

# Sinteza kompozitnih okosnica na temelju polimera i kalcijevih fosfata dobivenih iz biogenih izvora

---

Zadro, Karla

Master's thesis / Diplomski rad

2020

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

*Permanent link / Trajna poveznica:* <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:091862>

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

*Download date / Datum preuzimanja:* **2024-10-23**



*Repository / Repozitorij:*

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

**Karla Zadro**

**DIPLOMSKI RAD**

Zagreb, rujan 2020.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

KARLA ZADRO

**SINTEZA KOMPOZITNIH OKOSNICA NA TEMELJU POLIMERA I  
KALCIJEVIH FOSFATA DOBIVENIH IZ BIOGENIH IZVORA**

Voditelj rada:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

prof. dr. sc. Marica Ivanković

izv. prof. dr. sc. Domagoj Vrsaljko

Zagreb, rujan 2020.

Istraživanja ovog diplomskog rada provedena su u okviru istraživačkog projekta „Razvoj biokompatibilnih materijala na temelju hidroksiapatita za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva“, IP-2014-09-3752, financiranog od Hrvatske zaklade za znanost.

*Zahvaljujem svom mentoru, prof. dr. sc. Hrvoju Ivankoviću, na odabranoj temi, stručnom vodstvu i savjetima te ukazanoj prilici za izradu diplomskog rada.*

*Veliko hvala asistentici Antoniji Ressler, na vodstvu, strpljivosti te neizmjerne pomoći i podršci tijekom izrade diplomskog rada.*

*Na kraju zahvaljujem svojim roditeljima, obitelji i prijateljima na svom strpljenju, motivaciji i podršci koja mi je ukazana tijekom studiranja.*

## SAŽETAK

Inženjerstvo koštanog tkiva je brzo rastuće područje istraživanja kojemu je cilj pripraviti koštanu okosnicu koja što bolje oponaša prirodno koštano tkivo. Pripravljene materijale mora zadovoljiti sve tražene uvjete, kao što su biokompatibilnost, bioaktivnost, osteoinduktivnost, biorazgradivost, ne smije biti toksičan i izazivati upalne reakcije, te mora pružati dobru mehaničku potporu. Nadalje, mora biti slične strukture i kemijskog sastava kao i ljudska kost. Jedan od potencijalnih materijala je visokoporozna kompozitna okosnica na temelju kitozana i hidroksiapatita (CS/HAp), koja zadovoljava tražene uvjete. Stoga je cilj ovog rada sintetizirati hidroksiapatit iz biogenih izvora, koji sadrže elemente u tragovima od ključne važnosti za rast koštanog tkiva, a zatim iz pripremljenog hidroksiapatita iz različitih biogenih izvora i kitozana pripremiti kompozitne okosnice.

Kao biogeni izvori korištene su ljuske jajeta, sipina kost i ljuštura školjaka. Dobiveni hidroksiapatit pripremljen je metodom kemijskog taloženja, a karakteriziran je infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR) i rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD). Dobiveni difraktogrami analizirani su Rietveldovom metodom utočnjavanja pomoću računalnog programa DIFFRAC. SUITE TOPAS V.5.0. Morfologija kristala ispitana je pretražnim elektronskim mikroskopom (SEM), a kemijski sastav uzoraka određen je pomoću masene spektroskopije s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS). Pripremljeni uzorci hidroksiapatita umiješani su u polimernu matricu kitozana (CS/HAp) te su pripremljene visokoporozne kompozitne okosnice metodom „smrzavanje-geliranje“. Dobivene kompozitne okosnice karakterizirane su FTIR metodom, a morfologija je istražena SEM analizom. Biološka karakterizacija okosnica provedena je mjerenjem citotoksičnosti okosnica na ljudskim embrionalnim bubrežnim stanicama tijekom 3 dana, te određivanjem životne aktivnosti nasađenih stanica tijekom 7 dana.

Utvrđeno je da se pripremljeni praškasti uzorci sastoje od hidroksiapatitna i amorfne faze, te da je prisutna supstitucija  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$  ionima. Dobivene okosnice CS/HAp visokoporozne su strukture povezanih pora, a kristali HAp-a homogeno su raspoređeni unutar matrice kitozana. Visoka vijabilnost stanica upućuje na necitotoksičnost uzoraka, te dobru životnu aktivnost stanica tijekom 7 dana.

**Ključne riječi:** biogeni izvor, elementi u tragovima, hidroksiapatit, kitozan, okosnica

## SUMMARY

*Synthesis of composite scaffolds based on polymer and calcium phosphates obtained from biogenic sources*

The main goal of bone tissue engineering is to synthesize a material that mimics natural bony tissue, respectively its structure and chemical composition. A potential material is a chitosan/hydroxyapatite (CS/HAp) composite scaffold, due to its properties, such as biocompatibility, bioactivity, osteoinductivity, biodegradability and mechanical support. The aim of this study is to synthesize biomimetic hydroxyapatite from biogenic sources, which contain various trace elements crucial for bone growth, and prepare composite scaffolds based on HAp powders and chitosan.

As biogenic sources, hen eggshells, cuttlefish bone and seashells were used. HAp powders were prepared by wet precipitation method, while their composition was determined by Fourier-transform infrared spectroscopy and X-ray diffraction (XRD) analysis. Crystal morphology was studied by scanning electron microscopy (SEM) and chemical composition of powders was determined by coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS). Prepared powders have been dispersed into chitosan matrix, and composite CS/HAp scaffolds were prepared by freeze-gelation technique. Obtained CS/HAp scaffolds were analysed by FTIR, while morphology was studied by scanning electron microscopy. Biological evaluation of composite scaffolds was also conducted, by MTT and *Live/dead* assay.

It was found that prepared powders are composed of hydroxyapatite (HAp) and amorphous calcium phosphate (ACP). Substitution with trace elements ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^{+}$ ) occurred, as a result of using biogenic sources as precursors of  $\text{Ca}^{2+}$  ions. The structure of CS/HAp scaffolds was highly porous, with well interconnected pores and HAp crystals homogeneously dispersed in chitosan matrix. MTT assay has shown no toxicity of CS/HAp scaffolds, while *Live/dead* assay has shown good viability and proliferation of seeded cells.

**Keywords:** biogenic source, chitosan, hydroxyapatite, scaffold, trace elements

# SADRŽAJ

1. UVOD .....	1
2. TEORIJSKI DIO .....	3
2.1 INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA.....	3
2.2 KALCIJEVA FOSFATNA BIOKERAMIKA .....	4
2.3 HIDROKSIAPATIT .....	5
2.3.1 Hidroksiapatit dobiven iz biogenih izvora .....	8
2.3.2 Hidroksiapatit supstituiran stroncijem .....	10
2.3.3 Hidroksiapatit supstituiran magnezijem .....	11
2.3.4 Hidroksiapatit supstituiran cinkom .....	12
2.3.5 Hidroksiapatit supstituiran natrijem.....	12
2.3.6 Hidroksiapatit supstituiran karbonatom.....	13
2.4 BIOPOLIMERI .....	14
2.4.1 Kitozan.....	15
3. EKSPERIMENTALNI DIO.....	17
3.1 MATERIJALI.....	17
3.2 SINTEZA MATERIJALA .....	18
3.2.1 Dobivanje kalcijevog oksida iz biogenih izvora .....	18
3.2.2 Sinteza hidroksiapatita .....	18
3.2.3 Priprema kompozitnih okosnica od hidroksiapatita i kitozana .....	18
3.3 METODE KARAKTERIZACIJE .....	19
3.3.1 Elementarna analiza .....	19
3.3.2 pH vrijednost.....	20
3.3.3 Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza .....	20
3.3.4 Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama.....	20
3.3.5 Pretražna elektronska mikroskopija .....	20
3.3.6 Poroznost.....	21
3.4 BIOLOŠKA EVALUACIJA .....	21
3.4.1 Nasađivanje stanica.....	21
3.4.2 Citotoksičnost .....	22
3.4.3 Životna aktivnost .....	22
3.4.4 Statistička analiza.....	22



4. REZULTATI I RASPRAVA .....	23
4.1 KARAKTERIZACIJA HIDROKSIAPATITA DOBIVENIH IZ BIOGENIH IZVORA .....	23
4.1.1 Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka .....	23
4.1.2 Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama.....	25
4.1.3 Kemijski sastav pripremljenih uzoraka.....	26
4.2 KARAKTERIZACIJA KOMPOZITNIH OKOSNICA .....	28
4.2.1 Morfologija kompozitnih okosnica CS/HAp .....	28
4.2.2 Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama kompozitnih okosnica .....	29
4.2.3 Biološka karakterizacija .....	30
5. ZAKLJUČAK .....	32
6. LITERATURA .....	33

# 1. UVOD

Posljednjih desetljeća došlo je do intenzivnog razvoja inženjerstva koštanog tkiva, čiji je cilj razviti usadke koji će oponašati prirodno koštano tkivo. Koštana oboljenja i oštećenja (artritis, rahitis i osteoporoza) znatno smanjuju kvalitetu života, a zbog sve duljeg životnog vijeka ljudi sve je veća potreba za odgovarajućim usadcima <sup>1</sup>. Međutim, dosad razvijeni usadci mogu uzrokovati brojne zdravstvene rizike, kao što su potreba za naknadnim kirurškim zahvatom, rizik od infekcija, prijenosa bolesti i imunoloških reakcija <sup>2</sup>. Inženjerstvo tkiva nastoji razviti usadak sličan prirodnom koštanom tkivu, koji mora zadovoljavati brojne uvjete, kao što su biokompatibilnost, bioaktivnost, povoljna mehanička svojstva te biorazgradivost <sup>3</sup>. Kako bi to bilo moguće, potrebno je detaljno poznavati kemijski i fazni sastav, mehanička svojstva, strukturu i biološke procese koji se odvijaju u prirodnom koštanom tkivu <sup>4</sup>.

Kost se sastoji od ~ 70 % anorganske tvari, ~ 20 % organske tvari, a ostatak jest voda. Najzastupljenija anorganska tvar je hidroksiapatit, HAp ( $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), a najzastupljenija organska tvar je protein kolagen <sup>5</sup>. Hidroksiapatit je kalcijev fosfat (CaP), mineral koji se često koristi u inženjerstvu koštanog tkiva zbog svojih brojnih prednosti kao što su bioaktivnost, biokompatibilnost, osteoinduktivnost, mehanička potpora te kemijska sličnost mineralnoj fazi koštanog tkiva. Najčešće se koristi za proizvodnju okosnica, filera, bioaktivnih premaza i kao dio sustava dostave lijekova <sup>6</sup>. U strukturi biološkog HAp-a nalaze se brojni elementi u tragovima, primjerice  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{F}^-$ , koji imaju pozitivan utjecaj na obnavljanje koštanog tkiva. Supstitucija navedenih iona u kristalnu rešetku HAp-a može utjecati na njegovu toplinsku stabilnost, parametre elementarne ćelije, morfologiju, kristalnost i fazni sastav, što može značajno poboljšati njegova biološka svojstva <sup>7</sup>. Zbog toga se sintetski HAp često podvrgava supstitucijama raznim ionima, u cilju što vjernijeg oponašanja prirodnog koštanog tkiva pri izradi usadaka <sup>8</sup>. U većini dosadašnjih istraživanja HAp je dobiven sintetskim putem, raznim metodama od kojih su najviše korištene sol-gel metoda <sup>9</sup>, hidrotermalna metoda <sup>10</sup> i metoda kemijskog taloženja <sup>11</sup>. Međutim, u sintetskom HAp-u ne nalaze se elementi u tragovima, koji, kao što je već navedeno, značajno poboljšavaju svojstva HAp-a. Stoga se u posljednje vrijeme sve više istražuje mogućnost sinteze HAp-a iz biogenih izvora, primjerice koralja, ljusaka jajeta, ljuštura školjaka i sipine kosti, u čijem se sastavu već nalaze elementi u tragovima, što omogućuje postizanje boljih fizikalno-kemijskih svojstava usadaka <sup>12</sup>. Osim toga, ovakav pristup smatra se ekološki prihvatljivim, budući da se količina bio-otpada smanjuje i reciklira <sup>13</sup>.

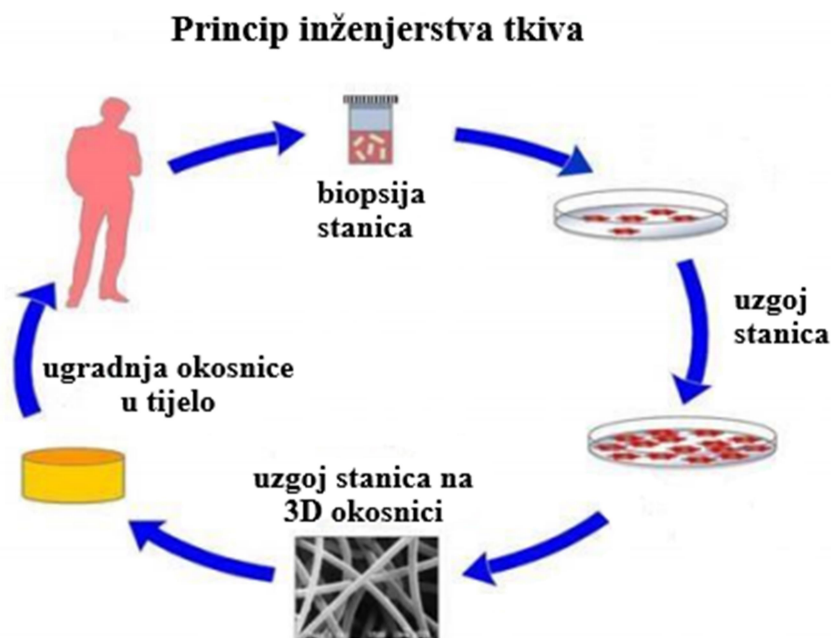
U posljednje vrijeme sve veću pažnju pri izradi usadaka privlače kompozitni materijali koji se sastoje od dvije faze: biokeramičke, koja omogućuje bioaktivnost i mehaničku otpornost, te polimerne, koja osigurava poroznost okosnice i njenu razgradivost *in vivo*, te fleksibilnost. Kombinacijom biokeramičke i polimerne faze značajno se poboljšavaju biološka i mehanička svojstva kompozitnog biomaterijala <sup>14</sup>. Kao biokeramička faza najčešće se koristi CaP biokeramika, posebice HAp, dok se za polimernu fazu često koristi biopolimer kitozan, prirodan polimer dobiven od biopolimera hitina, koji je netoksičan, biokompatibilan i biorazgradiv. Kitozan posjeduje antibakterijska, antigljivična i antimikrobna svojstva, bez izazivanja upalne reakcije ljudskog organizma <sup>15</sup>. Osim što predstavlja matricu za kristalne čestice HAp-a, kitozan omogućuje pripremu visokoporozne trodimenzionalne strukture koja je ključna za odvijanje biokemijskih i bioloških procesa u koštanom tkivu, primjerice prijenosa hranjivih tvari i kisika <sup>16</sup>. Također, visokoporozna struktura omogućuje interakcije između usadaka i prirodnog koštanog tkiva nužnu za uspješnu vaskularizaciju <sup>17</sup>.

Cilj ovog rada je sintetizirati visokoporoznu kompozitnu okosnicu dobivenu od hidroksiapatita pripremljenog iz tri različita biogena izvora (ljuske jajeta, sipine kosti i ljuštore školjaka) i kitozana, te istražiti fizikalno-kemijska i biološka svojstva pripremljenih okosnica.

