

# Priprava i karakterizacija kompozitnog skeleta za potencijalnu primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva

---

Hanžek, Andrija

Master's thesis / Diplomski rad

2015

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:149:598565>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2024-07-18**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrija Hanžek  
DIPLOMSKI RAD

Zagreb, srpnja 2015.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU  
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE  
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ

Andrija Hanžek

PRIPRAVA I KARAKTERIZACIJA KOMPOZITNOG SKELETA  
ZA POTENCIJALNU PRIMJENU U INŽENJERSTVU  
KOŠTANOG TKIVA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković

Prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković

Izv. prof. dr. sc. Jelena Macan

Zagreb, srpnja 2015.

## ***Zahvale***

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na posvećenom vremenu tijekom izrade ovog rada.

Zahvaljujem se asistentici dr.sc. Anamariji Rogini na savjetima i pomoći prilikom provedbe eksperimentalnog dijela i izrade ovog rada.

Zahvaljujem se Lidiji Pribolšan, mag.biol.mol na provedbi testa citotoksičnosti na Prirodoslovno-matematičkom fakultetu u Zagrebu.

Zahvalio bih se i svojim roditeljima na podršci koju su mi pružali i tijekom mog cjelokupnog školovanja.

## Sažetak

Cilj rada bila je priprava bioaktivnog i biorazgradivog skeleta na temelju hidroksiapatita (HA), kitozana (CHT) i polilaktidnog (PLA) nosača za potencijalne primjene u inženjerstvu koštanog tkiva.

Napredak inženjerstva tkiva omogućen je primjenom biomaterijala trodimenzijskih struktura na kojima se, prije samog presađivanja, uzgajaju koštane stanice. Biorazgradivi polimerni materijali služe kao podloga (nosač) za širenje stanica te daju mehaničku čvrstoću novonastalom tkivu. U inženjerstvu koštanog tkiva, osim polimernih matrica koristi se i bioaktivna keramika kao što je hidroksiapatit. Hidroksiapatit je po svom kemijskom sastavu sličan anorganskom dijelu kosti (biološkom apatitu) i pozitivno utječe na umnažanje (proliferaciju) stanica.

Sinteza poroznog kompozitnog nosača PLA/CHT-HA s 30 % masenog udjela HA u kitozanskoj matrici provedena je metodom toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju. Karakterizacija pripremljenih nosača utvrđena je instrumentalnim metodama: infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama, rendgenskom difrakcijskom analizom, pretražnom elektronskom mikroskopijom i diferencijalnom pretražnom kalorimetrijom. Kako bi se predvidjelo bubrenje materijala *in vivo*, kapacitet bubrenja nosača ispitan je u biološkom mediju. Test citotoksičnosti ekstrakta nosača proveden je na stanicama fibroblasta (MEH) nakon 3 i 7 dana uzgajanja. Karakterizacija kompozitnog nosača potvrdila je *in situ* nastajanje HA unutar kitozanske matrice, dobro prianjanje polimernih faza i visokoporoznu strukturu PLA/CHT-HA nosača. Analiza citotoksičnosti potvrdila je da pripremljeni nosači nemaju štetan utjecaj na stanice.

### Ključne riječi:

Hidroksiapatit (HA), kitozan (CHT), polilaktid (PLA), skelet (nosač), citotoksičnost.

# Preparation and characterization of composite scaffold for potential application in bone tissue engineering

## Abstract

The aim of this work was preparation of bioactive and biocompatible scaffold based on hydroxyapatite (HA), chitosan (CHT) and polylactide (PLA) scaffold with potential application in bone tissue engineering.

The progress of tissue engineering is possible by the application of 3D biomaterials structures seeded with bone cells prior to transplantation. Biodegradable polymeric materials are used as scaffolds for cell proliferation and as mechanical support for new tissue. Besides polymeric matrices, bioactive ceramics such as hydroxyapatite are used in bone tissue engineering. Hydroxyapatite possesses chemical similarity to the inorganic phase of the bone (biological apatite) and has positive effect on cell proliferation.

Synthesis of porous composite PLA/CHT-HA scaffold with 30 mass% of HA within chitosan matrix has been carried out by freeze-gelation method. Characterization of prepared scaffolds was carried out by instrumental methods: FTIR spectroscopy, X-ray diffraction analysis, SEM microscopy and differential scanning calorimetry. To predict the swelling behaviour of materials *in vivo*, swelling capacity was assessed in biological medium. Cytotoxicity assay on fibroblast cells was carried out by the scaffolds supernatant after 3 and 7 days of culture. Characterization of composite scaffold has confirmed *in situ* HA formation within chitosan matrix, good adhesion between polymeric phases and highly porous structure of PLA/CHT-HA scaffold. Cytotoxicity assay of prepared scaffolds has confirmed no harmful effect on cells.

## Keywords:

Hydroxyapatite (HA), chitosan (CHT), polylactide (PLA), scaffold, cytotoxicity.

## Sadržaj

1. Uvod .....	1
2. Opći dio .....	2
2.1. Inženjerstvo tkiva .....	2
2.2. Priprava poroznih struktura .....	3
2.2.1. Liofilizacija .....	3
2.2.2. Metoda toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju .....	3
2.2.3. 3D tiskanje .....	4
2.2.4. Elektropredenje .....	4
2.3. Koštano tkivo.....	5
2.4. Bioaktivna keramika.....	6
2.4.1. Apatiti i drugi fosfati.....	6
2.5. Biorazgradive polimerne matrice .....	9
2.5.1. Kitozan.....	9
2.5.2. Poli(mliječna kiselina) .....	11
3. Eksperimentalni dio.....	14
3.1. Materijali .....	14
3.2. Priprava poroznog kompozitnog PLA/CHT-HA nosača.....	15
3.2.1. <i>In situ</i> sinteza hidroksiapatita u otopini kitozana.....	15
3.2.2. Impregnacija PLA nosača kompozitnom suspenzijom.....	15
3.2.3. Priprema poroznih struktura unutar PLA nosača.....	16
3.3. Karakterizacija materijala.....	17
3.3.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama.....	17
3.3.2. Kvalitativna mineralna rendgenska difrakcijska analiza .....	18
3.3.3. Pretražna elektronska mikroskopija.....	18
3.3.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija .....	19

3.4. Fizikalna svojstva .....	20
3.4.1. Bubrenje poroznih materijala.....	20
3.5. Biološka karakterizacija .....	20
3.5.1. Test citotoksičnosti .....	20
4. Rezultati i rasprava.....	22
4.1. FTIR analiza .....	22
4.2. Rendgenska difrakcijska analiza .....	24
4.3. Mikrostruktura materijala .....	26
4.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija.....	28
4.5. Bubrenje u biološkom mediju.....	30
4.6. Test citotoksičnosti .....	32
5. Zaključak.....	34
6. Simboli .....	35
7. Literatura .....	36



## 1. Uvod

Otkazivanje organa i tkiva izazvanih ozljedama, bolestima ili drugim vrstama oštećenja je jedan od velikih problema u medicini. Područje koje se bavi rješavanjem tih problema naziva se inženjerstvo tkiva. Inženjerstvo tkiva (eng. *tissue engineering*) ujedinjuje više znanstvenih disciplina, usredotočenih na rješavanje problema dugotrajnih popravaka i zamjene oštećenih tkiva ili organa. Nudi odlične mogućnosti u području regenerativne medicine, u kojem se omogućuje vraćanje funkcija oštećenih tkiva ili organa pacijenata. Izazovi koje područje inženjerstva tkiva pruža su veliki, od pomaka znanstvenih otkrića *in vitro* do tehnoloških razvoja i proizvodnje materijala. Uspješna proizvodnja tkiva zahtijeva velik broj izvora zdravih stanica, razvoj tehnika za pripremu biomaterijala s idealnim svojstvima te dizajniranje idealnih bioreaktora koji će oponašati fiziološku okolinu u tijelu. Napredovanje inženjerstva tkiva omogućeno je primjenom biomaterijala trodimenzijskih struktura (eng. *scaffold*) u kojima se uzgajaju koštane stanice<sup>1,2</sup>. Materijali korišteni za inženjerstvo tkiva moraju stimulirati specifični stanični odgovor na molekularnoj razini. Temeljni zahtjevi za biomaterijale korištene u regeneraciji tkiva su biokompatibilna površina i poželjna mehanička svojstva<sup>3</sup>.

Ljudska kost je kompozitni materijal građen od biološkog apatita i kolagena, gdje kolagen služi kao matrica za rast stanica, dok apatit kao anorganska faza daje mehaničku čvrstoću i potiče aktivnost stanica. U inženjerstvu koštanog tkiva pokušava se imitirati struktura i sastav ljudske kosti primjenom biorazgradivih polimernih matrica koje imitiraju organsku fazu (kolagen) i sintetskih keramičkih materijala temeljenih na kalcijevim fosfatima kao anorganskom dijelu kosti. Kombinacijom različitih sintetskih i prirodnih polimera mogu se zadovoljiti mehaničke i biološke karakteristike potrebne za izradu skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva.

Kitozan kao prirodni polimer i hidroksiapatitna keramika pokazali su se kao obećavajući materijali za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva zbog svoje strukture i bioaktivnosti. Iako posjeduju izvrsnu bioaktivnost i biorazgradivost nedostaje im mehaničke čvrstoće. Iz tog razloga potrebna je dodatna faza koja bi poboljšala mehaničku čvrstoću bez narušavanja bioaktivnosti materijala. Jedno od rješenja je primjena sintetskog polimera, npr. poli(mliječne kiseline), PLA, zbog njegove biokompatibilnosti, biorazgradivosti te dobrih mehaničkih svojstava.

## 2. Opći dio

### 2.1. Inženjerstvo tkiva

Inženjerstvo tkiva ujedinjuje više znanstvenih disciplina, kao što su biologija, znanost o materijalima i biomedicinsko inženjerstvo, usredotočenih na rješavanje problema dugotrajnih popravaka i zamjene oštećenih tkiva ili organa. Inženjerstvo tkiva nudi nove mogućnosti u području regenerativne medicine, u kojem se omogućuje vraćanje funkcija oštećenih tkiva ili organa pacijenata. Veliki napredak inženjerstva tkiva postignut je upotrebom trodimenzijskih struktura (eng. *scaffold*) pripremljenih od biomaterijala u kojima se uzgajaju stanice prije transplantacije<sup>1,2</sup>.

*In vivo* primjena biomaterijala zahtijeva da materijal stimulira specifični stanični odgovor na molekularnoj razini, da ima biokompatibilnu površinu i poželjna mehanička svojstva<sup>3</sup>. Glavni elementi u tkivu kao što su izvanstanična matrica (eng. *extracellular matrix*, ECM), stanice i molekularni signali, trebaju poticati popravak i obnavljanje oštećenih dijelova. U tom smjeru krenule su brojne metode temeljene na upotrebi polimernih skeleta koji imitiraju izvanstaničnu matricu i služe kao privremeni predložak za umnažanje (proliferaciju) i razvoj novih stanica. Skeleti trebaju osigurati ne samo mehaničku potporu stanicama nego i mikroklimu molekularnih signala koji vode stanice ka obnavljanju tkiva<sup>4</sup>.

Idealni skeleti za inženjerstvo tkiva trebaju ispunjavati slijedeće uvjete:

- Bioaktivnost;
- Biokompatibilnost na razini tkiva i sustavnog odziva;
- Biorazgradivost odgovarajuće brzine razgradnje koja će održavati mehanička svojstva skeleta do potpunog obnavljanja tkiva;
- Trodimenzijska struktura s dobro definiranim oblikom i mehaničkom čvrstoćom;
- Velika poroznost s dobrom povezanošću pora koja omogućuje smještanje velikog broja stanica i efikasan transport hranjivih tvari potrebnih za preživljavanje i rast stanica;
- Smjernice za biološku reakciju putem promicanja dinamičke interakcije s okolnim tkivima<sup>5</sup>.

Kako bi se ostvarila željena arhitektura skeleta, istraživanja su usmjerena prema razvoju više sofisticiranih tehnika za obradu projektiranih skeleta. Dobra kontrola unutrašnje arhitekture može olakšati slijed stanica i molekulskih signala. Promjer pora je jedan od važnih čimbenika za rast, cirkulaciju i difuziju hranjivih tvari. Stoga je od velike važnosti stvaranje tehnologija za proizvodnju većih količina skeleta raznih materijala veće prostorne razlučivosti<sup>6</sup>.

## 2.2. Priprava poroznih struktura

Priprema porozne strukture jedan je od primarnih ciljeva kod izrade skeleta korištenih u inženjerstvu koštanog tkiva. Razvijene su brojne tehnike za proizvodnju poroznih struktura, a jedne od najčešćih su: liofilizacija, metoda toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju, 3D tiskanje i elektropredenje.

