Razvoj biorazgradivih injekcijskih sustava na temelju kitozana i kalcijeva fosfata

Ressler, Antonia

Master's thesis / Diplomski rad

2016

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

Permanent link / Trajna poveznica: https://urn.nsk.hr/urn:nbn:hr:149:844696

Rights / Prava: In copyright / Zaštićeno autorskim pravom.

Download date / Datum preuzimanja: **2024-03-28**

FKITMCMXIX

Repository / Repozitorij:

Repository of Faculty of Chemical Engineering and Technology University of Zagreb

zir.nsk.hr

dabar
DIGITALNI AKADEMSKI ARHIVI I REPOZITORIJI

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

Antonia Ressler

DIPLOMSKI RAD

Zagreb, lipanj 2016.

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

Antonia Ressler

RAZVOJ BIORAZGRADIVIH INJEKCIJSKIH SUSTAVA NA TEMELJU KITOZANA I KALCIJEVA FOSFATA

DIPLOMSKI RAD

Voditelj rada: prof. dr. sc. Marica Ivanković

Članovi ispitnog povjerenstva:
prof. dr. sc. Marica Ivanković
prof. dr. sc. Hrvoje Ivanković
dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, lipanj 2016.

Zahvale

Zahvaljujem se svojoj mentorici prof. dr. sc. Marici Ivanković na stručnom vodstvu, savjetima i mogućnosti izrade diplomskog rada.

Također se zahvaljujem prof. dr. sc. Gloriji Gallego Ferrer iz Center for Biomaterials and Tissue Engineering i dr. sc. Carlosu Garciji Fernándezu iz TA Instruments u Španjolskoj na pomoći oko reološke karakterizacije, te dr. sc. Igoru Matiću s Prirodoslovno-matematičkog fakulteta u Zagrebu za izvođenje biološke karakterizacije materijala.

Veliko hvala dr. sc. Anamariji Rogina na vodstvu, strpljivosti i pomoći tijekom izrade diplomskog rada.

Na kraju hvala mojim roditeljima koji su bili velika potpora i oslonac tijekom mog studija.

Sadržaj

1. UVOD 1

2. OPĆI DIO 3

2.1. HIDROGEL 3

2.2. INJEKCIJSKI HIDROGEL 5

2.3. INJEKCIJSKI HIDROGELOVI NA TEMELJU KITOZANA 7

2.3.1. Geliranje fotopolimerizacijom 8

2.3.2. Povezivanje pomoću iona 9

2.3.3. Temperaturom potaknuto geliranje 10

2.3.4. Geliranje neutralizacijom potpomognuto temperaturom 13

2.4. INJEKCIJSKI HIDROGELOVI ZA OBNOVU KOŠTANOG TKIVA 15

2.5. CITOTOKSIČNOST INJEKCIJSKIH HIDROGELOVA 16

2.5.1. Metode procjene životne aktivnosti stanica 17

3. EKSPERIMENTALAN DIO 19

3.1. MATERIJALI 19

3.2. SINTEZA MATERIJALA 19

3.2.1. In situ sinteza hidroksiapatita u otopini kitozana 19

3.2.2. Priprava injekcijskog hidrogela 19

3.3. KARAKTERIZACIJA 20

3.3.1. Vrijeme geliranja 20

3.3.2. Mjerenje pH vrijednosti hidrogela 21

3.3.3. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama 21

3.3.4. Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza 21

3.3.5. Udio vode u hidrogelu 21

3.3.6. Pretražna elektronska mikroskopija 22

3.4. REOLOŠKA SVOJSTVA 22

3.5. BIOLOŠKA KARAKTERIZACIJA 22

3.5.1. Citotoksičnost hidrogela 23

3.5.2. Životna aktivnost inkapsuliranih stanica 23

3.6. STATISTIČKA OBRADA 24

4. REZULTATI I RASPRAVA 25

4.1. VRIJEME GELIRANJA HIDROGELOVA 25

4.2. FTIR SPEKTROSKOPIJA 27
4.3. IDENTIFIKACIJA MINERALOŠKOG SASTAVA HIDROGELA 29
4.4. UDIO VODE 32
4.5. MIKROSTRUKTURA HIDROGELA 33
4.6. REOLOŠKA SVOJSTVA HIDROGELA 37
4.7. CITOTOKSIČNOST HIDROGELA 40
4.8. ŽIVOTNA AKTIVNOST INKAPSULIRANIH STANICA 41
5. ZAKLJUČAK 43
LITERATURA 44

Sažetak

Inženjerstvo tkiva predstavlja potencijalnu alternativu za konvencionalne metode obnove koštanog tkiva. Stoga se istražuju materijali koji bi mogli zamijeniti postojeće nerazgradive materijale koji nemaju mogućnost istovremene obnove tkiva i razgradnje njih samih. „Pametni“ materijali imaju mogućnost promjene fizičkih svojstva ovisno o promjeni uvjeta u kojima se nalaze. Iz tog razloga pronalaze primjenu u biomedicini i bioinženjerstvu. Temperaturno osjetljivi polimeri se u inženjerstvu tkiva koriste kao podloga za rast stanica i kao injekcijski gelovi. Injekcijski gelovi su od posebnog interesa zbog potencijalnog smanjenja operacijske invazivnosti. Injekcijski gelovi služe za dostavu stanica, hranjivih tvari i faktora rasta u trodimenzijskoj strukturi u tijelu te su dizajnirani za geliranje pri fiziološkim uvjetima.

U ovom radu pripravljeni su injekcijski hidrogelovi na temelju kitozana kao polimerne biorazgradive matrice i hidroksiapatita kao bioaktivne anorganske faze. Geliranje kompozitnih hidrogelova potaknuto je raspadom natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$) kao gelirajućeg agensa. Sastav hidrogelova utvrđen je rendgenskom difrakcijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama. Morfologija hidrogelova istražena je pomoću pretražnog elektronskog mikroskopa. Smični modul pohrane i gubitka mjereni su u ovisnosti o vremenu geliranja, dok su reološka svojstva potpuno geliranog gela ispitana promjenom smične deformacije i frekvencije. Biološka karakterizacija hidrogelova provedena je mjerenjem citotoksičnosti hidrogelova na mišje stanice fibroblasta, te određivanjem životne aktivnosti mišjih fibroblasta uklopljenih u hidrogel tijekom 7 dana.

Karakterizacija pripravljenih hidrogelova potvrđuje stvaranje apatitne strukture unutar matrice kitozana uz prisutnost oktakalcij fosfatne faze. Mikroskopska analiza ukazuje na visokoporoznu strukturu hidrogelova koju potvrđuje visoki udio vode od 97,5 ± 0,04%. Reološka ispitivanja pokazuju veliku početnu brzinu geliranja unutar 3 minute inkubiranja pri 37 °C, te stvaranje strukture čvrstog fizikalnog gela pri kojoj smični modul pohrane raste s porastom smične deformacije. Visoka vijabilnost stanica fibroblasta upućuje na necitotoksičnost hidrogelova. *In vitro* uzgajanje inkapsuliranih fibroblasta potvrdilo je dobru životnu aktivnost stanica tijekom 7 dana.

Ključne riječi: injekcijski gel, hidroksiapatit, kitozan, gelirajući agens, reologija, inkapsulacija stanica.

Development of biodegradable injectable systems based on chitosan and calcium phosphate

Summary

Tissue Engineering is a potential alternative to the conventional methods for bone tissue regeneration. For this reason, investigated materials could replace existing non-degradable materials with no possibility of simultaneous tissue regeneration and degradation themselves. "Smart" materials have the ability to change the physical properties responding to environmental changes. Due to mentioned, they are used in biomedicine and bioengineering. Temperature sensitive polymers are used in tissue engineering as substrates for cell growth and as injectable gels. Injectable gels can be applied directly at a desired location in a minimally invasive manner. Injectable gels are used for delivery of cells, nutrients and growth factors to the three-dimensional structure in the body, and designed for gelation under physiological conditions.

Injectable hydrogels based on chitosan as a biodegradable polymer matrix and hydroxyapatite as a bioactive inorganic phase are prepared in this study. Gelling of composite hydrogels has been initiated by decomposition of sodium hydrogencarbonate ($NaHCO_3$) as a gelling agent. The hydrogels' composition was determined by X-ray diffraction analysis and Fourier transmission spectroscopy. The morphology of hydrogels was investigated by scanning electron microscopy. Storage and loss shear modulus are determined by time sweep test, while rheological behaviour of physically cross-linked hydrogels was investigated by amplitude and frequency sweep experiments. Biological characterization was carried out by evaluation of hydrogel's cytotoxicity on mouse fibroblast cells, and by determination of viability of mouse fibroblasts encapsulated within the hydrogel for 7 days of culture.

The characterization of prepared hydrogels has confirmed hydroxyapatite formation within chitosan matrix with coexistence of octacalcium phosphate phase. Microscopic analysis reveals highly porous hydrogel's structure confirmed by high water content of 97.5 ± 0.04%. The rheological measurements have indicated rapid thermogelling within 3 minutes of incubation at 37 °C, and formation of 'strong physical gel' with increment of shear storage modulus by shear deformation. High viability of fibroblast cells indicates non-cytotoxicity of hydrogels. *In vitro* culture of encapsulated fibroblasts has confirmed good cell viability during 7 days.

Keywords: injectable gel, hydroxyapatite, chitosan, gelling agent, rheology, cell encapsulation.

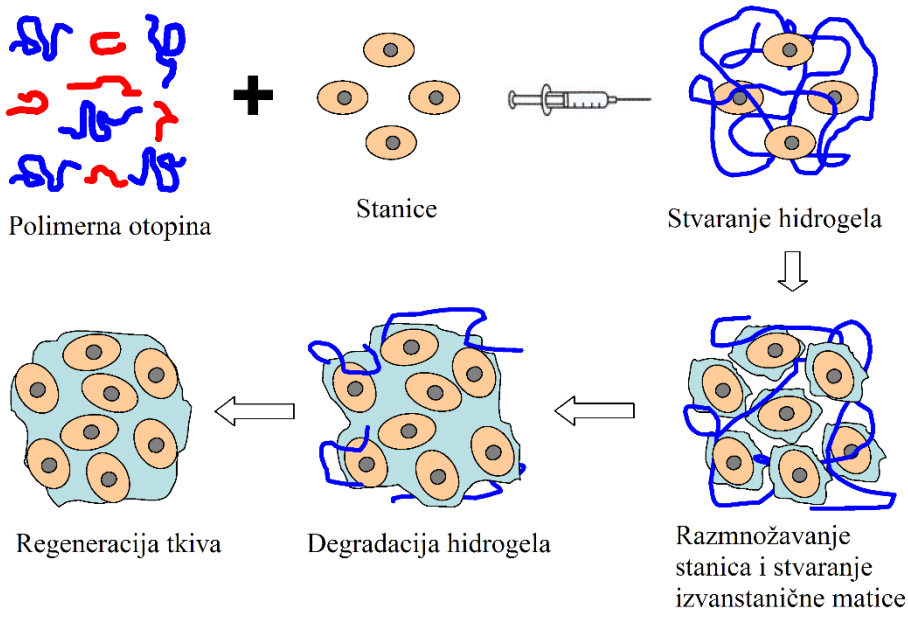
1. Uvod

„Pametni“ materijali imaju mogućnost promjene fizičkih svojstva (bubrenje, propusnost, mehanička čvrstoća i sl.) pri određenim uvjetima. Polimerni materijali su najviše proučavani zbog svoje niske cijene i jednostavnije karakterizacije u usporedbi s metalima i keramikom. Polimerni materijali mogu promijeniti svojstva ovisno o pH vrijednosti, temperaturi, električnom ili magnetskom polju, svjetlosti i promjeni otapala. Zbog toga pronalaze primjenu u biomedicini i bioinženjerstvu (molekulsko-separacijski procesi, uzgoj stanica, biosenzori, dostava lijekova, genska terapija i inženjerstvo tkiva). Inženjerstvo tkiva (eng. *tissue engineering*) je interdisciplinarno područje s ciljem razvijanja bioloških nadomjestaka za obnavljanje ili poboljšavanje funkcije tkiva. Cilj je dobiti okosnicu s nasađenim stanicama koja se ugrađuje na bolesno ili oštećeno mjesto. Krajnji rezultat je novonastalo tkivo bez prisutnosti ugrađenog materijala. Okosnica mora biti izgrađena od biokompatibilnog materijala koji će osigurati mehaničku potporu, te biti sposobna za prijenos hranjivih tvari i faktora rasta. Temperaturno osjetljivi polimeri se u inženjerstvu tkiva koriste kao podloga za rast stanica i kao injekcijski gelovi. Injekcijski gelovi služe za dostavu stanica, hranjivih tvari i faktora rasta na mjesto oštećenog tkiva te su dizajnirani za geliraje pri fiziološkim uvjetima [1,2].

U tijelu, gotovo sve stanice tkiva žive u izvanstaničnoj matrici (eng. *extracellular matrix,* ECM) koja se sastoji od složene trodimenzijske mreže. Interakcijama stanica – stanica i stanica – ECM uspostavlja se trodimenzijska mreža koja daje specifičnost i održava homeostazu (specifično stanje) tkiva. Stanice ne mogu stvoriti veze među sobom i s izvanstaničnom matricom ukoliko se nalaze na dvodimenzijskoj kulturi uslijed čega dolazi do smanjenja sposobnosti preživljavanja, proliferacije (umnažanja), diferencijacije (razvoja), metabolizma i ostalih staničnih funkcija. Kako bi se to izbjeglo stanice se uzgajaju u trodimenzijskim kulturama. Sve je više pokazatelja da su trodimenzijske stanične kulture pogodne za stvaranje interakcija stanica – stanica i stanica – ECM te da mogu oponašati specifičnost prirodnog tkiva. Okruženje u kojem se stanica nalazi utječe na ponašanje, način povezivanja i rasta, pokretljivost, proliferaciju i diferencijaciju, odgovor na podražaj, stanični metabolizam i ukupnu funkciju. Odgovarajući materijali za suspendiranje i inkapsuliranje (uklapanje) stanica moraju imati sličnu strukturu kao i izvanstanična matrica u kojoj se stanice nalaze u tijelu. Matrica ne smije štetiti stanicama niti u jednoj fazi postojanja. Mnogi materijali koji zadovoljavaju ove uvjete su prirodni polimeri i njihovi derivati sa sposobnošću stvaranja hidrogelova. Tijekom razgradnje polimerne matrice, suspendirane stanice se

razmnožavaju i stvaraju vlastitu izvanstaničnu matricu na mjestu na kojem se nalazio materijal. Ukoliko se hidrogel ponaša kao kemijska ili mehanička barijera za prolaz hranjivih tvari i otpada uslijedit će stanična smrt (apoptoza). Kisik, hranjive tvari i metabolički otpad trebali bi difundirati kroz hidrogel, što opet ovisi o strukturi, kemijskom sastavu i stupnju geliranja hidrogela. Potrebna količina hranjivih tvari u hidrogelu mora biti proporcionalna broju inkapsuliranih stanica. Svaki korak u stvaranju hidrogela i njegovoj razgradnji ne smije štetiti stanicama, a uvjeti moraju biti slični fiziološkima [3,4].

Osim necitotoksičnosti materijala u njegovom gel stanju, polimeri moraju zadovoljiti fiziološke uvjete i u stanju sola, tj. ne smiju izazvati odumiranje suspendiranih stanica prije samog geliranja. Stanice moraju biti suspendirane u neutralnoj tekućini poput vode, fiziološke tekućine ili medija za staničnu kulturu u rasponu pH vrijednosti od 6,8 do 8. I sam proces geliranja ne smije utjecati na vijabilnost (preživljavanje) stanica i njihovu raspodjelu, dok brzina razgradnje hidrogela mora odgovarati brzini stvaranja novog tkiva. Na slici 1 shematski je prikazan princip obnove tkiva sa stanicama inkapsuliranima u hidrogelu.



Slika 1. Shematski prikaz obnove tkiva pomoću stanica inkapsuliranih u hidrogelu [5].

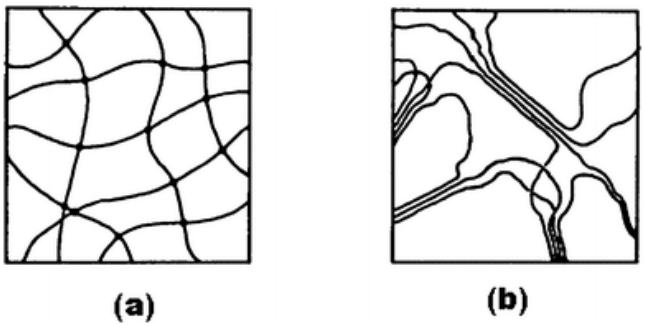
Nakon suspendiranja stanica u polimernoj otopini, suspenzija stanica se injektira u tkivo pri 37 °C pri čemu dolazi do stvaranja hidrogela. S vremenom, stanice se razmnožavaju i stvaraju izvanstaničnu matricu uz simultanu razgradnju hidrogela [5].

2. Opći dio

Prethodno pripremljene i oblikovane okosnice za obnovu tkiva (eng. *scaffold*) mogu uzrokovati poteškoće pri njihovom smještanju i ugradnji na oštećeno mjesto, što može dovesti do infekcija i odstupanja veličine okosnica od dimenzija oštećenog tkiva. Naposljetku, postoji mogućnost odbacivanja materijala, odnosno umjetnog tkiva. Injekcijski hidrogelovi stvaraju svoj konačni oblik prema obliku oštećenog mjesta i umanjuju mogućnost negativnih posljedica [6].

2.1. Hidrogel

Gelovi su trodimenzijske polimerne mreže stvorene kovalentnim vezanjem ili fizikalnim interakcijama (slika 2). Kovalentno vezani gelovi se temelje na polimernim lancima povezanim kovalentnim vezama, odnosno, poprečnim vezama pri čemu se dobivaju umreženi gelovi. Fizikalni gelovi nastaju fizikalnim ispreplitanjem polimernih lanaca u otopini, bez kovalentnih veza. I umreženi i fizikalni gelovi imaju mogućnost bubrenja u pogodnom otapalu.



Slika 2. a) kovalentno vezani gel, b) fizikalni gel [7].

