

Priprava 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva

M. Ivanković,* L. Bauer, A. Ressler, A. Rogina,
M. Antunović i H. Ivanković

Fakultet kemijskog inženjerstva i tehnologije, Sveučilište u Zagrebu
Marulićev trg 19, 10 000 Zagreb

Ovo djelo je dano na korištenje pod
Creative Commons Attribution 4.0
International License



Sažetak

Inženjerstvo koštanog tkiva brzorastuće je polje istraživanja usmjereno na razvoj bioaktivnih 3D poroznih nosača, kao privremenih izvanstaničnih matrica, koji podržavaju prijanjanje, umnažanje i diferencijaciju stanica te potiču stvaranje koštanog tkiva *in vivo*. Više od deset godina istraživanja naše grupe posvećena su razvoju novih materijala i postupaka za pripremu 3D poroznih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva. Kao mogući nosači istraživani su porozni skeleti morskih organizama te kompozitni materijali i hidrogelovi na temelju biorazgradljivih polimera i bioresorbirajuće hidroksiapatitne keramike. U ovom radu dan je prikaz naših istraživanja i glavnih postignuća, objavljenih u međunarodnim znanstvenim publikacijama.

Ključne riječi

Inženjerstvo koštanog tkiva, 3D nosači, porozna struktura, sipina kost, hidroksiapatit, biorazgradljivi polimeri, hidrogelovi

1. Uvod

Tkivno inženjerstvo relativno je novo multidisciplinarno polje istraživanja čiji je cilj razvoj bioloških nadomjestaka koji mogu održavati, poboljšati ili obnoviti funkciju oboljelog ili oštećenog tkiva ili cijelog organa. Radi dobivanja funkcionalnih 3D tkiva kombiniraju se nosači (engl. *scaffold*), stanice i biološki aktivne signalne molekule čineći tzv. trijadu tkivnog inženjerstva.¹ Optimalni nosač trebao bi oponašati funkciju prirodne izvanstanične matrice (međustanična tvar, engl. *extracellular matrix*, ECM). Izvanstaničnu matricu luče stanice, ona je u dinamičnom odnosu sa stanicama, regulirajući njihovo prijanjanje, pokretljivost, umnažanje i diferencijaciju.

Nosač koji služi kao predložak za stvaranje tkiva nasaduje se stanicama izoliranim iz prirodnog tkiva i izlaže različitim biofizičkim podražajima u bioreaktoru.^{1,2} Na mjesto ozljede može se implantirati stanicama nasadeni nosač ili tkivo uzgojeno *in vitro*, nakon čega se inducira regeneracija tkiva *in vivo*. Glavne korake u tkivnom inženjerstvu ilustrira slika 1.³

Nosači koji se primjenjuju u tkivnom inženjerstvu moraju zadovoljiti niz uvjeta. Prvi uvjet je biokompatibilnost. Stanice moraju prijanjati na materijal, normalno funkcionirati, migrirati po površini i kroz nosač te se početi umnažati (proliferirati) na materijalu prije taloženja nove izvanstanične matrice.¹ Nakon ugradnje u organizam nosač ne smije izazvati imunološku reakciju odnosno upalni proces koji bi mogao smanjiti cijeljenje ili prouzročiti odbacivanje materijala od strane tijela.¹ Jedan od ciljeva tkivnog inženjerstva je omogućiti stanicama pacijenta da stvaranjem vlastite izvanstanične matrice zamijene ugrađeni nosač tijekom određenog razdoblja. Stoga bi nosač trebao biti u pot-

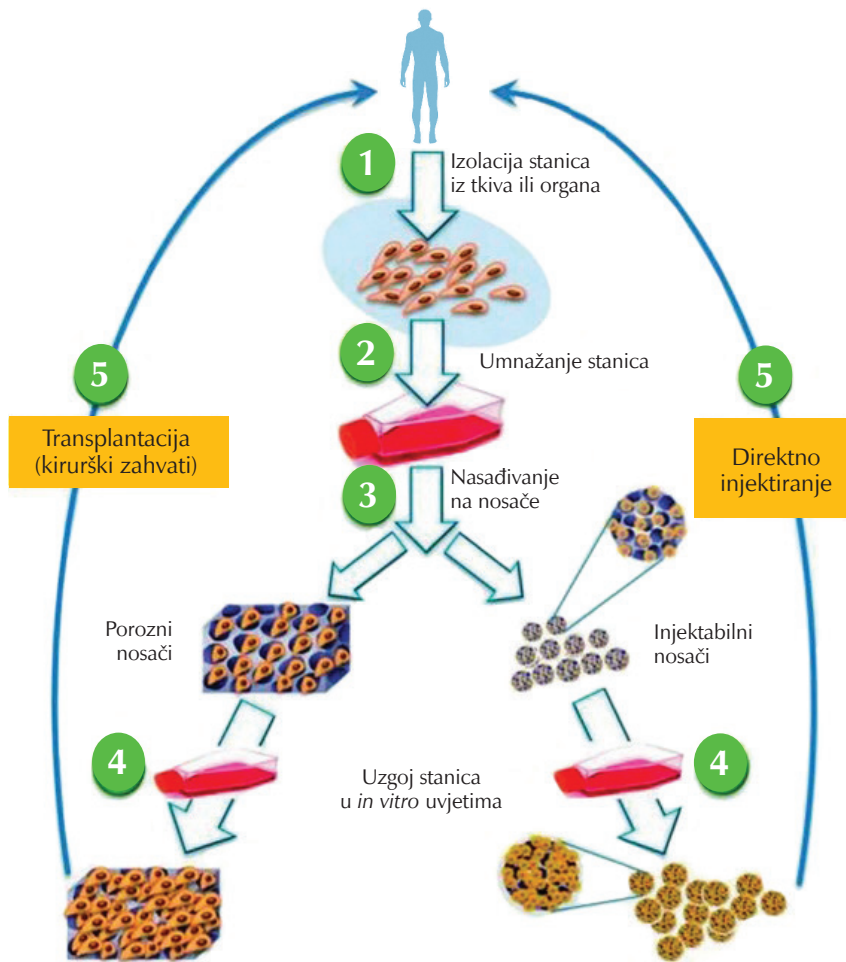
punosti biorazgradljiv i razgrađivati se kontroliranom brzinom razgradnje koja odgovara brzini stvaranja novog tkiva.¹ Nusprodukti biološke razgradnje ne smiju biti toksični i moraju izići iz tijela bez interakcija s drugim organima. Nosač bi trebao imati mehanička svojstva koja odgovaraju anatomskom položaju ugradnje i osiguravaju jednostavno rukovanje tijekom kirurškog zahvata. Struktura nosača je od iznimne važnosti. Nosači moraju imati visoko poroznu strukturu s dobrom međusobnom povezanošću pora kako bi se osigurala migracija stanica i urastanje novih krvnih žila (vaskularizacija) kroz cijeli volumen nosača te difuzija hranjivih tvari do stanica unutar nosača i otpadnih tvari iz nosača. Veličina pora također je vrlo bitna. Međudjelovanja između stanica i nosača primarno se ostvaruju preko kemijskih skupina (ligandi) čija gustoća ovisi o raspoloživoj površini. Pore moraju biti dovoljno velike kako bi stanice mogle migrirati u strukturu nosača i vezati se na ligande unutar nosača, ali i dovoljno male kako bi se osigurala velika površina i odgovarajuća gustoća liganada potrebna za vezanje dovoljnog broja stanica na nosač.¹ Različite vrste stanica i tkiva zahtijevaju različite raspone veličina pora u nosačima za tkivno inženjerstvo.

