača. Mikrostruktura kompozitnih okosnica istražena je na uređaju Tescan Vega III Easyprobe pri radnom naponu od 10 kV.

Za određivanje elementarnog sastava kompozitnih okosnica korišten je energetska disperzivni rendgenski spektrometar Bruker B-Quantax, povezan s pretražnim elektronskim mikroskopom.

3.8.6. Statistička obrada rezultata

Rezultati mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost \pm standardno odstupanje. Provedena je jednosmjerna analiza varijance (one-way ANOVA) grupa uzoraka uz kriterij za značajnu razliku $p < 0.05$.

4. REZULTATI

4.1. Poroznost

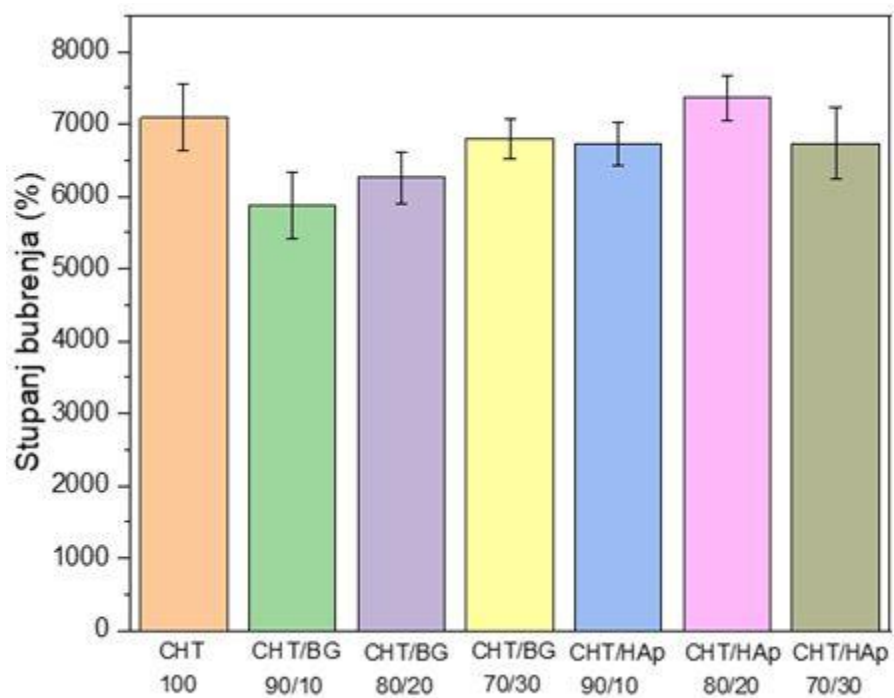
Vrijednosti procijenjene poroznosti kompozitnih kitozan/biokeramika okosnica određenih preko Arhimedove metode dane su u tablici 2.

Tablica 2. Procijenjene vrijednosti poroznosti kompozitnih okosnica.

Okosnica	Poroznost (%)
CHT/BG 70/30	96,1 ± 0,2 %
CHT/BG 80/20	96,6 ± 0,3 %
CHT/BG 90/10	95,3 ± 0,4 %
CHT/HAp 70/30	95,8 ± 0,6 %
CHT/HAp 80/20	96,1 ± 0,2 %
CHT/HAp 90/10	95,9 ± 0,2 %
CHT 100	97,2 ± 0,6 %

4.2. Bubrenje

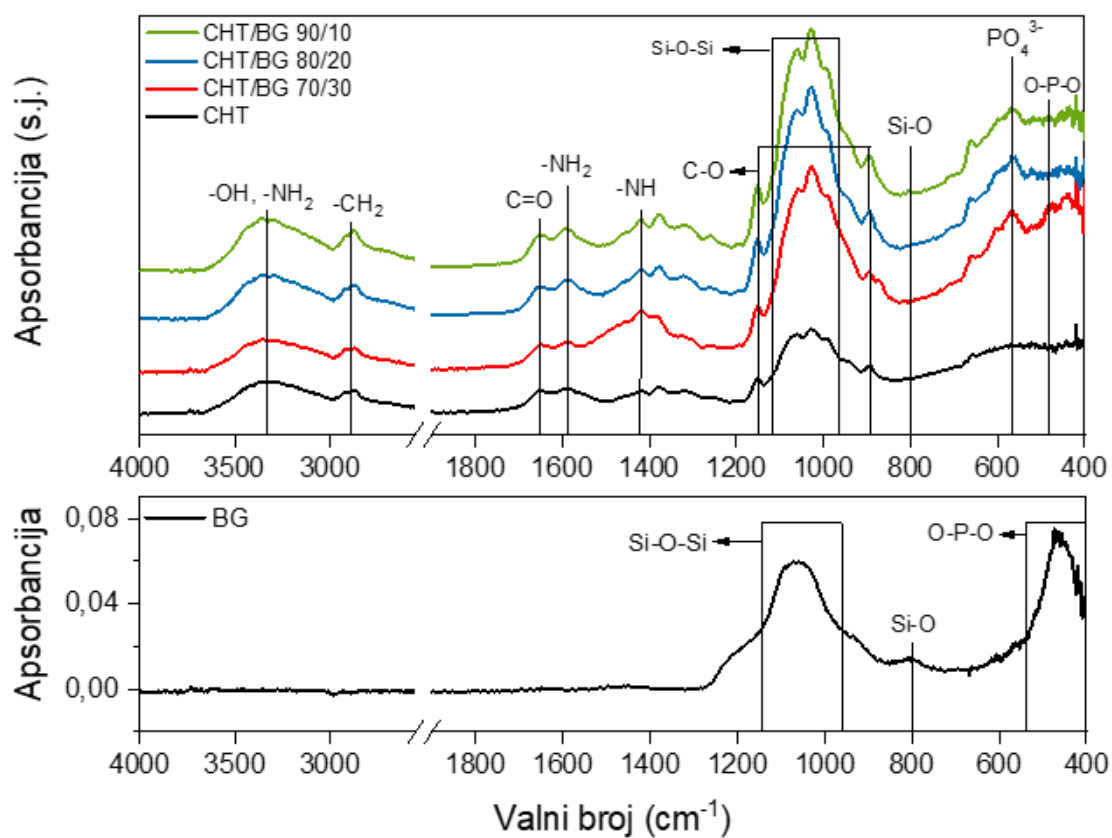
Svojstvo bubrenja kompozitnih okosnica određeno je gravimetrijskom metodom nakon 24 h namakanja u fosfatnom puferu (PBS) pri pH 7,4 i temperaturi od 37 °C. Vrijednosti kapaciteta bubrenja kompozitnih okosnica prikazani su na slici 9.



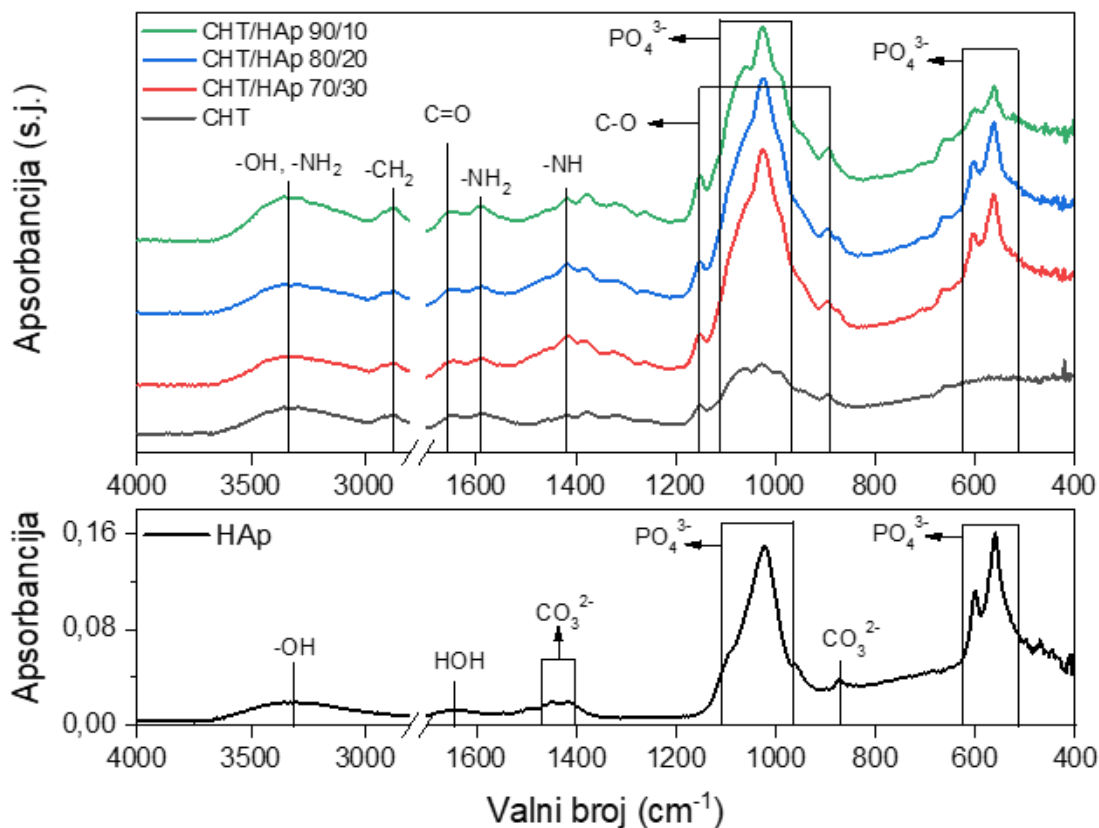
Slika 9. Kapacitet bubrenja kompozitnih okosnica nakon 24 h namakanja u fosfatnom puferu.

4.4. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom

Identifikacija pripremljenih materijala istražena je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovom transformacijom te su dobiveni spektri prikazani na slikama 10. – 11.