Hidrogelovi su hidrofilne polimerne mreže sa svojstvom bubrenja u vodi ili fiziološkoj otopini [7]. Zbog sposobnosti apsorpcije velike količine vode, s tim da njihova težina može biti i do tisuću puta veća od težine u suhom stanju, ubrzano se istražuju za biomedicinsku primjenu.

Hidrogelovi građeni od prirodnih ili sintetskih polimera intenzivno se istražuju za primjenu u inženjerstvu tkiva kao stanični „dostavljači“ za obnavljanje raznih vrsta tkiva i organa. Mogu biti kemijski stabilni u dužem periodu ili se razgraditi ubrzo nakon primjene, što ovisi o

njihovoj kemijskoj strukturi i okruženju u kojem se nalaze [8]. U tablici 1 navedeni su neki od hidrofilnih polimera prirodnog i sintetskog podrijetla koji se koriste za sintezu hidrogelova.

Tablica 1. Hidrofilni polimeri za sintezu hidrogela [8].

Prirodni polimeri		***Sintetski polimeri***	***Kombinacija prirodnih i sintetskih polimera***
Anionski	Alginat Pektin	PEG-PLA-PEG PEG-PCL-PEG PEG-PLGA-PEG PHB PNIPAAm	Alginat-g-(PEO-PPO-PEO) Kolagen-akrilat Alginat-akrilat
Kationski	Kitozan Poli($_L$-lizin)		
Amfipatski	Kolagen Želatina		
Neutralni	Dekstran Agaroza		

Postoje različiti načini priprave fizikalnog i umreženog hidrogela. Fizikalni hidrogel se može pripremiti zagrijavanjem (npr. kitozan/PEG) ili hlađenjem polimerne otopine (npr. želatina), sniženjem pH vrijednosti itd. Stvaranje kovalentnih veza u umreženom hidrogelu moguće je postići fotokemijski (primjenom vidljivog ili UV zračenja) ili različitim kemijskim reakcijama uz gelirajući agens („klik-reakcije“, enzimsko umreživanje, umreživanje disulfidom, Michaelova reakcija, Schiffovo umreživanje, itd.). Osim stvaranja kovalentih veza, moguća su i ionska umreživanja stvaranjem ionskih kompleksa polimera i odgovarajućih kationa i aniona (npr. alginat – Ca^{2+}).

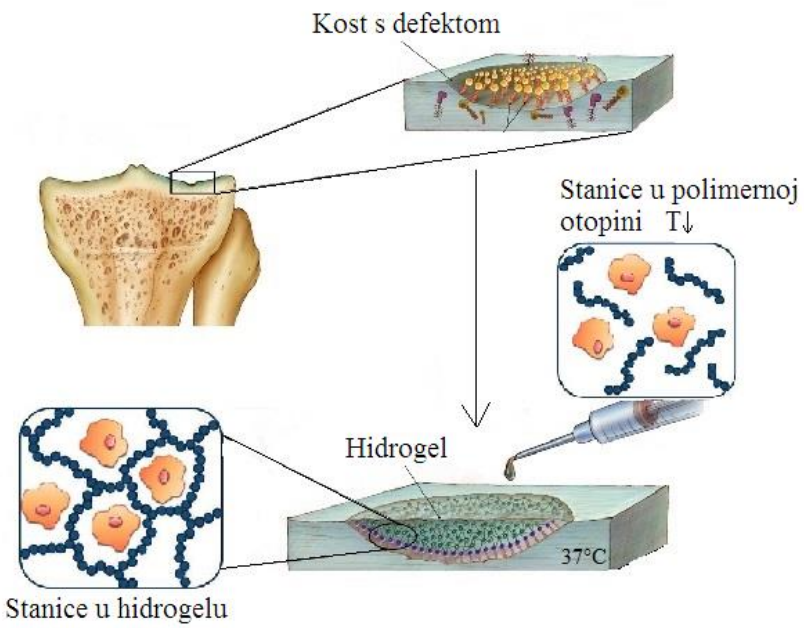
Temperaturno osjetljivim polimerima nije potrebno dodatno kemijsko tretiranje, dok sintetski polimeri i gelirajući agensi mogu negativno utjecati na stanice i okolno tkivo zbog mogućeg stvaranja toksičnih produkata. Zbog toga se češće primjenjuju prirodni polimeri. Među najčešće korištenim prirodnim polimerima kao hidrogelovima su polisaharidi (hitin, kitozan, dekstran, alginat, pektin itd.) i proteini (kolagen, želatina, fibrin itd.). Gotovo svi prirodni polimeri imaju monomerne jedinice slične prirodnoj izvanstaničnoj matrici zbog kojih su biokompatibilniji od sintetskih polimera [9]. U tablici 2 dana je usporedba svojstava prirodnih i sintetskih polimera korištenih za sintezu hidrogelova.

Tablica 2. Usporedba svojstava prirodnih i sintetskih polimera sintezu hidrogelova [9].

Svojstvo	*Prirodni polimeri*	*Sintetski polimeri*
Biokompatibilnost	ovisno o polimeru	ovisno o polimeru
Bioaktivnost	moguća	ograničena
Biorazgradivost	jako dobra	dobra
Propusnost produkta razgradnje	dobra	vrlo dobra
Produkti razgradnje	biokompatibilni	moguće štetni
Mogućnost kemijskih modifikacija	dobra	vrlo dobra
Fleksibilnost na podražaje	dobra	vrlo dobra
Mehanička svojstva	dobra	vrlo dobra
Komercijalna raspoloživost	dobra	vrlo dobra
Varijacija od serije do serije	dobra	vrlo dobra

2.2. Injekcijski hidrogel

Injekcijske hidrogelove moguće je injektirati u dublje slojeve tkiva bez oštećenja okolnog područja, te zbog svoje prirode u potpunosti ispunjavaju oštećeno mjesto. Rezultat toga je manja mogućnost infekcije, neinvazivnost liječenja i smanjena bol pacijenta [6]. Na slici 3 shematski je prikazan postupak injektiranja stanične suspenzije na oštećeno mjesto koštanog tkiva pri čemu dolazi do toplinskog prijelaza materijala iz sola u gel pri 37 °C.

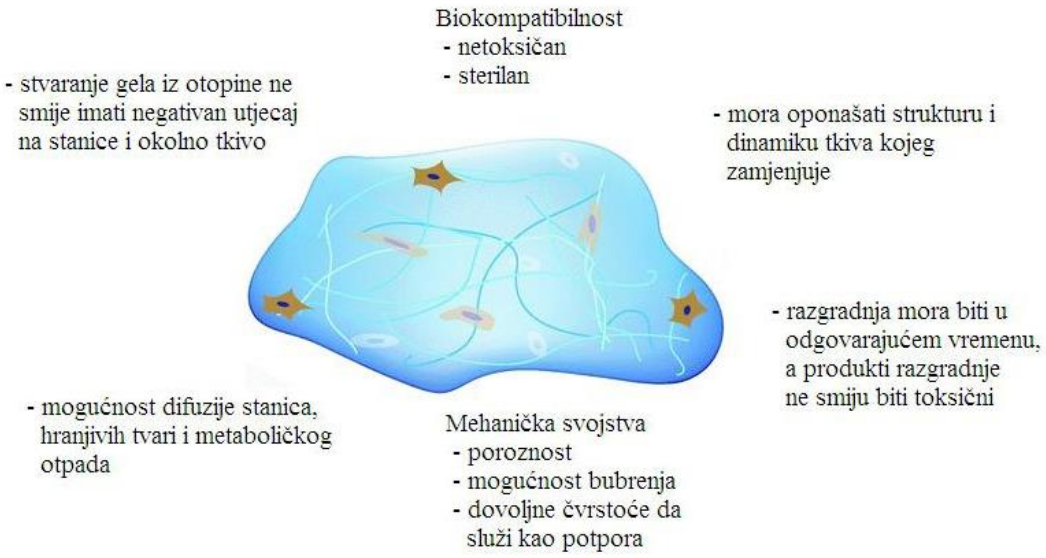


Slika 3. Postupak injektiranja stanične polimerne suspenzije na oštećeno mjesto [10].

Među važnim svojstvima injekcijskih hidrogelova su hidrodinamički volumen, udio vode, propusnost, biokompatibilnost, sklonost biološkoj razgradnji, stabilnost, mehanička svojstva itd. Hidrogelovi su postali zanimljivi znanstvenicima inženjerstva tkiva jer imaju dovoljan hidrodinamički volumen za slobodno stanično kretanje i razmnožavanje, te dostavu odgovarajućih lijekova i faktora rasta. Vodeno okruženje može zaštiti stanice i održavati hranjive tvari na željenom mjestu. [8]. Vodeno okruženje od posebne je važnosti kod neporoznih hidrogelova radi što efikasnije difuzije hranjivih tvari i metaboličkih otpada. Biokompatibilnost je svojstvo materijala da podržava rast stanica i njihovo razmnožavanje uz izostanak toksičnosti i imunološke reakcije tijela na materijal. Injekcijski hidrogel je u stalnom doticaju s okolnim prirodnim tkivom. Iz tog razloga, produkti geliranja ne smiju biti toksični niti uzrokovati imunološke reakcije, te ne smiju oslobađati velike količine topline tijekom geliranja. Brzina razgradnje u fiziološkim uvjetima mora biti jednaka brzini stvaranja novog tkiva. Razgradnja pri fiziološkim uvjetima može biti ubrzana enzimima u tijelu (enzimska razgradnja) pri čemu je moguće kontrolirati otpuštanje inkapsuliranih faktora rasta, lijekova, biomolekula i stanica koje pospješuju obnovu tkiva.

Čvrstoća hidrogela utječe na staničnu pokretljivost, adheziju i razmnožavanje. Na mehanička svojstva hidrogela može se utjecati promjenom koncentracije polimera, načinom pripreme i stupnjem umreživanja. Hidrogelovi su idealna matrica za smještaj stanica i faktora rasta, a nabubreni umreženi hidrofilni polimeri su većinom biokompatibilni s proteinima,

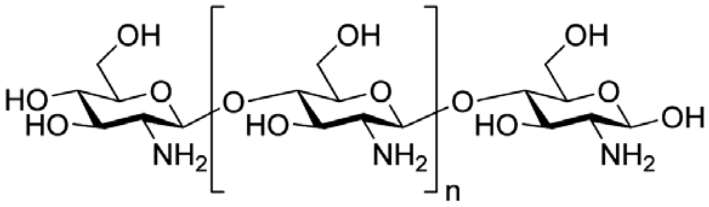
stanicama i okolnim tkivom, te se smatraju prikladnim matricama za inženjerstvo koštanog tkiva [11]. Međutim, nedostaci koji se javljaju primjenom injekcijskih hidrogelova su teškoća rukovanja i sterilizacija [8]. Na slici 4 dani su zahtjevi koje mora ispunjavati injekcijski hidrogel za primjenu u inženjerstvu tkiva.



Slika 4. Svojstva injekcijskog hidrogela za primjenu u inženjerstvu tkiva [10].

2.3. Injekcijski hidrogelovi na temelju kitozana

Hitin i kitozan su biopolimeri koji imaju pogodnu strukturu za kemijske i mehaničke modifikacije s ciljem dobivanja novih svojstava za različite grane industrije, a posebno za biomedicinu. Ubrajaju se u amino polisaharide, višenamjenskih svojstava (biokompatibilnost, biorazgradivost, ekološka prihvatljivost, netoksičnost, antimikrobne aktivnosti i sl.). Sva njihova svojstva i karakteristike su dobra podloga za daljnji razvoj materijala. Hitin u prirodi čini strukturnu komponentu egzokostura rakova, škampa, jastoga i sličnih člankonožaca. On je strukturni biopolimer koji ima istu ulogu kao kolagen u ljudskom i životinjskom organizmu, te kao celuloza u biljkama. Kitozan je kopolimer sastavljen od glukozamina i *N*-acetilglukozamina (slika 5) dobiven procesom deacetilacije hitina reakcijama hidrolize u lužnatim uvjetima ili enzimskom hidrolizom uz enzim hitin deacetilazu. [12].



Slika 5. Struktura isječka makromolekula kitozana [12].

Topljivost kitozana temelji se na slobodnim amino skupinama zbog kojih se kitozan ponaša kao polikation s pK_a vrijednosti od 6,5. Upravo te amino skupine omogućuju pripravu umreženih ili fizikalnih injekcijskih kitozanskih hidrogelova. Najviše istraživanja posvećeno je sustavima kitozana koji tvore temperaturno osjetljive hidrogelove s geliranjem pri fiziološkim uvjetima [13]. Zbog primjene injekcijskih hidrogelova u ljudskom tijelu bitan je izbor otapala. Izbor otapala utječe na mikrobiološka svojstva kitozana, od kojih su vodene otopine slabih organskih kiselina najčešće korištene. Kitozanske soli dobivene iz organskih kiselina (mravlja, octena, propanska kiselina) imaju veću mikrobiološku aktivnost od soli anorganskih kiselina (klorovodična, dušična, fosforna kiselina) [14].

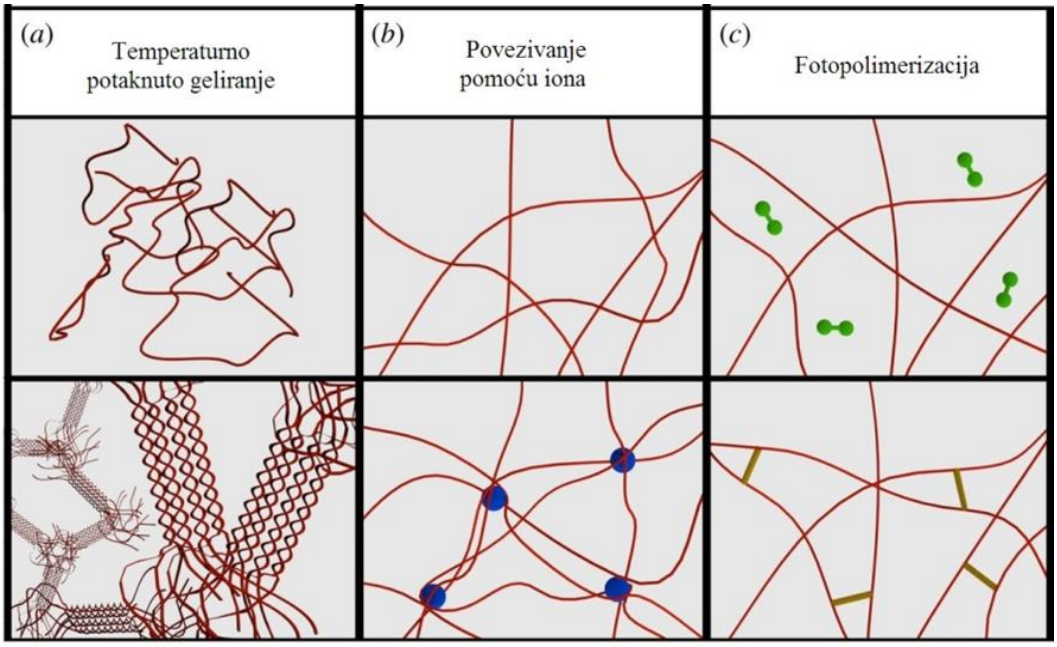
Postoji nekoliko načina geliranja injekcijskih gelova kitozana od kojih se najčešće primjenjuju geliranje fotopolimerizacijom, ionskim vezanjem, temperaturno potaknuto geliranje i geliranje promjenom pH vrijednosti.

2.3.1. Geliranje fotopolimerizacijom

Geliranje injekcijskih hidrogelova fotopolimerizacijom (slika 6) koristi se za proizvodnju bioloških ljepila za meka tkiva i ortopedske biomaterijale. Međutim, fotopolimerizacija zahtjeva prisutnost inicijatora koji može biti toksičan i oslobađati velike količine topline koja oštećuje okolno tkivo [15].

Kitozan/laktoza/azidne skupine

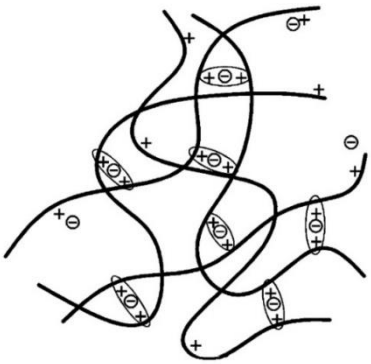
Modifikacija topljivosti kitozana u vodenom mediju pri neutralnoj pH vrijednosti moguća je fotokemijskim cijepljenjem kitozana molekulama laktoze. Kao inicijator za fotopolimerizaciju korištene su fotoaktivne azidne skupine koje tijekom polimerizacije stvaraju vezu između amino skupina kitozana. Geliranje fotopolimerizacijom postignuto je podvrgavanjem cijepljenog kitozana ultraljubičastom zračenju koji je nakon 60 sekundi tretmana prešao u stanje gela [16].



Slika 6. Mehanizam geliranja a) potaknuto temperaturom; b) ionskim vezanjem; c) fotopolimerizacijom [3].