1.1. Inženjerstvo koštanog tkiva

Koštano tkivo sastoji se od mineralizirane izvanstanične matrice i koštanih stanica. Osteoblasti su stanice koštanog tkiva koje proizvode, odlazu i mineraliziraju koštano matricu.⁴ Glavne sastavnice koštane matrice su kolagen, nekologenski proteini, minerali i voda. Više od 90 % organske tvari u kostima čini kolagen tip I, a najzastupljeniji mineral koštanog tkiva je hidroksiapatit.

Osteogeneza ili morfogeneza koštanog tkiva proces je kojim nastaje koštano tkivo. U nastajanju koštanog tkiva nužna je indukcija diferencijacije osteogenih stanica u osteoblaste činiteljima rasta (princip osteoindukcije). Oste-

* Autor za dopisivanje: prof. dr. sc. Marica Ivanković,
e-pošta: mivank@fkit.hr



Slika 1 – Glavni koraci u tkivnom inženjerstvu³
Fig. 1 – Basic steps in tissue engineering³

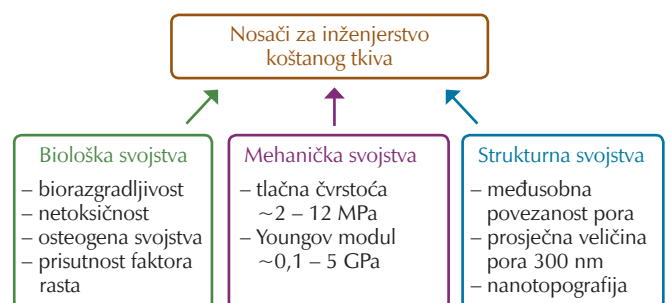
oblastima i stvorenom koštanom tkivu nužna je odgovarajuća podloga (princip osteokondukcije) te porozna struktura koja omogućuje trodimenzionalno prodiranje koštanoga tkiva s površine u dubinu.⁴

Rekonstrukcija velikih koštanih oštećenja jedan je od najvećih izazova u ortopedskoj kirurgiji. Koštano tkivo je nakon krvi najčešće presađivano tkivo. Autotransplantacija (samopresađivanje) kosti je i danas "zlatni standard" u rekonstrukciji velikih koštanih oštećenja jer osigurava osteogene stanice i osteoinduktivne čimbenike potrebne za koštano cijeljenje i regeneraciju. Nedostatak postupka je dodatni kirurški zahvat na donorskom mjestu, veća postoperativna bol te potencijalne infekcije. Osim autologa (samopresadak) rabe se i kosti dobivene od preminulog darivatelja (alogeni presadak) ili kosti drugih sisavaca (kse-nogeni presadak). Ti materijali potencijalni su izvor zaraznih bolesti i mogu izazvati imunološku reakciju organizma odnosno odbacivanje stranog materijala nakon transplantacije.⁵ Nedostatak umjetnih materijala (metali, keramika, polimeri) kao nadomjestaka za koštano tkivo je što nisu osteoinduktivni.

Primjena tkivnog inženjerstva u liječenju oštećenja kosti moguća je alternativa klasičnim postupcima ortopedске rekonstrukcijske kirurgije. Brojni znanstveni i pregledni ra-

dovi svjedoče o bitnom napretku u razvoju biomaterijala kao nosača za inženjerstvo koštanog tkiva, koji svojim sastavom, 3D strukturom i biomehaničkim svojstvima, integrirani sa stanicama i biološki aktivnim molekulama, mogu podržavati osteogenezu, odnosno regeneraciju kosti.

Svojstva idealnog nosača za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva prikazuje slika 2.⁶



Slika 2 – Biološka, mehanička i strukturalna svojstva idealnog nosača za inženjerstvo koštanog tkiva⁶

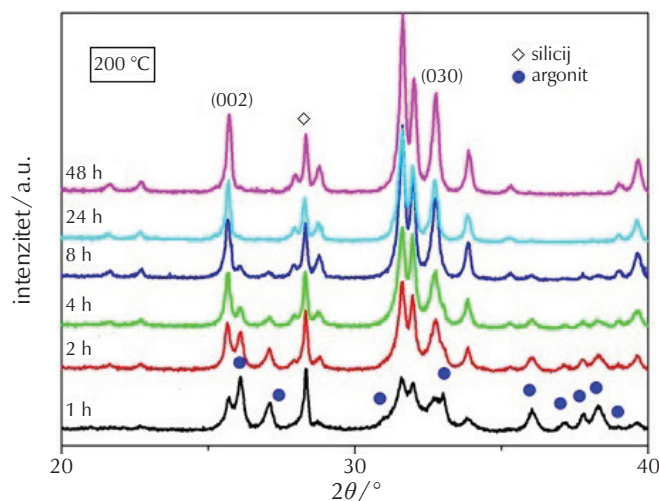
Fig. 2 – Biological, mechanical, and structural properties for an ideal bone tissue engineering scaffold⁶

Posebno zanimanje pobuđuje nova generacija nosača na temelju nanostrukturiranih poroznih kompozitnih materijala dobivenih kombiniranjem biorazgradljivih polimera i bioaktivne keramike. Posljednjih godina intenzivno se istražuje kalcij-fosfatna keramika a posebna pozornost posvećena je hidroksiapatitu, HAp, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, zbog njegove kemijske i strukturne sličnosti s anorganskom komponentom prirodne kosti, odlične osteokonduktivnosti i bioaktivnosti.^{7,8}

U ovom radu dan je pregled istraživanja znanstvenika s Fakulteta kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu usmjerenih na pripremu biomimetičkih nosača za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva.

