

Priprava i karakterizacija kompozitnog materijala od visokoporozne hidroksiapatitne keramike i kitozana

Žagar, Denis

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:151934>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Denis Žagar

**PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KOMPOZITNOG MATERIJALA
OD VISOKOPOROZNE HIDROKSIAPATITNE KERAMIKE I
KITOZANA**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

dr. sc. Dajana Milovac

dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, lipanj 2016.

Zahvaljujem mentoru prof.dr.sc. H. Ivankoviću na prihvaćenom mentorstvu i odobrenoj temi.

Također zahvaljujem asistentici dr.sc. Dajani Milovac na velikoj pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Emi Govorčin Bajsić sa Zavoda za polimerno inženjerstvo i organsku kemijsku tehnologiju na pomoći i ustupljenom TGA mjernom uređaju.

Zahvaljujem prof.dr.sc. Gordani Matijašić sa Zavoda za mehaničko i toplinsko procesno inženjerstvo na pomoći i ustupljenim uređajima za mjerenje viskoznosti i specifične površine.

Hvala mojoj obitelji, prijateljima i kolegama na podršci, razumijevanju i poticanju tijekom mog školovanja i studiranja.

Sadržaj

1. Uvod.....	1
2. Opći dio.....	2
2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva	2
2.2. Struktura kosti.....	2
2.3. Zahtjevi okosnica u inženjerstvu koštanog tkiva.....	4
2.4. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva	5
2.4.1. Biokeramika	5
2.4.2. Biorazgradivi polimeri	8
2.4.3. Kompozitni materijal hidroksiapatit/kitozan.....	11
3. Eksperimentalni dio	14
3.1. Sinteza hidroksiapatita.....	14
3.2. Priprava otopine kitozana	14
3.2.1. Određivanje viskoznosti otopine kitozana	14
3.3. Hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal	14
3.4. Karakterizacija materijala.....	16
3.4.1. Difuzna reflektirajuća spektroskopija s infracrvenim zračenjem (DRIFT).....	16
3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)	16
3.4.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)	16
3.4.4. Određivanje specifične površine i veličine nanopora	16
4. Rezultati i rasprava	17
4.1. Određivanje viskoznosti otopine kitozana.....	17
4.2. Difuzna reflektirajuća spektroskopija s infracrvenim zračenjem (DRIFT).....	18
4.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)	19
4.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM).....	20
4.5. Određivanje specifične površine i veličine nanopora.....	26
5. Zaključci	28
6. Literatura.....	29

Sažetak

Principi inženjerstva koštanog tkiva temelje se na razvoju 3D struktura, okosnica, koje služe kao predložak za adheziju i proliferaciju stanica, odnosno stvaranje novog koštanog tkiva. Ugrađena u tijelo, takva okosnica se povezuje s okolnim koštanim tkivom i na taj način obnavlja ili zamjenjuje oštećenu kost. Da bi oponašala prirodno koštano tkivo okosnica mora ispuniti niz zahtjeva, stoga je izuzetno važan odabir materijala okosnice te se kao rješenje, po uzoru na prirodnu kost, nameće primjena biorazgradivih polimera i hidroksiapatitne keramike. Kombinacija polimerne i keramičke faze kompozitnom materijalu daje novi spektar svojstava koja su bliže željenim svojstvima okosnice nego što to ima svaka faza pojedinačno.

U ovom radu pripremljeni su kompozitni materijali na temelju hidroksiapatita (HA) i biorazgradivog polimera kitozana (CS). Hidrotermalnom pretvorbom aragonita iz sipine kosti pri 200°C i 72 h sintetiziran je HA s potpuno očuvanom mikrostrukturom sipine kosti. Tehnikom vakuumske impregnacije dobiven je visokoporozni kompozitni materijal HA/CS1s i HA/CS4s. SEM mikrografija analiziranih kompozitnih uzoraka prikazuje lamelarnu strukturu HA prevučenu slojem kitozana nakon impregnacije 2%-tnom otopinom kitozana. Rezultati mjerenja DRIFT metodom ne pokazuju prisutnost karakterističnih vrpca kitozana u kompozitima zbog prekrivanja s karakterističnim vrpcama HA. TGA metodom potvrđena je prisutnost kitozana. U kompozitu HA/CS1s nađeno je 16 mas.%, a u kompozitu HA/CS4s 23 mas.% kitozana. BET metoda pokazuje da impregnirani film kitozana u kompozitnim uzorcima ima neznatan utjecaj na promjenu nanometarskih pora i specifičnu površinu u odnosu na čisti HA.

Ključne riječi: inženjerstvo tkiva, hidroksiapatit, kitozan, kompozit

Abstract

The main principle of bone tissue engineering is based on the development of a 3D structure, scaffold, which serves as a template for the adhesion and proliferation of cells and the formation of the new bone tissue. Ultimately, the scaffold bonds with the surrounding bone tissue, restoring or replacing the damaged bone. In order to mimic the natural bone tissue scaffold must fulfill a series of requirements. Therefore, it is extremely important to select an adequate material for the scaffold. Imitating the natural bone tissue using a biodegradable polymer and hydroxyapatite ceramics seems to be an appropriate approach. The combination of polymer and ceramic phase gives to composite material a new set of properties, which are closer to the desired properties of the scaffold for bone tissue regeneration.

In this work, a composite material based on hydroxyapatite (HA) and chitosan (CS) was prepared. HA was synthesized by the hydrothermal conversion of aragonitic cuttlefish bone at 200°C during 72 h with a fully preserved original microstructure. Next, a highly porous composite material HA/CS1s and HA/CS4s was obtained using the vacuum impregnation technique. SEM micrographs of the analyzed composite materials show the lamellar structure of HA coated with 2 w/v.% solution of chitosan. The results obtained by DRIFT method could not exactly confirm the presence of chitosan in the composites due to the overlapping of the specific bands of chitosan and HA. Thermogravimetric analysis showed that the HA/CS1s and HA/CS4s composites contain 16 wt.% and 23 wt.% of chitosan, respectively. The BET method showed that chitosan film impregnated into the composite samples has a minor effect on the size of the pores and specific surface area compared to pure HA.

Key words: tissue engineering, hydroxyapatite, chitosan, composite material

1. Uvod

U novije vrijeme, konvencionalni načini liječenja oštećenog koštanog tkiva putem tkiva donora ustupaju mjesto inženjerstvu koštanog tkiva koje objedinjuje područja inženjerskih i biomedicinskih znanosti s ciljem razvoja 3D okosnica/nadomjestaka koji mogu obnoviti, popraviti ili zamijeniti oštećeno koštano tkivo. Inženjerstvo koštanog tkiva razvija nadomjestke putem nasadivanja, rasta i diferencijacije stanica koje stvaraju novo tkivo na bioaktivnom, poroznom materijalu koji sa odgovarajućim fizikalnim, kemijskim, biološkim i mehaničkim svojstvima podržava obnavljanje oštećenog koštanog tkiva. Ključne odlike materijala koji se koristi u koštanom tkivnom inženjerstvu jesu biokompatibilnost, biorazgradivost, te odgovarajuća mehanička svojstva. Također, vrlo je važno da je materijal visokoporozan sa međusobno povezanim porama, čime se omogućuje vaskularizacija, integracija tkiva te protok hranjivih tvari i metaboličkih otpada.

Sve veće zanimanje u području razvoja materijala u inženjerstvu koštanog tkiva usmjereno je na organsko/anorganske kompozitne materijale koji imitiraju prirodnu kost. Naime, prirodno koštano tkivo predstavlja kompozit organske matrice, uglavnom kolagena, i neorganske mineralne faze, hidroksiapatita (HA, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$). Unatoč neodgovarajućim mehaničkim svojstvima visokoporoznog skeleta HA, njegova izrazita biokompatibilnost, posebice sintetiziranog iz bioloških sirovina, te bioaktivnost, tj. sposobnost da potakne specifični biološki odgovor organizma, čini ga vrlo prikladnim za regeneraciju koštanog tkiva. Druga grupa materijala koja se koristi u inženjerstvu koštanog tkiva jesu biorazgradivi polimerni materijali i to ponajviše zbog biokompatibilnosti, biorazgradivosti i odgovarajućih mehaničkih svojstava. Mogućnost kombiniranja svojstava biokeramike (HA, Bioglass, TCP) i biorazgradivih polimernih materijala koja podliježu zahtjevima inženjerstva koštanog tkiva navodi na daljnja istraživanja i razvoj ovih kompozitnih materijala. Prednost ovakvih materijala u odnosu na ostale koji se koriste za regeneraciju koštanog tkiva (metalni, keramički, kompozitni materijali koji nisu biorazgradivi) je ta što se nakon početne mehaničke stabilnosti kompozitnog skeleta, polimerna i keramička faza postepeno razgrađuje oslobađajući pritom mjesto novostvorenom koštanom tkivu, što znači da nakon potpune resorpcije kompozitne okosnice u organizmu ne zaostaje strano tijelo. Osim toga, polimerna faza može služiti kao nosač lijekova ili biomolekula kojima se dodatno povećava funkcionalnost i bioaktivnost okosnice.

2. Opći dio

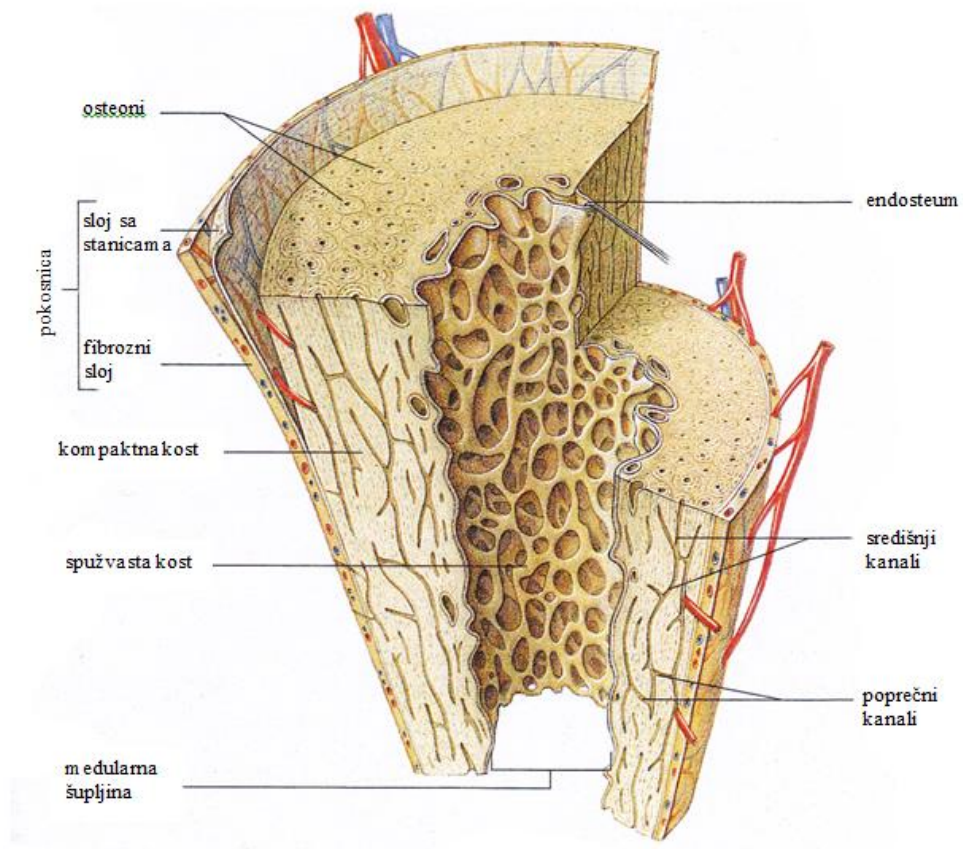
2.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Inženjerstvo tkiva je interdisciplinarno područje u kojem se primjenjuju principi inženjerstva, biologije, kemije, fizike i medicine da bi se razvili biološki nadomjesci koji obnavljaju, održavaju i poboljšavaju funkciju tkiva [1]. Glavna ideja inženjerstva koštanog tkiva je razvoj okosnice (engl. scaffold) koja u kombinaciji sa živim koštanim stanicama i biološkim stimulansima ubrzava oporavak i regeneraciju oštećenog koštanog tkiva. Regeneracija tkiva može se uspostaviti *in vitro* i *in vivo* metodama. *In vivo* metoda uključuje izolaciju koštanih stanica, nasađivanje stanica na okosnicu i direktnu ugradnju u oštećeno tkivo pacijenta kako bi se potaknulo stvaranje novog tkiva *in situ*. *In vitro* uvjeti podrazumijevaju uzgoj koštanog tkiva u bioreaktoru, gdje se okosnice nasađuju s koštanim stanicama kojima se omogućuje kontrolirana ekspanzija i diferencijacija do konačnog stvaranja kosti. Nakon toga slijedi ugradnja okosnice u oštećeno tkivo pacijenta [2].