2.3.2. Povezivanje pomoću iona

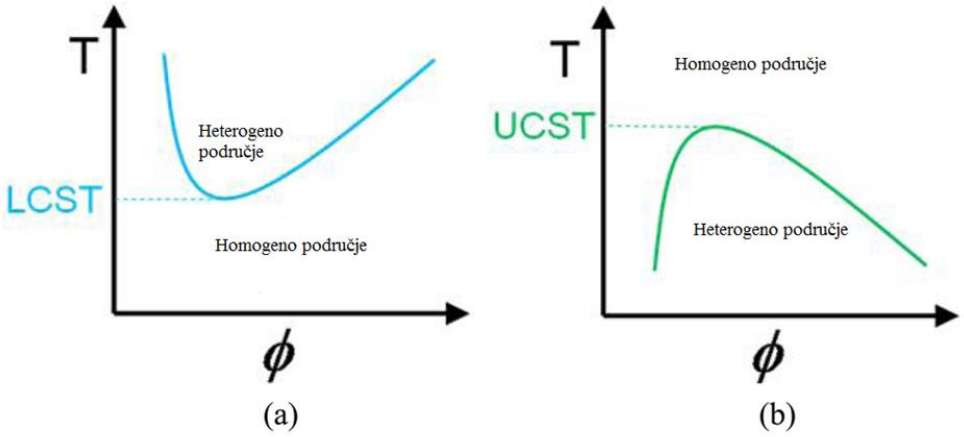
Ionsko povezivanje (slika 6) je metoda koja koristi dvovalentne ili trovalentne ione za povezivanje ioniziranih polimernih lanaca. Ova metoda najčešće se koristi za stvaranje hidrogelova alginata i pektina čiji se lanci mogu povezivati kalcijevim ionima (Ca^{2+}). Ionsko umreživanje kitozana omogućuju anioni koji, zbog negativnog naboja, stvaraju veze elektrostatke prirode između pozitivno nabijenog lanca kitozana (slika 7). Metalni ioni (kationi) omogućuju stvaranje usmjerene kovalentne veze između pozitivnih amino skupina kitozana. Ova vrsta veze je jača u usporedbi s elektrostatksim interakcijama (povezivanje pomoću aniona). Međutim, povezivanje uslijed stvaranja kompleksa s usmjerenim vezama između lanaca i svojstvo polimerne otopine da gelira pri nižim pH vrijednostima nije u potpunosti razjašnjena [17, 18].



Slika 7. Povezivanje lanaca kitozana pomoću aniona [17].

2.3.3. Temperaturom potaknuto geliranje

Sol – gel prijelaz temperaturno osjetljivih gelova može se eksperimentalno odrediti pomoću spektroskopije, diferencijalne pretražne kalorimetrije (DSC) i reologije. Prijelaz iz viskozne tekućine u gel praćen je brzim povećanjem viskoznosti na određenoj temperaturi. Do povećanja viskoznosti dolazi zbog promjene orijentacije polimernih lanaca (slika 6) [2].
Termodinamička stabilnost temperaturno osjetljivih polimernih sustava definirana je donjom ili gornjom kritičnom temperaturom (slika 8). U slučaju polimernog sustava s donjom kritičnom temperaturom (eng. *lower critical solution temperature*, LCST) sustav je homogen pri temperaturi ispod LCST-a, dok iznad donje kritične temperature dolazi do razdvajanja faza kapljevina – kapljevina. Suprotno od sustava s donjom kritičnom temperaturom, hidrogelovi koji nastaju hlađenjem polimerne otopine imaju gornju kritičnu temperaturu (eng. *upper critical solution temperature*, UCST) [15, 19].



Slika 8. Polimerni sustav s a) donjom (LCST); b) gornjom (UCST) kritičnom temperaturom [1].

U vodenim polimernim otopinama tri su vrste međudjelovanja: polimer-voda, polimer-polimer i voda-voda. U LCST-sustavima, porastom temperature vodikove veze između makromolekula polimera i vode postaju sve slabije, polimer postaje hidrofobniji i netopljiviji, dok međudjelovanja polimer – polimer i voda – voda postaju izraženija. Veći broj veza između istovrsnih molekula rezultira povećanjem entropije (ΔS). Slobodna entalpija (Gibbsova energija, ΔG) ovisi o entalpiji (ΔH), entropiji i temperaturi (T):

$$\Delta G = \Delta H - T\Delta S \qquad (1)$$

Porastom temperature, negativni temperaturno-entropijski član $-T\Delta S$ u jednadžbi (1) može prevladati pozitivnu entalpiju što rezultira sniženjem vrijednosti Gibbsove energije i reverznim stvaranjem fizikalnog hidrogela koji ponovnim sniženjem temperature ispod donje kritične temperature se vraća u stanje otopine [15, 20].

Kitozan/poliol

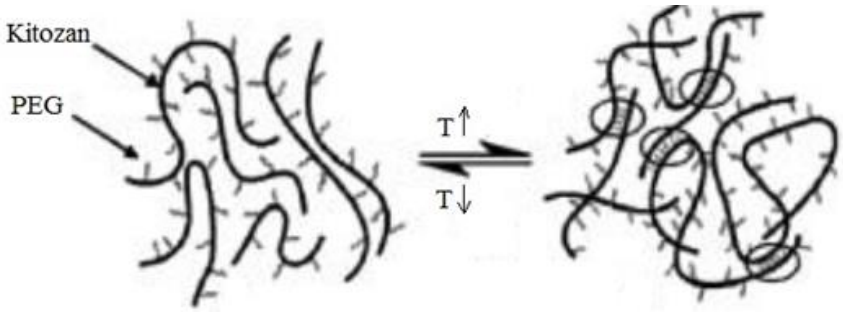
Poliol posjeduje sposobnost stabilizacije polimernih molekula u vodenom mediju uslijed veće hidratacije makromolekula. Kada se u kitozanskoj mreži nalaze komponente s hidroksilnim skupinama, kitozanski lanci ne mogu stvarati hidrogel pri niskim temperaturama. Međutim, porastom temperature dolazi do povećanja energije molekula vode te njihovog odvajanja od makromolekula kitozana, što povećava interakcije kitozan – kitozan, tj. stvaranje hidrogela [21].

Kitozan/hidroksibutil

Hidroksibutilne skupine vezane su na hidroksilne i amino skupine kitozana, te takav kompozit brzo stvara hidrogel pri povišenoj temperaturi. Na temperaturi ispod LCST-a vodikove veze postoje između –OH skupina hidroksibutila, –OH i $–NH_2$ skupina kitozana i –OH skupina hidroksibutila i vode, tj. može se zaključiti da su hidroksibutil kitozanski lanci okruženi molekulama vode. Kada je temperatura viša od LCST-a vodikove veze slabe. Molekulama vode se povisuje energija i više ne okružuju makromolekule hidroksibutil kitozana. Veze između molekula hidroksibutil kitozana jačaju što rezultira stvaranjem gela. Ovaj prijelaz je reverzan [21]. Chen i sur.[22] pripravili su ovakav hidrogel sa sol – gel prijelazom nakon 60 sekundi inkubiranja pri 37 °C.

Kitozan/PEG

Polietilen glikol, PEG, koristi se u biomedicini zbog hidrofilnosti, biokompatibilnosti i netoksičnosti. Otopina PEG-a je nestabilna pri povišenim temperaturama zbog prijelaza u manje polarno stanje uslijed čega je polimerni sustav kitozan/PEG toplinski osjetljiv. Pri nižoj temperaturi, kitozanski lanci su prekriveni molekulama vode vezanim vodikovim vezama. Vodikova veza se stvara između hidrofilnih grupa PEG-a i molekula vode. Povećanjem temperature dolazi do pucanja vodikovih veza i povećanja hidrofobnih svojstava lanaca kitozana. Polimerni sustav kitozan/PEG gelira opisanim mehanizmom kada je udio PEG-a najmanje 44 – 55%. Mehanizam geliranja prikazan je na slici 9 [21].



Slika 9. Interakcije kitozan/PEG sustava pri reverznom sol – gel prijelazu [21].

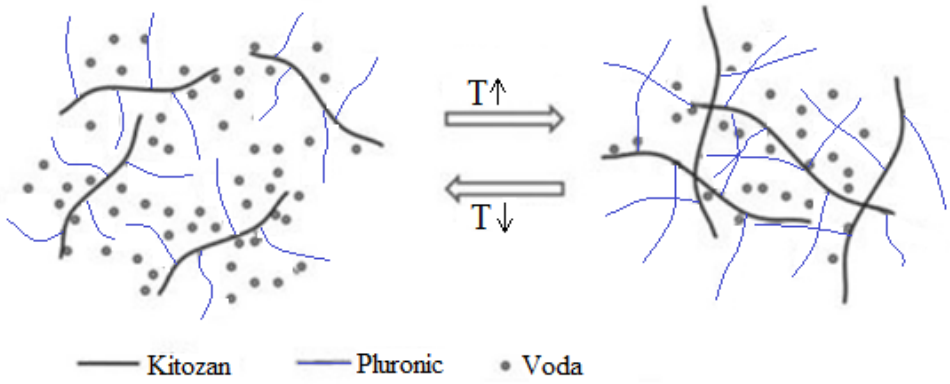
Kitozan/PNIPAAm

Poli(*N*-izopropilakrilamin), PNIPAAm poznati je temperaturno osjetljivi polimer. Prijelaz iz hidrofilne u hidrofobnu strukturu događa se pri temperaturi 30 – 35 °C (LCST sustav). Ispod LCST-a PNIPAAm je dobro topljivi u vodi, dok iznad dolazi do slabljenja veza između polimera i vode i prijalaza u hidofobnu strukturu. Kombinacija kitozana i PNIPAAm-a je među najčešće istraživanim temperaturno osjetljivim hidrogelovima. Na LCST temperaturu utječe PNIPAAm dok dodatak kitozana ne mijenja temperaturu prijelaza iz stanja sola u stanje gela.

Kitozan/Pluronic®

Triblok kopolimer poli(etilen oksid) – poli(propilen oksid) – poli(etilen oksid), PEO-PPO-PEO, (Pluronic®) je temperaturno osjetljiv polimer. LCST se može kontrolirati udjelom hidrofobnog PPO segmenta prema hidrofilnom PEO segmentu. Veći udio PPO-a pridonosi nižoj LCST vrijednosti. Većina PEO-PPO-PEO ima LCST iznad tjelesne temperature dok

PluronicF127 gelira pri 25 °C. Kitozan/*PluronicF127* gelira pri temperaturi 30 – 35 °C. Na slici 10 shematski je prikaz reverznog prijelaza kitozan/Pluronic® sustava [21].



Slika 10. Interakcije kitozan/Pluronic® ovisno o temperaturi [21].

2.3.4. Geliranje neutralizacijom potpomognuto temperaturom

Geliranje inicirano promjenom pH vrijednosti moguće je provesti na pH osjetljivim polimerima kao što je kitozan. Kitozan je topljiv pri nižoj pH vrijednosti, a nakon injektiranja u tijelo uslijed porasta pH, kitozan prelazi u stanje hidrogela. U razrijeđenim kiselinama (pH $\leq$ 5) kitozan postaje topljiv uslijed protoniranja amino skupina u polimernom lancu. Topljivost kitozana ovisi o pH vrijednosti medija, molekulskoj masi, stupnju deacetiliranja i čistoći sirovine. Kako je pK_a kitozana 6,5, pri fiziološkim uvjetima kitozan stvara hidrogel deprotoniranjem funkcionalnih skupina.

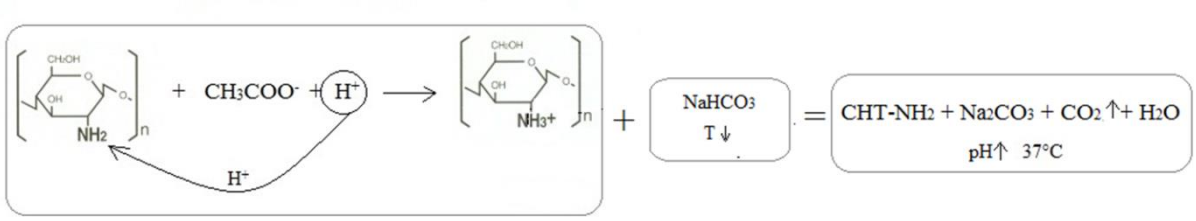
Kitozan/glicerofosfat

Kitozan/glicerofosfat (kitozan/GP) je temperaturno osjetljiva otopina posebna po sol – gel prijelazu pri tjelesnoj temperaturi. Kitozan/GP je fizikalni hidrogel koji se stvara pri povišenim temperaturama pri kojima su vodikove veze između kitozan/GP i vode nestabilne. Kitozan/GP hidrogel ima heterogenu mikrostrukturu s područjima većeg udjela vode ili polimera (agregati polimernih lanaca). GP u polimernoj otopini povećava pH vrijednost do 7.0 – 7.4. Također, sprječava prebrzo geliranje kitozanske otopine (prije injektiranja) vezanjem fosfatne skupine s protoniranim amino skupinama kitozana, tj. dovođenjem glicerolnih skupina između lanaca kitozana. Pri niskim temperaturama GP potiče hidrataciju kitozanskih lanaca i veze kitozan – voda, sprječavajući hidrofobne interakcije. Povišenjem

temperature molekule vode između lanaca kitozana se uklanjaju pomoću glicerolnih skupina što potiče geliranje. GP nakon geliranja ne zaostaje u hidrogelu već slobodno izlazi procesom difuzije [21]. Ovakav tip geliranja ostvariv je upravo zbog polielektolitne prirode kitozana.

Kitozan/$NaHCO_3$

Temperaturno osjetljivi gelovi na temelju kitozana geliraju pri 37 °C što ih čini idealnima za stvaranje injekcijskih hidrogelova. Fazna transformacija iz homogenog u heterogeni sustav povezana je s vezama kitozan – voda, kitozan – kitozan i molekule vode, te ovisi o stupnju deacetilacije i molekulskoj masi kitozana. Brzina geliranja ovisi o stupnju deacetilacije, temperaturi, pH vrijednosti medija i dodatnoj tvari za geliranje (neutralizaciju) [13]. Jedan od jednostavnijih i djelotvornih načina geliranja kitozana je temperaturno osjetljiva neutralizacija pomoću natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$). Ispod temperature faznog prijelaza, makromolekule kitozana zadržavaju se u otopini zahvaljujući otapalu koje ga okružuje, vodikovim vezama između hidrofilnih dijelova makromolekule i molekula vode. Porast temperature uzrokuje slabljenje vodikovih veza između kitozana i vode te jačanje kitozan – kitozan interakcija (dipolne, vodikove, van der Waalsove i dr.), tj. makromolekule kitozana se počinju međusobno približavati što vodi ka promjeni orijentacije u oblik klupka i stvaranjem hidrogela [14, 20, 23]. Na slici 11 prikazan je mehanizam geliranja kitozana dodatkom natrijeva hidrogenkarbonata pri tjelesnoj temperaturi.



Slika 11. Mehanizam geliranja (neutralizacije) kitozana s natrijevim hidrogenkarbonatom.

Geliranje kitozana uz pomoć natrijeva hidrogenkarbonata temelji se na raspadu natrijeva hidrogenkarbonata uslijed niske pH vrijednosti kitozanske otopine. Raspad natrijeva hidrogenkarbonata (jednadžba 2) popraćena je oslobađanjem ugljikova (IV) oksida (CO_2) pri čemu dolazi do neutralizacije, odnosno početka taloženja kitozana. Također, oslobođeni CO_2 može povećati poroznost hidrogela.

$$2\ NaHCO_3 \rightarrow Na_2CO_3 + CO_2 + H_2O\ (\uparrow \text{temp.}) \qquad (2)$$

Tijekom umiješavanja $NaHCO_3$, kitozan je djelomično neutraliziran i doveden blizu točke taloženja. Potom se sustav kitozan/$NaHCO_3$ zagrijava na tjelesnu temperaturu pri čemu dolazi do deprotoniranja kitozana. Ukoliko je koncentracija $NaHCO_3$ dovoljna za deprotoniranje svih amino skupina kitozana, doći će do sol – gel prijelaza. Umreživanje između kitozana i $NaHCO_3$ ne postoji, nego je geliranje rezultat neutralizacije kitozana koje je potpomognuto povišenjem temperature. Nastala sol Na_2CO_3 kao produkt geliranja nije toksična, te izlazi iz hidrogela procesom difuzije [14].

2.4. Injekcijski hidrogelovi za obnovu koštanog tkiva

Prisutnost apatita u hidrogelu poboljšava proliferaciju, diferencijaciju matičnih stanica u osteoblastne (koštane) stanice *in vitro* i stvaranje novog koštanog tkiva *in vivo*. Istraživanja pokazuju da hidroksiapatit (HA, $Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$) može značajno povećati biokompatibilnost i biološku aktivnost umjetnih biomaterijala korištenih za inženjerstvo koštanog tkiva posebice ukoliko se stvara nestehiometrijski hidroksiapatit ($Ca_{10-x}(HPO_4)_x(PO_4)_{6-x}(OH)_{2-x}$) s omjerom kalcija i fosfata Ca/P ≠ 1,67. Osim visoke biokompatibilnosti, hidroksiapatit potiče bržu obnovu kosti i izravno se veže na obnovljenu kost uz izostanak imunološke reakcije, dok se ostali bioaktivni materijali vežu preko stvorenog karbonatnog hidroksiapatita ($Ca_{10-x/2}[(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x][(OH)_{2-2y}(CO_3)_y]$). Nestehiometrijski hidroksiapatit ima mogućnost supstitucije različitih iona poput Na^+, K^+, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Cl^-, F^-, HPO_4^{2-}. Ionska supstitucija utječe na apsorpciju proteina na samu okosnicu [16-18]. Sposobnost ionske supstitucije omogućuje pripravu nestehiometrijskog hidroksiapatita veće bioresorpcije *in vitro* i *in vivo*. Većina sintetskih hidroksiapatita je stehiometrijska, dok su hidroksiapatiti dobiveni iz prirodnih izvora nestehiometrijski. Nestehiometrijski hidroksiapatit omogućuje stvaranje biološkog hidroksiapatita i time je pogodniji za obnovu koštanog tkiva [24-27].

Metoda taloženja je najjednostavnija metoda pomoću koje se HA dobiva pri sobnoj temperaturi. Ova se metoda temelji na reakciji između iona kalcija i fosfata pri kontroliranoj temperaturi i pH vrijednosti. Također, na veličinu i oblik kristala hidroksiapatita utječe i polimerna matrica unutar koje se sintetiziraju. Kitozanska matrica utječe na oblik i rast kristala HA zbog organsko – anorganskih interakcija između komponenata (kovalentne veze, ion-dipolne veze, stvaranje kompleksa Ca^{2+} s hidroksilnim, amino ili acetilamino skupinama).

U ovom istraživanju za sintezu hidroksiapatita primijenjena je metoda taloženja pri kojoj su kao izvori kalcijevih i fosfatnih iona korišteni kalcijev karbonat ($CaCO_3$) i urea fosfat (UPH, $H_3PO_4 \times (NH_2)_2CO$). Zbog prisutnosti karbonatnih iona moguće je dobivanje karbonatnog hidroksiapatita, a kontrolom pH vrijednosti može se postići transformacija hidroksiapatita hidrolizom iz primarno stvorenog oktakalcij hidrogenfosfata pentahidrata (OCP, $Ca_8H_2(PO_4)_6 \times 5H_2O$). Sinteza karbonatnog hidroksiapatita od posebnog je interesa u istraživanjima zbog strukturne sličnosti mineralnoj fazi prirodnog koštanog tkiva. Supstitucija karbonatnim ionima moguća je na mjestu hidroksilne i fosfatne skupine hidroksiapatita [27, 28].