2. Biomimetički nosači za inženjerstvo koštanog tkiva

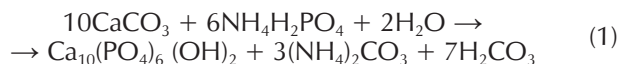
Bioinspirirana priprava naprednih materijala u mnogim je područjima dovela do tehnološkog napretka, pa se sve češće predlažu i intenzivno istražuju biomimetički materijali i za primjene u medicini. Vrlo interesantno polazište za pripremu biomimetičkih nosača za inženjerstvo koštanog tkiva su morski organizmi.⁵ Većina morskih organizama ima tvrda tkiva građena od kalcijeva karbonata u obliku kalcita ili aragonita koja se mogu prevesti u kalcij-fosfatnu keramiku. Potencijal sipine kosti za pripremu visokoporoznog HAp-a i kompozitnih nosača na Fakultetu kemijskog inženjerstva i tehnologije Sveučilišta u Zagrebu istražuju *H. Ivanković i sur.*⁹⁻¹⁶ Sipina kost je jeftin, lako dostupan prirodni materijal vrlo visoke poroznosti (~90 %) i idealne veličine međusobno povezanih pora (200 – 600 μm).



Slika 3 – XRD analiza hidrotermalne pretvorbe aragonita u hidroksiapatit¹¹

Fig. 3 – XRD analysis of hydrothermal conversion of aragonite into hydroxyapatite¹¹

Hidrotermalna pretvorba biogenog aragonita sipine kosti u kalcij-fosfatnu keramiku, reakcijom s vodenom otopinom amonijeva dihidrogen fosfata, $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, istraživana je pri različitim temperaturama između 140 °C i 220 °C i kroz različito vrijeme trajanja reakcije (1 – 48 h).¹² Ukupna reakcija može se prikazati jedn. (1):



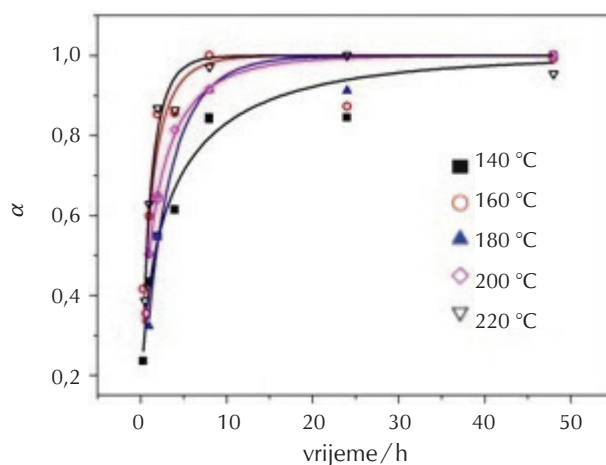
Kinetika i mehanizam pretvorbe aragonita u HAp istraživani su na temelju rezultata kvantitativne XRD analize i Rietveldovim utočnjavanjem strukture. Potpuna pretvorba aragonita u HAp postignuta je nakon 48 h pri temperaturi od 200 °C,¹¹ slika 3.

Izotermna kinetika pretvorbe opisana je Johnson-Mehl-Avramijevom jedn. (2):

$$\alpha = 1 - \exp[-(k^n)(t - \tau)^n] \quad (2)$$

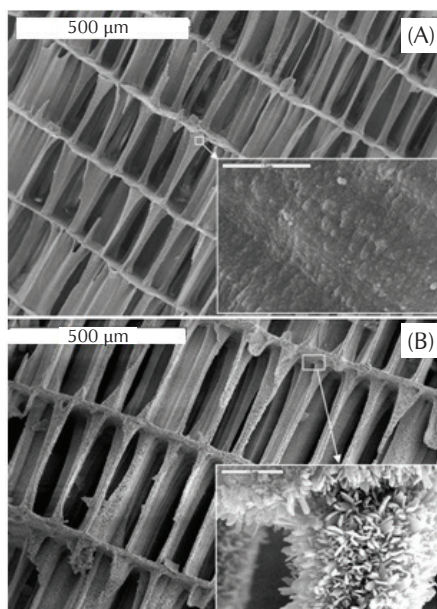
gdje je α doseg pretvorbe aragonita u HAp, n je Avramijev eksponent, τ je vrijeme inkubacije a k konstanta brzine reakcije.¹² Na slici 4 dana je usporedba eksperimentalnih rezultata i rezultata modeliranja.

Kinetička analiza ukazala je na difuzijski kontroliran jednodimenzionalni rast HAp-a u istraživanom području temperatura.¹² Pretražnom elektronskom mikroskopijom (SEM) utvrđeno je da tijekom hidrotermalne pretvorbe aragonita u HAp ne dolazi do narušavanja originalne, visokoporozne strukture sipine kosti,¹¹ slika 5, što je važan preduvjet za primjenu biogenog HAp-a kao nosača u inženjerstvu koštanog tkiva.



Slika 4 – Izotermna kinetika hidrotermalne pretvorbe aragonita u hidroksiapatit. Usporedba eksperimentalnih podataka i rezultata modeliranja (Johnson-Mehl-Avrami jednadžba).¹²

Fig. 4 – Isothermal kinetics of hydrothermal conversion of aragonite into hydroxyapatite. The fit of the Johnson-Mehl-Avrami model to the experimental data.¹²



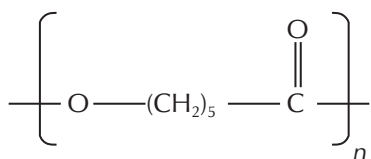
Slika 5 – SEM mikrografije sipine kosti prije (A) i nakon (B) hidrotermalne pretvorbe pri 200 °C/24 h¹¹

Fig. 5 – SEM micrographs of cuttlefish bone before (A) and after (B) hydrothermal conversion at 200 °C/24 h¹¹

2.1. Kompozitni nosači na temelju hidroksiapatita i biorazgradljivih polimera

Glavni nedostatak HAp nosača su njihova slaba mehanička svojstva, posebice krhkost i niska žilavost. Prema tome, oni se ne mogu upotrebljavati u uvjetima koji uključuju opterećenja. Da bi se prevladali navedeni nedostaci, HAp se kombinira s fleksibilnim polimerima.

Radi poboljšanja mehaničkih svojstava nosača *D. Milovac i sur.*^{13,14} impregniraju porozne HAp nosače dobivene iz sipine kosti polikaprolaktonom, PCL, slika 6, biorazgradljivim, biokompatibilnim i netoksičnim polimerom.

