

Priprava kompozitnih poroznih materijala na temelju bioaktivnog stakla i biorazgradljivog polimera

Kelava, Marija

Master's thesis / Diplomski rad

2024

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

Permanent link / Trajna poveznica: <https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:963374>

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

Download date / Datum preuzimanja: **2025-02-26**



Repository / Repozitorij:

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



SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ PRIMIJENJENE KEMIJE

Marija Kelava

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, rujan 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
POVJERENSTVO ZA DIPLOMSKE ISPITE

Kandidatkinja **Marija Kelava**

Predala je izrađen diplomski rad dana: 4. rujna 2024.

Povjerenstvo u sastavu:

Prof. dr. sc. Marica Ivanković, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Leonard Bauer, Sveučilište u Zagrebu Fakultet
kemijskog inženjerstva i tehnologije

Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina, Sveučilište u Zagrebu
Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije

Dr. sc. Iva Bazina, Sveučilište u Zagrebu Fakultet kemijskog
inženjerstva i tehnologije (zamjena)

povoljno je ocijenilo diplomski rad i odobrilo obranu diplomskog
rada pred povjerenstvom u istom sastavu.

Diplomski ispit održat će se dana: 9. rujna 2024.

SVEUČILIŠTE U ZAGREBU
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE
SVEUČILIŠNI DIPLOMSKI STUDIJ PRIMIJENJENE KEMIJE

Marija Kelava

**Priprava kompozitnih poroznih materijala na temelju bioaktivnog stakla i biorazgradljivog
polimera**

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:

prof. dr. sc. Marica Ivanković

dr. sc. Leonard Bauer

izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, rujan 2024.

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

Zahvala

Izražavam iskrenu zahvalnost mentorici, prof. dr. sc. Marici Ivanković, na prihvaćanju mentorstva, prijedlogu teme i stručnom vodstvu tijekom izrade ovog rada. Također, veliko hvala i asistentu dr. sc. Leonardu Baueru na posvećenosti, pomoći i svim savjetima tijekom izrade eksperimentalnog i pisanog dijela rada.

Neizmjeno hvala mojim roditeljima, najvećem i najčvršćem osloncu u mom životu. Posebno hvala seki i mom Leonu koji su bezuvjetno bili uz mene i kada su padale kiše i kada je sijalo sunce. Hvala mojoj cimi, Pažić, KC i svim prekrasnim prijateljima koje mi je život, a i FKIT, nanio na put. Zbog vas je ovo poglavlje mog života bilo prekrasna avantura.

SAŽETAK

Kompozitni porozni materijali kombiniraju različite komponente kako bi se postigla poboljšana svojstva koja nadilaze mogućnosti pojedinačnih materijala. Posebno zanimanje izazivaju kompoziti koji sadrže bioaktivno staklo i biorazgradljive polimere, zbog sposobnosti da simultano osiguraju strukturnu podršku, stimuliraju regeneraciju tkiva i postupno se razgrađuju unutar organizma. Bioaktivno staklo zbog svoje biokompatibilnosti i sposobnosti interakcije s biološkim tkivom ima široku primjenu u regenerativnoj medicini, posebice u obliku trodimenzionalnih nosača za tkivno inženjerstvo.

Cilj ovog diplomskog rada je priprema kompozitnih trodimenzionalnih nosača na temelju visokoporozne matrice koja je sačinjena od biostakla te kompozitnih sfera na temelju kitozana. Takvi nosači pripremljeni su metodom repliciranja žrtvovanog predloška (engl. *foam replica method*). Osnovni zadatak bio je pronaći odgovarajući postupak i najbolje parametre kako bi se sfere uspješno sljepile na staklenu trodimenzionalnu matricu. Prethodnim istraživanjima potvrđeni su optimalni parametri sinteze mikrosfera metodom elektroštrcanja. Prilikom impregnacije sfera na nosač pripremaju se suspenzije 5%, odnosno 10% mase sfera na volumen otapala. Za ljepljenje sfera za nosač pripremljena je otopina natrijevog alginata od 0,5, 1 i 2 mas./vol. %.

Uspješnost procesa procijenjena je na temelju gubitka mase nakon žarenja i SEM analizom. Potvrđena je stabilnost nosača od bioaktivnog stakla. Njegova je struktura složena i visokoporozna, hrapave površine što pomaže pri integraciji s biološkim tkivom. Rezultati su pokazali da uzorak BG-1ALG sadrži najdeblju polimernu prevlaku, što ukazuje na optimalnu koncentraciju alginata za postizanje najbolje adhezije mikrosfera. Zaključeno je da je uzorak BG-1ALG-10SF najpovoljniji, kombinirajući adekvatnu količinu sfera i visokoporoznu strukturu, što ga čini pogodnim za primjenu u medicini.

Ključne riječi: bioaktivno staklo, kompozitni porozni materijali, trodimenzionalni nosač, mikrosfere, kitozan

SUMMARY

Preparation of composite porous materials based on bioactive glass and biodegradable polymer

Composite porous materials combine different components in order to achieve enhanced properties that exceed the capabilities of individual materials. Composites containing bioactive glass and biodegradable polymers are of particular interest due to their ability to simultaneously provide structural support, stimulate tissue regeneration and gradually degrade within the body. Because of its biocompatibility and ability to interact with biological tissue, bioactive glass is widely used in regenerative medicine, especially in the form of a three-dimensional scaffold for tissue engineering.

The objective of this thesis is to prepare composite three-dimensional scaffolds using a highly porous matrix composed of bioglass and chitosan-based spheres. Such scaffolds are prepared using the foam replica method. The primary task was to find suitable procedures and optimal parameters to successfully stick the spheres onto the three-dimensional glass matrix. Previous research has confirmed the optimal parameters for the synthesis of microspheres using the electrospraying method. To impregnate the spheres on to the scaffold, suspensions with 5% or 10% of the sphere mass per volume of solvent are prepared. A sodium alginate solution of 0.5, 1 and 2 w/v % was prepared for glueing the spheres to the scaffold.

The effectiveness of the process was evaluated by the loss of mass after annealing and through SEM analysis. The stability of the bioactive glass scaffold was confirmed. Its structure is complex and highly porous, with a rough surface that facilitates integration with biological tissue. The results showed that sample BG-1ALG contains the thickest polymer coating, which indicates the optimal concentration of alginate to achieve the best adhesion of microspheres. It was concluded that the sample BG-1ALG-10SF is the most effective, combining an adequate amount of spheres and a highly porous structure, which makes it suitable for medical applications.

Keywords: bioactive glass, composite porous materials, three-dimensional scaffold, microspheres, chitosan

TABLICA SADRŽAJA

1.	UVOD	1
2.	OPĆI DIO.....	2
2.1.	Kompozitni porozni materijali	2
2.1.1.	Kompozitni materijali	2
2.1.2.	Porozni materijali	3
2.2.	Bioaktivno staklo.....	4
2.2.1.	Razvoj bioaktivnog stakla	4
2.2.2.	Sastav bioaktivnog stakla	6
2.2.3.	Svojstva bioaktivnog stakla.....	9
2.2.4.	Primjena bioaktivnog stakla	13
2.3.	Mikrosfere	16
2.3.1.	Svojstva mikrosfera.....	17
2.3.2.	Metode pripreme mikrosfera	17
2.4.	Biorazgradljivi polimeri	19
2.4.1.	Kitozan	20
2.4.2.	Natrijev alginat	23
2.5.	Skenirajući elektronski mikroskop (SEM).....	25
2.5.1.	Dijelovi SEM-a	25
2.5.2.	Princip rada SEM-a	28
2.5.3.	Prednosti SEM-a	29
3.	EKSPERIMENTALNI DIO.....	30
3.1.	Materijali	31
3.2.	Priprema kompozitnih mikrosfera na temelju kompleksa kitozan-bakar.....	33
3.2.1.	Priprema otopina	33
3.2.2.	Priprema mikrosfera metodom elektroštrcanja	33
3.3.	Priprema nosača	35
3.4.	Impregnacija sfera na nosač	37
3.4.1.	Priprema Na-alginata:	38
3.4.2.	Priprema kontrolnog uzorka:.....	38
3.4.3.	Priprema uzoraka sa sferama:.....	39
4.	REZULTATI I RASPRAVA	41
5.	ZAKLJUČAK	52
6.	LITERATURA.....	53

1. UVOD

Posljednjih desetljeća razvoj novih materijala u biomedicini, posebice regenerativnoj medicini i tkivnom inženjerstvu, privlači velik interes istraživača. Napredak u znanosti o materijalima omogućio je stvaranje kompozitnih poroznih materijala koji kombiniraju prednosti različitih komponenata pružajući nove mogućnosti za liječenje i obnovu oštećenih tkiva. Kompozitni porozni materijali na temelju bioaktivnog stakla i biorazgradljivog polimera privukli su veliku pozornost zbog svojih jedinstvenih svojstava i širokog spektra primjene.

U kontekstu poroznih materijala poroznost omogućuje učinkovitu izmjenu hranjivih tvari i otpada te potiče vaskularizaciju unutar implantata, što je ključno za regeneraciju tkiva. Porozni materijali također pružaju dodatnu površinu za adheziju stanica i integraciju s okolnim tkivom. Bioaktivno staklo, razvijeno 1969. godine, postalo je jedan od najznačajnijih materijala u biomedicinskim primjenama zbog svoje sposobnosti da potiče regeneraciju kostiju i mekog tkiva. Njegov kemijski sastav omogućava stvaranje površinskog sloja hidroksiapatita kada dođe u kontakt s tjelesnim tekućinama, što rezultira čvrstim vezivanjem s kostima. Kitozan, derivat hitina, pokazuje izvrsna svojstva u pogledu biokompatibilnosti, biorazgradljivosti i antimikrobne aktivnosti. Natrijev alginat, prirodni polisaharid, koristi se zbog svoje sposobnosti formiranja hidrogelova u prisutnosti dvovalentnih kationa, što ga čini idealnim za primjenu u sustavima kontrolirane dostave lijekova i tkivnom inženjerstvu.

Važnost ovog istraživanja leži u potencijalu ovih materijala da riješe ključne izazove u regenerativnoj medicini. Naime, kombinacija bioaktivnog stakla i biorazgradljivih polimera omogućava kontrolirano i produženo otpuštanje iona za terapijsko angiogeno i antitumorsko djelovanje, što je ključno za uspješan ishod terapije. U ovom će se radu analizirati i utjecaj različitih koncentracija natrijevog alginata na adheziju mikrosfera za nosač, koristeći skenirajući elektronski mikroskop (SEM) za procjenu morfologije i uspješnosti sinteze. Postignuti rezultati mogli bi poslužiti za daljnji razvoj novih generacija biomaterijala, koji ne samo da zadovoljavaju zahtjeve biokompatibilnosti i biorazgradljivosti, već i aktivno potiču regeneraciju tkiva, pružajući tako novu nadu za pacijente s kompleksnim ozljedama ili bolestima.

2. OPĆI DIO

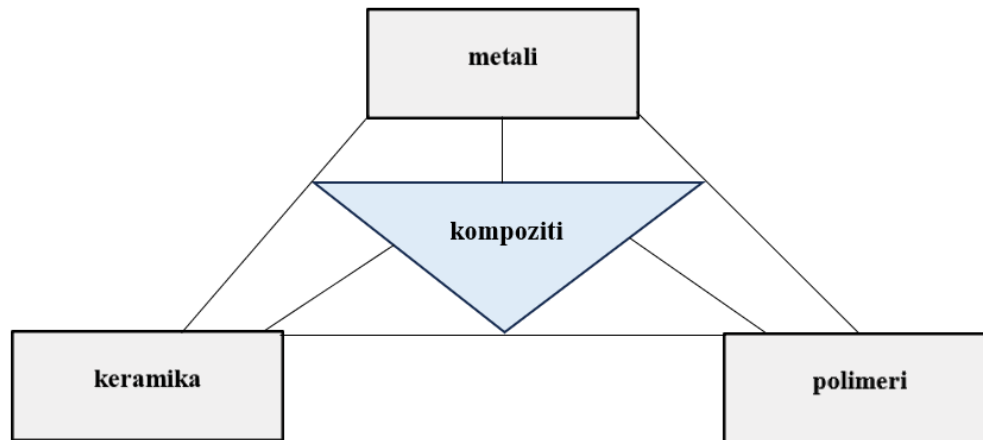
2.1. Kompozitni porozni materijali

U naslovu samog rada spomenuta je priprava kompozitnih poroznih materijala što otvara pitanje što su to kompozitni porozni materijali. Kako bi se pobliže opisali materijali o kojima je ovdje riječ slijedi kratki pregled toga što su to kompozitni, a što su porozni materijali.

2.1.1. Kompozitni materijali

Materijal se može definirati kao čvrsta tvar koja ima masu i zauzima prostor. Kako bi neka tvar bila materijal ona mora posjedovati jedno ili više specifičnih svojstava koja ju čine uporabljivom, npr. električna vodljivost ili otpornost na koroziju. Materijali su svuda oko nas. Neizbježan su dio svakodnevice i osnova su ljudskog postojanja. Neprestani porast značaja materijala uzrokuje pojavu nove interdisciplinarnosti poznate kao *Znanost o materijalima*. Ona nastoji otkriti prirodu samog materijala, pružiti opis materijala, te pobliže objasniti vezu sastava, strukture i svojstava materijala. [1] Materijali su se ranije svrstavali u tri osnovne skupine: metali, nemetali i polimeri, a danas se tom nizu dodaje i četvrta osnovna skupina: kompoziti. Shematski prikaz kompozitnih materijala u odnosu na klasične materijale nalazi se na *Slici 1*. Kompozitnim materijalima ili kompozitima smatramo posebne kombinacije najmanje dvaju osnovnih materijala različitih svojstava koja zajedno daju materijal boljih svojstava. [2] Znanost o materijalima definira kompozitne materijale isključivo kao višefazne materijale u kojima kontinuirana faza, *matrica*, okružuje jednu ili više diskontinuiranih faza, *punila*, s jasnom izraženom granicom među njima. Tako se u kompozitne materijale može ubrojiti beton ili asfalt, a i prirodni materijali su vrlo često kompozitni – npr. drvo ili ljuštore mekušaca i rakova. [3] Oni se proizvode kako bi se poboljšala postojeća svojstva materijala, te kako bi se postigla nova svojstva kakva pojedina sastavnica ne posjeduje. Na primjer, dodatkom punila određenom materijalu može se povećati čvrstoća, žilavost ili smanjiti propusnost za plinove. Proizvodnja kompozitnih materijala seže do samih početaka ljudske povijesti. Smatra se kako suvremena era kompozitnih tehničkih materijala započinje pojavom polimera ojačanih staklenim vlaknima (engl. *fiber*

reinforced plastics - FRP) koji se široko primjenjuju za izradu trupa čamaca. Kompozitni materijali su najstariji konstrukcijski materijali. [1,2]



Slika 1. Vrste materijala. [2]

Primjena kompozitnih materijala je izuzetno široka. Oni se primjenjuju u područjima građevinarstva (zgrade i mostovi), automobilske industrije (karoserija automobila), aeronautike (zahtjev za materijalima visoke čvrstoće i niske gustoće), za proizvodnju stambenih i industrijskih dijelova, te u medicini. Kako bi se maksimalno unaprijedilo zdravlje ljudi i životni standard primjenjuju se i kompozitni biomaterijali koji mogu poprimiti različite oblike i svojstva i samim time omogućuju širok spektar primjene u medicini. [1]

2.1.2. Porozni materijali

Porozni materijali, kako im samo ime govori, materijali su koji imaju pore, odnosno sadrže šupljine, međuprostore i kanaliće. Porozni materijali nalaze svoju primjenu u znanosti i industriji zbog svojih jedinstvenih svojstava i strukture. Prisutnost i distribucija pora u materijalu određuje njegova mehanička, termička i kemijska svojstva. Ukoliko se kruti materijal učini poroznim on može dobiti potpuno nova, primjenski korisnija svojstva. [4]

Svojstva koja su zajednička svim poroznim materijalima su relativno niska gustoća, velika specifična površina, velika specifična čvrstoća, mala termička vodljivost i dobra apsorpcija energije u usporedbi sa ostalim materijalima. Karakteristike poroznih materijala ovise o veličini i rasporedu pora, sastavu materijala i poroznosti. Poroznost se može definirati kao omjer ukupnog volumena pora u odnosu na volumen materijala, te ima značajan utjecaj na svojstva materijala i njegovu primjenu. [4]

2.2. Bioaktivno staklo

2.2.1. Razvoj bioaktivnog stakla

Bioaktivno staklo pripada skupini biomaterijala, odnosno materijala koji stupaju u interakciju s biološkim sustavima kao što su tkiva, organi i slično. Biomaterijali mogu biti prirodnog ili umjetnog porijekla, a koriste se za zamjenu ili poboljšanje funkcija živih tkiva. Bioaktivno staklo prvi je sintetski biomaterijal koji se lako veže za koštano tkivo. S vremenom se razgrađuje i potiče proliferaciju koštanih stanica, što doprinosi osteogenezi i angiogenezi. Prilikom interakcije s kosti formiraju se toliko jake veze da se staklo ne bi moglo ukloniti bez lomljenja kosti. Također, osim što se lako veže za kost, ono stimulira i rast kosti izvan površine implantata. [5]

Prvi značajan korak u razvoju bioaktivnog stakla napravio je prof. Larry Hench koji je sintetizirao bioaktivno staklo 1969. godine. On je započeo s istraživanjem materijala koji bi mogli potaknuti regeneraciju koštanog tkiva, a ideja koja je dovela do razvoja bioaktivnog stakla proizašla je iz neočekivanog razgovora tijekom vožnje autobusom na konferenciju za vojne materijale. Pukovnik američke vojske iznio je prof. Larry HENCHU izazove s kojima se suočavaju u liječenju ozljeda vojnika na bojištu. Njegova jednostavna sugestija: „*Zašto ne biste napravili keramičku kost koja neće biti odbačena od strane ljudskog tijela?*” potaknula je raspravu koja je dovela do angažmana stručnjaka iz različitih područja i u konačnici razvoja ovog inovativnog biomaterijala. [6]

Prvo sintetizirano bioaktivno staklo poznato je pod nazivom 45S5 Bioglass[®] i odlikuje ga izvrsna biokompatibilnost. Ovakav materijal organizam prepoznaje kao vlastito, a ne strano tijelo. Dio naziva „45S” odnosi se na postotak SiO₂, kojega ima 45%, dok broj 5 u nazivu predstavlja omjer atomske težine Ca/P u staklu. Tijekom godina istražene su i razne druge formulacije, no prva se pokazala kao najuspješnija. Sastavi koji sadrže 45-55% SiO₂ pokazuju zadovoljavajuća svojstva povezivanja s mekim vezivnim tkivima. Prilikom povećanja postotka silicija u staklu na 60% više ne dolazi do povezivanja s kostima.