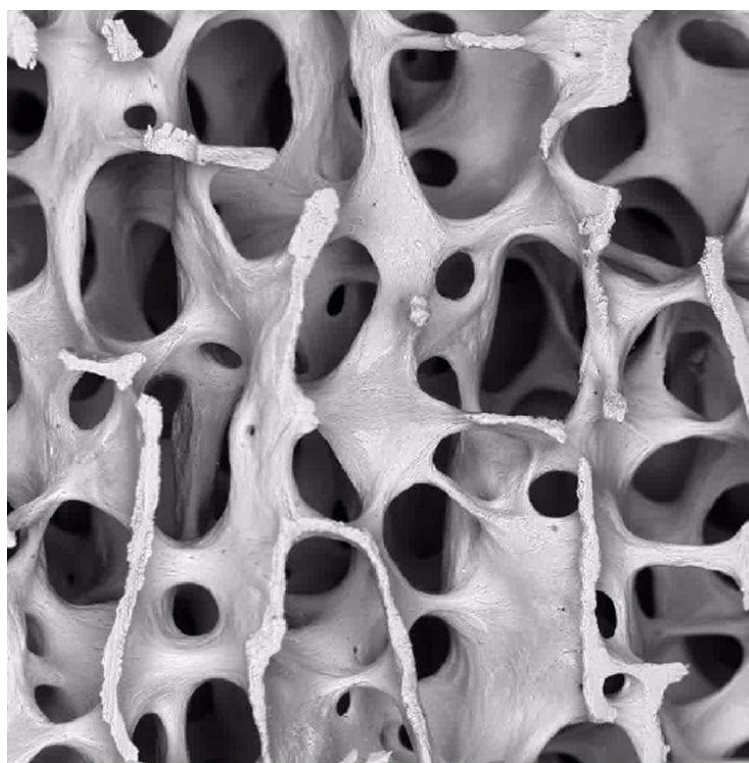
2.2. Struktura kosti

Glavne funkcije kosti u tijelu su potpora mekom tkivu, omogućavanje kretanja, prihvatite mišićima, zaštita unutarnjih organa, te rezervoar iona koji su neophodni za pravilno funkcioniranje metabolizma. Kost se sastoji od mineralne faze, kalcijeva fosfata u obliku karbonatnog hidroksiapatita, na koji otpada 2/3 mase kosti; organskog dijela, najvećim dijelom kolagenskih vlakana; i vode. Hidroksiapatitni pločati kristali, smješteni između kompaktno posloženih kolagenskih vlakana, kosti pružaju čvrstoću i tvrdoću, a kolagenska vlakna elastičnost i fleksibilnost [3].

Kost se može podijeliti na dva dijela, vanjski (kompaktni) i unutarnji (porozni) dio (Slika 1). Kompaktni dio kosti je vrlo čvrst i ima zaštitnu, strukturalnu i mehaničku ulogu. Sastoji se od mineraliziranih kolagenskih vlakana umotanih u koncentrične lamele oko središnjeg kanala kroz koji prolaze krvne žile. Nasuprot tome, unutarnji dio kosti, trabekularnu kost, karakterizira visoka poroznost između 30% i 90% odnosno velika specifična površina [3]. Sastoji se od međusobno povezanih šupljina, te služi kao kompenzator iznenadnih naprezanja, raspoređuje sile na zglob, pridodaje tlačnoj čvrstoći kosti, no primarna uloga trabekularne kosti je homeostaza kalcija.



Slika 1. Prikaz strukture kosti [4]



Slika 2. SEM mikrograf unutrašnjosti ljudske kosti [5]

2.3. Zahtjevi okosnica u inženjerstvu koštanog tkiva

Ideja inženjerstva koštanog tkiva je da okosnica pruži početnu 3D formu na kojoj stanice prijanjaju, rastu i stvaraju ekstracelularnu matricu, odnosno novu kost koja se integrira sa okolnim koštanim tkivom. S obzirom na vrlo kompleksan biološki sustav kao što je ljudska kost, skup zahtjeva koje okosnica mora zadovoljavati je prilično izazovan. Neki od osnovnih zahtjeva su:

- Biokompatibilnost

Biokompatibilnost podrazumijeva svojstvo materijala da bude prihvaćen od strane živog organizma u koji se ugrađuje, ne smije imati toksično, kancerogeno ili alergijsko djelovanje na živi organizam [6-9].

- Biorazgradivost

Razgradnja okosnica mora biti usklađena s rastom i razvojem koštanog tkiva, što znači kad se u potpunosti stvori novo koštano tkivo, okosnica mora biti u potpunosti razgrađena [9].

- Poroznost

Okosnice moraju imati otvorene i međusobno spojene pore, te veliku specifičnu površinu kako bi se omogućilo prijanjanje i pravilna raspodjela stanica unutar okosnice. Pore omogućavaju vaskularizaciju okosnice, prijenos kisika i hranjivih tvari do stanica kao i otpremanje metaboličkog otpada [10].

- Veličina pora

Veličina pora je vrlo važan faktor u dizajniranju okosnice. Neadekvatna veličina pora može dovesti do začepjenja pora uslijed stvaranja ekstracelularne matrice te tako onemogućiti razvoj koštanog tkiva. Opće je prihvaćeno da bi veličina pora trebala biti u rasponu od 200 μm do 900 μm [9,11,12].

- Mehanička svojstva

Okosnice ispitivane *in vitro* posjeduju čvrstoću koja podnosi hidrostatske tlakove medija u kojem se nalaze, te se zadržava poroznost potrebnu za rast stanica [8], no u realnim uvjetima na kost djeluju velika naprezanja. Zbog tih naprezanja čvrstoća okosnice bi trebala biti jednaka čvrstoći kosti kako bi bila funkcionalna i pogodna za rast tkiva [6-8].

- Bioaktivnost

Bioaktivan materijal ima svojstvo da tvori direktnu vezu sa živim tkivom što poboljšava obnavljanje i oporavak oštećenog tkiva.

- Svojstva površine

Kemijska i topografska svojstva površine utječu na adheziju i razmnožavanje stanica [13-15]. Istraživanja su pokazala da je razvoj ekstracelularne matrice bolji na hrapavoj nego na glatkoj površini materijala [16,17].

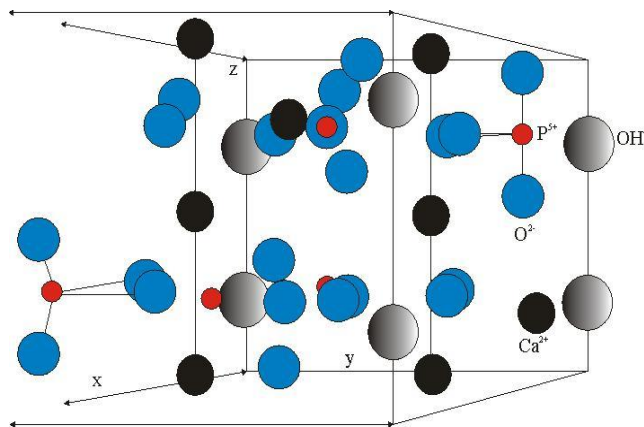
2.4. Materijali u inženjerstvu koštanog tkiva

Vrlo važan korak u dizajniranju okosnice je odabir materijala koji mora zadovoljavati niz zahtjeva potrebnih za razvoj novog koštanog tkiva. Materijali koji se koriste u inženjerstvu koštanih tkiva, odnosno biomaterijali, mogu se podijeliti u tri osnovne grupe: biokeramiku, biorazgradive polimere i kompozite.

2.4.1. Biokeramika

Najčešće korišteni biokeramički materijali, hidroksipatit i njemu slični kalcijevi fosfati, imaju izvrsnu biokompatibilnost uslijed velike kemijske sličnosti sa anorganskom komponentnom prirodne kosti. Bioaktivno svojstvo keramike čini keramičku okosnicu idealnom platformom za stvaranje novog dijela kosti pomoću zrelih osteoblasta koji su migrirali iz okolnog koštanog tkiva i izravno povezivanje biokeramike i novonastalog koštanog tkiva. U nekim slučajevima, bioaktivnost površine je takva da je nastanak kosti izazvan na površini stimulacijom stanične diferencijacije i aktivacije, fenomen znan pod nazivom osteoindukcija, koji se može događati u unutarkoštanim dijelovima [18].

Hidroksiapatit (HA) je kalcijev fosfat stehiometrijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, s molarnim omjerom $\text{Ca/P}=1,67$. Kristalna struktura hidroksiapatita može se opisati kao kompleksna heksagonska slagalina kisikovih atoma s metalima koji zauzimaju tetraedarske ili oktaedarske šupljine u slagalini.



Slika 3. Prikaz kristalne strukture hidroksiapatita

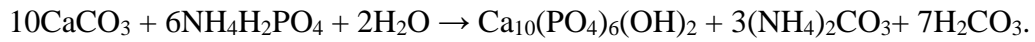
Kristalna struktura hidroksiapatita može prihvatiti druge ione kao supstituente. Te supstitucije se mogu odvijati na mjestima kalcijevih iona, fosfatnih ili hidroksilnih skupina. Ionske supstitucije mogu utjecati na parametre ćelije, kristalnu morfologiju, kristaliničnost, topivost i termalnu stabilnost hidroksiapatita. Kationski supstituenti najčešće se pojavljuju u područjima zauzetim kalcijevim atomima te uključuju natrij, magnezij, kalij, stroncij i mangan. U posljednje vrijeme, istraživanja su najviše usmjerena na sintetički karbonatni hidroksiapatit zbog toga što je karbonat najviše zastupljeni supstituent u koštanom mineralu. Postoje dva tipa karbonatne supstitucije navedene u literaturi, a to su supstitucija CO_3^{2-} skupina na mjesto OH^- skupina (tip A) i CO_3^{2-} skupina za PO_4^{3-} skupine (tip B). Karbonatni HA češće se formira oko implantanata velike gustoće u usporedbi s čistim hidroksiapatitom. Povećanoj bioaktivnosti karbonatnog hidroksiapatita pridonosi to što karbonatni hidroksiapatit ima veću topljivost [19].

2.4.1.1. Sinteza hidroksiapatita iz sipine kosti

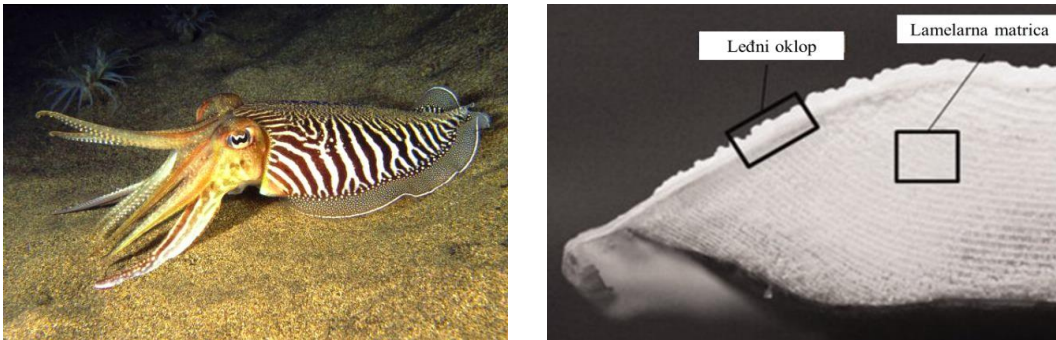
Uporaba bioloških struktura i materijala, poput koralja, morskih školjkaša, životinjskih skeleta i sličnog, u medicinske svrhe, motivirana je jednostavnim načinom pripreme HA i visokoporoznom strukturom spomenutih bioloških materijala. Nakon precipitacijske metode, koja se temelji na simultanom miješanju vodenih otopina kalcijevih i fosfatnih spojeva na $\text{pH} > 7$ ili dokapavanjem vodene otopine fosfata u vodenu otopinu kalcijeve soli, hidrotermalna sinteza je druga najkorištenija metoda za sintezu HA.

