

Kompozitne mikročestice kao sustavi za dostavu lijeka

Omazić, Martina

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://um.nsk.hr/um:nbn:hr:149:541461>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-03-16**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Martina Omazić

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, veljača 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ
PRIMIJEJENA KEMIJA

Martina Omazić

**KOMPOZITNE MIKROČESTICE KAO SUSTAVI ZA DOSTAVU
LIJEKA**

DIPLOMSKI RAD

Mentor: znanstveno-nastavno radno mjesto: izv.prof. dr. sc. Anamarija Rogina,
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Članovi ispitnog povjerenstva:

1. znanstveno-nastavno radno mjesto: izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
2. znanstveno-nastavno radno mjesto: prof. dr. sc. Marica Ivanković, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije
3. suradničko radno mjesto: dr. sc. Leonard Bauer, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Zagreb, veljača 2024.

Zahvale

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

Zahvaljujem mentorici, izv. prof. dr. sc. Anamariji Rogina, na pruženoj prilici, prenesenom znanju, stručnim vodstvu i savjetima prilikom izrade diplomskog rada.

Zahvaljujem asistentici, Andrei Lončarević, mag. ing. cheming, na prijateljskom pristupu, uloženom vremenu, svim savjetima i pomoći prilikom izvođenja praktičnog dijela diplomskog rada, kao i pisanju cijelog rada.

Posebno zahvaljujem svojoj obitelji na neizmjernoj potpori i podršci tijekom života.

Zahvaljujem kolegama i prijateljima na savjetima i lijepim trenucima za vrijeme studiranja.

SAŽETAK

Cilj ovoga rada bila je priprema kompozitnih kitozan-bakar(II)/hidroksiapatit mikročestica te ispitivanje mogućnosti inkapsulacije antitumorskog lijeka u pripremljene materijale u svrhu pripreme sustava za ciljanu dostavu lijekova. Kitozan (CHT), kao jedan od najvažnijih poliaminosaharida, izazvao je veliki interes zbog svojih poželjnih svojstava i široke primjene. Kitozan ima sposobnost stvaranja stabilnih kelata s bioaktivnim metalnim ionima, te je u ovom radu pripremljena polimerna matrica na temelju kitozan-Cu²⁺ kompleksa. S ciljem povećanja efikasnosti ugradnje antitumorskoga lijeka u matricu, pripravljene su kompozitne mikročestice dodatkom anorganskog punila (hidroksiapatit, HAp).

Metoda elektroštrcanja je korištena za proizvodnju visoko sferičnih mikronosača na temelju kompozita CHT-Cu/HAp zbog svoje jednostavnosti i visoke efikasnosti. Za identifikaciju dobivenih mikročestica korištene su infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom prigušene totalne refleksije (ATR-FTIR) i rendgenska difrakcijska analiza (XRD). Oblik, veličina i raspodjela veličina mikročestica određeni su pomoću pretražnog fluorescentnog mikroskopa. Stupanj bubrenja mikročestica određen je u otopinama fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7,4) te u demineraliziranoj vodi (H₂O, pH 6,5). Ugradnja antitumorskoga lijeka (doksorubicin, DOX) provedena je u blago kiselom mediju tijekom jednog, odnosno tri sata, pri 37 °C te su svojstva mikročestica s ugrađenim lijekom ispitana primjenom pretražnog fluorescentnog mikroskopa, fluorescentne spektrometrije i gravimetrijske metode.

XRD i FTIR analize pokazale su prisutnost hidroksiapatita u pripravljenom CHT-Cu/HAp kompozitu, te su mikročestice dobivene procesom elektroštrcanja bile sferičnoga oblika uz prosječnu veličinu čestica $56,1 \pm 5,1 \mu\text{m}$ za CHT-Cu sustav, odnosno $72,1 \pm 17,6 \mu\text{m}$ za CHT-Cu/HAp sustav. Ispitivanje stupanja bubrenja pokazalo je da mikročestice najviše bubre u kiselom mediju te da se s dodatkom hidroksiapatita povećava stupanj bubrenja. Primjenom fluorescentne mikroskopije utvrđena je uspješna ugradnja doksorubicina u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice. Rezultati fluorescentne spektrometrije i gravimetrijske metode ukazali su na prisutnosti soli fosfata u mikročesticama. Dobiveni rezultati pokazali su da pripravljene kompozitne mikročestice mogu poslužiti kao potencijalni sustavi za dostavu lijeka.

Ključne riječi: kitozan, dostava lijeka, hidroksiapatit, doksorubicin

Composite microparticles as drug delivery systems

ABSTRACT

This work aimed to prepare composite chitosan-copper/hydroxyapatite microparticles and investigate the possibility of loading an antitumor drug, forming a targeted drug delivery system. Chitosan (CHT), one of the most important polyaminosaccharides, has drawn attention due to its desirable properties and wide applications. Chitosan can form stable chelates with bioactive metal ions, and in this work, a polymer matrix based on the CHT-Cu²⁺ complex was prepared. To increase the efficiency of incorporating the antitumor drug into the matrix, composite microparticles were prepared with the addition of an inorganic filler (hydroxyapatite, HAp).

The electrospraying method was used to produce highly spherical microcarriers based on CHT-Cu/HAp composite due to its simplicity and high efficiency. Attenuated total reflection-Fourier transform infrared spectroscopy (ATR-FTIR) and X-ray diffraction analysis (XRD) were used to investigate the structure and composition of the obtained microspheres. The shape, size and size distribution of microparticles were determined using a scanning fluorescence microscope. The swelling degree of the microparticles was determined in phosphate buffer solution with pH values of 6 (PB-6) and 7.4 (PB-7.4) and demineralized water (H₂O, pH 6.5). Incorporation of the antitumor drug (doxorubicin, DOX) was carried out in a slightly acidic medium for one or three hours at 37 °C, and the properties of the drug loaded-microparticles were examined using a fluorescence microscope, fluorescence spectrometry and gravimetric method.

XRD and FTIR analyses showed the presence of hydroxyapatite in the prepared CHT-Cu/HAp composite and the microparticles obtained by the electrospraying process were spherical with an average particle size of $67.5 \pm 25.6 \mu\text{m}$ for the CHT-Cu system and $72.1 \pm 17.6 \mu\text{m}$ for the CHT-Cu/HAp system. The swelling study showed that the microparticles swell the most in an acidic medium, while the swelling degree increases with the addition of hydroxyapatite. Using fluorescence microscopy, successful incorporation of doxorubicin into CHT-Cu and CHT-Cu/HAp microparticles was observed. The results of fluorescence spectrometry and gravimetric method indicated the presence of phosphate salts in the microparticles. The obtained results showed that the prepared composite microparticles can serve as potential drug delivery systems.

Keywords: chitosan, drug delivery, hydroxyapatite, doxorubicin

SADRŽAJ:

1. UVOD	1
2. OPĆI DIO	3
2.1. Kompozitne mikročestice.....	3
2.2. Metode dobivanja kompozitnih mikročestica	5
2.3. Elektroštrcanje.....	5
2.4. Kitozan	8
2.4.1. Stupanj deacetilacije.....	9
2.4.2. Molekulska masa.....	10
2.4.3. Svojstva kitozana.....	10
2.5. Interakcije metalnih iona s kitozanom	12
2.5.1. Kompleks kitozana i bakra	13
2.6. Hidroksiapatit	15
2.7. Literaturni pregled.....	16
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	18
3.1. Materijali	18
3.2. Priprema otopina	18
3.2.1. Priprema polimerne otopine	20
3.2.2. Priprema otopine kompleksa kitozana i bakrovog(II) iona	20
3.2.3. Priprema suspenzije hidroksiapatita u otopini kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona	20
3.2.4. Priprema otopine neutralizacijskog agensa	21
3.2.5. Priprema otopina fosfatnog pufera	21
3.2.6. Priprema otopine doksorubicina.....	21
3.3. Priprava mikročestica	22

3.4.	Određivanje raspodjele veličine suhих mikročestica	23
3.5.	Bubrenje mikročestica	23
3.6.	Ugradnja lijeka u mikročestice	24
3.7.	Metode karakterizacije materijala	25
3.7.1.	Rendgenska difrakcijska analiza, XRD	25
3.7.2.	Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, FTIR	26
4.	REZULTATI I RASPRAVA	27
4.1.	Dobivanje CHT-Cu/HAp mikročestica procesom elektroštrecanja	27
4.2.	Veličina i oblik suhих mikročestica	29
4.3.	XRD analiza	30
4.3.1.	FTIR analiza	32
4.4.	Stupanj bubrenja mikročestica	34
4.5.	Ugradnja antitumorskog lijeka u mikročestice	36
4.5.1.	Pretražna fluorescentna mikroskopija	37
4.5.2.	Procjena ugradnje lijeka u mikročestice	39
5.	ZAKLJUČAK	43
6.	POPIS SIMBOLA	44
7.	LITERATURA	46
	ŽIVOTOPIS	53

1. UVOD

Rak uključuje niz bolesti koje nastaju kao rezultat nekontroliranoga rasta malignih stanica, koje imaju potencijal za širenje na druge dijelove tijela. Jedna od mogućnosti liječenja raka je primjena kemoterapije, međutim štetni učinci izazvani administriranjem kemoterapijskih lijekova na zdrava tkiva i organe glavni su razlog smrtnosti pacijenata oboljelih od raka. Osim toga, potrebne su i velike doze lijeka, što dovodi do povećane toksičnosti u zdravim stanicama i do povećane rezistencije na lijekove. Stoga, poželjno je razviti terapijske sustave koji će pasivno ili aktivno ciljati tumorske stanice i na taj način smanjiti neželjene nuspojave i poboljšati terapijsku učinkovitost. U posljednjih nekoliko godina, istražuju se nove metode za pripravu sustava za ciljanu i lokalnu dostavu lijeka na mjesto tumora s kontroliranim otpuštanjem i poboljšanom terapijskom učinkovitošću, a koji se temelje na kompozitnim mikročesticama. Kompozitne mikročestice su vrste sustava koji se sastoje od dva ili više različitih materijala te nude nekoliko prednosti u odnosu na tradicionalne sustave za isporuku lijeka, a kao što su poboljšana stabilnost, kontrolirano otpuštanje lijeka te ciljana dostava. Mikročestice na temelju kitozana imaju raznovrsnu primjenu kao pametni sustavi za dostavu lijeka i gena s kontroliranim otpuštanjem u području biomedicine i inženjerstva tkiva, te u prehrambenoj i poljoprivrednoj industriji [1].

Kitozan je drugi najzastupljeniji polisaharid u prirodi dobiven iz hitina, koji se uglavnom nalazi u egzoskeletima insekata i ljušturama rakova. Ovaj biopolimer ima povoljne karakteristike, uključujući biokompatibilnost, biorazgradljivost, bioaktivnost i netoksičnost. Osim toga, dokazano je da je kitozan bakteriostatik i fungistatik, te da ima protuupalne i antioksidativne učinke. Na temelju ovih karakteristika, kitozan je privukao sve veću pozornost znanstvenika za razvoj materijala temeljenih na kitozanu za biomedicinske primjene, osobito kao sustave za dostavu lijeka. Hidroksilne i amino skupine, prisutne u strukturi kitozana, odgovorne su za njegovu kemijsku reaktivnost, topljivost i bioaktivnost. Kitozan je netopljiv u vodi, ali u razrijeđenim kiselim otopinama dolazi do protoniranja amino skupina ($-\text{NH}_3^+$) pri čemu kitozan postaje pozitivno nabijen te topljiv. Također, kitozan kao polikation može ostvariti interakcije s negativno nabijenim staničnim membranama mikroorganizama, što objašnjava njegov antimikrobni učinak [2].

Nadalje, kitozan može tvoriti komplekse s ionima prijelaznih metala različitim mehanizmima. Glavnu ulogu u stvaranju kompleksa između kitozana i metalnih iona imaju atomi dušika i kisika amino i hidroksilnih skupina u polimeru (uslijed prisutnosti slobodnih elektronskih parova) koji mogu ostvariti interakcije s metalnim ionima. Budući da je kitozan jaki kelatni agens, kompleksi kitozan-metalni ion imaju veliku važnost u medicini i farmaceutskoj industriji [1].

Cilj ovoga rada je priprava i karakterizacija kompozitnih mikročestica na temelju kompleksa kitozan-metalni ion (polimerna matrica) uz dodatak anorganske faze primjenom metode elektroštrcanja. Uz to, ispitat će se mogućnost inkapsulacije antitumorskog lijeka (doksorubicina) u pripremljene mikročestice kao potencijalne sustave za ciljanu dostavu lijeka pri liječenju tumora kosti.

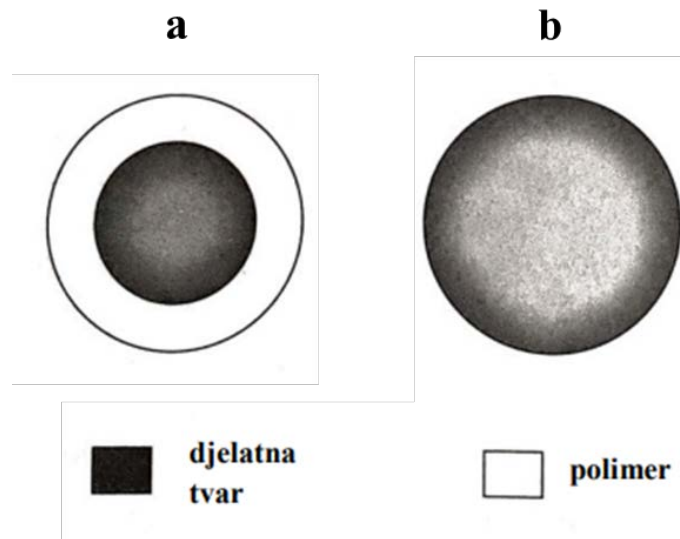
2. OPĆI DIO

2.1. Kompozitne mikročestice

Kompozitni materijali sastavljeni su od dvije ili više različitih komponenata, pri čemu svaka komponenta doprinosi krajnjim svojstvima kompozita. Sastoje se od jedne kontinuirane faze, matrice, koja obuhvaća jednu ili više diskontinuiranih faza, punila. Ovi materijali se obično kombiniraju kako bi se iskoristila jedinstvena svojstva svake komponente, a što rezultira materijalom s poboljšanim svojstvima. Matrica služi kako bi se zaštitilo punilo od vanjskih utjecaja, a punila se koriste za poboljšanje mehaničkih svojstava kompozitnih materijala. Kompozitni materijali se mogu podijeliti s obzirom na vrstu matrice na kompozite s metalnom, keramičkom ili polimernom matricom [3]. Nadalje, jedna od najčešćih primjena kompozitnih materijala u obliku mikročestica je u području dostave lijekova. U ovoj se primjeni kompozitne mikročestice koriste za inkapsulaciju te kontrolirano otpuštanje lijeka tijekom vremena. Na temelju toga, mogu se dizajnirati sustavi od biorazgradljivog polimera s ugrađenim lijekom koji će se otpuštati određenom brzinom, pružajući trajni terapijski učinak. Kontroliranjem veličine i oblika mikročestica, isporuka lijeka može se usmjeriti na određena tkiva ili stanice. Sinteza takvih mikročestica može biti izazovna jer često zahtjeva preciznu kontrolu nad veličinom, oblikom i sastavom čestica. Međutim, napredak u znanosti o materijalima omogućio je stvaranje sve složenijih kompozitnih mikročestica sa širokim rasponom primjena [4].

Mikročestice su vrsta terapijskih sustava reda veličine od nekoliko mikrometara do nekoliko stotina mikrometara, a razlikuju se po obliku (sferičnosti), morfologiji i raspodjeli veličine čestica. Što je faktor sferičnosti bliže 1, može se govoriti o pravilnijem obliku čestica, odnosno mikrosferama. Također, mikročestice se ovisno o smještaju uklopljene djelatne tvari dijele se na mikrokapsule i mikrosfere (slika 1). U tom slučaju, mikrosfere su mikročestice kod kojih je djelatna tvar homogeno ili heterogeno dispergirana u polimernoj matrici, dok je kod mikrokapsula djelatna tvar smještena u jezgri obavijenoj ovojnicom od makromolekularne tvari (npr. želatina, škrob, celulozni acetat) [5,6]. Osnovna razlika između mikrosfera i mikrokapsula je ta što su mikrosfere pune, a mikrokapsule šuplje.

Za svaku primjenu potrebno je odabrati odgovarajuća svojstva mikročestica, a glavni cilj sustava za dostavu lijeka jest sama dostava lijeka na odgovarajuće mjesto te reguliranje količine, brzine i vremena njegova oslobađanja kako bi se spriječile neželjene posljedice. Mikročestice kao sustavi za dostavu lijeka mogu produljiti životni vijek aktivnih tvari i kontrolirati otpuštanje bioaktivnih tvari na specifičnom mjestu [6].



Slika 1. Mikro kapsule (a), mikrosfere (b) [5].

U današnje vrijeme polimerni kompoziti su vrlo istraživani jer su se pokazali kao podobni materijali za dobivanje mikročestica različitim metodama pripreve. Polimerne mikročestice su čvrsti, biokompatibilni, koloidni i često biorazgradljivi sustavi. Jedan su od najjednostavnijih oblika mekih materijala koji se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu. Njihova jednostavna sinteza i strukturna modifikacija omogućuje dizajniranje materijala željenih svojstava. Najčešće su površinske modifikacije koje omogućuju poboljšanje učinkovitosti administriranja i biodistribucije lijeka, te smanjenje pojave nekontroliranog oslobađanja lijeka. Polimerne mikročestice mogu se izraditi od sintetskih polimera, kao što su poli(mliječna kiselina) (PLA), poli(mliječna-*co*-glikolna kiselina) (PLGA), poli(stiren-anhidrid maleinska kiselina), ili iz prirodnih polimera, kao što su želatina, dekstran, guma, kitozan i kolagen [7].

Tijekom posljednjih nekoliko desetljeća, kompozitne mikročestice naširoko su istraživane kao sustavi za dostavu lijekova. Pažljivom manipulacijom omjera lijeka i polimera, molekulske mase i prirode polimera, može se kontrolirati količina otpuštanja lijeka iz mikročestica za učinkovito liječenje bolesti [7].

2.2. Metode dobivanja kompozitnih mikročestica

Odabir metode pripreme mikročestica ovisi o različitim čimbenicima, poput željene veličine i oblika čestica, toplinske i kemijske stabilnosti aktivne tvari (lijeka), stabilnosti konačnog produkta i konačnoj toksičnosti krajnjeg produkta [6].