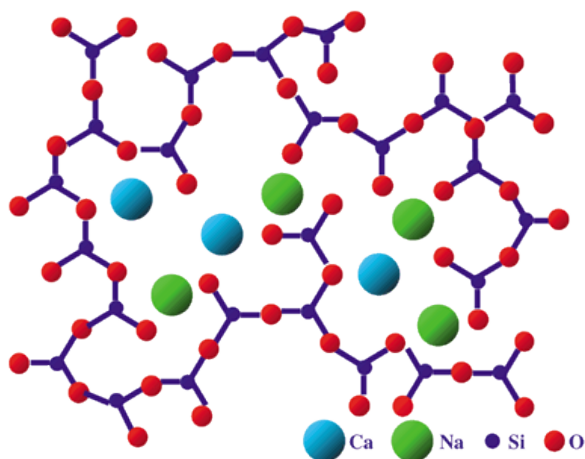
Tijekom 1970-ih godina provedena su opsežna *in vivo* i *in vitro* testiranja koja su pokazala da biostaklo 45S5 može stimulirati rast kosti i potaknuti stvaranje hidroksiapatitnog sloja na svojoj površini. Ranih 1980-ih započinje klinička primjena, posebno u ortopediji i stomatologiji. Prva uspješna primjena bila je u popravku kostiju lica i vilice. Tijekom narednih desetljeća istraživanja se fokusiraju na optimizaciju sastava i strukture bioaktivnog stakla kako bi se unaprijedile njegove mehaničke karakteristike i biokompatibilnost. Pojavljuju se nove formulacije bioaktivnog stakla različitog omjera sastojaka i sa dopunama poput srebra i cinka koji imaju antimikrobna svojstva. Napredak u proizvodnoj tehnologiji dovodi do proizvodnje bioaktivnog stakla boljih svojstava na mikro i nano razini, te omogućuje stvaranje poroznih struktura koje bolje oponašaju prirodnu kost. Nedavno su se razvili i kompozitni materijali koji kombiniraju bioaktivno staklo s polimerima i drugim biokompatibilnim materijalima kako bi stvorili implantant s boljim mehaničkim i biološkim svojstvima. Danas se istraživanja i dalje nastavljaju s ciljem poboljšanja bioaktivnosti, mehaničkih svojstava, prilagodbe specifičnim kliničkim potrebama, te širenja primjene bioaktivnog stakla u regenerativnoj medicini. [6,7]

2.2.2. Sastav bioaktivnog stakla

Bioaktivna stakla smatraju se skupinom reaktivnih materijala s atraktivnim svojstvima, ne samo u smislu biokompatibilnosti, već i bioaktivnosti, odnosno ona pokazuju sposobnost stvaranja veza s mineraliziranim koštanim tkivom u staničnom okruženju. Naziv Bioglass® zaštićen je naziv od strane Sveučilišta u Floridi kao ime za originalnu formulaciju 45S5, stoga se koristeći izraz biostaklo misli na upravo tu formulaciju. Formulacija biostakla prikazana je u **Tablici 1**, dok je njegova molekulska struktura prikazana na **Slici 2**. Ono se sastoji od 45% SiO₂, 24,5% Na₂O, 24,5% CaO, te 6% P₂O₅ (mas %). [6]

Tablica 1. Sastav bioaktivnog stakla formulacije 45S5. [6]

Sastav 45S5 biostaklo (mas. %)	
SiO ₂	45
Na ₂ O	24,5
CaO	24,5
P ₂ O ₅	6



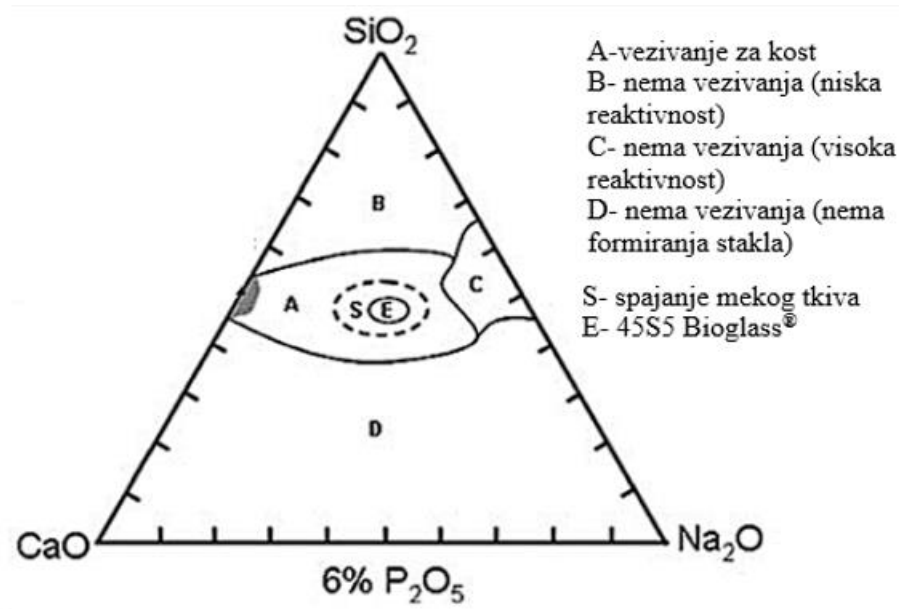
Slika 2. Molekulska struktura bioaktivnog stakla. [8]

Biostaklo je silikatno staklo, tako karakterizirano zbog visokog udjela silicija, odnosno silicijevog dioksida koji je osnova staklene mreže. Njegova osnovna jedinica je SiO_4 tetraedar sa silicijevim atomom u sredini i atomima kisika u svakom kutu. Svaka jedinica veže do četiri atoma kisika koji omogućuju formiranje 3D mreže i povezuje se međusobno pomoću veznih kisika, odnosno siloksanskim vezama $-\text{Si}-\text{O}-\text{Si}-$. U čistim silikatnim staklima svaki atom kisika je vezni kisik. Ukoliko su prisutni modifikatori veze, najčešće su to oksidi alkalijskih i zemnoalkalijskih elemenata, neke veze su prekinute, što je vidljivo na *Slici 2*. [8]

Silicij je važan u procesu stvaranja hidroksiapatita, minerala bitnog za regeneraciju kostiju. Oksidi natrija i kalcija modificirajući su oksidi koji mijenjaju strukturu i reaktivnost stakla tako što stvaraju nevezujuće kisikove veze i omogućuju promjene u biološkoj interakciji materijala s okolinom. U biostaklu je visok udio modifikatora mreže, veća je koncentracija nevezanih kisika što dovodi do depolimerizacije staklene mreže i stvaranja nesilikatnih jedinica. Veći udio nevezanih kisika smanjuje viskoznost stakla i omogućuje formiranje hidroksiapatitnog sloja kada staklo dođe u interakciju sa staničnom tekućinom. Natrijev oksid kontrolira brzinu oslobađanja iona koji stimuliraju biološke procese. Kalcijev oksid je ključan za formiranje hidroksiapatita i ima važnu ulogu u mineralizaciji kostiju. Fosfor pentoksid je neophodan za stvaranje fosfatnih grupa koje sudjeluju u formiranju hidroksiapatita. [5,6]

Ovi sastojci sa svojim točno određenim udjelima omogućuju biostaklu poticanje rasta koštanog tkiva. Osim toga, omogućena je i bioaktivnost jer specifični udjeli omogućuju kontrolirano otpuštanje iona poput silicija, kalcija, fosfora i natrija. U nekim slučajevima, biostaklo može osigurati i mehaničku potporu do početka zacjeljivanja koštanog defekta. [5,6]

Testirane su i varijacije udjela sastojaka biostakla. Korištenje većeg udjela silicijevog dioksida rezultira smanjenjem ili gubitkom bioaktivnosti. Formira se stabilnija staklena mreža koja je manje reaktivna, ioni se sporije otpuštaju i teže se formira hidroksiapatit. Manji udjeli silicijevog dioksida povećavaju bioaktivnost, ali je staklena mreža manje stabilna i brže se oslobađaju ioni, te se brže formira hidroksiapatit, što posljedično može dovesti do gubitka željene strukture prije nego dođe do potpune regeneracije tkiva. Kada je udio silicijevog dioksida $>60\%$ više ne dolazi do vezivanja s kosti. [8] Na *Slici 3* nalazi se trokutasti dijagram bioaktivnih granica koji prikazuje gdje se nalaze granice vezivanja biostakla za kost ovisno o njegovom sastavu. [6]



Slika 3. Dijagram sastava za spajanje s kosti i mekim tkivom. U regiji S bioaktivna stakla se vežu za kosti i meka tkiva, te dolazi do aktivacije gena. [6]

Na dijagramu je vidljiv odnos između tri glavne komponente biostakla: SiO₂, CaO i Na₂O. Ovaj dijagram pomaže u razumijevanju kako različiti udjeli komponenti mogu utjecati na bioaktivnost stakla. Na vrhu dijagrama prikazan je SiO₂. Visok udio SiO₂ povećava stabilnost stakla, ali smanjuje njegovu bioaktivnost. U lijevom vrhu nalazi se CaO koji je ključan za formiranje hidroksiapatita i povećavanje bioaktivnosti. U sljedećem se vrhu nalazi Na₂O koji smanjuje viskoznost stakla i kontrolira brzinu otpuštanja iona. U unutrašnjosti samog dijagrama prikazane su različite kombinacije ovih oksida od kojih svaka točka predstavlja specifičan sastav stakla. Prostor unutar dijagrama podijeljen je u regije različite bioaktivnosti. Regija A odnosi se na granicu u kojoj dolazi do vezivanja za kost unutar trideset dana ili manje. U regiji B ne dolazi do vezivanja, reaktivnost je preniska, odnosno sastav ne omogućava dovoljno brzo i značajno oslobađanje iona Ca²⁺ i PO₄³⁻, zbog čega ovakvi materijali ne uspijevaju inicirati i podržati formiranje sloja hidroksiapatita što je ključno za vezanje sa koštanim tkivom. U regiji C ne dolazi do povezivanja jer je reaktivnost previsoka, dok u regiji D ne dolazi do vezivanja jer se ne formira staklo zbog niskog udjela SiO₂. Optimalni sastav stakla ključan je kako bi se postigla željena bioaktivnost. Također, bioaktivno staklo treba imati sastav koji omogućuje kontrolirano otpuštanje iona, odnosno željenu interakciju sa staničnom tekućinom. [6]

2.2.3. Svojstva bioaktivnog stakla

Biostaklo ima izuzetnu sposobnost vezivanja za kost i poticanja formiranja nove kosti, odnosno okoštavanja. Ovaj fenomen poticanja stvaranja nove kosti prva je dokumentirala dr. June Wilson Hench kod ugradnje biostakla u koštani defekt vilice majmuna. [6] Proces započinje osteokondukcijom, odnosno stvaranjem nove kosti duž površine kosti domaćina. Zatim se razvija meko tkivo i naposljetku nova kost stvara poveznicu između bioaktivnog stakla i kosti, što je poznato kao osteoprodukcija.

Kao što je i ranije spomenuto, bioaktivnost je jedno od najvažnijih svojstava bioaktivnog stakla. Osim toga, pod karakteristična svojstva ubrajaju se još i biokompatibilnost, antimikrobna svojstva, osteokonduktivnost, resorptivnost, kemijska otpornost. Neka bioaktivna stakla imaju antimikrobne osobine jer oslobađaju ione koji inhibiraju rast bakterija. Osteokonduktivnost se odnosi na sposobnost omogućavanja rasta koštanih stanica na svojoj površini, podržavajući tako regeneraciju kostiju. [9]

Neka bioaktivna stakla mogu biti resorptivna što znači da se postepeno razgrađuju i bivaju zamijenjena prirodnim tkivom. Također, ovisno o primjeni, sastav bioaktivnog stakla može biti modificiran kako bi se prilagodila njegova mehanička svojstva. Može se pronaći u obliku granula, praha, vlakana ili kao dio kompozitnih materijala. Kemijska otpornost je također jedno od važnih svojstava koja mu omogućuje odupiranje na kemijske promjene u staničnoj tekućini, što ga čini pogodnim za implantacije. Bioaktivnost se odnosi na formiranje sloja hidroksiapatita koji omogućuje vezanje sa koštanim tkivom, dok biokompatibilnost znači da unutar tijela ne izaziva imunološki odgovor, stoga se dobro integrira sa živim tkivom bez izazivanja upale ili odbacivanja. Bioaktivno staklo je amorfno, što znači da nema dugoročnu kristalnu strukturu. Ovo svojstvo omogućuje kontrolirano otapanje i interakciju s biološkim tkivima. Ima kontroliranu topljivost u tjelesnim tekućinama, što omogućuje postupno otpuštanje iona koji potiču regeneraciju tkiva. [9]

2.2.3.1. Kako i zašto dolazi do vezivanja bioaktivnog stakla za kost?

Proces vezanja bioaktivnog stakla za kost može se podijeliti na više koraka prikazanih u **Tablici 2**. Prvih pet koraka odvija se na samoj površini stakla, a cijeli proces započinje kada bioaktivno staklo dođe u kontakt sa staničnom tekućinom. Tada dolazi do brze ionske izmjene natrijevih iona s vodikovim i hidronijevim ionima, što uzrokuje povećanje pH vrijednosti u neposrednoj blizini površine i stvaranje visoke koncentracije silanola (Si-OH) na površini stakla. [6]

Ubrzo nakon toga slijedi kondenzacijska reakcija kojom se stvaraju siloksanske veze (Si-O-Si) i stvara se površina gelaste strukture bogata silicijem. Također, dolazi do oslobađanja topljivog silicijevog dioksida, te kalcijevih i fosfatnih iona u staničnu tekućinu. Hidratizirani kalcijevi ioni se talože na površini silika gela i reagiraju s fosfatom i karbonatnim ionima te dolazi do stvaranja sloja hidroksikarbonatnog apatita (HCA) na površini. HCA je ekvivalent mineralu kosti i jednako je biološki aktivan. [6,9]

Sloj HCA stupa u interakciju s kolagenskim vlaknima oštećene kosti i stvara vezu. Koštane stanice koje sintetiziraju koštano tkivo, poznate pod nazivom osteoblasti, proizvode kolagenska vlakna, velike proteine nalik užetu, te se povezuju s HCA mijenjajući se u zrelu koštanu stanicu poznatu i kao osteocit, koja više nije sposobna za diobu. Osteocit ima dug životni vijek i hrani se nutrijentima dobivenih difuzijom iz malih kapilara. Ionski produkti otapanja bioaktivnog stakla, poput kalcijevih i silicijevih iona, igraju važnu ulogu u stimulaciji stanične aktivnosti, odnosno potiču proliferaciju i diferencijaciju osteoblasta što dodatno pomaže u procesu formiranja nove kosti. [6,9]

Tablica 2. Koraci u procesu vezivanja bioaktivnog stakla za kost. [6]

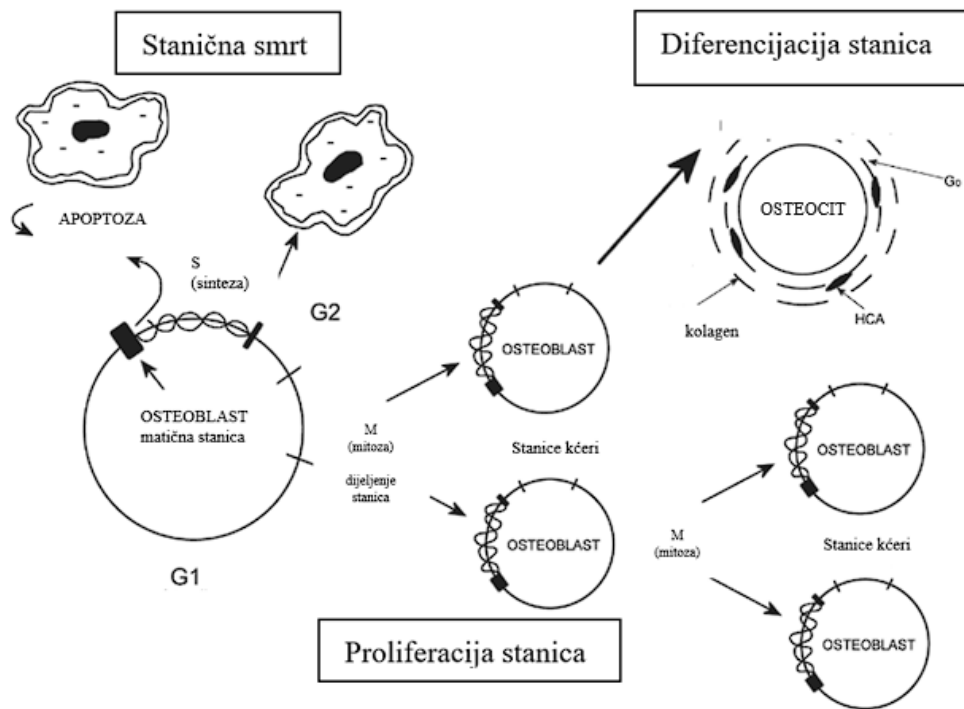
Vrijeme (sati)	12	Rast kosti (osteociti)
	11	Kristalizacija matriksa
	10	Generiranje matriksa
	9	Sinkronizirana proliferacija i diferencijacija osteoblasta
	8	Pričvršćivanje matičnih stanica osteoblasta
	7	Djelovanje makrofaga
	6	Adsorpcija bioloških slojeva u sloju HCA
	5	Kristalizacija sloja hidroksilkarbonatnog apatita (HCA)
	4	Adsorpcija $\text{Ca} + \text{PO}_4 + \text{CO}_3$
	3	Polikondenzacija $\text{SiOH} + \text{SiOH} \rightarrow \text{Si-O-Si}$ sloj gela
	1 i 2	Formiranje SiOH veza, otpušanje Si(OH)_4 i Ca
Bioaktivno staklo		