Hidrotermalna sinteza je postupak u kojem se odvijaju jednofazne ili višefazne reakcije u vodenom mediju pri povišenim temperaturama ($T > 25^\circ\text{C}$) i tlakovima ($p > 100 \text{ kPa}$) u cilju dobivanja kristalnog HA direktno iz otopine. Uspješnu sintezu HA iz anorganske komponente sipine kosti hidrotermalnom konverzijom proveli su Ivanković i suradnici [20]

utvrdivši da je aragonit u potpunosti moguće prevesti u AB-tip karbonatnog HA, a da se pritom potpuno očuva originalna mikrostrukura i arhitektura sipine kosti. Kao polazne komponente koristili su sipinu kost i amonijev dihidrogen fosfat, a reakcija hidrotermalne sinteze dana je jednadžbom:

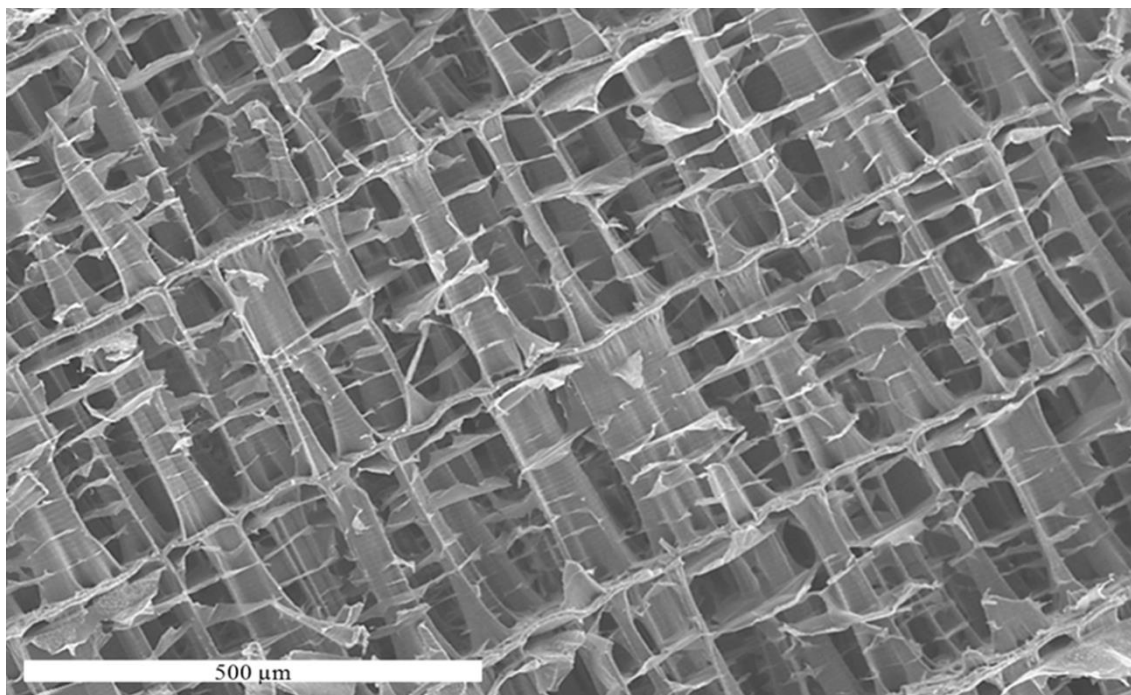


Sipa (*Sepia officinalis* L.) je morska životinja koja spada u red glavonožaca unutar koje se nalazi kost. Sipina kost ima izrazito poroznu strukturu (oko 90%) i zauzima 9% volumena sipe. Kost se sastoji od dva dijela: leđnog oklopa, plašta i unutarnje lamelarne matrice (Slika 4b). Lamele su međusobno odvojene potpornim stupićima (Slika 5).



Slika 4.a) Fotografija sipe u prirodnom okruženju

b) Uvećani prikaz sipine kosti koji prikazuje leđni oklop i lamelarnu matricu kosti



Slika 5. SEM mikrograf sirove sipine kosti s vidljivom organskom komponentom koja se nalazi između lamela i stupova kosti [2]

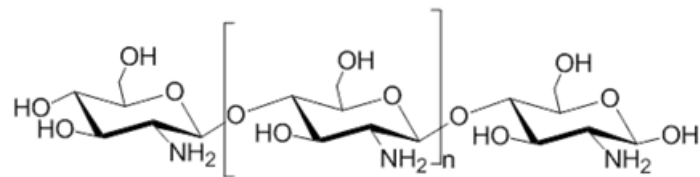
Lamele ili paralelni listovi izgrađeni su od aragonitne modifikacije kalcij karbonata (CaCO_3) te tvore odjeljke koji su međusobno izolirani. Unutar svakog odjeljka se nalazi tekućina ili plin koji se mogu slobodno kretati. Razmak između lamela je različit i uglavnom iznosi od 200 do 600 μm .

2.4.2. Biorazgradivi polimeri

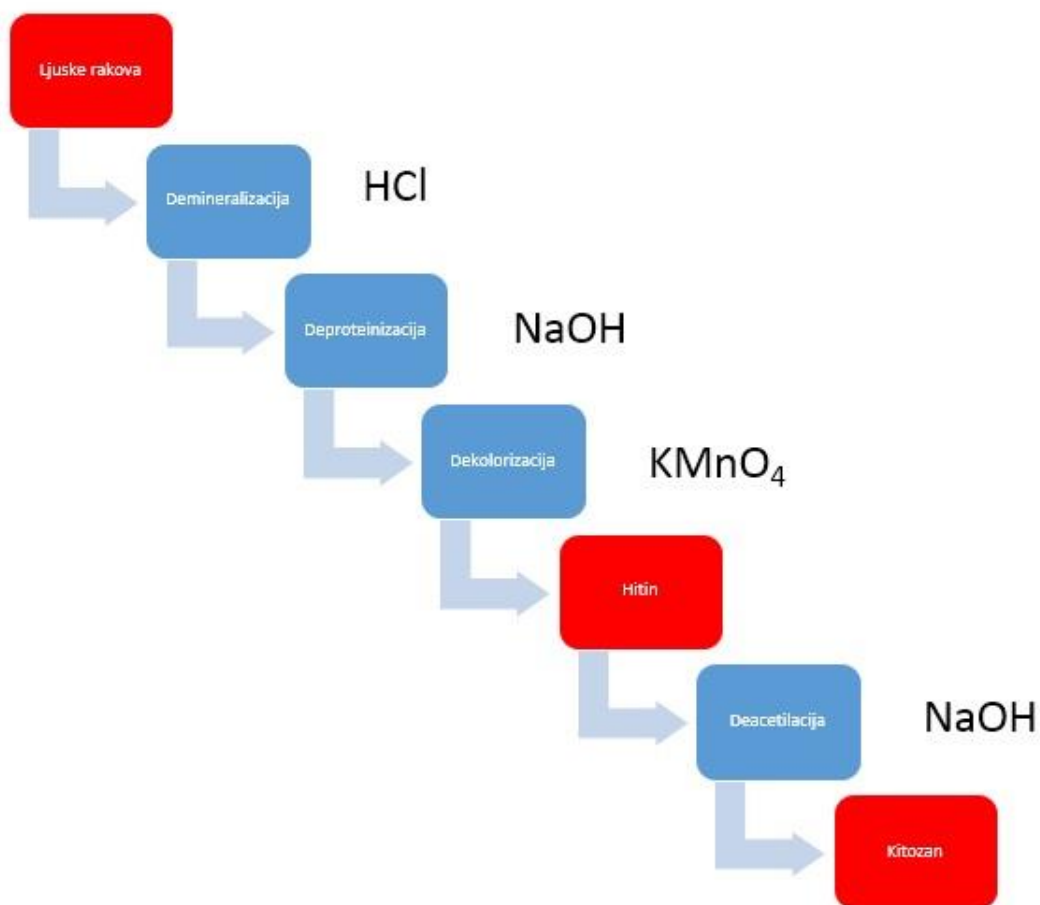
Drugu grupu materijala koji se koriste u inženjerstvu koštanog tkiva čine biorazgradivi sintetički polimeri (npr. PLA-polilaktidna kiselina, PGA-poliglikolna kiselina, i kopolimeri tipa PLGA- poli(laktid-ko-glikolidna) kiselina, ϵ -polikaprolakton (PCL) i dr.), te prirodni polimeri kao što su alginat, kitozan, kolagen i drugi. Biorazgradivi polimeri imaju prednost korištenja u medicini zbog toga što ih ljudski organizam metabolički razgrađuje te nije potrebno raditi dodatne kirurške zahvate vađenja materijala. U inženjerstvu koštanog tkiva njihov je cilj dati strukturalnu potporu kosti kao i potporu njezinoj ponovnoj izgradnji, te zbog tih svojstava su dobri kandidati za upotrebu u tom području. Također, mehanička svojstva svojstva tih polimera mogu se poboljšati dodavanjem punila ili ojačavala. Isto tako, čest je slučaj strukturalnog modificiranja tih polimera kopolimerizacijom. Za razliku od umjetnih polimera, polimeri iz prirodnih izvora su biološki aktivni i svojstvena im je dobra adhezija stanica i podržavanje njihovog rasta. Kako bi se nadišli poznati problemi polimernih

okosnica, kao što su nedovoljna čvrstoća, tvrdoća i nezadovoljavajuća struktura za uporabu u inženjerstvu koštanog tkiva, težište istraživanja prebačeno je na kompozite keramičkih materijala i polimera.

Kitozan je linearni, semikristalinični polisaharid sastavljen od 2-acetamido-2-deoksi- β -D-glukana i 2-amino-2-deoksi- β -D-glukana. Kitozan, u tom obliku, nije raširen u prirodi, te se dobiva parcijalnom deacetilacijom polimera hitina koji se nalazi u egzoskeletima rakova, škampi i jastoga, te se iz istih najčešće i dobiva. Također, u industriji, hitin se vrlo često dobiva i iz gljivičnih micela [21].

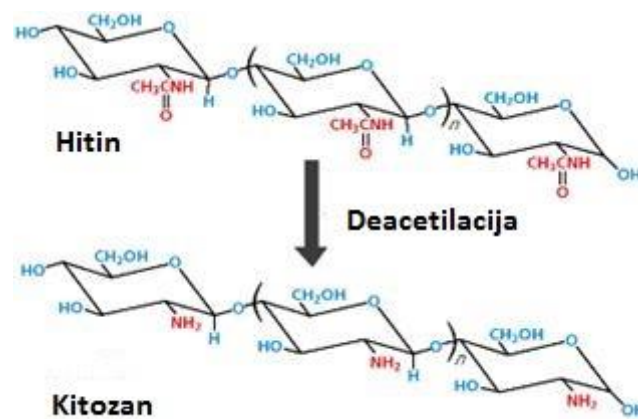


Slika 6. Kemijska struktura kitozana



Slika 7. Shematski prikaz kemijskog postupka dobivanja kitozana [22]

Stupanj deacetilacije kitozana se računa kao omjer D-glukoamina u odnosu na sumu D-glukoamina i N-acetil-D-glukoamina, odnosno prikazuje broj amino skupina u lancu. Da bi iz hitina nastao kitozan, stupanj deacetilacije treba biti barem 60%. Deacetilacija se provodi hidrolizom u alkalnom mediju ili uz pomoć enzima [23,24]. Tokom proizvodnje teško je predvidjeti svojstva kitozana jer on potječe od prirodnog polimera hitina, te može biti kontaminiran nečistoćama i imati široku polidisperznost, što jako utječe i na njegova svojstva kao otopine, te se zbog toga najčešće karakterizira prema viskoznosti otopine, a ne prema polidisperznosti. Kitozan je općenito slabo topljiv, osim u kiselim medijima što ga čini zahtjevnim za uporabu.