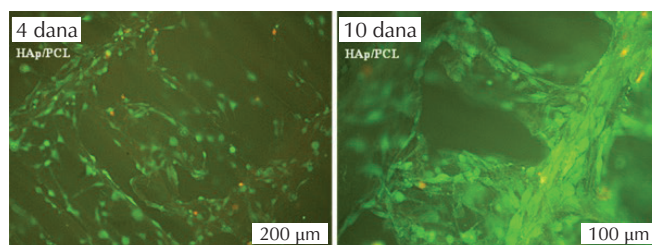


Slika 6 – Struktura polikaprolaktona

Fig. 6 – Structure of polycaprolactone

Za kompozitni HAp/PCL nosač, u usporedbi s neimpregniranim HAp nosačem, dobivene su više vrijednosti tlačne čvrstoće i modula elastičnosti koje su unutar područja vrijednosti objavljenih za ljudsku trabekularnu kost. Bioaktivnost nosača ispitana je *in vitro* upotrebom HBSS pufera (engl. *Hank's balanced salt solution*). Na oba istraživana nosača (HAp i HAp/PCL) opažena je *in vitro* mineralizacija kalcijeva fosfata iz kojeg nastaje apatit sličan onom u prirodnoj kosti.¹³ Istraživanja *in vitro*¹⁴ s preosteoblastnim

mišjim stanicama MC3T3-E1 pokazala su da pripravljeni nosači nisu toksični i da su odgovarajuća 3D podloga za prijanjanje, umnažanje i diferencijaciju stanica te depoziciju izvanstanične matrice. Vijabilnost stanica (sposobnost preživljavanja) uzgajanih na nosačima potvrđena je bojenjem stanica acetometoksi kalceinom (kalcein AM) i etidijevim homodimerom, EthD-1, (Live/Dead assay). Kalcein AM se zadržava u živim stanicama, što na slikama dobivenim fluorescentnom mikroskopijom daje zeleno obojenje a EthD-1 ulazi u stanice s oštećenom membranom te nakon vezanja s nukleinskim kiselinama daje crveno obojenje koje upućuje na staničnu smrt,¹⁴ slika 7.



Slika 7 – Slike obojenih MC3T3-E1 stanica nakon 4 i 10 dana uzgoja na HAp/PCL nosačima, dobivene fluorescentnom mikroskopijom. Kalcein AM boji žive stanice (zeleno), a etidijev homodimer-1 boji jezgre mrtvih stanica (crveno).¹⁴

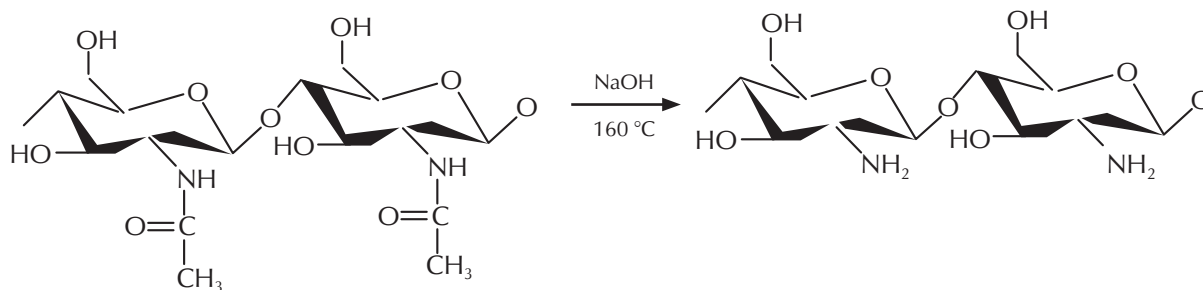
Fig. 7 – Fluorescence microscopy images of stained MC3T3-E1 cells after culturing for 4 and 10 days on the HAp/PCL scaffolds. Calcein AM stained the live cells green, and ethidium homodimer-1 stained the nuclei of dead cells red.¹⁴

Proliferacija MC3T3-E1 stanica potvrđena je određivanjem sadržaja DNK (PicoGreen dsDNA quantification kit, Invitrogen). Određivanjem aktivnosti enzima alkalne fosfataze (ALP) te imunofluorescentnim bojenjem kolagena tipa I potvrđena je diferencijacija osteoblasta. Sinteza kolagena kao pretežitog proteina u izvanstaničnoj matrici potvrđena je određivanjem sadržaja hidroksiprolina. Mikrografi dobiveni fluorescentnom mikroskopijom ukazali su na vlaknastu strukturu izvanstanične matrice.¹⁴

2.1.1. In situ HAp/kitozan kompoziti

Posljednjih godina znatna pozornost posvećena je i kompozitima na temelju kitozana i HAp-a kao obećavajućim materijalima za oponašanje organskog i anorganskog dijela prirodne kosti. Kitozan je deacetilirani derivat prirodnog polisaharida hitina, slika 8.

U kiselim vodenim otopinama, zbog protoniranih NH₂ skupina, kitozan postaje polikation sposoban za stvaranje kompleksa s metalnim ionima te širokim spektrom prirodnih anionskih vrsta poput lipida, proteina, DNK, pa je interesantan za biomedicinsko područje kao sustav za dostavu lijekova ili regeneracije tkiva. U tkivnom inženjerstvu kitozan kao biopolimerna matrica pronalazi primjenu u obliku trodimenzionalnih nosača ili hidrogelova za koštane i hrskavične nadomjestke, dvodimenzionalnih poroznih struk-