Kinetika odvijanja prvih pet koraka ovog procesa uvjetuje sljedeće korake. Naime, ukoliko se prvih pet koraka odvije prebrzo tada se staklo otapa i postaje toksično za stanice. S druge strane, ukoliko su koraci prespori tada ne dolazi do rasta novih koštanih stanica. Do povezivanja s kosti dolazi samo kada je brzina svih koraka, odnosno reakcija koje se odvijaju, sinkronizirana sa staničnim ciklusima. Optimalna brzina reakcija odgovara brzini stanične proliferacije i diferencijacije. [6,8]

Nakon odgovora na pitanje kako dolazi do vezivanja bioaktivnog stakla i kosti slijedi pitanje zašto do toga uopće dolazi. Za odgovor na to pitanje potrebno je promotriti životni ciklus koštane stanice. Kost je izgrađena od koštanog tkiva koga tvore tvrda međustanična mineralizirana tvar ili koštani matriks, te od tri vrste stanica: osteociti koji se nalaze u šupljinama koštanog tkiva i tvore većinu stanica, osteoblasti koji stvaraju organski dio koštanog tkiva, te osteoklasti koji sudjeluju u razgradnji koštanog tkiva. Koštano tkivo sadrži mnogobrojne mikroskopske kanaliće kojima osigurava prehranjivanje svake stanice. Osteoblasti stvaraju organski dio koštanog tkiva, a kada se u takvu matricu ugrade minerali, osteoblasti postaju osteocitima, odnosno zrele stanice

koštanog tkiva. Koštano tkivo nastaje djelovanjem osteoblasta koji sintetiziraju osteoid, organski dio međustanične tvari. Osteoid se pritom mineralizira pomoću kalcija i fosfora. Tijekom rasta kosti povećava se njezin volumen, te se novo stvorena kost oblikuje stvarajući određenu građu kosti. Stoga usporedno s izgradnjom kosti dolazi i do razgradnje odnosno resorpcije djelovanjem osteoklasta. [10]

Nakon što je koštana stanica umotana u mineraliziranu kolagensku matricu obično nastavlja dugo živjeti kao osteocit. Ako je osteocit oštećen, npr. dolazi do puknuća kosti, tada se kost ne može sama popraviti. Na mjesto popravka kapilare donose nove matične stanice. [10] Shematski prikaz životnog ciklusa koštane stanice nalazi se na *Slici 4*. Popravak oštećene kosti može se odvijati u tri smjera. Ako je biokemijsko i biomehaničko okruženje povoljno tada će stanica prijeći iz svoje normalne faze rasta, takozvane faze *G*, u fazu u kojoj je njegova DNA replicirana, odnosno *S* fazu. U ljudskim se stanicama nalaze brojni proteini koji osiguravaju da stanica može duplicirati svoje kromosome ispravno. Oni se sastoje od *G/S* kontrolne točke. Ako se kontrolna točka ne prijeđe, tada slijedi stanična smrt ili apoptoza. Diobom stanica nastaju dvije stanice kćeri koje imaju ekvivalentan DNA. Kada su biokemijski i biomehanički podražaji dovoljni, geni stanice kćeri započinju proizvodnju velikog broja proteina koji dovode do stvaranja mineralizirane izvanstanične matrice. Novi osteocit se formira i regeneriran je mali segment kosti. Stanice kćeri nastavljaju razmnožavanje diobom stanica dok se ne regeneriraju svi segmenti kosti i povežu zajedno. Kontrolirano otpuštanje silicija i kalcija omogućuje povoljno okruženje za diobu i diferencijaciju koštanih stanica. U kliničkim uvjetima do regeneracije kosti može doći u rasponu od tri do devet mjeseci ovisno o mjestu defekta i vrsti, te o dobi i zdravstvenom stanju bolesnika. [6]



Slika 4. Shematski prikaz životnog ciklusa koštane stanice. [6]

2.2.4. Primjena bioaktivnog stakla

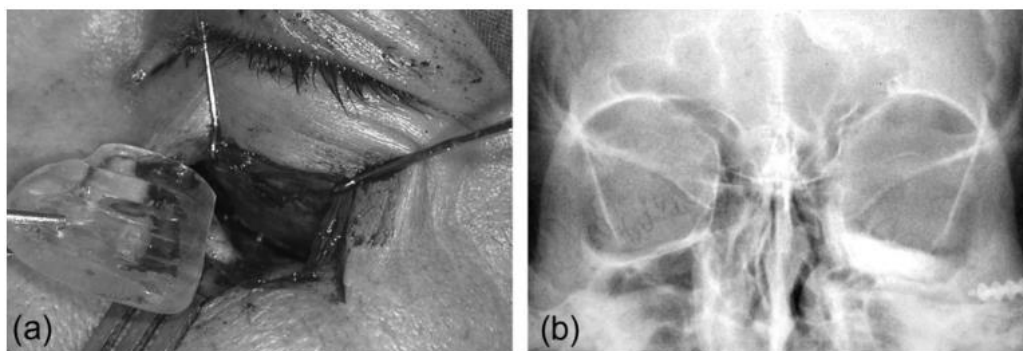
Bioaktivno staklo je revolucionarni materijal sa širokim spektrom primjene u medicini, ortopediji, stomatologiji i tkivnom inženjerstvu. Najvažnija primjena bioaktivnog stakla je regeneracija kostiju, odnosno zacjeljivanje koštanih defekata koji mogu biti urođeni, nastati uslijed traume ili bolesti, npr. osteoporoza ili kod rekonstrukcija nakon tumora. Trenutno je najprimjenivaniji postupak kod operacije koštanih defekata autotransplantacija, odnosno presađivanje kosti iz drugog dijela tijela na mjesto defekta. Nedostatak ovog postupka je ograničena opskrba kosti i jaka bol na mjestu odakle je kost uzeta. U svijetu se godišnje provede nekoliko milijuna operacija presađivanja kosti stoga je bilo potrebno razviti alternativu za liječenje koštanih defekata. [11]

Zahvaljujući svojim bioaktivnim svojstvima bioaktivno staklo može biti korišteno kao nosač za rast novih stanica i tkiva. Porozna struktura bioaktivnog stakla slična je strukturi same kosti i omogućuje proliferaciju i vaskularizaciju, što je ključno za uspješnu regeneraciju tkiva.

Osim toga, bioaktivno staklo može biti modificirano tako da oslobađa ione koji potiču osteogenezu i angiogenezu. Za regeneraciju kosti koriste se nosači koji djeluju kao trodimenzionalni podložak za usmjeravanje popravka kosti, odnosno rasta nove kosti. U idealnom slučaju dolazi do stimuliranja prirodnih mehanizama regeneracije. Nosači idealni za takvu primjenu bili bi bioaktivni i čvrsti materijali porozne strukture koji nalikuju na spužvastu kost, koja se može oblikovati i utisnuti u koštani defekt. [12]

U stomatologiji, bioaktivno staklo se koristi za liječenje čeljusnih defekata. Najveći komercijalni uspjeh ostvaren je u korištenju biostakla kao sredstvo za popravak zubi pod imenom *NovaMin*[®]. Studije su pokazale kako pasta za zube može mineralizirati sitne šupljine u zubu i tako smanjiti njegovu osjetljivost. Biostaklo nije primjenjivano samo u stomatologiji. Godine 1984. primjenom biostakla vraćen je sluh pacijentu koji je zbog infekcije koja je uzrokovala degradaciju dvije od tri kosti srednjeg uha izgubio sluh. Dizajniran je implantat koji je zamijenio kost za prijenos zvuka od bubnjića do pužnice što je pacijentu omogućilo potpuni oporavak. [13]

Provedena su klinička ispitivanja na trideset pacijenata koji su imali traumu lica na području oko očiju toliko značajnu da su postepeno gubili vid. Korištenjem kompjuterizirane aksijalne tomografije skenirana su mjesta oštećenja i proizvedeni su kalupi za lijevanje implantata od biostakla koji su potom zašiveni na mjesto oštećenja (*Slika 5*). Oporavak pacijenata praćen je narednih pet godina te je zabilježen potpuni pokret očiju, povratak vida i potpuni oporavak izgleda lica. [13]



Slika 5. Primjena bioaktivnog stakla za popravak dijela orbite: (a) umetanje implantata od bioaktivnog stakla ispod oka, (b) post-operativni RTG, prikazuje kako je implantat regenerirao orbitu. [13]

Ortopedi i stomatolozi najčešće primjenjuju čestice ili granule stakla jer se lako mogu utisnuti u defekt. Prvi čestični proizvod biostakla 45S5 je *PerioGlas* koji je poznat pod nazivom *NovaBone* i objavljen 1993. kao sintetički koštani graft za popravak defekata nastalih kao posljedica parodontalne bolesti u čeljusti (*Slika 6*). Koristi se za regeneraciju kosti oko korijena zuba ili u popravku kosti u čeljusti tako da kvaliteta kosti postane pogodna za ugradnju titanijevih implantata. *NovaBone* je korištena i kod operacije za liječenje adolescentske idiopatske skolioze. Skupina od 88 pacijenata podijeljena je na 40 pacijenata koji su dobili autotransplantat, a 48 *NovaBone*. U razdoblju od 4 godine nakon operacije *NovaBone* prikazuje 3% manje infekcija i 5,5% manje mehaničkih kvarova. [13]

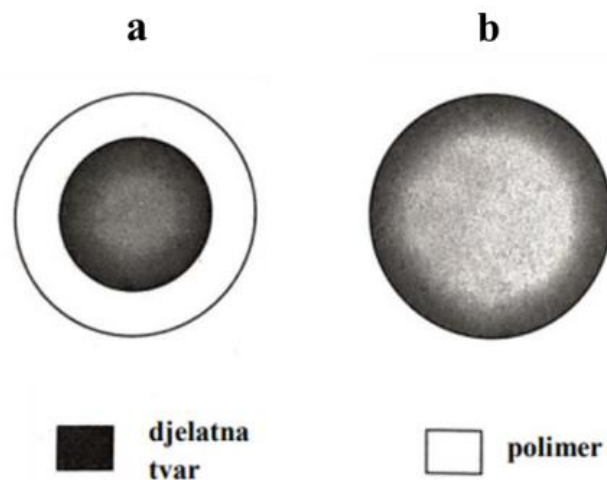


Slika 6. Lijevo je prikazano pakiranje NovaBone koštanog grafta, a lijevo je prikazan SEM čestica NovaBone na skali od 200 μm . [13]

Navedeni primjeri primjene bioaktivnog stakla jasno pokazuju kako ono može značajno unaprijediti tretmane u različitim granama medicine, pružajući efikasna rješenja za regeneraciju tkiva i poboljšanje kvalitete života pacijenata. Kombiniranjem ili promjenom udjela glavnih komponenti mogu se dobiti različita bioaktivna stakla koja bi imala različita svojstva ovisno o sastavu kao što je sposobnost stvaranja kostiju, antibakterijska svojstva, razgradnja, regeneracija mekog tkiva ili zacjeljivanje rana. Još jedna obećavajuća primjena je uporaba bioaktivnog stakla napunjenog antivirusima ili lijekovima koji se, kao posljedica razgradnje, oslobađaju tijekom liječenja infekcije kostiju. [14] U eksperimentalnom dijelu ovog rada na nosače od bioaktivnog stakla nanose se kitozanske mikrosfere koje će detaljno biti obrađene u nastavku.

2.3. Mikrosfere

Pod pojmom mikrosfere podrazumijevaju se čestice sferičnog oblika koje imaju promjer 1-1000 μm . Ovisno o načinu raspodjele aktivne komponente u odnosu na matricu razlikuju se još i mikrokapsule. Kod mikrokapsula djelatna tvar nalazi se u jezgri obavijenoj membranom, dok mikrosfere podrazumijevaju otapanje ili suspendiranje djelatne tvari. Pojednostavljeno, osnovna razlika mikrosfera i mikrokapsula je u tome što su mikrokapsule šuplje, dok su mikrosfere pune. Na *Slici 7* prikazan je izgled mikrokapsula i mikrosfera. [16]



Slika 7. Mikrokapsule (a), mikrosfere (b). [15]

Mikrosfere mogu biti izrađene od raznih materijala prirodnog ili sintetskog porijekla, a danas su na tržištu prisutne ponajviše one građene od keramike, stakla ili polimera. Kod polimernih mikrosfera dvije najčešće sintetske vrste su polietilenske i polistirenske. Polietilenske se koriste kao punilo u materijalima, dok se polistirenske primjenjuju u području biomedicine za selektivno djelovanje na različite vrste stanica. S druge strane, za izradu mikrosfera primjena materijala prirodnog porijekla, poput prirodnih polimera, privlači sve veću pozornost znanstvenika. Nekoliko je prednosti korištenja prirodnih polimera, poput biokompatibilnosti, biorazgradljivosti, te dobivanje iz obnovljivih izvora. [16]

2.3.1. Svojstva mikrosfera

Mikrosfere su male, sferične čestice koje zahvaljujući svojoj prilagodljivosti i raznolikosti svojstava nalaze široku primjenu u različitim znanstvenim i industrijskim područjima. Mogu se proizvesti u različitim veličinama, najčešće je to u rasponu od nekoliko nanometara do nekoliko mikrometara. Veličina mikrosfera može utjecati na njihovu funkcionalnost u različitim primjenama, npr. u biomedicini veličina mikrosfera utječe na njihovu sposobnost prodiranja u tkiva i na njihove farmakokinetičke osobine. [17]

Ravnomjerna disperzija i minimalna površinska energija mikrosfera korisna je u primjenama gdje je potrebna homogenost, poput farmaceutskih formulacija ili u materijalima za punjenje. Površina mikrosfera može biti funkcionalizirana različitim kemijskim grupama kako bi se postigla specifična svojstva, poput hidrofilnosti ili hidrofobnosti, što je korisno za ciljanu dostavu lijeka. Ovisno o prirodni korištenog polimera mikrosfere mogu imati širok spektar mehaničkih svojstava, od krutih do elastičnih. Mogućnost modifikacije mehaničkih svojstava doprinosi u primjeni gdje je potrebna otpornost na naprezanja i deformacije, npr. biomedicinski implantati. Polimerne mikrosfere mogu biti dizajnirane da budu biokompatibilne i biorazgradljive, te se koriste za kontrolirano otpuštanje lijekova. [18]

2.3.2. Metode priprave mikrosfera

Kako bi se povećala učinkovitost ugradnje lijekova u polimerne mikrosfere i postigla bolja regulacija oslobađanja terapeutika, potrebno je stvoriti čestice kontrolirane veličine, oblika i distribucije veličine. Istraživanja su pokazala da monodisperzni sustavi omogućuju bolju kontrolu i ponovljivost u kinetici oslobađanja lijekova. Uz monodisperznost, značajnu ulogu u određivanju kinetike oslobađanja lijekova ima i morfologija čestica, koja utječe na način i brzinu razgradnje polimerne matrice. [19]

Tehnika priprave mikrosfera ovisi o primjeni. Moguće je različitim tehnikama proizvesti mikrosfere specifične morfologije, sferičnosti, raspodjele veličina ili ujednačenosti čestica. Načini pripreme mikrosfera mogu biti kemijski ili fizikalno-kemijski od kojih su neki [20]:

- Isparavanje otapala
- Polimerizacija monomera
- Sušenje raspršivanjem
- Emulzijska metoda
- Elektroštrcanje

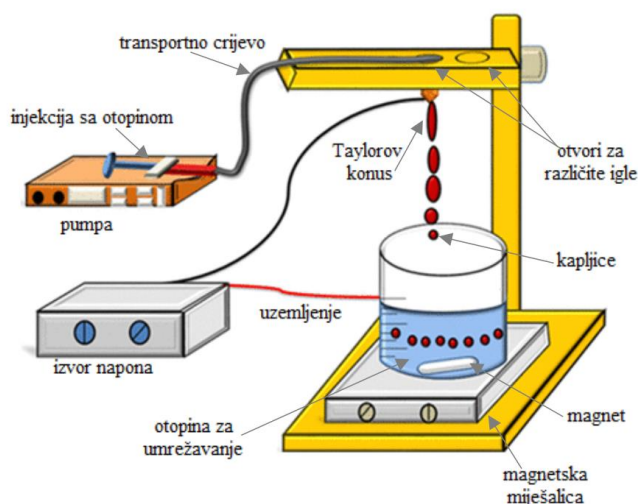
Dizajn mikrosfera mora zadovoljiti nekoliko ključnih kriterija. Prvo, mikrosfere moraju imati sposobnost ugradnje željene koncentracije lijeka kako bi se postigao terapijski učinak. Drugo, potrebno je osigurati stabilnost i dug vijek trajanja mikrosfera nakon sinteze. Treće, važno je imati kontroliranu veličinu i raspodjelu čestica. Četvrto, mikrosfere moraju omogućiti kontrolirano otpuštanje lijeka u odgovarajućem vremenskom rasponu. Konačno, mikrosfere moraju biti biokompatibilne i biorazgradljive. [20]

Važan čimbenik koji ima utjecaj na konačna svojstva mikrosfera jest odabir vrste polimera od koje je mikrosfera izgrađena. Polimer se odabire na temelju fizikalno-kemijskih karakteristika lijeka koji se ugrađuje, te zahtjevima poput brzine ispuštanja lijeka u organizam. [21]

Mikrosfere u ovom radu pripravljene su metodom elektroštrcanja. Metoda elektroštrcanja još je poznata pod nazivom elektrosprejanje ili elektrohodinamička atomizacija (EHDA, engl. *electrohydrodynamic atomization*). Ova metoda je jednostavna, ponovljiva i omogućuje primjenu polimera velike molekulske mase, te dobivanje čestica pogodne morfologije. Dobivene čestice su stabilnije, uže raspodjele veličina čestica, ne dolazi do aglomeracije, te je nanošenje lijeka na njih pogodnije. [22]

Proces elektroštrcanja temelji se na teoriji nabijenih čestica, odnosno na kapljicu je primjenjeno električno polje koje unutar nje izaziva elektrostatsku silu. Ta sila suprotstavlja se kohezivnoj sili unutar kapljice, odnosno površinskoj napetosti. U trenu u kojem elektrostatska sila nadvlada kohezivnu dolazi do raspada kapljice na manje čestice čija je veličina na mikrometerskoj ili nanometerskoj skali. Nastale kapljice su uske raspodjele veličina i zbog Coulombovog odbijanja naboja se za vrijeme putovanja prema kolektoru ne spajaju. [23]

Aparatura za elektroštrcanje nalazi se na *Slici 8*. Aparatura se sastoji od pumpe, injekcije za otopinu, vodljive kapilare, izvora visokog napona, uzemljenja i kolektora. Kolektor se postavlja na željenu udaljenost od igle i na njemu dolazi do sakupljanja proizvedenih čestica. [24]



Slika 8. Shema aparature za elektroštrcanje. [24]

Mikrosfere korištene u ovom radu pripravljene su metodom elektroštrcanja i izgrađene su od prirodnog polimera kitozana, koji je biokompatibilan i biorazgradljiv polimer. Više o kitozanu, te biorazgradljivim polimerima općenito slijedi u nastavku.