Struktura OCP-a građena je od naizmjeničnog slaganja apatitnog i hidratizirajućeg sloja što čini slojevitu strukturu. Slojevi su međusobno povezani van der Waalsovim privlačnim silama ili vodikovim vezama. Kristali OCP-a su mali i gotovo uvijek pločastog oblika. Materijali s OCP-om pokazuju bolju obnovu koštanog tkiva od materijala koji sadrže samo hidroksiapatit kao bioaktivnu komponentu. To može biti posljedica bolje biološke aktivnosti OCP kristala koji pospješuju diferencijaciju koštanih stanica (osteoblasta i osteoklasta) *in vivo*. OCP ima utjecaj na aktivnost osteoblasta pri prijelazu u svoje termodinamički stabilnije stanje (HA) pri fiziološkim uvjetima. Pozitivni efekt OCP-a ovisi o kristalnoj strukturi i morfologiji, koji opet ovise o načinu pripreme. OCP je prekursor biološkiog apatita (karbonatnog hidroksiapatita) što upućuje na potencijalno veću biološku aktivnost pripravljenih OCP-hidrogelova [29, 30].

Kako se dobiveni materijali namjeravaju primijeniti u obnovi malih koštanih defekata, prisutnost kalcijeva fosfata u hidrogelu smatra se poželjnim. Dobiveni hidrogelovi s hidroksiapatitom kao anorganskom fazom namjeravaju se koristiti za popunjavanje šupljina i defekata koštanog tkiva malih dimenzija za koje nisu potrebna dobra mehanička svojstva, te kao „dostavljači“ matičnih stanica.

2.5. Citotoksičnost injekcijskih hidrogelova

Kitozan je prirodni polimer siguran za ljudsko tijelo. Sadrži pozitivno nabijene amino skupine koje pozitivno utječu na adheziju stanice negativnog površinskog naboja. Prijašnja istraživanja su pokazala da epitelne stanice rastu na filmu kitozana, ali da je stanična adhezija i rast otežan kod nasađivanja stanica na hidrogel. *In vitro* ispitivanje citotoksičnosti u

hidrogelu pokazalo je da ljudske kožne stanice (fibroblasti), stanice mišića i endotelne stanice se ne zadržavaju niti rastu na površini hidrogela ako je geliranje potaknuto UV zračenjem.

Proveden je veliki broj *in vitro* istraživanja s različitim vrstama stanica te *in vivo* uzgajanja kitozan/glicerofosfat hidrogelova s različitim stupnjem deacetilacije kitozana (40 – 50%). Netoksičnost tih gelova potvrđena je s 80% staničnog preživljavanja kroz nekoliko tjedana. Stupanj deacetilacije ključan je za brzinu razgradnje i imunološki odgovor tijela. Niži stupanj deacetilacije rezultira kratkim vremenom zadržavanja u tijelu i većom imunološkom reakcijom [16].

2.5.1. Metode procjene životne aktivnosti stanica

MTT test

MTT test daje procjenu vijabilnosti (preživljavanja) stanica mjerenjem aktivnosti mitohondrijskog enzima koji reducira tetrazolijeve soli (MTT) na formazan topljiv u zakiseljenom izopropilnom alkoholu. Dobiveno ljubičasto obojenje analizira se spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini. Količina nastalog formazana direktno je proporcionalna broju živih stanica. MTT test za određivanje citotoksičnosti odobren je kao standardizirani test od strane Međunarodne organizacije za standarde (ISO). Materijal se smatra citotoksičnim ako je vijabilnost stanica ispod 70% od početnog broja nasađenih stanica [31].

MTT test može biti: 1) *direktan* pri čemu se ispituje vijabilnost nasađenih stanica direktno na materijalu; 2) *indirektan* gdje se citotoksičnost materijala ispituje preko hranjenja prethodno uzgojenih stanica ekstraktom medija u kojem se materijal inkubirao. Direktan MTT test osim citotoksičnosti daje uvid i u proliferaciju stanica na trodimenzijskoj okosnici, te realniju informaciju utjecaja materijala na migraciju i rast nasađenih stanica.

„Live/dead“ metoda

Za razliku od MTT testa koji kvantitativno određuje preživjele stanice, *live/dead* metoda je kvalitativna. *Live/dead* najčešće je primjenjivana metoda ispitivanja citotoksičnosti i distribucije živih i mrtvih stanica na ispitivanom materijalu. Metoda se temelji na tehnici bojanja čiji se rezultat prati fluorescentnom mikroskopijom. Svaka stanica sadrži enzim esterazu koji u reakciji s bojom acetometoksi kalcein (kalcein AM, $C_{46}H_{46}N_2O_{23}$) hidrolizom stvara kalcein zelene fluorescencije. Za razliku od kalceina, etidijum homodimer (EthD-1)

ulazi u stanice s oštećenom membranom te nakon vezanja s nukleinskim kiselinama (DNK) boji stanicu crveno. EthD-1 ne oštećuje niti reagira s živim stanicama. Prednost ove metode je što su kalcein AM i EthD-1 nefluorescentni spojevi prije reakcije sa živim, odnosno mrtvim stanicama, te ne interferiraju s pozadinskim zračenjem [23].

3. Eksperimentalan dio

3.1. Materijali

Za pripravu istraživanih materijala korišteni su:

- Kitozan, CHT, M_w = 100 – 300 kg/mol, stupanj deacetilacije, DD = 0,95 – 0,98 (Across Organics, Belgija)
- Octena kiselina, CH_3COOH, (POCH, Poljska)
- Kalcijev karbonat, kalcit, $CaCO_3$, p.a. (TTT, Hrvatska)
- Urea fosfat, UPH, $CO(NH_2)_2 \times H_3PO_4$ (Sigma-Aldrich, SAD)
- Natrijev hidrogenkarbonat, $NaHCO_3$ (Gram-Mol, Hrvatska).

3.2. Sinteza materijala

Priprava materijala može se podijeliti u dva dijela: 1) sinteza hidroksiapatita unutar otopine kitozana (CHT-HA) *in situ* metodom; 2) priprava kompozitnih injekcijskih hidrogelova uz pomoć gelirajućeg agensa, natrijeva hidrogenkarbonata ($NaHCO_3$).

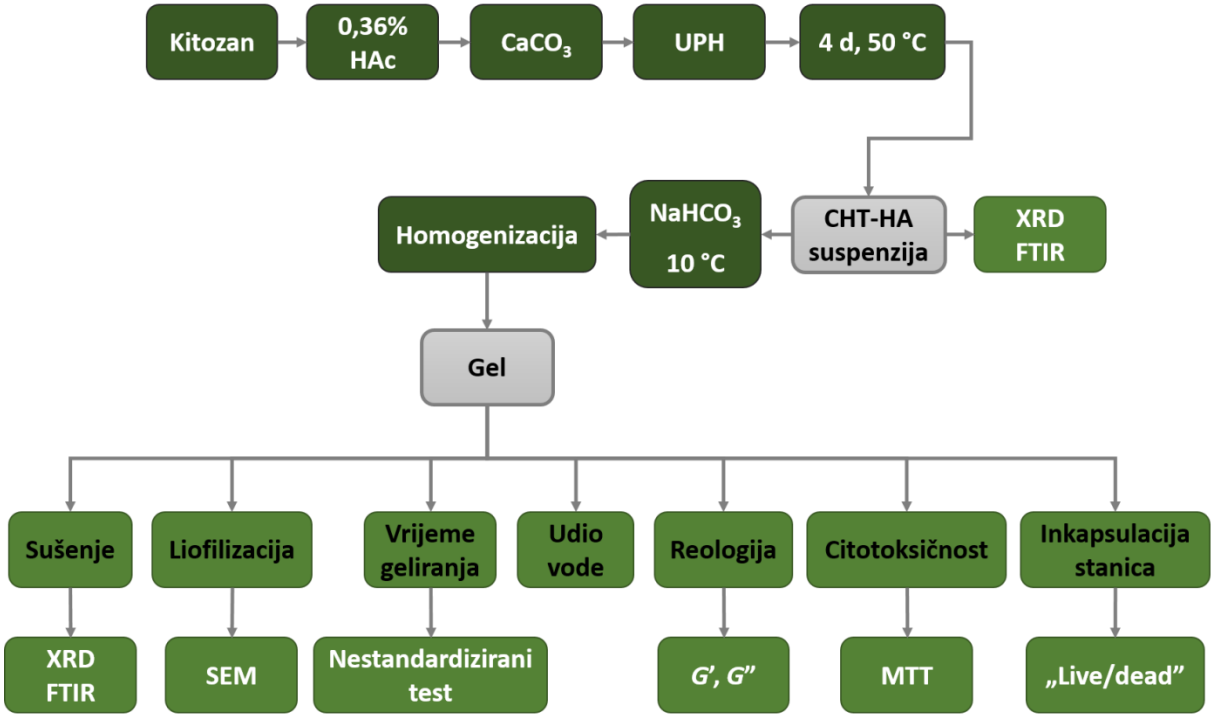
3.2.1. *In situ* sinteza hidroksiapatita u otopini kitozana

In situ sinteza hidroksiapatita u otopini kitozana provedena je na sljedeći način: kitozan je otopljen u 0,36 % otopini octene kiseline (HAc) s konačnim masenim udjelom od 1,2%. Potom, dodana je odgovarajuća količina kalcita do njegove potpune suspenzije u polimernoj otopini. Nakon potpunog suspendiranja kalcita, dodana je odgovarajuća količina uree fosfata (UPH) kako bi se postigao Ca/P omjer od 1,67. Reakcija se provodila sljedeća 4 dana na temperaturi od 50 °C. Prekursori kalcijevih i fosfatnih iona dodani su u odgovarajućim količinama kako bi konačni maseni udio *in situ* sintetiziranog HA u kompozitnoj suspenziji iznosio 30% (slika 12).

3.2.2. Priprava injekcijskog hidrogela

Kompozitna kitozan-hidroksiapatit suspenzija (CHT-HA) pripravljena prema poglavlju 3.2.1. korištena je za sintezu injekcijskih hidrogelova. Prethodno dobivena CHT-HA suspenzija ohlađena je na temperaturu od 10 °C uz pomoć ledene kupelji. U tako

ohlađenu suspenziju dodana je vodena otopina natrijeva hidrogenkarbonata različitih koncentracija od 0,04 mg/L, 0,053 mg/L i 0,067 mg/L. Homogenizacija CHT-HA/$NaHCO_3$ sustava vršila se 30 sekundi uz snažno miješanje. Nakon homogenizacije sustav je inkubiran na 37 °C kako bi se potaknulo geliranje. Dobiveni fizikalno-umreženi hidrogelovi imenovani su Gel-L, Gel-M i Gel-H.



Slika 12. Dijagram toka priprave istraživanih materijala.

3.3. Karakterizacija

3.3.1. Vrijeme geliranja

Vrijeme geliranja hidrogelova različitih koncentracija gelirajućeg agensa procijenjeno je nestandardiziranom metodom. Nakon homogenizacije CHT-HA/$NaHCO_3$ sustava pri temperaturi nižoj od 10 °C, 200 µL pojedine CHT-HA/$NaHCO_3$ suspenzije otpipetirano je u mikrotitarsku pločicu s 24 bunarića. Potom, mikrotitarska pločica inkubirana je na 37 °C radi geliranja. Nakon dvije minute inkubacije, ispitana je strukturna stabilnost dobivenih fizikalno-umreženih gelova, Gel-L, Gel-M i Gel-H, pomoć metalne lopatice. Kao kontrolni uzorak koristila se CHT-HA suspenzija bez gelirajućeg agensa.

3.3.2. Mjerenje pH vrijednosti hidrogela

pH vrijednost CH-HA/$NaHCO_3$ sustava različitih koncentracija gelirajućeg agensa mjerena je prije i nakon geliranja na Schottovom CG 842 pH-metru uz BlueLine 14 elektrodu s preciznošću od pH = 0,01.

3.3.3. Infracrvena spektroskopska analiza s Fourierovim transformacijama

Dobiveni materijali sušeni su pri 40 °C i karakterizirani infracrvenom spektroskopskom analizom s Fourierovim transformacijama (FTIR). FTIR spektri istraživanih sustava snimljeni su ATR-FTIR Bruker Vertex 70 spektrometrom s dijamantnim kristalom. Spektri su snimani 16 puta u apsorpcijskom režimu i rasponu mjernog područja od 4000 do 400 cm^{-1} s rezolucijom od 4 cm^{-1} pri 20 °C.

3.3.4. Kvalitativna rendgenska difrakcijska analiza

Mineraloški sastav sušenih hidrogelova određen je rendgenskom difrakcijskom analizom (XRD) na Shimadzu XRD-6000 instrumentu s CuK_α zračenjem pri 40 kV i 30 mA, u mjernom području kuteva $5° < 2\theta < 70°$ brzinom snimanja od 0,2 °/s. Identifikacija kristalnih faza provedena je uz pomoć ICDD baze podataka (engl. *The International Centre for Diffraction Data*).

3.3.5. Udio vode u hidrogelu

Udio vode u fizikalno-umreženom hidrogelu određen je gravimetrijskom metodom. Geliranje CHT-HA/$NaHCO_3$ suspenzije provodilo se 10 minuta pri 37 °C nakon čega se uzorak vagao (*m*(mokri)). Potom je hidrogel sušen na 50 °C 4 dana kako bi se odredila masa suhog uzorka, *m*(suhi). Udio vode u fizikalno-umreženom hidrogelu izračunat je prema jednadžbi 3:

$$w\ (voda) = \frac{m(mokri) - m(suhi)}{m(mokri)} \qquad (3)$$

Apsorpcija vode fizikalno-umreženog gela određena je gravimetrijskom metodom pri 37 °C uz fosfatni pufer (PBS, engl. *phosphate buffer saline*, pH = 7,4) kao ispitivani medij.

3.3.6. Pretražna elektronska mikroskopija

Morfologija liofiliziranih hidrogelova istražena je pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) na instrumentu TESCAN Vega3SEM Easyprobe pri energiji elektronskog snopa od 10 kV. Neposredno prije snimanja, uzorci su izloženi utjecaju plazme zlata i paladija 120 sekundi.

3.4. Reološka svojstva

Reološka svojstva hidrogela ispitivana su na reometru Discovery HR-2 Hybrid Rheometer (TA Instruments) pri 37 °C s Peltier pločicom za sprječavanje isparavanja vode. Provedena su ispitivanja utjecaja vremena (t_s), smične deformacije (γ) i kutne frekvencije (ω) na smični modul pohrane (G') i gubitka (G'') hidrogela. Sva mjerenja izvedena su na pločici promjera 20 mm s razmakom nepomične i pomične pločice od 940 μm pri čemu je korišten volumen ispitivanog uzorka od 322 μL.

Vremenska ovisnost smičnog modula pohrane i gubitka ispitivana je na *in situ* geliranju uzorka hidrogela pri smičnoj deformaciji od 2% i kutnoj frekvenciji od 0,2 Hz.

Utjecaj amplitude deformacije na čvrstoću fizikalno-umreženog hidrogela praćen je u rasponu deformacija od 0,01 do 100% pri frekvenciji od 0,2 Hz.

Ovisnost modula pohrane i gubitka fizikalno-umreženog hidrogela o frekvenciji ispitan je u području kutne frekvencije od 100 do 0,01 Hz pri konstantnoj deformaciji linearnog viskoelastičnog područja hidrogela.

3.5. Biološka karakterizacija

Za biološku evaluaciju injekcijskih hidrogelova, provedene su sinteze materijala s polaznim komponentama steriliziranima UV zračenjem u trajanju od 15 minuta, odnosno filtriranjem kroz sterilne filtre s porama od 0.22 μm ((TPP), Švicarska). Biološka karakterizacija sterilnog hidrogela uključuje analizu citotoksičnosti ekstrakta hidrogela na vijabilnost mišjih stanica fibroblasta, te evaluaciju životne aktivnosti mišjih fibroblasta inkapsuliranih u hidrogelu u trajanju do 7 dana uzgoja.

3.5.1. Citotoksičnost hidrogela

Analiza citotoksičnosti ispitana je na mišjim stanicama embrionalnih fibroblasta, ekstraktom hidrogela namakanog u biološkom mediju. Analiza je provedena u triplikatima. Sterilni hidrogel namakan je 24 sata u biološkom mediju. Dobiveni ekstrakt korišten je za hranjenje uzgojenih mišjih fibroblasta. Kao negativna kontrola citotoksičnosti uzet je standardni biološki medij (DMEM, engl. *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*).

U međuvremenu, mišje stanice fibroblasta uzgajane su u DMEM mediju nadopunjenom s 10% goveđeg seruma u atmosferi zraka s 5% CO_2 pri 37 °C. Prije presađivanja, konfluentnost (raširenost) stanica (80 – 90 %) provjerena je invertnim mikroskopom (Zeiss, Axiovert 40 CFL). Odvajanje stanica provedeno je tripsinizacijom uz pomoć otopine enzima tripsina (0,25%) u atmosferi zraka s 5% CO_2 pri 37 °C na 5 min, nakon čega je dobivena suspenzija stanica. Stanice su nasađene na mikrotitarsku pločicu s 96 bunarića (5×10^3 stanica/bunarić), te inkubirane u atmosferi zraka s 5% CO_2 pri 37 °C.

Nakon jednog dana inkubacije, DMEM medij je zamijenjen s ekstraktom hidrogela. Nakon 1, 2 i 3 dana uzgoja proveden je MTT test uz (3-(4,5-dimetiltiazol-2-ilo)-2,5-difeniltetrazol bromid) (Sigma-Aldrich, SAD). Mjerenje je provedeno na čitaču mikrotitarskih pločica ThermoLabSystems MultiskanEX Microplate Reader pri valnoj duljini od 570 nm.