## 2. TEORIJSKI DIO

### 2.1 INŽENJERSTVO KOŠTANOG TKIVA

Inženjerstvo koštanog tkiva je interdisciplinarno područje koje koristi znanja iz područja biologije, fizike, kemije i medicine, u cilju napretka u razvoju koštanih usadaka <sup>18</sup>. Jedan od problema s kojima se medicina danas susreće su koštana oštećenja, koja mogu nastati kao posljedica artritisa, prijeloma te koštano-mišićnih bolesti. Zahvaljujući istraživanjima u području inženjerstva koštanog tkiva, dokazano je da primjena koštanih usadaka omogućuje bržu obnovu koštanog tkiva <sup>19</sup>. Princip funkcioniranja inženjerstva tkiva prikazan je na slici 1.



Slika 1. Princip funkcioniranja inženjerstva tkiva <sup>20</sup>.

Kako bi razvoj koštanih usadaka bio moguć, potrebna je prethodna izolacija stanica biopsijom. Zatim se stanice, odnosno tkivo, uzgaja *in vitro* na okosnici, te se potom ugrađuje u tijelo pacijenta (*in vivo*).

Za razvoj koštanih usadaka u inženjerstvu koštanog tkiva koriste se biomaterijali, čija je osnovna uloga podržati stvaranje novih koštanih stanica (osteogeneza), kako bi se potaklo brže obnavljanje kosti. Biomaterijali moraju biti biokompatibilni, odnosno ne smiju izazivati alergijske, toksične ili kancerogene reakcije u ljudskom tijelu <sup>21</sup>. Najčešće korišteni

biomaterijali su biorazgradivi polimeri te bioaktivna keramika, među kojom se ističe kalcij-fosfatna (CaP) biokeramika. Njihova zadaća je oponašati kemijske karakteristike te površinu koštanog tkiva, kako bi se mogle izraditi proteze i koštane okosnice što sličnije prirodnom koštanom tkivu<sup>21</sup>. Okosnica je trodimenzionalna matrica čija je uloga omogućiti mehaničku i strukturnu potporu za stvaranje novog tkiva. Stvaranju novog koštanog tkiva prethodi migracija, vezanje, proliferacija i integracija stanica, stoga okosnica mora biti biokompatibilna, imati veliku specifičnu površinu i mikrostrukturu koja oponaša strukturu prirodnog koštanog tkiva te zadovoljavajuća mehanička svojstva. Mikrostruktura okosnice mora biti visokoporozna, kako bi se omogućila integracija i vaskularizacija tkiva, te protok kisika i hranjivih tvari<sup>22</sup>. Postoje različite vrste okosnica, ali sve veću pozornost privlače organsko/anorganske kompozitne okosnice, koje su građene od polimera i biokeramike. Dobivaju se spajanjem dvaju ili više različitih materijala, s jasnom granicom faza. Na taj način dobiva se materijal kombiniranih svojstava njegovih komponenata, mehanička otpornost i biorazgradivost polimera te bioaktivnost keramičke komponente<sup>14</sup>. Ono što ove materijale izdvaja od konvencionalnih metalnih i keramičkih materijala je mogućnost biorazgradnje. Ovakva okosnica ugrađuje se na oštećeno područje, te se s vremenom razgrađuje, a zamjenjuje ju novonastalo koštano tkivo. Brzina razgradnje okosnice mora biti jednaka brzini nastajanja novog koštanog tkiva, jer bi u suprotnom moglo doći do naprezanja i pucanja okosnice ili tkiva. Zbog sposobnosti biorazgradnje, kirurški zahvat uklanjanja ovakvih okosnica nije potreban<sup>23,24</sup>.

## 2.2 KALCIJEVA FOSFATNA BIOKERAMIKA

Biokeramički materijali mogu se u inženjerstvu koštanog tkiva koristiti samostalno, ili kao dio kompozitnog materijala s polimerima. Svojstva koja odlikuju biokeramičke materijale su tvrdoća, otpornost na trošenje te biokompatibilnost. Najizraženiji nedostaci biokeramike su mala gustoća i niska čvrstoća, zbog čega se ona ne koristi za izradu okosnica koje će biti izložene velikim naprezanjima. Biokeramika se stoga koristi za izradu usadaka koji su namijenjeni za koštana oštećenja s manjim opterećenjima, primjerice za ispunu oštećenih kosti u ortopedskoj i oralnoj kirurgiji te za presvlake dentalnih usadaka i metalnih proteza<sup>25</sup>. Najistaknutija vrsta biokeramike je CaP biokeramika, koja ima široku primjenu u biomedicini, a najpoznatiji predstavnici su hidroksiapatit (HAp), amorfni kalcijev fosfat (ACP), oktakalcijev fosfat pentahidrat (OCP), te  $\alpha$ - i  $\beta$ -trikalcijev fosfat ( $\alpha$ - i  $\beta$ -TCP). Fizikalna

svojstva CaP-a su slaba topljivost u vodi, dobra topljivost u kiselim i netopljivost u bazičnim otopinama. Poznavanje topljivosti CaP-a pri određenim pH vrijednostima od iznimne je važnosti, jer topljivost značajno utječe na ponašanje biokeramike *in vivo*. Poznavanje krivulja topljivosti CaP omogućuje prilagođavanje brzine razgradnje, kako bi ona bila jednaka brzini stvaranja novog koštanog tkiva. To se može postići stvaranjem višefazne CaP biokeramike, koja ima bolji stupanj resorpcije nego pojedinačna faza <sup>26</sup>. Prednosti CaP su stabilnost, mogućnost proizvodnje u velikim količinama i dostupnost. HAp i  $\beta$ -TCP najmanje su topljivi CaP te se zbog toga komercijalno koriste za proizvodnju koštanih okosnica na temelju CaP biokeramike.

Često istraživani kompozitni materijal sastoji se od HAp-a koji potiče rast novih koštanih stanica i omogućava nastanak čvrste veze između tkiva i usadka, te od biopolimera koji osigurava fleksibilnost. Da bi priprava takvog materijala bila što uspješnija potrebno je temeljito poznavati svojstva pojedinih komponenata, kako bi se pripremila okosnica što sličnija prirodnom koštanom tkivu, s zadovoljavajućim regeneracijskim svojstvima <sup>19</sup>.

### 2.3 HIDROKSIAPATIT

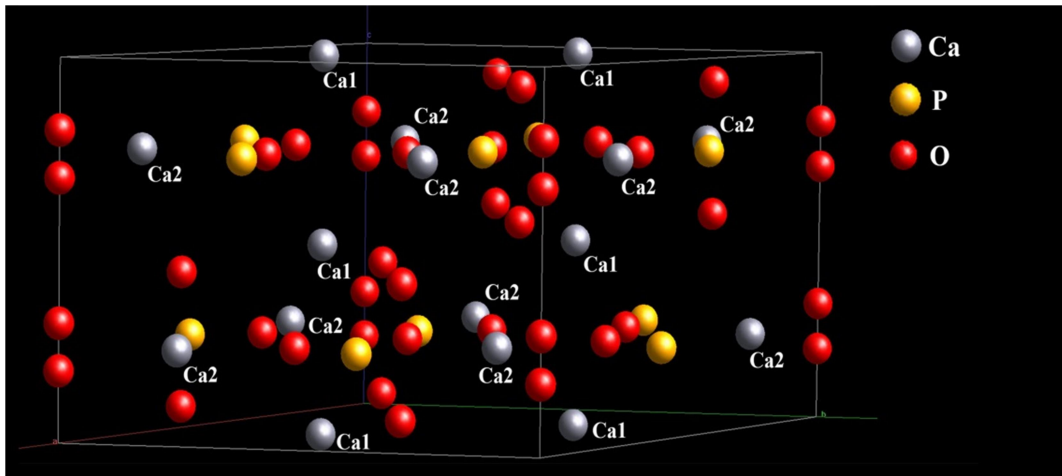
Hidroksiapatit s masenim udjelom od 60-70 % predstavlja temeljnu mineralnu fazu kosti. Formula hidroksiapatita je  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , dok molarni omjer kalcija i fosfora iznosi  $\text{Ca/P} = 1,67$ . Molarni omjer je važan, jer u slučaju njegovog odstupanja, pri toplinskoj obradi materijala može doći do pojave drugih CaP i kalcijeva oksida.

Moguća su dva slučaja:

1. molarni omjer  $\text{Ca/P}$  manji je od 1,67; dolazi do nastajanja  $\alpha$ - ili  $\beta$ -TCP.
2. molarni omjer  $\text{Ca/P}$  veći je od 1,67; dolazi do nastajanja kalcijevog oksida (CaO) i hidroksiapatitne faze.

Kristalna rešetka hidroksiapatita heksagonske je simetrije, a parametri elementarne ćelije iznose  $a = b = 9,41369 \text{ \AA}$ ,  $c = 6,90197 \text{ \AA}$ . Postoji nekoliko različitih pozicija na kojima se nalaze atomi kalcija i kisika. Od deset kalcijevih atoma četiri se nalaze na poziciji Ca1, dok se njih šest nalazi na poziciji Ca2. Na pozicijama O1 i O2 nalazi se po jedan kisikov atom, dok se na poziciji O3 nalaze dva kisikova atoma, u prostornoj grupi  $P6_3/m$  <sup>27</sup>. Na slici 2 prikazana

je kristalna rešetka HAp-a s označenim pozicijama kalcijevih atoma dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.



**Slika 2.** Struktura kristalne rešetke hidroksiapatita dobivena pomoću računalnog programa DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0.

HAp je mineral ionskog karaktera, te se u njegovu kristalnu strukturu mogu ugraditi različiti ioni čija je uloga pospješiti biokemijske funkcije HAp-a. Ioni se mogu ugraditi na pozicije kalcijevih ( $\text{Ca}^{2+}$ ) iona, te na pozicije fosfatnih ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) i hidroksilnih ( $\text{OH}^-$ ) iona. Ionske supstitucije utječu na svojstva HAp-a kao što su stabilnost, topljivost, morfologija kristala te parametri elementarne ćelije. Međutim, kristalna rešetka HAp-a i nakon supstitucije ostaje u istoj prostornoj grupi <sup>27</sup>.

Na pozicijama kalcijevih iona najčešće dolazi do supstitucije  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionima, dok na poziciji  $\text{PO}_4^{3-}$  najčešće dolazi do supstitucije karbonatnim ( $\text{CO}_3^{2-}$ ) ionima. Supstitucija karbonatnim ionima može se dogoditi na dvije pozicije u strukturi HAp-a:

1. A-tip supstitucije; pri kojem  $\text{CO}_3^{2-}$  supstituira  $\text{OH}^-$
2. B-tip supstitucije; pri kojem  $\text{CO}_3^{2-}$  supstituira  $\text{PO}_4^{3-}$ .

Supstitucija karbonatnim ionima odvija se u prirodnom koštanom tkivu prema B-tipu supstitucije, koji se stoga uvijek nastoji postići prilikom ugradnje  $\text{CO}_3^{2-}$  iona, kako bi se što bolje imitirali procesi koji se odvijaju u prirodnom koštanom tkivu.

Danas se HAp dobiva na različite načine, koji se mogu podijeliti u tri skupine:

1. mokri postupci pripreme (hidroliza, hidrotermalna metoda, kondenzacija, metoda kemijskog taloženja)

2. suhi postupci priprave

3. postupci kondenzacije prekursora u plinovitoj fazi (isključivo za pripravu tankih HAp filmova na odgovarajućim supstratima)

Međutim, sintetski HAp dobiven nekim od gore navedenih postupaka ipak se razlikuje od biološkog hidroksiapatita. Biološki HAp niske je kristalnosti i malih dimenzija kristala ( $50 \times 25 \times 2$  nm), a u svojoj strukturi već sadrži različite elemente u tragovima, koji izostaju kod sintetskog HAp-a. U tablici 1 navedeni su elementi u tragovima uz odgovarajuće masene udjele koji se nalaze u mineralnoj fazi kosti i zubi.

**Tablica 1.** Elementarni sastav prirodnog koštanog tkiva i zubi <sup>28</sup>.

	KOST	CAKLINA	DENTIN
Ca (wt,%)	36,6	37,6	40,3
P(wt,%)	17,1	18,3	17,1
CO <sub>2</sub> (wt,%)	4,8	3,0	4,8
Na(wt,%)	1,0	0,7	0,1
K(wt,%)	0,07	0,05	0,7
Mg(wt,%)	0,6	0,2	1,1
Sr(wt,%)	0,05	0,03	0,04
F(wt,%)	0,1	0,01	0,07
Zn (ppm)	126-217	263	173
Si (ppm)	500	-	-

Dokazano je da upravo elementi u tragovima imaju ključnu ulogu u nastajanju, rastu i razvoju novih koštanih stanica, te da je pomoću njih moguće poboljšati biološka i mehanička svojstva i prilagoditi brzinu razgradnje materijala <sup>29</sup>.

HAp je jedan od najčešće korištenih oblika CaP biokeramike, upravo zbog njegove kemijske i strukturne sličnosti s mineralnom fazom prirodnog koštanog tkiva, što ga čini dobrim kandidatom za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva <sup>30</sup>. Zbog njegove prilagodljive strukture podložne supstitucijama, moguće je sintetizirati materijale specifičnih svojstava, što je od velike važnosti za široku primjenu. Zbog toga je velik broj istraživanja usmjeren na razvoj HAp-a supstituiranog biološki značajnim ionima koji imaju sposobnost potaknuti rast novog koštanog tkiva. U posljednje vrijeme to se nastoji postići pripremom HAp-a iz biogenih izvora, koji u sebi već sadrži brojne biološki značajne ione.



### 2.3.1 Hidroksiapatit dobiven iz biogenih izvora

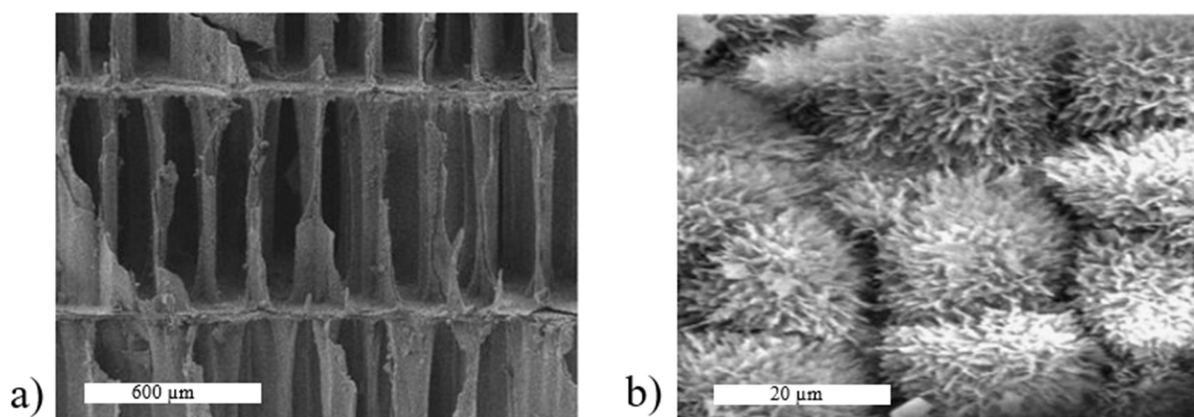
HAp dobiven iz biogenih izvora koji sadrže elemente u tragovima pokazuje veći stupanj biokompatibilnosti, osteoinduktivnosti, bioaktivnosti te poboljšana mehanička svojstva, zbog čega se mogućnost njegove primjene aktivno istražuje <sup>31</sup>. Biogeni izvori bogati kalcijem, kao što su ljuske jajeta, koralji, sipina kost, školjke, sastoje se većinskim dijelom od kalcijeva karbonata,  $\text{CaCO}_3$ , iz kojega se hidrotermalnom reakcijom ili metodom kemijskog taloženja dobiva HAp <sup>31</sup>. Dodatna prednost korištenja biogenih izvora za sintezu HAp-a je smanjenje količine otpada i recikliranje, što pridonosi smanjenju onečišćenja okoliša te se sinteza HAp-a iz biogenih izvora smatra ekološki prihvatljivim pristupom <sup>13, 15</sup>.