2.4. Biorazgradljivi polimeri

Biorazgradljivi polimeri su polimeri koji se razgrađuju do niskomolekulskih produkata djelovanjem mikroorganizama. Ovaj proces razgradnje dovodi do stvaranja CO_2 i H_2O u prisutnosti kisika, odnosno CO_2 i CH_4 u uvjetima bez kisika, tijekom određenog vremenskog perioda. Biorazgradnja može uključivati i izravan utjecaj enzima te utjecaj različitih okolišnih faktora poput vlage, topline i pH vrijednosti na polimerni materijal. Brzina biorazgradnje ovisi o karakteristikama samog polimera, uključujući njegova svojstva, stupanj kristalnosti i morfologiju. Biorazgradljivi

polimeri su od velikog interesa zbog svoje primjene u medicini, poljoprivredi, ambalaži i industrijama koje teže smanjenju ekološkog otiska. U medicinskim primjenama koriste se za izradu implantata, šavova, sustava za kontrolirano otpuštanje lijekova. [25]

Dijele se na prirodne biorazgradljive polimere (biopolimeri), biopolimere izdvojene izravno iz biomase, polimere sintetizirane od strane mikroorganizama ili genetski modificiranih bakterija, te sintetske biorazgradljive polimere. Prednost biorazgradljivih polimera u odnosu na sintetske polimere je ta što ne zahtijevaju odvojeno prikupljanje, sortiranje i recikliranje. Međutim, ove prednosti su važeće samo ako se biorazgradljivi polimeri nakon korištenja pravilno odlažu u uvjete koji omogućuju njihovu biološku razgradnju, poput kompostiranja. Kombinacija biorazgradljivosti i korištenja obnovljivih izvora za sintezu biorazgradljivih polimera uspostavlja ravnotežu između životnog ciklusa plastike i ciklusa tvari u prirodi. Naime, polimeri se proizvode iz obnovljivih prirodnih izvora, a nakon kompostiranja vraćaju se u okoliš kao kompost, koji služi kao hranjiva tvar za rast novih obnovljivih izvora. [26]

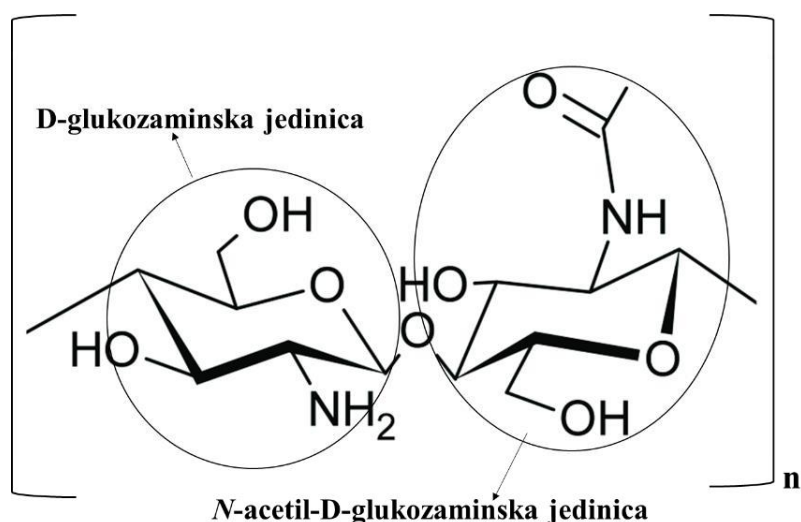
2.4.1. Kitozan

Kitozan je otkrio Rouget 1859. godine dok je kuhao hitin u koncentriranom kalijevom hidroksidu, pri čemu je dobio tvar topljivu u razrijeđenim kiselim otopinama, za razliku od hitina. Ozbiljna istraživanja i primjena kitozana započeli su stotinu godina kasnije, dok je industrijska proizvodnja započela u Japanu oko 1970. godine. Glavni izvori hitina i kitozana povezani su s prehrambenom industrijom u kojoj pronalaze najveću primjenu, posebno u dijetetskim pripravcima za regulaciju tjelesne mase i kolesterola. Danas se mnoge znanstvene studije fokusiraju na ispitivanje svojstava i primjenjivosti kitozana zbog njegove dostupnosti u prirodi i raznolikih svojstava. S obzirom na mogućnosti primjene u raznim industrijskim granama, kitozan, biorazgradljivi polimer, bit će vrlo važan materijal u budućnosti te ga nazivaju biopolimerom 21. stoljeća. [27]

Kitozan je jedan od najčešće korištenih polimera za izradu mikrosfera. On je kationski polisaharid, biokompatibilan, biorazgradljiv, netoksičan biopolimer s antibakterijskim, antifungalnim i hemostatskim svojstvima. Može se dobiti iz hitina, drugog najzastupljenijeg polisaharida, koji je sastavna tvar koja čini vanjski oklop člankonožaca. Njegova biorazgradljivost,

netoksičnost i izvrsna biokompatibilnost čine ga pogodnim za primjenu u biomedicinskoj i farmaceutskoj industriji. [28]

Dobiva se deacetilacijom hitina u alkalnom mediju. Sastoji se od dvije vrste ponavljajućih monomernih jedinica: *N*-acetil-*D*-glukozaminske (acetilirane) i *D*-glukozaminske (deacetilirane) strukturne jedinice. Svaka *D*-glukozaminska jedinica ima jednu amino ($-\text{NH}_2$) i dvije slobodne hidroksilne skupine ($-\text{OH}$). Struktura kitozana prikazana je na *Slici 9*. Zbog slobodnih amino skupina, koje se u kiselim uvjetima mogu protonirati, kitozan nosi pozitivan naboj, što mu omogućuje reakciju s mnogim negativno nabijenim polimerima i keliranje metalnih iona. On je slaba baza koja je netopljiva u vodi i organskim otapalima, ali se otapa u razrijeđenim kiselinama poput octene i mravlje. [29]



Slika 9. Struktura kitozana. [29]

2.4.1.1. Svojstva kitozana

Kitozan je zajednički naziv za sve deacetilirane oblike hitina, koji se međusobno razlikuju po stupnju deacetilacije i molnoj masi. Funkcionalna svojstva kitozana ovise o duljini polimernog lanca te gustoći i raspodjeli naboja. [30]

Molarna masa kitozana može varirati između 50 i 2000 kDa, a stupanj deacetilacije između 40 i 98%. Kitozani s nižim stupnjem deacetilacije (oko 40%) topljivi su u kiselom, neutralnom i alkalnom mediju ($\text{pH} < 9$), dok su kitozani s višim stupnjem deacetilacije (oko 85%) topljivi samo u kiselom mediju ($\text{pH} < 6,5$). Kitozan koji se koristi u prehrambene svrhe obično je deacetiliran između 75-80%, dok se za farmaceutsku industriju koriste kitozani sa stupnjem deacetilacije između 90 i 95%. [30]

Različita svojstva kitozana, poput topljivosti, bubrenja, toplinske stabilnosti i mnogih drugih utječu na svojstva farmaceutskih formulacija baziranih na kitozanu od kojih su ključna svojstva stupanj deacetilacije i molekulska masa. Polimerni materijali s većom molekulskom masom imaju veću viskoznost i manju topljivost, dok manja molekulska masa rezultira boljom biološkom aktivnošću i topljivošću. Tako su i oligosaharidi kitozana s molekulskom masom manjom od 20 kDa topljivi u vodi i pokazuju bolje antifungalne, antibakterijske, antitumorske i antioksidativne osobine. [30]

Stupanj deacetilacije ili skraćeno *DD* (engl. *degree of deacetylation*) označava udio deacetiliranih monomernih jedinica *D*-glukoamina u polimernom lancu. Veći stupanj deacetilacije smanjuje molekulsku masu i povećava topljivost kitozana jer veći broj amino skupina može biti protoniran u kiselom mediju. Kitozani s većim *DD*-om pokazuju bolju antifungalnu i antibakterijsku aktivnost zbog veće gustoće pozitivnog naboja. [31]

Bubrenje je proces apsorpcije otapala do uspostave termodinamičke ravnoteže. Stupanj bubrenja kitozana ovisi o pH vrijednosti otopine i temperaturi. Niže pH vrijednosti i više temperature povećavaju stupanj bubrenja zbog protoniranja amino skupina i disocijacije vodikovih veza. [32] Topljivost kitozana ovisi o stupnju deacetilacije, molekulskoj masi, pH vrijednosti medija, temperaturi i stupnju kristalnosti. U pravilu, kitozan je netopljiv u vodi, ali je topljiv u vodenim otopinama kiselina kada je pH manji od 6 zbog protoniranja amino skupina koje povećavaju unutarmolekulska elektrostatska odbijanja. [32] Viskoznost kitozana ovisi o koncentraciji, temperaturi, pH vrijednosti otopine, molekulskoj masi i stupnju deacetilacije. Povećanjem stupnja deacetilacije i molekulske mase dolazi do porasta viskoznosti. Također, viskoznost se smanjuje s povećanjem temperature i smanjenjem koncentracije. Stupanj kristalnosti polimera utječe na njegovu morfologiju, interakcije i otpornost prema otapalima. Kitozan s manjim

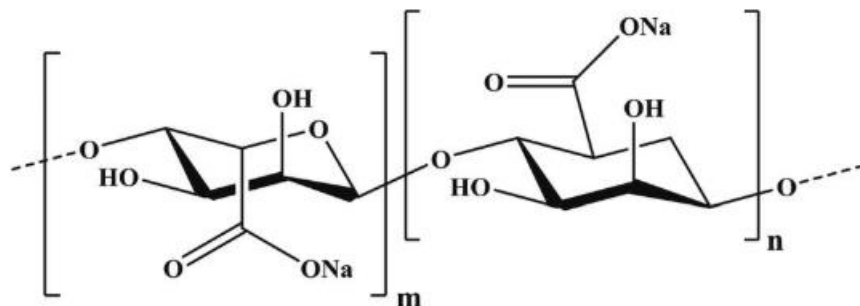
stupnjem kristalnosti ima veću mobilnost polimernih lanaca, što povećava apsorpciju vode i dostupnost amino skupina za modifikacije. [30,32]

2.4.1.2. Kitozanske mikrosfere

Primjena kitozanskih mikrosfera uključuje obradu otpadnih voda uklanjanjem teških metala, regeneraciju tkiva, a ponajviše ima ulogu u biomedicini gdje se nalazi u pretkliničkom i kliničkom razvoju lijeka. Primjena kitozanskih mikrosfera temeljena je na kontroliranoj i ciljanoj isporuci djelatne tvari pri čemu se lijek oslobađa difuzijom iz polimerne matrice ili razgradnjom polimerne matrice. Prednosti korištenja kitozanskih mikrosfera su brojne. Djelovanje samog lijeka je kontinuirano i produženo što smanjuje učestalost primjene novih doza lijeka. Zbog svoje veličine lako se inkapsuliraju ili injektiraju, te imaju poboljšanu biokompatibilnost i bioaktivnost. [28]

2.4.2. Natrijev alginat

Natrijev alginat je prirodni hidrofilni polisaharid koji se dobiva izoliranjem iz smeđih morskih algi. Njegova svojstva opsežno su istražena u području isporuke lijekova zbog biokompatibilne i biorazgradljive prirode. Ovaj spoj ima široku primjenu u prehrambenoj industriji kao zgušnjivač, stabilizator i emulgator, te u medicini kao biomaterijal. Strukturalno, natrijev alginat se sastoji od dugačkih lanaca polisaharida, specifično β -D-manuronske kiseline (*M*-blokovi) i α -L-guluronske kiseline (*G*-blokovi), koje su međusobno povezane 1,4-glikozidnim vezama. [34] Omjer *M*-blokova i *G*-blokova varira ovisno o izvoru alginata, pri čemu visok udio *G*-blokova povećava gelirajuće sposobnosti alginata u prisutnosti kalcijevih iona. U prisutnosti dvovalentnih Ca^{2+} kationa, guluronske kiseline iz obližnjih lanaca stvaraju ionske poprečne veze što rezultira alginatnim hidrogelom. Omjer *M* i *G* jedinica definira fizikalno-kemijska svojstva hidrogela. Struktura natrijevog alginata je linearna i bez grananja, što omogućava formiranje mreža i gelova kada se kombinira s multivalentnim kationima poput kalcija. Kemijska formula natrijevog alginata je $(\text{C}_6\text{H}_7\text{NaO}_6)_n$, gdje "*n*" predstavlja broj ponavljajućih jedinica u polimeru. [35] Strukturna formula natrijevog alginata prikazana je na *Slici 10*.



Slika 10. Strukturna formula natrijevog alginata. [35]

Natrijev alginat je natrijeva sol alginske kiseline, obično se pojavljuje u obliku suhog, zrnastog ili vlaknastog praha. Bez mirisa je, a boja mu može varirati od različitih nijansi žute do smeđe. Netopljiv je u alkoholu, kloroformu, eteru i kiselim vodenim otopinama s pH vrijednosti ispod 3. Kada se otopi u vodi, formira viskoznu, koloidnu otopinu s odličnim svojstvima za stvaranje filma. U kiselom mediju pokazuje visok stupanj bubrenja, dok viskoznost otopine ovisi o temperaturi, molekularnoj masi i prisutnosti polivalentnih metalnih kationa. [36]

Svoju primjenu alginat nalazi u mnogim prehrambenim i biomedicinskim područjima upravo zbog svoje biokompatibilnosti, niske toksičnosti, relativno niske cijene i sposobnosti geliranja. U prehrambenoj industriji, natrijev alginat se koristi kao zgušnjivač, emulgator i stabilizator. Njegova sposobnost da tvori gel u prisutnosti kalcijevih iona omogućava stvaranje željene teksture u proizvodima poput sladoleda, jogurta i umaka. Geliranje je rezultat stvaranja trodimenzionalne mreže koja zarobljava vodu, što pomaže u održavanju stabilnosti i konzistencije proizvoda. Na primjer, u sladoledu, natrijev alginat sprječava stvaranje velikih kristala leda, čineći proizvod glatkim i kremastim. Natrijev alginat ima ključnu ulogu u farmaceutskoj industriji, posebno u razvoju sustava za kontrolirano oslobađanje lijekova. Njegova sposobnost geliranja omogućava stvaranje hidrogelova koji se koriste za inkapsulaciju lijekova, što omogućava kontrolirano otpuštanje aktivnih sastojaka tijekom duljeg vremenskog perioda. Na primjer, u gastrointestinalnom traktu natrijev alginat može formirati zaštitni sloj oko tablete, omogućavajući postupno oslobađanje lijeka kako prolazi kroz probavni sustav. U kozmetici svoju primjenu pronalazi zbog sposobnosti zgušnjavanja i zadržavanja vlage, npr. pomaže zadržati boju ruža na usnama formiranjem mreže gela. Često je sastojak krema, losiona i maski za lice. [37]

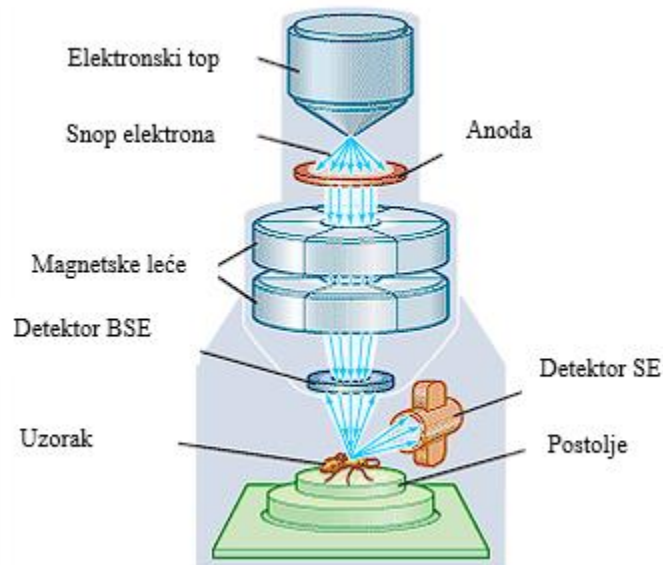
2.5. Skenirajući elektronski mikroskop (SEM)