3.5.2. Životna aktivnost inkapsuliranih stanica

Postupak odvajanja uzgojenih mišjih stanica fibroblasta opisan je u poglavlju 3.5.1. Dobiveni stanični pelet korišten je za inkapsulaciju stanica s gustoćom 1×10^6 stanica/200 μL CHT-HA/$NaHCO_3$ suspenzije u mikrotitarskoj pločici s 24 bunarića. Uzorci su inkubirani u DMEM mediju nadopunjenom s 10% goveđeg seruma u atmosferi zraka s 5% CO_2 pri 37 °C na 1, 2, 3 i 7 dana. Svježi medij mijenjan je svaka tri dana.

Životna aktivnost mišjih stanica fibroblasta inkapsuliranih u hidrogelu u periodu od 1, 2, 3 i 7 dana istražena je pomoću „live/dead“ metode bojanja uz primjenu Live/Dead® Viability/Cytotoxicity Kit (Invitrogen). Nakon određenog vremena, uzorci hidrogelova s inkapsuliranim stanicama ispirani su tri puta PBS puferom radi uklanjanja seruma i fenolnog crvenila, te inkubirani s 2 μmol/dm^3 otopinom kalcein-acetoksimetila (kalcein-AM) i 4 μmol/dm^3 otopinom etidij homodimera (EthD-1) na 37 °C u atmosferi zraka s 5% CO_2 na 30 minuta. Obojani uzorci istraženi su uz pomoć fluorescentnog mikroskopa (Axiovert 200

M, Zeiss, Göttingen, Germany uz AxioVision software 4.5). Žive stanice obojane kalceinom javljaju se u zelenoj boji, a mrtve obojane EthD-1 u crvenoj.

3.6. Statistička obrada

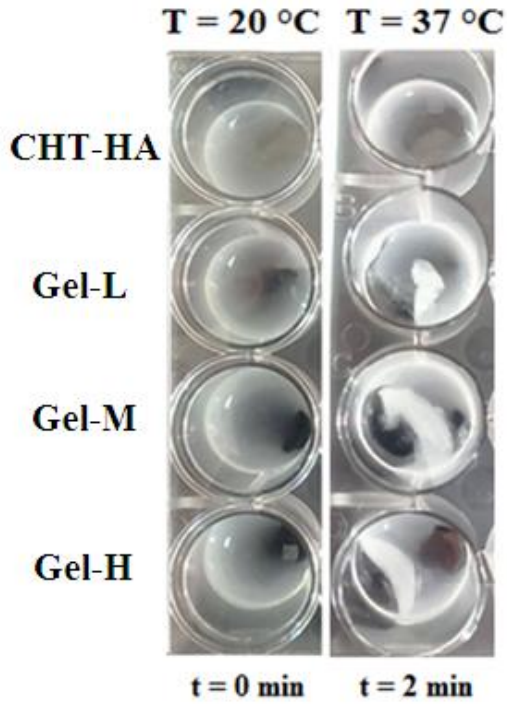
Rezultati eksperimentalnih mjerenja izraženi su kao srednja vrijednost ± standardno odstupanje. Statistička usporedba dviju grupa uzoraka provedena je ANOVA analizom uz značajnu razliku $p < 0,05$.

4. Rezultati i rasprava

4.1. Vrijeme geliranja hidrogelova

Vrijeme geliranja hidrogelova s različitom koncentracijom $NaHCO_3$ procijenjeno je na temelju stabilnosti gelova nakon 2 minute inkubacije pri 37 °C (slika 13). Stabilnost hidrogelova ispitana je na 200 µL pojedinog hidrogela, čiji volumen odgovara volumenu za buduća *in vitro* uzgajanja. Pripremljeni hidrogelovi se namjeravaju koristiti kao stanični „dostavljači" matičnih stanica za obnovu manjih koštanih oboljenja. Prema Spiceru i sur. [32] defekt kritične veličine (engl. *critical size defect*) je defekt najmanje dimenzije koji nema mogućnost potpunog obnavljanja tijekom života organizma. Kritična veličina defekta definira se kao 2 – 2,5 puta dulja od promjera oboljelog dijela kosti. Promjer defekta kritične veličine kod miša iznosi 5 mm, psa 20 mm, ovce 22 mm, a majmuna i zeca 15 mm [33]. Međutim, kritični promjer nije moguće strogo definirati jer ovisi o starosti živog organizma, položaju koštanog defekta u tijelu, strukturi i prokrvljenosti kosti, mehaničkom opterećenju kojem je izložena ozlijeđena kost itd. Utvrđene vrijednosti mogu poslužiti za usmjerenje istraživanog volumena fizikalno-umreženog hidrogela [34]. Stoga je za procjenu brzine geliranja hidrogelova korištena mikrotitarska pločica s 24 bunarića kojoj promjer bunarića iznosi 15,6 mm.

Za isto vrijeme inkubacije, struktura hidrogelova s nižom koncentracijom $NaHCO_3$ (Gel-L i Gel-M) se dezintegriarala, dok je Gel-H pokazao zadržani oblik i stabilnu strukturu nakon ispitivanja metalnom lopaticom. Polimerna suspenzija CHT-HA bez gelirajućeg agensa nije promijenila svoj oblik. Koncentracija $NaHCO_3$ u ukupnom volumenu hidrogela Gel-L iznosi 5,2 mg/mL, Gel-M 7,0 mg/mL, te u Gel-H 8,7 mg/mL. Ovakvom procjenom brzine geliranja može se zaključiti da povećanjem koncentracije $NaHCO_3$ u hidrogelu brzina fizikalnog umreživanja raste.



Slika 13. Stabilnost hidrogelova inkubiranih pri 37 °C.

Za primjenu istraživanog injekcijskog hidrogela potrebno je postići najveću moguću brzinu fizikalnog umreživanja kako bi injektiranje i sam postupak fizikalnog umreživanja vremenski kraće trajao. Dodavanje $NaHCO_3$ u neograničenim količinama za postizanje najveće brzine geliranja moglo bi uzrokovati narušavanja ravnoteže natrija u tretiranom dijelu tkiva, te promjenu mineraloškog sastava samog biomaterijala. Referentne vrijednosti natrija u intersticijskoj tekućini i plazmi su u rasponu 135 – 145 mmol/L i svako narušavanje ravnoteže natrija ima kliničke posljedice. Koncentracija natrija u uzorku Gel-H iznosi 103,5 mmol/L, te injektiranjem takvog hidrogela u oštećeno tkivo nema narušavanja homeostaze [35].

Bitno svojstvo staničnih „dostavljača“ i injekcijskih hidrogelova je pH vrijednost. Preniska (pH < 6,8) ili previsoka (pH > 8) pH vrijednost hidrogelova može štetiti okolnom tkivu i stanicama suspendiranima u takvom injekcijskom „dostavljaču“. pH vrijednost hidrogela utječe na vijabilnost (preživljavanje) stanica te bi optimalna vrijednost za preživljavanje stanica i smanjenje imunološkog odgovora tijela trebala biti u rasponu 6,9 – 7,8 (6,8 – 8) [36,37]. pH vrijednost CHT-HA suspenzije i pripravljenih hidrogelova mjerena je neposredno nakon umiješavanja $NaHCO_3$ (pri 10 °C), te nakon 24 sata fizikalnog umreživanja tijekom inkubiranja pri 37 °C (tablica 3), pri čemu je vidljivo da su pH vrijednosti svih pripravljenih hidrogelova unutar dozvoljenog raspona.

Tablica 3. pH vrijednosti CHT-HA suspenzije, Gel-L, Gel-M i Gel-H prije (T = 10 °C) i nakon fizikalnog umreživanja (T = 37 °C).

	CHT-HA	Gel-L	Gel-M	Gel-H
pH (10 °C)	-	6,80	6,96	7,01
pH (37 °C, 24 h)	5,88	7,33	7,29	7,28

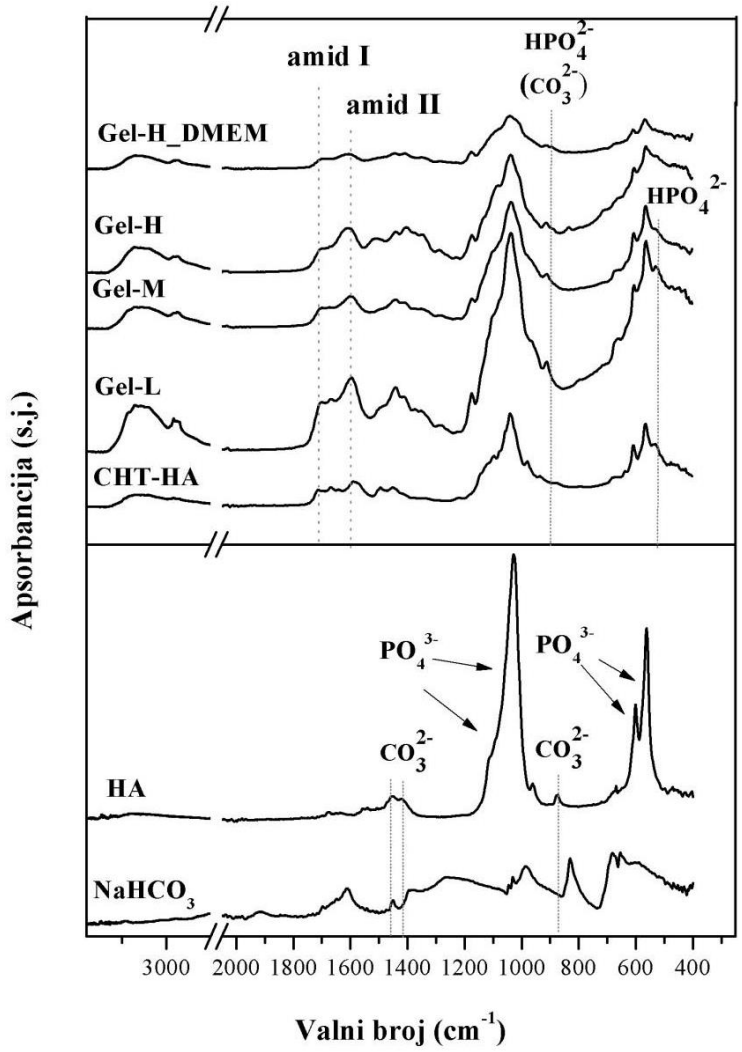
Važnost pH vrijednosti prije geliranja je u preživljavanju stanica suspendiranih u polimernoj suspenziji s gelirajućim agensom pri nižoj temperaturi. Prema izmjerenim vrijednostima, hidrogel Gel-H posjeduje najpogodniju pH vrijednost za suspendiranje i inkapsuliranje stanica.

Osnovni medij za uzgajanje stanica, DMEM, sadrži potrebne tvari za stanično preživljavanje tijekom *in vitro* kultura. Kod injekcijskih sustava, stanice su određeni period izložene materijalu bez direktnog doticaja s hranjivim tvarima, čija difuzija ovisi o kemijskom sastavu materijala. Stoga se kao potencijalni stanični „dostavljač“ hidrogel Gel-H pripravio uz modifikaciju otopine gelirajućeg agensa, odnosno uz otopinu $NaHCO_3$ pripravljenu u biološkom mediju, DMEM (Gel-H_DMEM). pH DMEM medija iznosi 7.4, dok je pH potpuno fizikalno-umreženog hidrogela Gel-H_DMEM 7,70 [38]. pH Gel-H_DMEM pogodan je za suspendiranje stanica, iako zbog približavanja pH vrijednosti 8 postoji mogućnost blage imunološke reakcije tijela. Međutim, ustanovljeno je da je imunološki odgovor tijela na blago lužnati sustav manji u odnosu na blago kiseli. Stoga je Gel-H_DMEM potencijalno prihvatljiv za inkapsuliranje i injektiranje stanica u oštećeno tkivo manjih dimenzija [39].

4.2. FTIR spektroskopija

Na slici 14 nalaze se FTIR spektri kompozitnog materijala kitozana i hidroksiapatita (CHT-HA) i fizikalno-umreženih hidrogelova (Gel-L, Gel-M, Gel-H, Gel-H_DMEM), dok je prašak hidroksiapatita (HA) korišten kao kontrolni uzorak za identifikaciju. Iz FTIR spektra kompozita CHT-HA vidljive su vrpce karakteristične za kitozan: vrpce na 1676 i 1562 cm^{-1} koje se pripisuju amid I i II (NH-C=O) skupini, dok široka vrpca u području valnih brojeva 3648 – 3022 cm^{-1} odgovara preklapanju vrpci $–NH_2$ i –OH skupina i međumolekulskih veza polisaharida. Pored kitozanskih vrpci, CHT-HA posjeduje vrpce karakteristične za fosfatne

(PO_4^{3-}) skupine hidroksiapatita na 1018 cm^{-1} ($v3$), 962 cm^{-1}, 598 cm^{-1} ($v4$*) i 557 cm^{-1} ($v4$). Osim fosfatnih vrpci, prisutna je i vrpca hidrogenfosfata (HPO_4^{2-}) na 525 cm^{-1} koja bi mogla biti posljedica stvaranja druge kalcij-fosfatne faze, dikalcijeva hidrogenfosfata dihidrata (brušita), kemijske formule $CaHPO_4 \times 2H_2O$ [22-24].



Slika 14. FTIR spektri istraživanih sustava (CHT-HA, Gel-L, Gel-M, Gel-H i Gel H_DMEM). Spektar praška hidroksiapatita (HA) korišten je za identifikaciju anorganske faze hidrogelova.

Sukladno CHT-HA kompozitu, hidrogelovi Gel-L, Gel-M, Gel-H i Gel-H_DMEM također pokazuju karakteristične kitozanske vrpce kao i fosfatne vrpce na valnim brojevima 1020 – 1014 cm^{-1}, 599 – 595 cm^{-1} i 559 – 555 cm^{-1}. Blagi pomaci fosfatnih vrpci mogu ukazivati na potencijalne interakcije između kitozana i *in situ* nastalog hidroksiapatita. Vrpca karakteristična za hidrogenfosfatnu skupinu brušita javlja se i kod hidrogelova Gel-L, Gel-M i Gel-H na valnom broju 525 – 520 cm^{-1}. Spomenuta vrpca izostaje kod fizikalno-umreženog

hidrogela Gel-H_DMEM. Pretpostavlja se da je izostajanje HPO_4^{2-} vrpce povezano s pH vrijednosti Gel-H_DMEM hidrogela koja utječe na sastav konačno stvorene kalcij-fosfatne faze. pH vrijednost fizikalno-umreženog hidrogela Gel-H_DMEM viša je usporedno s ostalim pripravljenim hidrogelovima te se pretpostavlja da u njemu postoje kalcij-fosfatne faze stabilne pri višim pH vrijednostima (pH > 7) [24 – 27].

Fizikalno-umreženi hidrogelovi Gel-H i Gel-H_DMEM pokazuju apsorpcijsku vrpcu na 875 cm^{-1} koja bi mogla odgovarati HPO_4^{2-} ili CO_3^{2-} skupini. U strukturu hidroksiapatita mogu se ugraditi različiti ioni, a supstitucije su moguće na mjestima kalcijevih, fosfatnih ili hidroksidnih iona. Biološki apatiti najčešće imaju manjak kalcijevih iona i uvijek ugrađene CO_3^{2-} ione. Apatitna struktura može imati karbonatne skupine na mjestu OH^- (A tip supstitucije) i PO_4^{3-} iona (B tip supstitucije) ili pak hidrogenfosfatne ione na mjestu fosfatnih. Prisutnost HPO_4^{2-} ili CO_3^{2-} vrpce može ukazivati na stvaranje nestehiometrijskog supstituiranog hidroksiapatita s manjkom kalcija sličnog biološkom apatitu s Ca/P omjerom različitom od 1,67 [40]. Zbog preklapanja CO_3^{2-} vrpci na valnim brojevima 1450 i 1421 cm^{-1} (identificiranih u kontrolnom HA uzorku), supstitucija *in situ* hidroksiapatita karbonatnim ionima se ne može potvrditi u kompozitnim materijalima.

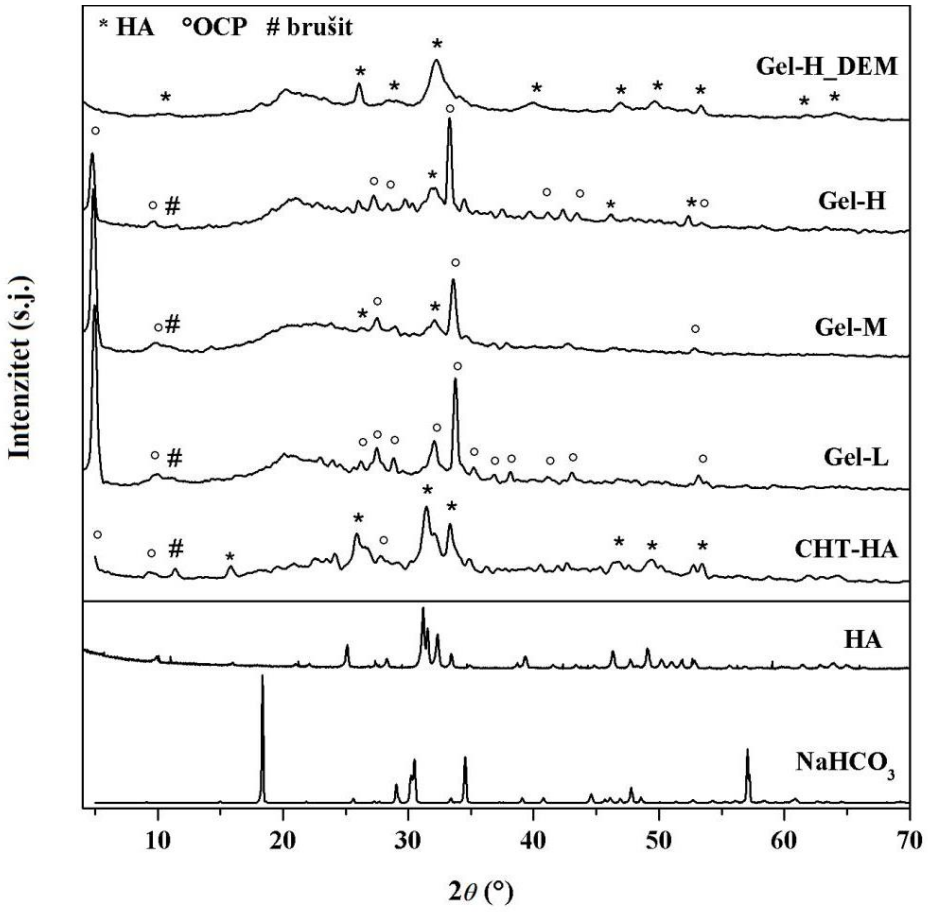
Precizniju identifikaciju sastava hidrogelova Gel-H i Gel-H_DMEM otežava i mogućnost nastajanja dodatne kalcij-fosfatne faze okta kalcij dihidrogenfosfata pentahidrata (OCP) čija se karakteristična HPO_4^{2-} vrpca također javlja na valnom broju od 875 cm^{-1} (Gel-H), odnosno 877 cm^{-1} (Gel-H_DMEM) [41, 42]. Tijekom pripreme materijala za potencijalnu primjenu u obnovi koštanog tkiva cilj je postići stvaranje nestehiometrijskog hidroksiapatita. Međutim, sinteza takvog hidroksiapatita može rezultirati stvaranjem drugih kalcij-fosfatnih faza. Izostanak vrpci karakterističnih za gelirajući agens $NaHCO_3$ može ukazivati potpuni raspad istog tijekom fizikalnog umreživanja gelova. Točan mineraloški sastav istraživanih sustava odredit će se pomoću rendgenske difrakcijske analize.