#### 2.3.1.1 Hidroksiapatit dobiven iz ljusaka jajeta

Svake godine milijuni tona ljusaka jajeta diljem svijeta završavaju u otpadu. Budući da se ljuska jajeta sastoji od ~ 94 %  $\text{CaCO}_3$ , ~ 1 %  $\text{MgCO}_3$  i ~ 5 % organske tvari te je lako dostupan i jeftin materijal, ona se smatra dobrim izvorom kalcijevih iona i aktivno se istražuje za sintezu HAp-a <sup>32</sup>. Adeogun i suradnici uspješno su iskoristili ljuske kokošnjeg jajeta kako bi sintetizirali HAp metodom kemijskog taloženja. Rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD, engl. *X-Ray Diffraction*) utvrđeni su pikovi karakteristični za HAp, dok su infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama (FTIR, engl. *Fourier Transform Infrared Spectroscopy*) potvrđeni odzivi karakteristični za fosfatnu, hidroksilnu i karbonatnu skupinu, koji pripadaju karbonatnom HAp-u. Dodatno, potvrđena je prisutnost elemenata u tragovima kao što su kalij, magnezij i željezo, koji imaju ključne uloge u biološkim procesima <sup>11</sup>. Geng i suradnici sintetizirali su hidrotermalnom metodom HAp i HAp supstituiran stroncijem koristeći ljuske jajeta kao prekursor  $\text{Ca}^{2+}$  iona. Supstitucija stroncijem uzrokovala je nižu kristalnost i smanjenje specifične površine. Međutim, oba uzorka pokazala su poboljšana biološka svojstva u odnosu na HAp pripremljen iz sintetskog prekursora, posebice Sr-supstituirani HAp <sup>10</sup>. Padmanabhan i suradnici pripremili su kompozitne okosnice na temelju HAp-a dobivenog iz ljusaka jajeta i kolagena te ih usporedili s okosnicama od kolagena bez dodatka HAp-a. XRD analizom i transmisijiskim elektronskim mikroskopom (TEM, engl. *Transmission Electron Microscopy*) potvrđena je prisutnost nanočestica HAp-a unutar kolagenske matrice, a dobiveni uzorci su visokoporozni. Kompozitni uzorak pokazao je bolja mehanička svojstva, te se smatra dobrim materijalom za potencijalnu primjenu u biomedicini <sup>33</sup>.

### 2.3.1.2 Hidroksiapatit dobiven iz sipine kosti

Drugi biogeni izvor od interesa je sipina kost, jer se u HAp-u pripremljenom iz sipine kosti nalaze elementi u tragovima ( $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  i  $\text{Na}^+$ ) ključni za regeneraciju koštanog tkiva<sup>34</sup>. HAp dobiven iz sipine kosti pokazao je veću biokompatibilnost u odnosu na HAp dobiven iz sintetskog prekursora<sup>35</sup>. Istraživanjem Milovac i suradnika utvrđena je mogućnost relativno jednostavne metode dobivanja HAp-a iz sipine kosti hidrotermalnom metodom<sup>36</sup>. Na slici 3 prikazana je struktura sipine kosti nakon sinteze HAp-a, te nastali kristali HAp-a u obliku cvjetače.



**Slika 3.** a) Struktura sipine kosti nakon sinteze HAp-a, b) Kristali HAp-a u obliku cvjetače<sup>36</sup>.

Na slici 3 vidljivo je da je nakon sinteze HAp-a hidrotermalnom metodom očuvana visokoporozna struktura s dobrom povezanošću pora, što je bitno za uspješan prijenos hranjivih tvari i kisika. Morfologija nastalih kristala HAp-a je u obliku cvjetače<sup>36</sup>. Nadalje, *in vivo* istraživanja pokazuju da HAp dobiven iz sipine kosti pojačano potiče regeneraciju kosti, u odnosu na sintetski HAp, zbog čega ovako dobiven HAp predstavlja velik potencijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva<sup>35</sup>. Ressler i suradnici sintetizirali su iz sipine kosti metodom kemijskog taloženja višefazni CaP koji se sastoji od karbonatnog hidroksiapatita s manjkom kalcijeva iona (engl. *calcium deficient hydroxyapatite*, CDHAp), OCP-a i ACP-a te je supstituiran biološki značajnim ionima. Dobiveni CaP je topljiviji nego stehiometrijski HAp, zbog čega je moguće dobiti materijal većeg stupnja bioresporpcije, koji je bitan za biomedicinske primjene<sup>34</sup>. Poželjne biološke karakteristike HAp-a dobivenog iz sipine kosti potvrđene su istraživanjem Rocha i suradnika, u kojem su rezultati *in vitro* istraživanja pokazali visok stupanj biokompatibilnosti, bioaktivnosti i vaskularizacije koštanog tkiva<sup>31</sup>.

### 2.3.1.3 Hidroksiapatit dobiven iz ljuštura školjaka

Uz ljuske jajeta i sipinu kost, treći biogeni izvor koji se često istražuje za sintezu HAp-a su ljuštore školjka. Wu i suradnici sintetizirali su HAp iz ljuštura kamenica (lat. *Ostrea edulis*), uz prethodno mljevenje i potom žarenje. Dokazali su da se povećanjem temperature žarenja povećava i kristalnost uzorka, veličina kristala i Ca/P omjer<sup>37</sup>. Također, HAp dobiven iz školjaka sintetiziran je mikrovalnom radijacijom koja je jednostavna i brza metoda za koju je potrebna mala količina energije. Dobiveni HAp pokazuje veću razinu bioaktivnosti i biokompatibilnosti od sintetskog HAp-a<sup>38</sup>. Kumar i suradnici sintetizirali su karbonatni HAp iz ljuštura dagnji, što je od važnosti za oponašanje kemijskog i strukturnog sastava biološkog apatita<sup>39</sup>. Pal i suradnici sintetizirali su Sr-supstituirani HAp dobiven iz ljuštura školjaka hidrotermalnom metodom. Povećanjem koncentracije stroncija uočena su poboljšanja mehaničkih svojstava pripremljenog HAp-a<sup>40</sup>.

Zbog navedenog, supstitucije određenih metalnih iona u kristalnu rešetku hidroksiapatita poželjne su zbog bioloških svojstava tako pripremljenih materijala. Međutim, kako bi supstitucija bila moguća, veličina iona mora biti pogodna uz sposobnost strukture da se prilagodi određenom stupnju deformacije. Goldschmidtova pravila govore kako ion jednog elementa može zamijeniti neki od atoma kristalne rešetke samo kada se njihovi radijusi ne razlikuju za više od 15%, uz prethodno zadovoljenu električnu neutralnost. Ako je supstituiran heterovalentni ion, mora doći do kompenzacije naboja, što se postiže daljnjom supstitucijom nekih od iona u kristalnoj rešetci. Rendgenskom difrakcijskom analizom i Rietveldovom metodom utočnjavanja moguće je potvrditi uspješnost supstitucije i prisutnost određenog iona jer će doći do promjene parametara elementarne ćelije. Naime, supstitucijom iona manjeg radijusa doći će do smanjenja duljine stranica elementarne ćelije, a supstitucijom iona većeg radijusa do njihovog povećanja<sup>41</sup>.

### 2.3.2 Hidroksiapatit supstituiran stroncijem

Stroncij je prirodno prisutan u ljudskom tijelu, odnosno u mineralnoj fazi koštanog tkiva, posebice u metabolički aktivnim dijelovima<sup>42</sup>. Koncentracija stroncija opada starenjem kosti, a njegova koncentracija u novonastaloj kompaktnoj kosti može biti do četiri puta veća nego u starijoj kompaktnoj kosti<sup>43</sup>. Povoljni učinci stroncija na koštani sustav intenzivno se istražuju u posljednjih nekoliko godina. Naime, stroncij ima dvojni mehanizam djelovanja kojim

omogućuje povećanje koštane mase i njene čvrstoće uz poticanje nastajanja koštanog tkiva, te inhibira resorpciju kostiju. Nastanak novog koštanog tkiva stroncij potiče pozitivnim utjecajem na proliferaciju osteoblastnih stanica, a resorpciju sprječava inhibiranjem aktivnosti osteoklastnih stanica <sup>44</sup>. Dodatno, prisutnost  $\text{Sr}^{2+}$  iona sprječava apoptozu (smrt koštanih stanica) <sup>45</sup>. Zbog navedenih povoljnih učinaka stroncija, stroncijem supstituirani HAp ima potencijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Radijus  $\text{Sr}^{2+}$  iznosi 0,113 nm, dok radijus  $\text{Ca}^{2+}$  iznosi 0,100 nm, što predstavlja neznatnu razliku <sup>46</sup>. Supstitucijom  $\text{Ca}^{2+}$  iona  $\text{Sr}^{2+}$  ionom dolazi do deformacija elementare ćelije, do promjene u veličini kristala i povećanja topljivosti, koja je bitna pri postupnom otpuštanju iona u okolno tkivo <sup>47</sup>. Povoljni učinci  $\text{Sr}^{2+}$  iona iskorišteni su za liječenje koštanih bolesti. Naime, na tržištu se već nalazi lijek, stroncijev ranelat, koji se koristi za sprječavanje osteoporoze, a dokazano je da upotreba lijeka smanjuje vjerojatnost fraktura kod pacijenata koji boluju od te bolesti <sup>48</sup>.

### 2.3.3 Hidroksiapatit supstituiran magnezijem

Maseni postotak magnezija u ljudskom tijelu iznosi 0,6 %, a čak 65 % ukupnog magnezija nalazi se u kostima i zubima <sup>49</sup>. Magnezij je od ključne važnosti za funkcioniranje koštanog sustava, a nedostatak magnezija u tijelu može uzrokovati osteoporozu <sup>50</sup>. Nadalje, magnezij potiče proliferaciju koštanih stanica i povećava gustoću kostiju, te se upravo zbog toga sve više istraživanja usmjerava na supstitucije HAp-a magnezijevim ionima,  $\text{Mg}^{2+}$  <sup>51</sup>. Najčešće metode pripreme Mg-supstituiranog HAp-a su sol-gel postupak, metoda kemijskog taloženja te mikrovalna sinteza potpomognuta surfaktantima <sup>9</sup>. HAp supstituiran  $\text{Mg}^{2+}$  ionima postaje sličniji biološkom HAp-u u pogledu sastava, kristalnosti i morfologije <sup>51</sup>. Radijus  $\text{Mg}^{2+}$  iona (0,069 nm) manji je od radijusa  $\text{Ca}^{2+}$  iona (0,100 nm), zbog čega nakon supstitucije dolazi do smanjenja parametara elementarne ćelije. Elementarna ćelija se uslijed supstitucije deformira, što dovodi do povećane topljivosti uzorka pri fiziološkim uvjetima, te do smanjenja kristalnosti <sup>52</sup>. Smanjenje veličine čestica kao rezultat supstitucije rezultira povećanjem specifične površine čestica, zbog čega su premazi Mg-supstituiranog HAp-a povoljniji nosači proteina i/ili lijekova <sup>53, 54</sup>. Nadalje, Mg-supstituirani HAp koristi se i u obliku cementa, gdje se  $\text{Mg}^{2+}$  ioni koriste za poboljšanje mehaničkih svojstava i staničnog odgovora <sup>55</sup>.

#### 2.3.4 Hidroksiapatit supstituiran cinkom

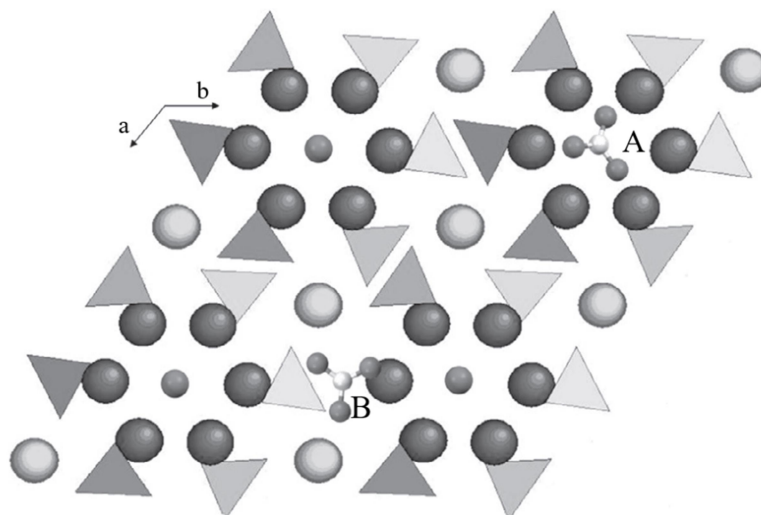
Cink je od velike važnosti za ljudsko tijelo, odnosno njegov razvoj, jer ima ključnu ulogu u nekoliko fizioloških procesa. Udio cinka u tijelu varira od 0,0126 do 0,0217 wt%, jer se tijekom života sastav ljudske kosti mijenja, te dolazi do otpuštanja određene količine cinkovih iona,  $Zn^{2+}$ . Ti ioni potiču djelovanje stanica osteoblasta, a inhibiraju djelovanje stanica osteoklasta te na taj način sprječavaju smanjenje gustoće kostiju<sup>56</sup>. Nadalje, enzimi poput alkalne fosfataze (ALP) koriste  $Zn^{2+}$  ione kako bi tijelo moglo obavljati svoje regularne, strukturalne i katalitičke procese. ALP ključan je enzim za proces mineralizacije tkiva koji regulira razinu fosfata, u svrhu stvaranja neutralno/alkalnog okruženja pogodnog za proces mineralizacije<sup>57</sup>.  $Zn^{2+}$  ioni povećavaju aktivnost stanica te posjeduju antibakterijska svojstva. Radijus  $Zn^{2+}$  iona (0,074 nm) manji je od radijusa  $Ca^{2+}$  iona (0,100 nm), a rezultat supstitucije je smanjenje parametara elementarne ćelije<sup>58</sup>. Kako se koncentracija  $Zn^{2+}$  iona u uzorku povećava, dolazi do smanjenja toplinske stabilnosti i kristalnosti Zn-supstituiranog HAp-a<sup>59</sup>. Zn-supstituirani HAp može se sintetizirati na nekoliko načina, među kojima su najznačajniji sol-gel postupak, hidrotermalna metoda, metoda kemijskog taloženja i metoda ionske izmjene<sup>60</sup>. Sol-gel postupak pogodan je za pripremu Zn-supstituiranog hidroksiapatitnog premaza koji se koristi na metalnim protezama zbog antibakterijskih svojstava cinka<sup>61</sup>. Koncentracija cinka potrebna da bi premazi posjedovali antibakterijska svojstva mora biti veća od 1000 ppm<sup>62</sup>.