Skenirajući elektronski mikroskop ili skraćeno SEM vrsta je elektronskog mikroskopa koji prikazuje sliku uzorka skeniranjem površine fokusiranim snopom elektrona. U području mikroskopije SEM je visoko sofisticiran instrument koji omogućuje dobivanje realnog trodimenzionalnog prikaza uzorka visoke razlučivosti reda veličine 10^{-8} m. [38] Ovaj snop elektrona izaziva izbijanje elektrona iz atoma uzorka. Energija elektrona iz snopa proporcionalna je energiji pobuđenih elektrona iz uzorka. Energije tih elektrona se prikupljaju i mjere specijalnim detektorima, a uz pomoć mikroprocesora stvara se pseudotrodimenzijska slika i valne duljine elektrona, karakteristične za elemente prisutne u uzorku. [39]

SEM započinje s primjenom u komercijalne svrhe sredinom 1960-ih godina. Zbog svojih prednosti u usporedbi s drugim mikroskopskim tehnikama ubrzo postaje nezamjenjiv alat znanstvenih i tehnoloških institucija. Najveća prednost SEM-a je rezolucija, odnosno sposobnost prikazivanja vrlo malih objekata. Zatim dubina polja, odnosno sposobnost da objekti različite visine na površini uzorka ostanu u fokusu, te mikroanaliza koja se odnosi na sposobnost analize sastava uzorka. [39]

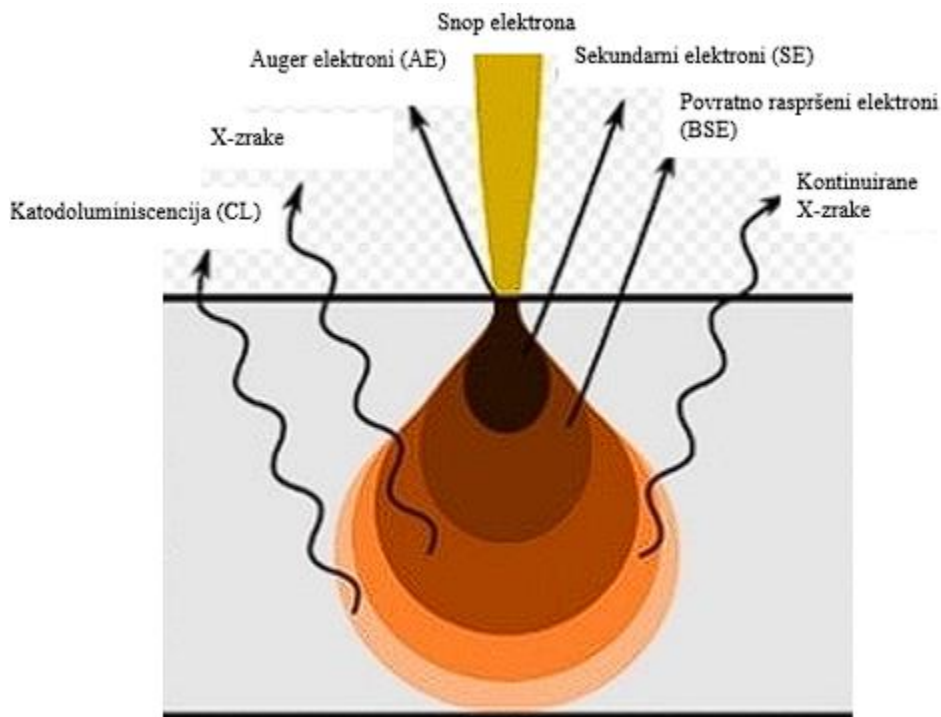
2.5.1. Dijelovi SEM-a

Skenirajući elektronski mikroskop (SEM) sastoji se od nekoliko ključnih komponenti koje omogućavaju precizno skeniranje i analizu uzoraka. Glavni dio SEM uređaja je kolona elektronskog snopa, koja se sastoji od elektron emitera, kondenzatorskih leća i elektromagnetskih leća. Elektron emiter generira elektrone koji se ubrzavaju prema uzorku uz pomoć visokog napona. Kondenzatorske leće fokusiraju elektronski snop, dok elektromagnetske leće dodatno usmjeravaju i fino podešavaju snop kako bi postigle visoku rezoluciju. Dijelovi SEM-a prikazani su na *Slici II*. [40,41]



Slika 11. Shematski prikaz dijelova SEM-a. [42]

Kada elektroni iz snopa udare u površinu uzorka, dolazi do interakcije koja uzrokuje emitiranje sekundarnih elektrona, povratnih elektrona i karakterističnih rendgenskih zraka. Vrste signala koje izlaze iz uzorka izloženog elektronskom snopu prikazani su na *Slici 12*. Ovi emitirani signali se prikupljaju pomoću različitih detektora: detektora sekundarnih elektrona (SE), detektora povratnih elektrona (BSE) i detektora rendgenskih zraka (EDS ili EDX). Svaki od ovih detektora ima specifičnu ulogu u stvaranju slike ili analizi sastava uzorka. Detektor sekundarnih elektrona koji je postavljen odmah iznad uzorka te skuplja sekundarne elektrone (SE) emitirane s površine uzorka. Koristi se za snimanje površinske topografije visoke rezolucije. Detektor povratno raspršenih elektrona koji prikuplja povratno raspršene elektrone (BSE) koji su raspršeni unatrag od teških atoma u uzorku. BSE snimanje daje informacije o sastavu uzorka. Detektor X-zraka prikuplja karakteristične X-zrake koje emitiraju atomi uzorka kada su pobuđeni snopom elektrona. [41]



Slika 12. Vrste signala koje izlaze iz uzorka izloženog elektronskom snopu. [43]

Uz detektore, važan dio SEM-a je i komora za uzorke koja sadrži postolje na koje se stavlja analizirani uzorak. U komori za uzorke skenirajućeg elektronskog mikroskopa (SEM) moraju biti ispunjeni specifični uvjeti kako bi se osigurala optimalna funkcionalnost i kvaliteta rezultata. Prvo, komora mora održavati visok vakuum kako bi se spriječilo raspršenje elektrona u zraku. [41] Stabilna temperatura je također ključna, jer temperaturne varijacije mogu uzrokovati termičko širenje ili kontrakciju, što smanjuje rezoluciju slike. Komora mora biti zaštićena od vibracija, koje mogu uzrokovati pomicanje uzorka i mutne slike, pa se često koriste antivibracijski stolovi. [44] Čistoća komore je neophodna kako bi se spriječila kontaminacija uzorka, a uzorci moraju biti pažljivo pripremljeni. Precizno pozicioniranje uzorka omogućava dobivanje jasnih i detaljnih slika, uz mehanizme za pomicanje u svim smjerovima te rotaciju i nagnjanje. Postolje za uzorke nalazi se na **Slici 13**. Konačno, uzorak mora biti električki vodljiv kako bi se spriječilo nakupljanje električnog naboja, često premazivanjem tankim slojem vodljivog materijala poput zlata ili ugljika. Ovi uvjeti zajedno osiguravaju visoku kvalitetu i pouzdanost podataka dobivenih SEM-om. [41,44]



Slika 13. Postolje za uzorke. [45]

Cijeli proces je kontroliran pomoću računalnog sustava koji omogućuje korisniku da podešava parametre skeniranja, prati dobivene slike u stvarnom vremenu i vrši analizu podataka. Ovaj integrirani sustav čini SEM moćnim alatom za istraživanje mikroskopskih struktura i sastava materijala.

2.5.2. Princip rada SEM-a

SEM koristi snop visokoenergetskih elektrona za skeniranje površine uzorka. Prvi korak za rad SEM-a uključuje generiranje snopa elektrona. Elektroni se emitiraju iz izvora elektronskog topa koji u središtu ima volframovu nit, te se ubrzavaju i fokusiraju u tanki snop pomoću elektromagnetskih leća koje djeluju kao zavojnica. [41] Fokusirani elektronski snop skenira površinu uzorka na način da u svakom trenutku osvjetljava samo jednu točku na predlošku. Snop elektrona pomiče se od točke do točke kontinuirano stvarajući signale, odnosno uzrokujući emisiju sekundarnih elektrona, povratno raspršenih elektrona, te karakterističnih rendgenskih zraka. [39]

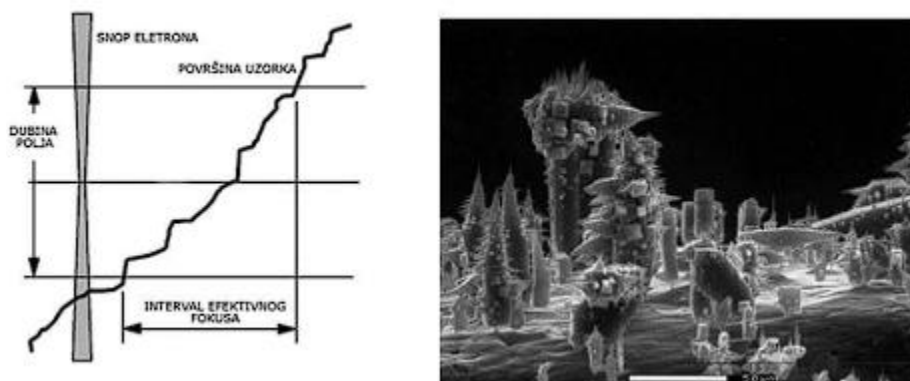
Sekundarni elektroni su jednostavni elektroni atoma koji su izbačeni uslijed interakcije s primarnim elektronima iz snopa. Općenito imaju vrlo malu energiju, zbog koje mogu iskočiti samo iz vrlo plitkog dijela površine uzorka. Detektiraju se i koriste za stvaranje visokorezolucijske slike koja daje uvid u površinsku morfologiju uzorka. Kontrast u slici sekundarnih elektrona dolazi prvenstveno zbog samog reljefa površine uzorka. S obzirom da se nalaze u blizini površine puno više elektrona može biti detektirano, kako oni iz točaka na vrhovima reljefa, tako i oni u dnu doline reljefa. Vrhovi su istaknuti, sjajni, dok su doline tamne. [39]

Povratno raspršeni elektroni (engl. *backscattered electron* - BSE), elektroni iz dubljih slojeva uzorka, pružaju informacije o kompoziciji i topografiji uzorka. BSE su primarni elektroni

iz snopa koji su se odbili nazad od površine uzorka uslijed elastičnih međudjelovanja s jezgrom atoma iz uzorka. Kontrast u ovakvim slikama dolazi prvenstveno iz razlika, od točke do točke, u prosječnom atomskom broju uzorka. Visoki atomski broj jezgre „odbija” više elektrona i stvara svjetlije površine na slici. [39,46] Detektor rendgenskih zraka koristi se za ispitivanje rendgenskih zraka koje uzorak emitira, a neki SEM uređaji imaju spektroskopske detektore s disperzijom energije (EDX) koji omogućuju ispitivanje kemijskog sastava uzorka. [46]

2.5.3. Prednosti SEM-a

U usporedbi sa svjetlosnim mikroskopima, SEM značajno poboljšava dubinu polja. Dubina polja karakterizira udaljenost od ravnine točke fokusa, i u jednu i drugu stranu, izvan kojeg se smanjuje kvaliteta slike. S većom dubinom polja mikroskop može kvalitetnije prikazati trodimenzionalne objekte. Efekt dubine polja SEM-a može se vidjeti na *Slici 14*. Kvaliteta i sveobuhvatnost slike velikim djelom dolazi zbog velike dubine polja, ali SEM uređaji su istaknuti i po svojoj rezoluciji. [39]



Slika 14. Efekt dubine polja skenirajućeg elektronskog mikroskopa. [39]

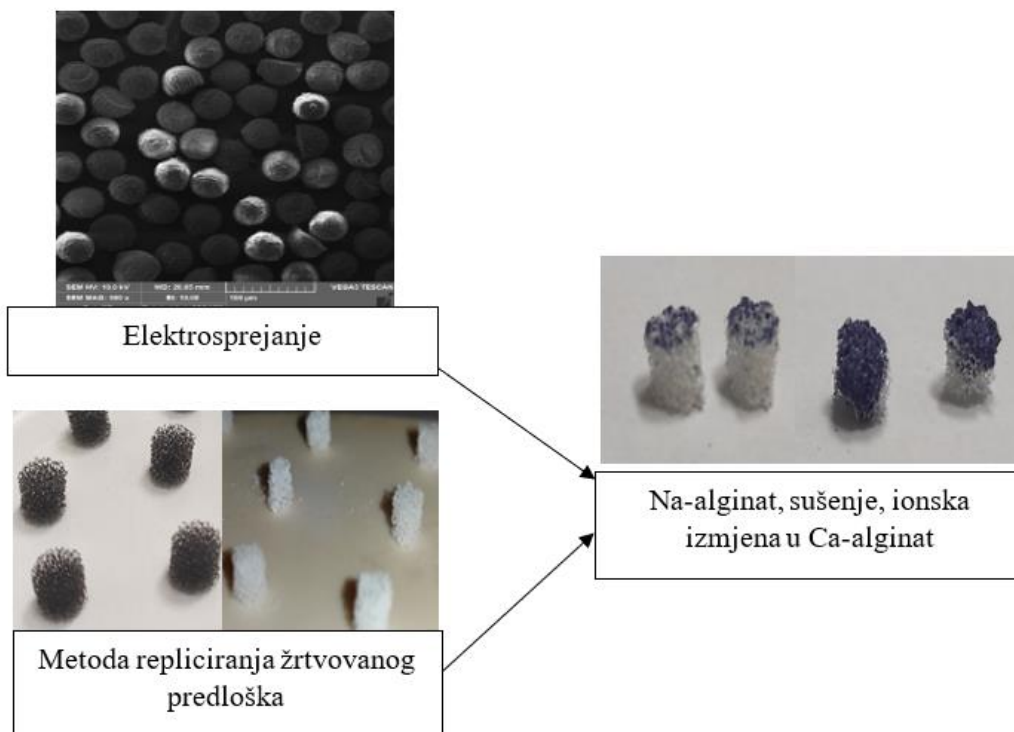
3. EKSPERIMENTALNI DIO

Ekperimentalni rad ovog diplomskog rada dio je kontinuiranog znanstveno-istraživačkog rada istraživačke grupe koja djeluje u Laboratoriju za biomaterijale i tkivno inženjerstvo (LabTI) na Sveučilištu u Zagrebu Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije, na Zavodu za fizikalnu kemiju.

Glavni zadatak ovog diplomskog rada bio je pripremiti kompozitne trodimenzionalne nosače na temelju visokoporozne matrice sačinjene od biostakla te kompozitnih sfera na temelju kitozana.

Prvi korak eksperimentalnog djela je sintetizirati kompozitne mikrosfere. Mikrosfere na temelju kitozana sadrže ione bakra, sa svrhom otpuštanja iona za terapijsko angiogeno i antitumorsko djelovanje, i čestice biostakla, za produženo otpuštanje iona s ciljem poboljšane osteointegracije. Na temelju prethodnih istraživanja dobiveni su optimalni parametri sinteze mikrosfera metodom elektroštrcanja te je potvrđen optimalni sastav kompozitnih mikrosfera.

Metodom repliciranja žrtvovanog predloška (engl. *foam replica method*) u ovom diplomskom radu dobiveni su trodimenzionalni visokoporozni nosači temeljeni na biostaklu. [47] Najveći dio eksperimentalnog rada, ujedno i najveći istraživački doprinos, bio je pronaći odgovarajući postupak i najbolje parametre za sljepljivanje sfera na staklenu trodimenzionalnu matricu. Shematski prikaz eksperimentalnog tijeka prikazan je na *Slici 15*.



Slika 15. Shematski prikaz eksperimentalnog tijeka – sinteza kompozitnih mikrosfera metodom elektrosprejanja, priprema trodimenzionalnog visokoporoznog nosača temeljenog na biostaklu metodom repliciranja žrtvovanog predloška, te sljepljivanje sfera na staklenu trodimenzionalnu matricu.

3.1. Materijali

Korišteni materijali za pripravu kompozitnih mikrosfera na temelju kompleksa kitozan-bakar (CHT-Cu-BG):

- Kitozan, CHT 85/100 (stupanj deacetilacije 83,2%; Heppe Medical Chitosan GmbH; Njemačka)
- Octena kiselina, CH₃COOH (99,8%; Lach-Ner; Češka)
- Bakar(II) acetat monohidrat, Cu(CH₃COO)₂×H₂O (BDH Prolabo; UK)
- Demineralizirana voda
- Etanol, CH₃CH₂OH (96%; KEFO d.o.o.; Slovenija)

- Aceton, C₃H₆O (Honeywell Riedel-de Haen; Njemačka)
- Natrijev hidroksid, NaOH mini perle (Gram-mol d.o.o.; Hrvatska)

Korišteni materijali za pripravu nosača na temelju bioaktivnog stakla i biorazgradljivog polimera su:

- Biostaklo 45S5, prah; Schott Vitryxx MD01, $d_{50} = 4,0 \pm 1,0 \mu\text{m}$, $d_{95} \leq 20 \mu\text{m}$
(SiO₂ 45 mas.%, CaO 24,5 mas.%, Na₂O 24,5 mas.%, P₂O₅ 6 mas.%)
- Poli(vinil-alkohol), PVA (99-100% hidrolizirani, MW 86 000, Acros Organics, USA)
- Alginska kiselina, natrijeva sol (viskoznost 20 000 - 40 000 cps, Sigma-Aldrich, USA)
- Etanol, CH₃CH₂OH (96%; KEFO d.o.o.; Slovenija)

3.2. Priprava kompozitnih mikrosfera na temelju kompleksa kitozan-bakar

3.2.1. Priprava otopina

Pripremljena je 1 mas.% otopina kitozana (CHT) otapanjem polimernog praha u 1 %-tnoj otopini octene kiseline pri sobnim uvjetima. Dobivena otopina filtrirana je u svrhu uklanjanja neotopljenih dijelova ili prisutnih nečistoća.