Slika 8. Deacetilacija hitina

Kitozan se od hitina razlikuje po prisutnosti amino skupina, te mu daje jedinstvena svojstva. Amino skupine D-glukoamina omogućavaju topljivost u kiselim medijima, te mu prema tome topljivost ovisi o pH otopine, odnosno nađeno je da se otapa u otopinama kojima je $\text{pH} < 6$ [25]. Kitozanova specifičnost je u tome da je jedini poznati pozitivno nabijeni polisaharid koji se pojavljuje u prirodi [26]. Amino i alkoholne skupine na lancu kitozana omogućuju ovom polisaharidu da tvori stabilne kovalentne veze s drugim skupinama. Kitozan pokazuje i druga intrinzična svojstva, kao što su antibakterijska, antifugalna i hemostatska, te biorazgradivost i biokompatibilnost, koja je vrlo važna za biomedicinsku primjenu.

2.4.2.1. Kitozan kao biomaterijal

Kitozan i njegovi derivati su vrlo istraživani za biomedicinsku primjenu kao što je zatvaranje rana, medij za dostavu lijekova, te za popunjavanje šupljina pri prijelomima kosti. Nađeno je da je kitozan vrlo pogodan za inženjerstvo tkiva zbog svoje polikationske prirode. Ta priroda povećava privlačenje stanica tom polimeru, a to privlačenje ovisi i o stupnju deacetilacije [27].

Dokazano je da kitozan ima ubrzavajuće djelovanje na zacjeljivanje i liječenje rana. Regenerirana vlakna hitina, spužve i filmovi kitozana ubrzavaju liječenje rana za 30% [28,29].

Kitozan može tvoriti čvrste, biokompatibilne filmove koji također vrlo dobro apsorbiraju vodu, te je zbog tih svojstava vrlo ozbiljan kandidat za tretiranje opekline. Ti filmovi se stavljaju direktno na opeklinu u obliku vodene otopine kitozan acetata, te imaju vrlo visoku permeabilnost za kisik što dodatno poboljšava liječenje. Razgrađuju ga enzimi iz tijela i voda, te se zbog toga film ne mora skidati s opekline što ga čini vrlo praktičnim za uporabu [29].

Pokazalo se da kitozan polisaharidi su strukturalnim svojstvima slični glukozamin glikanima, te se može koristiti kao supstrat za zamjenu kože [30-32].

Kitozan može zamijeniti sintetske polimere za oftamološke primjene jer posjeduje sve karakteristike za izradu dobrih kontaktnih leća kao što su optička prozirnost, optička korekcija, propusnost plinova, mogućnost vlaženja, te ne izaziva nikakve imunološke reakcije [33].

2.4.3. Kompozitni materijal hidroksiapatit/kitozan

Kao najčešća metoda pripreme HA/CS kompozita koristi se liofilizacija koja se temelji na isparavanju zamrznutog otapala nakon čega ostaju pore različitih veličina, odnosno zaostaje materijal visoke poroznosti. Proces liofilizacije je dugotrajan, a da bi se postigla željena veličina pora potrebno je obratiti pažnju na temperaturu i brzinu zamrzavanja, vrstu otapala, načinu neutralizacije te koncentraciju otopine. Istraživanja su pokazala da je tehnikom liofilizacije moguće dobiti porozni nosač HA/CS. Iako mehanička svojstva zaostaju za željenima, poboljšan je biološki odgovor određenih stanica te njihova proliferacija u odnosu na nosač pripravljen isključivo od kitozana [34].

Pri pripravi HA/CS kompozita koristi se i elektropredenje gdje se pomoću električnog polja stvaraju polimerna vlakna koja se nanose na kolektor, odnosno metalnu pločicu. Cilj elektropredenja je dobiti materijal velike specifične površine, no manjkavost tog procesa je što se njime ne može proizvesti 3D strukturirani materijal. Pokazano je kako se povećalo stvaranje koštanog tkiva unutar 15 dana ugradnjom kitozan-kompozitnih vlakana modifikacijom bioaktivnosti sinteriranjem HA u kitozan/PEOx otopini [35].

Jedna od klasičnih metoda pripreve poroznih materijala je izljevanje otopine i ispiranje porogenih tvari. Polimer se otapa u hlapljivom otapalu, te se u njemu dispergiraju čestice porogena, koje se nakon sušenja u kalupu ispiru otapalom [36]. Tako dobiveni HA/CS materijal posjeduje poroznost 60.6% i 87.1% uz veličinu pora 100 – 200 μm [37].

Često korištena metoda je metoda sinteriranja mikrosfera gdje se aglomerirane polimerne ili kompozitne sfere zagrijavaju iznad staklišta u kalupu. Malafaya i suradnici [38] pripravili su mikrosfere kitozana i HA/CS kompozita promjera 410 – 460 μm dokapavanjem određenih otopina u NaOH te nakon toga prešane u cilindričnim kalupima na 60°C. Dobivena poroznost iznosila je 22.4% - 31.5% te međusobna povezanost pora 91.8% - 94.9%.

Za dobivanje kompozitnih materijala koristi se i metoda toplinski inducirane fazne separacije uz liofilizaciju. Njome se vrlo jednostavno pripravljaју porozni nosači iz polimerne ili kompozitne otopine. Temelji se na termodinamičkom principu, odnosno faze u homogenim sustavima se pod određenim uvjetima razdvajaju kako bi snizili slobodnu energiju. Kao primjer može se navesti separacija čvrsto kapljevine, gdje otapalo kristalizira u kapljevitij koncentriranoj polimernoj fazi, te se vadi sublimacijom ili neatapalom, nakon čega ostaje porozna struktura. Veličina i oblik pora mogu se kontrolirati podešavanjem parametara (temperatura smrzavanja, brzina hlađenja, temperatura medija za geliranje, vrijeme geliranja i priroda otapala). Ovom metodom Sun i suradnici su sintetizirali 3D HA/CS kompozitni materijal visoke poroznosti i međusobno povezanih pora dodavanjem 10 mas.% HA nanočestica polimernoj fazi, kitozanu. HA nanočestice su poboljšale mehanička svojstva kompozitnog materijala u odnosu na čisti CS, a biološka ispitivanja su pokazala da kompozitni materijal podržava adheziju fibroblastnih stanica [39].

U ovom radu kao izvor hidroksiapatita korišten je biogeni materijal, tj. sipina kost (*Seppia officinalis* L.). Sipina kost se pokazala kao dobar odabir za sintezu hidroksiapatita jer zadržava svoju strukturu nakon hidrotermalne sinteze. Osim toga što se iz sipine kosti vrlo jednostavno može dobiti HA, glavna značajka strukture sipine kosti za korištenje u biomedicinske svrhe je njena visoka poroznost.

Kitozan je najčešće korišten biopolimer poslije celuloze [40] što ga čini vrlo atraktivnim za primjenu. Kao izbor za primjenu u ovom radu, kitozan je izabran zbog svojih zanimljivih karakteristika kao što su biokompatibilnost, netoksičnost i biodegradibilnost [41]. Također se često koristi u materijalima za zacjeljivanje rana [42], nosač farmaceutika i lijekova [43], te kao komponenta u materijalima za inženjerstvo tkiva [44].

3. Eksperimentalni dio

3.1. Sinteza hidroksiapatita

Kao polazni materijal za hidrotermalnu sintezu hidroksiapatita korištena je aragonitna sipina kost (*Sepia officinalis* L.). Kost je mehanički očišćena tako što je skinut plašt kosti, a porozni dio je izrezan cirkularnom pilom na komade debljine 5-6 mm. Izrezani komadi su stavljeni u otopinu natrijeva hipoklorita (NaClO, 13%, Gram-mol d.o.o.) 24 h kako bi se uklonila organska komponenta kosti. Nakon uklanjanja organske komponente sipina kost je ispirana destiliranom vodom i sušena pri 105°C. Komadi sipine kosti, zajedno sa stehiometrijskom količinom (Ca/P=1.67) amonijeva dihidrogenfosfata (NH₄H₂PO₄, 99% Sharalu), stavljeni su u teflonsku posudu u hidrotermalni reaktor na 200°C tijekom 72 h. Samogenerirani tlak je iznosio 18-20 bar. Po završetku hidrotermalne sinteze uzorci su izvađeni, isprani destiliranom vodom i sušeni.

3.2. Priprava otopine kitozana

U pripremljenu 0.1 M octenu kiselinu volumena 250 mL (CH₃COOH, puriss p.a., Sigma-Aldrich) dodano je 5 g kitozana (M_w = 100.000-300.000, Acros Organics). Otopina kitozana je miješana na magnetskoj mješalici pri temperaturi od 50°C 1 h. pH otopine je podešen sa 4.5 na oko 5.8 dopapavanjem 12 M otopine NaOH.

3.2.1. Određivanje viskoznosti otopine kitozana

Određivanje viskoznosti otopine kitozana provedeno je upotrebom rotacijskog viskozimetra DV III+ (*Brookfield Engineering Laboratories, Inc., SAD*).

3.3. Hidroksiapatit/kitozan kompozitni materijal

Uzorci hidroksiapatita postavljeni su u uređaj za impregnaciju (Citovac Struers) i nakon postignutog vakuuma u čašu s uzorcima usisana je otopina kitozana. Nakon 30 min uzorci su izvađeni iz otopine i sušeni pri 40°C kroz 24 h. Osušeni uzorci su tretirani 1 M otopinom NaOH kako bi se uklonile acetilne skupine, ispirani destiliranom vodom i ostavljeni da se suše na zraku. Na taj način dobiven je uzorak hidroksiapatita s jednim slojem kitozana označen kao HA/CS1s. Postupak impregnacije je ponovljen kako bi se u uzorke hidroksiapatita unijelo više kitozana te su tako pripremljeni i uzorci sa četiri sloja kitozana, HA/CS4s.



Slika 9. Fotografija uzoraka kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s

3.4. Karakterizacija materijala

3.4.1. Difuzna reflektirajuća spektroskopija s infracrvenim zračenjem (DRIFT)

Analiza funkcionalnih skupina kompozitnog materijala provedena je DRIFT metodom na FTIR uređaju (Bruker VERTEX 70). Uzorak je usitnjen u tarioniku te pomiješan s KBr u masenom omjeru 1(KBr)/0,05(uzorak) i analiziran u apsorpcijskom području od 400 cm^{-1} do 4000 cm^{-1} , pri rezoluciji od 4 cm^{-1} .

3.4.2. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Uzorci su analizirani termogravimetrijskom analizom u platinskim lončićima na uređaju za TGA (TA Instruments Q500) u rasponu od 25°C do 1000°C , brzinom zagrijavanja $5^{\circ}\text{C}/\text{min}$.

3.4.3. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Morfologija HA i kompozitnih uzoraka (hidroksiapatit/kitozan) proučavana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM TESCAN VEGA TS5136LS). S obzirom da su uzorci nevodljivi, prethodno su napareni vodljivim slojem zlata.