4.3. Identifikacija mineraloškog sastava hidrogela

Difraktogrami istraživanih sustava CHT-HA, fizikalno-umreženih hidrogelova Gel-L, Gel-M, Gel-H, Gel-H_DMEM, te standarda hidroksiapatita (HA) dani su na slici 15.

Karakteristični široki maksimum kitozana na oko $2\theta = 21°$ jasno je vidljiv kod fizikalno-umreženih hidrogelova Gel-L, Gel-M, Gel-H i Gel-H_DMEM, dok je kod kompozita CHT-HA intezitet kitozanskog maksimuma „prigušen“ maksimumima anorganske faze.

Prema rendgenskoj difrakcijskoj analizi (*The International Centre for Diffraction Data*, ICDD baza podataka), kompozit CHT-HA pokazuje trofazni anorganski sustav: osim maksimuma karakterističnih za hidroksiapatit (HA, ICDD 9-432), prisutni su maksimumi okta kalcij dihidrogenfosfata pentahidrata (OCP, ICDD 79-0423) i maksimum brušita (ICDD 11-0293) vidljiv na $2\theta = 11{,}6°$. HA je stabilna kalcij-fosfatna faza pri fiziološkim uvjetima. Međutim, povećanjem supstitucija u strukturi povećava se nestehiometrija ($Ca/P \neq 1{,}67$). Time se njegova stabilnost smanjuje što je mogući razlog postojanja triju kalcij-fosfatnih faza u polaznom kitozan-hidroksiapatit sustavu, te u fizikalno-umreženim hidrogelovima Gel-L, Gel-M i Gel-H [27]. Prisutnost brušita u kompozitnim materijalima u skladu je s rezultatima FTIR identifikacije. Brušit s Ca/P omjerom ~ 1 nastaje u rasponu pH vrijednosti 2,0 – 4,5, a može postojati i do 6,5. Usporedno s apatitima, brušit pokazuje bržu resorpciju *in vivo,* dok je pri fiziološkim uvjetima metastabilan. Prema Pina i sur. [43] brušit ima lošija svojstva „tečenja" te nije primjenjiv kao anorganska faza u materijalima za injektiranje kroz iglu. Brušitni cementi se brže razgrađuju *in vitro* što može rezultirati nepotpuno zacijeljenim novim koštanim tkivom. Međutim, *in vivo* istraživanja brušita kao materijala za obnovu koštanog tkiva ukazuju pogodnu brzinu razgradnje, dok su biološka istraživanja potvrdila biokompatibilnost uz potpuni izostanak imunološke reakcije, upalnih procesa i štetnosti za stanice. Prema Tamimi i sur. [44] kompozitni materijal brušita i kolagena pokazao je dobru tlačnu čvrstoću, koheziju i adheziju stanica, te pogodna biorazgradiva svojstva uz nastajanje novog koštanog tkiva.



Slika 15. XRD difraktogrami ispitivanih sustava CHT-HA, Gel-L, Gel-M, Gel-H i Gel-H_DMEM. Difraktogram hidroksiapatita (HA, ICDD 9-432) korišten je kao standard.

Budući da je sinteza HA unutar kitozanske otopine provedena u blago kiselom mediju (pH = 5,89), istovremena precipitacija OCP-a i HA je moguća. Prisutnost OCP-a poželjna je u materijalu za obnovu koštanog tkiva. Kompozitni materijali s OCP-om pokazuju bolju obnovu koštanog tkiva u odnosu na materijale koji sadrže stehiometrijski ili nestehiometrijski (HA s manjkom Ca^{2+} iona) hidroksiapatit kao bioaktivnu komponentu. Pretpostavlja se da je OCP prekursor kristala bioloških apatita u kostima i zubima, te da je sinteza nestehiometrijskog hidroksiapatita transformacijskim reakcijama iz OCP-a pri fiziološkim uvjetima biološki pogodnija od već sintetiziranog nestehiometrijskog hidroksiapatita. Transformacija OCP-a u njegovo termodinamički stabilnije stanje (HA) se odvija pri pH > 7, stoga bi taj prijelaz nastupio nakon injektiranja hidrogela u tijelo. OCP-HA transformacija utječe na aktivnost osteoblasta i samim time na brzinu obnavljanja i rasta novog tkiva [41]. Istraživanja Suzukija i sur. [29] potvrdila su veći stupanj obnove koštanog tkiva ugradnjom OCP-a na oštećeno mjesto u usporedbi s ugradnjom nestehiometrijskog hidroksiapatita

dobivenog iz OCP-a. U mnogim istraživanjima kao jedina kalcij-fosfatna faza koristi se OCP zbog pozitivnog utjecaja na obnovu kosti. Istraživanja su pokazala da se oko kristala OCP-a stvara matrica vlaknaste strukture koja se smatra mjestom početka stvaranja novog koštanog tkiva. Stanična aktivnost i novo stvoreno koštano tkivo veće je oko OCP-a u odnosu na kristale HA ugrađene u mišje koštano tkivo. Rendgenskom difrakcijskom analizom utvrđeno je da se u CHT-HA, Gel-L, Gel-M i Gel-H uzorcima javlja OCP koji je najčešće pločastog oblika, te prekursor za stvaranje hidroksiapatita. Pretpostavlja se nastajanje hidroksiapatita transformacijom iz OCP-a pri čemu se očekuje pločasti oblik HA kristala.
Analiza difraktograma Gel-H_DMEM potvrdila je izostanak karakterističnih maksimuma OCP-a i brušita. Mogući razlog tome je konačna pH vrijednost fizikalno-umreženog hidrogela Gel-H_DMEM od 7,70 pri kojoj se OCP i brušit transformiraju u HA.

Osim navedenih kalcij-fosfatnih faza, pretpostavlja se postojanje natrijeva karbonata (Na_2CO_3) kao produkta raspada gelirajućeg agensa tijekom fizikalnog umreživanja. Kristalna faza Na_2CO_3 nije identificirana što ne umanjuje mogućnost nastajanja amorfnog natrijeva karbonata. Međutim, maksimum najvećeg inteziteta natrijeva fosfata (Na_3PO_4, ICDD 84-0196) nalazi se na 2θ oko 33,6° pri kojoj se nalaze karakteristični intenziteti OCP-a. S obzirom na niži intenzitet OCP maksimuma na približnoj vrijednosti 2θ, moguće je preklapanje Na_3PO_4 s maksimumom OCP-a.

4.4. Udio vode

Na temelju rezultata procijenjene brzine geliranja i pH vrijednosti, udio vode je određen za hidrogel Gel-H. Rezultat ukazuje na visoki postotak vode u iznosu od 97,5 ± 0,04%, što znači da hidrogel Gel-H sadrži oko 40 puta više vode od svoje mase u suhom stanju.

Karakter i udio vode u hidrogelu određuje ukupnu propusnost hranjivih tvari i metaboličkog otpada kroz hidrogel. Ukoliko bi suhi gel počeo apsorbirati vodu, prve molekule vode koje ulaze u matricu će hidratizirati hidrofilne skupine i ta se voda naziva primarno vezanom vodom. Nakon apsorpcije primarno vezane vode dolazi do bubrenja gela i izlaganja hidrofobnih dijelova koji dolaze u interakciju s vodom, te do apsorbiranja sekundarno vezne vode. Primarno i sekundarno vezana voda je ukupna voda koja se nalazi u hidrogelu. Nakon bubrenja, polimerna mreža apsorbira dodatnu količinu vode uslijed koncentracijskog gradijenta, tzv. slobodna voda za koju se pretpostavlja da ispunjava prostor između fizikalno-

stvorenih mreža [8]. Međutim, apsorpcijom prevelike količine vode može doći do razdvajanja polimernih lanaca, tj. do otapanja polimera.

Apsorpcija dodatne vode određivala se inkubiranjem fizikalno-umreženog hidrogela Gel-H u fosfatnom puferu (engl. *phosphate buffer saline solution*, PBS) pri 37 °C. Ispitivanjem je ustanovljeno da dolazi do smanjenja mase hidrogela za 10,32 ± 0,50%. Pretpostavlja se da PBS djeluje kao neotapalo na polikationsku prirodu kitozana uslijed pH vrijednosti od 7,4, te do međusobnog približavanja kitozanskih lanaca i istiskivanja djela vode iz hidrogela što se odražava kao pad mase hidrogela. Važno je poznavati ponašanje ionsko-osjetljivih hidrogelova u PBS-u kojim se procjenjuje ponašanje hidrogela u biološkom mediju i fiziološkim uvjetima.

Zbog velikog udjela vode potrebno je istražiti mikrostrukturu hidrogela koja bi trebala omogućiti propusnost kisika, hranjivih tvari i metaboličkog otpada. Pretražnom elektronskom mikroskopijom istražena je mikrostruktura hidrogela Gel-H. Kako bi se utvrdio utjecaj vrste otapala gelirajućeg agensa na mikrostrukturu hidrogela, istražen je i hidrogel Gel-H_DMEM.

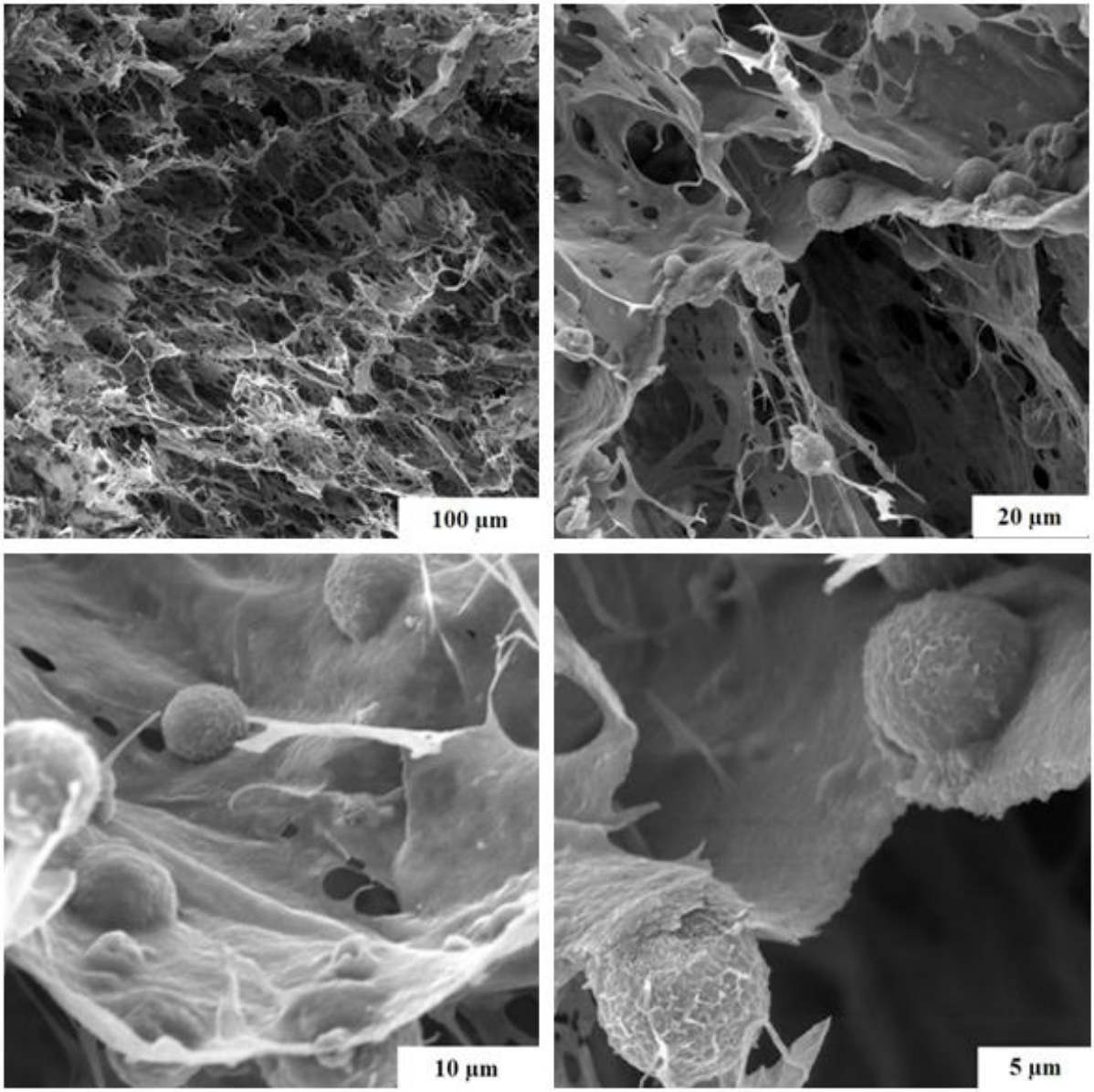
4.5. Mikrostruktura hidrogela

Mikrostrukture hidrogelova Gel-H i Gel-H_DMEM prikazane su na slikama 16 i 17. Za uvid u „stvarnu“ mikrostrukturu, hidrogelove je potrebno liofilizirati. Liofilizacija (eng. *freeze-drying*, *lyohpilization*) je naziv za sušenje smrzavanjem, tj. uklanjanje kristala leda sublimacijom pod vakumom nakon smrzavanja materijala pri vrlo niskim temperaturama (-80 °C). Rezultat liofilizacije je „smrznuta“ struktura hidrogela bez vode pri kojoj se može odrediti homogenost kompozitnih materijala te orijentacija i morfologija kristala anorganske faze [45].

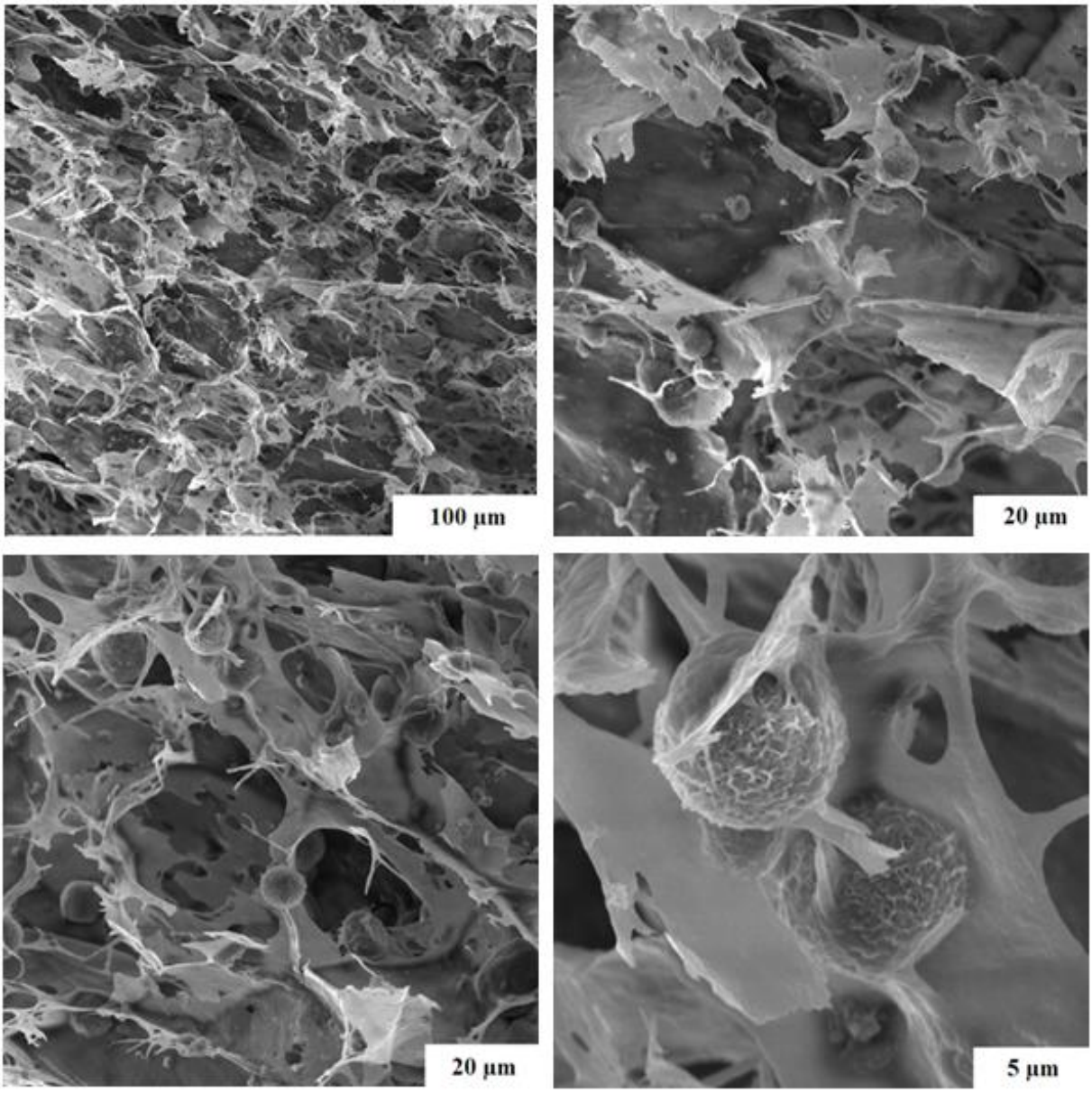
Iz danih mikrografova može se uočiti gotovo jednaka mikrostruktura hidrogelova Gel-H i Gel-H_DMEM što ukazuje na izostanak utjecaja primjene različitog otapala za pripremu otopine gelirajućeg agensa. Također, dobivene strukture nalikuju na spužvasti dio prirodnog koštanog tkiva. Uočava se visokoporozna struktura, s međusobno povezanim porama kroz cijeli volumen uzorka. Osim unutrašnjosti, porozna je i površina što omogućuje nesmetani prijenos kisika, hranjivih tvari i metaboličkog otpada kroz cijeli hidrogel kao preduvjet za veću životnu aktivnost inkapsuliranih stanica u hidrogelu.