### 2.2.1. Liofilizacija

Liofilizacija (eng. *freeze drying*) dobro je istražena metoda za pripravu poroznih materijala u inženjerstvu tkiva. Liofilizacija je proces uklanjanja otapala iz zamrznute otopine ili suspenzije pod vakuumom. Proces se sastoji od tri koraka: smrzavanja, primarnog i sekundarnog sušenja. Postupak u vakuumu omogućuje zaleđenom otapalu (voda ili organsko otapalo) da prijeđe iz zaleđene kristalne faze u plinovitu, tj. da sublimira. Sublimiranjem kristala otapala zadržava se morfologija pora koje su nastale zaleđivanjem otopine/suspenzije. Prilikom primarnog sušenja zaleđena masa sublimira pri temperaturi nižoj od ledišta tekućine i ukloni se oko 95 % zaostale mase otapala. Prilikom sekundarnog sušenja povisi se temperatura te se dodatno snizi tlak kako bi se uklonilo zaostalo adsorbirano otapalo<sup>7</sup>.

### 2.2.2. Metoda toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju

Kod metode toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju (eng. *freeze-gelation*) sniženjem temperature otopine polimera dolazi do razdvajanja homogenog sustava na polimerom siromašnu fazu i polimerom bogatu fazu. Ako su temperature hlađenja dovoljno niske dolazi do smrzavanja dvofaznog sustava. Smrzavanjem polimerom bogate faze

dolazi do stvaranja kristalića otapala zarobljenih u polimeru. Tako smrznute porozne strukture geliraju se u neutralizirajućem mediju gdje dolazi do umrežavanja polimera te istovremenog uklanjanja otapala iz polimerne faze<sup>8-10</sup>.

### 2.2.3. 3D tiskanje

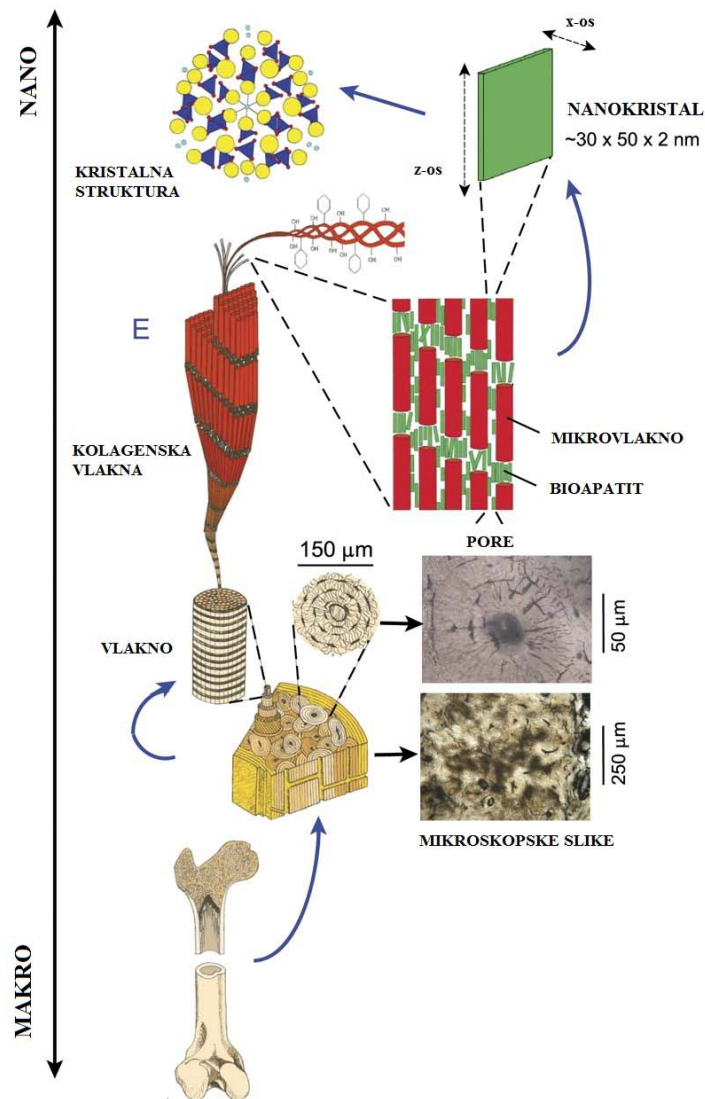
3D tiskanje je jedna od novijih metoda pripreme skeleta u inženjerstvu tkiva, a poznata je još pod nazivom aditivna metoda proizvodnje (eng. *additive manufacturing method*, AM). AM tehnika temelji se na računalnom modelu (eng. *computer aided design*, CAD) koji predstavlja podatke o trodimenzijskoj strukturi definiranih veličina i oblika skeleta. Širok je raspon materijala koji se mogu koristiti kod izrade skeleta, kao što su polimeri, keramički materijali, metali i kompozitni materijali. Tehnika 3D tiskanja sastoji se od nanošenja sloja praškastog materijala te preciznog nanošenja veziva za vezanje praškastog materijala. Proces nanošenja se ponavlja nanošenjem novog sloja na prethodni što rezultira nastajanjem 3D strukture. Rezolucija i točnost porozne strukture ovisi o korištenom materijalu i tehničkim karakteristikama uređaja. Napredovanje u području tehnologije izrade 3D printera omogućit će bržu proizvodnju s većom točnošću i rezolucijom<sup>11</sup>.

### 2.2.4. Elektropredenje

Elektropredenjem (eng. *electrospinning*) proizvode se netkane mreže koje mogu sadržavati vlakna promjera od nekoliko desetaka nanometara do nekoliko desetaka mikrometara. Mogu se koristiti sintetski ili prirodni polimerni. Sintetski polimeri obično dopuštaju veću mogućnost prilagodbe mehaničkih i degradacijskih svojstava. Sam proces elektropredenja odvija se uvođenjem polimerne taljevine ili otopine u elektrostatsko polje visokoga napona. Jedna se visoko naponska elektroda priključi na kapilarni uređaj za predenje, dok se druga elektroda priključi na zaslon (metalnu pločicu ili valjak) za prikupljanje vlakana. Djelovanjem električnoga polja nabijeni mlaz taline (otopine) se ubrzava i stanjuje. Pod utjecajem elektrostatskih sila i pri visokoj brzini deformacija, dolazi do stvaranja snopova iz nastalih vlakana. Promjeri takvih vlakana višestruko su manjega promjera nego uobičajena vlakna. Vlakna nastala elektropredenjem zbog smanjenih dimenzija posjeduju posebnu mikrostrukturu, a time i specifična uporabna svojstva<sup>12, 13</sup>.

## 2.3. Koštano tkivo

Kosti su prirodni kompozitni materijali koji se sastoje od mineralne faze (anorganskih soli), organske matrice i vode. Pojednostavljeno, koštano tkivo dijeli se na tvrdi kortikalnu kost i meku spužvastu (trabekularnu) kost. Udio mineralne tvari, većinski karbonatnog hidroksiapatita, varira ovisno o vrsti i starosti koštanog tkiva. Udio biološkog apatita u kortikalnoj kosti je 80 – 90 %, a u trabekularnoj 15 – 25 %. Mikroskopska struktura kosti odgovara ravnomjerno raspoređenim nanometarskim kristalima hidroksiapatita uzduž kolagenskih vlakana koje djeluju kao organska matrica (slika 1). Prosječna dužina kristala je 50 nm, širina 25 nm te debljina 2 – 5 nm.



Slika 1. Hijerarhijska struktura prirodne kosti.

Stvaranje koštanog tkiva je kompleksan proces koji se neprestano odvija pod djelovanjem različitih tipova stanica. Određene stanične vrste svojim razvojem izlučuju tj. talože mineraliziranu izvanstaničnu matricu (novo koštano tkivo). U živom organizmu, brzina nastajanja kosti u korelaciji je s brzinom njene resorpcije što je odgovorno za očuvanje strukture i mehaničkih svojstava, odnosno za remodeliranje koštanog tkiva. Procesi remodeliranja kosti omogućuju regeneraciju tkiva u slučaju ozljede ili koštanih defekata<sup>15</sup>. Dok je kortikalna kost zaslužna za mehaničku čvrstoću, visokoporozna trabekularna kost osigurava nesmetane procese vaskularizacije (stvaranja krvožilnog sustava) koji su jedan od važnih uvjeta za regeneraciju tkiva. Stoga se i najveći dio istraživanja inženjerstva koštanog tkiva usmjerava na pripravu poroznih kompozitnih nosača<sup>14</sup>.

## 2.4. Bioaktivna keramika

Kalcijev fosfat je materijal zanimljiv za kliničku upotrebu, istraživanje i proizvodnju korisnih biomaterijala za proizvodnju nadomjestaka ili fiksatora. Općenito, biomaterijali i djelomično bioaktivna keramika (biokeramika) mogu poslužiti kao zamjenski materijali pojedinih tkiva. Keramički materijali koji se koriste u rekonstruktivnoj medicini mogu se klasificirati u dvije velike grupe: bioinertna i bioaktivna keramika. Bioinertna keramika ne izaziva neželjene reakcije, ali ne postiže nikakve interakcije s okolnim tkivom (npr. aluminijev oksid). Bioaktivna keramika ima pozitivan utjecaj na okolno tkivo i ima mogućnost vezanja s koštanim tkivom. Među bioaktivnu keramiku ubrajaju se kalcijevi fosfati, određeni kompoziti stakla i staklokeramike<sup>14</sup>.

### 2.4.1. Apatiti i drugi fosfati

Najčešće korišteni kalcijev fosfat (CaP) u proizvodnji koštanih nadomjestaka je hidroksiapatit,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ , zbog svoje kemijske i strukturne sličnosti biološkom apatitu u kostima. Hidroksiapatit posjeduje dobru biokompatibilnost i bioaktivnost, dobro vezanje na okolno koštano tkivo *in vivo* te osteoprovodnost (poticanje nastanka novog tkiva). Između velikog broja postojećih vrsta kalcijevih fosfata važno je poznavati približni odnos kalcija i fosfora (Ca/P omjer), kiselosti i topljivosti. Niži Ca/P omjer daje veću kiselost i topljivost

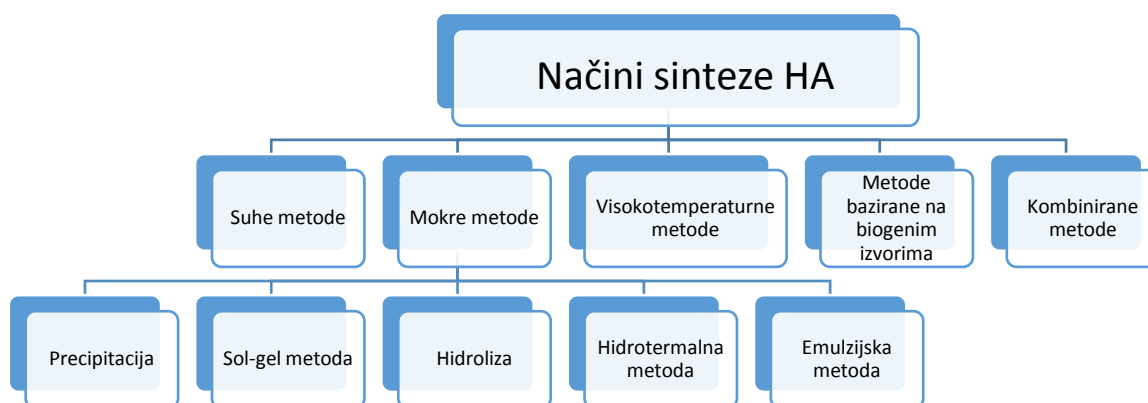
soli<sup>14</sup>. U tablici 1 prikazano je nekoliko primjera kalcijevih fosfata poredanih prema njihovim Ca/P omjerima.

Tablica 1. Primjeri kalcijevih fosfata poredanih prema njihovim Ca/P omjerima<sup>15</sup>.

Ca/P omjer	Naziv	Formula	Kratica
0,5	Monokalcijev fosfat monohidrat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \times \text{H}_2\text{O}$	MCPM
0,5	Monokalcijev fosfat	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	MCPA
1	Dikalcijev fosfat dihidrat	$\text{CaHPO}_4 \times 2 \text{H}_2\text{O}$	DCPD
1	Dikalcijev fosfat	$\text{CaHPO}_4$	DCPA
1,33	Oktakalcijev fosfat	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4) \times 5 \text{H}_2\text{O}$	OCP
1,5	$\alpha$ -trikalcijev fosfat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\alpha$ -TCP
1,5	$\beta$ -trikalcijev fosfat	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	$\beta$ -TCP
1,2 – 2,2	Amorfni kalcijev fosfat	$\text{Ca}_x(\text{PO}_4)_y \times n\text{H}_2\text{O}$	ACP
1,67	Hidroksiapatit	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	HA

Parametri kristalne rešetke nekih od navedenih fosfata vrlo su slični, što dovodi do preklapanja difrakcijskih maksimuma te otežava interpretaciju rezultata dobivenih rendgenskom difrakcijom. Pošto uvjeti sinteze veoma utječu na veličinu kristala, morfologiju i strukturu konačnog kalcijeva fosfata, precizna karakterizacija elektronskom difrakcijom i visokorezolucijskim elektronskim transmisijskim mikroskopom (HRTEM) je veoma važna u istraživanju dvofaznih CaP smjesa.