Postoji nekoliko metoda za pripremu čestica [8]:

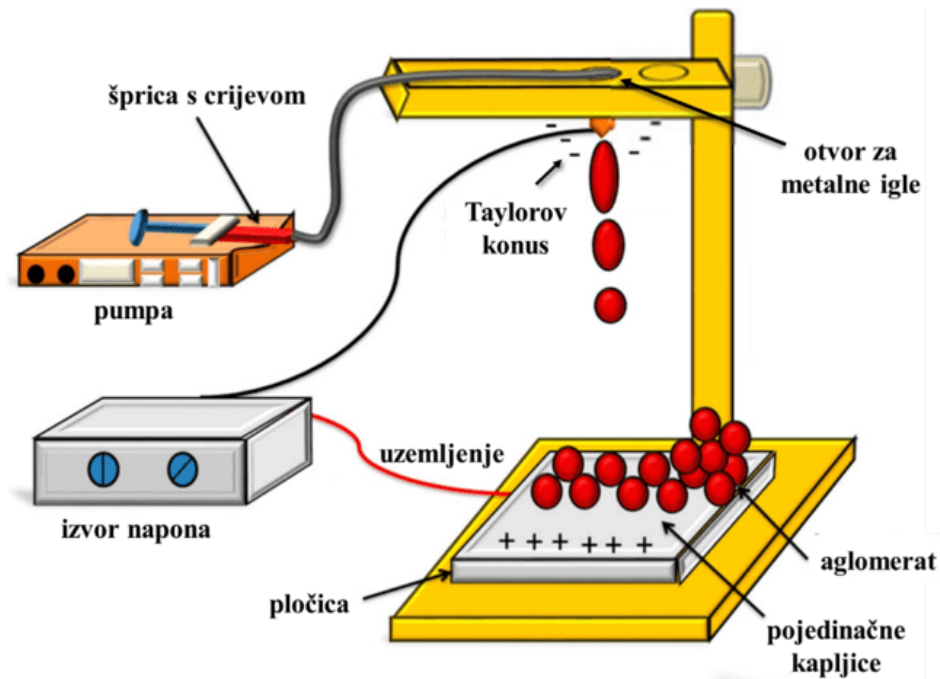
- metoda jednostruke emulzije
- metoda dvostruke emulzije
- polimerizacijska metoda
- metoda sušenje raspršivanjem
- metoda isparavanja otapala
- elektroštrcanje

U eksperimentalnom dijelu rada kao metoda pripreme kompozitnih mikročestica korištena je metoda elektroštrcanja.

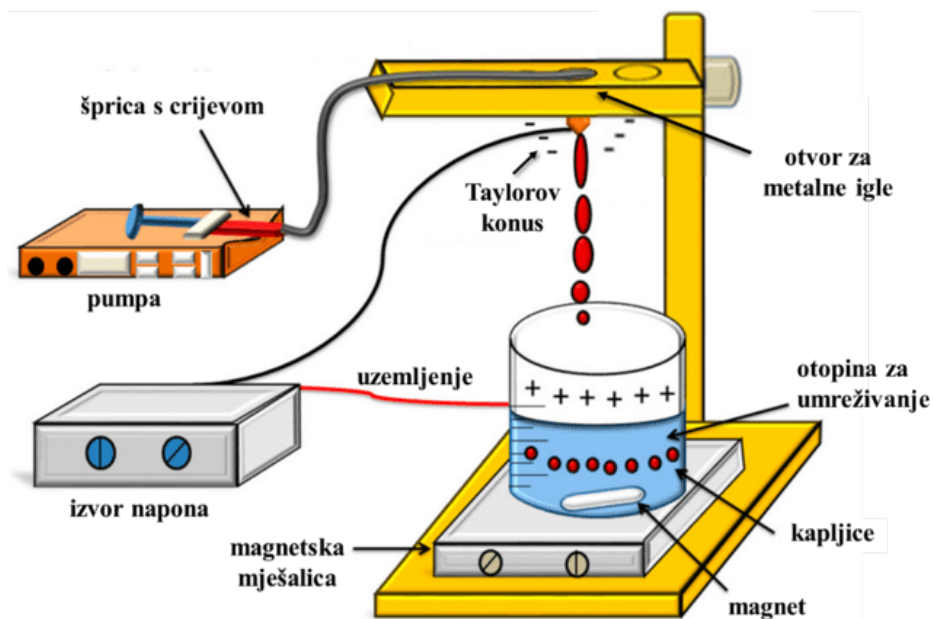
2.3. Elektroštrcanje

Elektroštrcanje ili elektrohidrodinamička atomizacija (engl. *electrospraying* ili *electrohydrodynamic atomization*) je moderan proces u jednom koraku za dobivanje nano- i mikročestica, šupljih ili čvrstih struktura u rasponu veličina od desetaka nanometara do nekoliko mikrometara. Osnovni princip procesa temelji se na primjeni visokog napona na kapljicu otopine koja izlazi iz igle. Djelovanjem napona stvara se elektrostatska sila unutar kapljice (Coulombova sila) koja se natječe s površinskom napetosti (kohezivna sila) kapljice pri čemu se formira Taylorov konus, koji je karakteristična pojava nabijene otopine. Naposljetku, elektrostatska sila nadvlada površinsku napetost i kapljica se raspada na manje kapljice. Nastale manje kapljice dobro su raspršene s uskom raspodjelom veličina i ne spajaju se tijekom svog putovanja prema kolektoru zbog djelovanja Coulombovog zakona o odbijanju istovrsnih naboja [9].

S obzirom na vrstu kolektora korištenog za sakupljanje nastalih kapljica postoje dvije vrste izvedbe aparature: elektroštrcanje na pločici (slika 2) i elektroštrcanje u otopini (slika 3). Elektroštrcanje na pločici temelji se na sakupljanju nabijenih kapljica na pločici, pri čemu se kapljice mogu taložiti pojedinačno ili kao nakupina kapljica (aglomerat). Elektroštrcanje u otopini temelji se na sakupljanju nabijenih kapljica u otopini za umreživanje kako bi se olakšalo stvaranje mikro- i nanosfera [10].



Slika 2. Metoda elektroštrcanja na pločici [10].



Slika 3. Metoda elektroštrcanja u otopini [10].

Metoda elektroštrcanja smatra se jednom od najboljih opcija za pripremu mikro- i nanočestica u odnosu na konvencionalne metode. Neke od prednosti procesa elektroštrcanja su: mogućnost korištenja polimera visoke molekulske mase, korištenje manjeg broja organskih otapala te nije potrebna upotreba površinskih aktivnih tvari (surfaktanata). Proces elektroštrcanja provodi se u jednom koraku, jednostavan je, jeftin, ponovljiv te se provodi pri sobnim uvjetima i stvara manje štetne produkte. Iako je metoda jednostavna, moraju se uzeti u obzir kontrolne varijable kako bi se dobile čestice željenih veličina. Neki od parametara koji utječu na dobivanje čestica željenih svojstava vezanih uz otopinu polimera su brzina protoka, koncentracija i viskoznost otopine, električna vodljivost i površinska napetost otopine te molekulska masa polimera. Također, primijenjeni električni napon i udaljenost kolektora od vrha igle utječu na krajnja svojstva materijala, a u nastavku rada će biti detaljnije opisani [10].

Brzina protoka jedan je od važnijih parametara koji utječe na morfologiju i veličinu čestica, a posljedično i na disperziju lijeka unutar polimerne matrice te otpuštanje lijeka. Shodno tome, dobivanjem čestica sferičnog oblika te većeg omjera površine i volumena, distribucija lijeka se može preciznije kontrolirati, te prilagoditi željenoj primjeni. Nadalje, za kontrolu oblika i veličine čestica, potrebno je uzeti u obzir i učinkovito isparavanje otapala, koje pak ovisi o udaljenosti kolektora od vrha igle. Mala udaljenost između kolektora i vrha igle dovodi do stvaranja velikih čestica jer sprječava da otapalo ispari u potpunosti, ali ako je udaljenost znatna (15–20 cm), isparavanje otapala je veće i stvaraju se manje čestice. Osim toga, velika brzina protoka dovodi do stvaranja većih čestica jer otapalo ne može ispariti u potpunosti. Zhou i suradnici [11], ispitivali su utjecaj različitih brzina protoka na veličinu čestica. Metodom elektroštrcanja pripravili su mikrosfere poli(ϵ -kapolaktona) (PCL) pri različitim brzinama protoka od 0,3 mL h⁻¹, 0,6 mL h⁻¹ i 0,9 mL h⁻¹. Dobiveni rezultati pokazali su da se veličina nastalih čestica povećava s porastom brzine protoka. To ukazuje da se veličina čestica može učinkovito kontrolirati brzinom protoka otopine.

Električna vodljivost otopine polimera važan je parametar jer proces elektroštrcanja ovisi o elektrostatskom privlačenju nabijenih čestica prema suprotno nabijenom kolektoru. Zajedno s brzinom protoka, električna vodljivost otopine kontrolira veličinu čestica, pri čemu veća vodljivost dovodi do smanjenja veličine nastalih čestica. Veća vodljivost otopine podrazumijeva da mlaz elektroštrcanja nosi više naboja [9].

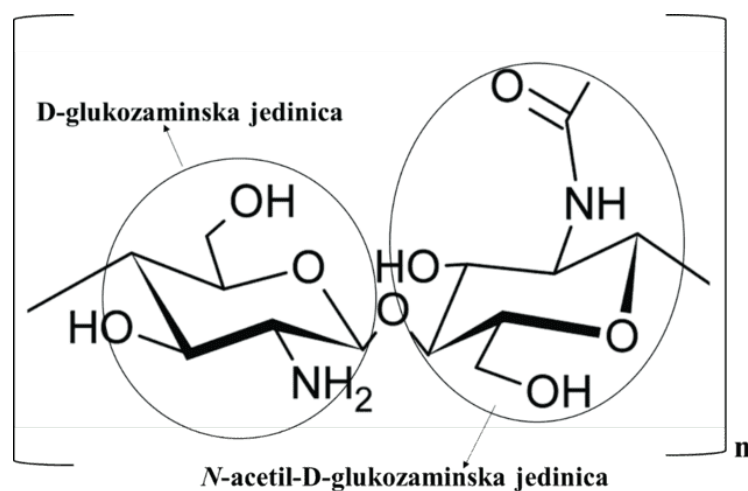
Viskoznost otopine bitan je parametar za dobivanje čestica željenog promjera i povezana je s koncentracijom otopine polimera, pH vrijednosti i temperaturom. Povećanjem koncentracije otopine polimera povećava se i viskoznost te se dobivaju veće čestice.

Moghadam i suradnici [12] proučavali su odnos koncentracije i viskoznosti otopine natrijevog alginata primjenom metode elektroštrcanja. Rezultati su pokazali da se povećanjem koncentracije otopine natrijevog alginata od 10 do 30 g L⁻¹ viskoznost otopine povećava, što u konačnici dovodi do povećanja veličine nastalih mikrosfera natrijevog alginata.

Metoda elektroštrcanja počela se koristiti u biomedicini za pripremu sustava za dostavu lijekova temeljenih na mikro- i nanočesticama, tj. uslijed potrebe inkapsuliranja lijekova u čestice koje omogućuju produljeno i kontrolirano otpuštanje lijeka. U ovom radu, naglasak je stavljen na proizvodnju mikročestica na temelju polimerne matrice kitozana uz dodatak anorganskog punila hidroksiapatita primjenom procesa elektroštrcanja.

2.4. Kitozan

Kitozan je prirodni biopolimer koji se dobiva alkalnom deacetilacijom hitina, a koji se nalazi u ljušturama člankonožaca kao što su škampi, rakovi i jastozi. To je linearni polisaharid sastavljen od dvije vrste ponavljajućih monomernih jedinica: *N*-acetil-D-glukozaminska (acetilirana) i D-glukozaminska (deacetilirana) strukturna jedinica, pri čemu D-glukozaminska jedinica ima jednu amino (–NH₂) i dvije slobodne hidroksilne skupine (–OH) u svakoj C₆-gradivnoj jedinici (slika 4). Kitozan, zbog slobodnih amino skupina, nosi pozitivan naboj i reagira s mnogim negativno nabijenim polimerima, a također se podvrgava keliranju s metalnim ionima [13,14].



Slika 4. Struktura kitozana [14].

Kitozan je slaba baza, netopljiv u vodi i organskim otapalima, ali je topljiv u razrijeđenim kiselinama kao što su octena i mravlja kiselina. Stupanj deacetilacije i molekulska masa polimera važne su karakteristike koje utječu na svojstva farmaceutskih formulacija na temelju kitozana. Svojstva kao što su biorazgradljivost, netoksičnost i dobra biokompatibilnost čine ga prikladnim za upotrebu u biomedicinskoj i farmaceutskoj industriji [13,15].

2.4.1. Stupanj deacetilacije

Deacetilacija hitina provodi se kemijskom hidrolizom u alkalnim uvjetima ili enzimskom hidrolizom u prisutnosti određenih enzima. To je proces u kojem dolazi do uklanjanja acetilnih skupina iz lanca hitina, pri čemu zaostaje amino skupina, te u konačnici nastaje kitozan [14]. Stupanj deacetilacije kitozana (engl. *degree of deacetylation*, *DD*), koji ukazuje na broj amino skupina u lancu, izračunava se kao omjer D-glukozaminskih prema zbroju D-glukozaminskih i *N*-acetil-D-glukozaminskih jedinica:

$$DD = 100 \cdot \frac{n_{\text{GlcN}}}{n_{\text{GlcN}} + n_{\text{GlcNAc}}} \quad (1)$$

gdje je n_{GlcN} prosječan broj D-glukozaminskih jedinica, a n_{GlcNAc} prosječan broj *N*-acetil-D-glukozaminskih jedinica. Stupanj deacetilacije važan je parametar koji utječe na fizikalno-kemijska i biološka svojstva kitozana, kao što su kristalnost, hidrofilnost, biorazgradljivost, sorpcijska svojstva te na sposobnost keliranja s metalnim ionima. Mnoga istraživanja [16,17] pokazala su da kitozan s višim vrijednostima *DD* pokazuje jače biološke učinke zbog prisutnosti većeg broja amino skupina u molekuli. Stupanj kristalnosti, odnosno uređenost strukture materijala veća je što je stupanj deacetilacije veći [16,17].

Najniža vrijednosti stupnja deacetilacije kitozana u literaturi varira i kreće se od 40 do 60 %, a većina komercijalnih kitozana imaju vrijednosti između 70 i 90 %. Za posebne biomedicinske primjene, može se pripremiti kitozan sa stupnjem deacetilacije većim od 95 % putem daljnjih koraka deacetilacije. Ovakvi postupci osim što povećavaju cijenu pripreme, također često rezultiraju djelomičnom depolimerizacijom [16,18].

Za određivanje stupnja deacetilacije mogu se koristiti različite metode, poput infracrvene (IR) spektroskopije, UV-Vis spektroskopije, pH-potenciometrijske titracije, ^1H NMR i ^{13}C NMR spektroskopije. Najčešće metode su IR i NMR spektroskopija i pH-potenciometrijska titracija. Najbolju točnost ima NMR metoda, međutim visoki troškovi ograničavaju njezinu primjenu. pH-potenciometrijska titracija je jedna od najjednostavnijih metoda i koristi se dugi niz godina zbog niske cijene reagensa i jednostavne opreme [17,18].

2.4.2. Molekulska masa

Molekulska masa (engl. *molecular weight*, M_w) je još jedan bitan parametar koji utječe na bioaktivnost kitozana. Ona može varirati ovisno o izvoru kitozana, njegovom načinu pripreme i stupnju deacetilacije. Može se odrediti pomoću različitih metoda kao što su kromatografija, viskozimetrija i raspršenje svjetlosti. Većina komercijalnih kitozana ima molekulska masu u rasponu od 50 do 2000 kDa [19].

Molekulska masa utječe na fizikalno-kemijska i mehanička svojstva kitozana, također i na svojstva biomaterijala koji se temelje na kitozanu [13]. U biomedicinskim primjenama, pokazalo se da kitozan molekulskih masa većih od 60 kDa ima sporiju brzinu razgradnje. S druge strane, kitozan niže molekulske mase (manja od 15 kDa) ima bolje antimikrobno djelovanje, veću topljivost i bioaktivnost. Nadalje, studije su pokazale da se otpuštanje lijeka iz mikrosfera kitozana smanjuje s povećanjem molekulske mase kitozana. To su utvrdili Shiraishi i suradnici (1993.) [13], tako što su istraživali utjecaj molekulske mase kitozana na otpuštanje i brzinu apsorpciju indometacina iz sferičnog kitozanskog mikrogela.

2.4.3. Svojstva kitozana

U posljednjih nekoliko desetljeća mnoge znanstvene studije bave se ispitivanjem svojstava kitozana, prvenstveno zbog njegove dostupnosti u prirodi i raznolikosti njegovih svojstava. Posebice zbog njegove biokompatibilnosti i biorazgradljivost provedena su brojna istraživanja primjene kitozana u medicinske i farmaceutske svrhe. Za razliku od mnogih sintetskih polimera, kitozan se prirodnim procesima može razgraditi u netoksične tvari, poput oligosaharida različitih duljina, koji se mogu ugraditi u metaboličke puteve ili dalje izlučivati.

Brzina razgradnje kitozana povezana je sa stupnjem deacetilacije i molekulskom masom polimera. Odnos između biorazgradljivosti kitozana i stupnja deacetilacije također ovisi i o kristalnosti jer je kitozan polukristaliničan polimer. Stoga, povećanjem stupnja deacetilacije povećava se i njegova kristalnost što rezultira smanjenjem brzine razgradnje. S druge pak strane učinkovitije se razgrađuje kitozan manje molekulske mase od kitozana veće molekulske mase [20,22,23].

Utvrđeno je da kitozan ima i antimikrobna svojstva protiv širokog spektra mikroorganizama, uključujući bakterije, gljivice i viruse. To je posljedica njegove kationske prirode koja mu omogućuje interakciju s negativno nabijenim supstancama na površini stanica kao što su proteini, masne kiseline i fosfolipidi [20,21].