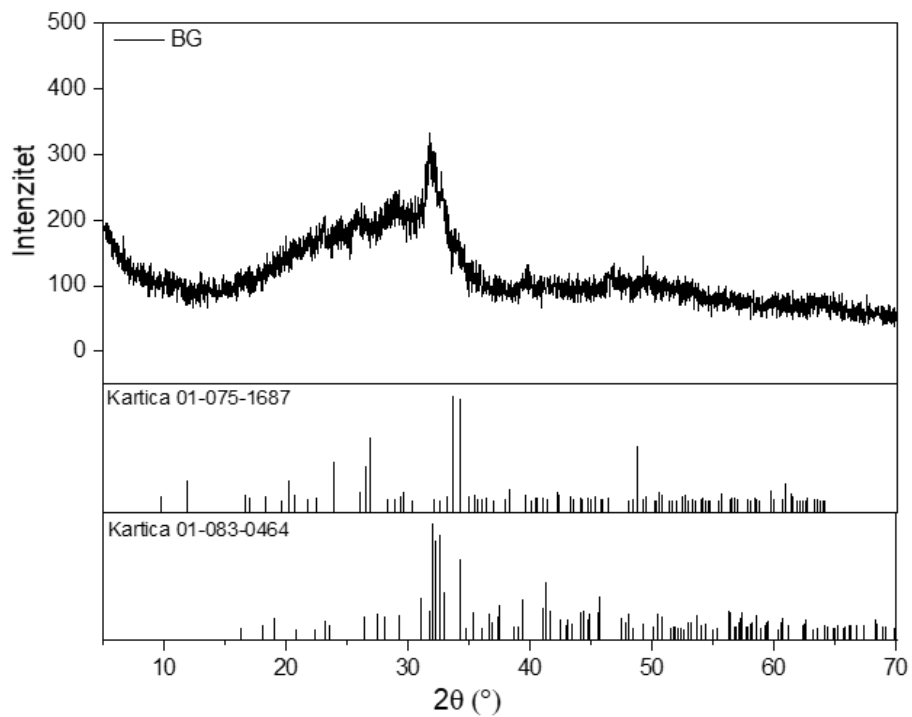
Slika 10. FTIR analiza kompozitnih okosnica CHT/BG.



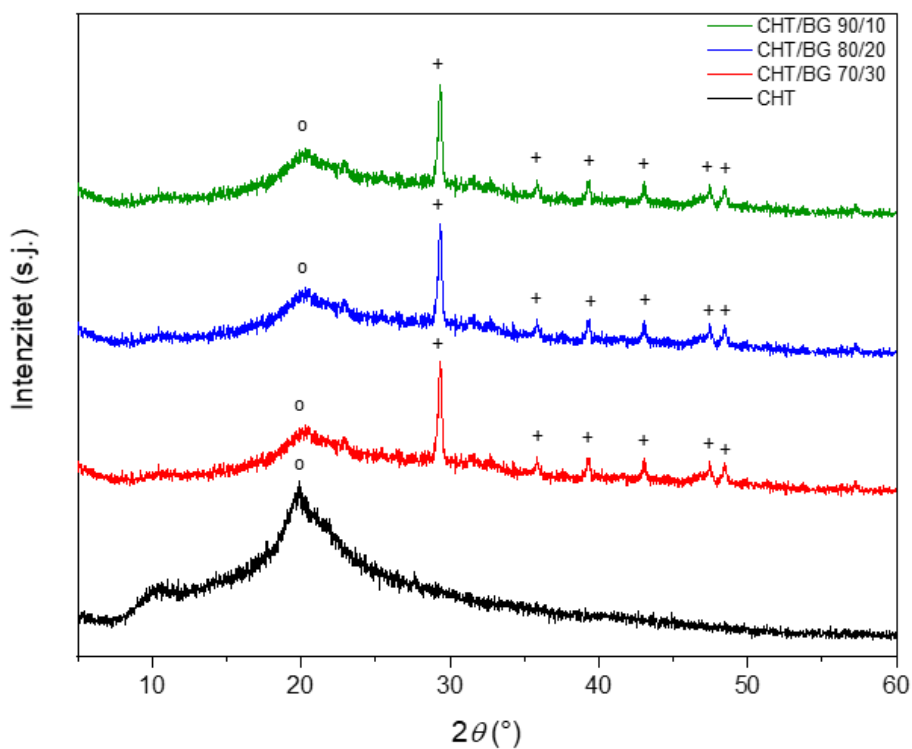
Slika 11. FTIR analiza kompozitnih okosnica CHT/HAp.

4.3. Rendgenska difrakcijska analiza

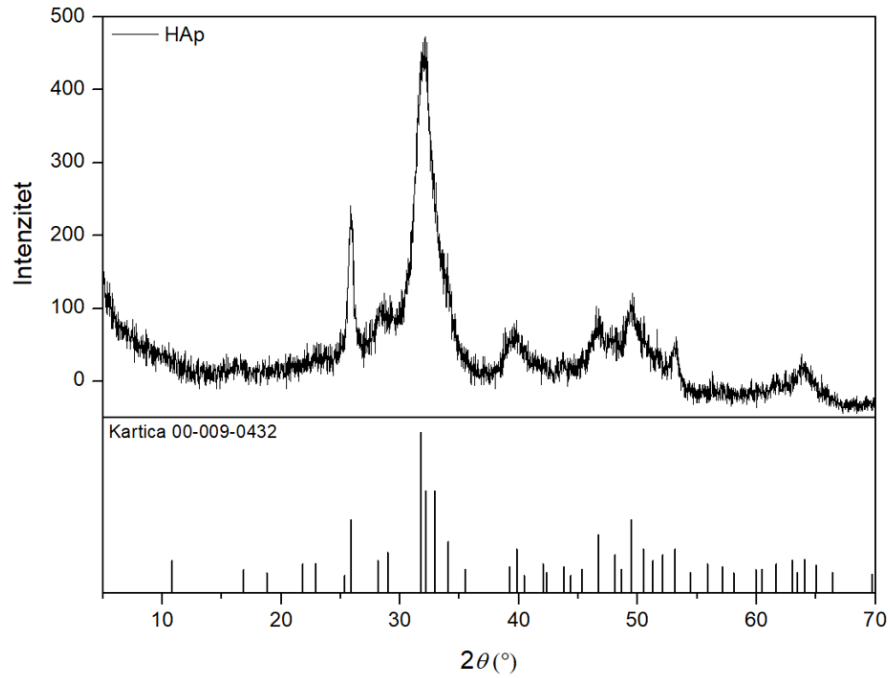
Rendgenskom difrakcijskom analizom istražen je mineraloški sastav bioaktivne keramike, pripremljenih kompozitnih okosnica te kompozitnih okosnica nakon inkubacije u HBSS otopini tijekom četiri tjedna pri 37 °C (slike 12. – 17.). Identifikaciju mineraloških faza provedena je uz pomoć standarda kristalografske baze podataka ICDD (*International Centre for Diffraction Data*).



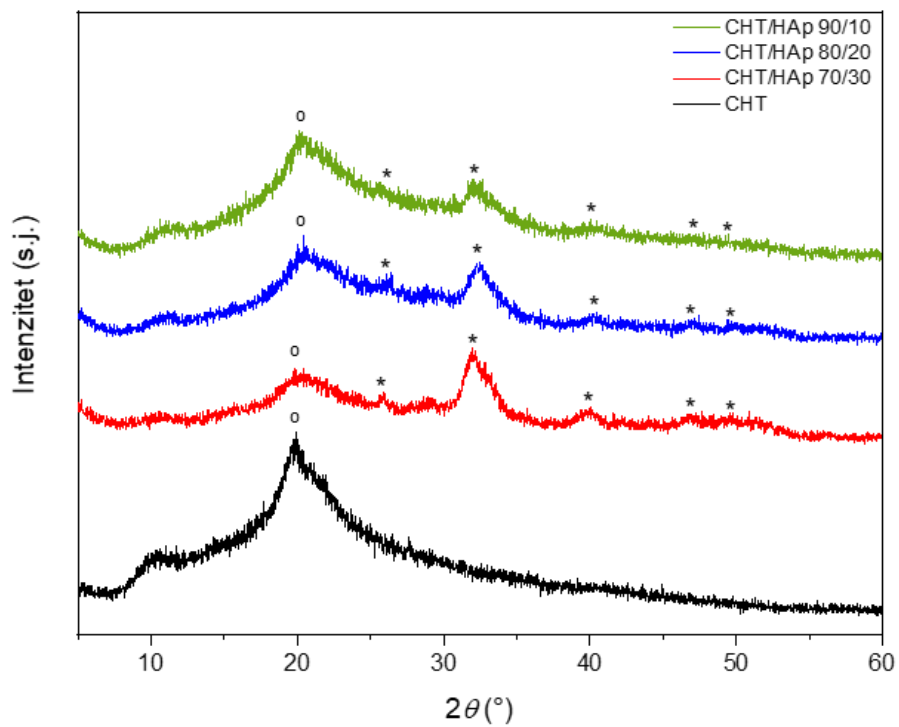
Slika 12. Difraktogram bioaktivnog stakla sintetiziranog sol-gel postupkom.