Tijekom prošlog desetljeća istraživane su razne metode pripreme HA nanočestica s preciznom kontrolom njihove mikrostrukture. Te metode uključuju razne tipove već poznatih metoda kemijske sinteze. Izbor načina pripreme praška dobro definirane strukture i posebne primjene može biti težak. Na slici 2. navedeni su neki načini sinteze HA.



Slika 2. Različiti načini sinteze HA<sup>14, 15</sup>.

Kako bi sintetski apatit dobro oponašao biološki, u svojoj strukturi mora sadržavati karbonatne ione. Hidroksiapatit ima sposobnost ionske supstitucije, tj. moguće su supstitucije s različitim anionskim i kationskim vrstama ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Sr}^{2+}$ ,  $\text{HPO}_4^{2-}$ ,  $\text{SiO}_4^{4-}$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ ,  $\text{F}^-$ ). Supstitucija odgovarajućih iona može povećati topljivost HA *in vitro* i *in vivo* te bioaktivnost. Među najvažnijim supstitucijama je supstitucija s karbonatnim ionima. Moguća su dva tipa supstituiranja s  $\text{CO}_3^{2-}$  ionima: tip A pri kojem dolazi do supstitucije  $\text{OH}^-$  iona i tip B pri kojem se supstituiraju  $\text{PO}_4^{3-}$  ioni.

Mokre metode priprave omogućuju sintezu supstituirane apatitne strukture. Također, omogućuju kontrolu morfologije i nanometarskih veličina čestica hidroksiapatita. Jedan od nedostataka mokrih metoda je moguće nastajanje dodatnih kalcijevih fosfata poput dikalcijeva fosfata dihidrata (DCPD)<sup>14, 15</sup>. Međutim, mokrim metodama mogu se pripraviti dvofazne anorganske faze oktakalcijeva hidrogenfosfata (OCP) i HA koje posjeduju veću topljivost i brzinu transformacije u biološki apatit *in vivo*. Priprava HA mokrim metodama može se provoditi pri nižim temperaturama u širokom rasponu pH vrijednosti medija (najčešće vodenog)<sup>14</sup>.

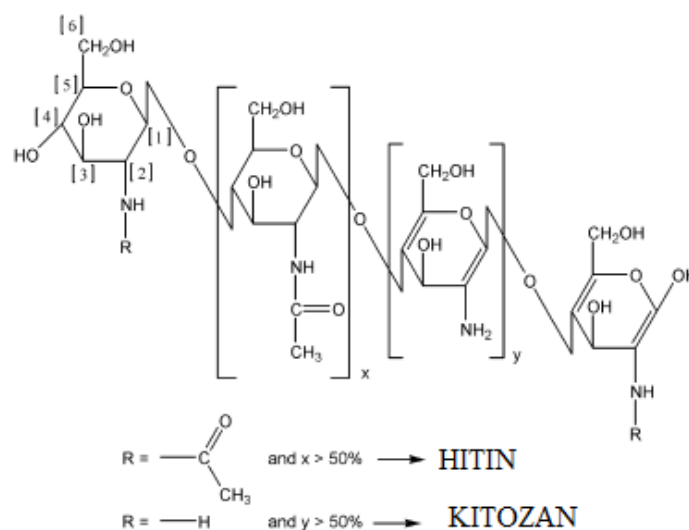


## 2.5. Biorazgradive polimerne matrice

Polimeri su primarni materijali korišteni za izradu skeleta u inženjerstvu koštanog tkiva. Biorazgradivi polimeri mogu se podijeliti u dvije skupine: 1) prirodni, uključujući polisaharide (škrob, alginat, hitin, kitozan, derivati hijaluronske kiseline) i proteine (soja, kolagen, fibrin gelovi, svila); te 2) sintetski polimeri (poli(mliječna kiselina), poliglikolna kiselina, polihidroksibutirat)<sup>3</sup>.

### 2.5.1. Kitozan

Kitozan (CHT) je linearni kristalasti polisaharid koji se dobiva deacetiliranjem prirodnog polimera hitina (slika 3) stupnja deacetiliranja većeg od 65 %. Kitozan je kopolimer sastavljen od glukozaminskih (deacetiliziranih) i *N*-acetilglukozaminskih (acetiliranih) jedinica. Budući da je sirovina za proizvodnju kitozana prirodnog podrijetla, dolazi do varijacija u sastavu i kemijsko-fizikalnim svojstvima koja je teško predvidjeti<sup>16-18</sup>.



Slika 3. Struktura hitina i kitozana.

Kitozan je zanimljivi polisaharid jer ima tri tipa reaktivnih funkcionalnih skupina: amino skupina, primarna i sekundarna hidroksilna skupina (slika 3). Kemijska priroda kitozana pruža mnoge mogućnosti za kovalentne i ionske izmjene koje omogućuju veliku prilagodbu mehaničkih i bioloških svojstava.

Dok je hitin netopljiv u većini organskih otapala, kitozan je lako topljiv u razrijeđenim kiselim otopinama s  $\text{pH} < 6,0$ . Razlog tome je što se kitozan smatra jakom bazom pošto posjeduje primarnu amino grupu s vrijednošću  $\text{p}K_a$  od 6,3. Kod nižih  $\text{pH}$  vrijednosti amino grupa se protonira i postaje pozitivno nabijena što čini kitozan vodotopljivim kationskim polielektrolitom. S druge strane ako se  $\text{pH}$  povisi iznad 6 amino skupine kitozana postaju deprotonirane, polimer gubi svoj naboj i postaje netopljiv. Prijelaz iz topljivog u netopljivo područje događa se između  $\text{pH}$  vrijednosti 6 – 6,5. Topljivost kitozana također ovisi o stupnju deacetiliranja i metodi deacetiliranja. Najčešće korišteno otapalo za kitozan je razrijeđena octena kiselina dok je također topljiv u razrijeđenoj klorovodičnoj i dušičnoj kiselini, ali nije topljiv u razrijeđenoj sumpornoj i fosfornoj kiselini<sup>18</sup>.

Izbor kitozana kao materijala za potporu tkiva leži u kontroli bioloških, fizikalnih i kemijskih svojstava pri blagim uvjetima. Zbog svojeg pozitivnog naboja, kitozan reagira s negativnim dijelovima stanične membrane, što vodi prema reorganiziranju i otvaranju zgusnutih proteina. To objašnjava povećanu propusnost ovog polisaharida kroz staničnu membranu. Povećanjem broja amino skupina, tj. stupnjem deacetiliranja ostvaruju se bolje interakcije između stanica i kitozana.

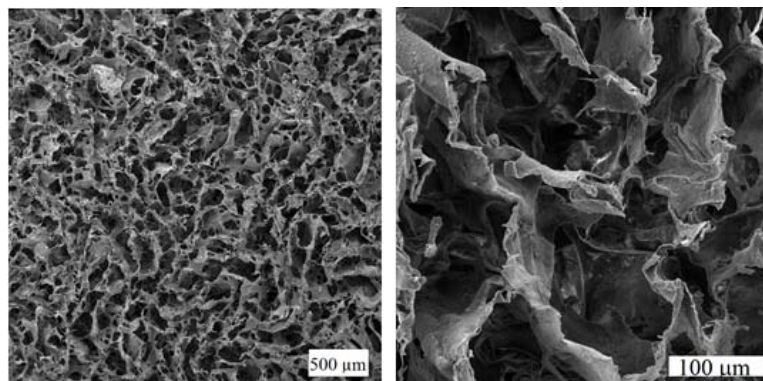
Razgradnjom kitozana dobivaju se netoksični oligosaharidi različitih molekulskih masa. Ti oligosaharidi mogu se razgraditi u organizmu ili se mogu dalje izlučiti iz tijela. Stupanj razgradnje kitozana usko je povezan s molekulskom masom i stupnjem deacetiliranja<sup>16, 17</sup>.

### *Kitozanski hidrogelovi u inženjerstvu koštanog tkiva*

Hidrogelovi se sastoje od čvrste faze, koja obično predstavlja manje od 10 % ukupnog volumena gela, i tekuće faze (vode). Čvrsta faza gela predstavlja kontinuiranu fazu što omogućuje apsorpciju velike količine vode bez otapanja. Hidrogelovi su zanimljivi kao biomaterijali zbog svojeg velikog udjela vode što ih čini kompatibilnima s većinom živućeg tkiva. Mekani su i savitljivi što smanjuje štetu okolnom tkivu prilikom ugradnje *in vivo*. Mehanička svojstva hidrogelova slična su svojstvima mekanog tkiva, što osigurava funkcionalnost i morfološke karakteristike tkiva koje treba zamijeniti. Osim u inženjerstvu tkiva upotrebljavaju se kao materijali za dostavu lijekova i faktora rasta.

Hidrogelovi kitozana mogu se pripremiti reverzibilnim ili nereverzibilnim geliranjem. Reverzibilno (fizikalno) geliranje temelji se na reverzibilnim interakcijama između polimernih lanaca kao što su elektrostatske, hidrofobne interakcije i vodikove veze. Te interakcije ovise o čimbenicima poput pH, koncentracije, temperature i dr. što ih čini prilično nestabilnim. Nereverzibilno (kemijsko) geliranje je kovalentnog karaktera gdje dolazi do stvaranja kovalentnih veza između polimernih lanaca. Tako pripremljeni gelovi mnogo su stabilniji od fizikalnih, ali je potrebna prethodna modifikacija strukture kitozana što može izmijeniti njegova primarna svojstva i narušiti biokompatibilnost.

Kitozan je također intenzivno korišten u inženjerstvu koštanog tkiva nakon što je otkriveno da potiče rast i taloženje mineralizirane matrice u kulturi osteoblasta (koštanih stanica). Mnogo istraživanja usmjereno je na pripremu kompozitnih materijala na temelju kitozana i kalcijeva fosfata primjenjivih u inženjerstvu koštanog tkiva (slika 4). Iako kompozitnim materijalima na temelju kitozanu treba poboljšati mehanička svojstva, nema sumnje da je kitozan obećavajući materijal za skelete u kliničkoj praksi<sup>16</sup>.

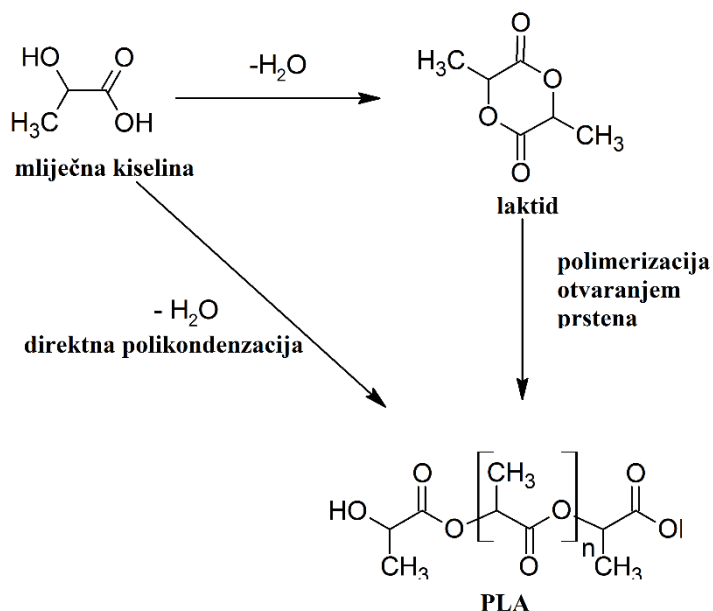


Slika 4. Visokoporozni nosač kitozan/hidroksiapatit.

### 2.5.2. Poli(mliječna kiselina)

Poli(mliječna kiselina), PLA, može se pripremiti različitim postupcima polimerizacije iz mliječne kiseline (slika 5), najčešće polikondenzacijom i polimerizacijom otvaranja prstena. Direktnom polikondenzacijom dobiva se PLA manje molekulske mase, dok se PLA većih molekulske masa proizvodi polimerizacijom otvaranjem prstena iz laktida. Budući da je mliječna kiselina kiralna molekula, PLA ima nekoliko stereoizomera: poli-L-laktid (PLLA),

poli-D-laktid (PDLA) i poli-D,L-laktid (PDLLA). PLLA i PDLA kristalne su građe, dok je PDLLA optički inaktivna tvar amorfne strukture. L-izomer mliječne kiseline je produkt bioloških procesa i predstavlja glavni monomer za proizvodnju PLA<sup>19</sup>.



Slika 5. Procesi polimerizacije mliječne kiseline.