Također, važno svojstvo je i njegova sposobnost stvaranja gelova i filmova. Ovo svojstvo proizlazi iz sposobnosti makromolekula da stvaraju jake, reverzibilne veze jedna s drugom kroz vodikovu vezu i elektrostatske interakcije. Gelovi i filmovi kitozana imaju niz korisnih svojstava, uključujući visoku sposobnost zadržavanja vode, dobru mehaničku čvrstoću i izvrsnu biokompatibilnost. Ova svojstva čine ih korisnim u različitim primjenama, uključujući dostavu lijekova, zacjeljivanje rana i regeneraciju koštanog tkiva [20,24].

Potrebno je spomenuti i viskoznost otopine kitozana na koju utječu različiti čimbenici kao što su koncentracija otopine, temperatura, pH vrijednost i molekulska masa polimera. Viskoznost otopine kitozana raste s povećanjem koncentracije, zbog jačih interakcija između molekula polimera. Također, pri niskim temperaturama otopine kitozana postaju viskoznije, dok se pri višim temperaturama viskoznost smanjuje. Budući da viskoznost otopine kitozana utječe na proces elektroštrcanja potrebno je osigurati da polimerna otopina bude što manje viskozna kako bi se procesom elektroštrcanja dobile što manje mikročestice [20,25].

Nadalje, prisutnost amino skupina ($-NH_2$) u strukturi kitozana daje ovom polimeru osebujna svojstva. Amino skupine u lancima makromolekula se protoniraju ($-NH_3^+$) u kiselom mediju, što rezultira topljivim polikationom koji ima visoku gustoću naboja. Zbog prisutnosti pozitivnog naboja, kitozan može tvoriti komplekse s drugim (bio)polimerima koji imaju ukupni negativni naboj (npr. polianionske nukleinske kiseline). Također, makromolekule kitozana koje sadrže velik broj amino i hidroksilnih skupina mogu formirati komplekse s ionima prijelaznih metala različitim mehanizmima kao što su keliranje, elektrostatsko privlačenje ili ionska izmjena, ovisno o metalnom ionu i pH otopine. Glavnu ulogu u stvaranju kompleksa između

kitozana i metalnih iona imaju atomi dušika i kisika, koji zbog svojih slobodnih elektronskih parova mogu ostvariti interakcije s metalnim ionima [14,20,26].

Mikročestice na temelju kitozana koriste se za kontrolirano otpuštanje mnogih lijekova i za poboljšanje biorasploživosti razgradljivih tvari (npr. proteina) te za poboljšanje unosa hidrofilnih tvari preko epitelnih slojeva. Kako bi se poboljšala svojstva kitozana, u novije vrijeme se u kitozansku matricu dodaju različiti (terapeutski) metalni ioni s kojima polimer stvara komplekse.

2.5. Interakcije metalnih iona s kitozanom

Kitozan pokazuje veliki afinitet prema mnogim metalnim kationima koji se keliranjem mogu vezati na amino i hidroksilne skupine kitozana. Alkalijski i zemnoalkalijski metali, zbog nepostojanja d i f nezasićenih orbitala, slabije tvore komplekse s kitozanom. Međutim, kitozan najveći afinitet ima prema prijelaznim metalima poput Cu^{2+} , Zn^{2+} , Ag^+ koji posjeduju antimikrobna svojstva. Stoga, priprema kompleksa kitozan–metalni ion omogućuje dobivanje materijala boljih antimikrobnih svojstava koja će biti od velike važnosti u biomedicini i farmaceutskoj industriji [29].

U proteklih nekoliko desetljeća, velik broj istraživanja proučavao je interakcije između metalnih iona i kitozana. Istraživanja su provedena u mnogim aspektima, uključujući različite mehanizme, selektivnu adsorpciju, složenu strukturu, adsorpcijsku termodinamiku i kinetiku te toplinska svojstva kompleksa. Najčešće korištene tehnike analize nastalih kompleksa su: ^{13}C NMR spektroskopija, rendgenska fotoelektronska spektroskopija (XPS), diferencijalna pretražna kalorimetrija (DSC) i termogravimetrijska analiza (TGA) [30].

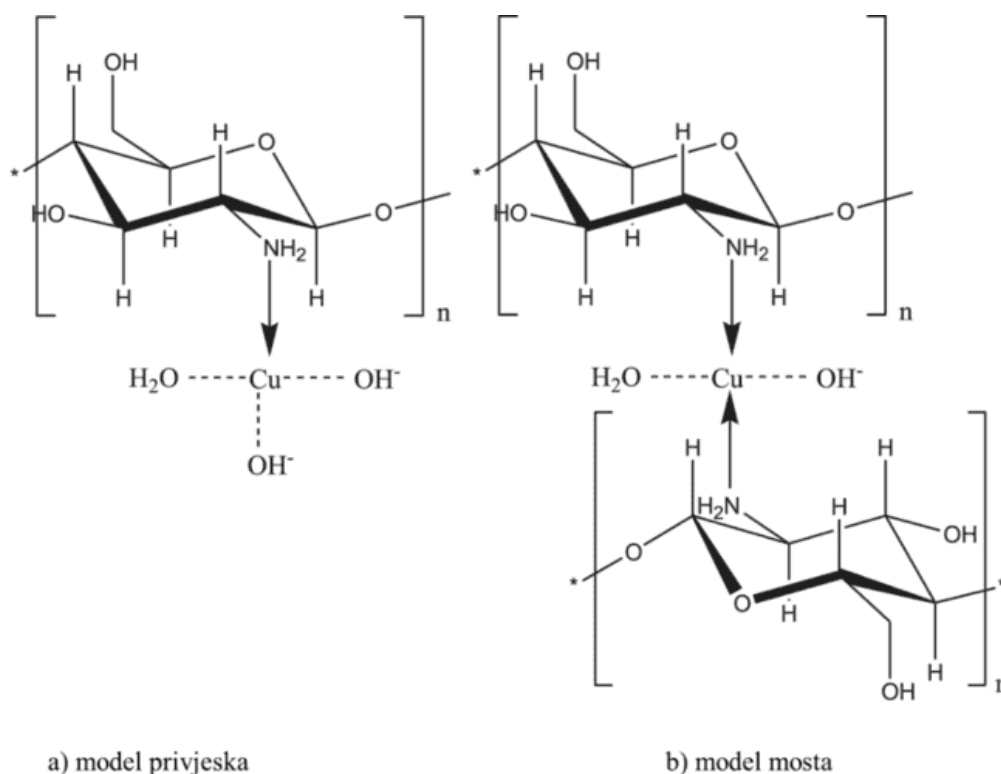
U eksperimentalnom dijelu rada provedeno je keliranje kitozana s bakrovim(II) ionom, te su u nastavku rada opisani mogući mehanizmi keliranja između iona bakra i kitozana.

2.5.1. Kompleks kitozana i bakra

Pojam „keliranje“ potječe od grčke riječi *chele* koja u prijevodu znači „klijštenje jastoga“, opisujući tako koncept čvrstog stiska između molekula. U kemijskom smislu, keliranje je postupak stvaranja kelatnog kompleksa u kojem je metalni atom povezan s dva ili više atoma unutar jednog liganda. Riječ „kelat“ prvi put su upotrijebili Sir Gilbert, T. Morgan i H. D. K. Drew 1920. godine. Predložili su taj pojam za skupine (ligande) koje su pričvršćene za središnji atom, čineći tako heterociklički prsten. Spojevi koji posjeduju skupine koje mogu ostvariti interakcije sa središnjim metalnim ionima (ligandi) nazivaju se kelatni agensi, a to su najčešće organski spojevi (etilendiamintetraoctena kiselina (EDTA), limunska kiselina, aminokiseline) [31].

U slučaju stvaranja kompleksa kitozan-bakar(II) proces keliranja odvija se interakcijom između amino skupina kitozana i metalnih iona, pri čemu se stvaraju koordinacijske veze, te se u konačnici formira stabilan kelatni spoj koji ima jedinstvena svojstva u usporedbi sa samim kitozansom i metalnim ionom. Kelati na temelju kitozana istraživani su zbog njihove potencijalne primjene u liječenju raka. Kitozan i njegovi derivati imaju nisku toksičnost za stanice sisavaca, dok metalni kompleksi, poput bakrovih, pokazuju visoku toksičnost. Stoga, pripremom materijala određenog sastava kompleksa kitozan-metal moguće je dobiti materijal s antitumorskim djelovanjem. Postizanjem idealnog omjera kitozan-metal smanjuje se toksičnost samog metala na zdrave stanice, te se pospješuje djelovanje cjelokupnog kompleksa na stanice raka i sprječavanje njihovog daljnjeg širenja. Shodno tome, kompleksi na temelju kitozana i metalnog iona pokazuju antioksidativna i antimikrobna svojstva te se mogu koristiti pri zacjeljivanju rana. Pokazuju i veliki potencijal kao sustavi za isporuku lijekova zbog jedinstvenih svojstava poput kontroliranog otpuštanja, ciljane isporuke, povećane stabilnosti lijeka, poboljšane učinkovitosti lijeka, biorazgradljivosti i smanjene toksičnosti [29,32-34].

Većina studija [31,35] koje proučavaju mehanizme keliranja usredotočena je na interakcije između iona bakra i kitozana. Bakar je jedan od prijelaznih metala koji ima jaku sposobnost stvaranja kelata s aminima. Postoji nekoliko mogućih modela interakcije između kitozana i bakrova(II) iona. Prvi model („model privjeska“) govori da je Cu^{2+} ion povezan s jednom amino skupinom u obliku privjeska (slika 5a), dok drugi model („model mosta“) govori da Cu^{2+} ion stupa u interakcije s dvije ili više amino skupina (slika 5b) [26].



Slika 5. Struktura kompleksa kitozan-bakar: **a)** model privjeska i **b)** model mosta [36].

Istaknuto je da kitozan s bakrom tvori dvije vrste kompleksa [36]:

- $[\text{Cu}(\text{NH}_2)]^{2+}$ koji nastaje pri pH vrijednosti 5,3 i
- $[\text{Cu}(\text{NH}_2)_2]^{2+}$ koji nastaje kada je pH vrijednost veća od 5,8.

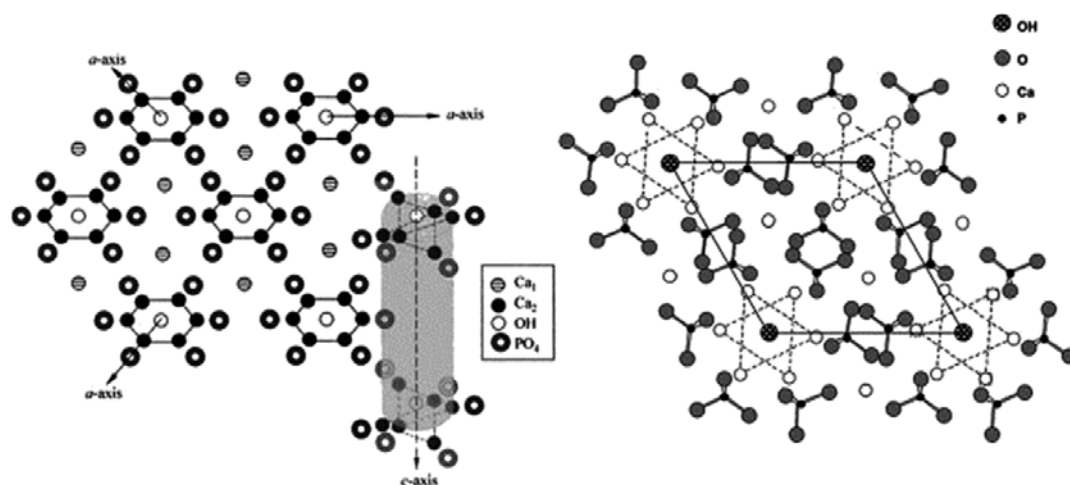
Živi organizmi zahtijevaju bakar u niskim koncentracijama kao kofaktor za metaloproteine i enzime. Koncentracija bakra veća od 30 ppm [37] inhibira rast bakterija i ima toksični učinak na većinu mikroorganizama. Ugradnja bakra u kitozan, mehanizmom keliranja, može pokazati povećanu sposobnost antibakterijskog učinka, što je vrlo povoljno za primjenu kompleksa kitozan-bakar u medicinskoj i prehrambenoj industriji, a osim toga pokazuju i antitumorsko djelovanje [38]. Gritsch i suradnici [39] pripremili su komplekse bakar(II)-kitozan kao antibakterijski materijal bez antibiotika i pokazali da ovaj materijal inhibira rast bakterija (*E. Coli* i *S. Carnosus*) te da ima snažnu antimikrobnu aktivnost bez značajnog oštećenja eukariotskih stanica.

Kako bi se ispitao utjecaj poboljšanja efikasnosti ugradnje lijeka u pripravljene mikročestice na temelju kitozan- Cu^{2+} dodan je i hidroksiapatit, a o njegovim svojstvima i svrsi govorit će se u sljedećem poglavlju.

2.6. Hidroksiapatit

Hidroksiapatit (HAp) prirodni je mineralni oblik kalcijevog apatita (skupina fosfatnih minerala) koji izgrađuje kosti i zube. Iznimno je važan zbog svoje strukturne i kemijske sličnosti s fosfatima kostiju i jedan je od najstabilnijih derivata kalcijevih fosfatnih soli. Prirodni hidroksiapatit se obično ekstrahira iz bioloških izvora ili otpada kao što su kosti sisavaca (goveda, konja), riblje kosti, školjke, ljuske jajeta, te iz biljaka i algi, te također iz mineralnih izvora (vapnenac) [40].

Hidroksiapatit, kemijske formule $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, kristalizira u heksagonskoj slagalini. U strukturi, prikazanoj na slici 6, prisutno je deset atoma kalcija koji su smješteni u dva simetrijska položaja, Ca1 i Ca2. Četiri atoma kalcija u položaju Ca1 okružena su s devet atoma kisika iz PO_4^{3-} skupine, dok su preostalih šest atoma kalcija, koji zauzimaju položaj Ca2, okruženi s ukupno sedam atoma kisika, od koji šest pripadaju PO_4^{3-} skupinama, a jedan dolazi iz $-\text{OH}$ skupine. Stehiometrijski HAp u osnovi se sastoji od kalcija i fosfora s molarnim omjerom (Ca/P) jednakim 1,67. Što je molarni omjer bliži 1,67, veća je stabilnost hidroksiapatita, dok smanjenjem omjera dolazi do povećanja topljivosti i bioaktivnosti. HAp u prirodnoj kosti je zapravo nestehiometrijski i ima manjak kalcija te je njegov omjer Ca/P uvijek manji od 1,67, ali se koštanim stvrdnjavanjem taj omjer približava stehiometrijskom [41].



Slika 6. Kristalna struktura hidroksiapatita [41].

Zahvaljujući izvrsnoj bioaktivnosti, visokoj biokompatibilnosti i kemijskoj stabilnosti, HAp ima široku primjenu u biomedicini, regeneraciji kostiju i dostavi lijekova. U tkivnom inženjerstvu primjenjuje se kao koštano punilo u obliku prašaka ili poroznih blokova kako bi se popravili koštani defekti [40,41].

Istraživanja koja se bave primjenom hidroksiapatita u kompozitnim materijalima u stalnom su porastu. Brojni znanstvenici [41,42] proizveli su polimer/HAp sustave koji se mogu koristiti za regeneraciju koštanog tkiva, za liječenje raznih oštećenja kostiju (poput osteoporoze), te kao nosači lijeka. U većini polimernih kompozita, HAp se koristi kao sredstvo za osiguravanje mehaničke čvrstoće i bioaktivnosti kompozitnog materijala. Osim toga omogućuje i povećanje efikasnosti ugradnje lijeka unutar kompozita ostvarujući interakcije s lijekovima, kao što je doksorubicin preko kalcijevih iona i fosfatnih skupina. U mnogim istraživanjima [43,44] utvrđeno je da kitozan/hidroksiapatit kompozitni materijal, posjeduje izvrsna svojstva kao što su biokompatibilnost i antialergijska svojstva te poboljšana mehanička i kemijska svojstva [40,41].

2.7. Literaturni pregled

Wu i suradnici [45] metodom jednostruke emulzije pripremili su kompozitne mikročestice temeljene na kitozanu i paligorskitu, pri čemu je paligorskit modificiran s heksadecil betainom (BS-16), kako bi se poboljšala njegova kompatibilnost s kitozanom. Rezultati dobiveni u ovom radu vezani su uz stupanj bubrenja te su pokazali da pripravljene kompozitne mikročestice kitozan-poligorskit imaju veći stupanj bubrenja u usporedbi s mikročesticama čistog kitozana.

Liang i suradnici [42] pripravili su porozne hidroksiapatit-želatinske kompozitne mikročestice, metodom mokrog taloženja u kombinaciji s kitozanom kao potencijalne nosače lijeka doksorubicina. Pokazalo se da je provedena učinkovita ugradnja lijeka zahvaljujući kitozanu koji stvara vodikove veze između HAp-želatine i doksorubicina, te da je produljeno vrijeme otpuštanja lijeka.

Sivakumar i suradnici [46] istraživali su utjecaj hidroksiapatit-kitozan mikročestica pripremljenih metodom polimerizacije na profil otpuštanja antibiotika gentamicina. Pokazali su da pripravljene kompozitne mikročestice imaju sferičnu i poroznu prirodu te da je ostvarena uspješna ugradnja lijeka i njegovo produljeno vrijeme oslobađanja.

U ovome radu govorit će se o pripravi kompozitnih mikročestica na temelju kitozan-bakar(II) kompleksa uz dodatak hidroksiapatita kao potencijalnih nosača antitumorskog lijeka (doksorubicina) s ciljem povećanja efikasnosti ugradnje lijeka.