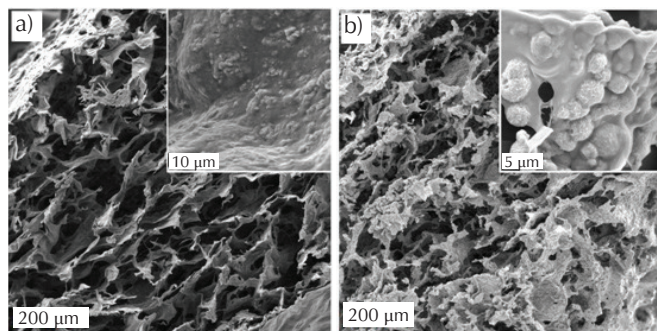


Slika 8 – Priprava kitozana iz hitina

Fig. 8 – Preparation of chitosan from chitin

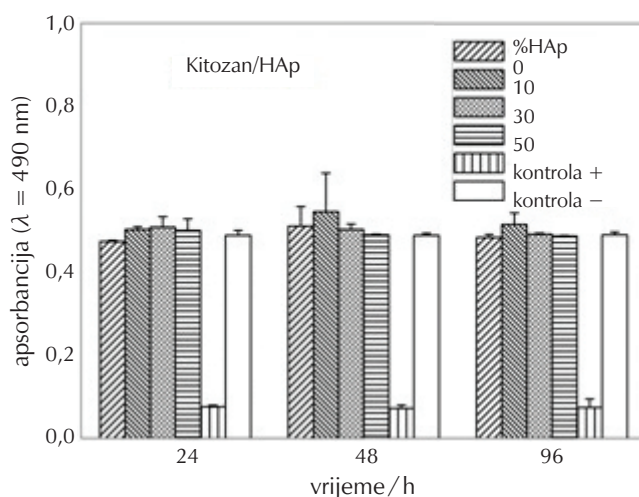
tura za previjanje rana te visokoporoznih membrana ili filmova za prevlačenje inertnih implantata. U usporedbi s drugim biopolimernim matricama rabljenim u inženjerstvu koštanog tkiva, prednost kitozana je u njegovoj strukturi sličnoj glikozaminoglikanskim lancima (GAG) prisutnim u izvanstaničnoj matrici. Brojna biološka istraživanja pokazala su da dodatak hidroksiapatita kitozanu rezultira poboljšanjem stanične adhezije i proteinske adsorpcije, povećanjem stanične proliferacije, ekspresije kolagena tipa I i osteogenih markera diferencijacije te poboljšanjem mehaničkih svojstava materijala.¹⁷⁻¹⁹

Postupkom taloženja HAp-a *in situ*, u otopini kitozana pri temperaturama 37 i 50 °C A. Rogina i sur.²⁰ pripravili su niz nanokompozita koji sastavom i mikrostrukturom oponašaju prirodnu kost. Vlaknasta morfologija (400 nm) HAp-a opažena transmisivskom elektronskom mikroskopijom (TEM) ukazala je na nukleaciju HAp-a na kitozanskim lancima.²⁰ Kombiniranjem postupaka toplinski inducirano razdvajanja, geliranja i ekstrakcije dobiveni su visokoporozni HAp/kitozan nosači s različitim masenim udjelima HAp-a (0 – 60 %) dobivenog *in situ*,²¹ slika 9.

Slika 9 – SEM mikrografije nosača na temelju kitozana i HAp-a formiranog *in situ*. a) w(HAp) = 0,3; b) w(HAp) = 0,6²¹Fig. 9 – SEM micrographs of scaffolds based on chitosan and HAp formed *in situ*. a) w(HAp) = 0.3; b) w(HAp) = 0.6²¹

Nosače odlikuje široka raspodjela veličina pora, u rasponu od 10 do 200 μm, te dobra međusobna povezanost pora koja se ogleda u vrijednostima otvorene porozno-

sti u rasponu od 84 do 92 %. Biološka istraživanja *in vitro* (MTT test) s mišjim fibroblastima (L929) pokazala su da pripremljeni nosači nisu citotoksični,²¹ slika 10. MTT test daje procjenu vijabilnosti stanica mjerenjem aktivnosti mitohondrijskog enzima koji reducira tetrazolijevu sol (MTT) u formazan. Dobiveno ljubičasto obojenje analizira se spektrofotometrijski na određenoj valnoj duljini. Očitana apsorbancija proporcionalna je broju živih stanica u uzorku, pri čemu se preživljenje stanica izražava kao omjer apsorbancije tretiranih i netretiranih (kontrolnih) stanica. Materijal se smatra citotoksičnim ako je vijabilnost stanica ispod 70 % od početnog broja nasadenih stanica.

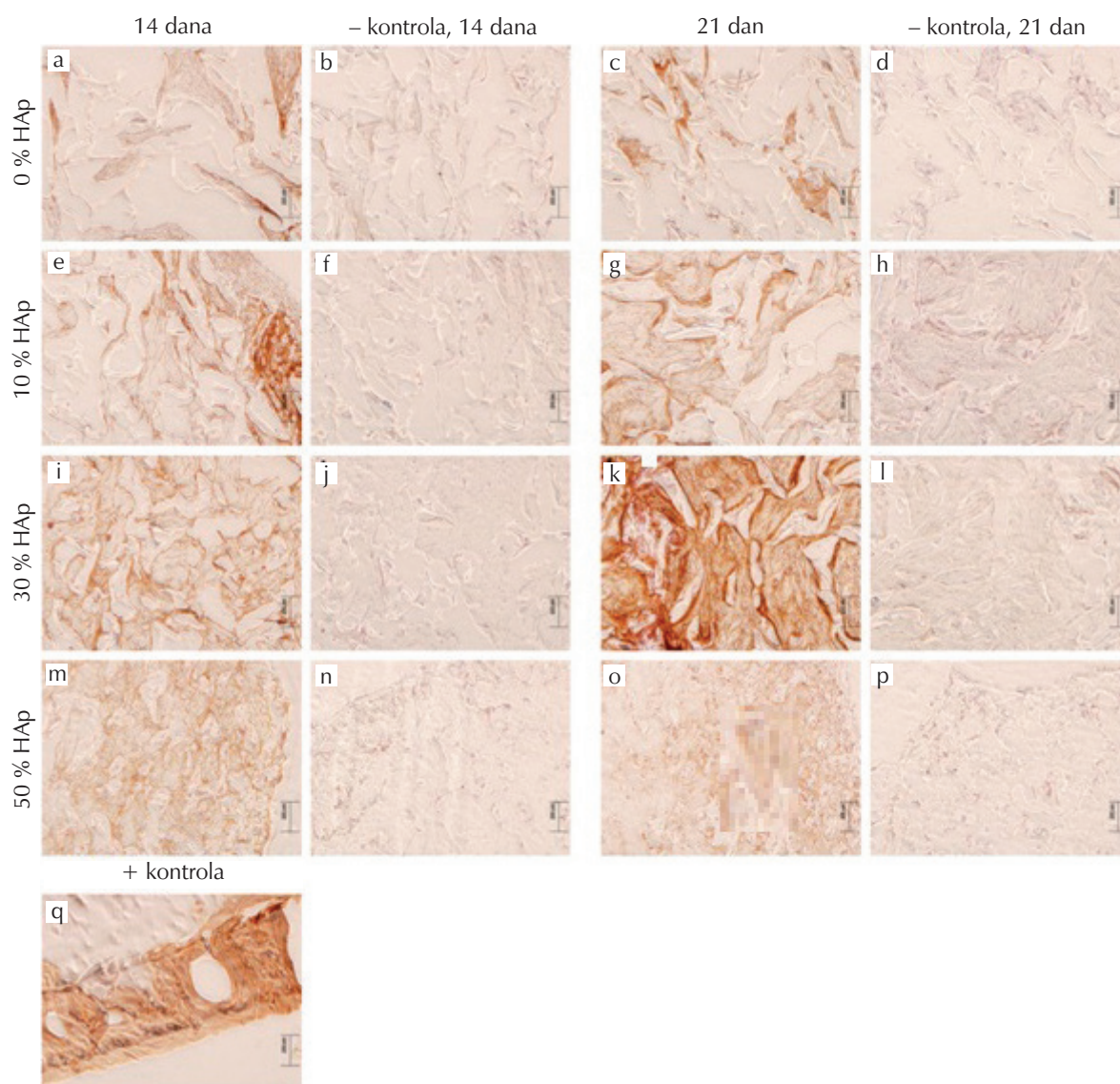
Slika 10 – Rezultati MTT testa sa stanicama L929 nakon 24, 48 i 96 h inkubacije pri 37 °C²¹Fig. 10 – MTT assay of L929 cells after 24, 48, and 96 h of incubation at 37 °C²¹