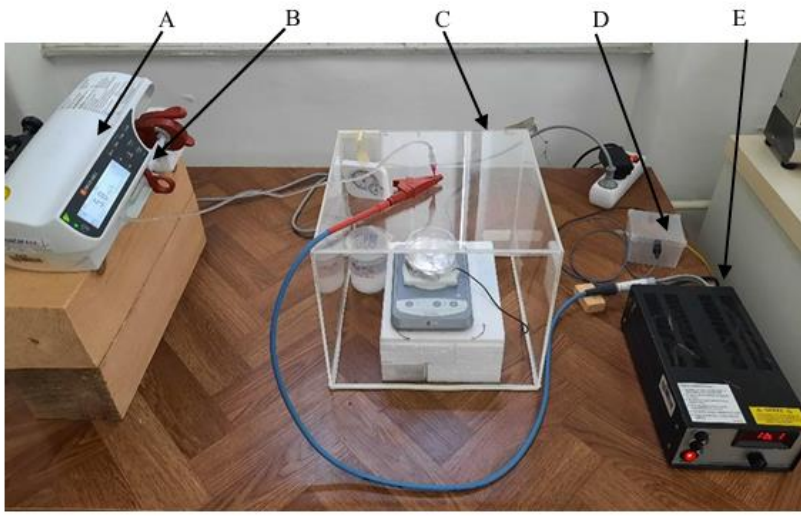
Potom je pripremljena otopina Cu^{2+} iona otapanjem bakrova(II) acetata monohidrata u destiliranoj vodi. Masa soli koju je potrebno otopiti i potom dodati u filtriranu otopinu kitozana određena je ovisno o množinskom omjeru bakrovih iona i amino skupina u polimernom lancu: $n(\text{Cu}^{2+}) : n(-\text{NH}_2) = 0,0916 : 1$.

Nakon sat vremena miješanja u otopinu kitozana i bakrovih iona dodano je biostaklo, tako da je maseni omjer stakla i kitozana iznosi 1 : 9. Na ovaj način mikrosfere, osim bakrovih iona, sadrže i ione silicija, kalcija, fosfora i natrija.

Također, pripremljena je i 5 mas.% otopina natrijevog hidroksida koja služi za neutralizaciju, odnosno kao medij za geliranje.

3.2.2. Priprava mikrosfera metodom elektroštrcanja

Mikrosfere na temelju kitozana umreženog s Cu^{2+} ionima pripravljene su procesom elektroštrcanja koristeći aparaturu prikazanu na *Slici 16* i *Slici 17*, pri parametrima provedbe eksperimenta danim u *Tablici 3*.



Legenda:

A- pumpa

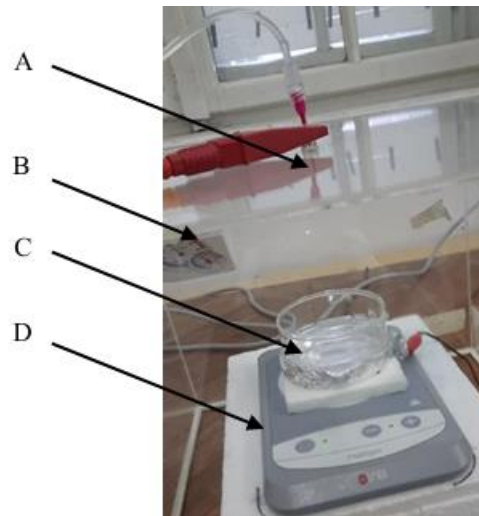
B-injekcija s otopinom

C-poli(metil-metakrilat)-na komora

D-uzemljenje

E-izvor visokog napona

Slika 16. Aparatura za pripremu mikrosfera metodom elektroštrcanja.



Slika 17. Prikaz dijela aparature u komori za pripremu mikrosfera metodom elektroštrcanja.

Tablica 3. Eksperimentalni parametri metode elektroštrcanja

PARAMETAR	IZNOS	MJERNA JEDINICA
promjer igle	25	G
protok otopine	5	mL/h
udaljenost vrha igle i površine NaOH u kolektoru	10	cm
temperatura	25 ± 1	°C
relativna vlažnost u komori	66 ± 5	%
Napon	15-17	kV
Vrijeme	60	min

Injekcija od 10 mL napunjena je pripremljenom CHT-Cu²⁺-biostaklo otopinom i spojena na pumpu koja osigurava konstantan protok otopine. Igla je pozitivno nabijena, a kolektor uzemljen. Kao kolektor korištena je uzemljena staklena posuda za kristalizaciju napunjena s 50 mL 5 mas.% otopine NaOH i izolirana aluminijskom folijom, te se lagano miješa kako bi se izbjegla aglomeracija mikrosfera. Na crijevo injekcije spojena je igla s tupim vrhom. Udaljenost igle i otopine NaOH je 10 cm. Protok otopine kroz iglu, promjer igle te udaljenost vrha igle od otopine za sakupljanje mikrosfera držane su konstantnima, a korišteni napon mijenjao se ovisno o sustavu. Prate se relativna vlažnost i temperatura u komori. Postupak elektroštrcanja provodi se u periodu od dva sata tijekom kojeg se mikrosfere skupljaju u kolektoru. Prvih pola sata potrebno je za stabilizaciju sustava, stoga se mikrosfere dobivene u tom vremenu odvajaju od ostalih mikrosfera.

3.3. Priprema nosača

Za pripremu nosača potrebno je odvagati 45S5 bioaktivno staklo i poli(vinil alkohol), PVA. PVA je sintetski polimer koji služi kao umreživalo. Postupak pripreme nosača započinje dodavanjem 2 mL H₂O u usku staklenu bočicu. U nju se dodaje magnetiće koji je potreban za miješanje, te prethodno odvagani PVA. Bočica s magnetićem, PVA i H₂O prebacuju se na

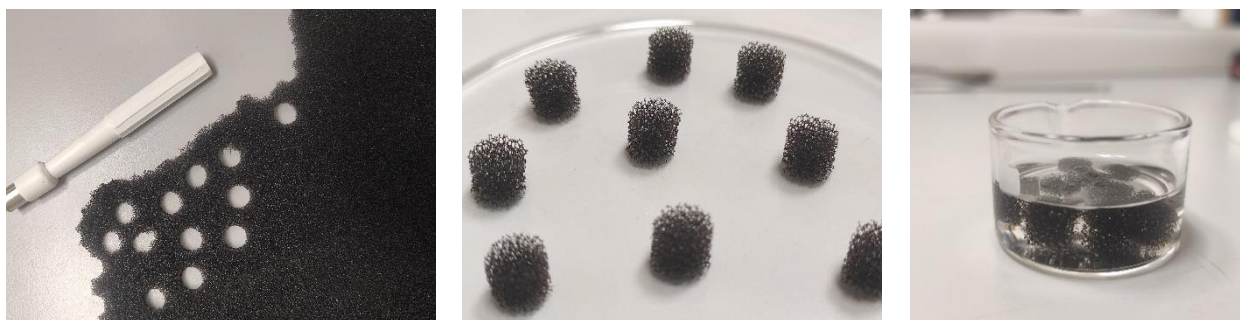
magnetnu miješalicu, poklapaju satnim staklom, te započinje miješanje i grijanje do 80°C kako bi došlo do potpunog otapanja.

Nakon otapanja otopina se vraća na sobnu temperaturu i dodaje se prethodno odvagano 45S5 bioaktivno staklo i nastaje suspenzija. Nastala suspenzija miješa se na magnetnoj miješalici 10 minuta, te na UZV 1 minutu, a slika suspenzije nalazi se na *Slici 18*.



Slika 18. Suspenzija bioaktivnog stakla.

Proces dobivanja žrtvovanog predloška, oblika na kojem će se temeljiti trodimenzionalna struktura prikazan je na *Slici 19*. Kao kalup za izradu nosača koristi se poliuretanska spužva iz koje se pomoću 8 mm bušača izrežu cilindrični oblici. Izrezani oblici uranjaju se u etanol kako bi se odmastili, te se potom suše na 60°C kako bi ispario sav etanol.



Slika 19. Poliuretanska spužva i bušač, cilindrični oblici kao kalup za izradu nosača, uranjanje u etanol zbog odmašćivanja.

Tako pripremljeni kalupi ubacuju se u prethodno pripremljenu suspenziju i miješaju se 2 minute. Višak suspenzije se po završetku miješanja istisne špatulom ili pomoću kažiprsta i palca. Pripremljeni uzorci su potom stavljeni na vakuumiranje u vakuum komoru (*Slika 20*, lijevo) dok se ne postigne tlak od 0,13 bar, te potom na sušenje pri 60 °C na 24 h, nakon čega slijedi sinteriranje s brzinom zagrijavanja od 2 °C/min uz zadržku od 1 h na 400 °C i 2 h na 1050 °C. *Slika 20*, desno, pokazuje uzorke na podlošku nakon sinteriranja.



Slika 20. Vakuumiranje uzoraka, te prikaz uzoraka nakon sinteriranja.

3.4. Impregnacija sfera na nosač

Kako bi se sfere zalijepile na nosač potrebno je pripremiti otopinu natrijevog alginata (Na-alginat) koja će omogućiti da se sfere zalijepe na površinu nosača. Pripremljena je otopina od 0,5, 1 i 2 mas./vol. % Na-alginata. U nastavku je opisan postupak pripreme otopina alginata, kontrolnog uzorka, te lijepljenja sfera na nosač.

3.4.1. Priprema Na-alginata:

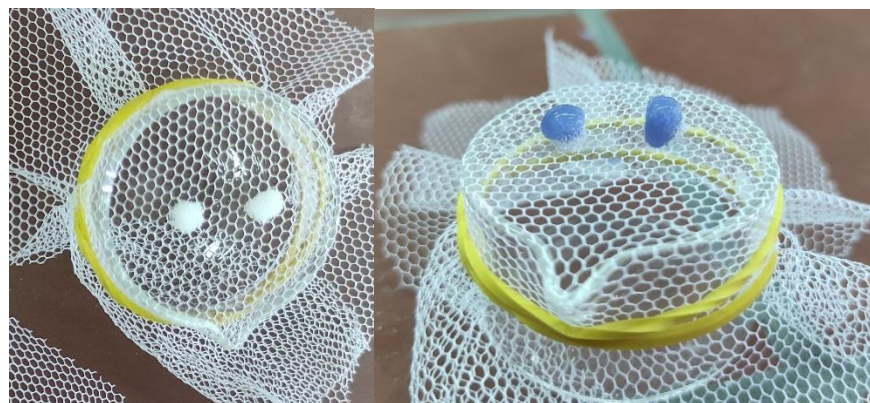
0,5 mas./vol.% Na-alginat: U 5 mL H₂O otopljeno je 25,0 mg Na-alginata, te se na magnetnoj miješalici uzorak homogenizirao 60 minuta.

1 mas./vol.% Na-alginat: U 5 mL H₂O otopljeno je 50,0 mg Na-alginata, te se na magnetnoj miješalici uzorak homogenizirao 60 minuta.

2 mas./vol.% Na-alginat: U 5 mL H₂O otopljeno je 100,0 mg Na-alginata, te se na magnetnoj miješalici uzorak homogenizirao 60 minuta.

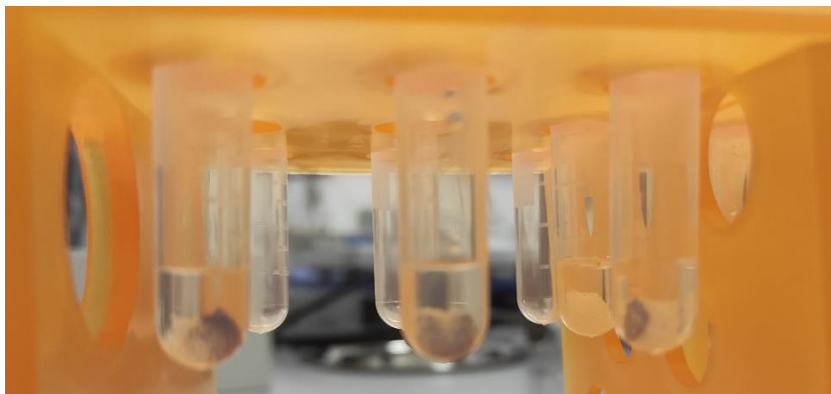
3.4.2. Priprema kontrolnog uzorka:

Na nosače, smještene na propusnu mrežicu (*Slika 21.*), kapanjem je nanoseno 0,1 mL otopine Na-alginata. Nosači se pritom stavljaju na vakuum, te na 60 °C na 2 h u peć.



Slika 21. Pripremljeni nosači sa Na-alginatom (lijevo) i s nanesenim kitozanskim mikrosferama (desno).

Nakon toga svaki se nosač zasebno odvaja u epicu (eppendorf tube 2mL), te se dodaje 0,5 mL 1% CaCl₂ na 20 minuta (*Slika 22.*). Potom slijedi ispiranje vodom četiri puta kako bi se uklonio eventualno zaostali NaCl i tako pripremljeni nosači idu u peć na 60 °C na 2 h.



Slika 22. Ionska izmjena – nosači uronjeni u otopinu CaCl₂.

3.4.3. Priprema uzoraka sa sferama:

Nakon pripremljenog kontrolnog uzorka pripremljeni su uzorci s 5%, odnosno 10% mase sfera na volumen otapala. Postupak je sljedeći:

- **BG - 1 ALG – 5 SF**: U epice je dodano 15 mg sfera na 300 µL 1 % Na-alginata. Volumen od 300 µL je dovoljan za impregnaciju dvaju nosača (za svaki je potrebno 100 µL, dok 100 ostaje kao višak). Kombinacijom magnetske miješalice i ultrazvuka homogenizira se otopina. Homogenizirana otopina se kapa na nosače u volumenu od 0,1 mL i tako pripremljeni nosači su stavljeni u vakuum i na 60 °C na 2 h u peć. Nakon toga slijedi odvajanje u posebne epice i stajanje u 0,5 mL 1% CaCl₂ 20 minuta. Potom se uzorci ispiru vodom četiri pute, te se stavljaju u peć na 60 °C na 2 h.

- **BG - 1 ALG – 10 SF**: U epice je dodano 30 mg sfera na 300 µL 1 % Na-alginata, ostatak postupka ostaje isti kao prethodno opisani.

- **BG - 0,5 ALG – 10 SF**: U epice je dodano 30 mg sfera na 300 μ L 0,5 % Na-alginata, ostatak postupka ostaje isti kao prethodno opisani.

- **BG - 2 ALG - 5 SF**: U epice je dodano 15 mg sfera na 300 μ L 2 % Na-alginata, ostatak postupka ostaje isti kao prethodno opisani.

4. REZULTATI I RASPRAVA

Kako bi se procijenila uspješnost lijepljenja sfera alginatom na nosač od biostakla provedeno je žarenje uzoraka i promatran gubitak mase. Uzorci su izvagani u aluminijskim posudicama i stavljeni u peć na sobnu temperaturu i zagrijavani brzinom od 2 °C/min do 500 °C. Nakon toga uzorci šest sati provode na temperaturi od 500 °C, te nakon toga slijedi njihovo hlađenje do sobne temperature.

Tablica 4. Prikaz vrijednosti mase uzoraka prije i nakon žarenja.

<i>uzorak</i>	<i>m uzorak prije, mg</i>	<i>m uzorak nakon, mg</i>	<i>promjena mase, %</i>
<i>BG-kontrola-1</i>	12.40	12.40	0.00
<i>BG-kontrola-2</i>	35.00	35.00	0.00
<i>BG-0,5ALG</i>	25.20	25.00	0.79
<i>BG-0,5ALG-10SF</i>	19.60	13.00	33.67
<i>BG-1ALG</i>	24.60	24.10	2.03
<i>BG-1ALG-5SF</i>	18.10	16.50	8.84
<i>BG-1ALG-10SF</i>	19.00	12.10	36.32
<i>BG-2ALG</i>	30.10	29.70	1.33
<i>BG-2ALG-5SF</i>	36.50	32.90	9.86

Staklo je stabilno iznad 1000 °C, dok polimerni dio degradira iznad 300 °C. S obzirom na to da se provodilo grijanje do 500°C pretpostavlja se kako je sav polimerni dio degradirao i promjena mase zapravo se odnosi na masu polimernog dijela u samom uzorku. Uzorak BG-kontrola odnosi se na kontrolne uzorke od stakla bez ikakve naknadne obrade ili dodatka polimera. Oni služe kako bi se provjerilo hoće li masa ostati stabilna, odnosno dolazi li do otpadanja dijelova uzoraka koji neće nakon žarenja završiti na vagi i sl. S obzirom da ne dolazi do promjene mase može se zaključiti da su kontrolni uzorci stabilni, odnosno nosači od bioaktivnog stakla su postojani.