3. EKSPERIMENTALNI DIO

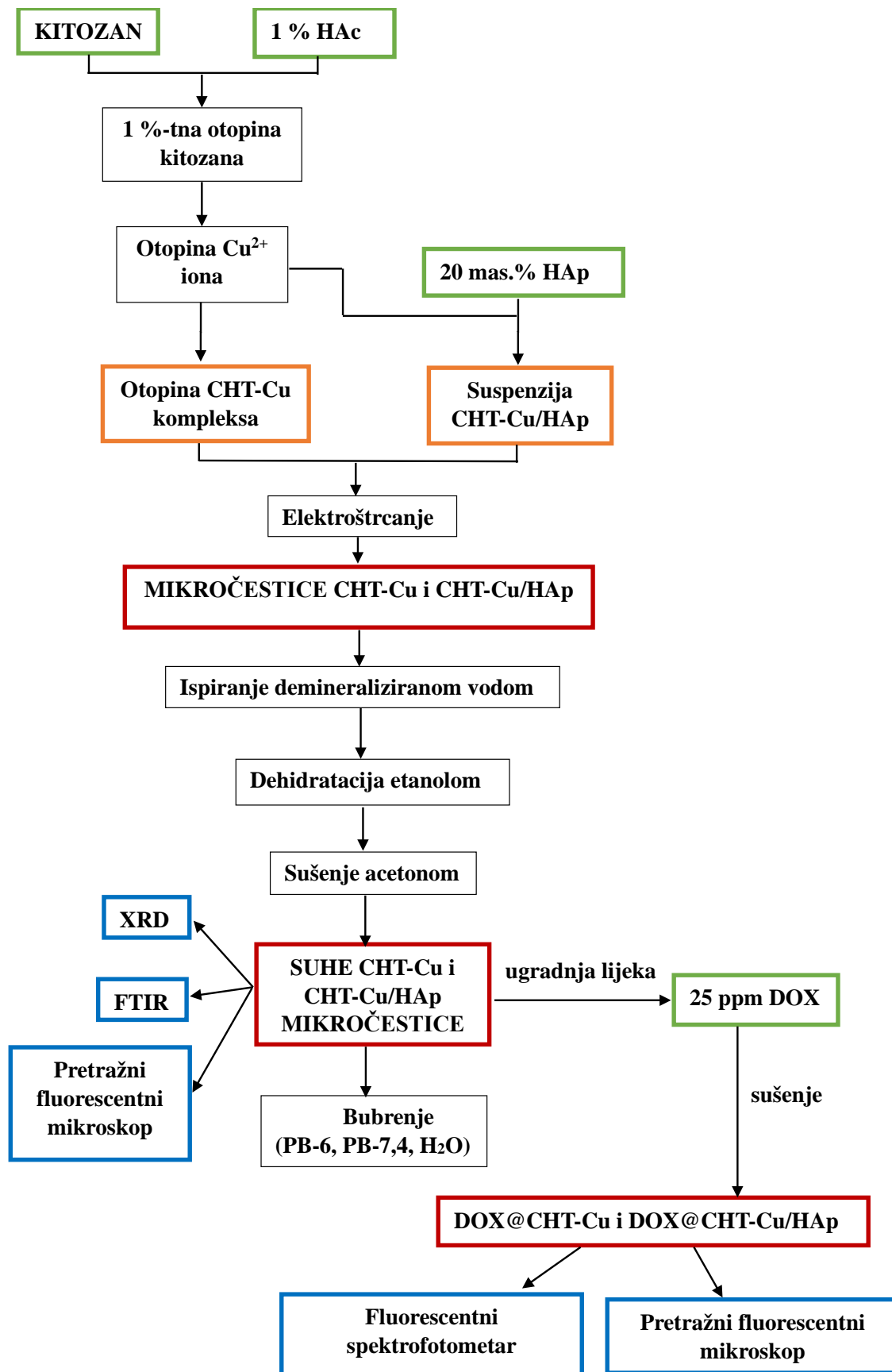
3.1. Materijali

Materijali korišteni u eksperimentalnom dijelu rada su:

- Kitozan (CHT, $DD = 83,2 \%$, viskoznost 1 %-tne otopine = 293 mPa s; Heppe Medical Chitosan GmbH, Halle (Saale), Njemačka)
- Bakrov(II) acetat monohidrat, $\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$ (Cu^{2+} ; BDH Prolabo, Belgija)
- Hidroksiapatit, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (HAp, dobiven precipitacijskom metodom)
- Octena kiselina, CH_3COOH (HAc, $\geq 99,8 \%$; Lach-Ner, Češka)
- Natrijev hidroksid, NaOH (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Etanol, $\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$ (96 % EtOH, LabExpert, Kefo d.o.o., Slovenija)
- Aceton, $\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$ ($\geq 99,5 \%$; Honeywell, Njemačka)
- Natrijev dihidrogenfosfat monohidrat, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ (AnalR NORMAPUR, Njemačka)
- Natrijev hidrogenfosfat bezvodni, Na_2HPO_4 (Gram-Mol d.o.o., Hrvatska)
- Doksorubicin HCl (DOX, BIOSYNTH Carbosynth, Ujedinjeno kraljevstvo)

3.2. Priprema otopina

U nastavku rada opisani su postupci pripreme otopina potrebnih za proces elektroštrcanja s ciljem dobivanja kompozitnih kitozan- Cu^{2+} /hidroksiapatit mikročestica. Shematski prikaz tijeka eksperimentalnoga dijela rada prikazan je na slici 7.



Slika 7. Shematski prikaz tijeka pripreme uzoraka i provedenih analiza.

3.2.1. Priprema polimerne otopine

Pripremljena je 1 %-tna otopina kitozana (CHT) otapanjem polimernog praha u 1 %-tnoj otopini octene kiseline te miješanjem brzinom 700 rpm tijekom jednog sata, pri sobnim uvjetima. Dobivena otopina kitozana zatim je filtrirana kako bi se uklonile moguće nečistoće i netopljivi dijelovi.

3.2.2. Priprema otopine kompleksa kitozana i bakrovog(II) iona

Otopina bakrovih(II) iona (Cu^{2+}) pripremljena je otapanjem bakrova(II) acetata monohidrata ($\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$) u demineraliziranoj vodi. Količina Cu^{2+} iona dodana je s obzirom na omjer amino skupina u kitozanu te Cu^{2+} iona, $n(-\text{NH}_2):n(\text{Cu}^{2+})=1:0,0916$.

Otopina kompleksa kitozan-Cu(II) pripremljena je miješanjem odgovarajućeg volumena otopine kitozana s otopinom Cu^{2+} iona. Volumni omjer otopine kompleksa iznosio je 7,33. Otopina se miješala tijekom 72 h pri sobnim uvjetima na magnetskoj miješalici brzinom 700 rpm, a pH vrijednost otopine iznosila je 4,2. Ova otopina kompleksa u nastavku rada označena je kao CHT-Cu.

3.2.3. Priprema suspenzije hidroksiapatita u otopini kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona

Priprema kompozita na temelju kompleksa kitozan-bakar(II) i hidroksiapatita, s 20 % masenog udjela hidroksiapatita u odnosu na suhu tvar kitozana, provedena je tako da je najprije pripravljena CHT-Cu otopina (na prethodno opisan način) te je nakon 2 h miješanja CHT-Cu otopine dodana određena količina hidroksiapatita. Nakon dodatka, pripremljena suspenzija se miješala ~70 h na magnetskoj miješalici (brzina 700 rpm) pri sobnim uvjetima te je uočeno da je došlo do djelomičnog otapanja hidroksiapatita. pH vrijednost pripremljene suspenzije iznosila je 4,9, a u nastavku rada označena je kao CHT-Cu/HAp.

3.2.4. Priprema otopine neutralizacijskog agensa

Otopina natrijevog hidroksida (NaOH) koncentracije $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ pripravljena je otapanjem odgovarajuće količine NaOH u demineraliziranoj vodi, te je korištena kao medij za geliranje tijekom procesa elektroštrcanja.

3.2.5. Priprema otopina fosfatnog pufera

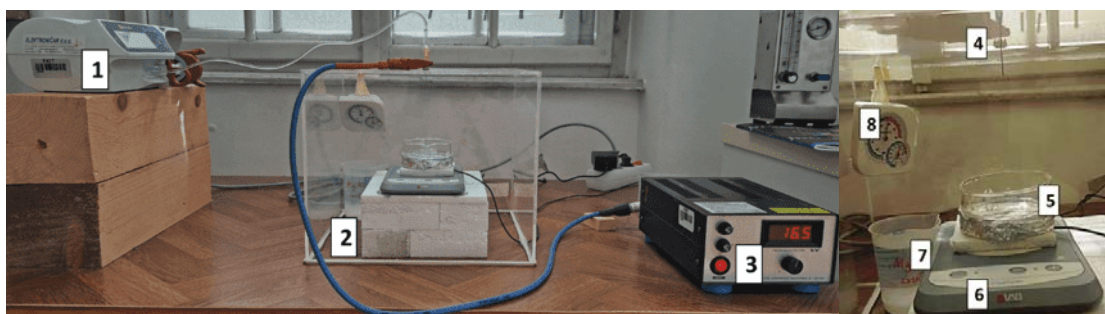
Otopine fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 i 7,4 pripravljene su otapanjem odgovarajućih količina natrijevog dihidrogenfosfata monohidrata, $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$ i bezvodnog natrijevog hidrogenfosfata, Na_2HPO_4 , u 200 mL demineralizirane vode. U 180 mL demineralizirane vode prvo je dodana jedna sol ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$), a po čijem potpunom otapanju je dodana i druga sol (Na_2HPO_4). Nakon što je nastala otopina, izmjerena je pH vrijednost otopine koja je po potrebi korigirana na željenu vrijednost dodatkom nekoliko kapi $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH otopine. Na kraju je dodana demineralizirana voda kako bi konačni volumen puferske otopine bio 200 mL. Otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 u daljnjem dijelu rada označena je kao PB-6, dok je otopina fosfatnog pufera pH vrijednosti 7,4 označena kao PB-7,4.

3.2.6. Priprema otopine doksorubicina

Kako bi se ispitala mogućnost ugradnje lijeka u pripremljene mikročestice, pripremljena je otopina antitumorskog lijeka doksorubicina (DOX) koncentracije 25 ppm. Otopina lijeka pripravljena je otapanjem određene količine doksorubicina u otopini PB-6 pri sobnim uvjetima i u mračnoj prostoriji jer je lijek podložan svjetlosnoj razgradnji [47].

3.3. Priprava mikročestica

Proces elektroštrcanja proveden je korištenjem aparature prikazane na slici 8 pri konstantnim procesnim uvjetima danim u tablici 1.



Slika 8. Aparatura za proces elektroštrcanja: (1) pumpa za injektiranje i šprica s otopinom, (2) PMMA komora, (3) generator visokog napona. U komori su: (4) metalna igla, (5) uzemljeni kolektor ($1,25 \text{ mol dm}^{-3}$ NaOH otopina u posudi za kristalizaciju s ravnim dnom izolirana aluminijskom folijom), (6) magnetska miješalica, (7) zasićena otopina $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ te (8) senzor temperature i relativne vlažnosti.

Tablica 1. Eksperimentalni uvjeti za proces elektroštrcanja

Parametri	Vrijednosti
Brzina protoka otopine	5 mL h^{-1}
Promjer igle ¹	22 i 23 G
Primijenjeni napon ²	$15,3 \pm 2,2$ i $16,7 \pm 1,6 \text{ kV}$
Udaljenost između vrha igle i kolektora	10 cm
Vrijeme trajanja procesa	60 min
Temperatura (u komori)	$25,8 \pm 0,7 \text{ }^\circ\text{C}$
Relativna vlažnost (u komori)	$63 \pm 8 \%$
Kolektor – otopina NaOH	50 mL, $1,25 \text{ mol dm}^{-3}$

¹ igla promjera 22 G korištena je u procesu elektroštrcanja CHT-Cu/HAp suspenzije, dok je igla promjera 23 G korištena za elektroštrcanje CHT-Cu otopine.

² primijenjeni napon od 15,3 kV korišten je kod elektroštrcanja CHT-Cu/HAp suspenzije, a napon od 16,7 kV za CHT-Cu otopinu.

Postupak elektroštrcanja proveden je na sljedeći način: u pumpu je postavljena šprica s pripremljenom otopinom kompleksa kitozan-Cu(II), odnosno suspenzijom kitozan-Cu(II)/hidroksiapatit (10 mL). Šprica je crijevom spojena na metalnu iglu s ravnim vrhom određenog promjera, ovisno o ispitivanoj otopini. Igla je bila pozitivno nabijena, dok je kolektor bio uzemljen. Staklena posuda u kojoj se nalazila otopina NaOH bila je izolirana aluminijskom folijom kako bi se omogućila električna vodljivost kolektora. Potreban napon za proces elektroštrcanja određen je prema formiranju stabilnog Taylorovog konusnog mlaza. Sam proces je trajao neprekidno jedan sat uz lagano miješanje medija za geliranje, kako bi se spriječilo stvaranje aglomerata. Nakon što je proces elektroštrcanja završen, medij za geliranje s formiranim mikrosferama pohranjen je u polipropilenskim epruvetama s čepom tijekom noći pri sobnoj temperaturi, kako bi se omogućila potpuna neutralizacija. Zatim je slijedio postupak ispiranja dobivenih mikročestica. Mikročestice su najprije ispirane demineraliziranom vodom (tri puta) kako bi se uklonio medij za geliranje (NaOH) te nastali produkti neutralizacije, zatim su dehidrirane s 96 %-tnim etanolom (tri puta) i naposljetku ispirane s acetonom (tri puta) kako bi se uklonio etanol. Na kraju su mikročestice s acetonom pohranjene u otvorene Eppendorf epruvete te ostavljene pri sobnim uvjetima kako bi aceton ishlapio i kako bi se dobile suhe CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice.

3.4. Određivanje raspodjele veličine suhih mikročestica

Raspodjela veličina pripremljenih suhih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica određena je primjenom pretražnog fluorescentnog mikroskopa (Olympus IX3 s kamerom Hamamatsu ORCA-Flash 4.0) uz softver za analizu slika CellSens. Također, pomoću spomenutog softvera određeni su i promjeri suhih mikročestica (potrebni za određivanje stupnja bubrenja mikročestica).

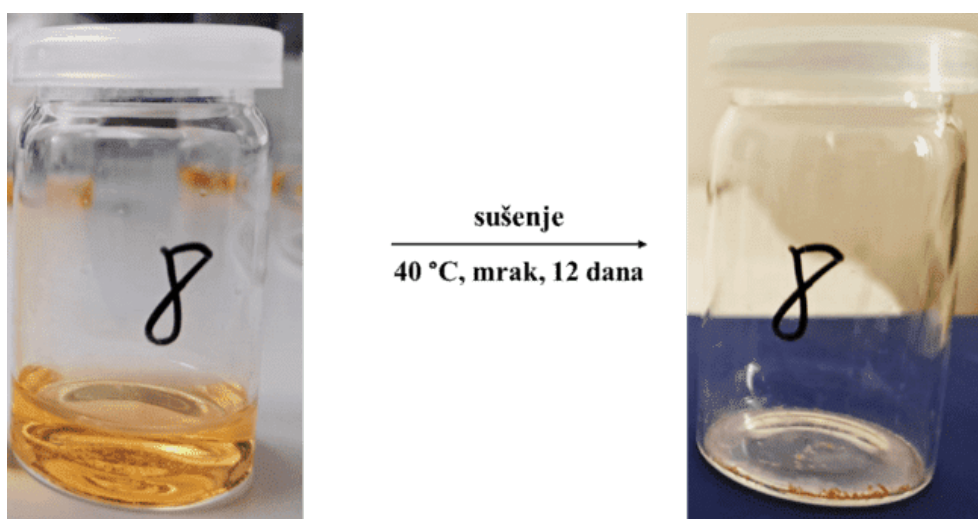
3.5. Bubrenje mikročestica

Procjena stupnja bubrenja mikročestica (~1 mg) provedena je inkubiranjem mikročestica u 1 mL medija pri 37 °C tijekom 24 sata. Stupanj bubrenja ispitan je u otopinama fosfatnog pufera: pufer pH vrijednosti 6 (PB-6), odnosno pH vrijednosti 7,4 (PB-7,4), dok je

demineralizirana voda (pH 6,5) korištena kao kontrolni medij. Nakon 24 sata, nabubrene mikročestice su zajedno s otopinom pufera stavljene na mikroskopsko stakalce i pomoću pretražnog fluorescentnog mikroskopa su snimljene mikrografije koje su zatim analizirane korištenjem programa ImageJ 1.53k. Volumen mokrih mikročestica procijenjen je na temelju minimalno 50 nasumično odabranih nabubrenih mikročestica uz pretpostavku sferičnosti čestica. Stupanj bubrenja CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica procijenjen je na temelju omjera volumena mokrih (nabubrenih) mikročestica, V_m i volumena suhih mikročestica prije bubrenja, V_s .

3.6. Ugradnja lijeka u mikročestice

Ugradnja lijeka u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice provedena je inkubiranjem mikročestica (~1 mg) u otopini lijeka doksorubicina (4 mL), u zatvorenom sustavu u mraku, pri temperaturi od 37 °C tijekom jednog, odnosno tri sata. Po završetku zadanog vremena, uklonjena je otopina lijeka (~3,5 mL), te su mikročestice s ugrađenim lijekom sušene na 40 °C tijekom dvanaest dana. Na slici 9 prikazan je proces sušenja pripremljenih mikročestica nakon ugradnje lijeka.



Slika 9. Proces ugradnje doksorubicina u pripravljene mikročestice. Slika lijevo - otopina DOX-a s mikročesticama nakon 1 i 3 h ugradnje, slika desno – suhe mikročestice s DOX-om nakon 12 dana sušenja.

Suhe mikročestice s lijekom (DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAp) analizirane su pomoću pretražnog fluorescentnog mikroskopa kako bi se ispitala uspješnost ugradnje lijeka. Osim toga, otopine lijeka s mikročesticama analizirane su fluorescentnom spektrometrijom na spektrofotometru PerkinElmer Victor Nivo pri čemu je izmjeren intenzitet fluorescencije doksorubicina kako bi se mogla procijeniti količina ugrađenog lijeka.

Također, procjena količine ugrađenog lijeka određena je gravimetrijskom metodom, tako što su se na analitičkoj vagi izvagale mase suhих CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica prije ugradnje lijeka, m_1 i mase suhих DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAp mikročestica nakon ugradnje lijeka, m_2 te je iz omjera njihovih masa:

$$\frac{m_2 - m_1}{m_1} \quad (2)$$

procijenjena količina ugrađenog lijeka doksorubicina.

Također, pripremljeni su i kontrolni uzorci PB@CHT-Cu i PB@CHT-Cu/HAp na način da su se pripravljene mikročestice (~1 mg) inkubirale u otopini PB-6 bez doksorubicina. Daljnji procesi obrade kontrolnih uzoraka provedeni su na isti način. Kontrolni uzorci služili su kako bi se vidjelo ima li otopina PB-6 utjecaja na ugradnju lijeka u mikročestice, odnosno dolazi li do taloženja fosfatnih soli, budući da je doksorubicin otopljen u istoj otopini.