Adhezija i proliferacija preosteoblastnih mišjih stanica MC3T3-E1 na nosačima kvalitativno je analizirana pomoću testa "Live/Dead" a kvantifikacija preosteoblasta provedena je brojanjem jezgri stanica bojenih fluorescentnom DAPI bojom (4',6'-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid).²² Diferencijacija stanica procijenjena je preko specifičnih osteoblastnih markera (RUNX2, osteopontin, integrin-ve-

zujući sijaloprotein).²² Rezultati su ukazali na pozitivan utjecaj HAp-a, formiranog *in situ* u matrici kitozana, na staničnu adheziju i proliferaciju. U kompozitima s većim sadržajem HAp-a (30 i 50 %) potvrđena je i ekspresija osteogenih markera diferencijacije ukazujući na potencijal nosača za primjene u liječenju oštećenog koštanog tkiva.²²

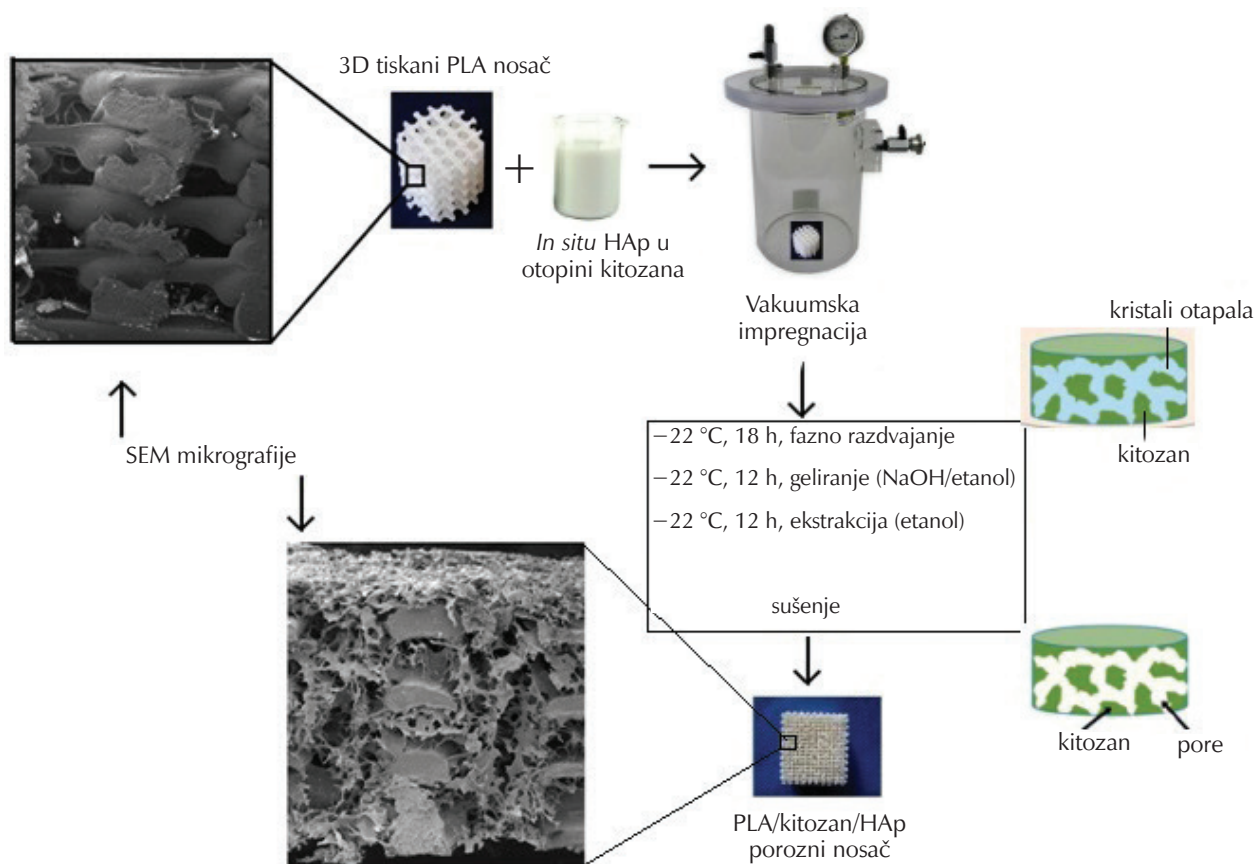
Osim u statičnim uvjetima, uzgoj stanica na kompozitnim HAp/kitozan nosačima proveden je i u dinamičnim uvjetima,²³ s humanim mezenhimskim matičnim stanicama (hMSCs, engl. *human mesenchymal stem cells*), u perfuzijskom bioreaktoru koji omogućava kontroliranu dobavu hranjivih tvari i kisika stanicama te uklanjanje metabolita. Prostrujavanje hranjivog medija kroz porozni nosač osigurava i biomehanički podražaj (smična naprezanja) važan za proliferaciju i diferencijaciju stanica.