#### 2.3.5 Hidroksiapatit supstituiran natrijem

Udio natrija u prirodnom koštanom tkivu iznosi  $\sim 1$  wt%.  $Na^+$  ioni poboljšavaju osteoinduktivna svojstva, odnosno svojstva koja potiču diferencijaciju stanica u koštane stanice. Nadalje, natrij ima značajnu ulogu u metabolitičkim procesima i resorpcijskom procesu tkiva, stoga je supstitucija  $Ca^{2+}$  s  $Na^+$  ionima poželjna. Posljedica Na-supstitucije jest povećanje parametara elementarne ćelije<sup>63</sup>. Metodom kemijskog taloženja sintetiziran je Na-supstituiran sustav CaP koji se sastojao od dvije faze, HAp i  $\beta$ -TCP<sup>64</sup>. Istraživanjima je utvrđeno da Na-supstituiran dvofazni sustav CaP odlikuju bolja biološka svojstva (brže obnavljanje koštanog tkiva) u usporedbi sa CaP sustavom koji nije supstituiran  $Na^+$  ionima.

### 2.3.6 Hidroksiapatit supstituiran karbonatom

Karbonat je u biološkim apatitima, odnosno u samom ljudskom tijelu, prisutan u velikom masenom postotku (4-8 wt%), zbog čega je supstituent od interesa za potrebe biomedicinske primjene HAp-a.



**Slika 4.** Apatitna struktura duž c-osi. Prikazani su položaji  $CO_3^{2-}$  ovisno o tipu supstitucije (A ili B).  $PO_4^{3-}$  prikazani su tetraedrom, svjetlije sfere prikazuju Ca1, tamnije sfere Ca2, najmanje sfere OH, a  $CO_3^{2-}$  prikazani su trigonoskom geometrijom <sup>65</sup>.

Supstitucijom  $CO_3^{2-}$  ionom narušava se električna neutralnost, te stoga mora doći do kompenzacije naboja, što se kod A-tipa supstitucije postiže vakancijama, a kod B-tipa supstitucije vakancijama i supstitucijom  $Na^+$  ionima <sup>65</sup>. Budući da se supstitucija  $CO_3^{2-}$  ionima u prirodnom koštanom tkivu odvija prema B-tipu supstitucije, on je poželjan pri sintezi sintetskog HAp-a za biomedicinske primjene, u cilju oponašanja prirodnog mineralnog tkiva. Supstitucija  $CO_3^{2-}$  ionima uzrokuje promjene parametara elementarne ćelije, naime, kod A-tipa supstitucije dolazi do povećanja osi *a* te do smanjenja osi *c*, dok će B-tip supstitucije uzrokovati obrnute rezultate. Osim tipa supstitucije, na promjenu parametara elementarne ćelije utječe i koncentracija  $CO_3^{2-}$  iona.  $CO_3$ -supstituirani HAp može se sintetizirati pomoću nekoliko metoda, kao što su sol-gel postupak, metoda kemijskog taloženja, hidrotermalna metoda, mikrovalno taloženje i metoda ionske izmjene. Dobiveni  $CO_3$ -supstituirani HAp smanjene je kristalnosti, što rezultira povećanom topljivosti i smanjenjem termalne stabilnosti uzorka <sup>66</sup>. Zbog navedenih povoljnih učinaka na koštani sustav, supstitucija HAp-a  $CO_3^{2-}$  ionima često se primjenjuje za biomedicinske primjene HAp-a.

## 2.4 BIOPOLIMERI

Inženjerstvo tkiva posebnu pažnju posvećuje razvoju organsko/anorganskih kompozitnih okosnica, koje su najčešće građene od polimera i biokeramike. Uloga polimera u ovakvom materijalu je osigurati mehaničku otpornost te biorazgradivost. Osim toga, da bi biopolimeri bili pogodni za regeneraciju koštanog tkiva, oni moraju biti biokompatibilni, imati sposobnost bio-integracije i omogućavati pripremu porozne strukture <sup>67</sup>.

Polimere možemo podijeliti na prirodne i sintetske:

### 1. Prirodni polimeri

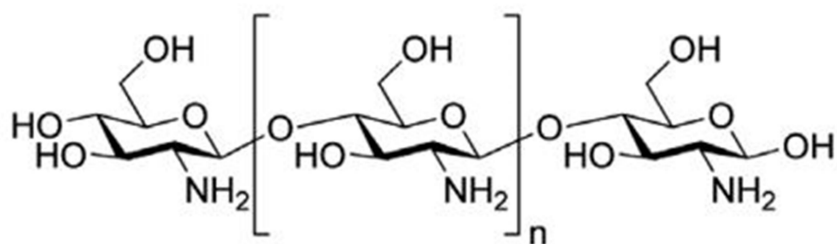
- a) polisaharidi – hitin, kitozan, alginat, celuloza, škrob, derivati hijaluronske kiseline
- b) proteini – kolagen, fibrin gelovi, soja, svila, želatina

### 2. Sintetski polimeri – poliesteri, poliglikolna kiselina, polimljična kiselina <sup>19</sup>

Navedeni polimeri su biokompatibilni što znači da ne izazivaju upalne reakcije nakon usađivanja u tijelo domaćina. Uz biokompatibilnost, za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva biopolimer mora imati mogućnost razgradnje *in vivo* <sup>68</sup>. Razgradnja *in vivo* omogućuje da se biopolimer koristi kao sustav za kontrolirano otpuštanje lijekova ili kao okosnica <sup>69</sup>. Okosnice izrađene od sintetskih biopolimera imaju zadovoljavajuća mehanička svojstva, a biološki su inertne. Iako je obrada sintetskih biopolimera jednostavnija, jer ih je lakše kontrolirati i oblikovati, prirodni biopolimeri znatno su biokompatibilniji te pospješuju mineralizaciju koštanog tkiva. U slučajevima većih koštanih oštećenja kod kojih nije moguća samoobnova, tkivo se može obnoviti pomoću okosnica koji potiču proliferaciju i diferencijaciju stanica. Prirodni biopolimeri se bez izazivanja toksičnih reakcija i upalnih procesa prilagođavaju mjestu ugradnje, na kojem će se nakon određenog vremena stvoriti novo koštano tkivo <sup>67</sup>. Nedavna istraživanja pokazala su kako su biokompatibilnost i biorazgradivnost svojstva koja materijalu daju značajnu prednost pri izboru materijala za okosnicu, zbog čega su prirodni biopolimeri najpovoljniji odabir. U inženjerstvu koštanog tkiva koriste se neki biljni i životinjski biopolimeri, od kojih su najpoznatiji i najčešće korišteni kitozan i hitin <sup>70</sup>.

### 2.4.1 Kitozan

Kitozan se učestalo koristi u inženjerstvu koštanog tkiva upravo zbog svoje sposobnosti stvaranja visokoporoznih, trodimenzionalnih okosnica <sup>71</sup>. Kitozan je linearni polisaharid sastavljen od jedinica N-acetil D-glukozamina, a sastoji se od tri tipa reaktivnih funkcionalnih skupina, a to su amino skupina te primarna i sekundarna hidroksilna skupina (slika 5).



**Slika 5.** Struktura isječka makromolekule kitozana <sup>71</sup>.

Kitozan se dobiva od prirodnog biopolimera hitina, odnosno njegovom djelomičnom deacetilacijom ( $DD > 65\%$ ). Kao što je već navedeno, hitin je biopolimer prirodnog podrijetla, što znači da njegov sastav i fizikalno-kemijska svojstva mogu varirati, a samim time varirat će i sastav i fizikalno-kemijska svojstva kitozana i to na način koji je teško predvidjeti <sup>71</sup>. Kitozan je topljiv u razrijeđenim kiselim otopinama kojima je pH vrijednost niža od 6. U tom slučaju se amino skupina protonira te postaje pozitivno nabijena, što kitozan čini topljivim u vodi. U slučaju pH vrijednosti više od 6, amino skupina se deprotonira, što rezultira gubitkom naboja te polimer postaje netopljiv. Osim o pH vrijednosti otopine, topljivost kitozana ovisi i o metodi pripreme i stupnju deacetilacije. Razrijeđena octena kiselina je najčešće otapalo za kitozan, a može se koristiti i klorovodična te dušična kiselina. Kitozan nakon otapanja postaje molekula pozitivnog naboja, zbog čega reagira s negativnim dijelovima stanične membrane. Rezultat je reorganizacija membrane te otvaranje zgusnutih proteina, zbog čega je propusnost stanične membrane kitozana povećana. Povećanje broja amino skupina omogućuje bolju interakciju kitozana i stanica. Mogućnost biorazgradnje kitozana jedna je od njegovih najvećih prednosti. Naime, razgradnjom kitozana unutar tijela domaćina nastaju oligosaharidi koji nisu toksični, te se mogu dalje razgrađivati unutar organizma ili izlučiti iz tijela <sup>72</sup>. Još jedna od prednosti korištenja kitozana je njegova



kemijska priroda koja otvara mogućnosti za brojne kovalentne i ionske izmjene koje zatim omogućuju znatne prilagodbe bioloških i mehaničkih svojstava <sup>71</sup>.

### 3. EKSPERIMENTALNI DIO

#### 3.1 MATERIJALI

Za dobivanje kalcijevih oksida, CaO potrebnih za sintezu HAp korišteni su:

- kalcijev karbonat, CaCO<sub>3</sub>, (T.T.T d.o.o.)
- kalcijev karbonat, CaCO<sub>3</sub>, dobiven iz sipine kosti (*Sepia officinalis* L.)
- kalcijev karbonat, CaCO<sub>3</sub>, dobiven iz ljustaka jajeta
- kalcijev karbonat, CaCO<sub>3</sub>, dobiven iz ljuštura školjaka (*Trachycardium egmontianum* L.)

Za sintezu HAp-a korišten je:

- amonijev dihidrogenfosfat, NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, (Lach:Ner)

Za pripremu kompozitnih okosnica korišteni su:

- kitozan, M<sub>w</sub> = 310 000–375 000g/mol, DD > 0,75 (Lach:Ner)
- octena kiselina, CH<sub>3</sub>COOH (99,8 %), (Sigma-Aldrich)
- natrijev hidroksid, NaOH, (Honeywell/Fluka)
- etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, (KEFO)

Za karakterizaciju materijala korišteni su:

- nitratna kiselina, HNO<sub>3</sub>, (Ultra-Pure, Sigma-Aldrich)
- silicij, Si (standard), (Sigma-Aldrich)
- etanol, CH<sub>3</sub>CH<sub>2</sub>OH, (KEFO)
- fiziološka otopina puferirana fosfatom (PBS), (Gibco)
- DMEM medij (*engl.* Dulbecco's modified Eagle's culture medium), (Sigma-Aldrich)
- fetalni goveđi serum, (Capricorn Scientific)
- penicilin/streptomycin, (Lonza)
- hidrofobne pločice od polistirena s jažicama, (Coming-Sigma-Aldrich)

- tetrazolijeva sol, (3-(4,5-dimetil tiazol)-2,5-difenil tetrazol bromid), (Sigma-Aldrich)
- dimetil sulfoksid, DMSO, (Sigma-Aldrich)

## 3.2 SINTEZA MATERIJALA

### 3.2.1 Dobivanje kalcijevog oksida iz biogenih izvora

Kalcijev oksid, CaO, dobiven je iz sintetskog i biogenog kalcijevog karbonata (sipina kost, ljuske jajeta i školjke). Kako bi se iz biogenih izvora uklonila sva organska tvar i dobio CaO, ljuske jajeta, sipina kost, i školjke su ispirane, usitnjene i žarene na 700 °C tijekom četiri sata. Sintetski CaO dobiven je žarenjem sintetskog CaCO<sub>3</sub> pri istim uvjetima.

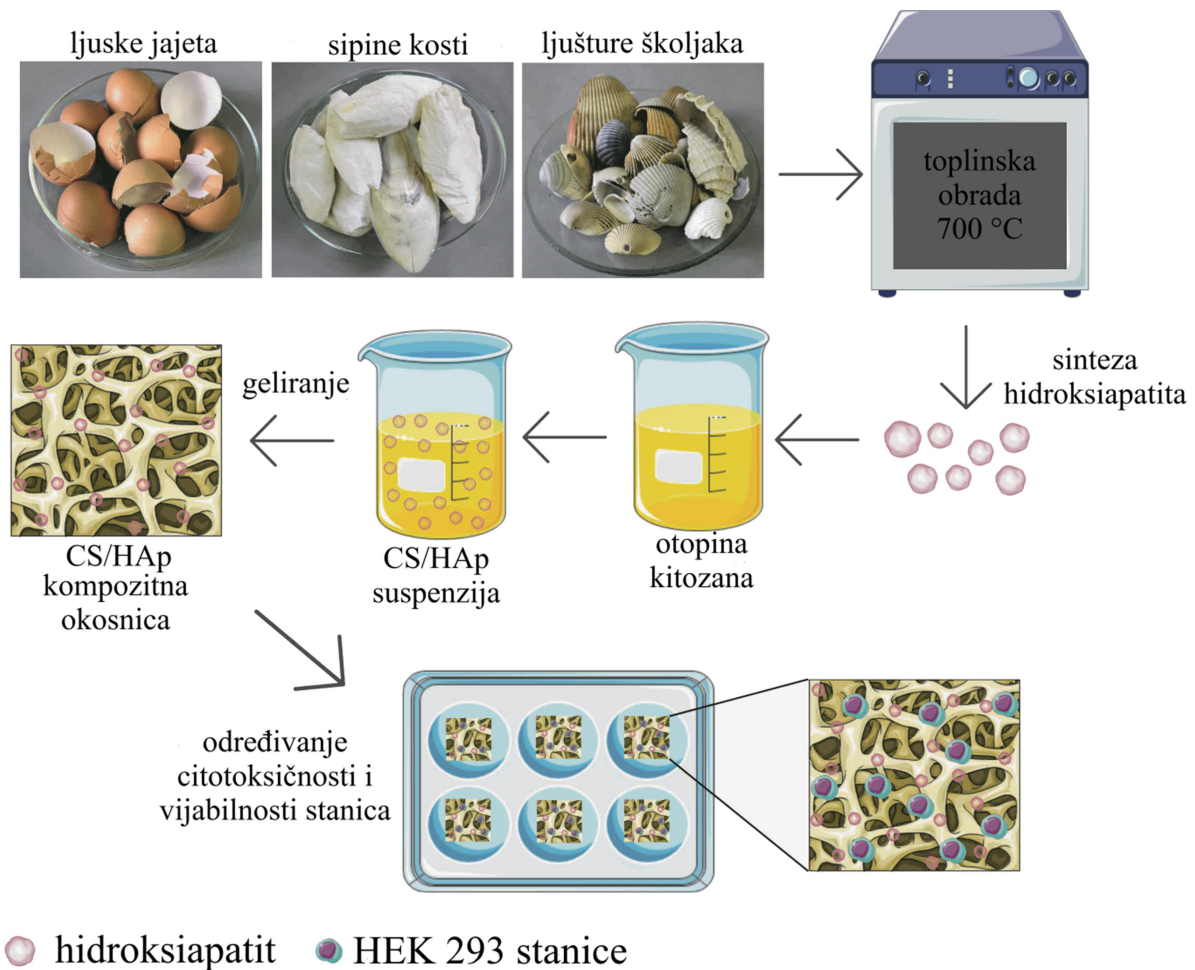
### 3.2.2 Sinteza hidroksiapatita

HAp je sintetiziran otapanjem dobivenih uzoraka CaO u demineraliziranoj vodi. Zatim je dodana određena količina amonijeva dihidrogenfosfata (NH<sub>4</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>) kako bi omjer Ca/P iznosio 1,67. Sinteza HAp-a provodila se tri dana pri temperaturi od 60 °C, uz dan starenja pri sobnoj temperaturi. Dobiven je uzorak sintetskog hidroksiapatita (HAp), uzorak hidroksiapatita iz ljuske jajeta (HAp\_e), sipine kosti (HAp\_c) i školjki (HAp\_s). Dio pripremljenih uzoraka je toplinski obrađen pri 1200 °C.