3.7. Metode karakterizacije materijala

3.7.1. Rendgenska difrakcijska analiza, XRD

Rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) analiziran je sastav pripremljenih mikročestica. Korišten je difraktometar XRD Shimadzu 6000 uz $\text{Cu}_{K\alpha}$ zračenje pri 40 kV i 30 mA. Mjerni raspon difrakcijskih kutova iznosio je $3^\circ < 2\theta < 70^\circ$, s korakom od $0,02^\circ$. Identifikacija kristalnih faza provedena je korištenjem ICDD baze (engl. *International Centre for Diffraction Data*).

3.7.2. Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom, FTIR

Za identifikaciju suhih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica korištena je prigušena totalna refleksija infracrvene spektroskopije s Fourierovom transformacijom (ATR-FTIR). Analize su provedene pomoću spektrometra Bruker Vertex 70. Spektri su snimani 32 puta u rasponu mjernog područja od 4000 do 400 cm^{-1} uz rezoluciju od 4 cm^{-1} pri sobnim uvjetima.

4. REZULTATI I RASPRAVA

U ovom radu pripravljene su CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice. Za karakterizaciju dobivenih materijala korištene su infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR) i rendgenska difrakcijska analiza (XRD). Osim toga, pripremljenim mikročesticama određena je raspodjela veličine čestica i stupanj bubrenja u različitim medijima. Također, provedena je i ugradnja antitumorskoga lijeka doksorubicina (DOX) u pripravljene mikročestice koje su zatim analizirane pretražnim fluorescentnim mikroskopom, te fluorescentnom spektrometrijom i gravimetrijskom metodom.

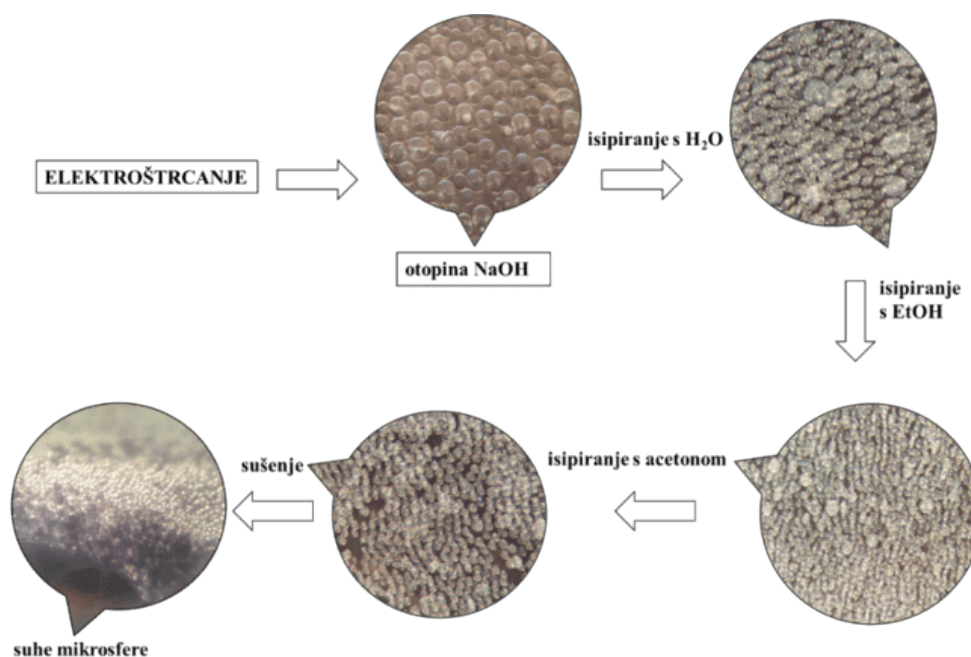
4.1. Dobivanje CHT-Cu/HAp mikročestica procesom elektroštrcanja

Budući da je kitozan topljiv u slabim kiselinama, otapanjem u otopini octene kiseline postaje polikation zbog protoniranih $-NH_2$ skupina te ima mogućnost stvaranja kompleksa s bakrovim(II) ionima (CHT-Cu). Izmjerena pH vrijednost pripravljene otopine CHT-Cu kompleksa iznosila je 4,2. Potom je uz miješanje u CHT-Cu otopinu dodan hidroksiapatit, pri čemu je nastala suspenzija CHT-Cu/HAp, uz djelomično otapanje hidroksiapatita. Izmjerena pH vrijednost CHT-Cu/HAp suspenzije iznosila je 4,9, te je vizualno otopina bila translucetna i djelovala viskoznije u odnosu na CHT-Cu kompleks. Pretpostavlja se da je dodatkom hidroksiapatita porasla viskoznost otopine jer otapanjem hidroksiapatita dolazi do porasta pH vrijednosti otopine. Nadalje, kako bi se daljnjim postupkom dobili stabilni sferični mikrogelovi, bilo je potrebno produkte elektroštrcanja neutralizirati alkalnom otopinom.

U ovome radu, kompozitne mikročestice kao sustavi za dostavu lijeka pripravljene su procesom elektroštrcanja. Parametri procesa koji utječu na izgled, veličinu i morfologiju dobivenih mikročestica su napon (u kV), brzina protoka otopine, udaljenost između vrha igle i kolektora, promjer igle, relativna vlažnost, tlak i temperatura [10]. U ovome radu, ispitan je utjecaj promjene napona jer u procesu elektroštrcanja različiti naponi uzrokuju različito kapanje otopine (sporo kapanje, brzo kapanje, višestruko, nestabilan konusni mlaz, Taylorov konusni mlaz). Najpoželjniji je Taylorov konusni mlaz zbog svoje stabilnosti, ponovljivosti i proizvodnje malih i monodisperznih mikročestica [9]. Osim napona, ispitan je utjecaj promjera igle na veličinu i morfologiju mikročestica. Općenito, u procesu elektroštrcanja promjeri igle

kreću se od 18 G (unutarnji promjer je 1,27 mm) do 29 G (unutarnji promjer je 0,33 mm). Stoga korištenjem igle većeg (unutarnjeg) promjera očekuje se dobivanje većih mikročestica [9]. U ovom radu korištene su dvije igle, za elektroštrcanje suspenzije kitozan-Cu²⁺ s dodatkom hidroksiapatita (CHT-Cu/HAp) korištena je igla promjera 22 G, dok je u procesu elektroštrcanja otopine kompleksa CHT-Cu korištena igla promjera 23 G. Stabilni Taylorov konus postignut je pri naponu od 15,3 kV za suspenziju CHT-Cu/HAp i pri 16,7 kV za otopinu kompleksa CHT-Cu. Kada je korištena igla promjera 23 G, zbog veće viskoznosti suspenzije CHT-Cu/HAp, došlo je do pojave otpora, te suspenzija nije mogla prolaziti kroz iglu. Zbog toga je odlučeno da se igla promjera 23 G zamijeni s iglom većeg promjera, 22 G. Stoga, očekuje se da će upotreba igle većeg promjera dovesti do stvaranja većih CHT-Cu/HAp čestica.

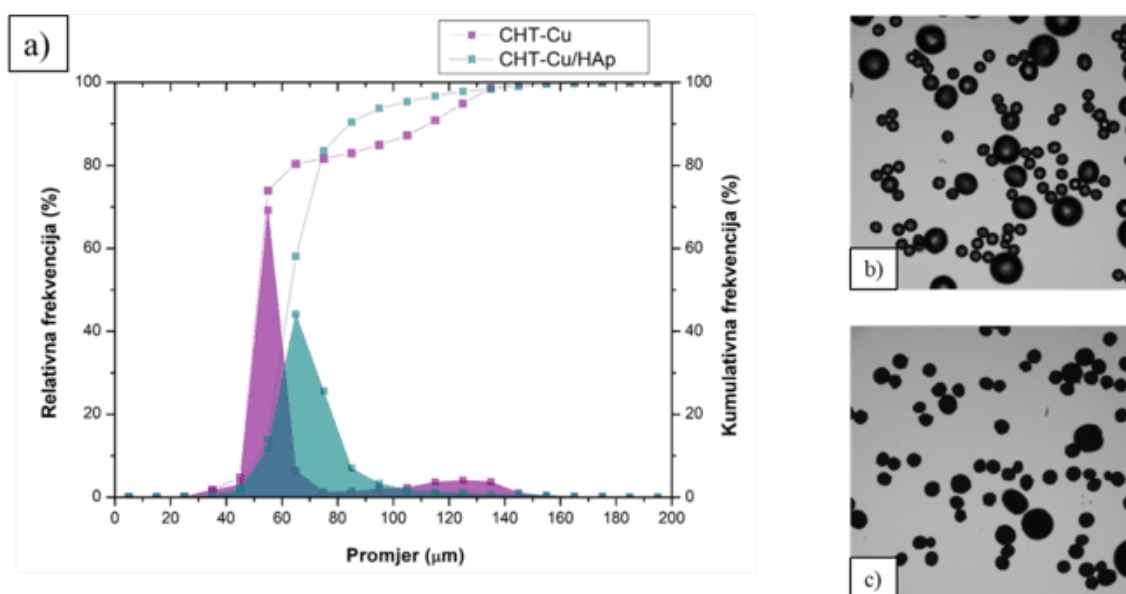
Budući da postoje dvije vrste izvedbi aparature s obzirom na vrstu kolektora tijekom procesa elektroštrcanja, u ovome radu mikročestice su se sakupljale u 1,25 mol dm⁻³ otopini NaOH (neutralizacijski agens). Nakon toga, slijedilo je ispiranje nastalih mikročestica demineraliziranom vodom, te dehidracija etanolom i sušenje acetonom pri sobnim uvjetima. Nakon procesa sušenja nastali su aglomerati mikročestica koji su se mogli lako usitniti pritiskom špatule. Iz danog shematskog prikaza (slika 10) može se vidjeti utjecaj procesa pripreve i sušenja mikročestica na izgled i veličinu istih, tj. da tijekom pripreve dolazi do smanjenja veličine nastalih mikročestica uz zadržavanje dobre sferičnosti. Prikazane slike iz shematskog prikaza dobivene su pomoću optičkog mikroskopa.



Slika 10. Promjena veličine CHT-Cu/HAp mikročestica tijekom procesa pripreve i sušenja (uvećanje 6,5×).

4.2. Veličina i oblik suhih mikročestica

Ujednačene veličine nastalih mikročestica neophodne su za mnoge primjene, osobito za preciznu dostavu lijeka, budući da je veličina mikročestica jedan od ključnih čimbenika koji kontroliraju farmakokinetiku i učinkovitost inkapsuliranog lijeka. S ujednačenim veličinama, mikročestice mogu i optimizirati kinetiku otpuštanja inkapsuliranog lijeka te postići maksimalnu zaštitu lijekova od prijevremene razgradnje [48]. Stoga je određena raspodjela veličina čestica dobivenih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica (slika 11a). Iz prikazanih mikrografija može se vidjeti da CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice pokazuju visoku sferičnost (slika 11 b i c).



Slika 11. a) Raspodjela veličina čestica CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikročestica. Mikrografije **b)** CHT-Cu i **c)** CHT-Cu/HAp mikročestica. Oznaka skale odgovara 100 μm, a uvećanje je 10×.

Na slici 11a prikazana je raspodjela veličina čestica i može se vidjeti da je sustav CHT-Cu/HAp pokazao nešto širu raspodjelu veličina čestica koja iznosi $72,1 \pm 17,6 \mu\text{m}$, dok sustav CHT-Cu ima užu raspodjelu veličina čestica, prosječne veličine od $56,1 \pm 5,1 \mu\text{m}$ u odnosu na CHT-Cu/HAp. Međutim, potrebno je spomenuti da CHT-Cu sustav pokazuje bimodalnu raspodjelu veličina čestica, te da mali postotak čestica posjeduje veći promjer od navedenog prosječnog promjera.

Tijekom procesa elektroštrcanja, suspenzija CHT-Cu/HAp imala je nešto veću vizualno procijenjenu viskoznost što je dovelo do pojave otpora te otopina nije mogla prolaziti kroz iglu manjeg promjera (23 G). Zbog toga, igla promjera 23 G zamijenjena je s iglom promjera 22 G, što je dovelo do stvaranja nešto većih mikročestica. Stoga, upotreba igle većeg promjera mogući je razlog nešto većih čestica CHT-Cu/HAp. Također, postizanje stabilnog Taylorovog konusa, koji je neophodan za proizvodnju čestica jednakih veličina, bilo je otežano. Pretpostavlja se da su razlog tome čestice hidroksiapatita koje mogu uzrokovati povremeno začepljenje igle. Kako na formiranje stabilnog konusa utječu različiti parametri kao što su viskoznost otopine, napon, protok otopine, udaljenosti kolektora od vrha igle, u ovom radu kao konstantni parametri bili su protok otopine (5 mL h^{-1}) i udaljenost kolektora od vrha igle (10 cm). Stoga, šira raspodjela veličine čestica može biti posljedica teškog postizanja stabilnog Taylorovog konusa pri različitim primijenjenim naponima [49].

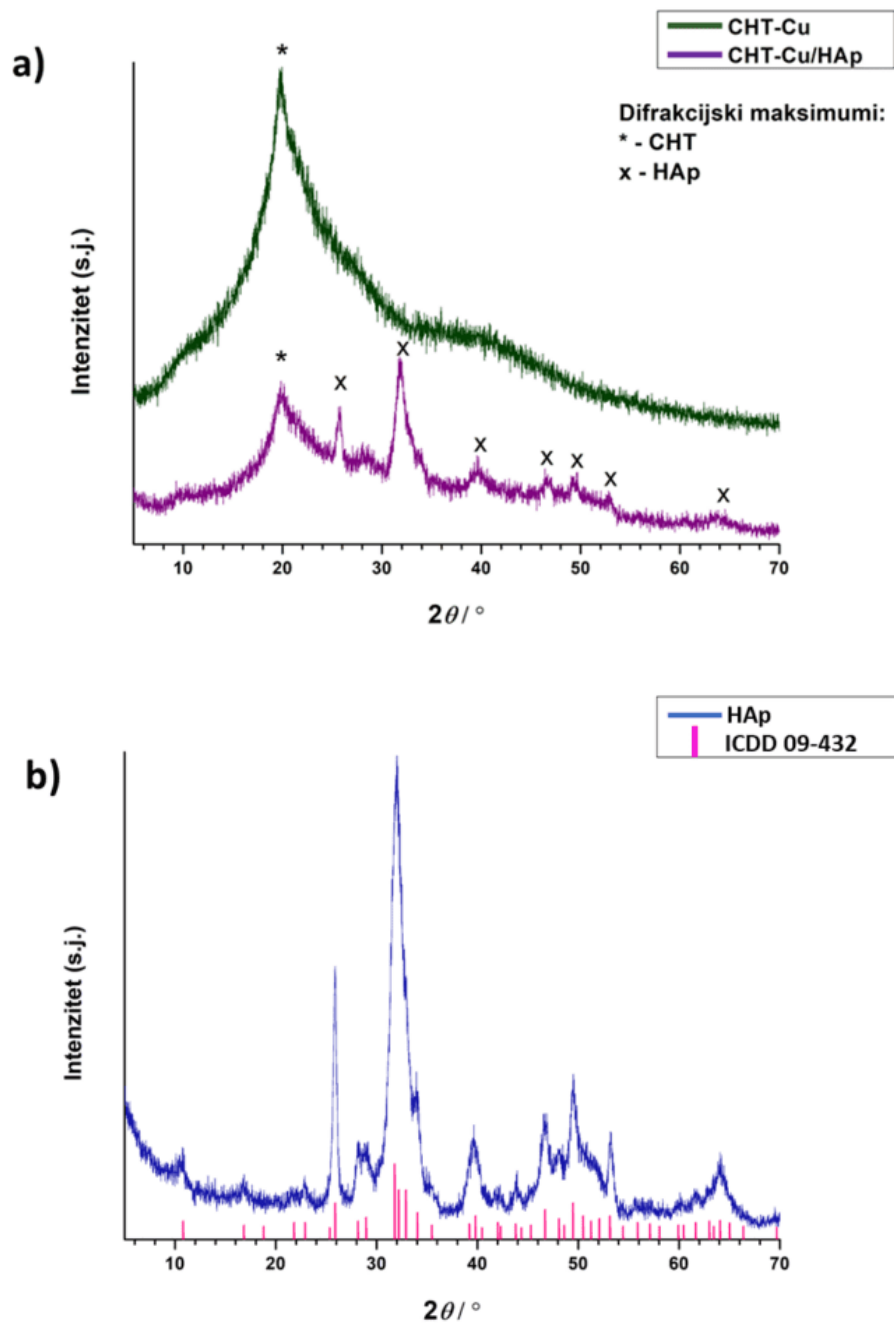
Zaključno, na temelju prikazanih mikrografija i rezultata može se utvrditi da su procesom elektroštrcanja dobivene sferične mikročestice, te da sustav CHT-Cu/HAp pokazuje nešto širu raspodjelu veličina čestica u odnosu na CHT-Cu mikrosfere.

U nastavku rada primjenom XRD i FTIR analiza provedena je identifikacija sastava pripremljenih mikročestica.

4.3. XRD analiza

Na slici 12a prikazani su difraktogrami pripremljenih mikročestica, dok su na slici 12b prikazani difraktogrami korištenog hidroksiapatita te referentni difraktogram HAp-a dobiven iz pripadajuće ICDD kartice (engl. *International Centre for Diffraction Data*) broj 09-432.

Difraktogram CHT-Cu mikročestica pokazuje karakterističan široki difrakcijski maksimum kitozana pri $2\theta \approx 20^\circ$ [50]. Također, difraktogram kompozitnih mikročestica CHT-Cu/HAp pokazuje prisutnost maksimuma na $\sim 20^\circ$ koji je manjeg intenziteta u odnosu na CHT-Cu, a što je posljedica smanjenog udjela kitozana u kompozitu. Nadalje, vidljivi su i difrakcijski maksimumi na $2\theta \approx 26^\circ, 32^\circ, 39^\circ, 46^\circ, 49^\circ, 53^\circ$ i 64° , a koji ukazuju na prisutnost kristalne anorganske faze u uzorku. Usporedbom dobivenog difraktograma kompozitnih mikročestica s difraktogramom HAp-a i prema podacima ICDD kartice broj 09-432, može se zaključiti da detektirani difrakcijski maksimumi (slika 12b) pripadaju hidroksiapatitu.