Rezultati biološke karakterizacije ukazali su na dobru staničnu adheziju (90 – 98 %) kod svih istraživanih kompozitnih nosača. Bojenje staničnih jezgri fluorescentnom bojom (Hoechst 33342) nakon 21 dana uzgoja stanica u dinamičkim uvjetima i histološka analiza nakon 14 i 21 dana uzgoja ukazali su na to da nosač s 30 % HAp-a ima ujednačenu raspodjelu stanica kroz cijeli volumen nosača i osigurava najbolje uvjete za stvaranje novog koštanog tkiva.²³ Izoliranjem mRNK iz tkiva i qPCR analizom (engl. *Quantitative Polymerase Chain Reaction*) praćena je ekspresija koštanih markera kao što su kolagen, koštani sijaloprotein, protein dentalnog matriksa i osteokalcin. Imunohistokemijsko bojenje je ukazalo na najveću akumulaciju vlaknastog kolagena I, slika 11, i osteokalцина na nosaču s 30 % HAp-a, potvrđujući njegov osteoinduktivni potencijal aktiviranjem diferencijacije hMSC u osteoblaste.²³



Slika 11 – Imunohistokemijsko istraživanje kolagena I na različitim HAp/kitozan nosačima nakon 14 i 21 dana osteogene indukcije. Smeđa boja ukazuje na pozitivno bojenje. Vrlo jako obojenje opaženo je na nosaču koji sadrži 30 % HAp-a nakon 21 dana osteokondukcije (k).²³

Fig. 11 – Immunohistochemical examination of collagen I on different HAp/chitosan scaffolds after 14 and 21 days of osteogenic induction. Brown colour indicates positive staining. Very strong staining was observed in scaffold composed of 30 % HA after 21 days of osteoinduction (k).²³



Slika 12 – Priprava poroznih kompozitnih PLA/kitozan/HAp nosača i SEM mikrografije nosača²⁴

Fig. 12 – Preparation of porous composite PLA/chitosan/HAp scaffolds and SEM micrographs of scaffolds²⁴

Glavni nedostatak poroznih nosača na temelju kitozana i HAp-a su slaba mehanička svojstva. Kako bi poboljšali mehanička svojstva nosača, A. Rogina i sur.²⁴ impregniraju makroporozni nosač poli(mliječne kiseline), PLA, dobiven tehnikom 3D tiska, suspenzijom HAp-a, formiranog *in situ* u otopini kitozana, slika 12. Nakon toplinski inducirano faznog razdvajanja (pri $-22\text{ }^{\circ}\text{C}$), geliranja kitozana (u smjesi NaOH/etanol) i ekstrakcije neotopalom (etanol) dobivaju odgovarajuću poroznost kitozanske matrice za nesmetanu migraciju stanica kroz cijeli volumen nosača. Strukture nosača snimljene SEM-om uspoređene su također na slici 12.²⁴

Biološka istraživanja s humanim mezenhimskim matičnim stanicama potvrdila su netoksičnost materijala te dobru staničnu adheziju i proliferaciju. Analizom proteina potvrđena je ekspresija osteoblastnih markera diferencijacije (osteokalcina i integrin-vezujućeg sijaloproteina).²⁴

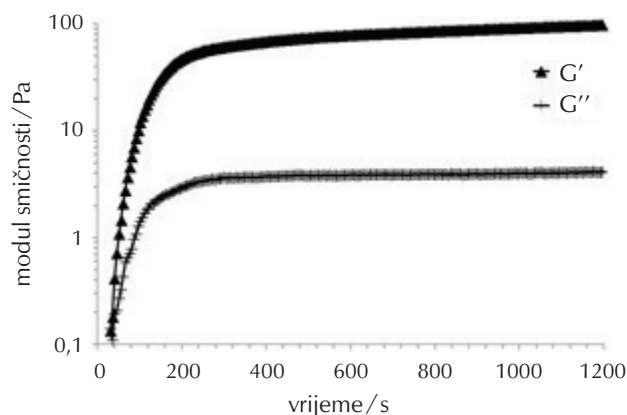
2.2. Hidrogelovi

Nosači za tkivno inženjerstvo često se pripremaju u obliku hidrogelova. Hidrogel je 3D mreža lanaca prirodnog ili sintetskog polimera, nastala kovalentnim vezanjem polimernih lanaca ili fizikalnim vezama (npr. ispreplitanjem

lanaca) odnosno ionskim vezama, koja zadržava veliku količinu vode ili biološke tekućine, zbog hidrofilnih skupina na polimernim lancima kao što su $-\text{NH}_2$, $-\text{COOH}$, $-\text{OH}$ i dr. U tkivnom inženjerstvu gelovi služe za kontroliranu lokalnu dostavu stanica i/ili faktora rasta. Posebno su korisni injektibilni hidrogelovi^{25,26} koji podliježu geliranju *in situ*, zbog promjene pH ili temperature, jer se mogu injektirati *in vivo* u dublje slojeve tkiva bez oštećenja okolnog područja, u potpunosti ispunjavaju oštećeno mjesto i mogu se primijeniti na oštećenja nepravilnog oblika. Rezultat toga je manja mogućnost infekcije, neinvazivnost liječenja i smanjena bol pacijenta.²⁶

2.2.1. In situ HAp/kitozan hidrogelovi

A. Rogina i sur.²⁷ pripravili su novi pH-osjetljivi kompozitni hidrogel na temelju kitozana i HAp-a upotrebljavajući NaHCO_3 kao gelirajući agens. Sinteza apatitne faze *in situ* rezultirala je povećanjem pH suspenzije, što je olakšalo fizikalno umreživanje kitozana (geliranje) bez potrebe za velikim količinama gelirajućeg agensa. Kao što prikazuje slika 13, do naglog porasta reoloških svojstava (modula pohrane, G' , i modula gubitka, G'') došlo je već nakon 4 min od dodatka gelirajućeg agensa.



Slika 13 – Reološka karakterizacija hidrogela na temelju kitozana i HAp-a pri 37 °C. Modul pohrane (G') i modul gubitka (G'') kao funkcija vremena.²⁷

Fig. 13 – Rheological characterization of a chitosan/HAp hydrogel at 37 °C. Storage (G') and loss (G'') modulus as a function of time.²⁷

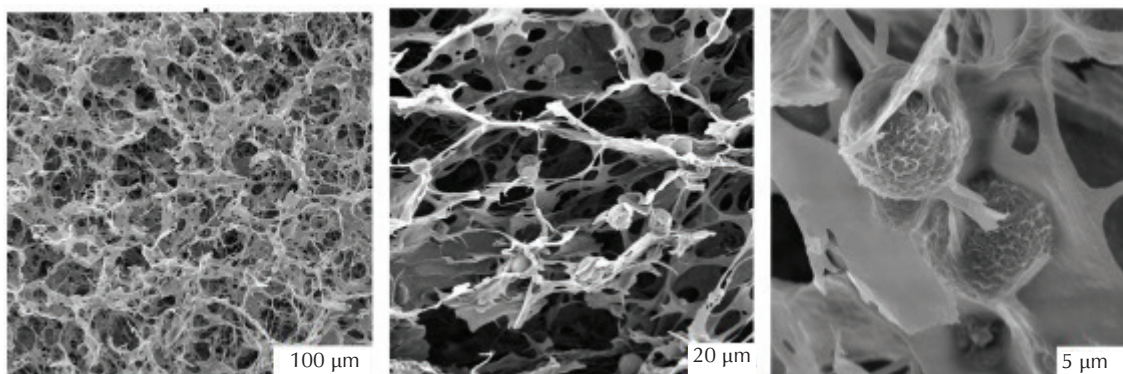
Biološka istraživanja *in vitro* (MTT test) s mišjim fibroblastima pokazala su da pripremljeni hidrogel nije citotoksičan. Test "Live/dead" potvrdio je dobru vijabilnost stanica inkapsuliranih u hidrogel te njihovu homogenu rasprostranjenost, bez stvaranja aglomerata.²⁷ SEM mikrografije osušenog hidrogela s homogeno raspodijeljenim HAp česticama formiranim *in situ* unutar kitozanske matrice prikazuje slika 14.²⁸