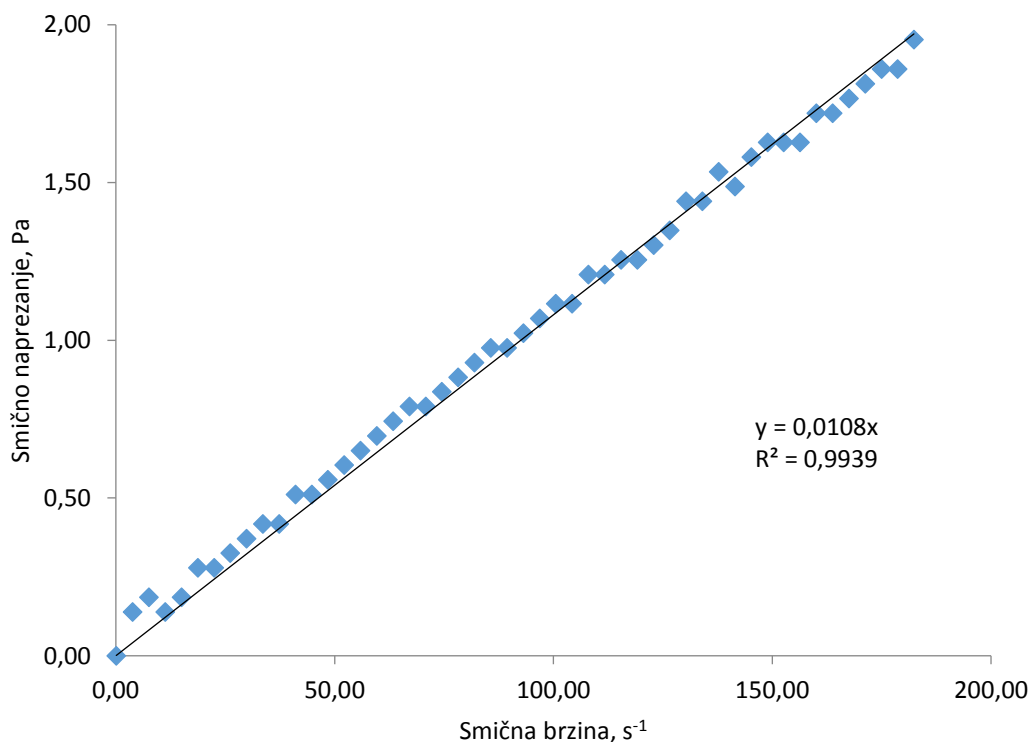
3.4.4. Određivanje specifične površine i veličine nanopora

Kvantificiranje nanoporoznosti rađeno je prema Brunauer-Emmett-Tellerovoj metodi (BET) snimanjem adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma pri temperaturi tekućeg N_2 na uređaju Micromimetics ASAP 2000. Tom se metodom dobiva ukupna površina uzorka, koja uključuje i vanjsku površinu kolektiva čestica i površinu samih pora. Ispitivani su uzorci HA, HA/CS1s i HA/CS4s. Prije analize provedeno je otplinjavanje uzoraka, kojim se iz pora uklanjaju vlaga i nečistoće. Otplinjavanje je provedeno pri 100°C djelovanjem visokog vakuuma (0.67 Pa) u trajanju od 3 h. Nakon otplinjavanja slijedilo je određivanje površine uzorka na temelju adsorpcijsko-desorpcijskih izoterma N_2 određenih pri temperaturi od -196.15°C . Temeljem količine adsorbiranog dušika prema metodi BET određene su specifična površina i prosječna veličina pora (do 100 nm) u ispitivanim uzorcima.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Određivanje viskoznosti otopine kitozana

Kao što je već spomenuto, kitozan nije praktično karakterizirati prema molarnoj masi zbog njene široke raspodjele, te je preporučljiva karakterizacija otopine mjerenjem njene dinamičke viskoznosti. Viskoznost 2%-tne otopine kitozana određena je rotacijskim viskozimetrom.

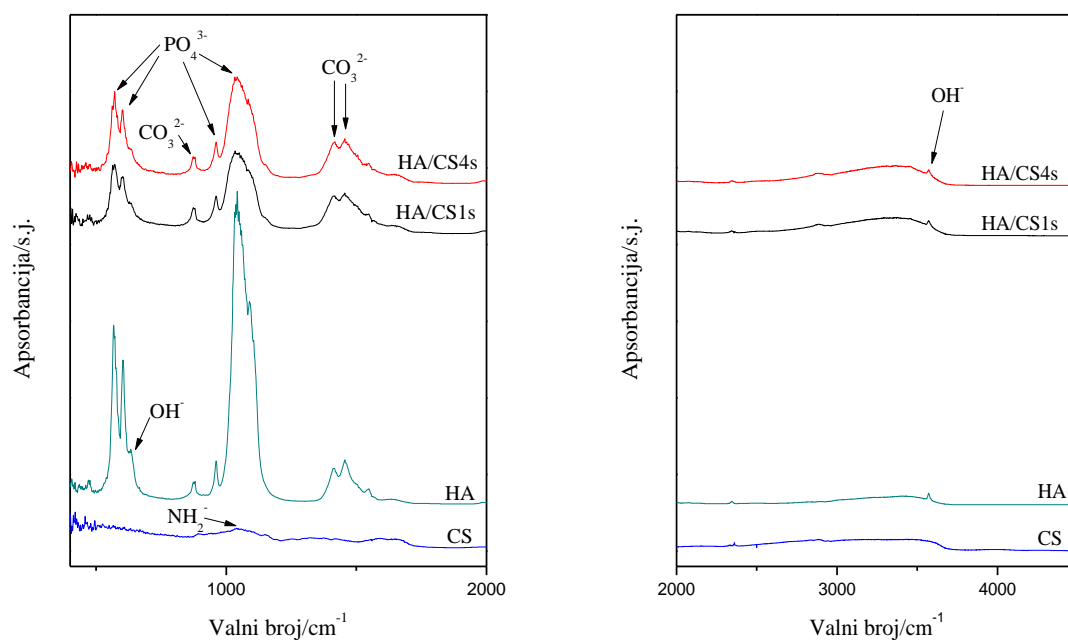


Slika 10. Grafički prikaz odnosa smične brzine i smičnog napreznja 2%-tne otopine kitozana

Dobiveni grafički prikaz ovisnosti smičnog napreznja o smičnoj brzini pokazuje da se 2%-tna otopina kitozana ponaša kao Newtonski fluid (Slika 10). Iz nagiba pravca može se očitati da dinamička viskoznost otopine kitozana iznosi 0,0108 Pa s pri 25°C.

4.2. Difuzna reflektirajuća spektroskopija s infracrvenim zračenjem (DRIFT)

DRIFT tehnikom dobiveni su spektri HA, kitozana i kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s koji prikazuju karakteristične vrpce navedenih materijala.



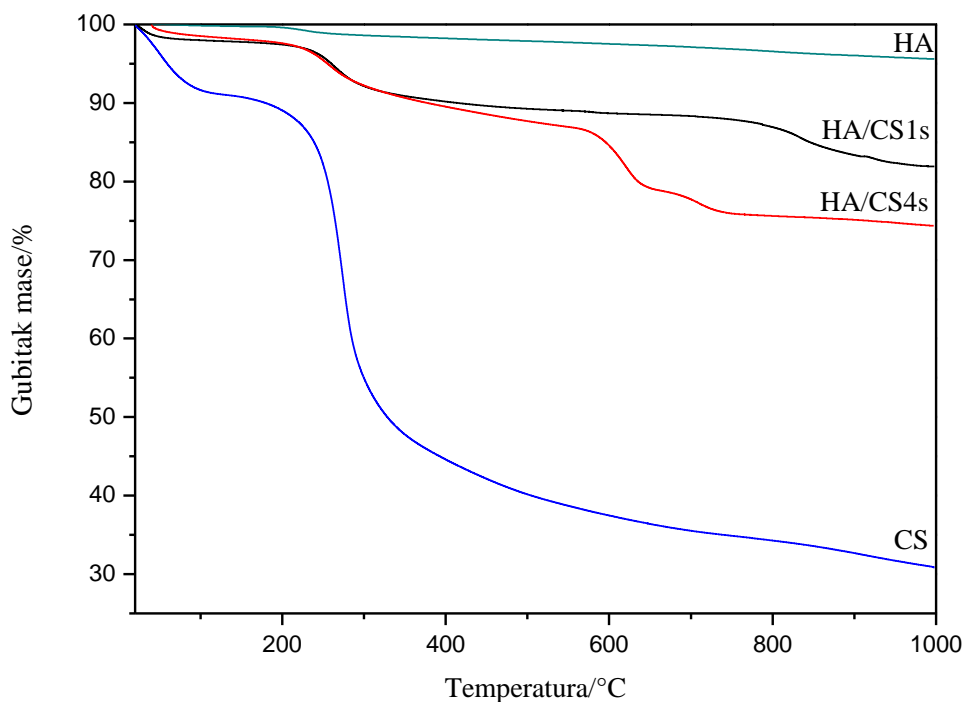
Slika 11. DRIFT spektar kitozana i kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s

Na spektru HA vidljive su karakteristične vrpce PO_4^{3-} tetraedara pri 470, 561, 601, 960, 1018 i 1083 cm^{-1} . Pri 630 i 3750 cm^{-1} javljaju se karakteristične vrpce za vibracije istezanja i savijanja OH^- skupine. HA u svoju strukturu može primiti supstituente kao što je CO_3^{2-} skupina, pa tako postoje dva tipa karbonatnih supstitucija: supstitucija CO_3^{2-} skupina na mjesto OH^- skupina (tip A) i CO_3^{2-} skupina za PO_4^{3-} skupine (tip B). Iz spektra HA vidljivo je da u HA postoji B tip supstitucije karbonatnih iona čije se vrpce javljaju pri 871, 1413 i 1456 cm^{-1} . B-tip supstitucije, koji je nađen u sintetiziranom HA, dominira u sastavu anorganske faze prirodne kosti (2-8 mas. %), te povećava bioaktivnot i biokompatibilnost materijala [45].

U kompozitnim materijalima najizraženija vrpca kitozana, NH_2^- skupina, koja se u spektru čistog kitozana javlja pri 1020 cm^{-1} , nije vidljiva zbog prekrivenosti PO_4^{3-} vrpcom mnogo jačeg intenziteta, te ovom metodom ne možemo egzaktno potvrditi prisustvo kitozana u ispitivanim kompozitnim materijalima.

4.3. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Da bi se odredila količina kitozana impregnirana u hidroksiapatitne okosnice, kompoziti uzorci su analizirani termogravimetrijski do 1000°C. Radi usporedbe, analizirani su i uzorci čistog HA i kitozana.

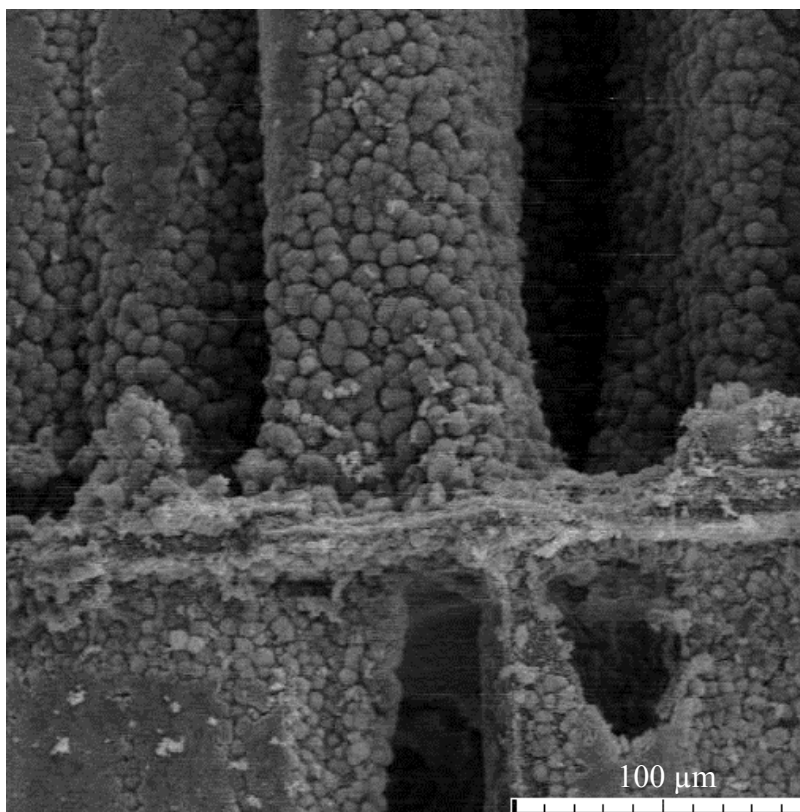


Slika 12. TGA krivulje hidroksiapatita, kitozana i kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s