PLA je jedan od obećavajućih sintetskih biorazgradivih polimera zbog svojih dobrih mehaničkih svojstava, plastomerne prerađljivosti i bioloških svojstava kao što su biokompatibilnost i biorazgradljivost. PLA je topljiv u organskim otapalima poput dioksana, acetonitrila, kloroforma, diklormetana itd. Svojstva PLA mogu se modificirati kopolimerizacijom laktida s drugim monomerima laktona, hidrofilnim makromerima (npr. poli(etilen-glikol)) ili drugim monomerima koji sadrže funkcionalne skupine kao što su amino i karboksilna skupina.

Razgradnja PLA započinje nakon nekoliko mjeseci izloženosti vlazi. Proces razgradnje događa se u dva koraka: 1) cijepanje esterskih veza do makromolekula manjih molekularnih masa; 2) cijepanje do mliječne kiseline ili oligomera koje mogu razgraditi mikroorganizmi ili stanice na ugljikov dioksid i vodu. Brzina razgradnje je većinom određena reaktivnošću polimera s vodom i katalizatorima.

Čimbenici koji utječu na reaktivnost i brzinu razgradnje polimera su oblik, temperatura, vlaga, kristalna ili amorfnost struktura, postotak izomera, zaostala koncentracija mliječne kiseline, molekulska masa i difuzija vode. PLA velike molekulske mase ima vrijeme razgradnje od 2 do 8 godina<sup>11</sup>. Biološka razgradnja PLA traje između 10 mjeseci i 4 godine, a na brzinu razgradnje utječu mikrostrukturni čimbenici (kemijski sastav, poroznost/čvrstoća i kristalna struktura)<sup>11</sup>. Dugo vrijeme zadržavanja PLA *in vivo* može izazvati upalne reakcije i infekcije. Iz tog razloga, poželjna je proizvodnja PLA manje molekulske mase kako bi se smanjilo vrijeme potrebno za razgradnju i resorpciju. Istraživanja PLLA male molekulske mase utvrdila su održavanje mehaničkih svojstava kroz period potreban za obnovu i zacjeljenje koštanog prijeloma. Površinska svojstva imaju ključnu ulogu u primjeni materijala, posebno biomaterijala u biološkom okruženju. Različite metode modifikacije površine, kao što su fizikalne, kemijske, modifikacije plazmom i radijacijski inducirane metode, upotrebljavane su u svrhu stvaranja poželjnih površinskih svojstava PLA.

Trodimenzijski skeleti PLA koriste se za uzgoj različitih vrsta stanica, koristeći staničnu gensku terapiju za kardiovaskularne bolesti, bolesti mišićnog tkiva, kosti i hrskavice, regeneraciju i liječenje neuroloških i ortopedskih slučajeva. Medicinska primjena ovog polimera je porasla zbog njegove biokompatibilnosti. Čisti ili u kombinaciji s drugim biorazgradivim polimerima, PLA pruža dobru potporu za rast stanica. Vlaknasti porozni skeleti imaju značajne prednosti nad polimernim filmovima zbog svoje velike specifične površine potrebne za smještaj velikog broja stanica. Istraživanja čistog PLA su dosta ograničena, ali opsežnija istraživanja su provedena s kopolimerima PLA i poliglikolne kiseline<sup>20</sup>.

### 3. Eksperimentalni dio

#### 3.1. Materijali

Za sintezu kompozitnog PLA/CHT-HA nosača korištene su slijedeće kemikalije i materijali:

- PLA nosači (debljina vlakna 1 mm, razmak između vlakana 1,5 mm) pripremljeni metodom 3D tiskanja u *Center for biomaterials and tissue engineering*, Polytechnic University of Valencia, Španjolska te velikodušno donirani
- Kitozan (CHT),  $\bar{M} = 100 - 300 \text{ kg mol}^{-1}$ , stupanj deacetiliranja: 95 – 98 % (Acros organic, SAD)
- Kalcijev karbonat (kalcit),  $\text{CaCO}_3$ , (T.T.T. d.o.o., Hrvatska)
- Urea fosfat,  $\text{CO}(\text{NH}_2)_2\text{-H}_3\text{PO}_4$ , (Sigma-Aldrich, SAD)
- Octena kiselina,  $\text{CH}_3\text{COOH}$ , 99,5 % (Poch Gliwice, Poljska)

Za dobivanje stabilne porozne strukture (toplinski induciranom faznom separacijom uz geliranje i ekstrakciju) korištene su slijedeće kemikalije:

- Etanol,  $\text{CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ , 96 %
- Natrijev hidroksid,  $\text{NaOH}$ ,  $1 \text{ mol dm}^{-3}$

## 3.2. Priprava poroznog kompozitnog PLA/CHT-HA nosača

Priprava PLA/CHT-HA nosača može se podijeliti na: 1) sintezu kompozitne suspenzije kitozan/hidroksiapatit (CHT-HA); 2) impregnaciju PLA nosača CHT-HA suspenzijom; 3) pripravu visokoporozne PLA/CHT-HA strukture metodom toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju.

### 3.2.1. *In situ* sinteza hidroksiapatita u otopini kitozana

Sinteza kompozitne CHT-HA suspenzije s 30 % masenog udjela HA provedena je na slijedeći način: otopina kitozana masenog udjela 1,2 % pripravljena je otapanjem kitozana u vodenoj otopini octene kiseline masenog udjela 0,36 %, pri sobnoj temperaturi. Potom, određena količina kalcita dodana je u otopinu kitozana uz snažno miješanje do njegove potpune suspenzije. Smjesi je dodana odgovarajuća količina uree fosfata da bi se postigao omjer kalcija i fosfora (Ca/P) od 1,67. Nakon dodavanja uree fosfata, reakcija se provodila 4 dana pri 50 °C. Nakon završetka reakcije, dobivena CHT-HA suspenzija ohlađena je na sobnu temperaturu i podijeljena na dva dijela: jedan dio suspenzije korišten je za impregnaciju 3D tiskanog PLA nosača, dok je drugi dio korišten za pripravu visokoporozne strukture toplinski induciranom faznom separacijom uz geliranje i ekstrakciju (Poglavlje 3.2.3.). Paralelno, otopina kitozana i njena visokoporozna struktura pripravljene su prema istom protokolu bez dodatka prekursora kalcija i fosfora. Visokoporozne CHT i CHT-HA strukture (spužve) služile su kao referentni uzorci za identifikaciju *in situ* sintetiziranog HA te za određivanje utjecaja PLA na *in situ* sintezu i mikrostrukturu poroznih CHT i CHT-HA nosača.

### 3.2.2. Impregnacija PLA nosača kompozitnom suspenzijom

Prije vakumske impregnacije, PLA nosač ispiran je u etanolu (96 %) kako bi se uklonile nečistoće i osušen pri atmosferskim uvjetima. Impregnacija PLA nosača provedena je na CitoVac impregnacijskoj pumpi (Struers) nanošenjem pripremljene CHT otopine i CHT-HA suspenzije pod vakuumom ( $p = 0,1$  bar) 20 minuta. Impregnacija nosača vršila se pod vakuumom kako bi otopina/suspenzija u potpunosti ispunila pore PLA nosača bez zaostalog

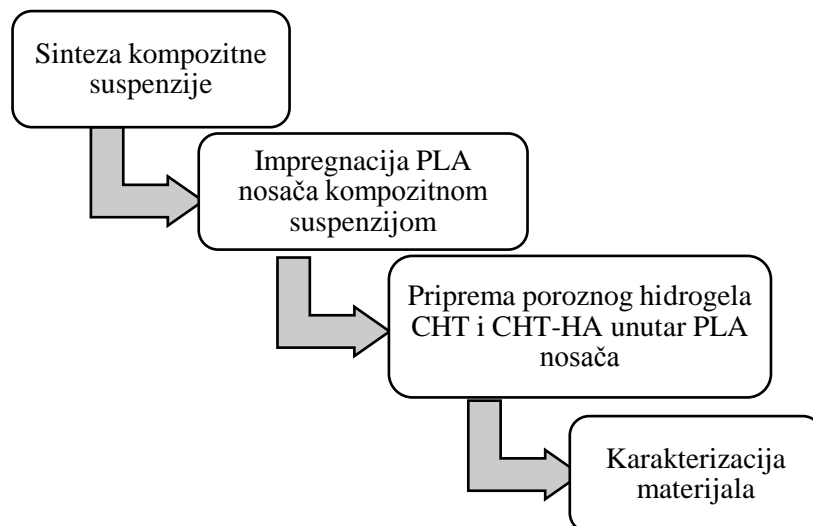
uklopljenog zraka. Nakon impregnacije, kompozitni nosači ostavljeni su u otopini/suspenziji 30 minuta.

### **3.2.3. Priprema poroznih struktura unutar PLA nosača**

Nakon 30 minuta uranjanja u otopini/suspenziji, nosači su prebačeni u kalupe za pripremu poroznih struktura. Visokoporozne strukture unutar PLA nosača pripravljene su toplinski induciranom faznom separacijom uz geliranje i ekstrakciju („freeze-gelation“ metodom) te imenovani PLA/CHT i PLA/CHT-HA (slika 6):

1. Kalupi su smrznuti pri  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 18 h. Pri tome dolazi do stvaranja odgovarajuće mikrostrukture uslijed fazne separacije područja veće koncentracije polimera od područja niže koncentracije polimera, tj. otapala.
2. Tako smrznute strukture uronjene su u gelirajući medij NaOH/etanol (volumni omjer 1:1) pri  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 12 h. Pri tome dolazi do fizikalnog umreživanja kitozana neutralizacijom bez narušavanja prethodno stvorene mikrostrukture.
3. Stvoreni porozni hidrogelovi unutar PLA nosača uronjeni su u etanol pri  $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$  na 12 h kako bi se ekstrahirao gelirajući medij (NaOH).
4. Slijedi uranjanje uzoraka u etanol pri sobnoj temperaturi na 24 h radi dehidracije hidrogelova.
5. Konačno, porozni kompozitni nosači dobiveni su sušenjem 24 h pri atmosferskim uvjetima.





Slika 6. Shematski prikaz tijeka pripreve poroznih kompozitnih nosača.

### 3.3. Karakterizacija materijala

#### 3.3.1. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

FTIR analiza provedena je na Bruker Vertex 70 instrumentu s ATR nastavkom (slika 7).

Uvjeti snimanja:

- 16 snimanja u apsorpcijskom režimu;
- Raspon mjernog područja  $4000 - 400 \text{ cm}^{-1}$ ;
- Rezolucija od  $4 \text{ cm}^{-1}$ ;
- Temperatura snimanja od  $20 \text{ }^{\circ}\text{C}$ .



Slika 7. ATR-FTIR spektrometar.

### 3.3.2. Kvalitativna mineralna rendgenska difrakcijska analiza

Kvalitativna difrakcijska analiza (XRD) provedena je na Shimadzu XRD-6000 difraktometru (slika 8).

Uvjeti snimanja:

- Raspon difrakcijskih kuteva  $5^\circ < 2\theta < 70^\circ$ ;
- Brzina snimanja od  $0,02^\circ \cdot s^{-1}$ .



Slika 8. XRD difraktometar.

### 3.3.3. Pretražna elektronska mikroskopija

Mikrostruktura poroznih materijala istražena je pretražnim elektronskim mikroskopom Tescan Vega3SEM Easy probe (slika 9).

Uvjeti rada:

- Naparivanje ispitivanih uzoraka zlatom i paladijem 120 s;
- Energija elektronskog snopa 10 keV.



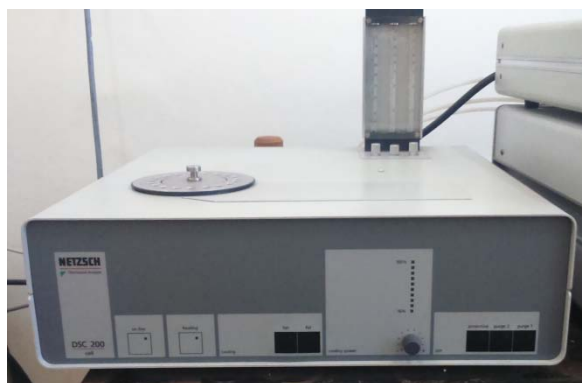
Slika 9. Pretražni elektronski mikroskop.

### 3.3.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Toplinska svojstva pripremljenih nosača ispitana su Netzsch DSC 200 instrumentom u struji zraka (slika 10).

Uvjeti rada:

- Temperaturni interval 20 – 500 °C;
- Brzina grijanja od 10 °C min<sup>-1</sup>.



Slika 10. Diferencijalni pretražni kalorimetar.

### 3.4. Fizikalna svojstva

#### 3.4.1. Bubrenje poroznih materijala

Bubrenje poroznih materijala provedeno je u duplikatima u biološkom mediju (eng. *Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM) nadopunjenom s 10 % masenog udjela goveđeg seruma (eng. *fetal bovine serum*, FBS) i 1 % masenog udjela penicilina/streptomocina. Za razliku od standardnog medija, fosfatnog pufera, koji se najčešće koristi za određivanje bubrenja biomaterijala, ovdje je korišten biološki medij kako bi se predvidjelo ponašanje materijala *in vivo*.