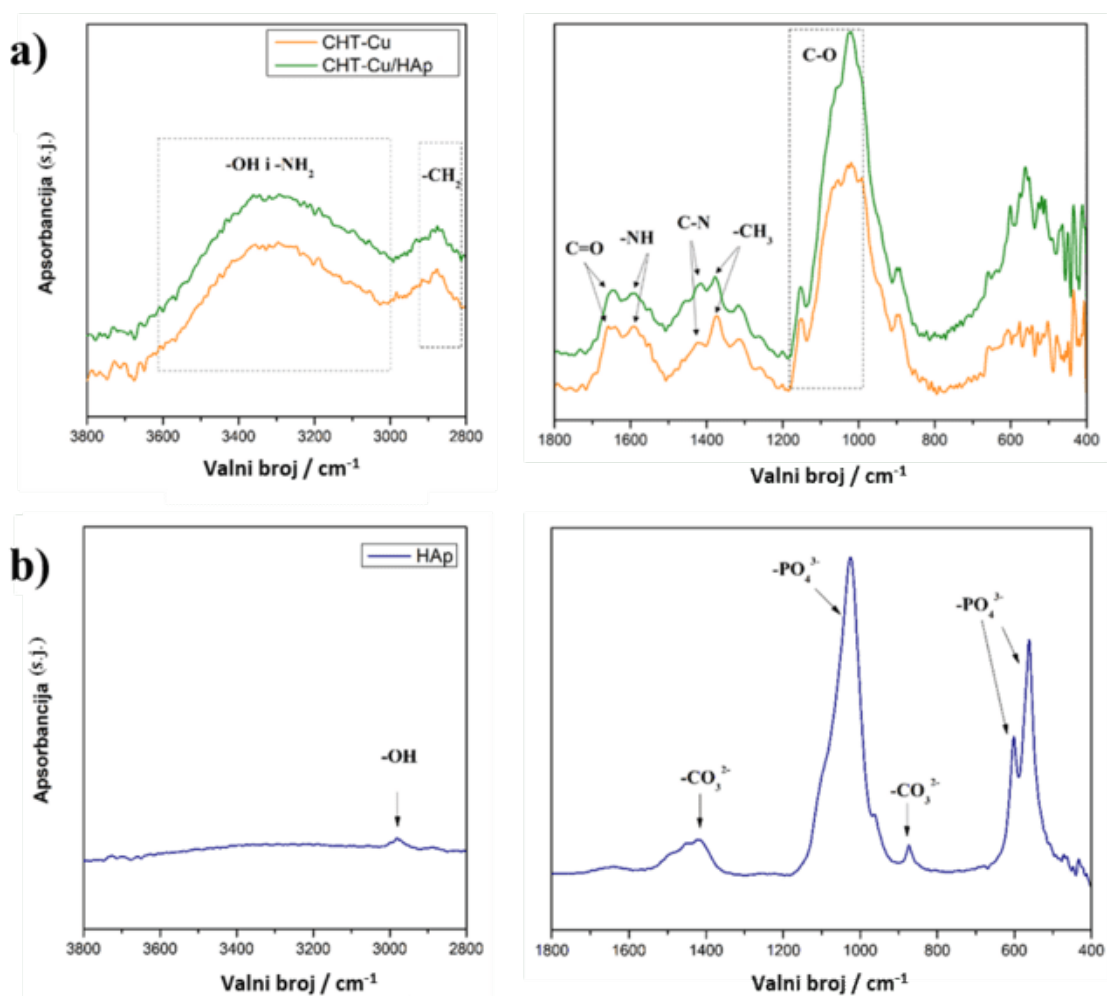


Slika 12. a) Difraktogrami pripremljenih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica, i **b)** Difraktogram hidroksiapatita korištenog za pripravu kompozita te podaci ICDD kartice za hidroksiapatit.

XRD analiza pokazala je prisutnost hidroksiapatita u pripravljenom CHT-Cu/HAp kompozitu, iako je tijekom procesa pripreve kompozita došlo do otapanja hidroksiapatita. Međutim, tijekom geliranja u prisutnosti otopine NaOH može doći do retaloženja hidroksiapatita koji nastaje pri pH vrijednostima iznad 9 [51].

4.3.1. FTIR analiza

Za identifikaciju dobivenih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica korištena je ATR-FTIR spektroskopija, pri čemu su na slici 13 prikazani FTIR spektri korištenog hidroksiapatita (HAp), te mikročestica na temelju kompleksa CHT-Cu bez i s dodatkom anorganskog punila (CHT-Cu/HAp).



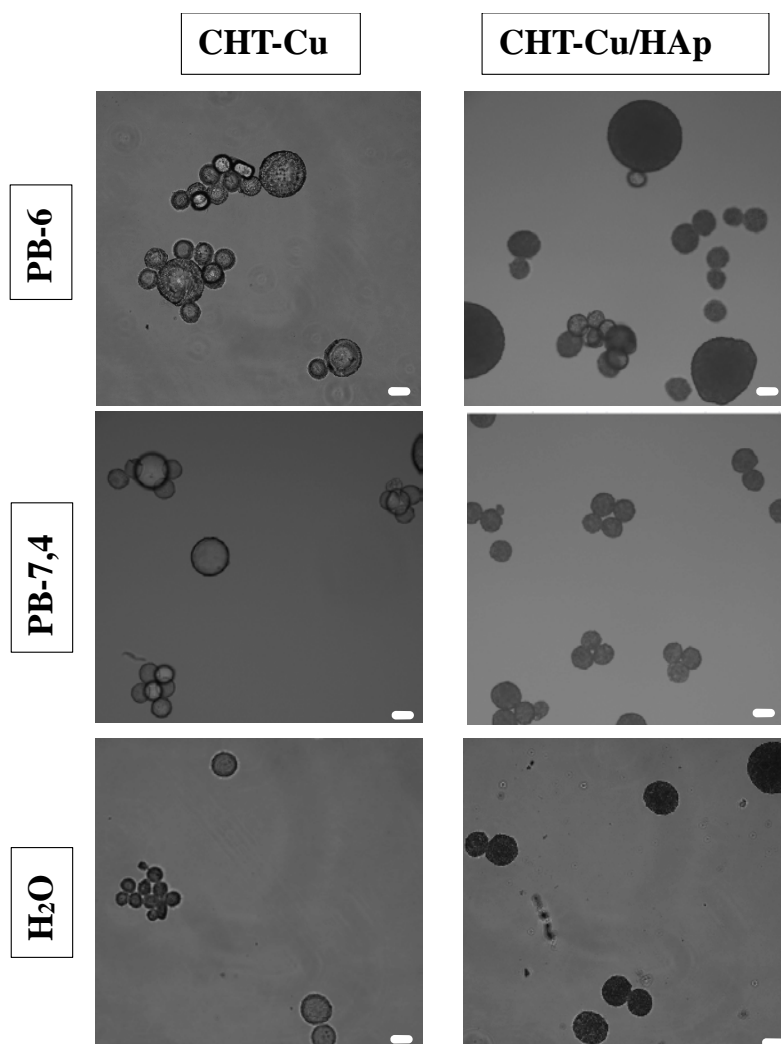
Slika 13. FTIR spektri a) CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikročestica i b) hidroksiapatita.

FTIR spektar pripremljenih mikročestica (slika 13a) na temelju kompleksa kitozana i bakrovih(II) iona (CHT-Cu) pokazuje karakterističnu apsorpcijsku vrpca u rasponu valnih brojeva od 3600 do 3000 cm^{-1} , a koja odgovara vibracijskom istezanju $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ skupine kitozana. Vrpca na valnom broju 2876 cm^{-1} odgovara simetričnom i asimetričnom istezanju $-\text{CH}_2$ skupina. Karakteristične vrpce na valnim brojevima 1650 i 1590 cm^{-1} odgovaraju istezanju karbonilne ($\text{C}=\text{O}$) skupine (amid I) i savijanju $-\text{NH}$ skupine (amid II). Zatim, vrpce na valnim brojevima 1420 i 1385 cm^{-1} pripadaju skupinama $\text{C}-\text{N}$ i $-\text{CH}_3$ iz acetilne skupine. U rasponu valnih brojeva od 1185 do ~ 1000 cm^{-1} prisutna su tri istezanja $\text{C}-\text{O}$ skupina. Navedene karakteristične vrpce pripadaju strukturi kitozana [50]. Nadalje, na FTIR spektru kompozitnih mikrosfera CHT-Cu/HAp (slika 13a) zabilježena je pojava istih apsorpcijskih vrpca kao kod CHT-Cu mikrosfera: vibracijsko istezanje $-\text{OH}$ i $-\text{NH}_2$ skupine, simetrično i asimetrično istezanje $-\text{CH}_2$ skupina, zatim istezanje $\text{C}=\text{O}$ i savijanje $-\text{NH}$ skupine, istezanje $\text{C}-\text{N}$ i $-\text{CH}_3$ skupina te tri istezanja $\text{C}-\text{O}$ skupina. Osim toga, usporedbom FTIR spektra korištenoga hidroksiapatita (slika 13b) i CHT-Cu/HAp uzorka, u uzorku kompozitnog materijala je vidljiva prisutnost apsorpcijskih vrpca PO_4^{3-} skupine, a koje su blago pomaknute prema nižim valnim brojevima (~ 565 i 600 cm^{-1}). U području valnih brojeva 1185 do ~ 990 cm^{-1} dolazi do preklapanja apsorpcijskih vrpca PO_4^{3-} skupina HAp-a i $\text{C}-\text{O}$ skupina kitozana. Nadalje, uz spomenute apsorpcijske vrpce PO_4^{3-} skupine (na valnim brojevima 570, 602 i 1041 cm^{-1}), na FTIR spektru hidroksiapatita (slika 13b) vidljive su i vrpce na valnim brojevima 869 i 1461 cm^{-1} . Opažene apsorpcijske vrpce se mogu pripisati vibracijama CO_3^{2-} grupe što bi moglo ukazati na karbonatni hidroksiapatit. Ove vrpce se prema literaturi [52] pripisuju B-tipu supstitucije odnosno da su CO_3^{2-} grupe supstituirane na mjesto PO_4^{3-} skupina. Također, u području valnih brojeva od 3600 do 2900 cm^{-1} zabilježena je široka vrpca istezanja $-\text{OH}$ skupine iz apsorbirane vode [52].

Uočene promjene u FTIR spektrima između anorganskog punila (HAp), polimerne matrice (CHT-Cu) i nastalog kompozita (CHT-Cu/HAp) bi mogle ukazati na interakcije između polimerne i anorganske faze [52].

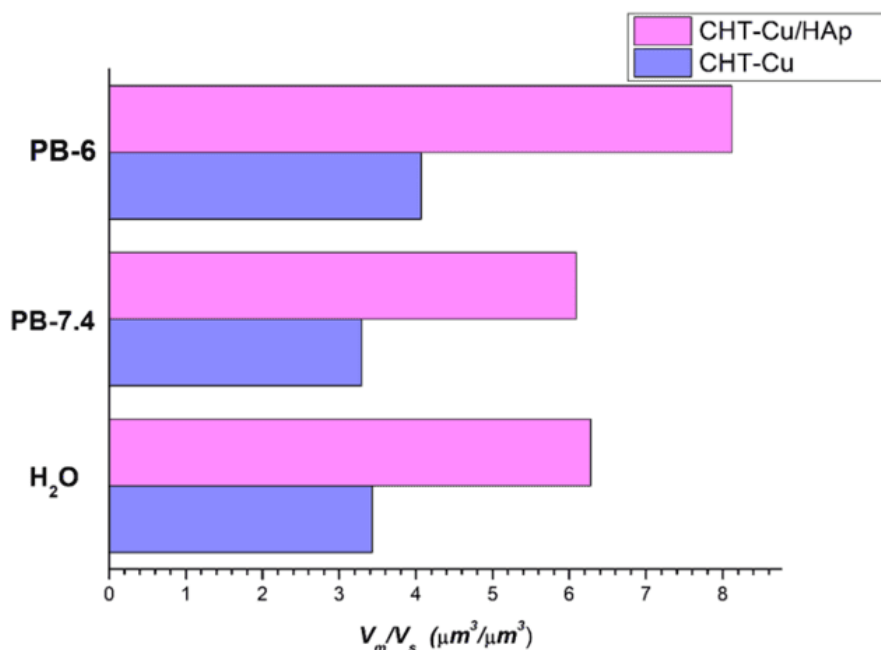
4.4. Stupanj bubrenja mikročestica

Svojstvo bubrenja kitozanskih mikročestica definira njihovu stabilnost u otopinama različitih pH vrijednosti, te utječe na njihovu primjenu u tkivnom inženjerstvu i dostavi lijekova. Sposobnost kitozana da apsorbira vodu ovisi o nekoliko čimbenika: molekulskoj masi i stupnju deacetilacije, mikrostrukтури (poroznosti), ionskoj jakosti otopine i pH vrijednosti. Glavni parametri koji utječu na sposobnost bubrenja kompozita na temelju kitozana uključuju sadržaj hidrofilnih skupina ($-OH$ i $-NH_2$ skupine) i međumolekulske interakcije između kitozana i vode [53]. Na slici 14 prikazane su mikrografije CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica nabubrenih u različitim medijima.



Slika 14. Mikrografije CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica nakon bubrenja u otopinama fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7,4) te u demineraliziranoj vodi (H_2O , pH 6,5). Oznaka skale odgovara 100 μm , a uvećanje je 10 \times .

Stupanj bubrenja pripremljenih CHT-Cu mikročestica s i bez dodatka HAp-a procijenjen je u otopinama fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7,4) te u demineraliziranoj vodi (H₂O, pH 6,5) kao omjer volumena mokrih i suhih mikročestica (V_m/V_s) (slika 15).



Slika 15. Procijenjeni stupanj bubrenja (V_m/V_s) pripremljenih CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica u različitim medijima: otopine fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6) i 7,4 (PB-7,4) i demineralizirana voda (H₂O, pH 6,5).

Slika 15 prikazuje procijenjeni stupanj bubrenja mikročestica u različitim medijima nakon 24 h. Iz prikazanih omjera može se vidjeti da pripravljene CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice pokazuju veliki kapacitet bubrenja zahvaljujući –OH i –NH₂ skupinama kitozana koje ostvaruju vodikove veze s molekulama vode i omogućuju apsorpciju vode [53]. CHT-Cu mikročestice imaju najveći stupanj bubrenja u otopini PB-6, a približnu vrijednost u otopini PB-7,4 i u H₂O. Ovakvi rezultati potječu od polikationske prirode kitozana. U kiselom mediju, amino skupine kitozana se protoniraju, što dovodi do povećanog elektrostatskog odbijanja između polimernih lanaca. Polimerni lanci se međusobno udaljavaju i olakšavaju ulazak vode. S druge pak strane, kako se pH vrijednost otopine povećava, amino skupine više nisu protonirane, elektrostatska odbojnost između lanaca se smanjuje i na taj način se smanjuje stupanj bubrenja [53].

Nadalje, dodatkom hidroksiapatita u CHT-Cu čestice povećava se stupanj bubrenja. Dhivya i sur. [54] u svome radu također su dobili povećanje stupanja bubrenja kitozanskog kompozita dodatkom hidroksiapatita, pretpostavljajući da veći stupanj bubrenja CHT-Cu/HAp mikročestica može biti posljedica hidrofilnosti koju nude –OH skupine hidroksiapatita te njegova poroznost što dovodi do veće apsorpcije vode u mikročestice [54]. Međutim, dobiveni rezultati u ovom radu nisu u skladu s očekivanjima i rezultatima drugih istraživanja, poput istraživanja u kojem su Kumar i suradnici [55] pripravili kompozitni hidrogel kitozana i nano-hidroksiapatita. U svome radu, autori su pokazali da se povećanjem udjela hidroksiapatita u nanokompozitu, sposobnost bubrenja kompozitnog hidrogela smanjuje. Smatraju da je to uslijed stvaranja vodikove veze između kitozana i hidroksiapatita koja uzrokuje smanjenje sposobnost bubrenja kitozana jer se smanjio broj slobodnih –OH skupina kitozana za stvaranje vodikove veze s vodom, odnosno smanjio se udio komponente koja bubri (kitozan) [55].

Sposobnost bubrenja polimera u blago kiselom mikrookruženju može se iskoristiti pri pripremi sustava za ciljanu dostavu lijeka pri liječenju tumora. Tijekom rasta tumora, metabolička aktivnost stanica izaziva lokalno povećanje kiselosti. U takvom mikrookruženju materijali na temelju kitozana počinju bubriti i djelomično se otapati što omogućuje oslobađanje ugrađenog antitumorskog lijeka [56]. Stoga, kako bi se pokazalo da pripravljene CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikročestice mogu poslužiti kao potencijalni sustavi za dostavu lijeka, provedena je inkapsulacija antitumorskog lijeka doksorubicina.

4.5. Ugradnja antitumorskog lijeka u mikročestice

Mikronosači na temelju kitozana imaju jedinstvena svojstva kao što su biokompatibilnost, biorazgradljivost, visok kapacitet ugradnje lijeka, i pH osjetljivost [57]. Na temelju tih svojstava, moguće je usporiti razgradnju i prijevremeno oslobađanje lijeka iz mikronosača. Budući da tumorske stanice imaju nizak pH, kompozitni materijali na temelju kitozana razgrađuju se u kiselom okruženju pri čemu dolazi do oslobađanja lijeka koji će na taj način imati utjecaj na tumorske stanice. Dodatak hidroksiapatita u kitozanski mikronosač, poboljšavaju se mehanička svojstva, biokompatibilnost, bioaktivnost, adsorpcijska svojstva mikročestica i efikasnost ugradnje lijeka [58]. Kao modelni lijek u ovom radu, u pripravljene mikročestice s i bez HAp-a ugrađen je doksorubicin.

Doksorubicin hidroklorid (DOX) koristi se u kemoterapiji protiv različitih vrsta raka uključujući leukemiju, rak dojke, maternice, jajnika, pluća i kosti, ali njegova učinkovitost je ograničena kratkim životnim vijekom u krvotoku i toksičnošću za različite organe i tkiva [42].

Stoga, kako bi se postigla veća terapijska učinkovitost, smanjile nuspojave, omogućila ciljana dostava i prevladala rezistencija tumorskih stanica na lijek, brojna su istraživanja usmjerena na pripravu kompozitnih mikročestica na temelju kitozana kao potencijalnih sustava za dostavu doksorubicina [47]. Osim toga, utvrđeno je da aktivni oblik doksorubicina pokazuje crvenu fluorescenciju [59], što je korišteno za dokazivanje lijeka ugrađenog u mikročestice.