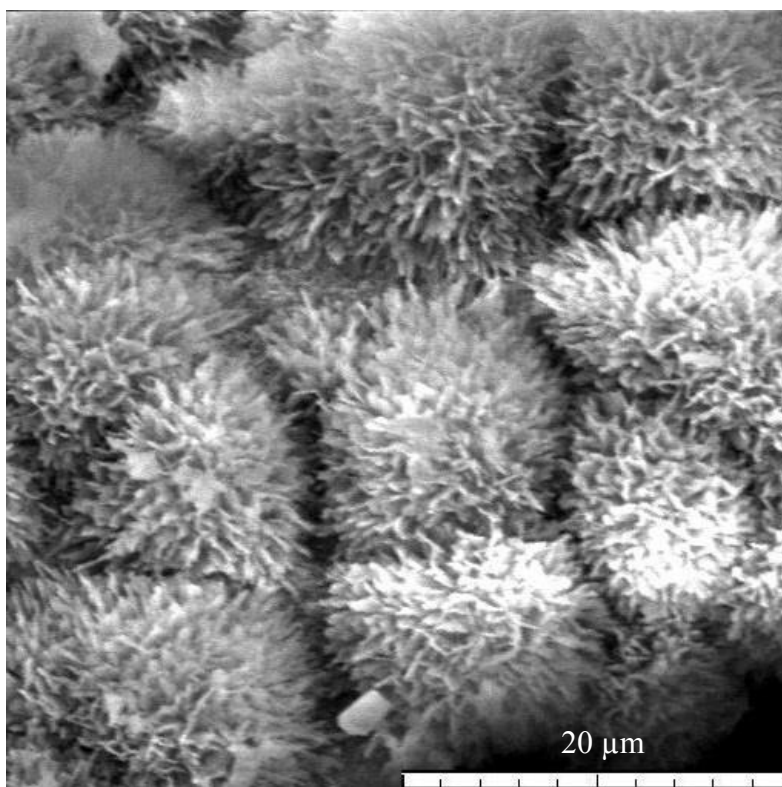
Termogravimetrijska krivulja HA ukazuje na njegovu termalnu stabilnost. Gubitak mase čistog hidroksiapatita od 4% možemo objasniti gubitkom fizikalno adsorbirane vode, kao i gubitkom CO₂ procesom dekarbonizacije koji nastupa u temperaturnom intervalu od 600°C do 1000°C. TGA krivulja čistog kitozana ukazuje na njegov dvostupanjski raspad koji je kod kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s odgođen. Razlog tome vjerojatno leži u tome što je degradacija ugljika iz kitozana usporena uslijed manjeg prisustva kisika čiji pristup otežava postojanje hidroksiapatitnih čestica. Također, odgodi raspada kitozana doprinosi i različita toplinska provodnost hidroksiapatita u odnosu na kitozan te postojanje uklopaka zraka u porama koji doprinose smanjenju toplinske provodnosti. Kod kompozita HA/CS1s ukupni gubitak mase iznosi 16 mas.%, dok kompozit HA/CS4s, očekivano, pokazuje veći gubitak mase od ukupno 23 mas.%.

4.4. Pretražna elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajuća elektronska mikroskopija korištena je kako bi se dokazala prisutnost kitozana u kompozitnom materijalu, te analizirala morfologija površine materijala. Sve mikrografske snimke prikazuju unutarnju površinu materijala kako bi se utvrdila efikasnost ulaska otopine kitozana u pore HA.



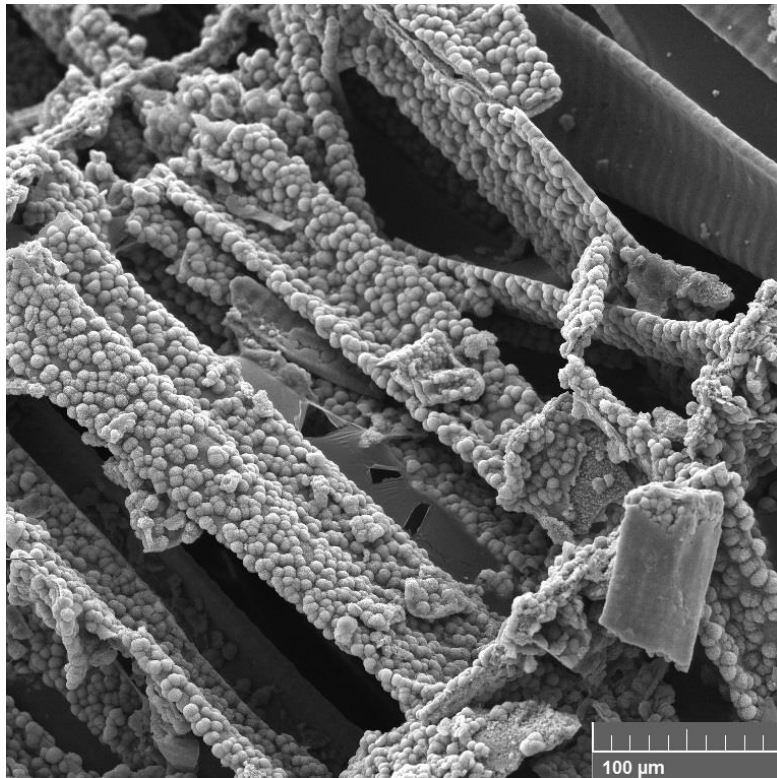
Slika 13. SEM mikrograf hidroksiapatita



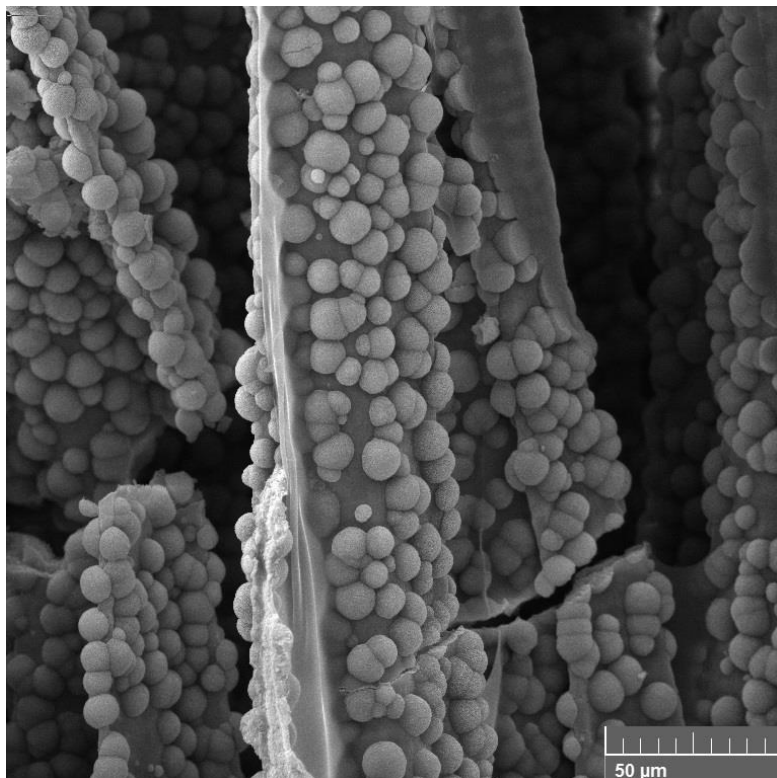
Slika 14. SEM mikrograf sferičnih hidroksiapatitnih čestica [2]

SEM mikrograf hidroksiapatita sintetiziranog hidrotermalnom reakcijom iz sipine kosti na 200°C kroz 72 h pokazuje očuvanu originalnu mikrostrukturu sipine kosti (Slika 13). Kristali HA prekrivaju površinu tvoreći sferične forme koje doprinose povećanju specifične površine materijala. Pri većem povećanju vidljivo je da su te sferične forme, nalik maslačku, sastavljene su od mnoštva pločastih ili lisnatih kristalića HA između kojih je slobodan prostor, za koji se očekuje da će doprinijeti boljoj adheziji kitozana (Slika 14).

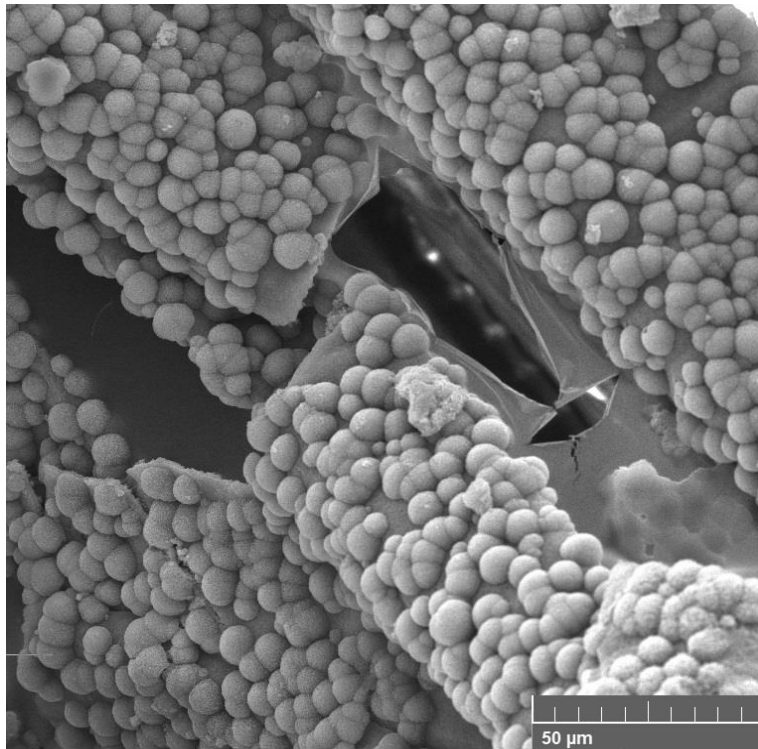
Na slikama od 15. do 18. prikazani su mikrografske snimke kompozitnog materijala HA/CS1s pri različitim uvećanjima. Iz mikrografa je vidljivo da jedna impregnacija otopinom kitozana blago mijenja vanjski izgled površine HA tako da su sferne čestice kompaktnije u odnosu na čisti HA. Na slici 15. i slici 17. vidljiva je vrlo tanka opna kitozana koji je zaostao u porama materijala što potvrđuje da je otopina kitozana bila adekvatne viskoznosti da uđe u pore materijala kroz cijeli uzorak debljine 5-6 mm. Usporedbom slika 14. i 18. jasno je uočljiva razlika u izgledu sferičnih čestica HA na kojima je u kompozitnom uzorku vidljiv tanak sloj kitozana na površini, ali i u porama čestica, pa je zbog toga oblik sfera znatno kompaktniji i zaglađeniji u odnosu na početni oblik prije impregnacije.