Nadalje, uzorci BG-0,5ALG, BG-1ALG i BG-2ALG odnose se na uzorke koji sadrže bioaktivno staklo i Na-alginat u različitim postotcima. Masa polimerne prevlake određuje se uz pomoć promjene mase vaganih uzoraka. Tako je vidljivo kako uzorak BG-0,5ALG sadrži 0,79%

alginata, BG-1ALG sadrži 2,03% alginata, dok BG-2ALG sadrži 1,33% alginata. Prema ovim podacima može se zaključiti kako je najdeblja polimerna prevlaka kod uzorka BG-1ALG, odnosno da je ova koncentracija alginata najpovoljnija. Manja koncentracija nedovoljna je da potpuno prekrije površinu bioaktivnog stakla, dok veća koncentracija može dovesti do prezasićenja, odnosno višak alginata ostaje u otopini i ne veže se na staklo. Pri većim koncentracijama alginat može formirati agregate koji mogu otežati njegovu adsorpciju na staklo, dok kod alginata optimalne koncentracije molekule mogu ostati dovoljno dispergirane da dođe do učinkovite adsorpcije. Još jedan od razloga zašto je prevlaka od 1% deblja od one od 2% može biti i viskoznost otopine. Povećanjem koncentracije alginata raste i viskoznost što otežava difuziju alginata i smanjuje učinkovitost adsorpcije.

Uzorci s alginatom i sferama gube oko 30% mase kada je dodano 10% mase sfera na volumen otapala, a oko 10% kada je dodano 5% mase sfera. Konkretno, uzorak BG-0,5ALG-10SF gubi 33,67% mase. Uz pretpostavku da uzorci BG-0,5 ALG i BG-0,5 ALG-10SF imaju istu količinu alginata u sebi može se doći do podatka kolika je masa sfera nanescena na uzorak. Dio izgubljene mase pripada alginatu (0,20 mg), dok preostali dio pripada kitozanskim mikrosferama (6,40 mg). Do mase kitozanskih mikrosfera dolazi se jednostavnim računom:

$$\Delta m, mg = m(\text{uzorak prije}), mg - m(\text{uzorak nakon}), mg$$

$$m(\text{kitozanskih mikrosfera}), mg = \Delta m, mg - m(\text{alginat}), mg$$

Primjer računa za uzorak BG-0,5ALG-10SF:

$$m(\text{uzorak prije}), mg = 19,60$$

$$m(\text{uzorak nakon}), mg = 13,00$$

$$\underline{m(\text{alginat}), mg = 0,20}$$

$$\Delta m, mg = 19,60 mg - 13,00 mg = 6,60 mg$$

$$m(\text{kitozanskih mikrosfera}), mg = 6,60 mg - 0,20 mg = 6,40 mg$$

Isti postupak računa provodi se i za ostale uzorke, a rezultati su prikazani u **Tablici 5**.

Tablica 5. Prikaz promjena mase u mg i mase kitozanskih mikrosfera u uzorcima.

uzorak	$\Delta m, mg$	m_{exp} sfere, mg
BG-0,5ALG	0,20	/
BG-0,5ALG-10SF	6,60	6,40
BG-1ALG	0,50	/
BG-1ALG-5SF	1,60	1,10
BG-1ALG-10SF	6,90	6,40
BG-2ALG	0,40	/
BG-2ALG-5SF	3,60	3,20

Uzorak BG-1ALG-5SF gubi 8,84% mase, od čega je 0,50 mg od alginata, dok je 1,10 mg od kitozanskih mikrosfera. Uzorak BG-1ALG-10SF gubi 36,32% mase, a od toga 6,40 mg pripada kitozanskim mikrosferama. Uzorak BG-2ALG-5SF gubi 9,86%, 0,40 mg alginata i 3,20 mg mikrosfera.

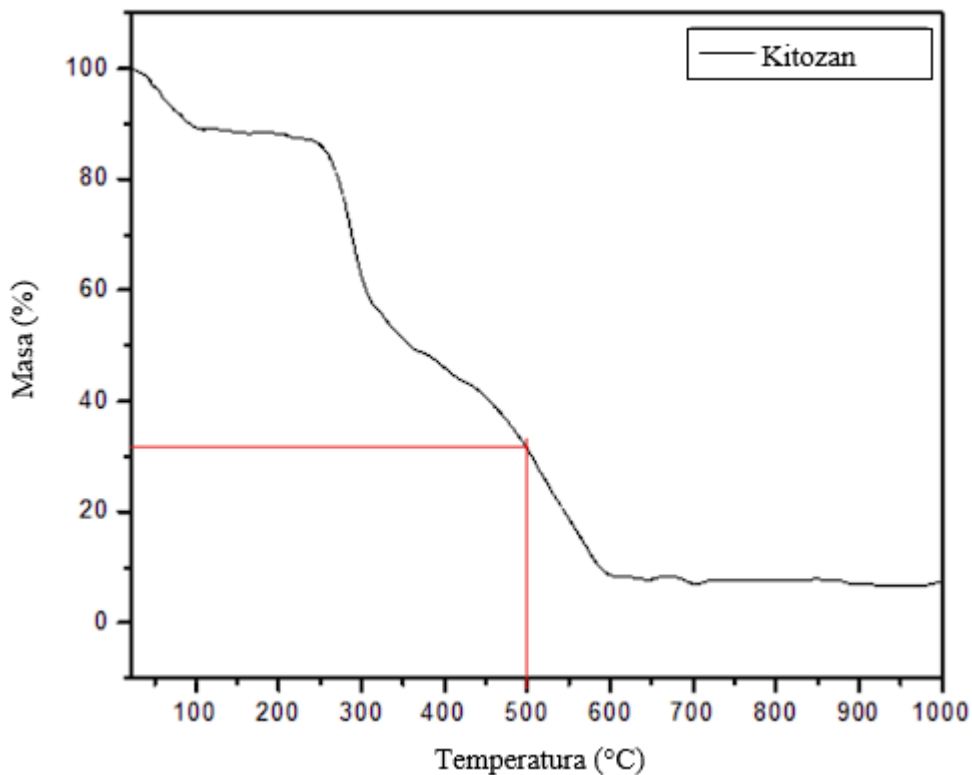
Očito je kako uzorci s više stavljenih sfera gube više mase. Najviše mase izgubio je uzorak BG-1ALG-10SF, dok je najmanje izgubio uzorak BG-1ALG-5SF, što ukazuje kako je najviše polimernog udjela na uzorku BG-1ALG-10SF, dok je najmanje nanesenog polimera na uzorku BG-1ALG-5SF.

Prilikom impregnacije sfera na nosač pripremaju se suspenzije 5%, odnosno 10% mase sfera na volumen otapala. Konkretno, za pripremu uzoraka BG-1ALG-5SF pripremljena je otopina od 5% mase mikrosfera na volumen otapala tako što je dodano 15 mg sfera na 300 μ L 1% Na-alginata. Za jedan nosač potrebno je 100 μ L tako pripremljene otopine. Dakle, teorijski bi se na jednom tako pripremljenom nosaču trebalo nalaziti 5 mg mikrosfera. Mikrosfere sadrže 90% udjela kitozana. Teorijska masa kitozana nanescena na uzorak s 5 mas./mas. % mikrosfera iznosi:

$$m_{teor}(kitozan), mg = m_{teor}(kitozanskih mikrosfera), mg * 0,90$$

$$m_{teor}(kitozan), mg = 5 * 0,90 = 4,5$$

Dobivene mase prikazane u tablici 5, stupcu m_{exp} sfere, odnose se na udio mase kitozana koji je izgubljen prilikom postupka žarenja na 500°C. Prema TGA krivulji kitozana prikazanoj na *Slici 23*, na 500°C u uzorku zaostaje približno 30% mase kitozana, odnosno iz uzorka se gubi se približno 70% ukupne mase kitozana.



Slika 23. TGA kitozana. [48]

Prema tome, primjer računa za računanje ukupne mase kitozana eksperimentalno nanese na nosače prikazan na uzorku BG-1ALG-5SF:

$$m_{exp,uk}(kitozan), mg = m_{exp,500^{\circ}C}(kitozan), mg / 0,70$$

$$m_{exp,uk}(kitozan), mg = 1,10 mg / 0,70$$

$$m_{exp,uk}(kitozan), mg = 1,57$$

Račun je jednak za sve ostale uzorke i rezultati su prikazani u *Tablici 6 i 7*:

Tablica 6. Teorijska i eksperimentalna masa kitozanskih mikrosfera, odnosno kitozana.

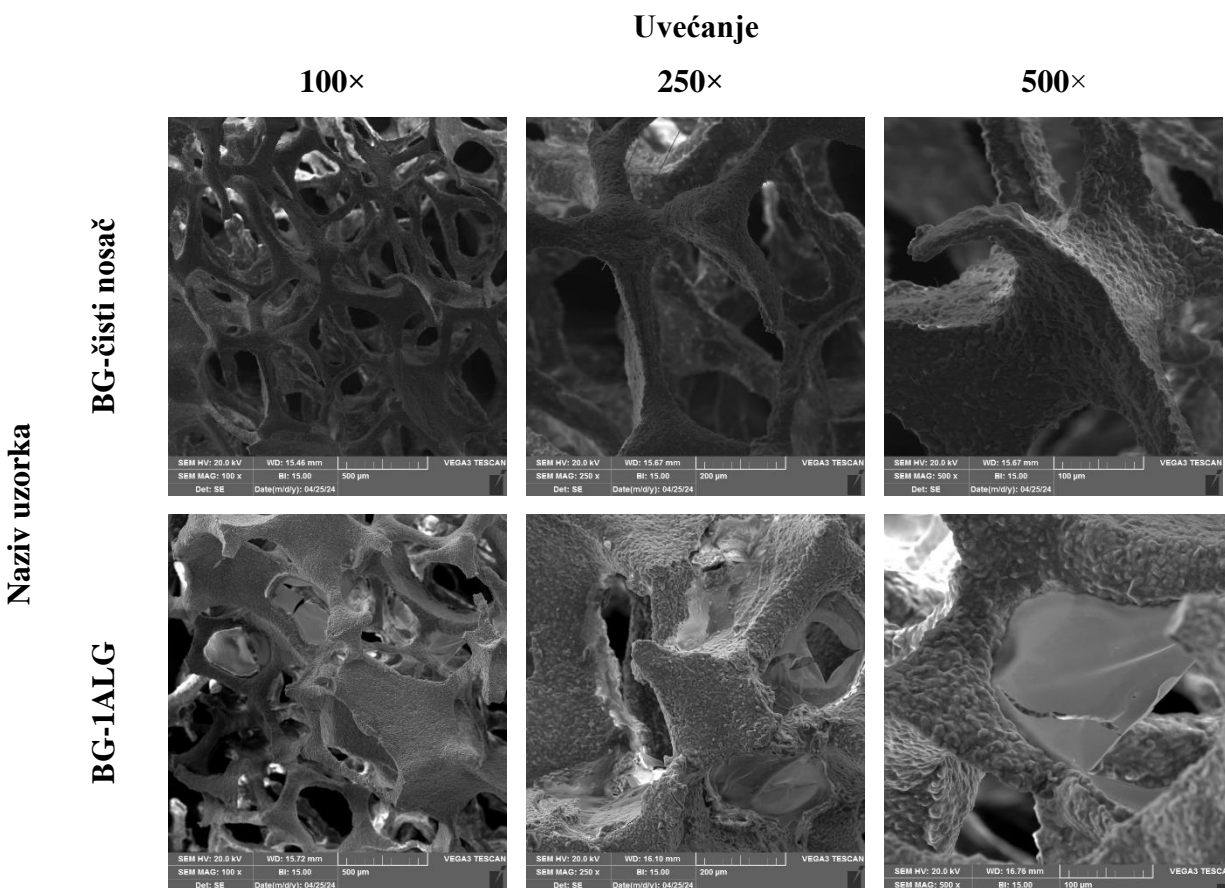
<i>uzorak</i>	<i>m_{teor}(sfere),mg</i>	<i>m_{exp}(sfere),mg</i>	<i>m_{teor}(kitozan),mg</i>
<i>BG-0,5ALG-10SF</i>	10	6,40	9
<i>BG-1ALG-5SF</i>	5	1,10	4,5
<i>BG-1ALG-10SF</i>	10	6,40	9
<i>BG-2ALG-5SF</i>	5	3,20	4,5

Tablica 7. Ukupna masa kitozana nanescna na uzorak i iskorištenje kitozana.

<i>uzorak</i>	<i>m_{exp,uk} (kitozan)</i>	<i>iskorištenje kitozan, %</i>
<i>BG-0,5ALG-10SF</i>	9,14	101,59
<i>BG-1ALG-5SF</i>	1,57	34,92
<i>BG-1ALG-10SF</i>	9,14	101,59
<i>BG-2ALG-5SF</i>	4,57	101,59

Iz **Tablica 6 i 7** vidljiva je uspješnost lijepljenja kitozanskih mikrosfera na nosač. Iz usporedbe teorijske mase kitozana, koja je u teoriji trebala završiti na uzorku, s masom kitozana nanesenom na uzorak, dobivenom računanjem gubitka mase nakon žarenja, može se uvidjeti kako je najmanja uspješnost nanošenja sfera kod uzorka BG-1ALG-5SF gdje ona iznosi 34,92%, dok je kod ostalih uzoraka ona visoka i iznosi 101,59%. Odstupanje od 1,59% je zanemarivo, ono može biti posljedica točnosti vage ili procjene zaostatka mase kitozana pri temperaturi žarenja. Na temelju toga može se zaključiti kako je ovaj postupak nanošenja mikrosfera na nosač od bioaktivnog stakla vrlo učinkovit.

Na *Slici 24* prikazane su SEM slike uzoraka čistog nosača od bioaktivnog stakla pod nazivom BG-čisti nosač i uzorka nosača od bioaktivnog stakla s 1% Na-alginata pri uvećanjima od 100×, 250× i 500×.



Slika 24. Mikrografija uzoraka čistog nosača bioaktivnog stakla (BG-čisti nosač) i uzorka bioaktivnog stakla s 1 mas./vol.% alginata (BG-1 ALG).

Slika nosača od bioaktivnog stakla prikazuje složenu i visokoporoznu strukturu. Površina nosača je hrapava što može pomoći pri integraciji s biološkim tkivom. Pore su neravnomjerno raspoređene, ali dobro povezane, što je korisno za transport hranjivih i otpadnih tvari. Nema naznaka mjehurićima ili pukotinama što sugerira homogenost i kvalitetu materijala. Uzorak sa 1 mas./vol.% alginata ima manje homogenu strukturu, vidljive su začepljene regije u kojima kasnije

zaostaju sfere. Zidovi čistog nosača su stabilni, nisu ispucali, te su prijelazi grublji u odnosu na nosač sa alginatom. Površina uzorka s alginatom manje je gruba zbog dodatka polimerne prevlake, te struktura izgleda glađe u određenim područjima što ukazuje na utjecaj alginata na površinsku teksturu. Struktura pripremljenih nosača odgovara uvjetima medicinske primjene gdje se zahtijeva kombinacija poroznosti i površinske teksture za optimalnu integraciju s biološkim tkivom.

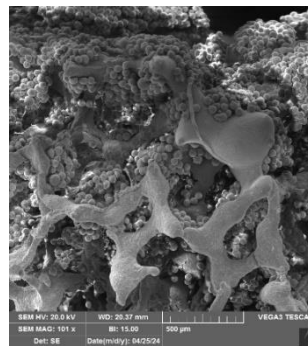
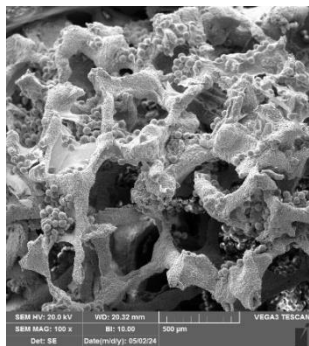
Na *Slici 25* uspoređeni su pripremljeni uzorci s 10% mase sfera na volumen otapala, odnosno uspoređeni su uzorci bioaktivnog stakla s 0,5 mas./vol.% alginata i 10 mas./mas.% mikrosfera (BG-0,5ALG-10SF) i bioaktivnog stakla s 1 mas./vol. % alginata i 10 mas./mas. % mikrosfera (BG-1 ALG-10SF) pri uvećanjima od 100×, 250×, 500× i 2000×.

Uvećanje

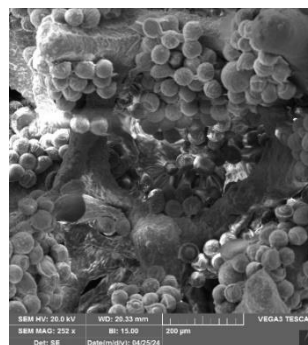
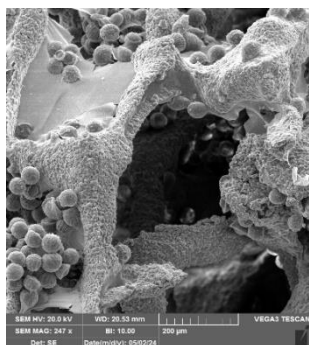
BG-0,5ALG-10SF

BG – 1ALG-10 SF

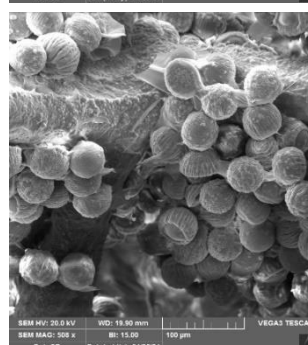
100×



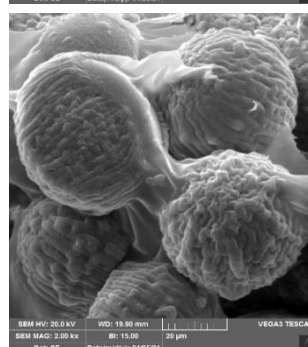
250×



500×



2000×



Slika 25. Mikrografija uzoraka nosača bioaktivnog stakla sa 0,5 mas./vol. % alginata i 10 mas./mas.% mikrosfera (BG-0,5ALG-10SF) i uzorka bioaktivnog stakla s 1 mas./vol.% alginata i 10 mas./mas.% mikrosfera (BG-1 ALG 10 SF).