Ispitivani uzorci vagani su neposredno prije bubrenja ( $m_{\text{poč}}$ ) te potom uronjeni u biološki medij na 24 h pri 37 °C. Nakon bubrenja, uzorci su sušeni pri 40 °C do konstantne mase ( $m_{\text{kon}}$ ). Bubrenje materijala izračunato je prema jednadžbi (1), uz pretpostavku jednake količine istaloženih tvari iz biološkog medija.

$$\text{Bubrenje (\%)} = \frac{m_{\text{kon}} - m_{\text{poč}}}{m_{\text{poč}}} \times 100 \% \quad (1)$$

### 3.5. Biološka karakterizacija

#### 3.5.1. Test citotoksičnosti

Analiza citotoksičnosti ispitana je na stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta, MEF, ekstraktom poroznih nosača PLA, PLA/CHT i PLA/CHT-HA namakanih u biološkom mediju. Analiza je provedena u triplikatima. Neposredno prije namakanja, uzorci ispitivanih nosača sterilizirani su 24 h u etanolu (70 %) te ispirani biološkim medijem (DMEM/FBS/penicilin) 6 h. Nakon ispiranja, uzorci su namakani u biološkom mediju 24 h. Pored ispitivanih nosača, kao negativna kontrola citotoksičnosti uzet je DMEM medij, dok je pozitivna kontrola bila lateks. Nakon 24 h, ekstrakti materijala uzeti su za hranjenje nasađenih stanica.

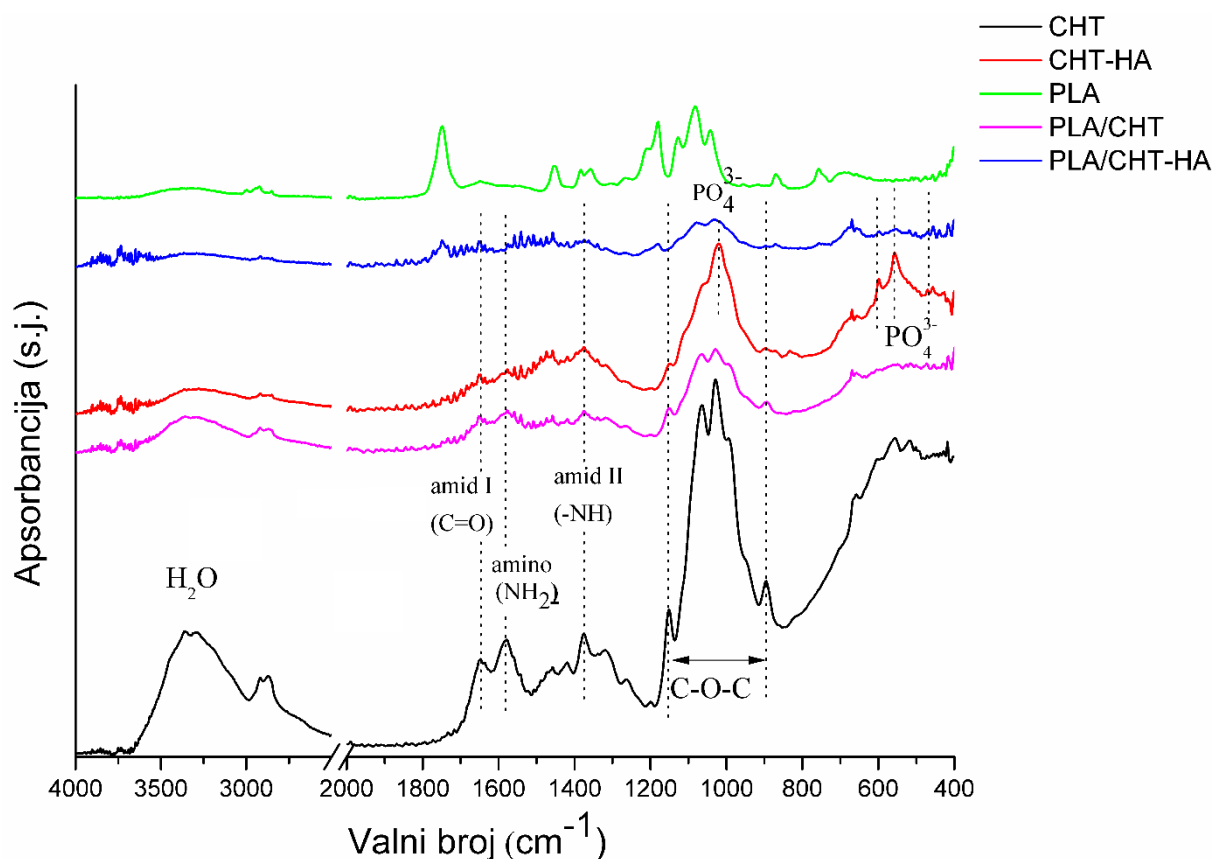
U međuvremenu, mišje stanice fibroblasta (MEF) uzgajane su u DMEM mediju nadopunjenom s 10 % goveđeg seruma u atmosferi zraka s 0,05 atm CO<sub>2</sub> pri 37 °C. Prije

presađivanja, konfluentnost (raširenost) stanica (80 – 90 %) provjerena je invertnim mikroskopom (Zeiss, Axiovert 40 CFL). Odvajanje stanica provedeno je tripsinizacijom uz pomoć otopine enzima tripsina (0,25 %) u atmosferi zraka s 0,05 atm CO<sub>2</sub> pri 37 °C na 5 min, nakon čega je dobivena suspenzija stanica. Stanice su nasađene na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića ( $5 \times 10^2$  stanica/bunarić) te inkubirane u atmosferi zraka s 0,05 atm CO<sub>2</sub> pri 37 °C, uz promijenu medija svaka 3 dana. Nakon 3 i 7 dana proveden je MTT test. MTT test je kolorimetrijska metoda kojom se prati metabolička aktivnost stanica uz bojanje (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid)om (Sigma-Aldrich, SAD). Mjerenje je provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica ThermoLabSystems MultiskanEX Microplate Reader pri valnoj duljini od 570 nm.

## 4. Rezultati i rasprava

### 4.1. FTIR analiza

Na slici 11. prikazani su spektri PLA nosača, kompozitnih nosača PLA/CHT i PLA/CHT-HA te spužvi CHT i CHT-HA kao usporednih materijala.



Slika 11. FTIR spektar ispitivanih materijala: CHT spužva i CHT-HA spužva, PLA nosač, PLA/CHT nosač, PLA/CHT-HA nosač.

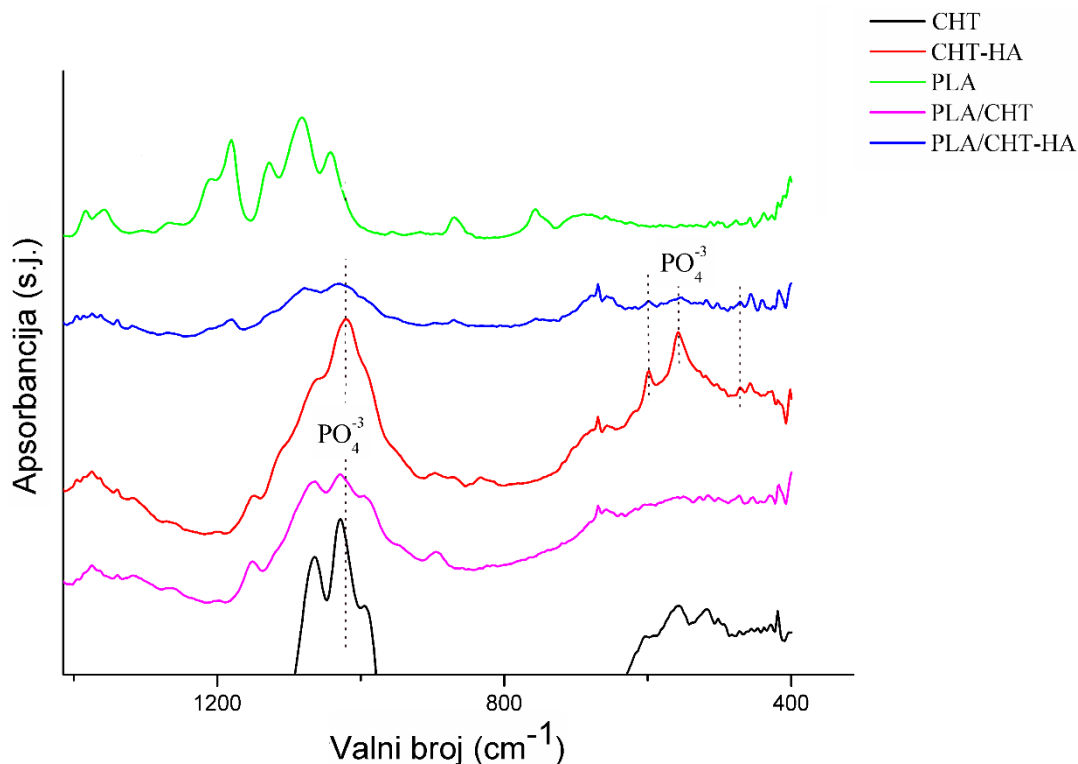
Na slici 11. označene su karakteristične vrpce za fosfatnu skupinu ( $\text{PO}_4^{3-}$ ) na 470, 556, 599 i 1020  $\text{cm}^{-1}$ , koje odgovaraju apatitnoj strukturi HA prisutne kod CHT-HA spužve i PLA/CHT-HA nosača<sup>21-25</sup>. Vrpce na 470, 556, 599  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične su za vibraciju fosfatne skupine, dok je na valnom broju od 1020  $\text{cm}^{-1}$  područje njenog rastezanja. U području oko 1020  $\text{cm}^{-1}$  dolazi do preklapanja vrpce fosfatnih skupina sa saharidnom skupinom kitozana kod CHT-HA spužve i PLA/CHT-HA nosača što uzrokuje stvaranje šireg apsorpcijskog područja gdje je teško razlučiti karakteristične vrpce fosfatne skupine u PLA/CHT-HA nosaču.

Na slici 12. prikazano je uvećanje apsorbanzijskog područja gdje su vidljive vrpce fosfatnih skupina i saharidne skupine kitozana.

FTIR spektar kitozanske spužve (CHT) pokazuje vrpce na 1151, 1059, 1028 i 893  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične za C-O-C vezu (saharidnu strukturu)<sup>23</sup>. Vrpce na 1651, 1581, 1535  $\text{cm}^{-1}$  pripisuju se redom amid I (C=O veza amida), amino (-NH<sub>2</sub>) i amid II (-NH veza amida) skupinama kitozana<sup>22-25</sup>. Još jedna izražena vrpca amid II skupine kitozana nalazi se na 1375  $\text{cm}^{-1}$ <sup>22</sup>. Sve navedene vrpce CHT-a pojavljuju kod svih kompozitnih materijala s kitozanskom matricom, ali manjeg intenziteta. To ukazuje na izostanak kemijskih reakcija između kitozana, PLA i HA, kao što je i očekivano.

Široka vrpca u području od 3600 do 3000  $\text{cm}^{-1}$  kod uzoraka CHT, CHT-HA i PLA/CHT pripisuje se adsorbiranoj vodi, O-H istežanju kitozanske strukture, N-H vibraciji kitozana te međumolekulskim vodikovim vezama polisaharida<sup>22, 23</sup>.

Kod uzorka PLA/CHT-HA, vrpce na 470, 556, 599  $\text{cm}^{-1}$  karakteristične za apatitnu strukturu slabijeg su intenziteta što se može uočiti na uvećanom prikazu FTIR spektara (slika 12). Mogući razlog slabijeg intenziteta je manji udio HA u odnosu na ukupnu masu kompozitnog nosača te veća poroznost nosača.



Slika 12. Uvećani FTIR spektar ispitivanih materijala: CHT spužva i CHT-HA spužva, PLA nosač, PLA/CHT nosač, PLA/CHT-HA nosač.

## 4.2. Rendgenska difrakcijska analiza

Difrakcijski spektri ispitivanih materijala dani su na slici 13. Kompozitna CHT-HA spužva korištena je kao referentni materijal za potvrdu *in situ* sinteze hidroksiapatita u kompozitnom nosaču PLA/CHT-HA. Rendgenska difrakcijska analiza kompozitnih materijala potvrdila je *in situ* sintezu hidroksiapatita (ICDD 9-432), ali i precipitaciju druge kalcij-fosfatne faze.