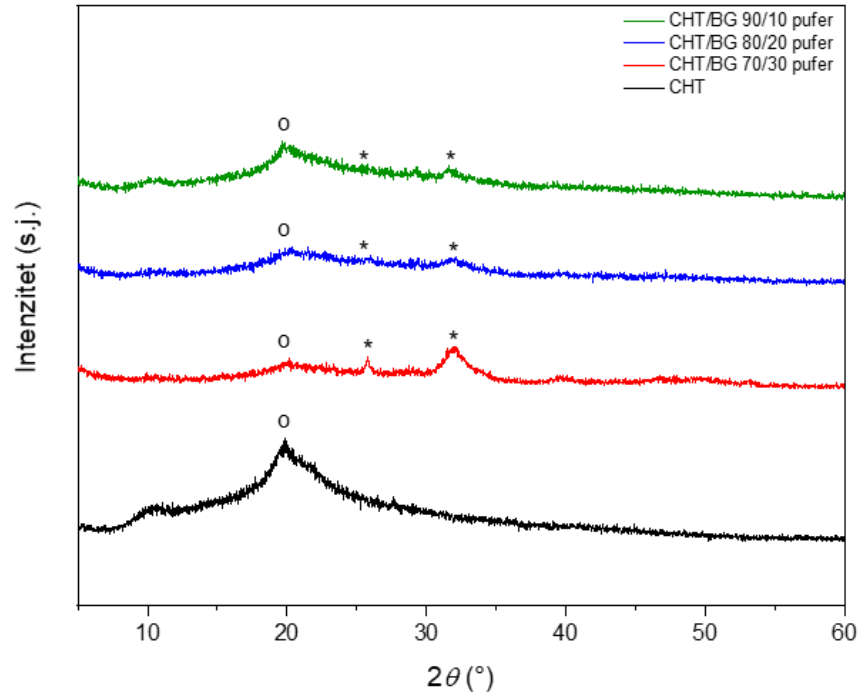
Slika 13. Difraktogrami kompozitnih CHT/BG okosnica. (o) označava maksimum kitozana; (+) označava maksimume kalcita.



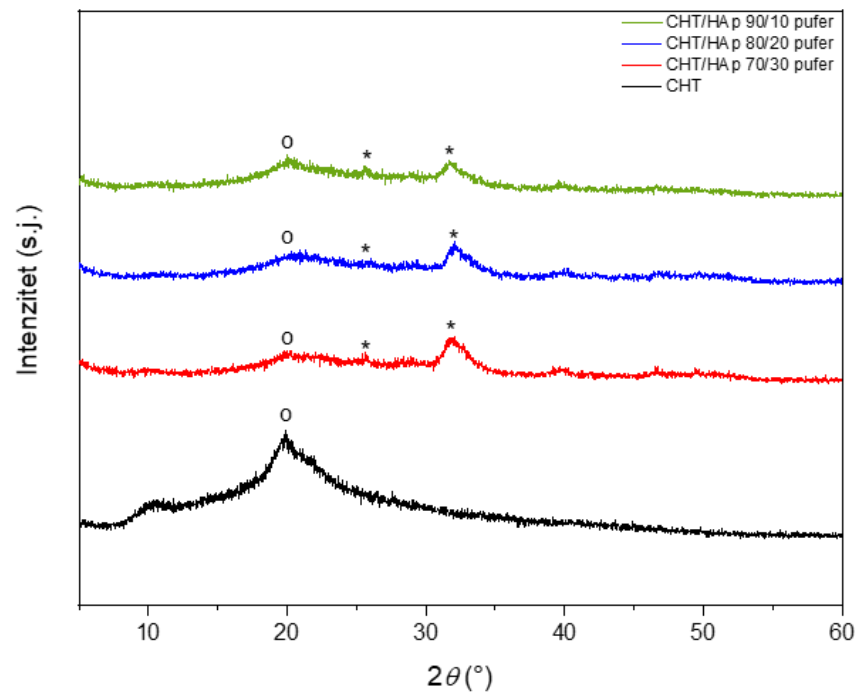
Slika 14. Difraktogram hidroksiapatita sintetiziranog metodom precipitacije.



Slika 15. Difraktogrami kompozitnih CHT/HAp okosnica. (o) označava maksimum kitozana; (*) označava maksimume hidroksiapatita.



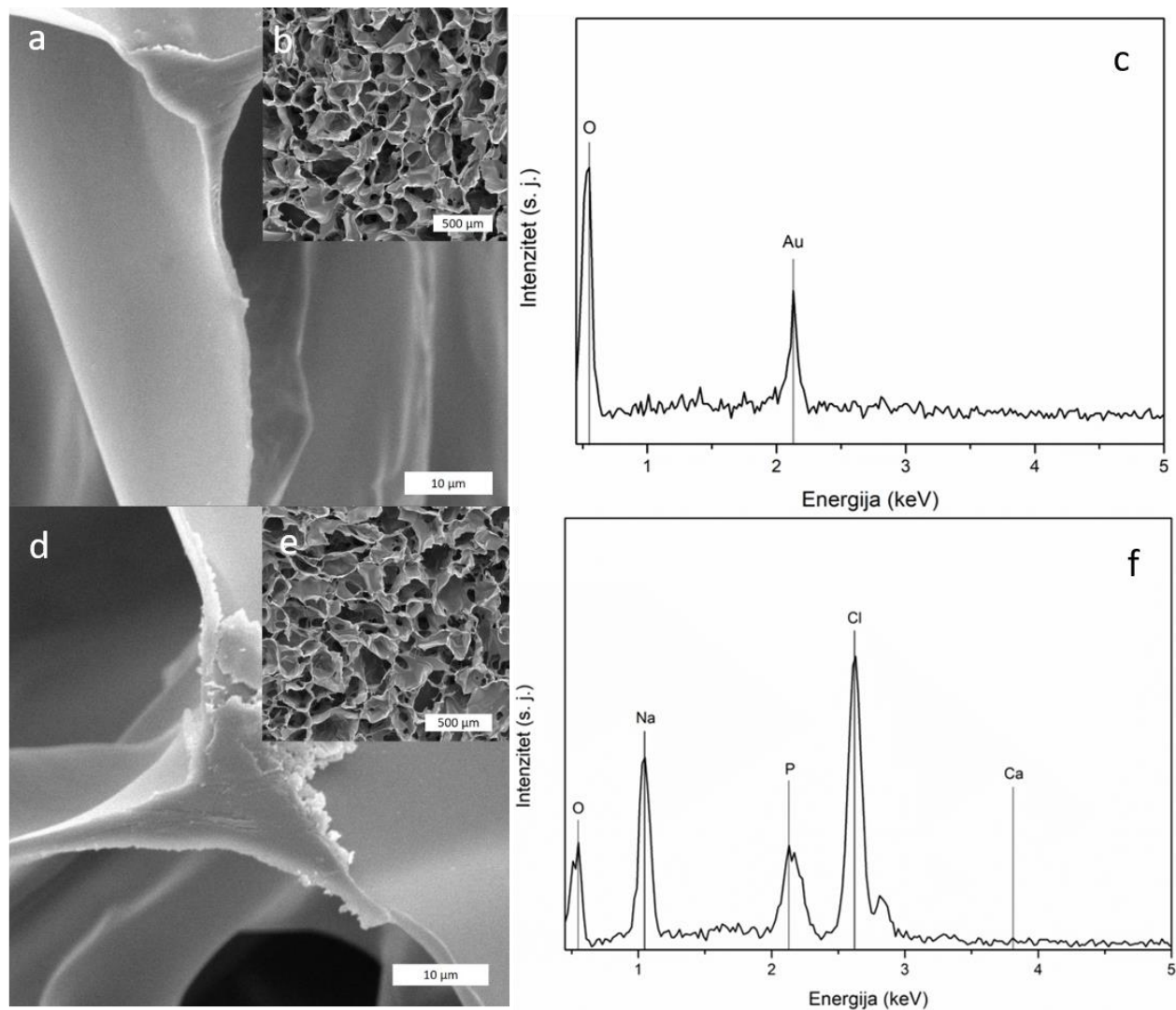
Slika 16. Difraktogrami kompozitnih CHT/BG okosnica nakon inkubacije u HBSS otopini. (o) označava maksimum kitozana; (*) označava maksimume CaP faze.



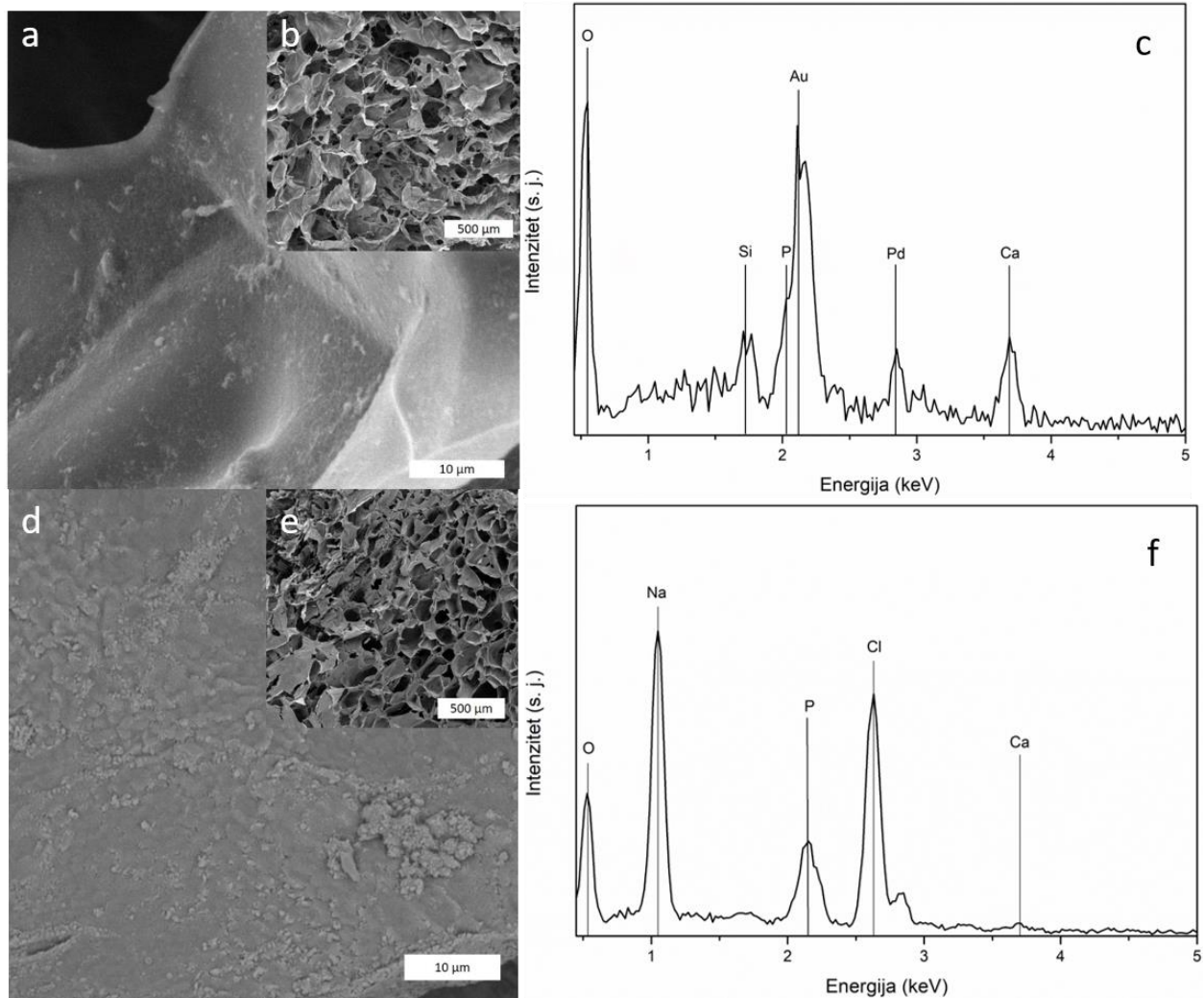
Slika 17. Difraktogrami kompozitnih CHT/HAp okosnica nakon inkubacije u HBSS otopini. (o) označava maksimum kitozana; (*) označava maksimume CaP faze.