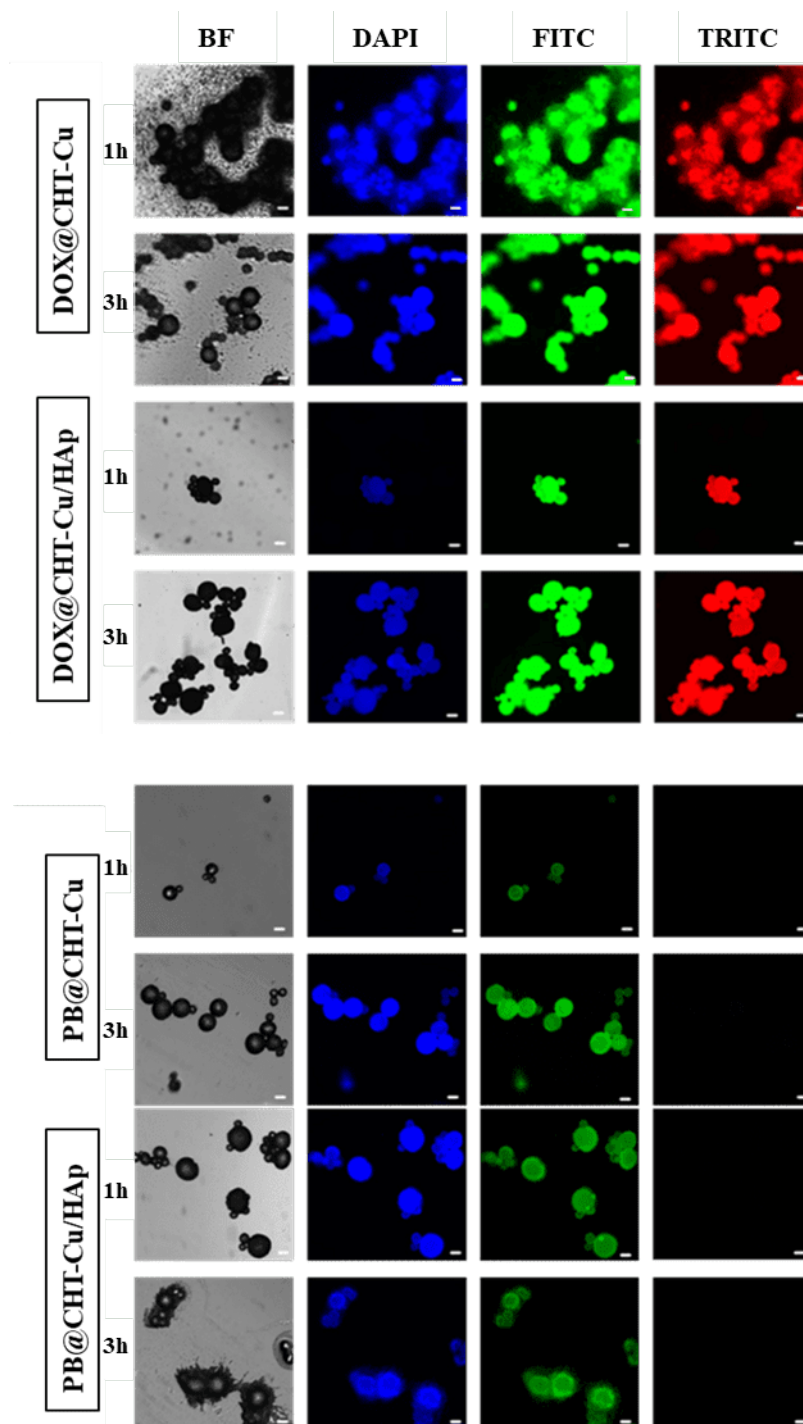
4.5.1. Pretražna fluorescentna mikroskopija

Na slici 16 prikazane su mikrografije pripremljenih mikročestica s ugrađenim lijekom (DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAp) te kontrolnih uzoraka mikročestica bez lijeka (PB@CHT-Cu i PB@CHT-Cu/HAp), snimljene korištenjem četiri filtera: BF (svijetlo polje, engl. *bright field*), DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol; plava fluorescencija), FITC (fluorescein izotiocijanat; zelena fluorescencija) i TRITC (tetrametilrodamin izotiocijanat; crvena fluorescencija).

Iz prikazanih mikrografija može se vidjeti pojava crvene fluorescencije (TRITC) u DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAp mikročesticama, a koja se ne uočava u kontrolnim uzorcima. Na temelju toga može se pretpostaviti da se doksorubicin uspješno ugradio u mikročestice već nakon jednog, odnosno tri sata inkubacije. Pretpostavlja se da je razlog uspješne ugradnje lijeka taj da dolazi do stvaranja vodikovih veza između doksorubicina te hidroksilnih i amino skupina prisutnih u kitozanu [42]. Također, mogući razlog je i prisutnost anorganske komponente (hidroksiapatita) u mikronosačima jer hidroksiapatit može ostvariti interakcije s doksorubicinom preko kalcijevih iona i fosfatnih skupina [60].

Nadalje, vidljivo je da su svi uzorci zadržali visoku sferičnost nakon ugradnje lijeka, kao i prisutnost sitnog materijala oko mikročestica u uzorcima s ugrađenim lijekom (DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAp). S obzirom da u kontrolnim uzorcima nije uočena ista pojava te da u uzorcima s ugrađenim lijekom taj materijal ne pokazuje crvenu fluorescenciju, može se pretpostaviti da se radi o neaktivnom obliku DOX-a.

Zaključno, pomoću pretražne fluorescentne mikroskopije potvrđeno je da se doksorubicin uspješno ugradio u pripravljene mikročestice.

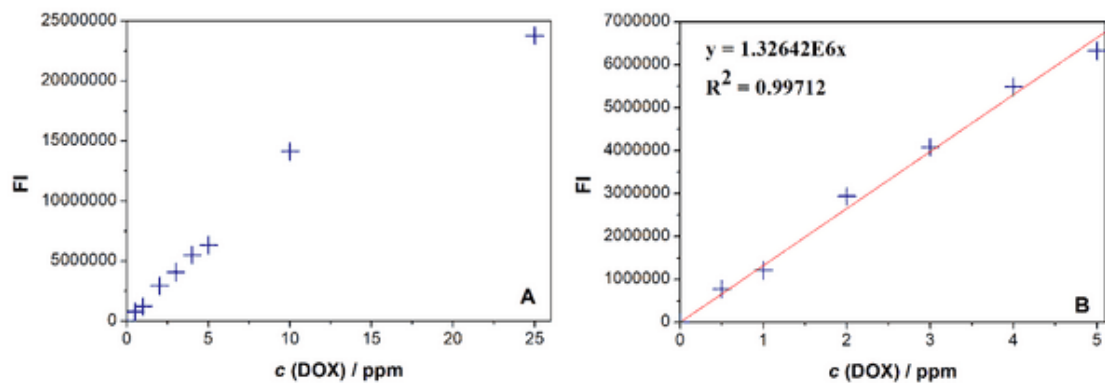


Slika 16. Mikrografije mikročestica s ugrađenim lijekom (DOX@CHT-Cu i DOX@CHT-Cu/HAP) te kontrolnih uzoraka (PB@CHT-Cu/HAP i PB@CHT-Cu) nakon 1 i 3 h inkubacije snimljene s BF (svijetlo polje), DAPI, FITC i TRITC filterom. Oznaka skale odgovara 100 μm , a uvećanje je 10 \times .

4.5.2. Procjena ugradnje lijeka u mikročestice

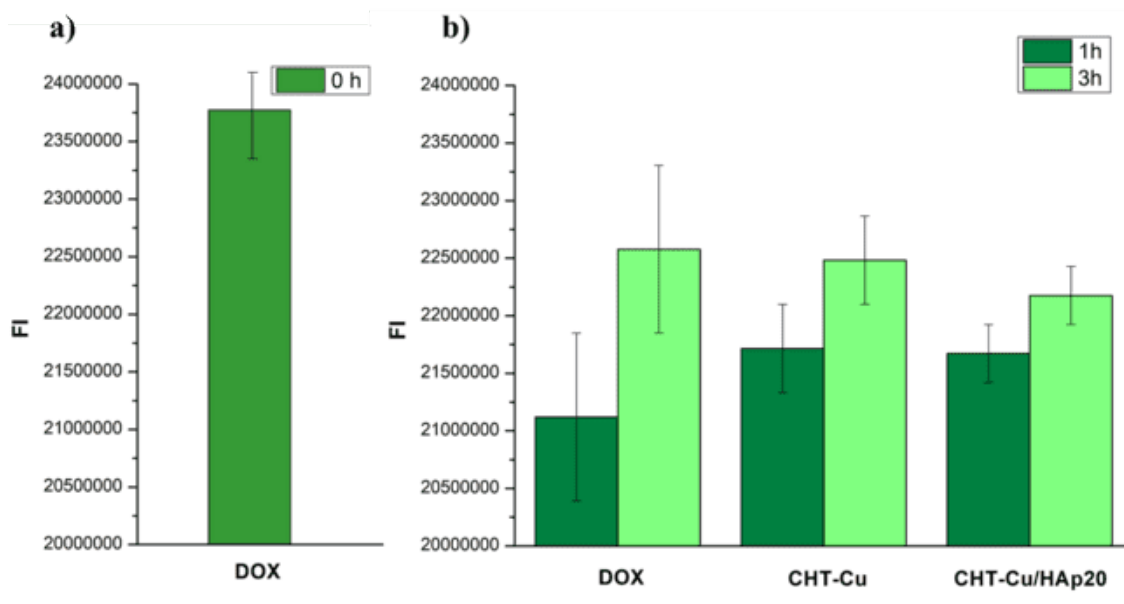
Kako bi se odredila količina lijeka ugrađenog u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice korištene su fluorescentna spektrometrija i gravimetrijska metoda.

Korištenjem fluorescentne spektrometrije izmjeren je intenzitet fluorescencije (FI) u otopinama DOX-a. Na slici 17 prikazane su kalibracijske krivulje ovisnosti intenziteta fluorescencije (FI) o koncentraciji otopine doksorubicina. Iz prikazanih kalibracijskih krivulja može se vidjeti da se linearnost postiže pri nižim koncentracijama lijeka, odnosno u području od 0 do 5 ppm, dok se porastom koncentracije gubi linearnost. Zbog toga se količina ugrađenog lijeka u mikrosferama na ovaj način ne može točno odrediti, nego se može samo procijeniti [61].



Slika 17. Kalibracijska krivulja otopine DOX-a u području: **A)** 0-25 ppm, **B)** 0-5 ppm.

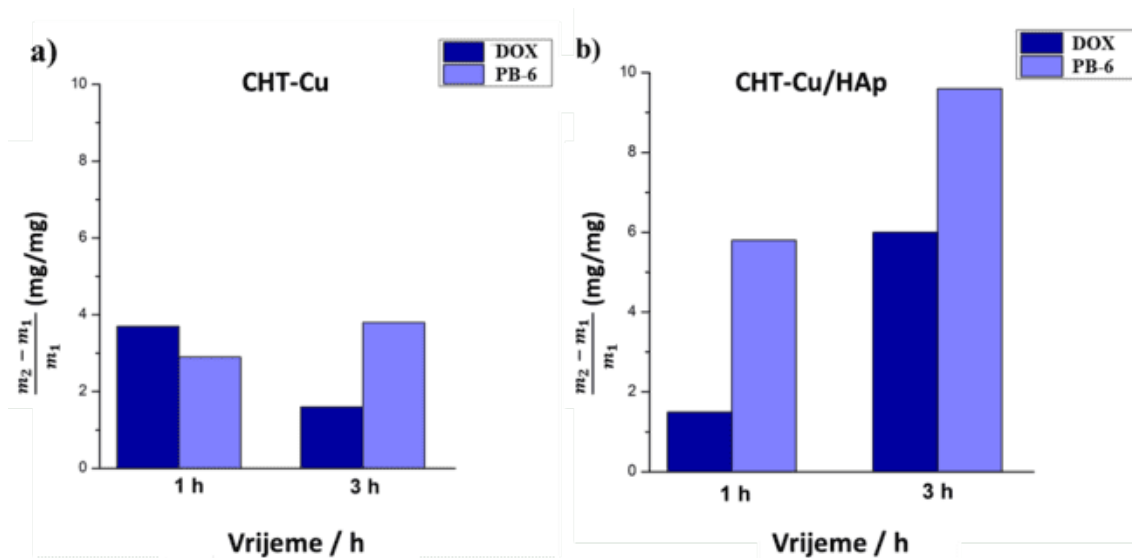
Na slici 18a prikazan je intenzitet fluorescencije (FI) svježe pripremljene otopine doksorubicina koncentracije 25 ppm ($t = 0$ h), dok su na slici 18b prikazani intenziteti fluorescencije otopina lijeka nakon ugradnje u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikrosfere tijekom 1 i 3 h. Također, prikazan je i FI čiste otopine doksorubicina, bez mikročestica pri istim uvjetima (1 i 3 h, u mraku, 37 °C).



Slika 18. Intenziteti fluorescencije (FI) **a)** svježe otopine doksorubicina prije inkubacije ($t = 0$ h) i **b)** otopine doksorubicina (DOX) bez i s mikročesticama (CHT-Cu i CHT-Cu/HAp) nakon 1 i 3 h inkubacije.

Kako bi se mogla procijeniti količina ugrađenoga lijeka u mikročestice, uspoređivani su intenziteti fluorescencije izmjereni za otopinu doksorubicina u kojoj nisu inkubirane mikročestice s FI otopine lijeka nakon ugradnje (otopine lijeka u kojima su bile inkubirane CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikročestice). U ovome radu, za ugradnju lijeka korištena je otopina DOX-a koncentracije 25 ppm. Nakon ugradnje DOX-a u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice, vrijednosti očitanih intenziteta fluorescencije otopina lijeka su se smanjile te se nalaze u rasponu od 10 do 25 ppm (prema podacima kalibracijske krivulje). Takvi rezultati su u skladu s očekivanjima jer smanjenje intenziteta fluorescencije, odnosno količine DOX-a u otopini, ukazuje na to da se lijek uspješno ugradio [61]. Međutim, iz prikazanih dijagrama može se vidjeti da se intenzitet fluorescencije DOX-a čiste otopine lijeka (bez inkubiranih mikročestica) također smanjuje tijekom vremena ($t = 1$ i 3 h). Kako bi se odredilo ima li značajne razlike između čiste otopine doksorubicina i otopine lijeka u kojima su bile inkubirane CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikročestice korištena je ANOVA analiza i t -test. Provedene statističke analize (uz $p < 0,05$) ukazale su da nema značajne razlike između vrijednosti intenziteta fluorescencije otopina lijeka s i bez mikročestica. Na temelju toga, primjenom fluorescentne spektrometrije za dane uvjete nije moguće precizno odrediti količinu ugrađenoga lijeka u mikročesticama.

Nadalje, gravimetrijskom metodom željela se procijeniti količina ugrađenog lijeka (DOX) i fosfatnih soli (iz otopine fosfatnog pufera, pH vrijednosti 6) u CHT-Cu (slika 19a) i CHT-Cu/HAp (slika 19b) mikročesticama.



Slika 19. Procijenjena količina ugrađenoga doksorubicina (DOX), odnosno fosfatnih soli (iz PB-6 pufera) gravimetrijskom metodom u: **a)** CHT-Cu i **b)** CHT-Cu/HAp mikročesticama, nakon 1 i 3 h ugradnje.

Rezultati gravimetrijske analize (slika 19) ukazali su na veću promjenu mase CHT-Cu mikročestica inkubiranih u otopini lijeka tijekom jednog sata, u odnosu na promjenu mase mikročestica nakon 3 h ugradnje. Također, u CHT-Cu/HAp uzorcima zabilježena je veća promjena mase za mikročestice inkubirane u otopini pufera (kontrolnim uzorcima) u odnosu na uzorke inkubirane u otopini DOX-a. Nadalje, nakon tri sata ugradnje lijeka, masa CHT-Cu/HAp mikročestica veća je od mase CHT-Cu mikročestica, što bi moglo ukazati na ugrađenu veću količinu lijeka. Pretpostavlja se da je za ugradnju lijeka odgovoran kitozan koji preko –OH i –NH₂ skupina stvara vodikove veze s doksorubicinom [42], kao i mogućnost nastanka dodatnih interakcija lijeka s punilom prisutnim u kompozitnim mikročesticama [60].

Nadalje, pretpostavlja se da su u mikročesticama osim doksorubicina prisutne i soli fosfatnog pufera u kojem je pripravljena otopine lijeka. To ukazuje dijagram prikazan na slici 19, gdje se vidi da se u kontrolnim uzorcima (PB@CHT-Cu i PB@CHT-Cu/HAp) istaložila određena količina fosfatnih soli, pri čemu veća promjena mase CHT-Cu/HAp ukazuje na veće

taloženje soli uslijed HAp-a. Nadalje, treba imati na umu i to da su na stijenkama bočica uzoraka s ugrađenim lijekom bili uočeni talozi, a što u konačnici utječe na rezultate gravimetrijske analize. Kao moguće rješenje ovoga problema, predlaže se ispiranje mikročestica nakon ugradnje lijeka.

Na temelju dobivenih rezultata može se zaključiti da je ugradnja lijeka doksorubicina u pripravljene CHT-Cu/HAp i CHT-Cu mikronosače bila uspješna, odnosno da su dobiveni potencijalni mikronosači lijeka.

5. ZAKLJUČAK

Procesom elektroštrcanja pripravljene su mikročestice na temelju kitozan-Cu²⁺ kompleksa (CHT-Cu) uz dodatak anorganske faze hidroksiapatita (CHT-Cu/HAp). Dobivene mikročestice su sferičnoga oblika te je sustav CHT-Cu prosječne veličine čestica $56,1 \pm 5,1 \mu\text{m}$, a sustav CHT-Cu/HAp $72,1 \pm 17,6$.

XRD analiza pokazala je prisutnost hidroksiapatita u kompozitnim CHT-Cu/HAp česticama na temelju ICDD kartice 09-432. FTIR analiza potvrdila je prisutnost hidroksiapatita u kompozitnim mikročesticama.

Rezultati bubrenja CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestica, dobiveni kao volumni omjer mokrih i suhih mikročestica, ukazali su na pH-osjetljivost kitozanske matrice. CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice imaju najveću sposobnost bubrenja u otopini fosfatnog pufera pH vrijednosti 6 (PB-6), a manju u otopini pufera pH vrijednosti 7,4 i demineralizirane vode. Dodatkom hidroksiapatita povećava se stupanj bubrenja.