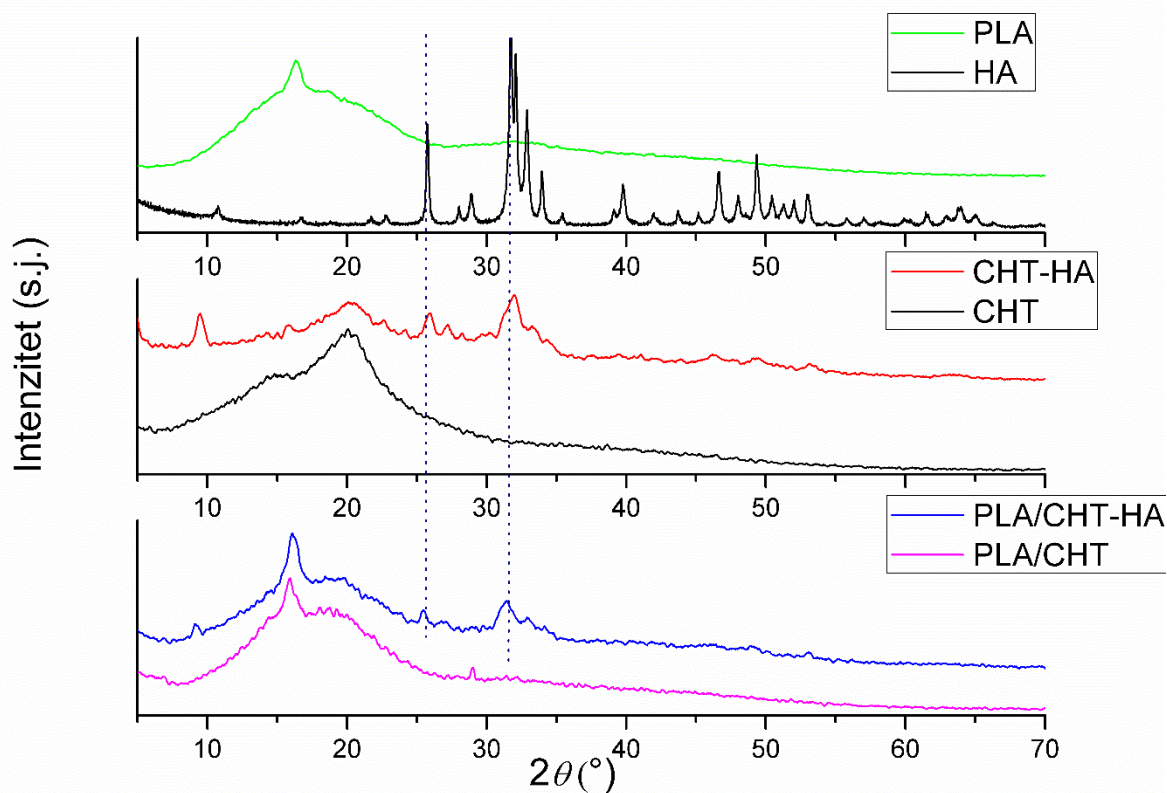
Na slici 13. prikazani su difraktogrami ispitivanih uzoraka i standardnog uzorka HA. Osim hidroksiapatita utvrđena je i prisutnost oktakalcij hidrogenfosfata pentahidrata (OCP, ICDD 79-0423) u CHT-HA spužvi i PLA/CHT-HA nosaču (Tablica 2.). OCP je termodinamički manje stabilna kalcij-fosfatna faza u odnosu na hidroksiapatit, a može se naći kao međufazni korak prilikom precipitacije HA u fiziološkim uvjetima. pH vrijednost sustava oko 5,5 pogoduje nastajanju OCP-a. Budući da je sinteza HA unutar kitozanske otopine provedena u blago kiselom mediju, istovremena precipitacija OCP-a i HA je moguća. Međutim, OCP se može opisati kao izmjenična slojevita struktura apatitnog i hidratiziranog sloja, gdje je apatitni sloj veoma slične strukture kao kod HA. Stoga je moguće i stvaranje monokristala<sup>21-24, 26-28</sup>.

Prisutnost OCP-a u biomaterijalu kao dodatne kalcij-fosfatne faze je čak i poželjan zbog lakše transformacije u biološki (karbonatni) apatit *in vitro* i *in vivo*. U tablici 2. navedeni su vrijednosti difrakcijskih maksimuma HA i OCP faze za navedene uzorke. Slični difraktogrami anorganske faze u CHT-HA spužvi i PLA/CHT-HA nosaču ukazuju da prisutnost PLA ne utječe na sastav *in situ* stvorene kalcij-fosfatne faze unutar kitozanske matrice.

Tablica 2. Difrakcijski maksimumi OCP-a i HA određeni iz XRD spektra.

Uzorci	OCP	HA	
PLA/CHT-HA	9,2°	25,4°	31,4°
CHT-HA	9,5°	25,9°	31,8°





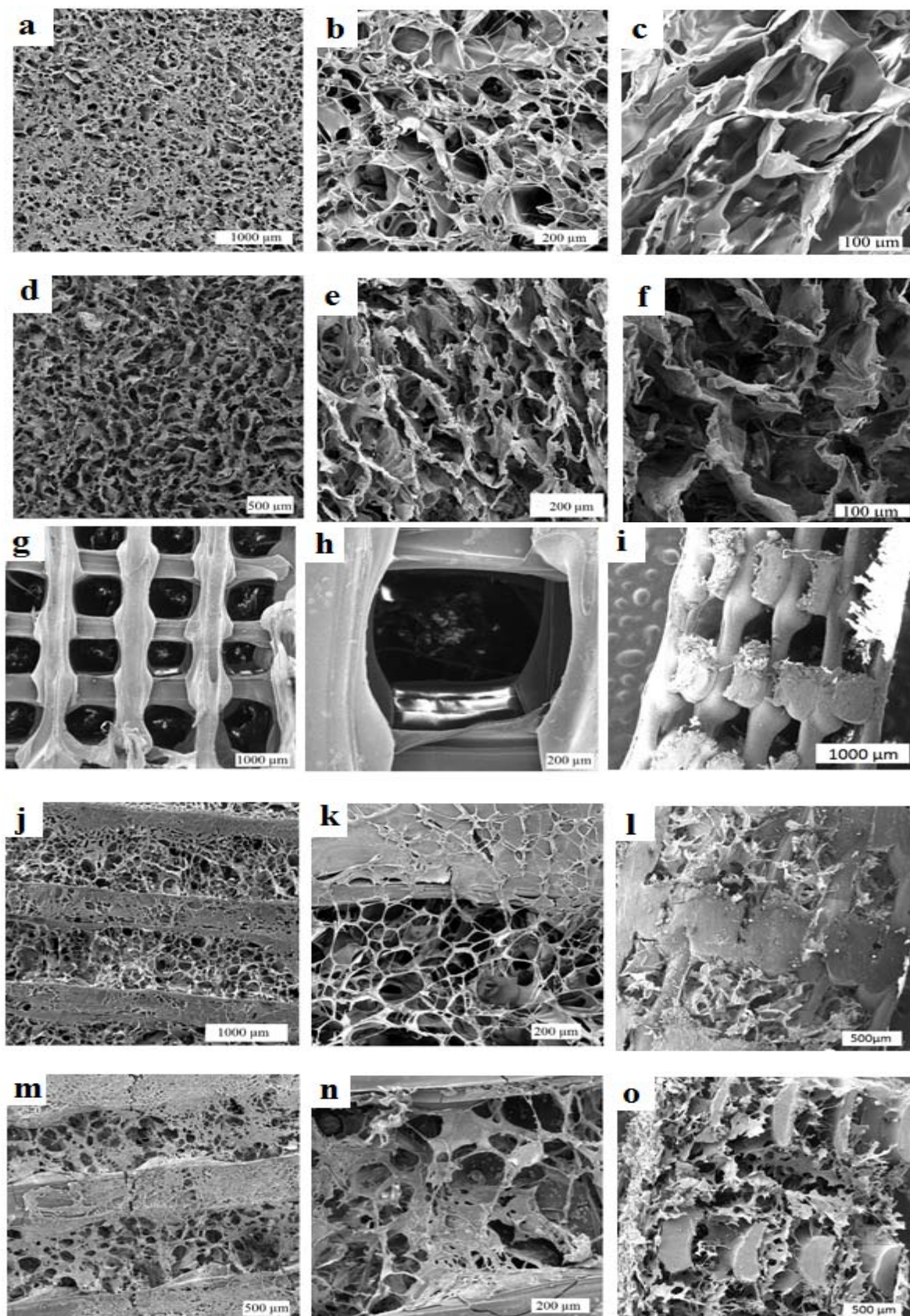
Slika 13. XRD spektar ispitivanih materijala: PLA nosač, standard HA, CHT-HA spužva, CHT spužva, PLA/CHT-HA nosač i PLA/CHT nosač.

Za CHT uzorak utvrđen je karakteristični široki difrakcijski maksimum kitozana na  $2\theta = 20^\circ$  koji je jasno vidljiv kod CHT-HA, dok je kod PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosača prisutno preklapanje maksimuma kitozana i PLA. PLA pokazuje široki difrakcijski maksimum na  $2\theta = 16^\circ$  te je jasno vidljiv kod kompozitnih uzoraka pripremljenih iz PLA nosača<sup>21-28</sup>.

### 4.3. Mikrostruktura materijala

Mikrostruktura pripremljenih materijala istražena je SEM analizom. Na slici 14. prikazane su SEM mikrografije nosača PLA, PLA/CHT i PLA/CHT-HA te CHT i CHT-HA spužvi kao referentnih uzoraka. Mikrografije u prva dva stupca (14a, 14b, 14d, 14e, 14g, 14h, 14i, 14j, 14m i 14n) pokazuju površinu materijala snimanu pri različitim povećanjima, dok mikrografije u trećem stupcu slike 14 (14c, 14f, 14i, 14l i 14o) odgovaraju poprečnom presjeku svih pripremljenih materijala. Vidljivo je da CHT (slike 14a, 14b, 14c) i CHT-HA (slike 14d, 14e, 14f) spužvasti materijali posjeduju visokoporoznu površinu bez stvorenog površinskog filma koji se najčešće dobiva liofilizacijom. Također, velike i međusobno povezane pore uočljive su i u unutrašnjosti spužvastih materijala. Uočljiva je razlika između veličine i izgleda pora CHT i CHT-HA materijala. Pore CHT-HA spužve izgledaju veće te su granice pora „izlomljene“ i nepravilnije u odnosu na CHT spužvu.

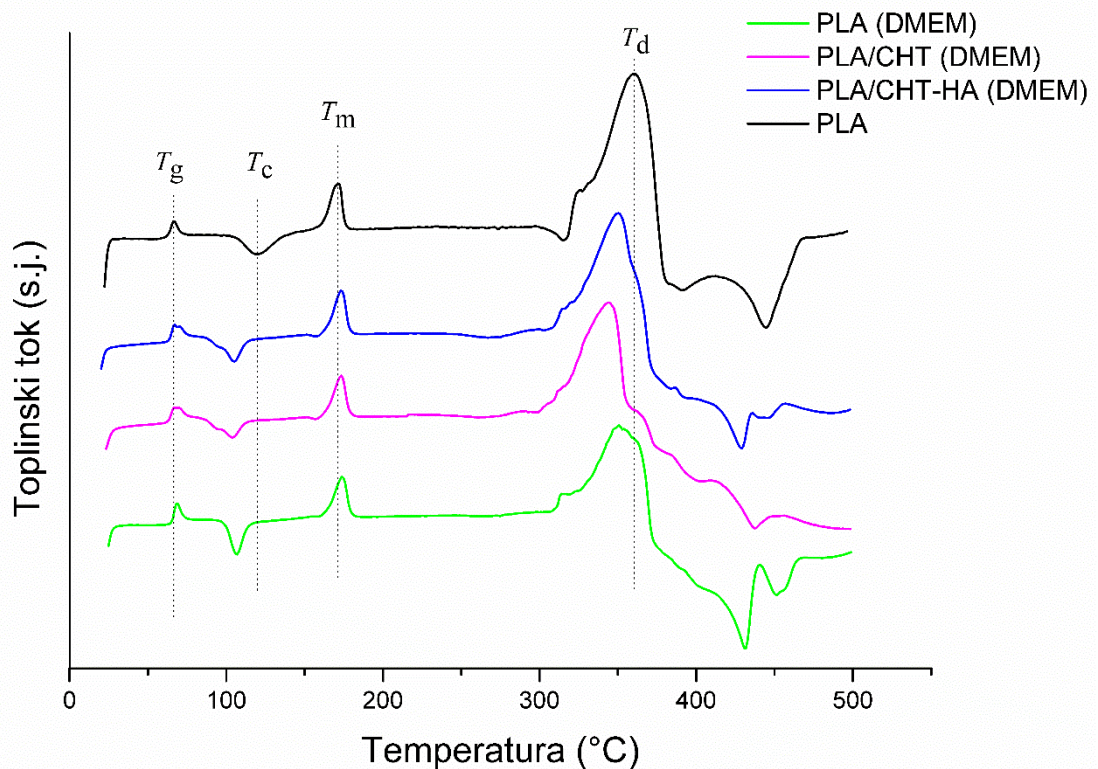
Kako bi ispunili zahtjev za mehaničkom čvrstoćom biorazgradivog nosača kao potencijalnog nadomjeska u inženjerstvu koštanog tkiva, primijenio se 3D-tiskani PLA nosač (slike 14g, 14h, 14i) pravilne trodimenzijske strukture s povezanim porama duljine 1 mm. Velike pore PLA nosača iskorištene su za pripremu spužvastih struktura CHT i CHT-HA unutar PLA nosača koje ispunjavaju slobodan prostor pora PLA nosača te povećavaju specifičnu površinu kompozitnih nosača PLA/CHT (slike 14j, 14k, 14l) i PLA/CHT-HA (slike 14m, 14n, 14o). U navedenim nosačima vidljivo je dobro prijanjanje spužvastih struktura na PLA nosač. Dobra adhezija CHT i CHT-HA poroznih struktura može biti posljedica interakcija karboksilnih skupina PLA i protoniranih amino skupina kitozana tijekom pripreme nosača. Pore PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosača su također nepravilnog oblika i međusobno dobro povezane što se vidi iz analize površine i poprečnog presjeka materijala.