4.5. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM) i energetska disperzivna rendgenska analiza (EDS)

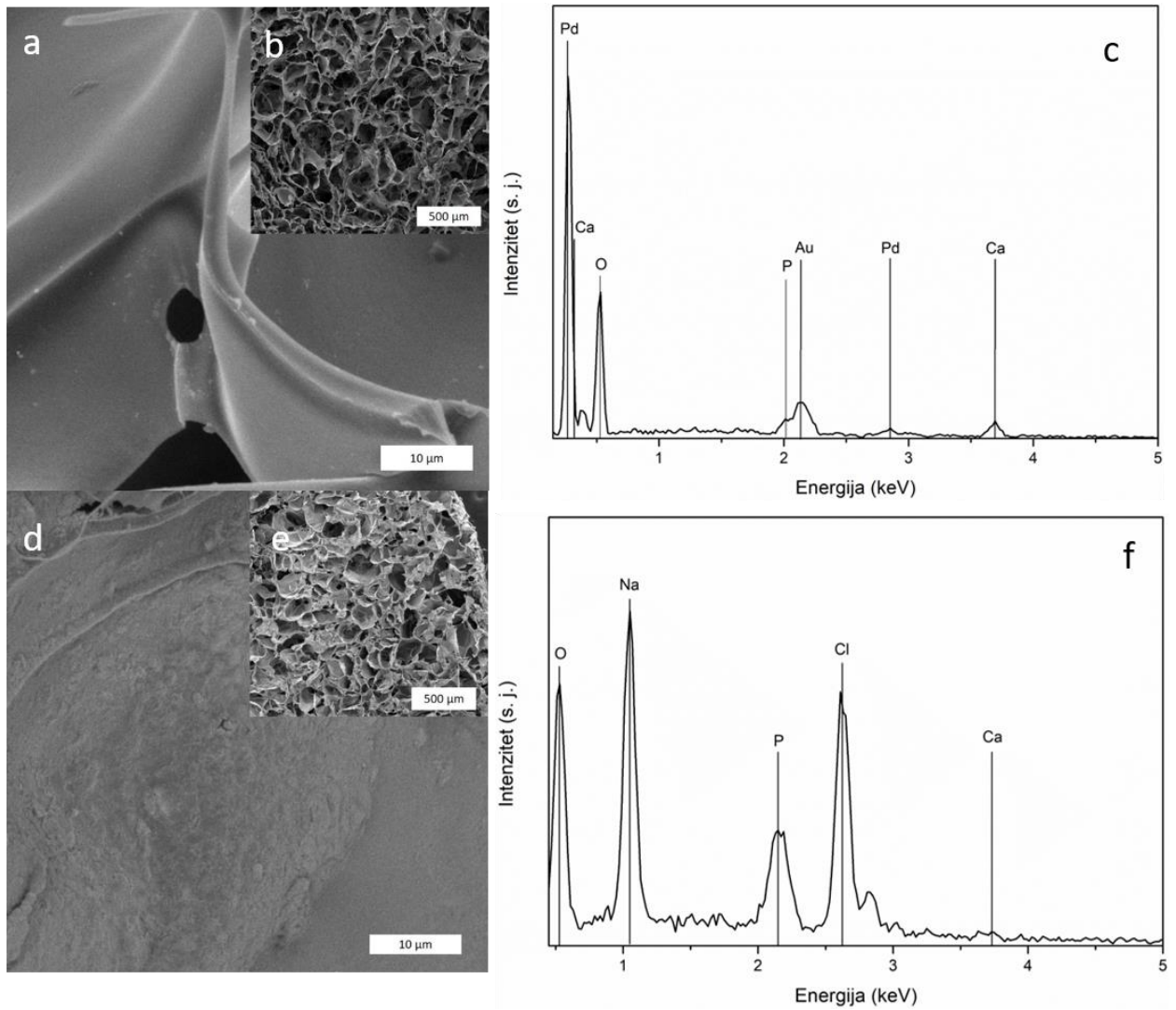
Morfologija pripremljenih kompozitnih okosnica prije i nakon inkubacije u HBSS otopini dana je na slikama 18. – 24. uz elementarni sastav prikazan EDS spektrima.



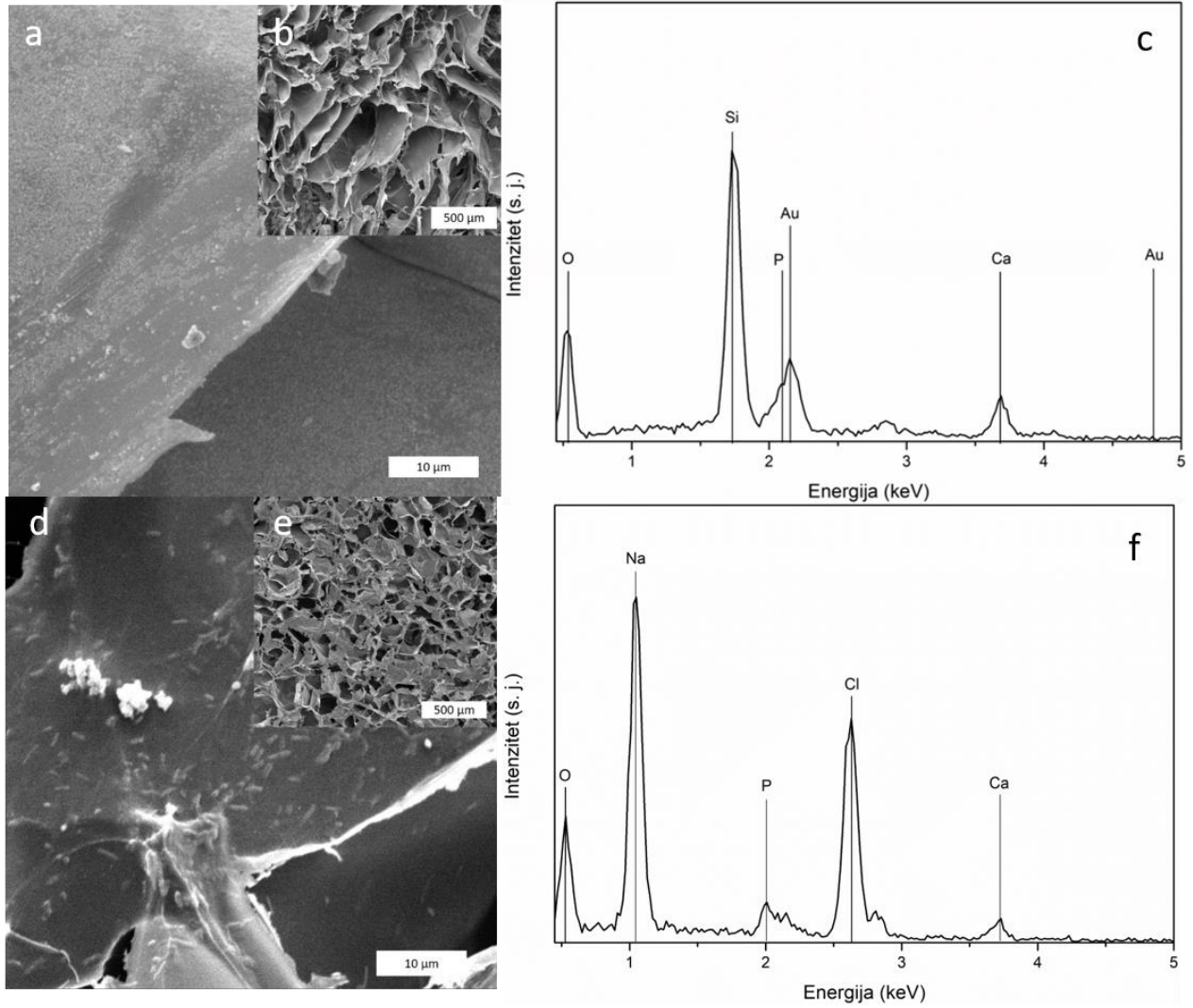
Slika 18. SEM mikrografije i EDS spektar okosnice kitozana (CHT): (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