Uzorci na *Slici 25* imaju visokoporoznu strukturu, iako je njihova međusobna poroznost različita. Začepljenije su pore uzoraka s većom koncentracijom alginata, dok je količina sfera na uzorcima jednaka, što potvrđuje i eksperimentalna vrijednost mase sfera od 6,40 mg kod oba uzorka. Raspodjela sfera po uzorku nije homogena. Kod uzorka BG-1 ALG-10SF vidljivo je kako većina sfera zaostaje na površini, te one nisu uspjele prodrijeti kroz cijelu površinu nosača. Vidljive su i regije gdje su pore začepjene i na takvim regijama više je zaostalih sfera. Na većim uvećanjima posebno je uočljivo začepljenje pojedinih regija, gdje sfere „zapiju" u slojevima alginata, odnosno dolazi do agregacije. Struktura je gušća i kompaktnija. Viša koncentracija alginata može dovesti do smanjenja poroznosti. Kod uzorka BG-0,5 ALG-10SF veća je poroznost, manje je začepljenih pora, no one su i dalje prisutne. Bolja je raspodjela sfera po površini nosača. Sfere nisu zaostale samo na površini već su prodrjele i u unutrašnjost strukture. Promjena mase uzorka BG-0,5ALG-10SF iznosi 33,67%, dok promjena mase uzorka BG-1ALG-10SF iznosi 36,32%. Promjena mase ukazuje na polimerni udio u nosaču, što bi značilo da je u uzorku BG-1ALG-10SF 2,65% veći polimerni udio u odnosu na uzorak s manjom koncentracijom alginata. S obzirom na jednaku količinu sfera u uzorcima, razlika u masi odnosi se na masu alginata, koje u uzorku BG-1ALG-10SF ima više, te ona može utjecati na začepljeniju poroznost strukture tog uzorka. Uspješnost lijepljenja sfera na nosače iznosi 101,59%, što bi značilo da su sfere uspješno zaljepljene na uzorcima.

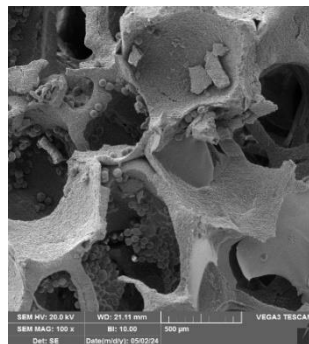
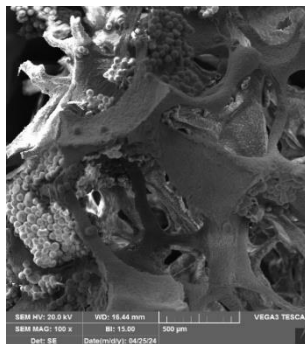
Na *Slici 26* uspoređeni su pripremljeni uzorci s 5% mase sfera na volumen otapala, odnosno uspoređeni su uzorci bioaktivnog stakla s 1 mas./vol. % alginata i 5 mas./mas. % mikrosfera (BG-1 ALG-5SF) i bioaktivnog stakla s 2 mas./vol. % alginata i 5 mas./mas.% mase sfera (BG-2 ALG-5 SF) pri uvećanjima od 100×, 250×, 500× i 2000×.

Uvećanje

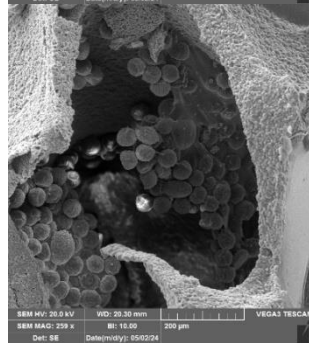
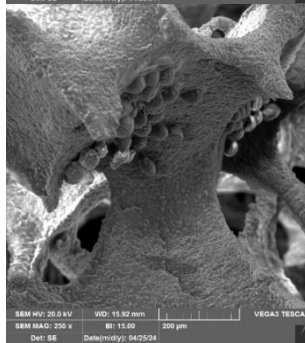
BG-1ALG-5SF

BG-2ALG-5SF

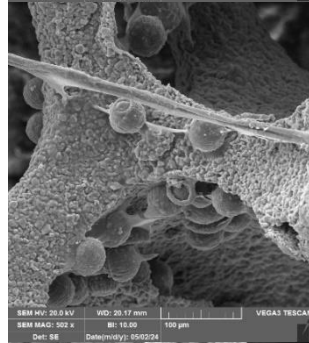
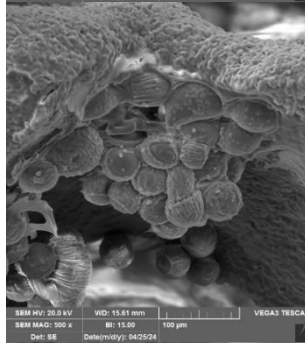
100×



250×



500×



2000×



Slika 26. Mikrografija uzoraka nosača od bioaktivnog stakla sa 5 mas./mas.% mikrosfera i 1 mas./vol. % alginata (BG-1 ALG-5SF) i bioaktivnog stakla sa 2 mas./vol. % alginata i 5 mas./mas.% mikrosfera (BG-2 ALG-5 SF) pri uvećanjima od 100×, 250×, 500× i 2000×.

Poroznost uzorka BG-2ALG-5SF je manja. Pore su začepljenije i nema homogenosti strukture. Dolazi do pucanja polimera koji na mjestima radi „spore”. Dio sfera je zalijepljen, dio nije. Količina sfera veća je u uzorku BG-2ALG-5SF, a distribucija sfera neravnomjerna. Kod uzorka BG-1ALG-5SF sfere se stabilno nalaze nakupljene na jednom mjestu, najviše se nakupljaju pri dnu a kroz samo strukturu zapinju u „bazenima”. Nije postignuta homogenost uzorka. Postoje različite veličine pora, od manjih sferičnih do većih nepravilnih oblika. Površina uzorka je gruba i neravna, dok površina sfera djeluje glatko što ukazuje na razliku u teksturi između sfera i bioaktivnog stakla. Udio polimera u BG-1ALG-5SF iznosi 8,84% dok kod uzorka BG-2ALG-5SF iznosi 9,86%. Razlika od 1,02% nije značajna i nastaje zbog začepljenije strukture uzorka BG-2ALG-5SF. Na uzorku BG-1ALG-5SF vidljive su bijele nakupine na mikrosferama koje pripadaju kalciju. Sitne nakupine kalcija na sferama mogu se pojaviti kao posljedica raspadanja strukture stakla ili iz otopine CaCl_2 u kojoj su uzorci bili tijekom pripreve. Uspješnost lijepljenja sfera je značajno različita. Za uzorak BG-1ALG-5SF ona iznosi 34,92%, dok za uzorak BG-2ALG-5SF iznosi 101,59%.

5. ZAKLJUČAK

Cilj ovog diplomskog rada bio je pripremiti kompozitne trodimenzionalne nosače na temelju visokoporozne matrice sačinjene od biostakla te kompozitnih sfera na temelju kitozana.

Nosač od bioaktivnog stakla pripremljen je metodom žrtvovanog predloška koja se pokazala kao efikasna metoda za stvaranje poroznih struktura s kontroliranom morfologijom. Prema SEM analizi može se zaključiti kako je pripremljeni nosač stabilan, homogen, visokoporozne i hrapave strukture. Ovakva struktura omogućuje dobar transport hranjivih i otpadnih tvari. Dodatkom alginata struktura postaje manje homogena, začepljenije su pore i struktura je glađa. Viša koncentracija alginata dovodi do smanjenja poroznosti, tako je najmanja poroznost uzorka BG-2ALG-5SF, a najveća kod uzorka BG-0,5 ALG-10SF.

Prateći promjene mase vaganih uzoraka zaključuje se da je najpovoljnija koncentracija polimerne prevlake, odnosno natrijevog alginata 1%. Niža koncentracija alginata nije dovoljna kako bi se u potpunosti prekrila površina bioaktivnog stakla, dok veća koncentracija može dovesti do prezasićenja, pri čemu višak alginata ostaje u otopini i ne veže se na staklo. Kod većih koncentracija alginat može formirati agregate koji otežavaju njegovu adsorpciju na staklo. S druge strane, pri optimalnoj koncentraciji, molekule alginata ostaju dovoljno dispergirane, omogućujući učinkovitu adsorpciju. Također, povećanje viskoznosti otopine s većom koncentracijom alginata može otežati difuziju i smanjiti efikasnost adsorpcije, što može biti razlog zašto je prevlaka od 1% deblja od one od 2%.

Uzorci s alginatom i sferama gube oko 30% mase kada je dodano 10% mase sfera na volumen otapala, a oko 10% kada je dodano 5% mase sfera. Očito je kako uzorci s više stavljenih sfera gube više mase. Najviše mase izgubio je uzorak BG-1ALG-10SF, dok je najmanje izgubio uzorak BG-1ALG-5SF, što ukazuje kako je najviše polimernog udjela na uzorku BG-1ALG-10SF, dok je najmanje nanesenog polimera na uzorku BG-1ALG-5SF.

Prema svim rezultatima može se zaključiti kako je najuspješnije ljepljenje sfera na uzorku BG-1ALG-10SF. U ovom uzorku zadovoljena je i količina nanesenih sfera i struktura koja je visokoporozna.

6. LITERATURA

- [1] Bhong, M., Khan, T:K.H., Devade, K., Krishna, B.V, Sura, S., Eftikhaar, H.K., Thethi, H.P., Gupta, N., Review of composite materials and applications, *Mater. Today. Proc.*, (2023) 2214-7853
- [2] Šundrica, J., Kompozitni materijali, *Naše more*, **37** (1990) 79-81.
- [3] Macan, J. Kompozitni materijali, *Interna skripta za studente Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2020, str 1-4*
- [4] Lau, A. P. S., Chen, G.-F., *Porous materials: Processing and applications*, Elsevier Science, 2014, str. 1-19
- [5] Dash, P.A., Mohanty, S., Nayak, S.K., A review on bioactive glass, its modifications and applications in healthcare sectors, *J. Non. Cryst. Solids.*, **614** (2023) 122404
- [6] Hench, L.L. The story of Bioglass®, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006, **17**, 967–978.
- [7] Izquierdo-Barba, I., Salinas, A. J., Vallet-Regí, M., Bioactive Glasses: From Macro to Nano, *Int. J. Appl. Glass. Sci.*, **4** (2013) 149–161.
- [8] Razum, M., *Biostaklo – od sinteze do primjene*, Prirodoslovno matematički fakultet, Kemijski odsjek, 2021, Zagreb
- [9] Boccaccini, A. R., Brauer, D. S., Bioactive Glasses in Medicine, *J. Am. Ceram. Soc.*, **98**(8) (2015) 2839-2854.
- [10] Bajek, S., Bobinac, D., Jerković, R., Malnar, D., Marić, I., *Sustavna anatomija čovjeka*. Rijeka, 2007
- [11] Cannio, M., Bellucci, D., Roether, J.A., Boccaccini, D.N., Cannillo, V., Bioactive Glass Applications: A Literature Review of Human Clinical Trials, *Materials*, **14** (2021) 5440.
- [12] Rahaman, M. N., Day, D. E., Sonny Bal, B., Fu, Q., Jung, S. B., Bonewald, L. F., Tomsia, A. P., Bioactive glass in tissue engineering, *Acta Biomater.*, **7** (2011) 2355–2373.
- [13] Jones, J.R., Review of bioactive glass: From Hench to hybrids, *Acta Biomater.*, **9** (2013) 4457-4486
- [14] Skallevoid, H. E., Rokaya, D., Khurshid, Z., Zafar, M. S., Bioactive Glass Applications in Dentistry, *Int. J. Mol. Sci.*, **20** (2019) 5960
- [15] Jalšenjak I, Jalšenjak V, Filipović-Grčić J. *Farmaceutika*. Zagreb: Školska knjiga; 1998.

- [16] Sahil, K., Akanksha, M., Premjeet, S., Bilandi, A., Kapoor, B., Microsphere:review, *Int. J. Res. Pharm. Chem.*, **1** (2011) 2231-2781.
- [17] Varde, N. K., Pack, D. W., Microspheres for controlled release drug delivery, *Expert. Opin. Biol. Ther.*, **4**(1)(2004) 35–51
- [18] Kawaguchi, H., Functional polymer microspheres, *Prog. Polym. Sci.*, **25** (2000) 1171–1210
- [19] Muzzarelli, R. A. A., Chitins and chitosans for the repair of wounded skin, nerve, cartilage and bone, *Carbohydr. Polym.*, **76** (2009) 167-182
- [20] Yadav, V., Galande, P., Borkar, S., A Review on Microspheres: Preparation, Characterization and Applications, *Asian J. Pharm. Res. Dev.*, **10** (2022) 128-133.
- [21] Mao, S., Guo, C., Shi, Y., Li, L. C., Recent advances in polymeric microspheres for parenteral drug delivery – part 1, *Expert. Opin. Drug. Deliv.*, **9**(9) (2012) 1161–1176.
- [22] Cam, M. E., Zhang, Y., Edirisinghe, M., Electrospayed microparticles: a novel drug delivery method, *Expert Opin. Drug. Deliv.*, **16** (2019) 895-901.
- [23] Bock, N., Woodruff, M. A., Hutmacher, D. W., Dargaville, T. R., Electrospaying, a Reproducible Method for Production of Polymeric Microspheres for Biomedical Applications, *Polymers*, **3** (2011) 131-149.
- [24] Tapia-Hernández, J.A., Torres-Chávez, P.I., Ramírez-Wong, B., Rascón-Chu, A., Plascencia-Jatomea, M., Barreras-Urbina, C.G., Rangel-Vázquez, N.A., Rodríguez-Félix, F., Micro- and nanoparticles by electrospay: advances and applications in foods, *J Agric Food Chem.*, **63**(19) (2015) 4699-4707.
- [25] Gu, J.-D., Microbiological deterioration and degradation of synthetic polymeric materials: recent research advances, *Int. Biodeterior. Biodegradation*, **52**(2) (2003) 69–91.
- [26] Ghanbarzadeh, B., Almasi, H., Biodegradable Polymers, *Biodegradation-Life of Science*, 2013, str. 141-185.
- [27] W. Paul and C.P. Sharma, Chitosan, a drug carrier for the 21 st century: a review, *S. T. P. Pharm. Sci.* **10** (1), 5-22, 2000.
- [28] Lončarević, A., Ivanković, M., Rogina, A., Electrospayed Chitosan–Copper Complex Microspheres with Uniform Size, *Materials*, **14** (2021) 5630.
- [29] Croisier, F., Jérôme, C., Chitosan-based biomaterials for tissue engineering, *Eur. Polym. J.*, **49**(4) (2013) 780–792.

- [30] Martinac, A., Filipović-Grčić, J., Kitozan - biopolimer 21. stoljeća, Farmaceutski glasnik, **58** (2002) 1 – 10, Zagreb
- [31] Raafat, D., Sahl, H. G., Chitosan and its antimicrobial potential-a critical literature survey, Microb. Biotechnol., **2** (2009) 186-201
- [32] Majeti, N.V., Ravi, K., A review of chitin and chitosan applications, React. Funct. Polym., **46** (2000) 1-27.
- [33] Annu, A., S., Ahmed, S., Ikram, S., Chitin and Chitosan: History, Composition and Properties, Chitosan, 2017, str. 1–24.
- [34] L. Ren, Production of Alginate Beads, Carroll Industries LTD., New Zealand, 2008, str. 1-10
- [35] McHugh, D. J., Production, properties and uses of alginates, Production and Utilization of Products from Commercial Seaweeds. FAO. Fish. Tech. Pap, **288** (1987) 58-115.
- [36] URL: <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/SodiumAlginate#section=Information-Sources> (pristup 12. lipnja 2024.)
- [37] URL: <https://www.elveflow.com/microfluidic-reviews/droplet-digital-microfluidics/sodium-alginate-and-applications-a-review/> (pristup 13. lipnja 2024.)
- [38] Rochow, T.G., Rochow, E.G., Scanning Electron Microscopy. In: An Introduction to Microscopy by Means of Light, Electrons, X-Rays, or Ultrasound. Springer, Boston, MA, 1978., str. 273-298.
- [39] Mršić, G., Žugaj, S., Analiza GSR čestica upotrebom elektronskog mikroskopa (SEM/EDX), Polic. sigur., **16** (2007), 179-200.
- [40] Abdullah, A., Mohammed, A., Scanning Electron Microscopy (SEM): A Review. Proceedings of 2018 International Conference on Hydraulics and Pneumatics - HERVEX, Băile Govora, Romania, **2018** (2019) 1-9
- [41] Goldstein, J., Newbury, D. E., Joy, D. C., Lyman, C. E., Echlin, P., Lifshin, E., Sawyer, L., Michael, J. R., Scanning Electron Microscopy and X-Ray Microanalysis, 2017.
- [42] URL: <https://www.britannica.com/technology/scanning-electron-microscope> (pristup 20. lipnja 2024.)
- [43] URL: <https://www.azom.com/article.aspx?ArticleID=14309> (pristup 10. lipnja 2024.)
- [44] Kaech, A., An introduction to electron microscopy instrumentation, imaging and preparation, Center for Microscopy and Image Analysis, University of Zurich. 2013., str. 1-23

- [45] URL: https://www.tedpella.com/SEM_html/16142-32P_16142-32_side.jpg (pristup 14. lipanj 2024.)
- [46] URL: <https://www.scimed.co.uk/education/sem-scanning-electron-microscopy/> (pristup 16. lipanj 2024.)
- [47] Chen, Q.Z., Thompson, I., D., Boccaccini, A.R., 45S5 Bioglass®-derived glass–ceramic scaffolds for bone tissue engineering, *Biomater.*, **27**(11) (2006) 2414-2425.
- [48] Dey, S. C., Al-Amin, M., Rashid, T. U., Sultan, M. Z., Ashaduzzaman, M., Sarker, M., Shamsuddin, S. M., Preparation, characterization and performance evaluation of chitosan as an adsorbent for remazol red, *Int. J. Latest Res. Eng. Technol*, **2**(2) (2016) 52-62.