### 3.2.3 Priprema kompozitnih okosnica od hidroksiapatita i kitozana

Određena količina kitozana otopljena je u 0,40 %-tnoj otopini octene kiseline kako bi se dobila 1,2 wt% otopina kitozana. Zatim su dodane odgovarajuće količine HAp, HAp\_e, HAp\_c i HAp\_s kako bi udio HAp-a u otopini kitozana iznosio 30 wt%. Zatim su CS/HAp suspenzije ohlađene na 4 °C, izliven u Petrijeve zdjelice i smrznute na -30 °C tijekom osam sati. Uzorci su potom uronjeni u smjesu neotapala (NaOH/EtOH, volumni omjer 1:1) na temperaturi od -30 °C tijekom 24 sata, kako bi se potaknulo geliranje kitozana i neutralizirala zaostala kiselina u uzorcima. Zatim je uslijedilo uranjanje uzoraka u 96%-tni etanol pri temperaturi od -30 °C tijekom 24 sata kako bi se omogućilo ispiranje uzoraka od NaOH. Nadalje, uzorci su ispirani demineraliziranom vodom kako bi se uklonio zaostali etanol te ponovno smrznuti i liofilizirani kako bi se iz njih uklonila prisutna voda. Kao produkt je

dobivena kompozitna okosnica CS/HAp visokoporozne strukture. Na slici 6 shematski je prikazana sinteza CS/HAp kompozitne okosnice.



**Slika 6.** Shematski prikaz sinteze CS/HAp kompozitnih okosnica i njihove pripreme za biološku evaluaciju.

### 3.3 METODE KARAKTERIZACIJE

#### 3.3.1 Elementarna analiza

Masena spektroskopija s induktivno spregnutom plazmom (ICP-MS) korištena je za određivanje kemijskog sastava uzorka, a provedena je pomoću instrumenta Perkin Elmer ICP-MS ELAN DRC-e. Svaki uzorak (100 mg) otopljen je u 1 mL vodene otopine nitratne kiseline,  $\text{HNO}_3$ , ( $c = 1 \text{ mol/dm}^3$ ), čiji je volumen zatim povećan na 10 mL, dodatkom ultračiste vode.

### 3.3.2 pH vrijednost

Konačna pH vrijednost suspenzija mjerena je pomoću Schott CG 842 pH-metra, koristeći BlueLine 14 elektrodu preciznosti 0,01, pri sobnoj temperaturi.

### 3.3.3 Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza

Mineralni sastav dobivenih kalcijevih oksida određen je rendgenskom difrakcijskom analizom, XRD, pomoću difraktometra Shimadzu XRD-6000s Cu  $K_{\alpha}$  (1.5406 Å), zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva 35°-70°, s brzinom snimanja od 0,02°/0,6s. Mineralni sastav pripremljenih i toplinski obrađenih prašaka hidroksiapatita, u koje je umiješan silicij (5 wt%) kao standard, određen je također XRD analizom, u mjernom području kuteva 20°-70°, s brzinom snimanja 0.02°/3s.

Kvantitativni fazni sastavi pripremljenih uzoraka određeni su računalnim programom DIFFRAC.SUITE TOPAS V.5.0., koristeći Rietveldovu metodu utočnjavanja. Strukturni model HAp-a koji je korišten u računalnom programu preuzet je iz istraživanja Veselinović i suradnika <sup>73</sup>, model  $\beta$ -TCP-a iz istraživanja Yashima i suradnika <sup>74</sup> i model  $\alpha$ -TCP-a iz istraživanja Mathew i suradnika <sup>75</sup>.

### 3.3.4 Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

Pripremljeni HAp i kompozitne okosnice CS/HAp karakterizirane su infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovom transformacijom (FTIR), pomoću ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometra s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani ukupno 32 puta u apsorpcijskom režimu pri 20 °C, u rasponu mjernog područja od 4000 do 400  $\text{cm}^{-1}$  s rezolucijom od 4  $\text{cm}^{-1}$ .

### 3.3.5 Pretražna elektronska mikroskopija

Morfologija pripremljenih kompozitnih okosnica CS/HAp analizirana je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM), pomoću mikroskopa TESCAN, Vega3 EasyProbe, pri energiji elektronskog snopa pd 11 keV. Prije samog mikroskopiranja okosnice su naparene smjesom zlata i paladija tijekom 90 sekundi.

### 3.3.6 Poroznost

Poroznost CS/HAp okosnica određena je pomoću Arhimedovog zakona. Svaka okosnica uronjena je u etanol, gustoće  $\rho = 0,789 \text{ g/cm}^3$ , pri sobnoj temperaturi. Poroznost okosnica (%) računata je kao omjer volumena pore ( $V_{\text{pore}}$ ) i ukupnog volumena okosnice ( $V_{\text{CS/HAp}}$ ), prema jednadžbi (1):

$$\text{Poroznost (\%)} = \frac{V_{\text{pore}}}{V_{\text{CS/HAp}}} \quad (1)$$

Uzorci okosnica su prethodno izrezani u cilindrične oblike promjera ( $D$ ) 6 mm i visine ( $H$ )  $\sim 1$  mm. Uzorci ( $n = 5$ ) su izvagani u suhom stanju ( $W_d$ ). Nadalje, nakon uranjanja u etanol pri uvjetima vakuuma, suvišna tekućina je uklonjena te su uzorci ponovno izvagani ( $W_e$ ). Volumen pore izračunat je prema jednadžbi (2):

$$V_{\text{pore}} = \frac{W_e - W_d}{\rho_{\text{etanol}}} \quad (2)$$

Gustoća cilindrično oblikovanih uzoraka izračunata je prema jednadžbi (3):

$$\rho_{\text{CS/HAp}} = \frac{W_d}{\pi \times (D/2)^2 \times H} \quad (3)$$

## 3.4 BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA

### 3.4.1 Nasađivanje stanica

Pripremljene okosnice CS/HAp izrezane su u cilindrične oblike promjera ( $D$ ) 6 mm i visine ( $H$ )  $\sim 1$  mm te sterilizirane u 96% etanolu tijekom 24 sata. Nakon sterilizacije, uzorci su tri puta ispirani PBS otopinom (fosfatno puferirana fiziološka otopina) i zatim ostavljeni u DMEM mediju (engl. *Dulbecco's modified Eagle's culture medium*) uz dodatak 10 % fetalnog goveđeg seruma i 1 % penicilina/streptomicina, tijekom 24 sata pri 4 °C. Idući dan, uzorci okosnica su premješteni u mikrotitarske pločice s 96 bunarčića (engl. *96-well plate*). Ljudske embrionalne bubrežne stanice (HEK 293, engl. *human embryonic kidney 293*)

nasadenene su na pripremljene okosnice ( $0,5 \times 10^5$  stanica/okosnica) i inkubirane pri  $37\text{ }^\circ\text{C}$  u atmosferi zraka s  $0,05\text{ atm CO}_2$ .

#### 3.4.2 Citotoksičnost

Potencijalna citotoksičnost određena je MTT metodom. Nakon 1 i 3 dana uzgoja proveden je MTT test uz (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5,-difeniltetrazol bromid). Mjerenje je provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica ThermoLabSystems MultiskanEX Reader pri valnoj duljini od 570 nm. Analiza je provedena u triplikatima.

#### 3.4.3 Životna aktivnost

Životna aktivnost stanica istražena je „live/dead“ metodom. Nakon 1 i 7 dana uzgoja okosnice su ispirane PBS-om, a zatim tripsinizirane i neutralizirane s medijem. Uzorci sa stanicama su centrifugirani (300 x, 5 minuta). Nakon uklanjanja supernatanta, nakupina stanica ispirana je PBS-om i inkubirana s  $200\text{ }\mu\text{dm}^3$  boje razrijeđene 1000 puta u PBS-u. Nakon inkubacije, otopina je prenesena u mikrotitarsku pločicu s 96 bunarčića i analizirana na čitaču GlowMax-Multi Promega korištenjem fluorescentnih filtera. Analiza je provedena u kvadriplikatima.

#### 3.4.4 Statistička analiza

Svi podaci bioloških testiranja prikazani su kao srednja vrijednost  $\pm$  standardna devijacija. Statistička analiza provedena je pomoću jednosmjerne analize varijance (ANOVA) kako bi se utvrdila razina značajnosti između grupa. Vrijednost  $p < 0,05$  smatra se statistički značajnom, dok se vrijednost  $p < 0,1$  smatra statistički visoko značajnom.

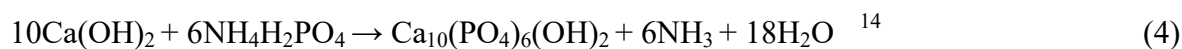
## 4. REZULTATI I RASPRAVA

CaP biokeramika istražuje se u okviru inženjerstva koštanog tkiva. Među CaP biokeramikom ističe se hidroksiapatit (HAp), zbog sličnosti prirodnom mineralnom tkivu. Mineralna faza koštanog tkiva sastoji se od 60-70 wt% HAp-a, uz koji se nalaze i brojni elementi u tragovima kao što su  $Mg^{2+}$ ,  $Na^+$ ,  $Sr^{2+}$ ,  $Fe^{3+}$ ,  $K^+$ ,  $Zn^{2+}$  i dr., koji pozitivno utječu na obnavljanje koštanog tkiva <sup>5</sup>. Zbog brojnih pozitivnih učinaka navedenih iona na obnavljanje koštanog tkiva, u posljednje vrijeme naglasak je na biomimetičkom pristupu, u kojem se HAp sintetizira iz biogenih izvora koji već prirodno posjeduju elemente u tragovima. Biogeni izvori mogu se razlikovati po svom kemijskog sastavu, pa je tako *in vivo* istraživanje koje su proveli Lee i suradnici pokazalo brže nastajanje koštanog tkiva primjenom HAp-a dobivenog iz ljusaka jajeta nego iz ljuštura školjaka <sup>76</sup>. Razlog tomu je različit udio elemenata u tragovima u različitim biogenim izvorima.

### 4.1 KARAKTERIZACIJA HIDROKSIAPATITA DOBIVENIH IZ BIOGENIH IZVORA

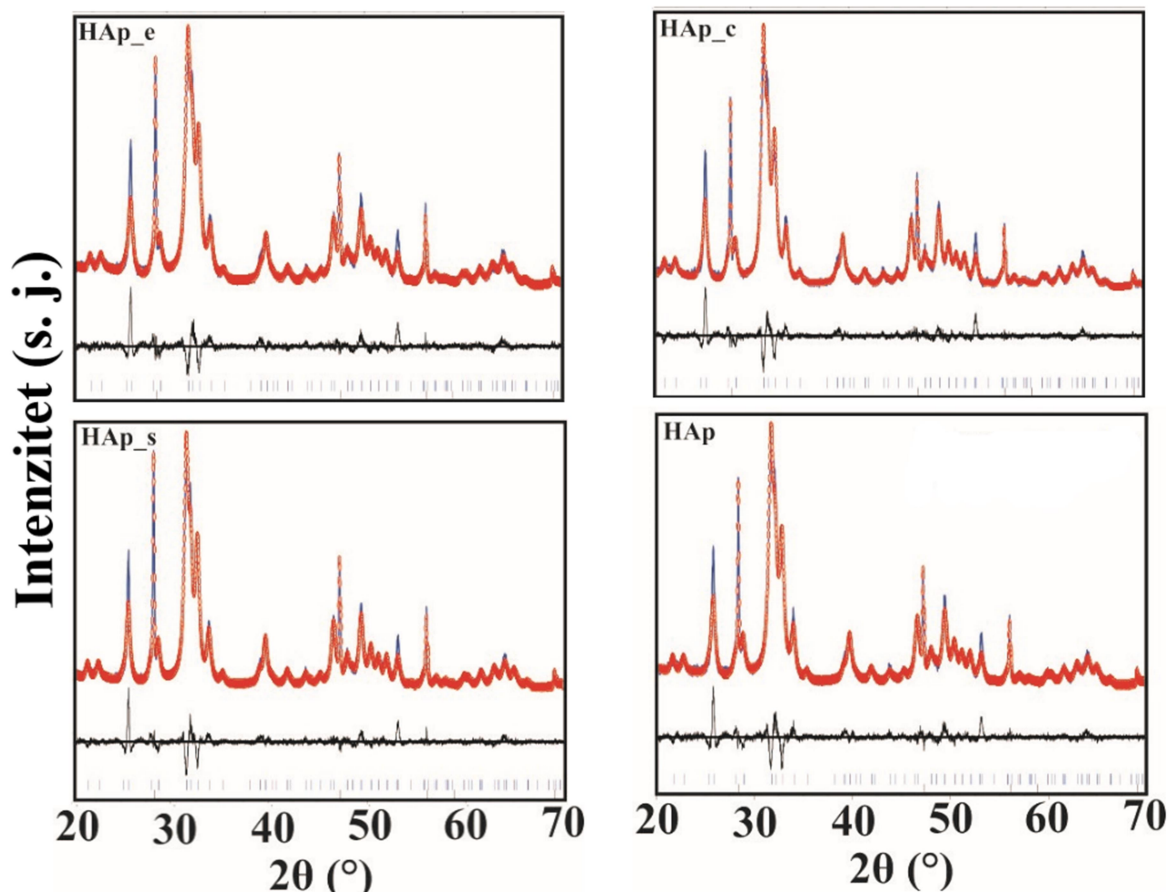
#### 4.1.1 Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka

Dobiveni difraktogrami nakon toplinske obrade  $CaCO_3$  pri 700 °C iz sintetskog i biogenih izvora sadrže karakteristične pikove za CaO (CaO, ICDD No. 82-1691). Dobiveni CaO dodan je u demineraliziranu vodu te je došlo do nastajanja kalcijeva hidroksida ( $Ca(OH)_2$ ) <sup>77</sup>. Dodatkom  $NH_4H_2PO_4$  pri 60 °C sintetiziran je HAp prema jednadžbi (4):



Na slici 7 prikazani su difraktogrami pripremljenih uzoraka HAp-a dobivenih iz biogenih i sintetskog izvora. Uspoređujući eksperimentalno dobivene difraktograme s ICDD standardima, utvrđeno je da svaki od difraktograma pokazuje pikove karakteristične za HAp (ICDD 09-0432), te karakteristične pikove silicija (ICDD 27-1402) koji je korišten kao standard.





**Slika 7.** Difraktogrami pripremljenih prašaka dobivenih iz biogenih izvora (HAp\_e, HAp\_c, HAp\_s) i kontrolnog praška dobivenog iz sintetskog izvora (HAp). Snimljeni difraktogrami prikazani su crveno, a računski plavo. Krivulja ispod difraktograma predstavlja razliku između snimljenog i računskog difraktograma ( $R_{wp} < 11\%$ ,  $R_{exp} < 3\%$ ). ICDD podaci položaja difrakcijskih maksimuma HAp-a i silicija (standard) dani su na dnu slike.