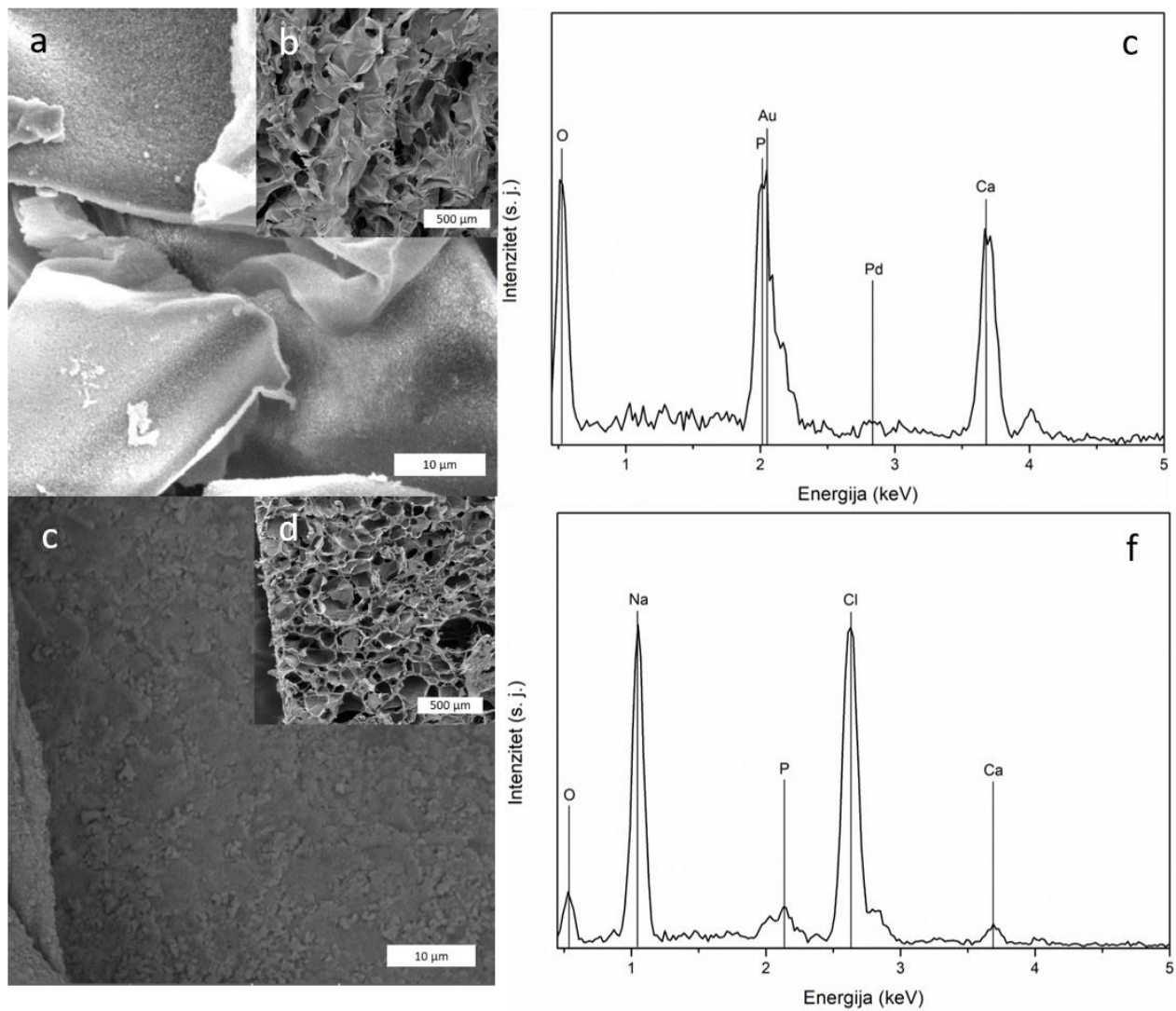
Slika 19 . SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/BG 90/10 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



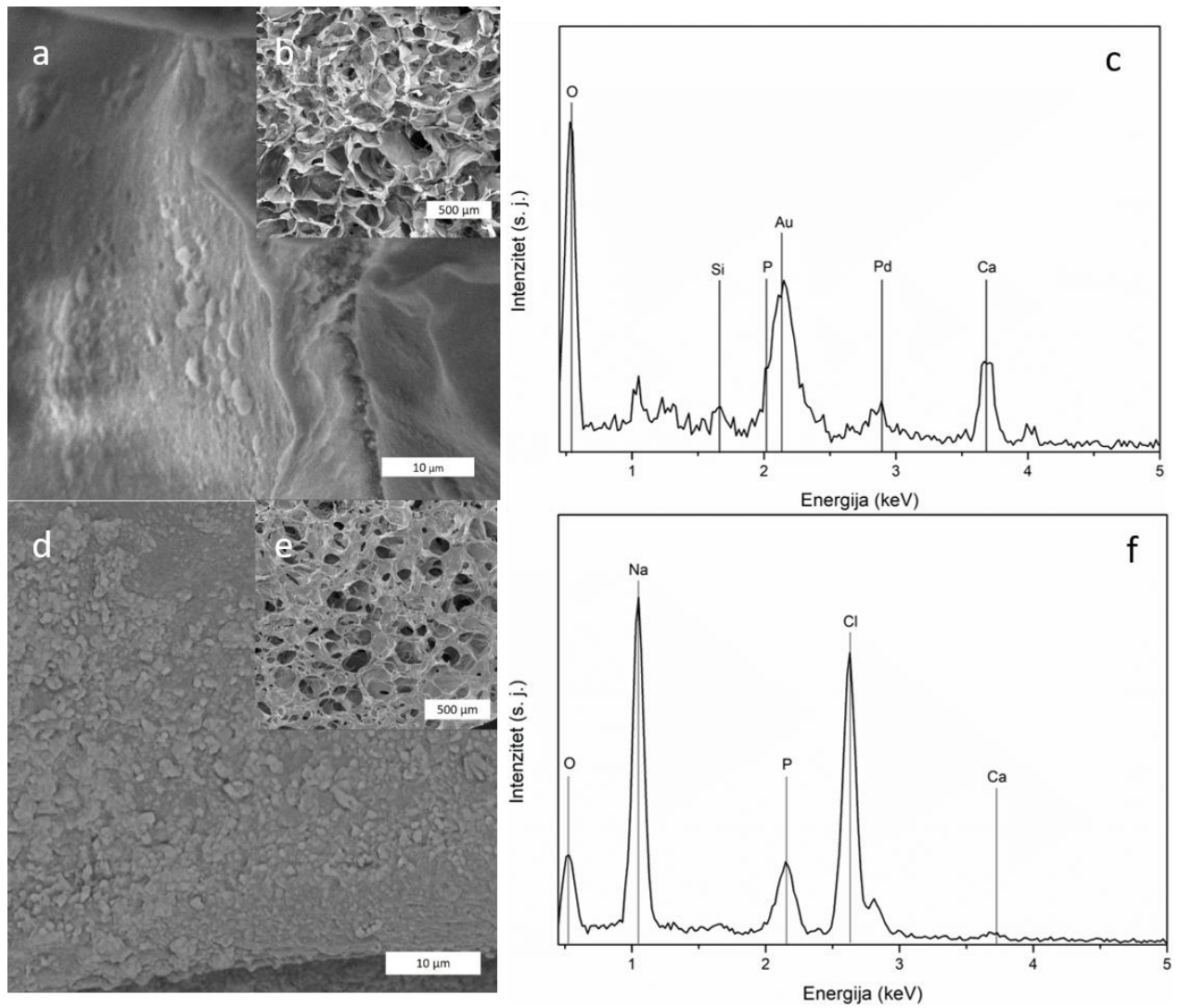
Slika 20. SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/HAp 90/10 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



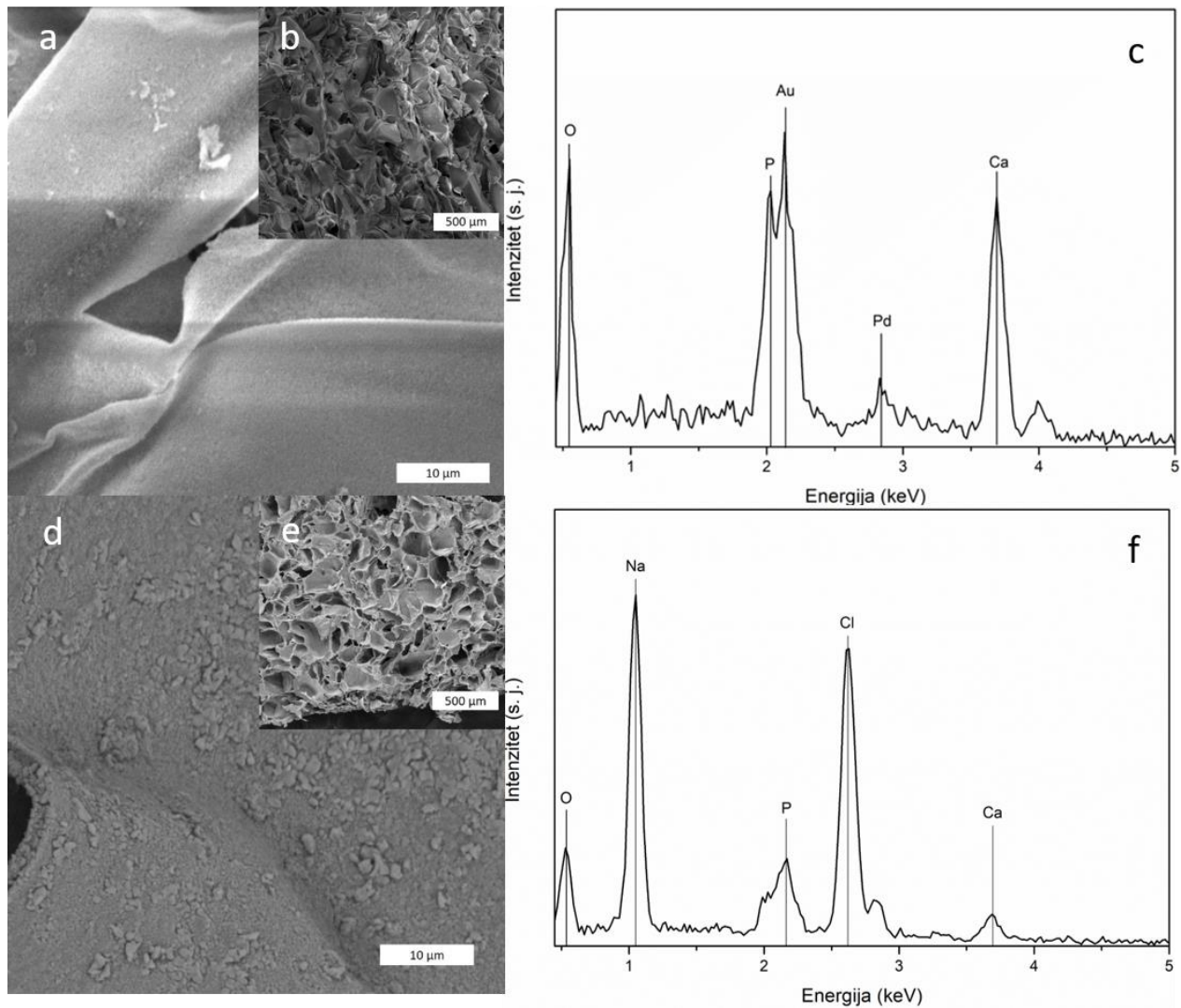
Slika 21 . SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/BG 80/20 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



Slika 22. SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/HAp 80/20 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



Slika 23. SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/BG 70/30 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.