Slika 14. SEM mikrografije pripremljenih uzoraka: CHT spužva (a, b, c); CHT-HA spužva (d, e, f); PLA nosač (g, h, i); PLA/CHT nosač (j, k, l); PLA/CHT-HA nosač (m, n, o).

#### 4.4. Diferencijalna pretražna kalorimetrija

Toplinska svojstva materijala ispitana su DSC analizom kako bi se utvrdio utjecaj pripreme materijala (pH vrijednost početne otopine kitozana i suspenzije kitozan/HA) i bubrenja u biološkom mediju (DMEM). Materijali su uspoređeni s netretiranim PLA nosačem.



Slika 15. DSC analiza nosača PLA, PLA/CHT i PLA/CHT-HA nakon bubrenja u biološkom mediju i netretiranog PLA nosača.

Na slici 15. prikazane su DSC krivulje ispitivanih materijala: PLA, PLA/CHT, PLA/CHT-HA nakon 24 h bubrenja u biološkom mediju pri 37°C te netretiranog PLA nosača. Iz dobivenih krivulja određene su karakteristične temperature za PLA: staklište ( $T_g$ ), talište ( $T_m$ ), temperatura kristalizacije ( $T_{c1}$  i  $T_{c2}$ ) i temperatura degradacije ( $T_d$ ). U tablici 3. prikazani su rezultati dobiveni DSC analizom ispitivanih uzoraka.

Kod svih nosača javlja se prvi maksimum na oko 65 °C koji se može pripisati starenju materijala. Uslijed starenja, staklišta materijala nije jasno vidljivo te se određuje iz točke infleksije dobivene ekstrapolacijama baznih krivulja. Ustanovljeno je da ne postoji značajna razlika između tako određenog staklišta i maksimuma starenja. Radi jednostavnijeg prikaza grafičkih rezultata, maksimum starenja označen je kao staklišta ( $T_g$ ) ispitivanih materijala. Vrijednosti staklišta svih nosača nakon bubrenja ne razlikuju se značajno u odnosu na referentni (netretirani) PLA nosač.

Tablica 3. Rezultati DSC analize nosača nakon bubrenja u biološkom mediju i netretiranog PLA nosača.

	PLA	PLA-CHT	PLA-CHT-HA	PLA*
$T_g, ^\circ\text{C}$	66,40 ± 0,28	65,05 ± 0,07	66,10 ± 0,28	64,60 ± 0,00
$T_{c1}, ^\circ\text{C}$	106,45 ± 0,21	102,85 ± 0,21	105,30 ± 0,42	119,75 ± 0,49
$T_{c2}, ^\circ\text{C}$	-	95,25 ± 1,34	95,35 ± 0,64	-
$T_m, ^\circ\text{C}$	173,50 ± 0,71	172,55 ± 0,07	173,85 ± 0,78	171,95 ± 0,21
$T_d, ^\circ\text{C}$	352,15 ± 2,05	343,4 ± 3,39	346,95 ± 0,64	360,7 ± 0,57
$\Delta H_c, \text{J g}^{-1}$	-30,64 ± 1,41	-26,62 ± 0,18	-28,98 ± 0,54	-34,28 ± 0,59
$\Delta H_m, \text{J g}^{-1}$	36,065 ± 0,42	40,59 ± 0,28	37,12 ± 1,02	40,84 ± 0,59
$\chi$	0,39 ± 0,00	0,44 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,44 ± 0,01

\* Netretirani PLA nosač.

Taljenju PLA prethodi hladna kristalizacija. Neposredno prije prelaska u viskofluidno stanje dolazi do prestrukturiranja makromolekula koje stvaranju uređeniju strukturu. Utjecaj bubrenja na toplinska svojstva nosača vidljiv je iz pomaka temperature kristalizacije ( $T_{c1}$ ) i degradacije ( $T_d$ ) prema nižim vrijednostima PLA nosača nakon bubrenja. S obzirom da je PLA poliester, njegova se razgradnja odvija hidrolitičkim reakcijama. Esterske skupine PLA podložne su reakcijama hidrolize u vodenom mediju koje utječu na kemijska, toplinska i biološka svojstva PLA. Niža temperatura kristalizacije popraćena je nižom entalpijom kristalizacije ( $\Delta H_c$ ) te nižim stupnjem kristalnosti ( $\chi$ ) PLA nakon bubrenja. Stupanj kristalnosti PLA izračunat je pomoću literaturne vrijednosti entalpije taljenja od 93 J g<sup>-1</sup> <sup>19</sup>.

Toplinska analiza kompozitnih nosača PLA/CHT i PLA/CHT-HA ukazuje na pojavu dodatne temperature kristalizacije ( $T_{c2}$ ) pri nižim vrijednostima u odnosu na  $T_{c1}$  tj. na raniju kristalizaciju PLA. Ranija kristalizacija može biti posljedica hidrolize polimera u blago kiselom mediju tijekom impregnacije otopine kitozana (pH = 4,8) i kompozitne kitozan/HA suspenzije (pH = 6). Priprava kompozitnog PLA/CHT nosača u kiselom mediju dovodi do brže hidrolize PLA te do nastajanja manjih makromolekula veće mobilnosti koje brže prelaze u uređenu kristalnu strukturu tijekom zagrijavanja. Međutim, utjecaj na toplinska svojstva PLA u kompozitnim nosačima PLA/CHT i PLA/CHT-HA može imati i dodatna polimerna, odnosno anorganska faza. Pretpostavljaju se međusobne interakcije esterskih veza i amino skupina kitozana koje mogu biti uzrok brže kristalizacije manjih makromolekula PLA. Također, kristali hidroksiapatita mogu djelovati kao nukleatori za kristalizaciju PLA u PLA/CHT-HA nosaču. Niže temperature kristalizacije ( $T_{c1}$  i  $T_{c2}$ ) kao i entalpije kristalizacije ( $\Delta H_c$ ) PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosača popraćene su bržom razgradnjom materijala u odnosu na PLA prije i nakon bubrenja. Brža razgradnja navedenih nosača može biti posljedica već započete hidrolize PLA tijekom pripreme kompozitnih nosača. S obzirom na dugotrajniju biološku razgradnju PLA *in vivo* koja može uzrokovati upalne reakcije, ovakav način pripreme (obrade PLA) materijala može pozitivno utjecati na njegova biološka svojstva.

#### 4.5. Bubrenje u biološkom mediju

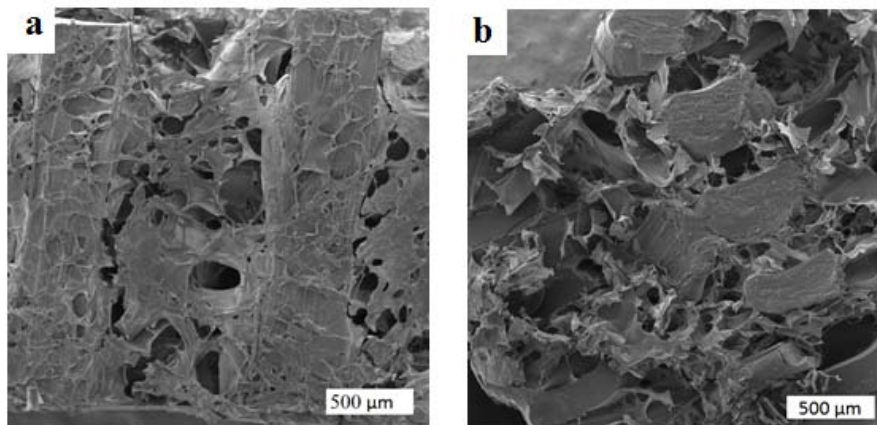
Bubrenje svih pripremljenih materijala provedeno je kako bi se utvrdila mogućnost apsorpcije biološkog medija (Tablica 4).

Tablica 4. Kapacitet bubrenja ispitivanih materijala.

Materijali	Bubrenje (%)
CHT	2477 ± 78
CHT-HA	1912 ± 39
PLA	126,6 ± 9,4
PLA/CHT	135,0 ± 4,4
PLA/CHT-HA	130,1 ± 6,4

Rezultati kapaciteta bubrenja pokazuju velike razlike u bubrenju CHT i CHT-HA spužvi s obzirom na PLA i kompozitne nosače. Spužve pokazuju sposobnost za apsorpciju mase biološkog medija i do 20 puta veću od vlastite, što ukazuje na stabilnu strukturu hidrogela. Tako velika sposobnost apsorpcije medija moguća je zbog njihove izrazito porozne strukture i specifične prirode kitozana kao hidrogela.

Svi ispitivani uzorci s PLA nosačem pokazuju kapacitet bubrenja u rasponu 126 – 135 %. Statistička obrada podataka provedena je ANOVA testom kojim je zaključeno da nema značajne razlike u bubrenju PLA i kompozitnih nosača. Mogući razlog znatno manje apsorpcije biološkog medija uzoraka s PLA matricom je nemogućnost povećanja volumena PLA nosača tj. manja sposobnost bubrenja PLA u odnosu na kitozanske spužve. Količina medija kojeg materijal može apsorbirati jednaka je volumenu pora PLA nosača. PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosači posjeduju kitozanski hidrogel, ali njegov utjecaj na bubrenje je zanemariv zbog velikog volumena pora PLA nosača unutar kojih je smješten.



Slika 16. SEM mikrofografije PLA/CHT nosača nakon bubrenja u biološkom mediju:

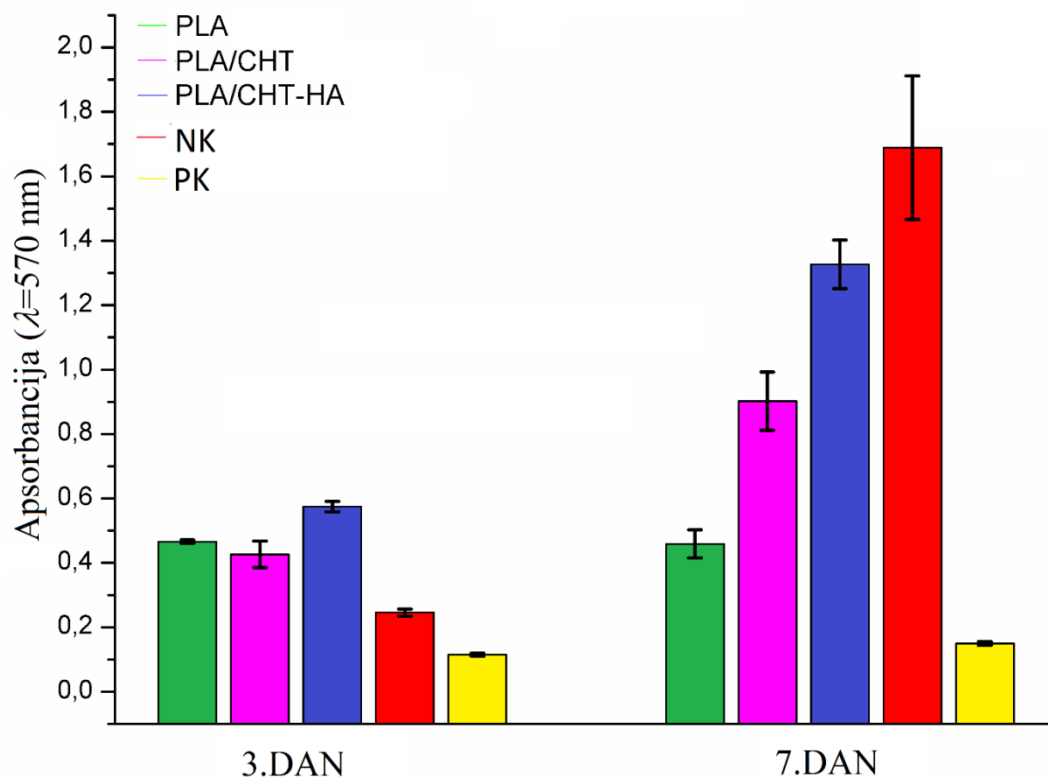
a) površina; b) poprečni presjek.