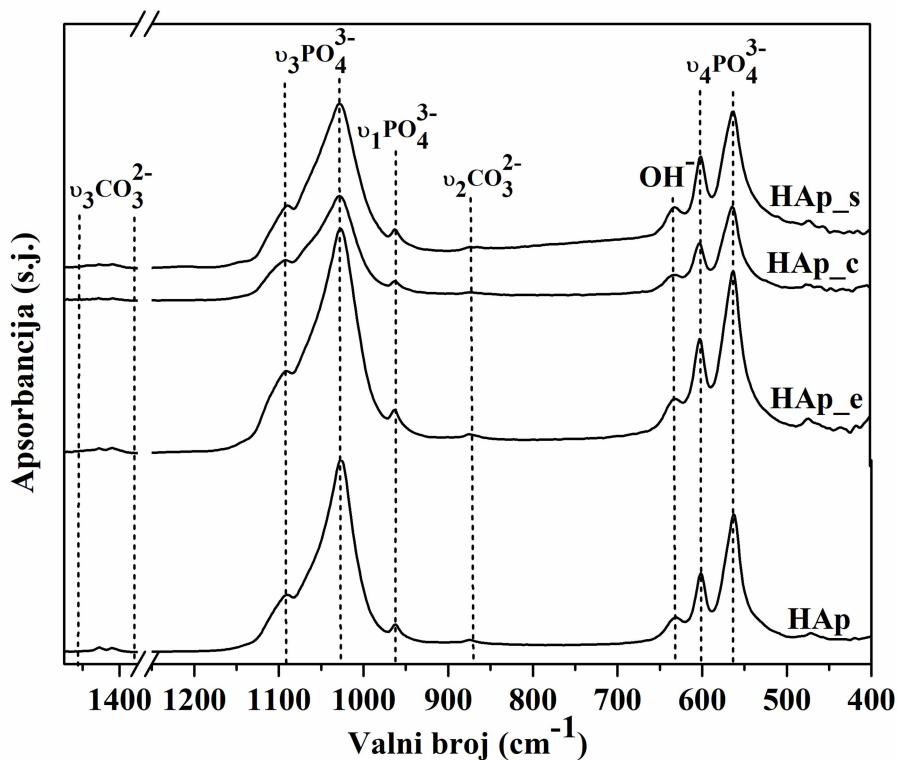
Rietveldovom metodom utočnjavanja uz HAp utvrđena je prisutnost amornog kalcijevog fosfata, ACP (Tablica 3). Najveći maseni udio amorfne faze jest u uzorku dobivenom iz školjaka, HAp\_s (35,96), dok je najmanji udio amorfne faze uočeni u uzorku dobivenom iz sipine kosti, HAp\_c (11,38). U uzorku dobivenom iz ljusaka jajeta, HAp\_e, udio amorfne faze iznosi 24,48 %, dok u uzorku dobivenom iz sintetskog izvora iznosi 14,41 %. U prirodnom mineralnom tkivu udio amorfne faze varira u rasponu 1-30 % ukupne mineralne mase, dok je ostatak nisko kristalni CDHAp supstituiran različitim ionima. Konačna vrijednost pH suspenzija pri sobnoj temperaturi iznosi  $10.41 \pm 0.06$ , što pogoduje taloženju HAp-a i ACP-a<sup>78</sup>.

**Tablica 2.** Mineraloški sastav pripremljenih uzoraka

UZORAK	Kvantitativna analiza (wt%)	
	HAp	ACP
HAp_s	64,04	35,96
HAp_c	88,62	11,38
HAp_e	75,52	24,48
HAp	85,59	14,41

#### 4.1.2 Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

Slika 8 prikazuje FTIR spektre pripremljenih uzoraka hidroksiapatita, dobivenih iz biogenih (HAp\_s, HAp\_c, HAp\_e) i sintetskog izvora (HAp). FTIR spektri su prikazani u rasponu od 400-1550  $\text{cm}^{-1}$ , zbog toga što na valnim duljinama većim od 1550  $\text{cm}^{-1}$  nisu uočene značajne vrpce. Uzorci posjeduju apsorpcijske vrpce karakteristične za fosfatnu skupinu ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) pri 1026 i 1091  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ , asimetrično rastezanje P–O veze), 561 i 601  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ , asimetrične vibracije savijanja O–P–O veze) i na valnoj duljini 961  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_1$ , simetrično rastezanje P–O veze), koje se mogu pripisati HAp fazi. Apсорpcijske vibracije savijanja pri 632  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične su za  $\text{OH}^-$  skupinu HAp-a<sup>39</sup>. Apсорpcijske vrpce pri 870  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_2$ , asimetrično savijanje), 1416 i 1455  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ , asimetrično rastezanje) karakteristične su za karbonatnu,  $\text{CO}_3^{2-}$ , skupinu, što nam ukazuje da je došlo do supstitucije unutar rešetke HAp-a, odnosno da je  $\text{PO}_4^{3-}$  skupina supstituirana  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima. Položaji apсорpcijskih vrpca upućuju na B-tip supstitucije karakterističan za biološki apatit<sup>79</sup>. Budući da su prašci pripremljeni iz CaO,  $\text{CO}_3^{2-}$ -supstitucija je očekivana, obzirom na visoku reaktivnost polazne komponente i prisutnost ugljikovog dioksida u procesu sinteze pri atmosferskim uvjetima<sup>80</sup>. Karbonatni ioni su najbrojnija vrsta iona u mineralnoj fazi koštanog tkiva, s masenim udjelom od 4-8 wt%, stoga je  $\text{CO}_3^{2-}$ -supstitucija poželjna<sup>39</sup>.



Slika 8. FTIR spektri pripremljenih prašaka (HAp\_s, HAp\_c, HAp\_e, HAp).

#### 4.1.3 Kemijski sastav pripremljenih uzoraka

Kemijski sastav uzoraka određen je pomoću ICP-MS analize, a rezultati su prikazani u tablici 3. Svi uzorci HAp-a pripremljeni iz biogenih izvora sadrže elemente u tragovima koji se prirodno nalaze u mineralnoj fazi koštanog tkiva, a to su  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$ . Uzorak HAp-a dobiven iz sintetskog izvora ne sadrži natrijeve ione, a prisutan je značajno niži udio molarne supstitucije  $\text{Sr}^{2+}$  ionima (0,01 mol%), dok je molarni udio  $\text{Mg}^{2+}$  iona (0,40 mol%) usporediv s onima iz uzoraka dobivenih iz biogenih izvora. Najveći udio  $\text{Mg}^{2+}$  iona (1,40 mol%) prisutan je u uzorku HAp-a dobivenom iz ljusaka jajeta, HAp\_e, dok je najveći udio  $\text{Na}^+$  (0,74 mol%) i  $\text{Sr}^{2+}$  (0,49 mol%) iona prisutan u uzorku HAp-a dobivenom iz sipine kosti, HAp\_c. Može se primijetiti da su udjeli molarne supstitucije  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$  i  $\text{Sr}^{2+}$  ionima značajno viši u uzorcima HAp\_e i HAp\_c, nego li u uzorku HAp\_s. Viši udio magnezija u uzorku dobivenom iz ljusaka jajeta rezultat je toga što se ljuska jajeta sastoji od ~ 95 %  $\text{CaCO}_3$ , organske komponente i ~1% magnezijeva karbonata ( $\text{MgCO}_3$ )<sup>32</sup>.

**Tablica 3.** Rezultati ICP-MS analize pripremljenih uzoraka

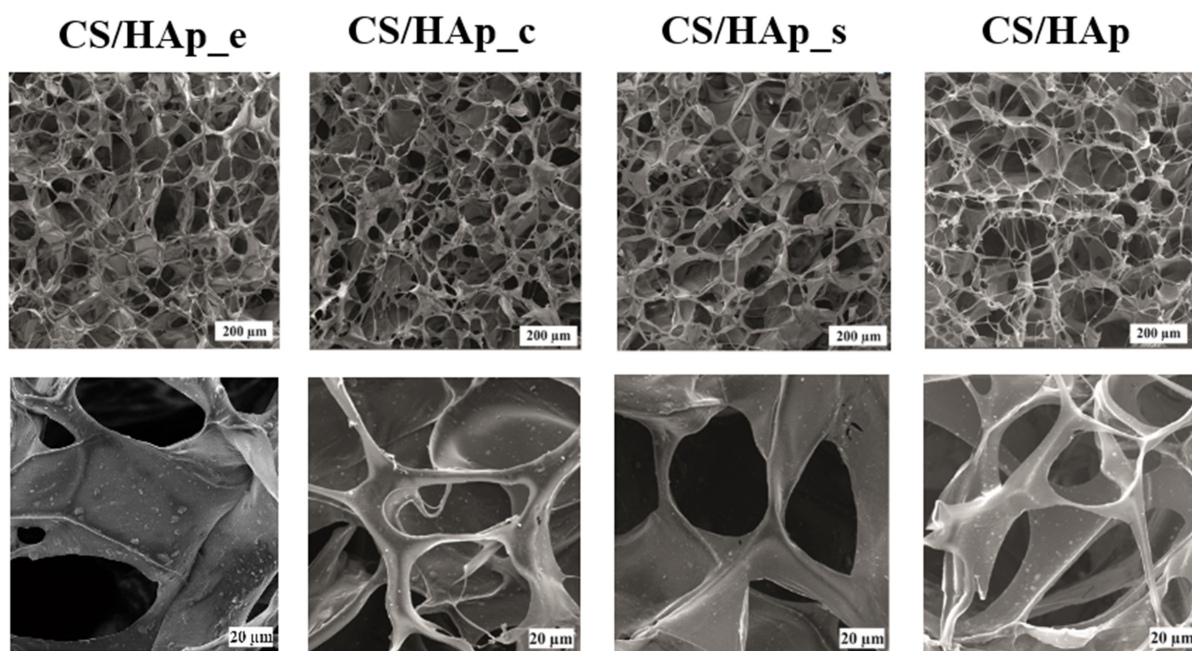
Uzorak	Supstituenti (mol%)					Ca/P (mol/mol)
	Sr	Na	Mg	Al	Fe	
HAp_s	0,20	0,34	0,26	0,07	0,07	1,58
HAp_c	0,49	0,74	0,60	0,06	0,08	1,48
HAp_e	0,12	0,13	1,40	0,05	0,06	1,55
HAp	0,01	0,00	0,40	0,05	0,02	2,08

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjem Lee i suradnika, u kojem je udio  $Mg^{2+}$  iona viši u HAp-u dobivenom iz ljusaka jajeta nego u onom dobivenom iz ljuštura školjaka <sup>76</sup>. Aragonitna struktura sipine kosti stabilizirana je  $Sr^{2+}$  ionima te je najveći molarni udio  $Sr^{2+}$  iona u uzorku dobivenom iz sipine kosti, HAp\_c, rezultat toga <sup>81</sup>. Dobiveni rezultati dodatna su potvrda prethodnim istraživanjima, koja pokazuju da se korištenjem biogenih izvora može sintetizirati HAp supstituiran biološki značajnim elementima. Prisutnost  $Mg^{2+}$  iona od iznimne je važnosti u ranoj fazi mineralizacije kosti, jer on povećava gustoću kostiju i sprječava osteoporozu, te potiče proliferaciju i sintezu ALP-a, koji je odgovoran za proces mineralizacije <sup>51</sup>. Nadalje, magnezij posjeduje antitumorska i antibakterijska svojstva, koja smanjuju rizik od upalne reakcije <sup>82</sup>.  $Sr^{2+}$  ioni ključni su za stvaranje nove kosti jer potiču aktivnost osteoblasta, a inhibiraju aktivnost osteoklasta <sup>44</sup>. Prisutnost  $Na^+$  iona poboljšava osteoinduktivna svojstva i povećava toplinsku stabilnost pripremljenih CaP materijala <sup>41</sup>. Okosnice od HAp-a koji sadrži elemente u tragovima imaju sposobnost dugoročnog otpuštanja biološki značajnih iona koji pospješuju oporavak kosti i pokazuju visoku razinu bioaktivnosti i osteoinduktivnosti <sup>83</sup>. Ca/P omjer uzoraka dobivenih iz biogenih izvora niži su nego Ca/P omjer stehiometrijskog HAp-a (1,67), što je u skladu s očekivanjima. Razlog tomu je prisutnost elemenata u tragovima u pripremljenom HAp-u iz biogenih izvora. Dobiveni rezultati poklapaju se s Ca/P omjerom CDHAp-a, koji iznosi ~1,5, a nalazi se u ljudskoj kosti <sup>84</sup>. Suprotno očekivanjima, Ca/P omjer HAp-a dobivenog iz sintetskog CaO iznosi 2,08, dok je očekivan iznos bio 1,67. Jedan od mogućih razloga je veći udio kalcija i niži udio fosfata zbog prisutne supstitucije  $CO_3^{2-}$  skupinama.

## 4.2 KARAKTERIZACIJA KOMPOZITNIH OKOSNICA

### 4.2.1 Morfologija kompozitnih okosnica CS/HAp

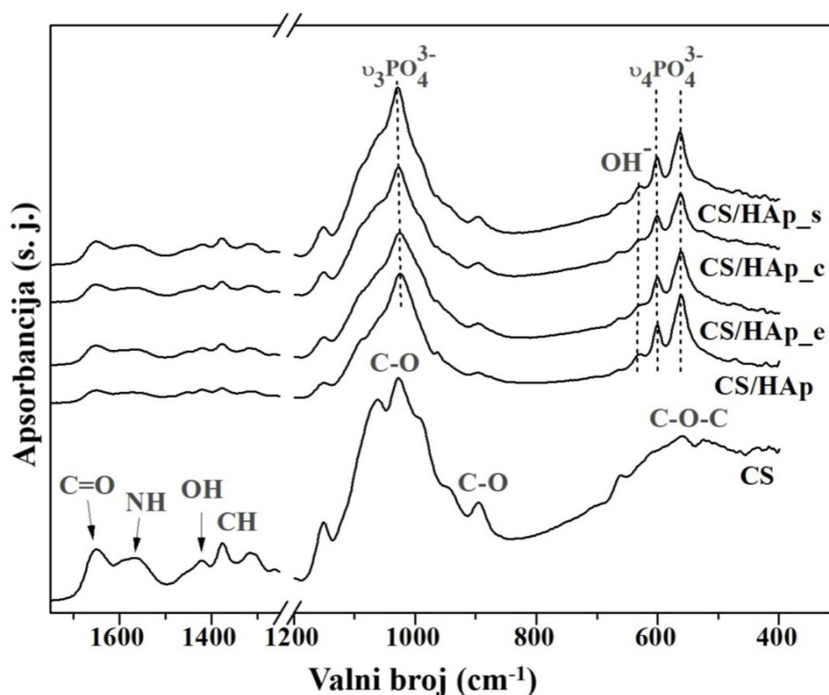
Organsko-anorganske kompozitne okosnice pripravljene su umiješavanjem pripremljenih uzoraka HAp-a u polimernu matricu kitozana. Slika 9 prikazuje morfologiju pripremljenih kompozitnih okosnica analiziranih pretražnim elektronskim mikroskopom. Mikrostrukture uzoraka CS/HAp\_e, CS/HAp\_c, CS/HAp\_s i CS/HAp visokoporozne su strukture povezanih pora te homogene raspodjele HAp-a u obliku sfera unutar polimerne matrice kitozana. Poroznost pripremljenih okosnica iznosi  $60,81 \pm 0,09$  % u CS/HAp\_e,  $60,24 \pm 0,07$  % u CS/HAp\_c,  $58,41 \pm 0,04$  % u CS/HAp\_s i  $57,02 \pm 0,01$  % u CS/HAp. Visokoporozna struktura od ključne je važnosti za uspješan prijenos hranjivih tvari i kisika kroz okosnicu, mogućnost srastanja tkiva te interakciju između tkiva i okosnice<sup>17, 85</sup>. Analizom poroznosti nije utvrđena značajna razlika između okosnica.



**Slika 9.** Morfologija pripremljenih kompozitnih CS/HAp okosnica dobivenih iz sintetskog izvora i različitih biogenih izvora. Skala: 200 i 20 μm.