Slika 24. SEM mikrografije i EDS spektar kompozitne CHT/HAp 70/30 okosnice: (a, b, c) prije inkubacije; (d, e, f) nakon inkubacije u HBSS otopini.

5. RASPRAVA

Cilj ovog rada bio je pripremiti visokoporozne kompozitne okosnice na temelju kitozana i različite bioaktivne keramike (bioaktivnog stakla i hidroksiapatita) te istražiti njihova fizikalna i biološka svojstva. Nadalje, kompozitne okosnice pripravljene su kako bi imitirale sastav i strukturu prirodne kosti te bile primjenjive za uzgoj tkiva.

Vrijednosti procijenjene poroznosti kompozitnih okosnica ukazuje na uspješnu pripremu visokoporoznog materijala metodom toplinski inducirane fazne separacije uz sublimaciju. Svi ispitani materijali pokazuju vrijednosti iznad 95 % bez značajnih promjena poroznosti dodatkom biokeramike, čak i pri većem udjelu bioaktivne keramike. Nadalje, vidljivo je da vrsta biokeramike nije utjecala na pripremu visokoporoznog kompozitnog materijala. Visoka poroznost jedan je od glavnih uvjeta koje biomaterijal mora ispuniti za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Biorazgradljive porozne strukture omogućuju prijenos hranjivih tvari i metaboličkih otpada stanica te lakšu neovaskularizaciju (stvaranje novog krvožilnog sustava) i osteointegriranje u okolno tkivo (strukturno povezivanje površine nadomjestka i prirodne kosti) [40].

Jedan od glavnih čimbenika koji utječe na biokompatibilnost potencijalnih nadomjestaka je svojstvo bubrenja, tj. količina apsorbirane vode koja utječe na fizikalno-kemijska svojstva biomaterijala. Kitozan ima veliku sposobnost bubrenja u vodenim otopinama zbog svoje prirode hidrogela. Svi pripremljeni materijali pokazali su veliku sposobnost apsorpcije medija s kapacitetom bubrenja između 5900 i 7400 %. Visoke vrijednosti stupnja bubrenja upućuju na sposobnost poroznih okosnica da apsorbiraju i zadržavaju masu vode veću od vlastite, a visoke vrijednosti stupnja bubrenja biomaterijala važne su zbog migracije stanica i difuzije hranjivih tvari [41]. Prema rezultatima je vidljivo da nema značajnih razlika u kapacitetu bubrenja s obzirom na vrstu biokeramike te njihov udio. Iznimka je prisutna kod kompozitne okosnice CHT/BG 90/10 u odnosu na okosnicu kitozana, pri čemu je vidljiv pad kapaciteta bubrenja. Osim kitozanske prirode hidrogela, visoki kapacitet bubrenja proizlazi iz visoke poroznosti. Iako sve okosnice pokazuju visoku poroznost, razlika u kapacitetu bubrenja između ove dvije okosnice bi mogla biti zbog različite mikrostrukture, odnosno veličine i povezanosti pora.

FTIR spektar bioaktivnog stakla sintetiziranog sol-gel postupkom pokazao je karakteristične vrpce: vrpca na 473 cm^{-1} karakteristična za asimetrično istezanje O–P–O veze,

vrpce u području valnih brojeva 950 – 1100 cm^{-1} karakteristične za asimetrično stezanje Si–O–Si veze, vrpca na 800 cm^{-1} koja odgovara vibraciji Si–O veze [34]. Kitozanska okosnica pokazuje karakteristične apsorpcijske vrpce između 3100 i 3550 cm^{-1} s najvišim maksimumom na 3260 cm^{-1} što odgovara preklapanju vrpce karakterističnih za –OH i –NH vibracije. Vrpca na 2870 cm^{-1} pripisuje se savijanju –CH₂, dok su vrpce u rasponu valnih brojeva 890 – 1150 cm^{-1} karakteristične za vibracije istezanja C–O [42, 43]. Nadalje, apsorpcijske vrpce vidljive na 1652, 1580 i 1415 cm^{-1} pripisuju se redom amid I (C=O veza), amino (–NH₂ iz primarnog amina) i amid II (–NH veza) kitozana. Kod kompozitnih CHT/BG okosnica uočene su apsorpcijske vrpce karakteristične za bioaktivno staklo i kitozan, no uočava se vrpca na 560 cm^{-1} karakteristična za PO₄³⁻ skupinu iz kalcijevih fosfata. Pretpostavlja se da tijekom pripreme kompozitnih CHT/BG okosnica dolazi do taloženja kalcijevih fosfata uslijed otapanja bioaktivnog stakla [40].

FTIR spektar hidroksiapatita sintetiziranog metodom precipitacije pokazuje apsorpcijske vrpce u rasponu valnih brojeva 560 – 600 cm^{-1} i 960 – 1100 cm^{-1} karakterističnih za P–O veze u PO₄³⁻ skupini te vrpce pri 870 i 1415 – 1440 cm^{-1} karakteristične za CO₃²⁻ skupinu što može ukazati na stvaranje karbonatnog hidroksiapatita, odnosno hidroksiapatitne strukture s B-tipom supstitucije karbonatnih iona na mjestu fosfatnih [21]. Vrpca pri 1645 cm^{-1} te široka vrpca u valnom području 3600 – 3000 cm^{-1} karakteristične za H–O–H i –OH vezu se pripisuju fizikalno vezanoj vodi. FTIR spektri kompozitnih CHT/HAp okosnica pokazuju vrpce karakteristične za kitozan te vrpce karakteristične za P–O veza u području valnih brojeva 560 – 600 cm^{-1} koje odgovaraju hidroksiapatitu.

Rendgenskom difrakcijskom analizom određen je mineraloški sastav pripremljenih materijala, odnosno identificirane su anorganske faze pripravljene sol-gel postupkom i metodom precipitacije. Na slikama 12. i 13. prikazani su difraktogrami bioaktivnog stakla i kompozitnih CHT/BG okosnica. Difraktogram sintetiziranog bioaktivnog stakla pokazuje široki difrakcijski maksimum koji ukazuje na pristutnost amorfne faze te difrakcijski maksimum na $2\theta = 31,75^\circ$ koji odgovara kalcijevom silikatu (Ca₂SiO₄) prema ICDD standardu 01-083-0464. Također, difraktogram je uspoređen je s ICDD standardom bioaktivnog stakla, kartica 01-075-1687, te je vidljivo da se difraktogrami ne preklapaju. Razlog tomu je što je u ovom radu rađena modifikacija sinteze u svrhu dobivanja amorfne strukture prema istraživanju Rad i sur. [44]. Difraktogrami kompozitnih CHT/BG okosnica pokazuju široki difrakcijski maksimum na $2\theta \sim 20^\circ$, koji je

karakterističan za semi-kristaličan kitozan [45]. Osim kitozana, vidljiva je prisutnost kalcijeva karbonata (ICDD 86-174, CaCO_3), koji je rezultat pripreve visokoporoznih okosnica. Tijekom postupka neutralizacije okosnica u vodenoj otopini natrijeve lužine dolazi do reakcije lužine s bioaktivnim staklom pri čemu se dobiva kalcijev karbonat [46, 47, 48]. Prisutnost kalcijevog karbonata ne predstavlja problem za primjenu ovakvih okosnica.

Na slikama 14. i 15. prikazani su difraktogrami hidroksiapatita sintetiziranog metodom precipitacije te kompozitnih CHT/HAp okosnica. Usporedba difraktograma s ICDD standardom za hidroksiapatit (ICDD kartica 9-432) ukazuje na uspješnu sintezu fino kristaličnog hidroksiapatita [49], dok difraktogrami kompozitnih okosnica ukazuju na superpoziciju maksimuma karakteristignog za kitozan i HAp.