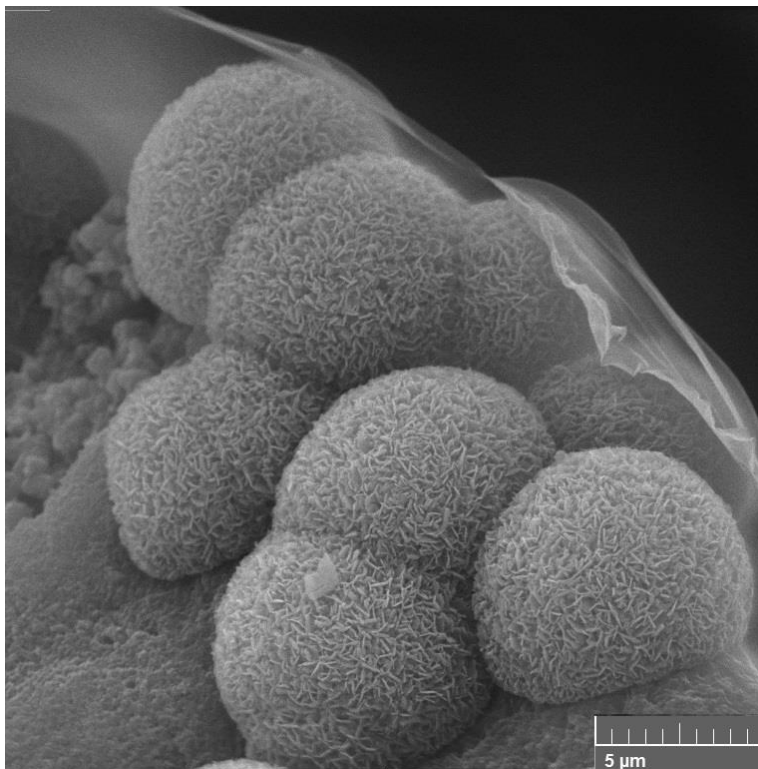
Slika 15. SEM mikrograf kompozita HA/CS1s



Slika 16. SEM mikrograf kompozita HA/CS1s

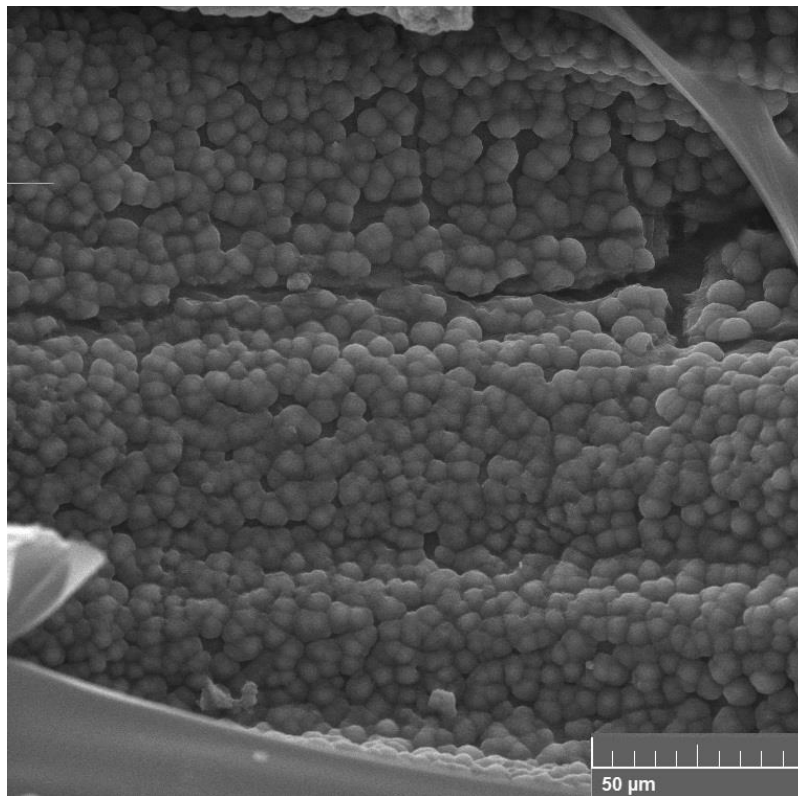


Slika 17. SEM mikrograf kompozita HA/CS1s

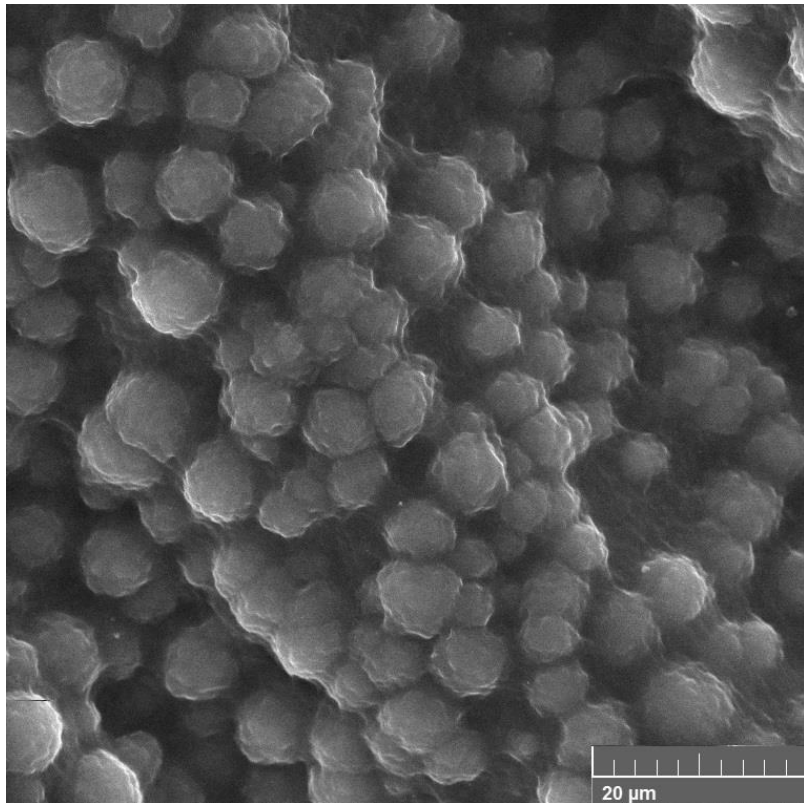


Slika 18. SEM mikrograf kompozita HA/CS1s

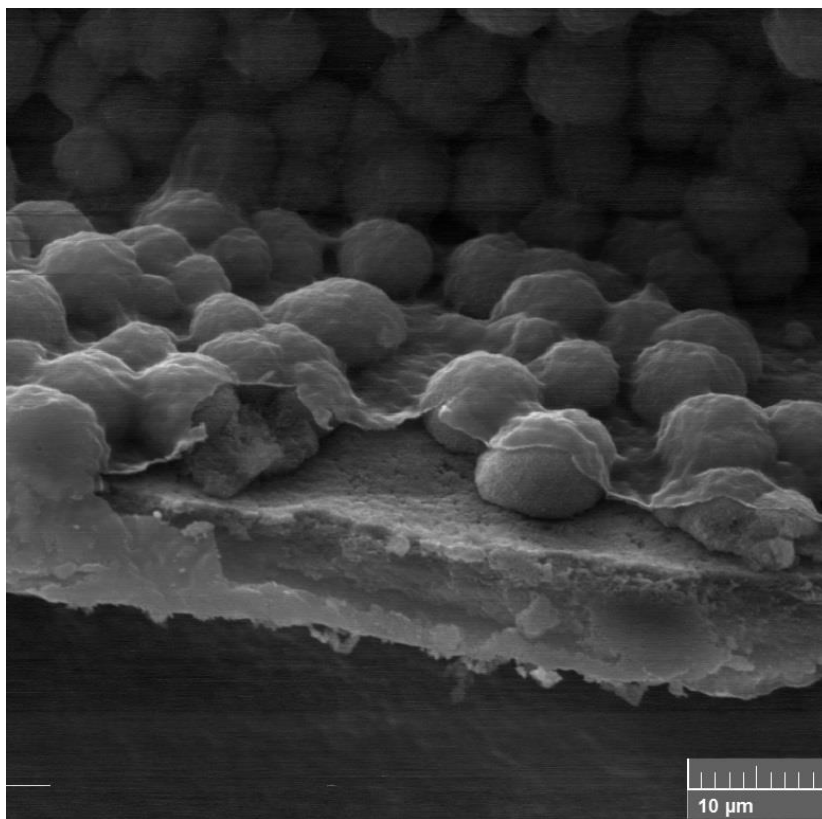
Na slikama od 19. do 22. prikazane su mikrografske snimke kompozitnog materijala HA/CS4s pri različitim uvećanjima. Svrha ponavljane impregnacije otopine kitozana u HA okosnicu je bila povećati udio kitozana u kompozitnom materijalu ravnomjernim prekrivanjem površine, a da pritom ne dođe do začepjenja pora materijala. Uspješnost unošenja četiri sloja kitozana potvrđuju mikrografi HA/CS4s kompozitnog materijala. Na mikrografijama je vidljiv znatno deblji sloj polimera u odnosu na HA/CS1s kompozit, ravnomjerno raspoređenog po površini. Na slici 22. vidljivo je kako je odvajanjem polimerne opne od površine došlo i do odvajanja vrhova sferičnih čestica zajedno s polimernom fazom. Iz toga se može zaključiti kako je adhezija između tih dviju faza jaka, olakšana zbog postojanja slobodnog prostora između listića HA u koji ulazi otopina kitozana.



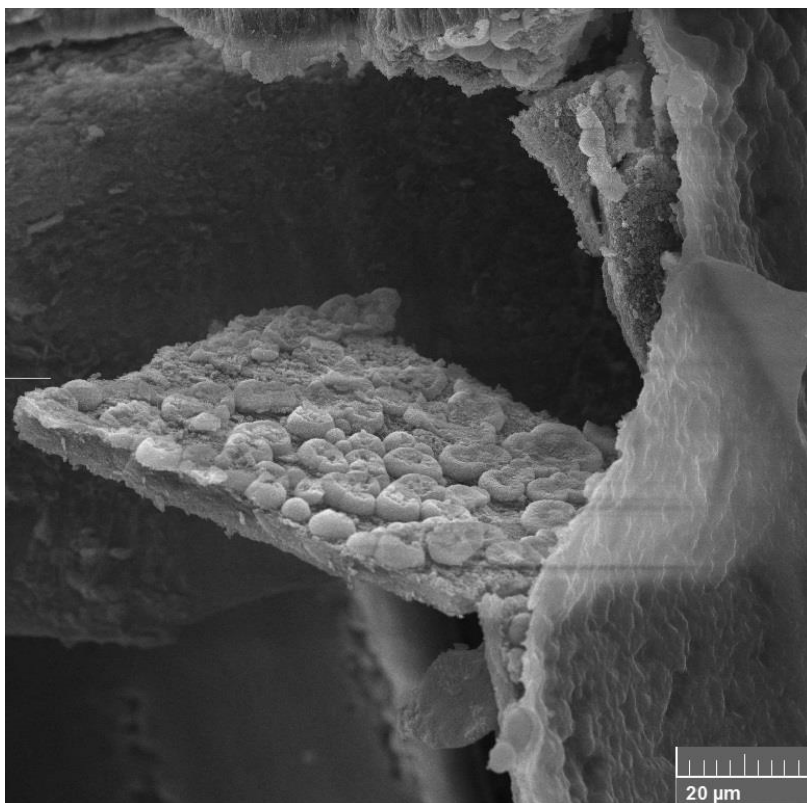
Slika 19. SEM mikrograf kompozita HA/CS4s



Slika 20. SEM mikrograf kompozita HA/CS4s



Slika 21. SEM mikrograf kompozita HA/CS4s



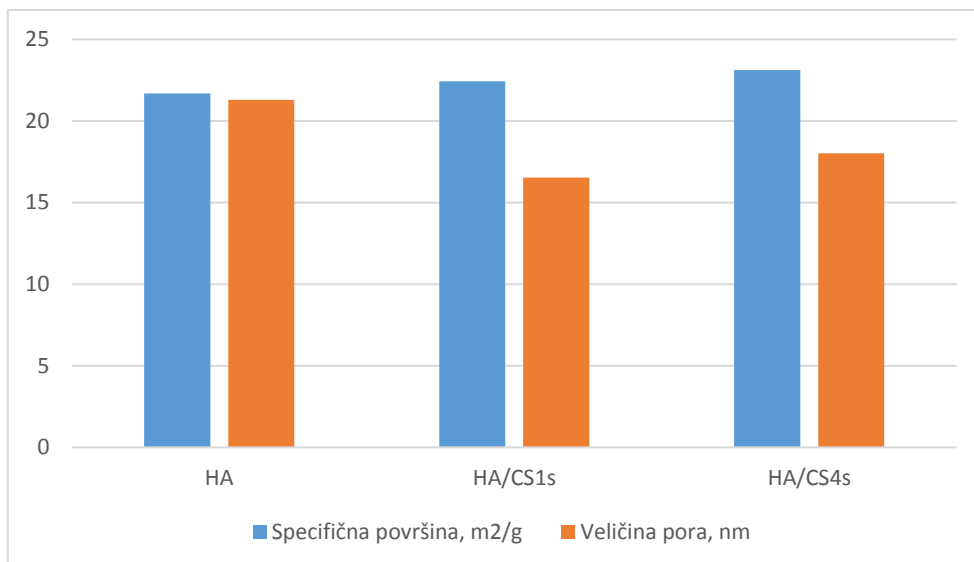
Slika 22. SEM mikrograf kompozita HA/CS4s

4.5. Određivanje specifične površine i veličine nanopora

BET metodom određena je specifična površina i prosječna veličina nanopora uzoraka HA i kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s (Tablica 1.).