#### 4.2.2 Infracrvena spektroskopija s Fourierovim transformacijama kompozitnih okosnica

Rezultati FTIR spektroskopije kompozitnih okosnica na temelju hidroksiapatitnih prašaka (anorganska faza) i kitozana (polimerna matrica) prikazani su na slici 10. Spektri su prikazani u rasponu od 400 do 1750  $\text{cm}^{-1}$ , budući da na valnim duljinama većim od 1750  $\text{cm}^{-1}$  nisu uočene značajne vrpce. Vrpce karakteristične za kitozan nalaze se pri 1654  $\text{cm}^{-1}$  (C=O veza amidne skupine) te pri 1568  $\text{cm}^{-1}$  (CO–NH veza amidne skupine). Vrpce pri 1421  $\text{cm}^{-1}$  i 1323  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične su za vibracije hidroksilne (OH) skupine i C–H veze unutar prstena. Vrpca pri 1377  $\text{cm}^{-1}$  odgovara metilnoj ( $\text{CH}_3$ ) skupini, a područje valnih brojeva 1025 – 1151  $\text{cm}^{-1}$  C–O–C vezi <sup>86</sup>. Osim vrpca karakterističnih za kitozan, na FTIR spektru pojavljuju se i vrpce karakteristične za HAp, na valnim duljinama 564  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ), 600  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_4$ ), i 1028  $\text{cm}^{-1}$  ( $\nu_3$ ), koje odgovaraju fosfatnoj skupini ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) i pri 631  $\text{cm}^{-1}$  koje odgovaraju hidroksilnoj (OH) skupini.

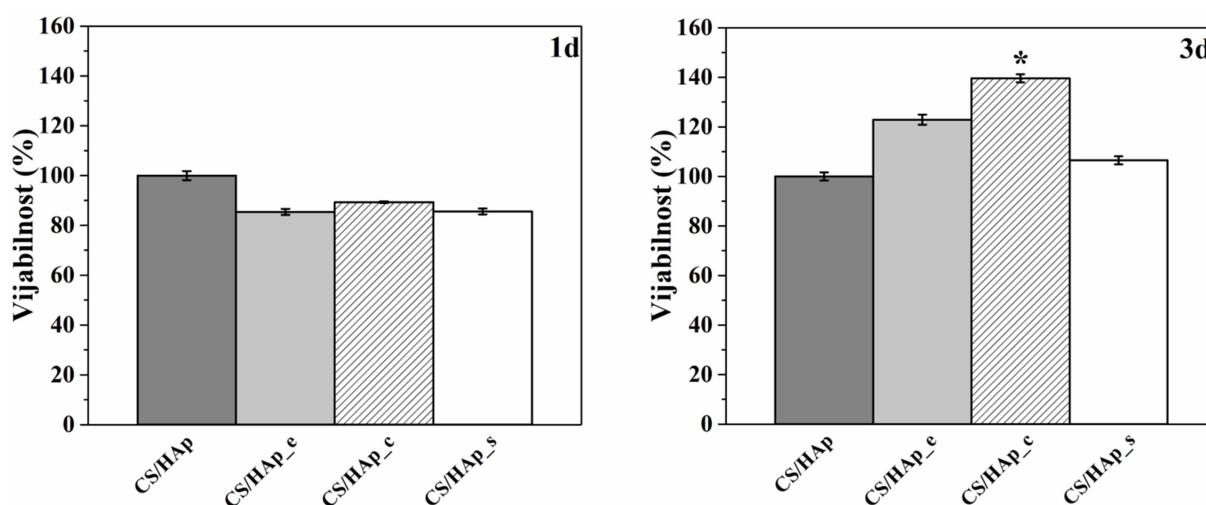


**Slika 10.** FTIR spektri sintetiziranih kompozitnih uzoraka: CS/HAp\_s, CS/HAp\_c, CS/HAp\_e, CS/HAp i kontrolnog uzorka: CS

### 4.2.3 Biološka karakterizacija

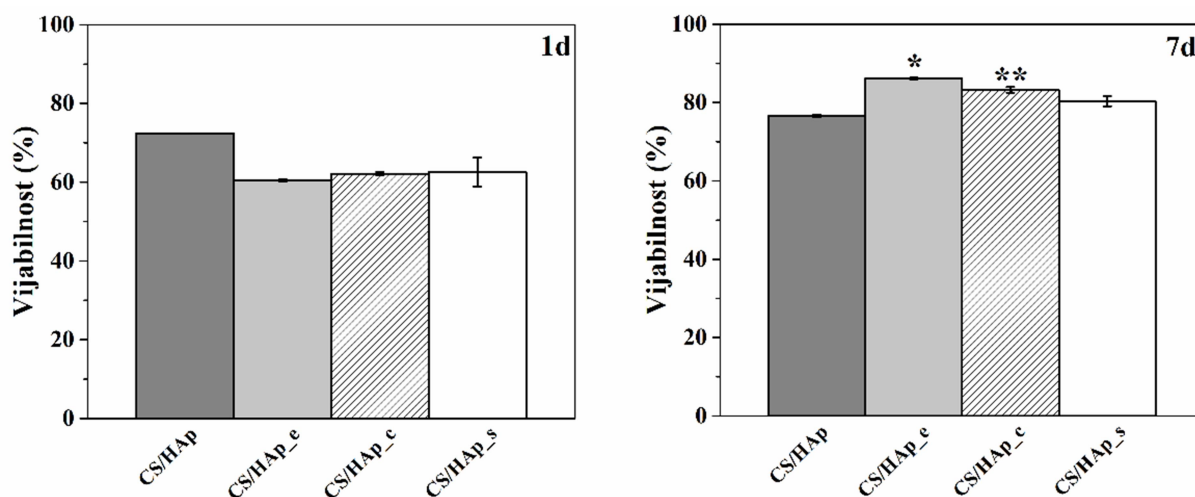
Biološka karakterizacija kompozitnih okosnica CS/HAp provedena je na HEK 293 staničnoj liniji, kako bi se odredila citotoksičnost i vijabilnost stanica. Mitohondriji su ključni metabolički organeli stanica, pa se njihova aktivnost može smatrati direktnim pokazateljem vijabilnosti stanica i proliferacije. Procjena aktivnosti mitohondrijskih stanica provedena je MTT metodom. Na slici 11 prikazana je vijabilnost HEK 293 stanične linije nasađene na CS/HAp, CS/HAp\_e, CS/HAp\_c i CS/HAp\_s okosnice nakon 1 i 3 dana uzgajanja.

Tijekom prvog dana eksperimenta vijabilnost stanica nasađenih na okosnice pripremljene iz različitih biogenih izvora ne razlikuje se značajno. Nakon perioda inkubacije u trajanju od tri dana, došlo je do rasta vijabilnosti stanica u svim okosnicama, međutim značajan rast primijećen je samo kod okosnice CS/HAp\_c. Nasuprot tomu, stanice nasađene na okosnicu CS/HAp pokazuju najmanji rast vijabilnosti stanica. Primijećen rast vijabilnosti stanica nasađenih na okosnice dobivene iz biogenih izvora potvrđuje mogućnost njihove primjene za regeneraciju koštanog tkiva.



**Slika 11.** Citotoksičnost CS/HAp okosnica dobivenih iz različitih biogenih izvora nakon 1 i 3 dana uzgajanja HEK 293 stanične linije. Značajna razlika u odnosu na CS/HAp: \* ( $p < 0,1$ ).

Procjena životne aktivnosti stanica provedena je „live/dead“ metodom nakon 1 i 7 dana uzgajanja (slika 12). Kompozitne okosnice CS/HAp\_e, CS/HAp\_c i CS/HAp\_s pokazuju višu vijabilnost stanica tijekom sedam dana uzgajanja nego li okosnica CS/HAp. Kod okosnice CS/HAp\_c primijećen je značajan rast vijabilnosti, dok je okosnica CS/HAp\_e pokazala statistički visoko značajnu razliku u rastu vijabilnosti stanica nakon sedam dana uzgajanja.



**Slika 12.** Kvantifikacija živih stanica na pripremljenim okosnicama CS/HAp, CS/HAp\_e, CS/HAp\_c i CS/HAp\_s, određena „live/dead“ metodom. Značajna razlika u odnosu na CS/HAp: \*\*( $p < 0,05$ ), \* ( $p < 0,1$ ).

Dobiveni rezultati u skladu su s istraživanjima Kim i suradnika, gdje je stupanj proliferacije stanica značajno viši u uzorku HAp-a dobivenog iz sipine kosti, u odnosu na uzorak dobiven iz sintetskog HAp-a<sup>35</sup>. Nadalje, Lee i suradnici proveli su istraživanje kojim je dokazano da HAp dobiven iz ljusaka jajeta pokazuje bolja biološka svojstva u odnosu na HAp dobiven iz ljuštura školjaka. Razlog tomu je viši udio  $Mg^{2+}$  iona u HAp-u dobivenom iz ljusaka jajeta, koji dovodi do višeg stupnja regeneracije koštanog tkiva<sup>76</sup>. Najveći stupanj proliferacije stanica zapažen je kod uzorka dobivenog iz sipine kosti, CS/HAp\_c, zbog najviše koncentracije  $Sr^{2+}$  iona, koji potiču nastajanje koštanog tkiva, a sprječavaju njegovu razgradnju *in vivo*, zbog čega se koriste pri tretiranju osteoporoze<sup>87</sup>. Niži stupanj vijabilnosti stanica nasađenih na uzorak CS/HAp\_s može biti rezultat značajno nižih koncentracija elemenata u tragovima u HAp-u dobivenom iz ljuštura školjaka, u usporedbi s onim dobivenim iz ljusaka jajeta i sipine kosti.



## 5. ZAKLJUČAK

Kompozitne okosnice izrađene od bioaktivne keramike i biorazgradivog polimera obećavajući su materijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Dokazano je da prisutnost elemenata u tragovima u kristalnoj rešetci hidroksiapatita značajno poboljšava biološka svojstva okosnice.

- Uspješno je pripremljen multi-supstituiran hidroksiapatit iz različitih biogenih izvora, metodom kemijskog taloženja u vodenom mediju, pri blagim uvjetima sinteze.
- Prednost korištenja biogenih izvora, kao što su ljuske jajeta, sipina kost i ljuštura školjaka jest njihova dostupnost, prisutnost elemenata u tragovima i ekološka prihvatljivost.
- Pripravljene su visokoporozne trodimenzionalne kompozitne okosnice od pripremljenih hidroksiapatitnih uzoraka dobivenih iz biogenih izvora i kitozana kao polimerne matrice, što je od ključne važnosti za bolji prijenos hranjivih tvari i kisika kroz čitav volumen okosnice.
- Primijećen je pozitivan utjecaj  $\text{Sr}^{2+}$  i  $\text{Mg}^{2+}$  iona, koji su prisutni u ljuskama jajeta i sipinoj kosti, na vijabilnost stanica.

Pripremljene kompozitne okosnice imaju potencijal za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva, no potrebna su daljnja istraživanja kako bi se mogla potvrditi mogućnost njihove primjene u biomedicinske svrhe.

## 6. LITERATURA

1. Macan, J., Profesionalne bolesti mišićno-koštanog sustava, *Sigur.* **49** (2007) 359–397.
2. Moguš-Milanković, A., Tri generacije biomaterijala, *Kem. u Ind.* **54** (2005) 131–134.
3. Mondal, S., Pal, U., Dey, A., Natural origin hydroxyapatite scaffold as potential bone tissue engineering substitute, *Ceram. Int.* **42** (2016) 18338–18346.
4. Cortesini, R., Stem cells, tissue engineering and organogenesis in transplantation, *Transpl. Immunol.* **15** (2005) 81–89.
5. Lafon, J. P., Champion, E., Bernache-Assollant, D., Processing of AB-type carbonated hydroxyapatite  $\text{Ca}_{10-x}(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{CO}_3)_x(\text{OH})_{2-x-2y}(\text{CO}_3)_y$  ceramics with controlled composition, *J. Eur. Ceram. Soc.* **28** (2008) 139–147.
6. Zhou, H., Lee, J., Nanoscale hydroxyapatite particles for bone tissue engineering, *Acta. Biomater.* **7** (2011) 2769–2781.
7. Lin, K., Zhou, Y., Zhou, Y., Qu, H., Chen, F., Zhu, Y., Chang, J., Biomimetic hydroxyapatite porous microspheres with co-substituted essential trace elements: Surfactant-free hydrothermal synthesis, enhanced degradation and drug release, *J. Mater. Chem.* **21** (2011) 16558–16565.
8. Bianco, A., Cacciotti, I., Lombardi, M., Montanaro, L., Si-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sinterability, *Mater. Res. Bull.* **44** (2009) 345–354.
9. Tampieri, A., Celotti, G. C., Landi, E., Sandri, M., Magnesium doped hydroxyapatite: synthesis and characterization, *Key Eng. Mater.* **264–268** (2009) 2051–2054.
10. Geng, Z., Cheng, Y., Ma, L., Li, Z., Cui, Z., Zhu, S., Liang, Y., Liu, Y., Bao, H., Li, X., Yang, X., Nanosized strontium substituted hydroxyapatite prepared from egg shell for enhanced biological properties, *J. Biomater. Appl.* **32** (2018) 896-905.
11. Adeogun, A. I., Ofudje, A. E., Idowu, M. A., Kareem, S. A., Facile development of nano size calcium hydroxyapatite based ceramic from eggshells: synthesis and characterization, *Waste Biomass Valor.* **9** (2018) 1469-1473.
12. Boutinguiza, M., Pou, J., Comesaña, R., Lusquiños, F., de Carlos, A., León, B., Biological hydroxyapatite obtained from fish bones, *Mater. Sci. Eng. C* **32** (2012) 478–486.
13. Kumar, G. S., Girija, E. K., Flower-like hydroxyapatite nanostructure obtained from eggshell: A candidate for biomedical applications, *Ceram. Inter.* **39** (2013) 8293–8299.

14. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M. T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Jamshidi, A., Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite in diverse structures, *Acta Biomater.* **9** (2013) 7591–7621.
15. Trakoolwannachai, V., Kheolamai, P., Ummartyotin, S., Development of HAp from eggshell waste and a chitosan based composite: In vitro behavior of human osteoblast-like cell (Saos-2) cultures, *Int. J. Biol. Macromol.* **134** (2019) 557–564.
16. Pillai, C. K. S., Paul, W., Sharma, C. P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 641–678.
17. Sobczak – Kupiec, A., Pluta, K., Drabczyk, A., Włos, M., Tyliczszak, B., Synthesis and characterization of ceramic - polymer composites containing bioactive synthetic hydroxyapatite for biomedical applications, *Ceram. Inter.* **44** (2018) 13630–13638.
18. Bhattarai, D. P., Aguilar, L. E., Park, C. H., Kim, C. S., A review on properties of natural and synthetic based electrospun fibrous materials for bone tissue engineering, *Membranes* **8** (2018) 1–24.
19. Allo, B. A., Costa, D. O., Dixon, S. J., Mequanint, K., Rizkalla, A. S., Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration, *J. Funct. Biomater.* **3** (2012) 432–463.
20. [http://www.wikilectures.eu/index.php/Tissue\\_engineering\\_principle](http://www.wikilectures.eu/index.php/Tissue_engineering_principle) (pristup 03.04.2020.)
21. Hasnain, M. S., Ahmad, S. A., Chaudhary, N., Hoda, M. N., Nayak, A. K., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering, *Applic. of Nanocomp. Math. in Orthop.* **95** (2019) 1-37.
22. Langer, R., Vacanti, J. P., Tissue engineering, *Science* **14** (1993) 920–926.
23. Place, E. S., Evans, N. D., Stevens, M. M., Complexity in biomaterials for tissue engineering, *Nat. Mater.* **8** (2009) 457–470.
24. Tverdokhlebov, S. I., Bolbasov, E. N., Shesterikov, E. V., Osteogenesis: scaffold materials based on fluorocarbon composites modified with RF magnetron sputtering., u: Lin, Y., Osteogenesis, In Tech (2012) 84-115.
25. Habraken, W., Habibovic, P., Epple, M., Bohner, M., Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future?., *Mater. Today* **19** (2016) 69–87.
26. Tadic, D., Epple, M., A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone, *Biomaterials* **25** (2004) 987–994.