Difraktogrami kompozitnih CHT/BG i CHT/HAp okosnica nakon ispitivanja *in vitro* prikazani su na slikama 16. i 17. XRD analiza nakon inkubacije u HBSS-u provedena je u svrhu utvrđivanja kristalizacije kalcijevih fosfata čime se ukazuje na bioaktivnost ispitivanog materijala. Vidljivo je da CHT/BG okosnice pokazuju pojavu anorganske faze vidljive pri većem udjelu bioaktivnog stakla. Pri nižim udjelima biostakla, vidljiv je novi široki maksimum na $2\theta \sim 33^\circ$ slabog intenziteta koji bi mogao odgovarati novonastaloj kalcij-fosfatnoj fazi. Povećanjem udjela biostakla, vidljiv je porast intenziteta difrakcijskog maksimuma te pojava novog difrakcijskog maksimum na $2\theta \sim 26^\circ$ za CHT/BG 70/30 što bi ukazivalo na taloženje hidroksiapatita na površini okosnice, tj. na bioaktivnost materijala. Također, može se zaključiti da prisutnost većeg udjela biostakla pogoduje bržem taloženju kalcij-fosfatne faze. Nasuprot tome, CHT/HAp okosnice pokazale su kalcij-fosfatnu fazu koja je već prisutna u netretiranim uzorcima, pa je utvrđivanje novo istaloženog hidroksiapatita iz HBSS otopine otežano. Tijekom inkubacije u HBSS otopini dolazi do konstantnih procesa otapanja i taloženja kalcij-fosfatnih faza te nije moguće identificirati XRD analizom. Međutim, pretražnom elektronskom mikroskopijom moguće je istražiti taloženje kristala na površini materijala.

SEM mikrografije kompozitnih CHT/BG i CHT/HAp okosnica (slike 18. – 24.) ukazuju na visokoporoznu strukturu s međusobno povezanim porama nepravilnih oblika te široku raspodjelu veličina pora. Procijenjene veličine pora su u rasponu od 200 do 400 μm te su optimalne za osteoprovodnost i obnovu tkiva [22, 23]. Nadalje, vidljiva je dobra dispergiranoost anorganske faze unutar matrice kitozana. Različiti udio biokeramike nije uzrokovao značajne promjene u

mikrostrukturi okosnica te je i dalje zadržana međusobna povezanost pora koja je ključna za uzgoj tkiva. SEM mikrografije kompozitnih okosnica nakon ispitivanja u HBSS otopini pokazale su istaložene aglomerate na površini okosnice koji bi odgovarali kalcijevim fosfatima. Također, istaloženi aglomerati jasnije su vidljivi kod kompozitnih okosnica s većim udjelom biokeramike, što je u skladu s XRD analizom. EDS analiza uzoraka nakon inkubacije u HBSS otopini ukazala je i na prisutnost natrija i klora koji bi odgovarali mineralu halitu čije je taloženje očekivano zbog sastava HBSS otopine. S obzirom na jake difrakcijske maksimume halita, tretirane okosnice su isprane prije XRD analize.

6. ZAKLJUČAK

- U ovom radu istražena su fizikalna i biološka svojstva visokoporoznih kompozitnih okosnica na temelju bioragradljivog polimera kitozana, bioaktivnog stakla i hidroksiapatita.
- Toplinski inducirana fazna separacija uz sublimaciju pokazala se adekvatnom metodom za pripremu visokoporoznih okosnica s procijenjenim vrijednostima poroznosti iznad 95%. Dodatak biokeramike nije značajno utjecao na procijenjenu poroznost kompozitnih okosnica.
- Kapacitet bubrenja kompozitnih okosnica ukazao je na sposobnost apsorpcije velike količine medija uz zadržavanje stabilne strukture okosnica. Također, svojstvo bubrenja kompozitnih okosnica nije značajno promijenjeno dodatkom bioaktivnog stakla i hidroksiapatita.
- FTIR spektroskopija i XRD analiza ukazale su na uspješnu sintezu bioaktivnog stakla sol-gel postupkom te hidroksiapatita metodom precipitacije. Nadalje, priprema kompozitnih kitozan/biostaklo okosnica ukazala je na pojavu dodatnih faza, kalcijevih fosfata i kalcita uslijed procesa neutralizacije okosnica. Nasuprot tome, kompozitne okosnice kitozan/hidroksiapatit nisu pokazale stvaranje dodatnih faza.
- Pretražna elektronska mikroskopija pokazala je visokoporoznu strukturu okosnica s međusobno povezanim porama procijenjene veličine pora između 200 i 400 μm . Nadalje, dodatak biokeramike nije značajno utjecao na mikrostrukturu kompozitnih okosnica.
- Ispitivanja *in vitro* u simuliranoj tjelesnoj tekućini pokazala su taloženje kalcij-fosfatne faze na površini kompozitnih okosnica pri čemu se može zaključiti da su oba kompozita bioaktivna.

Zaključno, pripravljene kompozitne okosnice pokazale su zadovoljavajući sastav, strukturu i svojstva za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Daljnja istraživanja biorazgradnje i citotoksičnosti nužna su za utvrđivanje kompatibilnosti okosnica za uzgoj stanica.

7. ZAHVALE

Istraživanja rada provedena su u okviru projekta „Pametni sustavi za dostavu lijeka pri liječenju tumora kosti“ (Projekt SmartCar, UIP-2020-02-6201, voditeljica projekta: doc. dr. sc. Anamarija Rogina) koji je financiran od Hrvatske zaklade za znanost.

Prvenstveno želimo zahvaliti mentorici doc. dr. sc. Anamariji Rogini i asistentu Luki Dornjaku, mag. chem. na pruženoj prilici, mnoštvu savjeta i ohrabrenja te ugodnoj radnoj atmosferi. Također, hvala na izdvojenom vremenu, strpljenju i trudu uložanima u ovo istraživanje.

Zahvaljujemo kolegama na Zavodu za anorgansku kemijsku tehnologiju i nemetale koji su također radnu atmosferu činili ugodnom te uvijek priskočili u pomoć kada je trebalo.

Zahvaljujemo prijateljima i obiteljima koji su nas podržavali i bodrili, kako tijekom ovog istraživanja, tako i tijekom cijelog našeg studentskog obrazovanja.

8. POPIS LITERATURE

- [1] Santin, M., Bone tissue engineering, *Bone Repair Biomaterials* (2009) 378-422.
- [2] Chen, Q., Lianga, S., Thouasb, G. A., Elastomeric biomaterials for tissue engineering, *Progress in Polymer Science*, 38 (2013) 584-671.
- [3] Manzini, B. M., Machado, L. M. R., Noritomi, P. Y., da Silva, J. V. L., Advances in Bone tissue engineering: A fundamental review, *Journal of Biosciences* (2021), 46(1)
- [4] Beus, N., Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [5] Liu, Y., Luo, D., Wang, T., Hierarchical Structures of Bone and Bioinspired Bone Tissue Engineering, *Small* (2016), 12(34), 4611-4632.
- [6] Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia*, 9 (2013) 7591-7621.
- [7] Posarić, M., Diplomski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
- [8] Raghavendra, G. M., Varaprasad, K., Jayaramudu, T., Biomaterials: Design, Development and Biomedical Applications, Thomas, S., Grohens, Y., Ninan, N., *Nanotechnology Applications for Tissue Engineering*, Amsterdam, Elsevier Inc, (2015) 21-44.
- [9] Bauer, S., Schmuki, P., Von der Mark, K., Park, J., Engineering biocompatible impact surfaces, Part 1: Materials and Surfaces, *Progress in Materials Science*, 58 (2018) 261 – 326.
- [10] Hudecki, A., Kiryczynski, G., Los, M. J., Biomaterials, Definition, Overview, Los, M. J., Hudecki, A., *Stem Cells and Biomaterials for Regenerative Medicine*, Amsterdam, Elsevier Inc, (2019) 87-98.
- [11] <https://www.wv.tf.fau.eu/2020/02/27/bioactive-glasses-skin-wounds/> (pristup 13. travnja 2023.)
- [12] Razum, M., Biostaklo – od sinteze do primjene, Prirodoslovno-matematički fakultet
- [13] Bains, F., Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine, *Ceramics International* (2018) 14953-14966, 44(13)

- [14] Jones, R. J., Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomaterialia* 9 (2013) 4457-4486.
- [15] Farooq, I., Ali, S., Khan, E., Hill, R. G., Bioactive glasses – structure and applications, *Advanced Dental Biomaterials*, (2019) 453-476.
- [16] Fernandes, H. R., Gaddam, A., Rebelo, A., Brazete, D., Stan, G. E., Ferreira, J. M. F., Bioactive Glasses and Glass-Ceramics for Healthcare Applications in Bone Regeneration and Tissue Engineering, *Materials* (2018)], 11(12), 2530
- [17] Nandi, S. K., Mahato, A., Kundu, B., Mukherjee, P., Doped Bioactive Glass Materials in Bone Regeneration, *Advanced Techniques in Bone Regeneration* (2016)
- [18] Fitzgerald, V., Pickup, D., Greenspan, G., Sarak, G., Fitzgerald, J., Wetherall, K., Moss, R. J. J., Newport, R., A neutron and X-ray diffraction study of bioglass with reverse Monte Carlo modelling, *Adv. Funct. Mater* (2007), 17, 3746-3753.
- [19] Filip, D., G., Surdu, V.-A., Paduraru, A., V., Andronescu, E., Current Development in Biomaterials – Hydroxyapatite and Bioglass for Applications in Biomedical Field: A Review, *Journal of Functional Biomaterials* (2022) 13, 248
- [20] Orlić, S., Ivanković, H., Tkalčec, E., Preparation of highly porous hydroxyapatite ceramics from cuttlefish bone, 11. Conference on Materials, Processes, Friction and Wear (2006).
- [21] Li, T-T., Zhang, Y., Ren, H-T., Peng, H-K., Lou, C-W., Lin, J-H., Two-step strategy for constructing hierarchical pore structured chitosan-hydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Carbohydrate Polymers* 260 (2021) 117765
- [22] Song, P., Zhou, C., Fan, H., Zhang, B., Pei, X., Fan, Y., I sur., Novel 3D porous biocomposite scaffolds fabricated by fused deposition modeling and gas foaming combined technology, *Composites Part B: Engineering* (2018), 152, 151–159.
- [23] Wang, M., Favi, P., Cheng, X., Golshan, N. H., Ziemer, K. S., Keidar, M., i sur., Cold atmospheric plasma (CAP) surface nanomodified 3D printed polylactic acid (PLA) scaffolds for bone regeneration, *Acta Biomaterialia* (2016)