Utjecaj biološkog medija na površinu i unutrašnjost materijala nakon bubrenja istražen je SEM analizom. Na slici 16. prikazana je površina i poprečni presjek PLA/CHT nosača nakon bubrenja u biološkom mediju. Usporedbom sa SEM analizom PLA/CHT nosača prije bubrenja (Poglavlje 4.3., slika 14j, 14k, 14l) može se vidjeti sljepljivanje i zatvaranje pora na površini nakon sušenja. Biološki medij oponaša uvjete *in vivo*, sastavljen je od raznih proteina i soli koje se polaganim sušenjem talože na površini materijala. Iz slike poprečnog presjeka

nosača (slika 16b) vidi se da biološki medij nije imao nikakav utjecaj na povezanost i izgled pora u unutrašnjosti nosača nakon sušenja.

#### 4.6. Test citotoksičnosti

Analiza citotoksičnosti provedena je na PLA, PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosačima nakon 3 i 7 dana. Utjecaj materijala na život stanica ispitan je ekstraktom biološkog medija u kojem su nosači namakani 24 sata. Kao rezultat dobivene su vrijednosti apsorbancije koje su direktno proporcionalne vijabilnosti (preživljavanju) stanica (slika 17, Tablica 5.).



Slika 17. MTT test fibroblasta inkubiranih s ekstraktom nosača 3 i 7 dana. Pozitivna kontrola (PK): ekstrakt lateksa; negativna kontrola (NK): biološki medij za uzgajanje stanica (DMEM).

Nakon trećeg dana uzgajanja stanica s ekstraktima ispitivanih uzoraka primjećuju se veće vrijednosti apsorbancije ispitivanih nosača u odnosi na negativnu i pozitivnu kontrolu.



Značajniji porast apsorbancije između ispitivanih nosača može se vidjeti za PLA/CHT-HA nosač, što ukazuje na pogodniji sastav materijala za umnažanje stanica.

Tablica 5. Vrijednosti apsorbancija ( $\lambda = 570$  nm) nakon trećeg i sedmog dana.

<b>Uzorci</b>	<b>3. DAN</b>	<b>7. DAN</b>
<b>PLA</b>	0,466 ± 0,005	0,459 ± 0,043
<b>PLA/CHT</b>	0,426 ± 0,041	0,903 ± 0,091
<b>PLA/CHT-HA</b>	0,575 ± 0,017	1,327 ± 0,076
<b>Negativna kontrola</b>	0,246 ± 0,011	1,689 ± 0,223
<b>Pozitivna kontrola</b>	0,115 ± 0,004	0,150 ± 0,006

Porast apsorbancije kod kompozitnih nosača PLA/CHT i PLA/CHT-HA vidljiv je nakon sedam dana uzgajanja stanica, dok se vrijednost za PLA se ne mijenja. Kompozitni nosači PLA/CHT i PLA/CHT-HA potiču umnažanje (proliferaciju) stanica uslijed veće biokompatibilnosti u odnosu na čisti sintetski polimer. Prisutnost kitozana kao prirodnog polimera povećava staničnu vijabilnost, dok najveće umnažanje stanica potiče PLA/CHT-HA nosač zbog prisutnosti kalcij-fosfatne faze (OCP/HA).

## 5. Zaključak

Priprava visokoporoznog kompozitnog materijala PLA/CHT-HA s 30 % masenog udjela hidroksiapatita provedena je metodom toplinski inducirane fazne separacije uz geliranje i ekstrakciju („freeze-gelation“).

FTIR i XRD analizom potvrđena je *in situ* sinteza OCP/HA anorganske faze unutar kitozanske matrice. SEM analiza potvrdila je pripravu visokoporoznih struktura, velikih međusobno povezanih pora, nepravilnijeg oblika.

Toplinska analiza ukazuje na utjecaj priprave nosača na kristalnost i toplinsku razgradnju PLA. Tijekom impregnacije PLA-nosača otopinom CH i suspenzijom CHT/HT dolazi do djelomične hidrolize PLA nosača koja bi mogla poboljšati biološku razgradnju nosača *in vivo*. Bubrenje u biološkom mediju nakon 24 h ukazuje na hidrolizu PLA u neutralnom mediju.

Analiza citotoksičnosti provedena na stanicama mišjih embrionalnih fibroblasta nakon 3 i 7 dana uzgajanja potvrdila je necitotoksičnost PLA, PLA/CHT i PLA/CHT-HA nosača. Najveća vijabilnost stanica potvrđena je kod stanica uzgajanih s ekstraktom PLA/CHT-HA nosača.

Iz provedenih analiza možemo zaključiti da je dobiveni kompozitni materijal PLA/CHT-HA svojom strukturom i sastavom potencijalan za primjenu u inženjerstvu koštanog tkiva. Međutim, potrebna su daljnja istraživanja kojima bi se utvrdila mehanička svojstva i brzina degradacije *in vitro*.

## 6. Simboli

$M$  – molekulska masa

$T_g$  – temperatura staklastog prijelaza (staklište)

$T_{c1}$  i  $T_{c2}$  – temperature kristalizacije

$T_m$  – temperatura taljenja (talište)

$T_d$  – temperatura degradacije

$\Delta H_c$  – entalpija kristalizacije

$\Delta H_m$  – entalpija taljenja

$\chi$  – stupanj kristalnosti polimera

$\lambda$  – valna duljina

$\theta$  – difrakcijski kut

## 7. Literatura

1. Puppi, D., Chiellini, F., Piras, A.M., Chiellini, E. Polymeric materials for bone and cartilage repair, *Progress in Polymer Science* **35** (2010) 403 – 440.
2. Moguš-Milanković, A. Tri generacije biomaterijala, Izazovi i poticaji, *Kemija u Industriji* **54** (3) (2005) 131 – 134.
3. Armentano, I., Dottori, M., Fortunati, E., Mattioli, S., Kenny, J.M. Biodegradable polymer matrix nanocomposites for tissue engineering: A review, *Polymer Degradation and Stability* **95** (2010) 2126 – 2146.
4. Chen, Q., Liang, S., Thouas, G.A. Elastomeric biomaterials for tissue engineering, *Progress in Polymer Science* **38** (2013) 584 – 671.
5. Lui, C., Xia, Z., Czernuszka, J.T. Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering, *Chemical Engineering Research and Design* **85** (A7) (2007) 1051 – 1064.
6. Quaglia, F. Bioinspired tissue engineering: The great promise of protein delivery technologies, *International Journal of Pharmaceutics* **364** (2008) 281 – 297.
7. Offeddu, G.S., Ashworth, J.C., Cameron, R.E., Oyen, M.L. Multi-scale mechanical response of freeze-dried collagen scaffolds for tissue engineering applications, *Journal of the mechanical behavior of biomedical materials* **42** (2015) 19 – 25.
8. Hsieh, C.Y., Tsai, S.P., Ho, M.H., Wang, D.M., Lui, C.E. Analysis of freeze-gelation and cross-linking processes for preparing porous chitosan scaffolds, *Carbohydrate Polymers* **67** (2007) 124 – 132.
9. Ho, M.H., Kuo, P.Y., Hsieh, H.J., Hsien, T.Y., Hou, L.T., Lai, J.Y., Wang, D.M. Preparation of porous scaffolds by using freeze-extraction and freeze-gelation methods, *Biomaterials* **25** (2004) 129 – 138.
10. Yuan, N.Y., Lin, Y.A., Ho, M.H., Wang, D.M., Lia, J.Y., Hsieh, H.J. Effects of the cooling mode on the structure and strength of porous scaffolds made of chitosan, alginate, and carboxymethyl cellulose by the freeze-gelation method, *Carbohydrate Polymers* **78** (2009) 349 – 356.
11. Farzadi, A., Waran, V., Solati-Hashjin, M., Rahman, A.A., Asadi, M., Osman, N.A.A. Effect of layer printing delay on mechanical properties and dimensional accuracy of 3D printed porous prototypes in bone tissue engineering, *Ceramics International* **41** (2015) 8320 – 8330.

12. Yashimoto, H., Shin, Y.M., Terai, H., Vacanti, J.P. A biodegradable nanofiber scaffold by electrospinning and its potential for bone tissue engineering, *Biomaterials* **24** (2003) 2077 – 2082.
13. Lannutti, J., Reneker, D., Mia, T., Tomasko, D., Farson, D. Electrospinning for tissue engineering scaffolds, *Materials Science and Engineering C* **27** (2007) 504 – 509.
14. Vallet-Regi, M., Gonzalez-Calbet, J.M. Calcium phosphates as substitution of bone tissue, *Progress in Solid State Chemistry* **32** (2004) 1 – 31.
15. Sadat-Shojai, M., Khorasani, M.T., Dinpanah-Khoshdargi, E., Janshidi, A. Synthesis methods for nanosized hydroxyapatite with diverse structures, *Acta Biomaterialia* **9** (2013) 7591 – 7621.
16. Croisier, F., Jerome, C. Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *European Polymer Journal* **49** (2013) 780 – 792.
17. Kim, I.Y., Seo, S.J., Moon, H.S., Yoo, M.K., Park, I.Y., Kim, B.C., Cho, C.S. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications, *Biotechnology Advances* **26** (2008) 1 – 21.
18. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma, C.P. Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fiber formation, *Progress in Polymer Science* **34** (2009) 641 – 678.
19. Lopes, M.S., Jardini, A.L., Filho, R.M. Poly(lactic acid) production for tissue engineering applications, *Procedia Engineering* **42** (2012) 1402 – 1413.
20. Gupta, B., Revagade, N., Hilborn, J. Poly(lactic acid) fiber: An overview, *Progress in Polymer Science* **32** (2007) 455 – 482.
21. Chen, J., Nan, K., Yin, S., Wang, Y., Wu, T., Zhang, Q. Characterization and biocompatibility of nanohybrid scaffold prepared via in situ crystallization of hydroxyapatite in chitosan matrix, *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* **81** (2010) 640 – 647.
22. Li, J., Zhu, D., Yin, J., Liu, Y., Yao, F., Yao, K. Formation of nano-hydroxyapatite crystal in situ in chitosan-pectine polyelectrolyte complex network, *Materials Science and Engineering C* **30** (2010) 795 – 803.
23. Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, *Materials Science and Engineering C* **33** (2013) 4539 – 4544.

24. Cai, X., Tong, H., Shen, X., Chen, W., Yan, J., Hu, J. Preparation and characterization of homogeneous chitosan-poly(lactic acid)/hydroxyapatite nanocomposite for bone tissue engineering and evaluation of its mechanical properties, *Acta Biomaterialia* **5** (2009) 2693 – 2703.
25. Chen, F., Wang, Z.C., Lin, C.J. Preparation and characterization of nano-sized hydroxyapatite particles and hydroxyapatite/chitosan nano-composite for use in biomedical materials, *Materials Letters* **57** (2002) 858 – 861.
26. Zao, H., Jin, H., Cai, J. Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite/chitosan composite with enhanced compressive strength by urease-catalyzed method, *Materials Letters* **116** (2014) 293 – 295.
27. Rusu, V.M., Ng, C.H., Wilke, M., Tiersch, B., Fratzl, P., Peter, M.G. Size-controlled hydroxyapatite nanoparticles as self-organized organic–inorganic composite materials, *Biomaterials* **26** (2005) 5414 – 5426.
28. Olivera, M.J., Rodrigues, M.T., Silva, S.S., Malafaya, P.B., Gomes, M.E., Viegas, C.A., Dias, I.R., Azevedo, J.T., Mano, J.F., Reis, R.L. Novel hydroxyapatite/chitosan bilayered scaffold for osteochondral tissue-engineering applications: Scaffold design and its performance when seeded with goat bone marrow stromal cells, *Biomaterials* **27** (2006) 6123 – 6137.

## Životopis

Rođen sam u Zagrebu 10.10.1991. godine. Odrastao sam u Gornjoj Stubici gdje sam završio osnovnu školu 2005. godine. Iste godine upisao sam IX gimnaziju u Zagrebu.

2010. završio sam srednju školu i upisao preddiplomski studij *Kemijskog inženjerstva* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu. Preddiplomski studij završio sam 2013. i zatim sam upisao diplomski studij *Kemijsko procesno inženjerstvo* na već navedenom fakultetu.

2014. godine dobio sam Rektorovu nagradu za studentski rad *Uvećanje sušionika s fluidiziranim slojem* odrađen u koautorstvu s kolegama Antonijom Giacobi i Darijom Klarićem.

2015. godine održao sam predavanje pod nazivom *Biodegradable polymer matrices in tissue engineering* na radionici *Polymers from the perspective of chemists and engineers* na Fakultetu strojarstva i brodogradnje u Zagrebu.