Otapanje gelirajućeg agensa u biološkom mediju, DMEM, pogodnije je za inkapsuliranje stanica zbog dostupnosti hranjivih tvari za rast i umnažanje što je od iznimne važnosti tijekom fizikalnog umreživanja hidrogela [3].

Strukture unutrašnjosti hidrogelova Gel-H i Gel-H_DMEM prikazuju kristale hidroksiapatita pločastih oblika nanometarskih dimenzija koji tvore prepoznatljivu morfologiju cvjetače (engl. *cauliflower morphology*) reda veličine nekoliko mikrometara. Pretpostavlja se da pločasti oblik HA kristala potječe od transformacijskih reakcija iz OCP-a. Povišenje pH vrijednosti tijekom fizikalnog umreživanja hidrogela može imati za posljedicu orijentiranje HA kristala u morfologiju cvjetače [27]. Kristali HA homogeno su raspoređeni unutar hidrogela te ne dolazi do njihove međusobne agregacije. Gotovo svi kristali hidroksiapatita prekriveni su kitozanom što ukazuje na dobru adheziju polimerne i anorganske faze.



Slika 16. Morfologija liofiliziranog hidrogela Gel-H.



Slika 17. Morfologija liofiliziranog hidrogela Gel-H_DMEM.

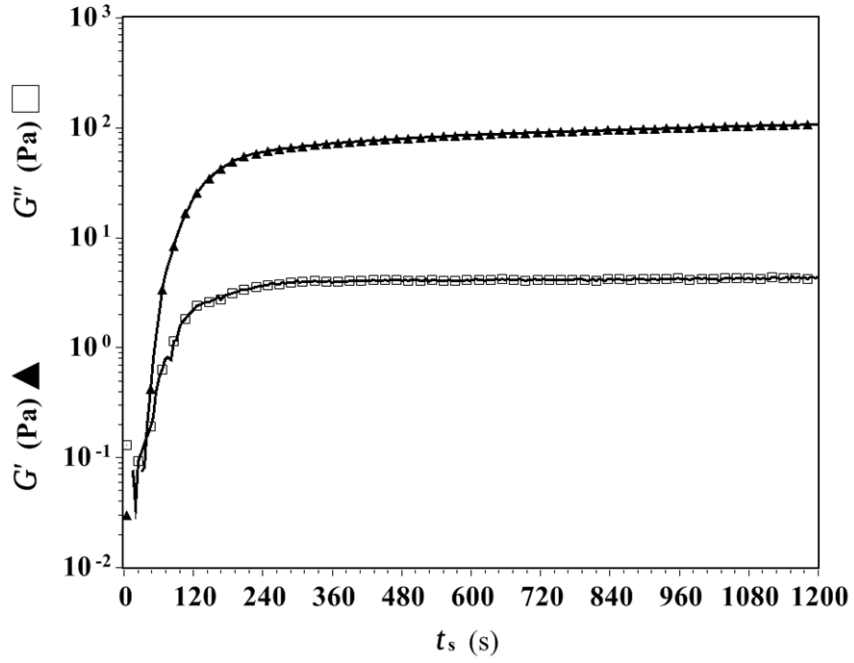
Mnoga istraživanja posvećena su pronalaženju najbolje metode dobivanja nanočestica hidroksiapatita te ispitivanju utjecaja promjene parametara sinteze na svojstva hidroksiapatita. Rezultati istraživanja pokazali su da je hidroksiapatit u tvrdom koštanom tkivu pločastog i štapićastog oblika nanometarske veličine koja ne prelazi par nanometara u debljini i desetak nanometara u duljini [30]. Odabrana *in situ* sinteza rezultirala je stvaranjem pločastog hidroksiapatita unutar kitozanske matrice kao imitacije koštanog tkiva.

Iako fizikalno-umreženi hidrogelovi pripravljeni uz vodenu otopinu gelirajućeg agensa ukazuju na biološki aktivniji sastav, daljnja istraživanja provedena su na hidrogelu Gel-H_DMEM radi osiguravanja veće vijabilnosti inkapsuliranih stanica.

4.6. Reološka svojstva hidrogela

Današnji reometri omogućuju precizna mjerenja složenih materijala koji su podvrgnuti promjeni sile ili deformacije. Točkom geliranja smatra se ona temperatura ili vrijeme pri kojem se ostvaruje prijelaz iz stanja sola u stanje gela [48]. Vrijeme geliranja hidrogela Gel-H_DMEM određeno je mjerenjem smičnog modula pohrane (*G*') i gubitka (*G*") u ovisnosti o vremenu smicanja *in situ* geliranog hidrogela pri 37 °C.

Na slici 18 vidljiv je porast modula pohrane i gubitka s vremenom smicanja. Najveći porast modula pohrane i gubitka događa se unutar 2 minute mjerenja što se poklapa s nestandardiziranim mjerenjem brzine geliranja u mikrotitarskoj pločici s 24 bunarića. Međutim, ovaj porast modula pohrane ne može označavati konačno vrijeme geliranja zbog vrste umreživanja hidrogela. S obzirom da se umreživanje ne odvija preko kemijskih veza, potpuno fizikalno-umreživanje hidrogela se odvija nakon dužeg perioda (unutar 24 sata).



Slika 18. Ovisnost modula pohrane (*G*') i gubitka (*G*") o vremenu geliranja hidrogela Gel-H_DMEM pri 37 °C.

Fizikalno umreživanje pripravljenih hidrogelova ostvaruje se promjenom pH vrijednosti. Gelirajući agens smanjuje naboj protoniranih amino skupina pri čemu dolazi do jačanja kitozanske strukture uslijed molekulskih interakcija. Stoga je za očekivati kraće vrijeme geliranja Gel-H_DMEM hidrogela pri fiziološkim uvjetima *in vivo* te brže postizanje potpuno

umrežene strukture. U mnogim istraživanjima se kao vrijeme, odnosno temperatura geliranja uzima sjecište krivulja modula pohrane i gubitka što se u ovom istraživanju ne može primijeniti zbog vrste umreživanja hidrogela. Prema tom načinu određivanja, vrijeme geliranja Gel-H_DMEM bio bi 30 sekundi što preliminarna istraživanja procjene brzine geliranja opovrgavaju.

U tablici 4 dane su vrijednosti parametara smičnog ispitivanja fizikalno-umreženog hidrogela Gel-H_DMEM određene pri 37 °C nakon 20 minuta smicanja.

Tablica 4. Modul pohrane (*G*') i gubitka (*G*''), faktor gubitka (tan (δ)) i viskoznost (*η*) mjereni pri frekvenciji od 0,2 Hz i 2% deformacije za hidrogel Gel-H_DMEM pri 37 °C.

***G*', Pa**	***G*'', Pa**	**tan(δ)**	***η*, Pa s**
98,58 ± 7,25	4,37 ± 0,08	0,04 ± 0,00	77,84 ± 6,44

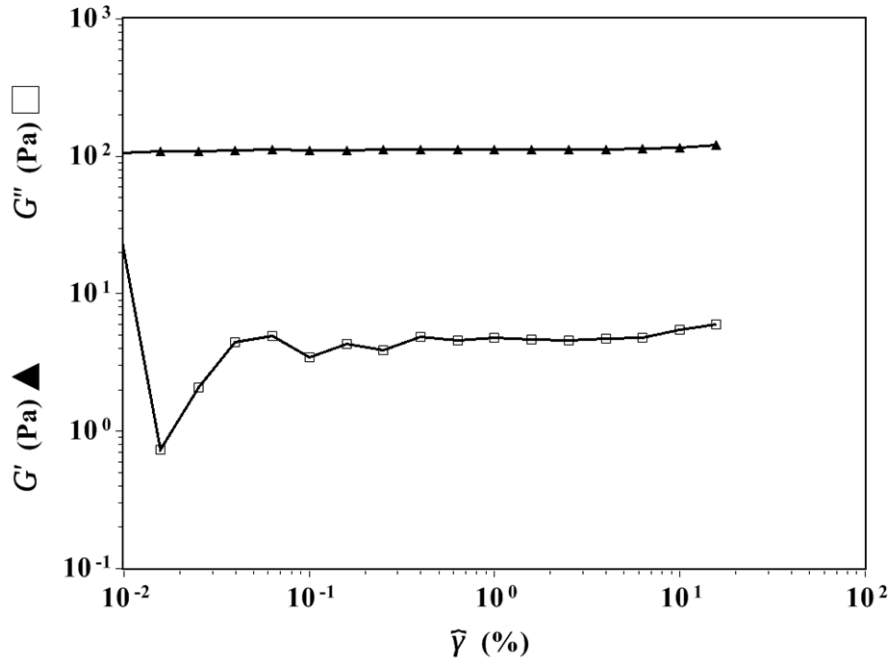
Vrijednosti smičnog modula pohrane nakon 20 minuta fizikalnog umreživanja pri 37 °C iznosi 98,58 ± 7,25 Pa. Ako se ta vrijednosti usporedi sa sličnim fizikalno-umreženim sustavom na temelju kitozan – 30% bioaktivno staklo i β-glicerofosfata [47], uočljiva je razlika od 30 Pa u smičnom modulu pohrane ukazujući da hidrogel Gel-H_DMEM ima potencijal kao injekcijski biomaterijal.

Ponašanje umreženih hidrogelova može se okarakterizirati preko omjera modula gubitka i pohrane (*G*''/*G*'), odnosno faktora gubitka (tan (δ)) prema jednadžbi 4:

$$G''/G' = \tan(\delta) \qquad (4)$$

Ukoliko je omjer $G''/G' > 1$ materijal se ponaša kao viskozna tekućina, dok pri omjeru $G''/G' < 1$ materijal djeluje kao elastična krutina. Što je omjer *G*''/*G*' manji to je materijal elastičniji, odnosno gel posjeduje veći broj fizikalnih mreža [48,49]. Prema Jin i sur. [50] kompozitni gel na temelju kitozana cijepljenog glikolnom kiselinom iznimno je elastičan zbog niskog *G*''/*G*' omjera u rasponu 0,001 – 0,002. S obzirom na vrijednost faktora gubitka od 0,04 može se zaključiti da je fizikalno-umreženi hidrogel Gel-H_DMEM elastičan.

Ovisnost modula pohrane i gubitka o deformaciji može dati uvid u vrstu hidrogela kao i u područje linearne viskoelastičnosti materijala. Na slici 19 može se primijetiti povećanje modula *G*' i *G*'' pri porastu deformacije iznad 10%. Ovakvo je ponašanje karakteristično za fizikalno-umrežene i to vrlo čvrste fizikalne gelove (engl. *strong physical gels*).

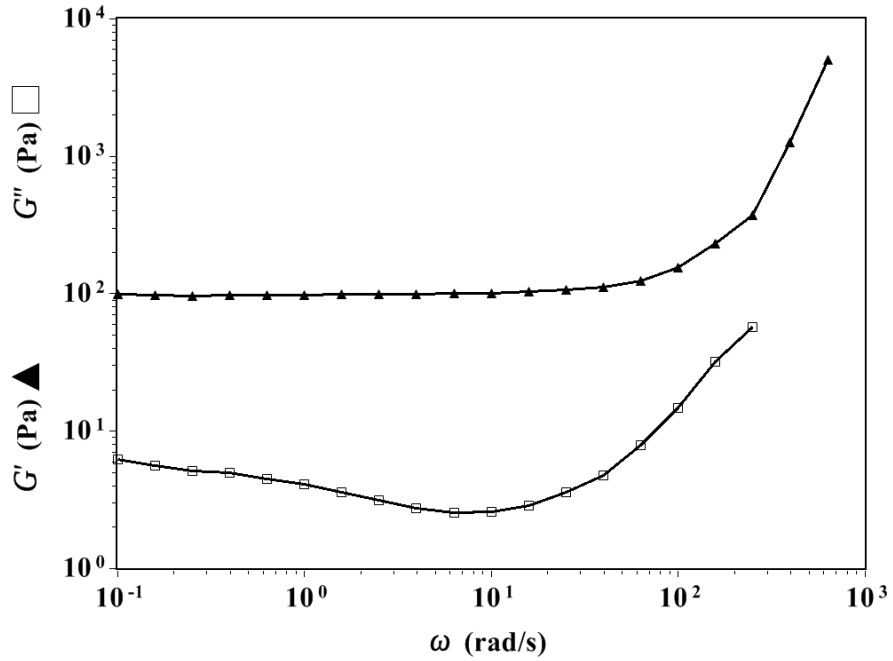


Slika 19. Ovisnost modula pohrane (*G*') i gubitka (*G*'') o deformaciji za hidrogel Gel-H_DEMEM pri 37 °C.

Pretpostavlja se da do stvaranja vrlo čvrstog hidrogela dolazi zbog smanjenja elektrostatskih odbijanja kitozanskih makromolekula uslijed potpunijeg deprotoniranja amino skupina te agregacije lanaca. U kiselim otopinama, protonirane molekule kitozana ponašaju se kao polu-kruti lanci. Dodatkom $NaHCO_3$ postupno dolazi do neutralizacije kitozanskih aminskih skupina i smanjenja gustoće naboja, što doprinosi nastajanju fizikalnih, vodikovih veza između i unutar lanaca makromolekula, ispreplitanju lanaca i stvaranju mikroagregata nastalih „samoudruživanjem“ polimernih lanaca. U konačnici, ispreplitanjem molekula ili sekundarnim interakcijama poput hidrofobnih i vodikovih veza može doći do fizikalnog geliranja. [13].

Ovisnost modula *G*' i *G*'' o kutnoj frekvenciji (ω) često se provodi za karakterizaciju reoloških svojstava hidrogelova (slika 20). Neovisnost *G*' i *G*'' o malim promjenama kutne frekvencije smatra se važnim za određivanje čvrstoće hidrogelova. Čvrstim hidrogelom

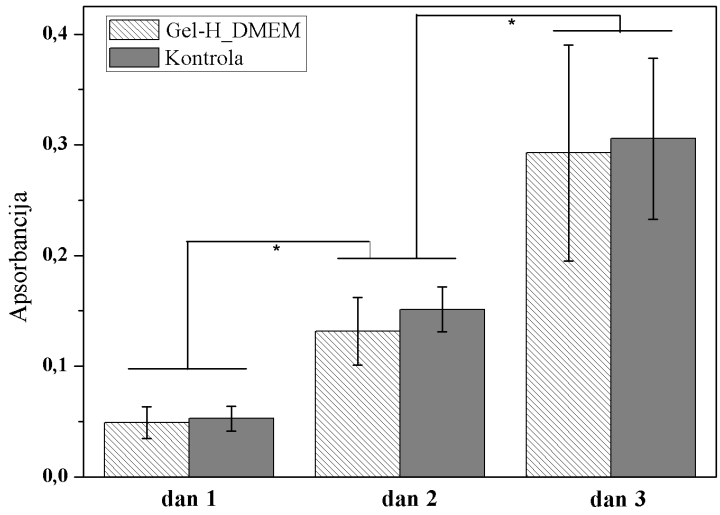
smatra se onaj čija je vrijednost modula pohrane jednom ili dva puta veća od modula gubitka, te kada pokazuje plato u širokom području frekvencija (engl. *"true gels"*), kao što je izmjereno za hidrogel Gel-H_DMEM [51]. Dobivena ovisnost na slici 20 pokazuje klasično ponašanje gela uslijed geliranja, tj. u njegovom viskoelastičnom stanju.



Slika 20. Ovisnost modula pohrane (*G*') i gubitka (*G*'') o kutnoj frekvenciji za hidrogel Gel-H_DMEM pri 37 °C.

4.7. Citotoksičnost hidrogela

Analiza citotoksičnosti provedena je MTT metodom na fizikalno-umreženom hidrogelu Gel-H_DMEM nakon 1, 2 i 3 dana hranjenja nasađenih mišjih stanica fibroblasta. Citotoksičnost Gel-H_DMEM uspoređena je sa standardnom negativnom kontrolom citotoksičnosti (biološki medij, DMEM). Utjecaj hidrogela na vijabilnost stanica ispitan je ekstraktom biološkog medija u kojem je hidrogel inkubiran. Kao rezultat analize dobivene su vrijednosti apsorbancije proporcionalne broju živih stanica (slika 21).