27. LeGeros, R.Z., LeGeros, J. P., Dense Hydroxyapatite, u: Hench, L. L., Wilson, J., An Introduction to Bioceramics, World Scientific, Singapur (1993) 139–180.
28. LeGeros, R. Z., Li, X., Sogo, Y., Ito, A., Mutsuzaki, H., Ochiai, N., Kobayashi, T., Nakamura, S., Yamashita, K., The optimum zinc content in set calcium phosphate cement for promoting bone formation in vivo, *Mater. Sci. Eng. C* **29** (2009) 969–975.
29. Bandyopadhyay, A., Bernard, S., Xiue, W., Bose, S. ,Calcium phosphate-based resorbable ceramics: influence of MgO, ZnO, and SiO<sub>2</sub> dopants, *J. Am. Ceram. Soc.* **89** (2006) 2675–2688.
30. Naga, S. M., El-Maghraby, H. F., Sayed, M., Saad, E. A., Highly porous scaffolds made of nanosized hydroxyapatite powder synthesized from eggshells, *J. Ceram. Sci. Technol.* **6** (2015) 237-243.
31. Rocha, J. H. G., Lemos, A.F., Agathopoulos, S., Valério, P., Kannan, S., Oktar, F. N., Ferreira, J. M. F., Scaffolds for bone restoration from cuttlefish, *Bone* **37** (2005) 850–857.
32. Akram, M., Ahmed, R., Shakir, I., Ibrahim, W. A. W., Hussain, R., Extracting hydroxyapatite and its precursors from natural resources, *J. Mater. Sci.* **49** (2014) 1461-1475.
33. Padmanabhan, S. K., Salvatore, L., Gervaso, F., Catalano, M., Taurino, A., Sannino, A., Lucciulli, A., Synthesis and characterization of collagen scaffolds reinforced by eggshell derived hydroxyapatite for tissue engineering, *J. Nanosci. Nanotechnol.* **15** (2015) 504-509.
34. Ressler A., Cvetnić M., Antunović M., Marijanović I., Ivanković M., Ivanković H., Strontium substituted biomimetic calcium phosphate system derived from cuttlefish bone, *J. Biomed. Mater. Res. B* **108** (2019) 1697-1709.
35. Kim, B.S., Kang, H. J., Yang, S. S., Lee, J., Comparison of in vitro and in vivo bioactivity: cuttlefish-bone-derived hydroxyapatite and synthetic hydroxyapatite granules as a bone graft substitute, *Biomed. Mater.* **9** (2014) 025004.
36. Milovac, A., Gallego Ferrer, G., Ivanković, M., Ivanković, H., PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: Morphology, mechanical properties and bioactivity, *Mater. Sci. Eng. C* **34** (2014) 437-445.
37. Wu, S., Hsu, H., Hsu, S., Tseng, C., Ho, W., Effects of calcination on synthesis of hydroxyapatite derived from oyster shell powders, *J. Aust. Ceram. Soc.* **55** (2019) 1051-1058.

38. Shavandi, A., Bekhit, A. E., Ali, A., Sun, Z., Synthesis of nano-hydroxyapatite (nHA) from waste mussel shells using a rapid microwave method, *Mater. Chem. Phys.* **149-150** (2015) 607-616.
39. Kumar, G. S., Girija, E. K., Venkatesh, M., Karunakaran, G., Kolesnikov, E., Kuznetsov, D., One step method to synthesize flower-like hydroxyapatite architecture using mussel shell bio-waste as a calcium source, *Ceram. Int.* **43** (2017) 3457-3461.
40. Pal, A., Nasker, P., Paul, S., Choudhury, A. R., Sinha, A., Das, M., Strontium doped hydroxyapatite from *Mercenaria* clam shells: Synthesis, mechanical and bioactivity study, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **90** (2019) 328-336.
41. Bigi, A., Boanini, E., Capuccini, C., Gazzano, M., Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorg. Chim. Acta* **360** (2007) 1009–1016.
42. Blake, G. M., Živanović, M. A., McEwan, A. J., Ackery, D. M., Sr-89 therapy: Strontium kinetics in disseminated carcinoma of the prostate, *Eur. J. Nucl. Med.* **12** (1986) 447–454.
43. Marie, P. J., Ammann, P., Boivin, G., Rey, C., Mechanisms of action and therapeutic potential of strontium in bone, *Calcif. Tissue Int.* **69** (2001) 121–129.
44. Canalis, E., Hott, M., Deloffre, P., Tsouderos, Y., Marie, P. J., The divalent strontium salt S12911 enhances bone cell, *Bone* **18** (1996) 517–523.
45. Xue, W., Moore, J. L., Hosick, H. L., Bose, S., Bandyopadhyay, A., Lu, W. W., Cheung, K. M., Luk, K. D., Osteoprecursor cell response to strontium containing hydroxyapatite ceramics, *J. Biomed. Mater. Res. - Part A* **79** (2006) 804–814.
46. Jegou Saint-Jean, S., Camiré, C. L., Nevsten, P., Hansen, S., Ginebra, M. P., Study of the reactivity and in vitro bioactivity of Sr-substituted  $\alpha$ -TCP cements, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **16** (2005) 993–1001.
47. Curran, D. J., Fleming, T. J., Towler, M. R., Hampshire, S., Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods, *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* **4** (2011) 2063–2073.
48. Ammann, P., Strontium ranelate: A novel mode of action leading to renewed bone quality, *Osteoporos. Int.* **16** (2005) 11-15.
49. Rude, R. K., Gruber, H. E., Wei, L. Y., Frausto, A., Kilburn, J., Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in the rat, *Bone* **37** (2005) 211–219.

50. Stendig-Lindberg, G., Koeller, W., Bauer, A., Rob, P. M., Experimentally induced prolonged magnesium deficiency causes osteoporosis in the rat, *Eur. J. Intern. Med.* **15** (2004) 97–107.
51. Landi, E., Logroscino, G., Proietti, L., Tampieri, A., Sandri, M., Sprio, S., Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: From synthesis to in vivo behaviour, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **19** (2008) 239–247.
52. Fadeev, I. V., Shvorneva, L. I., Barinov, S. M., Orlovskii, V. P. O., Synthesis and structure of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Inorg. Mat.* **39** (2003) 947–950.
53. Zyman, Z., Tkachenko, M., Epple, M., Polyakov, M., Naboka, M., Magnesium substituted hydroxyapatite ceramics, *Materwiss. Werksttech.* **37** (2006) 474–477.
54. Jiao, M. J., Wang, X. X., Electrolytic deposition of magnesium-substituted hydroxyapatite crystals on titanium substrate, *Mater. Lett.* **63** (2009) 2286–2289.
55. Wei, S., Lu, J., Wei, J., Li, H., Jia, J., Guo, H., Xiao, T., Liu, C., Preparation and preliminary cytocompatibility of magnesium doped apatite cement with degradability for bone regeneratio, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **22** (2011) 607–615.
56. Hadley, K. B., Newman, S. M., Hunt, J. R., Dietary zinc reduces osteoclast resorption activities and increases markers of osteoblast differentiation, matrix maturation, and mineralization in the long bones of growing rats, *J. Nutr. Biochem.* **21** (2010) 297–303.
57. Yamaguchi, M., Role of nutritional zinc in the prevention of osteoporosis, *Mol. Cell. Biochem.* **338** (2010) 241-254.
58. Miyaji, F., Kono, Y., Suyama, Y., Formation and structure of zinc-substituted calcium Hydroxyapatite, *Mater. Res. Bul.* **40** (2005) 209–220.
59. Bigi, A., Foresti, E., Gandolfi, M., Gazzano, M., Roveri, N., Inhibiting effect of zinc on hydroxyapatite crystallization, *Inorg. Biochem.* **58** (1995) 49–58.
60. Šupova, M., Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, *Ceram. Int.* **41** (2015) 9203–9231.
61. Sutha, S., Karunakaran, G., Rajendran, V., Enhancement of antimicrobial and longterm biostability of the zinc-incorporated hydroxyapatite coated 316L stainless steel implant for biomedical application, *Ceram. Int.* **39** (2013) 5205–5212.
62. Chung, R. J., Hsieh, M., F., Huang, C. W., Perng, L. H., Wen, H. W., Chin, T. S., Antimicrobial effects and human gingival biocompatibility of hydroxyapatite sol-gel coatings, *J. Biomed. Mater. Res. B* **76** (2006) 169–178.

63. El Feki, H., Ben Salah, A., Daoud, A., Lamure, A. Lacabanne, C., Studies by thermally stimulated current (TSC) of hydroxy- and fluoro-carbonated apatites containing sodium ions, *J. Phys. Condens. Matter* **12** (2000) 8331–8343.
64. Kannan, S., Ventura, J. M. G., Lemos, A. F., Barba, A. Ferreira, J. M. F., Effect of sodium addition on the preparation of hydroxyapatites and biphasic ceramics, *Ceram. Int.* **34** (2008) 7–13.
65. Astala, R., Stott, M. J., First principles investigation of mineral component of bone: CO<sub>3</sub> substitutions in hydroxyapatite, *Chem. Mater.* **17** (2005) 4125–4133.
66. Barralet, J., Knowles, J. C., Best, S., Bonfield, W., Thermal decomposition of synthesised carbonate hydroxyapatite, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **13** (2002) 529–533.
67. Hasnain, M. S., Ahmad, S. A., Chaudhary, N., Hoda, M. N., Nayak, A. K., Biodegradable polymer matrix nanocomposites for bone tissue engineering, *Applications of Nanocomposite Materials in Orthopedics*, Elsevier, Amsterdam (2018)
68. Tipton, A. J., Middleton, J. C., Synthetic biodegradable polymers as orthopedic devices, *Biomaterials* **21** (2000) 2335–2346.
69. Guanatillake, P. A., Adhikari, R., Biodegradable syntethic polymers for tissue engineering, *Eur. Cells Mater.* **5** (2003) 1–16.
70. Hasnain, M. S., Nayak, A. K., Singh, R., Ahmad, F., Emerging trends of natural-based polymeric systems for drug delivery in tissue engineering applications, *Sci. J.* **1** (2010) 1–13.
71. Sharma, C. P., Willi, P., Pillai, C. K. S., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fibre formation, *Prog. Polym. Sci.* **34** (2009) 641–678.
72. Croisier, F., Jerome, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J* **49** (2013) 780–792.
73. Veselinović, L., Karanović, Lj., Stojanović, Z., S., Bračko, I., Crystal structure of cobalt-substituted calcium hydroxyapatite nanopowders prepared by hydrothermal processing, *J. Appl. Crystallogr.* **43** (2010) 320-327.
74. Yashima, M., Sakai, A., Kamiyama, T., Hoshikawa, A., Crystal structure analysis of  $\beta$ -tricalcium phosphate Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> by neutron powder diffraction, *J. Solid. State. Chem.* **175** (2003) 272–277.
75. Mathew, M., Brown, W. E., Schroeder, L. W., Dickens, B., The crystal structure of alpha-Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>, *Acta Crystallogr. B* **33** (1977) 1325-1333.

76. Lee, S. W., Balázsi, C., Balázsi, K., Seo, D. H., Kim, H. S., Kim, C. H., Kim, S. G., Comparative Study of hydroxyapatite prepared from seashells and eggshells as a bone graft material, *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* **11** (2014) 113–120.
77. Bose, S., Fielding, G., Tarafder, S., Bandyopadhyay, A., Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics, *Trends Biotechnol.* **31** (2013) 594–605.
78. Dorozhkin, S.V., Amorphous calcium (ortho)phosphates, *Acta Biomater.* **6** (2010) 4457–4475.
79. Gibson, I. R., Bonfield, W., Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite, *J. Biomed. Mater. Res.* **59** (2002) 697–708.
80. Goloshchapov, D. L., Kashkarov, V. M., Rummyantseva, N. A., Seredin, P. V., Lenshin, A. S., Agapov, B. L., Domashevskaya, E. P., Synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite by precipitation using hen's eggshell, *Ceram. Inter.* **39** (2013) 4539–4549.
81. Birchall, J. D., Thomas, N. L., On the architecture and function of cuttlefish bone, *J. Mater. Sci.* **18** (1983) 2081–2086.
82. Sabet, A. S., Jabbari, A. H., Sedighi, M., Microstructural properties and mechanical behavior of magnesium/ hydroxyapatite biocomposite under static and high cycle fatigue loading, *J. Compos. Mater.* **0** (2017) 1–12.
83. Zhang, X., Chen, Y., Han, J., Mo, J., Dong, P., Zhuo, Y., Feng, Y., Biocompatible silk fibroin/carboxymethyl chitosan/strontium substituted hydroxyapatite/cellulose nanocrystal composite scaffolds for bone tissue engineering, *Int. J. Biol. Macromol.* **136** (2019) 1247–1257.
84. Boanini, E., Gazzano, M., Bigi, A., Ionic substitutions in calcium phosphates synthesized at low temperature, *Acta Biomater.* **6** (2010) 1882–1894.
85. Chocholata, P., Kulda, V., Babuska, V., Fabrication of scaffolds for bone-tissue regeneration, *Materials* **12** (2019) 568.
86. Pawlak, A., Mucha, M., Thermogravimetric and FTIR studies of chitosan blends, *Thermochim. Acta* **396** (2003) 153–166.
87. Neves, N., Linhares, D., Costa, G., Ribeiro, C. C., Barbosa, M. A., *In vivo* and clinical application of strontium-enriched biomaterials for bone regeneration: A systematic review, *Bone Joint. Res.* **6** (2017) 366–375.



## ŽIVOTOPIS

Karla Zadro [REDACTED] Osnovnu školu Ljudevita Gaja završila je u Zaprešiću. Nakon završene osnovne škole upisala je XVI. Gimnaziju u Zagrebu i maturirala 2014. godine, te potom upisala Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, preddiplomski studij Ekoinženjerstvo. 2018. godine upisuje diplomski studij Ekoinženjerstvo, također na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije. Od 2018. godine do 2019. godine radi kao student u Plivi. 2019. godine sudjeluje s usmenim izlaganjem na projektnoj HaTEA radionici (engl. *Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering Applications*) s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata dobivenih iz biogenih izvora“. Na Prvom studentskom kongresu o inženjerstvu materijala (e-SKIM) osvaja prvo mjesto za usmeno izlaganje s temom „Struktura i karakterizacija stroncijem supstituiranih kalcijevih fosfata“, te drugo mjesto za postersko izlaganje. 2019. godine osvaja rektorovu nagradu za rad s temom „Sinteza metalnim ionima supstituirane kalcij fosfatne biokeramike u polimernoj matrici kitozana za biomedicinsku primjenu“. 2020. godine jedna je od autora članka „From bio-waste to bone substitute: synthesis of biomimetic hydroxyapatite and its use in chitosan-based composite scaffold preparation“ koji izlazi u časopisu *Chemical Biocemical Engineering Quarterly*.