Provedeno je i ispitivanje mogućnosti ugradnje antitumorskog lijeka doksorubicina u pripravljene mikročestice u svrhu pripreme potencijalnih sustava za ciljanu dostavu lijeka. Primjenom fluorescentne mikroskopije utvrđena je ugradnja doksorubicina u CHT-Cu i CHT-Cu/HAp mikročestice, na temelju pojave crvene fluorescencije koja je karakteristično svojstvo aktivnog oblika doksorubicina. Pretpostavlja se da dolazi do stvaranja vodikovih veza između lijeka te hidroksilnih i amino skupina prisutnih u kitozanu, odnosno Ca²⁺ i PO₄³⁻ iona prisutnih u hidroksiapatitu. Također, rezultati fluorescentne spektrometrije i gravimetrijske metode ukazali su na prisutnosti soli fosfata u mikročesticama, uz prisutnost ugrađenoga lijeka. Potrebna su daljnja istraživanja u svrhu preciznijega određivanja količine ugrađenoga lijeka, a predlaže se i ispiranje mikronosača nakon provedenog procesa ugradnje lijeka.

Na temelju dobivenih rezultata u ovome radu, kompozitne mikročestice na temelju kitozan-bakar(II) kompleksa i hidroksiapatita pokazale su se kao potencijalni mikronosači lijeka.

6. POPIS SIMBOLA

PLA	poli(mliječna kiselina)
PLGA	poli(mliječna- <i>co</i> -glikolna kiselina)
PCL	poli(ϵ -kaprolakton)
<i>DD</i>	stupanj deacetilacije (engl. <i>degree of deacetylation</i>)
IR	infracrvena spektroskopija
UV-Vis	ultraljubičasta-vidljiva spektrofotometrija
NMR	nuklearna magnetna rezonancija ^1H
NMR	nuklearna magnetna rezonancija ^{13}C
M_w	molekulska masa (engl. <i>molecular weight</i>)
XPS	rendgenska fotoelektronska spektroskopija
DSC	diferencijalna pretraža kalorimetrija
TGA	termogravimetrijska analiza
EDTA	etilendiamintetraoctena kiselina
HAp	Hidroksiapatit
BS-6	heksadecil betain
CHT	kitozan
$\text{Cu}(\text{CH}_3\text{COO})_2 \times \text{H}_2\text{O}$	bakrov(II) acetat monohidrat
CH_3COOH	octena kiselina, HAc
NaOH	natrijev hidroksid
$\text{C}_2\text{H}_6\text{O}$	etanol, EtOH
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	natrijev dihidrogenfosfat monohidrat
NaHPO_4	natrijev hidrogenfosfat bezvodni
DOX	doksorubicin HCl
CHT-Cu	kitozan-bakar(II)
CHT-Cu/HAp	kitozan-bakar(II)/hidroksiapatit
PB	otopina fosfatnog pufera
PMMA	poli(metil-metakrilat)
V_m	volumen mokrih mikrosfera (μm^3)
V_s	volumen suhih mikrosfera (μm^3)
DOX@CHT-Cu	kitozan-bakar(II) mikrosfere s ugrađenim doksorubicinom

DOX@CHT-Cu/HAp	kitozan-bakar(II)/hidroksiapatit mikrosfere s ugrađenim doksorubicinom
PB@CHT-Cu	kitozan-bakar(II) mikrosfere u otopini fosfatnog pufera (pH 6)
PB@CHT-Cu/HAp	kitozan-bakar(II)/hidroksiapatit mikrosfere u otopini fosfatnog pufera (pH 6)
FTIR	infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (engl. <i>Fourier-transform infrared spectroscopy</i>)
XRD	kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza (engl. <i>X-ray diffraction</i>)
ICDD	engl. <i>International Centre for Diffraction Data</i>
BF	svijetlo polje (engl. <i>bright field</i>)
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol
FITC	fluorescein izotiocijanat
TRITC	tetrametilrodamin izotiocijanat

7. LITERATURA

- [1] Lins, L. C., Bazzo, G. C., Barreto, P. L. M., Pires, A. T. N., Composite PHB/chitosan microparticles obtained by spray drying: effect of chitosan concentration and crosslinking agents on drug release, *J. Braz. Chem. Soc.*, **0** (2014) 1-10.
- [2] Iacob, A. T., Lupascu, F. G., Apotrosoaei, M., Vasincu, I. M., Tauser, R. G., Lupascu, D., Giusca, S. E., Caruntu, I.-D., Profire, L., Recent Biomedical Approaches for Chitosan Based Materials as Drug Delivery Nanocarriers, *Pharmaceutics*, **13** (2021) 1-36.
- [3] Sabu, T., Kuruvilla, J., Sant, K. M., Koichi, G., Meyyarappallil, S. S., Introduction to Polymer Composites, *Polym. Compos.*, **1** (2012) 3-16.
- [4] Yang, C. H., Wang, L. S., Chen, S. Y., Huang, M. C., Li, Y. H., Lin, Y. C., Chen, P. F., Shaw, J. F., Huang, K. S., Microfluidic assisted synthesis of silver nanoparticle-chitosan composite microparticles for antibacterial applications, *Int. J. Pharm.*, **510** (2016) 493-500.
- [5] Đakmanec, A., Sinteza kitozanskih i poloksamersko-kitozanskih mikrosfera s melatoninom pripravljenih sušenjem raspršivanjem, Diplomski rad, Sveučilište u Zagrebu (2017) 1.
- [6] Mitra, A., Dey, B., Chitosan Microspheres in Novel Drug Delivery Systems, *Indian J. Pharm. Sci.*, **73** (2011) 355-366.
- [7] Senapati, S., Mahanta, A. K., Kumar, S., Maiti, P., Controlled drug delivery vehicles for cancer treatment and their performance, *Signal Transduct. Target. Ther.*, **3** (2018) 1-19.
- [8] Sharma, N., Purwar, N., Gupta, P. C., Microspheres as drug carriers for controlled drug delivery: A review, *IJPSR*, **6** (2015) 4579-4587.
- [9] Bock, N., Dargaville, T. R., Woodruff, M. A., Electrospraying of polymers with therapeutic molecules: State of the art, *Prog. Polym. Sci.*, **37** (2012) 1510-1551.

- [10] Tapia-Hernandez, J. A., Torres-Chavez, P. I., Ramirez-Wong, B., Rascon-Chu, A., Plascencia-Jatomea, M., Barreras-Urbina, C. G., Rangel-Vazquez, N. A., Rodriguez-Felix, F., Micro- and Nanoparticles by Electrospray: Advances and Applications in Food, *J. Agric. Food Chem.*, **63** (2015) 4699-4707.
- [11] Zhou, F. L., Cristinacce, P. L. H., Eichhorn, S. J., Parker, G. J. M., Preparation and characterization of polycaprolactone microspheres by electrospraying, *Aerosol Sci. Technol.*, **50** (2016) 1201-1215.
- [12] Moghadam, H., Samimi, M., Samimi, A., Khorram, M., Electrospray modeling of highly viscous and non-Newtonian liquids, *J. Appl. Polym. Sci.*, **118** (2010) 1288-1296.
- [13] Sinha, V. R., Singla, A. K., Wadhawan, S., Kaushik, R., Kumria, R., Bansal, K., Dhawan, S., Chitosan microsphere as a potential carrier for drugs, *Int. J. Pharm.*, **274** (2004) 1-33.
- [14] Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.*, **49** (2013) 780-792.
- [15] Rani, M., Agarwal, A., Negi, Y. S., Review: Chitosan based hydrogel polymeric beads - as drug delivery system, *BioResour.*, **5** (2010) 1-43.
- [16] Balazs, N., Sipos, P., Limitations of pH-potentiometric titration for the determination of the degree of deacetylation of chitosan, *Carbohydr. Res.*, **342** (2007) 124-130.
- [17] Czechowska-Biskup, R., Jarosinska, D., Rokita, B., Ulanski, P., Rosiak, J. M., Determination of degree of deacetylation of chitosan - comparison of methods, *Prog. Chem.*, **17** (2012) 5-20.
- [18] Kou, S. G., Peters, L. M., Mucalo, M. R., Chitosan: A review of sources and preparation methods, *Int. J. Bio. Macromol.*, **169** (2021) 85-94.
- [19] Goncalves, C., Ferreira, N., Lourenco, L., Production of Low Molecular Weight Chitosan and Chitooligosaccharides (COS): A Review, *Polymers*, **13** (2021) 2466.
- [20] Rinaudo, M., Chitin and chitosan: Properties and applications, *Prog. Polym. Sci.*, **31** (2006) 603-632.

- [21] Kumar, M. N. V., A review of chitin and chitosan applications, *React. Funct. Polym.*, **46** (2000) 1-3.
- [22] Matica, A., Menghiu, G., Ostafe, V., Biodegradability of Chitosan Based Products, *Front. Chem.*, **26** (2017) 75-86.
- [23] Islam, M. A., Firdous, J., Choi, Y. J., Yun, C. H., Cho, C. S., Design and application of chitosan microspheres as oral and nasal vaccine carriers: an update review, *Int. J. Nanomedicine*, **7** (2012) 6077-6093.
- [24] Younes, I., Rinaudo, M., Chitin and Chitosan Preparations from Marine Sources. Structure, Properties and Applications, *Mar. Drugs*, **13** (2015) 1133-1174.
- [25] Wang, L., Li, J., Marchant, R. E., Zhao, Z., Influence of molecular weight, concentration and temperature on the viscosity behavior of chitosan dissolved in lactic acid, *J. Appl. Polym. Sci.*, **100** (2006) 3559-3563.
- [26] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Electrosprayed Chitosan-Copper Complex Microspheres with Uniform Size, *Materials*, **14** (2021) 5630.
- [27] Zhou, L., Liu, J., Liu, Z., Adsorption of platinum (IV) and palladium(II) from aqueous solution by thiourea-modified chitosan microspheres, *J. Hazard. Mater.*, **172** (2009) 439-446.
- [28] Guiba, I. E., Interactions of metal ions with chitosa-based sorbents: a review, *Sep. Purif. Technol.*, **38** (2004) 43-74.
- [29] Wang, X., Du, Y., Fan, L., Liu, H., Hu, Y., Chitosan-metal complexes as antimicrobial agent: Synthesis, characterization and Structure-activity study, *Polym. Bull.*, **55** (2005) 105-113.
- [30] Qu, J., Hu, Q., Shen, K., Zhang, K., Li, Y., Li, H., Zhang, Q., Wang, J., Quan, W., The preparation and characterization of chitosan rods modified with Fe³⁺ by a chelation mechanism, *Carbohydr. Res.*, **346** (2011) 822-827.
- [31] Flora, S. J. S., Pachauri, V., Chelation in Metal Intoxication, *Int. J. Environ. Res. Public Health*, **7** (2010) 2745-2788.

- [32] Wang, K., Pan, S., Qi, Z., Xia, P., Xu, H., Kong, W., Li, H., Xue, P., Yang, X., Fu, C., Recent Advances in Chitosan-Based Metal Nanocomposites for Wound Healing Applications, *Adv. Mater. Sci. Eng.*, **3** (2020) 1-13.
- [33] Zhang, X., Shi, X., Ma, L., Pang, X., Li, L., Preparation of Chitosan Stacking Membranes for Adsorption of Copper Ions, *Polymer.*, **11** (2019) 1463.
- [34] Lite Dai, T., Tanak, M., Huang, Y., Hamblin, M. R., Chitosan preparation for wounds and burns: antimicrobial and wound-healing effects, *Expert Rev. Anti. Infect Ther.*, **11** (2012) 857-879.
- [35] Guibal, E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review, *Sep. Purif. Technol.*, **38** (2004) 43-74.
- [36] Desbrieres, J., Guibal, E., Chitosan for wastewater treatment, *Polym. Int.*, **67** (2017) 7-14.
- [37] Gritsch, L., Maqbool, M., Mourino, V., Ciraldo, F. E., Cresswell, M., Jackson, P. R., Lovell, C., Boccaccini, A. R., Chitosan/hydroxyapatite composite bone tissue engineering scaffolds with dual and decoupled therapeutic ion delivery: copper and strontium, *J. Mater. Chem.* **7** (2019) 6109-6124.
- [38] Mekahlia, S., Bouzid, B., Chitosan-Copper (II) complex as antibacterial agent: synthesis, characterization and coordinating bond-activity correlation study, *Phys. Procedia*, **2** (2009) 1045-1053.
- [39] Gritsch, L., Lovell, C., Goldmann, W. H., Boccaccini, A. R., Fabrication and characterization of copper(II)-chitosan complex as antibiotic-free antibacterial biomaterial, *Carbohydr. Polym.*, **179** (2018) 370-378.
- [40] Mohd Pu'ad, N. A. S., Koshy, P., Abdullah, H. Z., Idris, M. I., Lee, T. C., Syntheses of hydroxyapatite from natural sources, *Heliyon*, **5** (2019) e01588.
- [41] Haider, A., Haider, S., Han, S. S, Kang, I. K., Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: a review, *RSC Adv.*, **7** (2017) 7442-7458.

- [42] Liang, Y. H., Wu, M. Y., Yen, S. K., Effects of Chitosan on Loading and Releasing for Doxorubicin Loaded Porous Hydroxyapatite-Gelatin Composite Microspheres, *Polymers*, **14** (2022) 4276.
- [43] Rogina, A., Vidović, D., Antunović, M., Ivanković, M., Ivanković, H., Metal ion-assisted formation of porous chitosan-based microspheres for biomedical applications, *Int. J. Polym. Mater.*, **70** (2020) 1027-1035.
- [44] Lai, Y. L., Cheng, Y. M., Yen, S. K., Doxorubicin - chitosan - hydroxyapatite composite coatings on titanium alloy for localized cancer therapy, *Mater. Sci. Eng.*, **104** (2019) 109953.
- [45] Wu, J., Ding, S., Chen, J., Zhou, S., Ding., Preparation and drug release properties of chitosan/organomodified palygorskite microspheres, *Int. J. Biol. Macromol.*, **68** (2014) 107-112.
- [46] Sivakumar, M., Manjubala, I., Panduranga Rao, K., Preparation, characterization and in-vitro release of gentamicin from coralline hydroxyapatite chitosan composite microspheres, *Carbohydr. Polyme.*, **49** (2002) 281-288.
- [47] Mohan, P., Rapoport, N., Doxorubicin as a molecular Nanotheranostic Agent: Effect of Doxorubicin Encapsulation in Micelles or Nanoemulsions on the Ultrasound-Mediated Intracellular Delivery and Nuclear Trafficking, *Mol. Pharm.*, **6** (2010) 1959-1973.
- [48] Ma, G., Yue, H., Advances in Uniform Polymer Microspheres and Microcapsules: Preparation and Biomedical Applications, *Chin. J. Chem.*, **38** (2020) 911-923.
- [49] Lončarević, A., Ostojić, K., Urlić, I., Rogina, A., Preparation and Properties of Bimetallic Chitosan Spherical Microgels, *Polymers*, **15** (2023) 1480.
- [50] Queiroz, M. F., Melo, K. R. T., Sabry, D. A., Sasaki, G. L., Rocha, H. A. O., Does the Use of Chitosan Contribute to Oxalate Kidney Stone Formation?, *Mar. Drugs*, **13** (2015) 141-158.
- [51] Miecznik, J. B., Haberko, K., Sitarz, M., Bućko, M. M., Macherzynska, B., Hydroxyapatite from animal bones – Extraction and properties, *Cheram. In.*, **41** (2015) 4841-4846.

- [52] Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, *Mater. Sci. Eng.*, **33** (2013) 4539-4544.
- [53] Mao, J., Kondu, S., Ji, H. J., McShane, M., Study of the Near-Neutral pH-Sensitivity of Chitosan/Gelatin Hydrogels by Turbidimetry and Microcantilever Deflection, *Biotechnol. Bioeng.*, **95** (2006) 333-341.
- [54] Dhivya, S., Saravanan, S., Sastry, T. P., Selvamurugan, N., Nanohydroxyapatite-reinforced chitosan composite hydrogel for bone tissue repair in vitro and in vivo, *J. Nanobiotechnol.*, **13** (2015) 1-13.
- [55] Santosh Kumar, B. Y., Isloor, A. M., Mohan Kumar, G. C., Inamuddin, Asiri A. M., Nanohydroxyapatite Reinforced Chitosan Composite Hydrogel with Tunable Mechanical and Biological Properties for Cartilage Regeneration, *Sci. Rep.*, **9** (2019) 1-13.
- [56] Rogina, A., Vidović, D., Antunović, M., Ivanković, M., Ivanković, H., Metal ion-assisted formation of porous chitosan-based microspheres for biomedical applications, *Int. J. Polym. Mater.*, **70** (2020) 1027-1035.
- [57] Ashrafizadeh, M., Hushmandi, K., Mirzaei, S., Bokaie, S., Bigham, A., Rabiee, N., Orive, G., Chitosan-based nanoscale systems for doxorubicin delivery: Exploring biomedical application in cancer therapy, *Bioeng. Transl. Med.*, **8** (2023) 1-29.
- [58] Lakson, A. D., Study on Antibacterial of Chitosan/Hydroxyapatite Doped Magnesium Composite as a Material for Bone Graft Applications, *Makara J. Technol.*, **23**, (2019) 119-125.
- [59] Prabakaran, M. Chitosan-based nanoparticles for tumor-targeted drug delivery, *Int. J. Bio. Macromol.*, **72** (2015) 1313-1322.
- [60] Lai, Y. L., Cheng, Y. M., Yen, S. K., Doxorubicin - chitosan - hydroxyapatite composite coatings on titanium alloy for localized cancer therapy, *Mater. Sci. Eng.*, **104** (2019) 109953.

[61] Kauffman, M. K., Kaufmann, M. E., Zhu, H., Jia, Z., Li, Y. R., Fluorescence-Based Assays for Measuring Doxorubicin in Biological Systems, *React. Oxyg. Species (Apex)*, **2** (2016) 432-439.

ŽIVOTOPIS

Martina Omazić [REDACTED]

[REDACTED] Nakon završene osnovne škole, 2014. godine, upisuje Opću gimnaziju u Vitezu, BiH. 2018. godine upisala je Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu, smjer *Primijenjena kemija*. Tijekom preddiplomskog studija stručnu praksu odradila je na Institutu za medicinska istraživanja i medicinu rada u jedinici za zaštitu od zračenja. Diplomski studij upisala je 2021. godine na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, smjer *Primijenjena kemija*, modul *Primijenjena organska kemija*.