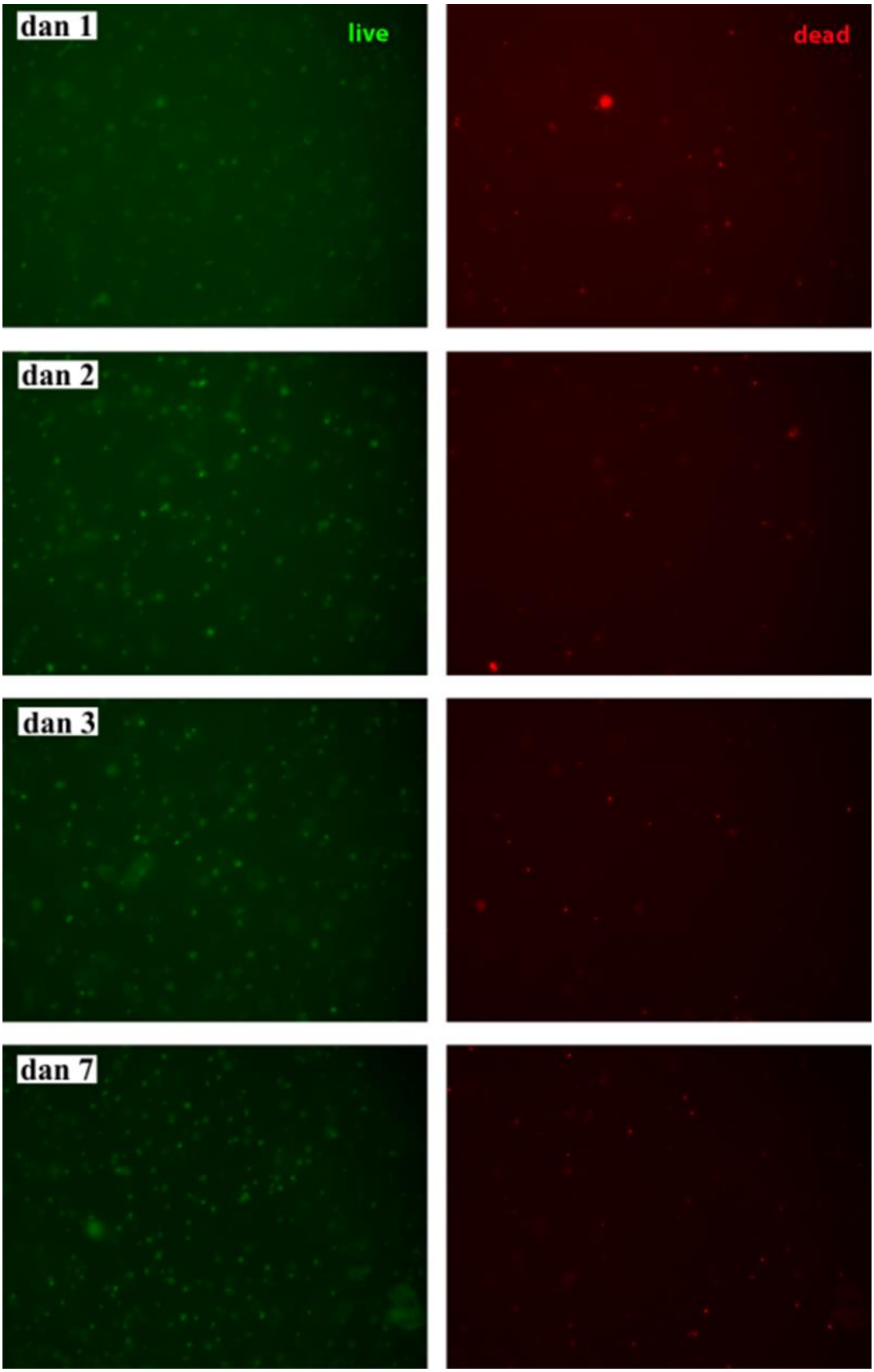
Slika 21. MTT analiza fibroblasta inkubiranih s ekstraktom hidrogela Gel-H_DMEM nakon 1, 2 i 3 dana pri 37 °C. Negativna kontrola citotoksičnosti: biološki medij, DMEM.

Rezultati apsorbancije ukazuju da hidrogel Gel-H_DMEM nema štetan utjecaj na stanice unutar 3 dana, te da broj stanica s vremenom inkubiranja raste. Slične vrijednosti apsorbancije hidrogela i negativne kontrole potvrđuju necitotoksičnost materijala, tj. dobru biokompatibilnost i životnu aktivnost stanica hranjenih ekstraktom Gel-H_DMEM.

4.8. Životna aktivnost inkapsuliranih stanica

In vitro uzgoj inkapsuliranih mišjih stanica fibroblasta proveden je u hidrogelu Gel-H_DMEM tijekom 1, 2, 3 i 7 dana. Životna aktivnost inkapsuliranih stanica istražena je „live/dead" metodom bojanja pri kojem se žive stanice pojavljuju u zelenoj boji, a mrtve u crvenoj.

Na slici 22 vidljiva je dobra životna aktivnost stanica nakon fizikalnog umreživanja te nakon 7 dana uzgoja unutar hidrogela. Pored dobre životne aktivnosti, vidljiva je i njihova homogena raspodjela bez agregacije stanica unutar hidrogela što ukazuje na dobru biokompatibilnost materijala i pogodno okruženje za stanični rast. Broj stanica raste s vremenom uzgajanja što ukazuje na dobru bioaktivnost i propusnost hidrogela za kisik, hranjive tvari i metabolički otpad. Homogena dispergiranost živih stanica ukazuje da ne postoji ni fizička ni kemijska barijera unutar hidrogela Gel-H_DMEM.



Slika 22. Životna aktivnost inkapsuliranih mišjih stanica fibroblasta ispitana „live/dead" metodom u hidrogelu Gel-H_DMEM nakon 1, 2, 3 i 7 dana uzgajanja. Žive stanice obojene su zelenom bojom, dok su mrtve obojene crvenom.

5. Zaključak

Pripremljeni su pH osjetlivi injekcijski hidrogelovi na temelju kitozanske matrice i hidroksiapatita s različitim udjelom natrijeva hidrogenkarbonata kao gelirajućim agensom.

- *In situ* sinteza pokazala je pozitivni utjecaj na stvaranje hidroksiapatit (HA) kao kalcij-fosfatne faze u kompozitnom CHT-HA materijalu.
- Blago kiseli uvjeti sinteze odgovorni su za stvaranje dodatnih kalcij-fosfatnih faza OCP-a te brušita u tragovima u fizikalno-umreženim hidrogelovima. Promjena medija gelirajućeg agensa (DMEM) vodi ka homogenijem mineraloškom sastavu fizikalno-umreženog hidrogela.
- Koncentracija natrija u fizikalno-umreženom hidrogelu ne prelazi granicu referentne vrijednosti natrija u intersticijskoj tekućini i plazmi.
- Propusnost hranjivih tvari i metaboličkog otpada osigurani su visokim udjelom vode u fizikalno-umreženom hidrogelu.
- Fizikalno-umreženi hidrogelovi pokazuju visokoporoznu strukturu s kristalima HA koji tvore morfologiju „cvjetače“.
- Reološka ispitivanja ukazuju na stvaranje „čvrstog fizikalnog gela“ s karakterističnim porastom smičnog modula pohrane s deformacijom. Najveći porast smičnog modula pohrane odvija se unutar 2 minute fizikalnog-umreživanja.
- Analiza citotoksičnosti na stanicama fibroblasta potvrdila je izostanak štetnog utjecaja hidrogela.
- Mjerenje životne aktivnosti mišjih stanica fibroblasta potvrdilo je preživljavanje inkapsuliranih stanica tijekom fizikalnog umreživanja, dobru dispergiranost i proliferaciju stanica tijekom uzgoja unutar hidrogela.

Dobiveni hidrogelovi pokazali su dobra svojstva kao injekcijski materijali i predstavljaju obečavajuće sustave za poboljšanje kemijskih i bioloških karakteristika hidrogelova. U daljnjim istraživanjima moguće je ispitati enzimsku razgradnju hidrogelova te imunološku reakciju nakon injektiranja u potkožno tkivo životinja.

Literatura

1. Ward, M.A., Georgiou T.K., Thermoresponsive polymers for biomedical applications, *Polymers* **3** (2011) 1215 – 1242.

2. Goycoolea, F.M., Argüelles-Monalb, W.M., Lizardia, J., Penichec, C., Herasd, A., Galedd, G., Díaza, E.I., Temperature and pH-sensitive chitosan hydrogels: DSC, rheological and swelling evidence of a volume phase transition, *Polymer Bulletin* **58** (2007) 225-234.

3. Gasperini, L., Mano, J.F., Reis, R.L., Natural polymers for the microencapsulation of cells, *Journal of the royal society Interface* **11** (2014) 20140817.

4. www.cellculturedish.com/2015/03/materials-and-assay-systems-used-for-3d-cell-culture/ (20.03.2016.)

5. Tan, H., Marra, K.G., Injectable, biodegradable hydrogels for tissue engineering applications, *Materials* **3** (2010) 1746 – 1767.

6. Sivashanmugam, A., Kumar, R.A., Priya, M.V., Nair, S.V., Jayakumar, R., An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering, *European Polymer Journal* **27** (2015) 543 – 565.

7. Tang, Y., Du, Y., Hu, X., Shi, X., Kennedy J.F., Rheological characterisation of a novel thermosensitive chitosan/poly(vinyl alcohol) blend hydrogel, *Carbohydrate Polymers* **67** (2007) 491 – 499.

8. Hoffman, A.S., Hydrogels for biomedical applications, *Advanced Drug Delivery reviews* **54** (2002) 3 – 12.

9. Kharkar, P.M., Kiick, K.L., Kloxin, A.M., Designing degradable hydrogels for orthogonal control of cell microenvironments, *Royal Society of Chemistry* **42** (2013) 7335 – 7372.

10. http://www.datlof.com/8axamal/docs/marketing/jhu/je/index.htm (10.11.2015)

11. Jin, R., Moreira Teixeira, L.S., Dijkstra, P.J., Karperien, M., van Blitterswijk, C.A., Zhong, Z.Y., Feijen, J., Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* **30** (2009) 2544 – 2551.

12. Pillai, C.K.S., Paul, W., Sharma C.P., Chitin and chitosan polymers: Chemistry, solubility and fibre formation, *Progress in Polymer Science* **34** (2009) 641 – 678.

13. Liu, L., Tang, X., Wang, Y., Guo, S., Smart gelation of chitosan solution in the presence of $NaHCO_3$ for injectable drug delivery system, *International Journal of Pharmaceutics* **414** (2011) 6 – 15.

14. Zarzycki, R., Modrzejewska, Z., Owczarz, P., Wojtasz-Pajak, A., New chitosan structures in the form of the thermosensitive gels, *Progress on chemistry and application of chitin and its derivatives* **8** (2008) 35 – 41.

15. Ruel-Gariépy, E., Leroux, J.C., *In situ* forming hydrogels – review of temperature-sensitive systems, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **58** (2004) 409 – 426.

16. Ta, H.T., Dass, C.R., Dunstan, D.E., Injectable chitosan hydrogels for localised cancer therapy, *Journal of Controlled Release* **126** (2008) 205 – 2016.

17. Berger, J., Reist, M., Mayer, J.M., Felt, O., Peppas, N.A., Gurny, R., Structure and interactions in covalently and ionically crosslinked chitosan hydrogels for biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **57** (2004) 19 – 34.

18. Brack, H., P., Tirmizi, S, A., Risen, W., M., A spectroscopic and viscometric study of the metal ion-induced gelation of the biopolymer chitosan, *Polymer* **38** (1997) 2351 – 2362.

19. Fang. J., Chen, J, Leu, Y., Hu, J., Temperature-sensitive hydrogels composed of chitosan and hyaluronic acid as injectable carriers for drug delivery, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68** (2008) 626 – 636.

20. Klouda, L., Mikos, A.G., Thermoresponsive hydrogels in biomedical applications, *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics* **68** (2008) 34 – 45.

21. Yao, K., Li, J., Yao, F., Yin, Y., Chitosan-based hydrogels: Functions and applications, CRC Press, Boca Raton 2011, 219-257.

22. Chen, B.Y., Dang, J., Tan, T.L., Fang, N., Chen, W., N., Leong, K., W., Chan, V., Dynamics of smooth muscle cell deadhesion from thermosensitive hydroxybutyl chitosan, *Biomaterials* **28** (2007) 1503 – 1514.

23. Modrzejewska, Z., Skwarczynska, A., Maniukiewicz, W., Douglas, T.E.L., Mechanism of formation of termosensitive chitosan chloride gels, *Progress on chemistry and application of chitin and its derivates* **19** (2014) 125 – 134.

24. Rogina, A., Ivanković, M., Ivanković, H., Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix, *Materials Science and Engineering* C **33** (2013) 4539 – 4544.

25. Rehman, I., Bonfield, W., Characterization of hydroxyapatite and carbonated apatite by photo acoustic FTIR spectroscopy, *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, **8** (1997) 1 – 4.

26. Wei, G., Ma, P.X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* **25** (2004) 4749 – 4757.

27. Rogina, A. *In situ* sinteza hidroksiapatita u matrici biorazgradivih polimera, Doktorski rad, Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Zagreb, 2009, 10 – 11.

28. Wei, G., Ma, P.X., Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering, *Biomaterials* **25** (2004) 4749 – 4757.

29. Suzuki, O., Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials, *Japanese Dental Science Review* **49** (2013) 58 – 71.

30. Allo, B.A., Costa, D.O., Dixon, J.S., Mequanint, K., Rizkalla, A.S., Bioactive and biodegradable nanocomposites and hybrid biomaterials for bone regeneration, *Journal of Functional Biomaterials* **3** (2012) 432 – 463.

31. http://www.ifyber.com/biocompatibility-testing/ (16.12.2015.)

32. Spicer, P.P., Kretlow, J.D., Young, S., Jansen, J.A., Kasper, F.K., Mikos, A.G., Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect, *Nature Protocols*, **7** (2012) 1918 – 1929.

33. Szpalski, C., Barr, J., Wetterau, M., Saadeh, P.B., Warren, S.M., Cranial bone defects: Current and future strategies, *Neurosurgical Focus* **29** (2010) 8 – 16.

34. Schmidmaier, G., Capanna, R., Wildemann, B., Beque, T., Lowenberg, D., Bone morphogenetic proteins in critical-size bone defects: what are the options?, *Injury* **40** (209) 39 – 43.

35. www.oxfordmedicine.com (23.3.2016.)

36. Ceccarini, C., Eagle, H., pH as a determinant of cellular growth and contact inhibition, *Proceedings of the National Academy of Sciences* **68** (1971) 229 – 233.

37. Hinderling, P.H., Hartmann, D., The pH dependency of the binding of drugs to plasma proteins in man, *Therapeutic Drug Monitoring* **27** (2005) 71 – 85.

38. www.labome.com/method/Cell-Culture-Media-A-Review.html (10.4.2016.)

39. Lardner, A., The effects of extracellular pH on immune function, *Journal of Leukocyte Biology* **69** (2001) 522 – 530.

40. Resende, N.S., Nele, M., Salim, V.M.M., Effects of anion substitution on the acid properties of hydroxyapatite, *Thermochimica Acta* **451** (2006) 16 – 21.

41. Suzuki, O., Kamakura, S., Katagiri, T., Nakamura, M., Zhao, B., Honda, Y., Kamijo, R., Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite, *Biomaterials* **27** (2006) 2671 – 2681.

42. Spence, G., Phillips, S., Campion, C., Brooks, R., Rushton, N., Bone formation in a carbonate-substituted hydroxyapatite implant is inhibited by zoledronate, *The Journal of Bone and Joint Surgery* **90B** (2008) 1635 – 1639.

43. Pina, S., Ferreira, M.F., Brushite-forming Mg-, Zn- and Sr-substituted bone cements for clinical applications, *Materials* **3** (2010) 519 – 535.

44. Tamimi, F., Kumarasami, B., Doillon, C., Gburecki, U., Nihouannen, L.D., Cabarcos, E.L., Barralet, J.E., Brushite-collagen composites for bone regeneration., *Acta Biomaterialia* **5** (2008) 1315 – 1321.

45. Mikos, A.G., Temenoff, J.S., Formation of highly porous biodegradable scaffolds for tissue engineering, *Electronic Journal of Biotechnology* **3** (2000) 114 – 119.

46. Picout, D.R., Ross-Murphy, S.B., Rheology of biopolymer solutions and gels, *The Scientific World Journal* **3** (2003) 105 – 121.

47. Couto, D.S., Hong, Z., Mano, J.F., Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles, *Acta Biomaterialia* **5** (2009) 115 – 123.

48. Grillet, A.M., Wyatt, N.B., Gloe, L.M, Polymer gel rheology and adhesion, Rheology, InTech, Rijeka 2012, 59 – 80.

49. Kodavaty, J., Deshpande, A.P., Mechanical and swelling properties of poly(vinyl alcohol) and hyaluronic acid gels used in biomaterial systems - a comparative Study, *Defence Science Journal* **64** (2014) 222 – 229.

50. Jin, R., Teixeira, L.S.M., Dijkstra, P.J., Karaperien, M., van Blitterswijk, C.A., Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Biomaterials* **30** (2009) 2544 – 2551.

51. Wu, J., Zhou, T., Liu, J., Wan, Y., Injectable chitosan/dextran-polylactide/glycerophosphate hydrogels and their biodegradation, *Polymer Degradation and Stability* **120** (2013) 273 – 282.

Životopis

Rođena sam u Koprivnici 1992. godine. Nakon završetka osnovne škole, upisujem Opću gimnaziju „Fran Galović" u Koprivnici. Godine 2010. upisala sam preddiplomski studij *Kemija i inženjerstvo materijala* na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu, a potom, 2014., i diplomski studij na već navedenom fakultetu.

Završni rad izradila sam na Zavodu za fizikalnu kemiju na temu „Karakterizacija kompozitnog biomaterijala na temelju kitozana i *in* situ sintetiziranog hidroksiapatita". 2014. godine sudjelovala sam na *5th Young European Scientists workshop* u Krakovu, s temom „Porous chitosan/hydroxyapatite composite scaffolds".

2015. godine osvajam Rektorovu nagradu za rad „*In vitro* enzimska razgradnja poli(ε-kaprolaktona) i PCL/GEL mješavine za biomedicinsku primjenu" s čjim sam posterskim izlaganjem sudjelovala na Sajmu ideja iste godine.

2015. godine sudjelujem na radionici „Polimeri iz perspektive kemičara i strojara" s usmenim izlaganjem na temu „Karakterizacija mikrostrukture biokompozitne okosnice na temelju kitozana pripremljene metodom *smrzavanje-geliranje*", a 2016. godine s temom „Injekcijski hidrogelovi za regeneraciju tkiva".

Tijekom studija četiri godine sudjelujem kao demonstrator na vježbama iz kolegija *Fizikalna kemija I* i *Fizikalna kemija II*.