- [24] Dorozhkin, S. V., Functionalized calcium orthophosphates (CaPO₄) and their biomedical applications, *Journal of Materials Chemistry B*, 7 (2019) 7471-7489.
- [25] Dorozhkin, S. V., Calcium – orthophosphate – based bioactive ceramics, Thomas, S., Balakrishnan, P., Sreekala, M. S., *Fundamental Biomaterials: Ceramics*, Amsterdam, Elsevier Ltd., (2018) 297-405.
- [26] Narayanan, R., Seshadri, S. K., Kwon, T. Y., Kim, K. H., Calcium Phosphate – Based Coatings on Titanium and its Alloys, *Journal of Biomedical Materials Research B: Applied Biomaterials* 85B (2008) 279-299.
- [27] Rujitanapanich, S., Kumpapan, P., Wanjanoi, P., Synthesis of Hydroxyapatite from Oyster Shell via Precipitation, *Energy Procedia*, 54 (2014) 112-117.
- [28] Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal*, 49 (4) (2013) 780-792.
- [29] Saini, M., Singh, Y., Arora, P., Arora, V., Jain, K., *Implant Biomaterials: A comprehensive review*, *World Journal of Clinical Cases*, 3(1) (2015) 52-57.
- [30] Venkatesan J., Ryu B., Sudha P.N., Kim S-K., Preparation and characterization of carbon nanotube scaffolds for bone tissue engineering, *International Journal of Biological Macromolecules*, Elsevier, 50 (2012) 393-402.
- [31] Costa-Pinto A.R., Reis R.L., Neves N.M., *Scaffolds Based Bone Tissue Engineering: The Role of Chitosan*, *Tissue Engineering*, 17 (2011) 331-347.
- [32] Martinac, A., Filipović-Grčić, J.: Kitozan - biopolimer 21. stoljeća, *Farm. Glas.* 58, 1/2002
- [33] Sami El-banna, F., Mahfouz, M. E., Leporatti, S., El-Kemary, M., A. N. Hanafy, N., Chitosan as a Natural Copolymer with Unique Properties for the Development of Hydrogels, *Applied Sciences* 9(11) (2019) 2193
- [34] Boccaccini, A. R., Erol, M., Stark W. J., Mohn, D., Hong, Z., Mano, J. F., *Polymer/bioactive glass nanocomposites for biomedical applications: A review*, *Composites Science and Technology* 70 (2010) 1764-1776.
- [35] Cao W., Hench L.L., *Bioactive materials*, *Ceramics International*, 22 (1996), 493 – 507.

- [36] Narayan R., Colombo P., Advances in bioceramics and porous ceramics, John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, 60 (2009)
- [37] Kokubo, T., Takadama, H., How useful is SBF in predicting *in vivo* bone bioactivity), Biomaterials 27 (2006) 2907-2915.
- [38] <https://resources.rndsystems.com/pdfs/datasheets/B32150.pdf> (pristup 13. travnja 2023.)
- [39] Eslami, N., Mahmoodian, R., Hamdi, M., Khatir, N. M., Herliansyah, M. K., Rafieerad, A. R., Study the Synthesis, Characterization and Immersion of Dense and Porous Bovine Hydroxyapatite Structures in Hank's Balanced Salt Solution, JOM (2017), 69(4), 691-698.
- [40] Gentile, P., Mattioli-Belmonte, M., Chiono, V., Ferretti, C., Baino, F., Tonda-Turo, C., Vitale-Brovarone, C., Pashkuleva, I., Reis, L.R., Ciardelli, G., Bioactive glass/polymer composite scaffolds mimicking bone tissue, Society For Biomaterials, Wiley Periodicals 00A (2012)
- [41] Mohamed, K. R., El – Rashidy, Z. M., Salama, A. A., In vitro properties of nanohydroxyapatite/chitosan biocomposites, Ceramics International 37 (2011) 3265 – 3271.
- [42] Felfel, R. M., Gideon-Adeniyi, M. J., Hossain, K. M., Roberts, G. A. F., Grant, D. M., Structural, Mechanical and Swelling Characteristics of 3D Scaffolds from Chitosan-Agarose blends, Carbohydrate Polymers (2018)
- [43] Ca'diz, M., Maureira, M., Celhay, I., Cuadra, F., von Martens, A., Bionanocomposite scaffolds based on chitosan–gelatin and nanodimensional bioactive glass particles: In vitro properties and in vivo bone regeneration, Journal of Biomaterials Applications (0) 2018 1–9.
- [44] Rad, R. M., Alshemary, A. Z., Evis, Z., Keskin, D., Altunbaş, K., Tezcaner, A. A., Structural and Biological Assessment of Boron Doped Bioactive Glass Nanoparticles for Dental Tissue Applications, Ceramics International
- [45] Teng, S-H., Lee, E-J., Wang, P., Jun, S-H., Han, C-M., Kim, H-E., Functionally Gradient Chitosan/Hydroxyapatite Composite Scaffolds for Controlled Drug Release, Wiley Interscience, 151-744.
- [46] Faqhiri, H., Chitosan and silica bioactive glass 3D porous composite for tissue engineering, Master of Science Thesis, Tampere University of Technology

[47] Mozafari, M., Banijamali, S., Bairo, F., Kargozar, S., Hill, R. G., Calcium Carbonate: Adored and Ignored in Bioactivity Assessment, *Acta Biomaterialia* 91 (2019) 35- 47.

[48] Cerruti, M., Morterra, C., Carbonate Formation on Bioactive Glasses, *Langmuir* (2004), 20, 6382-6388.

[49] Kong, L., Gao, Y., Cao, W., Gong, Y., Zhao, N., Zhang, X., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite scaffolds, Wiley InterScience, 2005., 276-282.

9. SAŽETAK

Janina Roknić i Anja Turkalj

Utjecaj biokeramike na bioaktivnost okosnica kitozana za primjene u tkivnom inženjerstvu

Inženjerstvo koštanog tkiva pruža dobru alternativu za kirurške intervencije u slučaju ozljeda koštanih tkiva. Kako bi nadomjesti uspješno potaknuli rast novog tkiva, teži se razvoju biokompatibilnih i biorazgradljivih biomaterijala koji bi imitirali sastav, strukturu i mehanička svojstva tkiva. U ovom radu, pripravljene su kompozitne okosnice na temelju biorazgradljivog prirodnog polimera kitozana i biokeramike s ciljem imitacije sastava i strukture prirodne kosti. Bioaktivno staklo (biostaklo) i hidroksiapatit odabrane su kao bioaktivne komponente koje potiču biomineralizaciju *in vivo*. Toplinski inducirana fazna separacija uz sublimaciju korištena je za pripremu visokoporoznih okosnica s međusobno povezanim porama, čija mikrostruktura nije narušena dodatkom različitog udjela biokeramike. Pripravljene okosnice pokazale su veliki kapacitet bubrenja koji je nužan za transport hranjivih tvari i metaboličkog otpada tijekom uzgoja tkiva. Ispitivanja *in vitro* ukazala su na bioaktivnost okosnica kitozan/biostaklo i kitozan/hidroksiapatit, pri čemu veći udio biokeramike pogoduje bržem taloženju kalcij-fosfatne faze tijekom inkubacije u simuliranoj tjelesnoj tekućini.

Ključne riječi: inženjerstvo koštanog tkiva, kitozan, hidroksiapatit, bioaktivno staklo, okosnica.

10. SUMMARY

Janina Roknić i Anja Turkalj

Effect of bioceramics on bioactivity of chitosan scaffolds for tissue engineering application

Bone tissue engineering provides a good alternative to surgical interventions in case of bone tissue injuries. In order to stimulate neotissue growth, biodegradable and biocompatible biomaterials should mimic the composition, structure and mechanical properties of the tissue. In this work, composite scaffolds were prepared from biodegradable natural polymer chitosan and bioceramics in order to mimic the composition and structure of natural bone. Bioactive glass (bioglass) and hydroxyapatite were selected as bioactive components that promote biomineralization *in vivo*. Thermally induced phase separation with sublimation was used to prepare highly porous scaffolds with interconnected pores, which microstructure was maintained by the addition of bioceramics. The prepared scaffolds showed a high swelling capacity, which is necessary for the transport of nutrients and metabolic waste during tissue culture. *In vitro* assays indicated the bioactivity of the chitosan/bioglass and chitosan/hydroxyapatite scaffolds, where a larger amount of bioceramics favors faster deposition of the calcium-phosphate phase during incubation in a simulated body fluid.

Keywords: bone tissue engineering, chitosan, hydroxyapatite, bioactive glass, scaffold.

11. ŽIVOTOPIS

Anja Turkalj rođena je 11. siječnja 1998. godine u Bjelovaru. Preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala upisala je 2017. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. Stručnu praksu odradila je 2021. godine u Teva Api R&D, Pilot odjelu tvrtke Pliva Hrvatska d.o.o. u Zagrebu. Preddiplomski studij završava 2021. godine obranom Završnog rada pod mentorstvom doc.dr.sc. Jozefine Katić na Zavodu za elektrokemiju te stječe naziv akademske prvostupnice inženjerke kemijske inženjerke. Diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala upisala je 2021. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu.

Janina Roknić rođena je u Karlovcu 19. kolovoza 1998. godine. Završila je srednju školu Gimnaziju Karlovac, opći smjer, nakon čega 2017. godine upisuje preddiplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. 2021. godine, nakon stečenog akademskog naziva prvostupnice inženjerke kemijskog inženjerstva, upisuje diplomski studij Kemija i inženjerstvo materijala na FKIT-u. Stručnu praksu odradila je u Hrvatskom zavodu za javno zdravstvo u Zagrebu na Odjelu za kemiju voda. Prvo radno iskustvo u struci stekla je 2022. godine u Plivi/Tevi kao student tehničar u laboratoriju globalnih laboratorijskih servisa (GASL). Trenutno obavlja studentski posao u Plivi/Tevi (TAPI R&D, Pilot) u Zagrebu.