Tablica 1. Specifična površina i prosječna veličina pora uzoraka HA i kompozitnih materijala i HA/CS1s i HA/CS4s.

	Specifična površina, m²/g	Veličina pora, nm
HA	21,68	21,29
HA/CS1s	22,43	16,53
HA/CS4s	23,12	18,01



Slika 23. Grafički prikaz specifičnih površina i prosječnih veličina pora uzoraka HA i kompozitnih materijala HA/CS1s i HA/CS4s

Dobivene vrijednosti pokazuju da impregnirani slojevi kitozana nisu imali zamjetan utjecaj na promjenu specifične površine kompozitnih uzoraka u odnosu na čisti HA. Vrijednosti prosječne veličine pora uzoraka, mjerene do 100 nm, pokazuju neznatno smanjenje veličine pora kompozita u odnosu na čisti HA. Očekivano, ali vrlo malo smanjenje pora upućuje na to da kitozan prekriva površinu HA u obliku jako tankog filma koji ulazi u međuprostore sferičnih čestica koje čine kristalići HA, kao što je viđeno na mikrografima uzoraka. Iako je najveće smanjenje očekivano u uzorku HA/CS4s, rezultati analize pokazuju da je prosječna veličina pora ipak neznatno veća nego u uzorku HA/CS1s. Iz podataka se može zaključiti da vrlo tanki slojevi kitozana koji prijanjaju na površinu HA nemaju značajan utjecaj na specifičnu površinu i veličinu pora materijala.

5. Zaključci

Na temelju dobivenih rezultata karakterizacije pripremljenog kompozitnog materijala hidroksiapatita i kitozana može se zaključiti:

- Hidrotermalnom pretvorbom aragonita iz sipine kosti pri 200°C tijekom 72 h dobiven je hidroksiapatit očuvane mikrostrukture sipine kosti.
- Tehnikom vakuumske impregnacije dobiven je visokoporozni kompozitni materijal HA/CS1s i HA/CS4s.
- SEM analiza uzoraka prikazuje očuvanu lamelarnu strukturu sipine kosti prevučenu tankim filmom kitozana nakon impregnacije 2%-tnom otopinom kitozana.
- Rezultati mjerenja DRIFT metodom ne pokazuju prisutnost kitozana u kompozitima zbog prekrivanja specifičnih vrpci hidroksiapatita i kitozana.
- TGA metodom potvrđena je prisutnost kitozana. U kompozitu HA/CS1s nađeno je 16 mas.%, a u kompozitu HA/CS4s 23 mas.% kitozana.
- BET metoda pokazuje neznatno smanjenje veličine pora kompozita HA/CS1s i HA/CS4s u odnosu na čisti hidroksiapatit.

6. Literatura

1. Langer, R., Vacanti, J. P. —Tissue Engineering, Science, 260:5110, 920-926, 1993.
2. Milovac, D. – Synthesis and characterization of hydroxyapatite-biodegradable polymer composite material, Doctoral thesis, 2014
3. Hall S.- Basic biomechanics, 5th Edition, p.88, McGraw-Hill, New York, 2007
4. Tate, P. (2009): Seeley's principles of anatomy & physiology. McGraw-Hill. 124-140.
5. https://www.pinterest.com/pin/275775177151848606/?from_navigate=true (23.5.2016)
6. Hutmacher, D.W, —Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage, Biomaterials, 21:24 2529-2543, 2000.
7. Agrawal, C.M., Ray, R.B. —Biodegradable polymeric scaffolds for musculoskeletal tissue engineering, J. Biomed. Mat. Res., 55:2, 141-150, 2001.
8. Leong, K.F., Cheah, C.M., Chua, C.K. —Solid freeform fabrication of three-dimensional scaffolds for engineering replacement tissues and organs, Biomaterials, 24:13 3262-2378, 2003.
9. Yang S., Leong, K.F., Du, Z., Chua, C.K. —The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors, Tissue Eng, 7:6, 679-689, 2001.
10. Freed, L.E., Vunjak-Novakovic, G. —Culture of organized cell communities, Adv. Drug. Deliv. Rev., 33:1-2 15-30, 1998.
11. Maquet V., Jerome R. —Design of macroporous biodegradable polymer scaffolds for cell transplantation, Mat. Science Forum, 250, 15- 42, 1997.
12. Burg, K.J., Porter, S., Kellam, J.F. —Biomaterial developments for bone tissue engineering Biomaterials, 21:23, 2347-2359, 2000.
13. Lange, R., Luthen, F., Beck, U., Rychly, Baumann, J., A., Nebe, B. —Cell-extracellular matrix interaction and physico-chemical characteristics of titanium surfaces depend on the roughness of the material, Biomol. Eng., 19:2-6 255-261, 2002.
14. He, W., Gonsalves, K.E., Batina, N., Poker, D.B., Alexander, E., Hudson, M. —Micro/nanomachining of Polymer Surface for Promoting Osteoblast Cell Adhesion, Biomed. Dev., 5:2, 101-108, 2003.
15. Cassinelli, C., Morra, M., Bruzzone, G., Carpi, A., Di Santi, G., Giardino, R., Fini, M. —Surface chemistry effects of topographic modification of titanium dental implant surfaces: 1. Surface analysis, Int. J. Oral & Maxillofac. Impl., 18:1, 46-50, 2003.
16. Davies, J.E. —In vitro modeling of the bone/implant interface, Anat. Record, 245:2, 426-445, 1996.

17. Albrektsson, T., Johansson —Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration, C., Eur. Spine J., 10:2 S96-101, 2001.
18. Orlić, S. – Biomimetički pristup sintezi visokoporozne hidroksiapatitne keramike, Doktorska disertacija, 2012
19. El-Ghannam, A.- Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering
20. Ivankovic, H., Ferrer, G.G., Tkalčec, E., Orlic, S., Ivankovic, M.- Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone, 20:5, 1039-1046, 2009.
21. Nisen-Nygaard, J., Strand P.S. Chitosan- Gels and Interfacial Properties, Polymers, 7, 522-579, 2015.
22. Cheung, R.C.F, Bun Ng T., Ho Wong J., Chan W.Y. - Chitosan: An Update on Potential Biomedical and Pharmaceutical Applications
23. Acosta N., Jimenz C., Borau V., Heras A.- Extraction and characterization of chitin from crustaceas, Biomass Bioenergy, 5:145-53, 1993.
24. Madihally S.V., Mathew H.W.T. - Porous chitosan scaffolds for tissue engineering, Biomaterials, 20: 1133-42, 1999.
25. Leedy M., Martin H., Norowski P., Jennings J.- Use of chitosan as a bioactive iplant coating for bone-implant applications, Chitosan for biomaterials II, Springer Berlin; 2001.
26. Decher G. - Fuzzy nanoasssemblies toward layered polymeric multicomposites, Science 277:1232-7, 1997.
27. Prasitslip, M., Jenwithisuk, R., Kongsuwan K., Damrongachi, N., Watts, P. - Cellular responses to chitosan in vitro: the importance of deacetylation, J Mater Sci: Mater Med, 11, 773, 2000.
28. www.bae.ncsu.edu (25.5.2016)
29. www.vanson.com (25.5.2016)
30. Mucha, M.- Rheological characteristics of semi-dilute chitosan solutions, Macromol Chem Phys, 198, 471, 1997.
31. Calvo, P., Remunan-Lopez, C., Vila Jato, J.L., Alonso, M.J.- Development of positively charged drug carriers: chitosan-coated polyester nan capsules and submicron-emulsions, Colloid Polym Sci, 275, 46, 1997.
32. Wu S., Shen J. - Electrorheological properties of chitin suspensions, J Appl Polym Si, 60, 2159, 1996.
33. Jing H., Su W., Caracci S., Bunning T.G., Cooper T., Adams W. - Optical waveguiding and morphology of chitosan thin films, J Appl Polym Sci, 61, 1163, 1990.

34. Thein-Han, W.W., Misra, R.D.K. - Biomimetic chitosan-nanohydroxyapatite composite scaffolds for bone tissue engineering, *Acta Biomaterialia* 5, 1182 – 1197, 2009.
35. Zhang, Y., Venugopal, J.R., El-Turki, A., Ramakrishna, S., Su, B., Lim, C.T. - Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering, *Biomaterials* 29, 4314 – 4322, 2008.
36. Sarmiento, B., Neves, J. - Chitosan-based systems for biopharmaceuticals: Delivery, targeting and polymer therapeutics, John Wiley & Sons, Chichester, UK, 2012.
37. Kashiwazaki, H., Kishiya, Y., Matsuda, A., Yamaguchi, K., Iizuka, T., Tanaka, J., Inoue, N. - Fabrication of porous chitosan/hydroxyapatite nanocomposites: their mechanical and biological properties, *Biomedical Materials and Engineering* 19, 133 – 140, 2009.
38. Malafaya, P.B., Reis, R.L. - Bilayered chitosan-based scaffolds for osteochondral tissue engineering: Influence of hydroxyapatite on *in vitro* cytotoxicity and dynamic bioactivity studies in a specific double-chamber bioreactor, *Acta Biomaterialia* 5, 644 – 660, 2009.
39. Sun, T., Khan, T.H., Sultana, N. - Fabrication and In Vitro Evaluation of Nanosized Hydroxyapatite/Chitosan-Based Tissue Engineering Scaffolds, *Journal of Nanomaterials*, vol. 2014, Article ID 194680, 2014.
40. Rinaudo, M. - Chitin and chitosan: properties and applications. *Prog. Polym Sci*, 31:603–32, 2006.
41. Kumar, M.N., Muzzarelli, R.A., Muzzarelli, C., Sashiwa, H., Domb, A.J. - Chitosan chemistry and pharmaceutical perspectives. *Chem. Rev.*, 104, 6017–6084, 2004.
42. Chandy, T., Sharma, C.P. - Chitosan-as a biomaterial. *Biomater. Artif. Cells Artif. Organs*, 18, 1–24, 1990.
43. Felt, O., Buri, P., Gurny, R. - Chitosan: A unique polysaccharide for drug delivery. *Drug Dev. Ind. Pharm.*, 24, 979–993, 1998.
44. Zhang, Y., Zhang, M. - Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants. *J. Biomed. Mater. Res.*, 61, 1–8, 2002.
45. Driessens, F.C.M.: CRC Press, Boca Raton, FL (1983) 1-32

ŽIVOTOPIS

Rođen sam 04.08.1989. u Zagrebu. Pohađao sam osnovnu školu Žuti brijeg u Zagrebu, te nakon završene osnovne škole upisao sam X. gimnaziju Ivan Supek, prirodoslovno – matematički smjer. Nakon završene gimnazije 2008. godine upisao sam Ekonomski fakultet u Zagrebu, nakon toga 2009. godine upisao sam preddiplomski Sveučilišni studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu. 2014. godine upisujem sam diplomski Sveučilišni studij Kemija i inženjerstvo materijala na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije u Zagrebu

Stručnu praksu sam odradio u Atlantic grupi, podružnica Cedevida u laboratoriju za kontrolu kvalitete. Dobitnik sam rektorove nagrade za znanstveni rad. Tokom svog studiranja na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije bavio sam se judom te osvojio drugo mjesto na zagrebačkom studentskom prvenstvu u judu.