Detaljnju *in vitro* karakterizaciju hidrogela inkapsuliranog s MSC stanicama, uključujući enzimatsku razgradnju hidrogela u simuliranim fiziološkim uvjetima tijekom 28 dana inkubacije, proveli su A. Ressler *i sur.*²⁸ Osteogena diferencijacija inkapsuliranih MSC stanica potvrđena je kolorimetrijskim određivanjem aktivnosti alkalne fosfataze i imu-

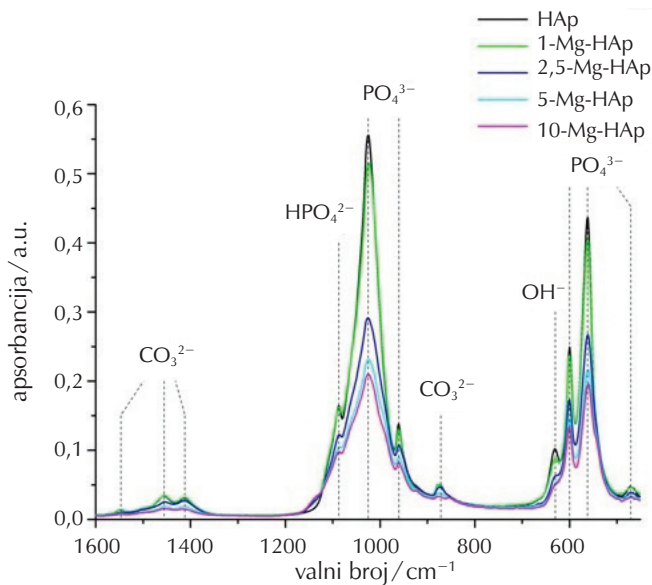
noflorescentnim bojenjem, koje je ukazalo na ekspresiju osteogenih markera Runx2, kolagena tipa I i osteokalcina. Mineralizacija izvanstanične matrice (depozicija kalcijevih fosfata) potvrđena je von Kossa i Alizarin-crvenim bojenjem.²⁸

2.3. Porozni nosači na temelju supstituiranog hidroksiaptita

Kao što je navedeno, mineralna faza prirodne kosti kemijski je slična hidroksiapatitu, $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, čija kristalna struktura omogućava različite ionske supstitucije.²⁹ Uz Ca^{2+} , PO_4^{3-} i OH^- ione, biološki apatiti uvijek sadrže CO_3^{2-} (3.5-7.4 mas.%)³⁰ te ione u tragovima poput Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Cl^- , F^- .²⁹⁻³² Brojna istraživanja pokazala su da uvođenje malih količina nekih iona u strukturu hidroksiapatita može rezultirati poboljšanjima njegovih bioloških, fizikalno-kemijskih i mehaničkih svojstava. Magnezijev ion (Mg^{2+}) je, nakon karbonatnog iona (CO_3^{2-}), drugi najzastupljeniji supstituent u hidroksiapatitu koji znatno utječe na biološka svojstva i aktivnost koštanog tkiva.^{30,33} Bauer *i sur.*³⁴ hidrotermalno su sintetizirali magnezijem supstituirani HAp iz biogenog aragonita (sipina kost), amonijeva dihidrogen fosfata i magnezijeva klorida heksahidrata, $\text{MgCl}_2 \times 6\text{H}_2\text{O}$, odnosno magnezijeva perklorata, $\text{Mg}(\text{ClO}_4)_2$. Pri pripravi početnih smjesa pretpostavljena je supstitucija kalcija magnezijem od 1; 2,5; 5 i 10 % kao i molarni omjer $(\text{Ca} + \text{Mg})/\text{P} = 10/6$. Struktura HAp-a utočnjena je Rietveldovom metodom te je upotrijebljena kao polazna struktura za analizu Mg^{2+} supstituiranih uzoraka. Potvrđeno je da supstitucija kalcija magnezijevim ionom manjeg ionskog radijusa od kalcija smanjuje veličinu kristalne ćelije hidroksiapatita. FTIR karakterizacijom materijala, slika 15, utvrđena je predominantna supstitucija karbonatom B-tipa (ugradnja CO_3^{2-} na poziciju PO_4^{3-}) svojstvena biološkim apatitima.³⁵



Slika 14 – SEM mikrografije osušenog hidrogela s HAp česticama precipitiranim *in situ* unutar kitozanske matrice²⁸
Fig. 14 – SEM micrographs of dried hydrogel with *in situ* precipitated HAp particles within chitosan matrix²⁸



Slika 15 – FTIR spektri HAp-a i magnezijem supstituiranih HAp-a³⁴

Fig. 15 – FTIR spectra of HAp and Mg-substituted HAp³⁴

Nakon što je indirektnom analizom *in vitro* s ljudskim embrionalnim stanicama (Hek293) potvrđeno da sintetizirani materijal nije citotoksičan, proveden je i eksperiment *in vitro* s kulturom mezenhimskih matičnih stanica u trajanju od 21 dana. Provedene histološke analize potvrdile su nastanak kalcij-fosfatnih depozita te izraženiju pojavu kolagena i osteokalcina kod uzorka hidroksiapatita supstituiranog s 1 % magnezija ukazujući na to da magnezijem supstituirani 3D HAp pogoduje razvoju stanica više nego nesupstituirani hidroksiapatit.

4. Zaključak

Istraživani biomimetički 3D porozni (nano)kompozitni nosači na temelju biorazgradljivih polimera i hidroksiapatita, dobivenog hidrotermalnom pretvorbom aragonitne sipine kosti ili precipitacijom *in situ*, zadovoljavaju niz bioloških, strukturnih i mehaničkih zahtjeva za primjene u inženjerstvu koštanog tkiva. Injektabilni pH-osjetljivi hidrogel na temelju fizikalno umreženog kitozana i hidroksiapatita podržava osteogenu diferencijaciju mezenhimskih matičnih stanica. Ionska supstitucija u kristalnoj strukturi hidroksiapatita ionima u tragovima obećavajući je pristup za dodatno poboljšanje bioloških i fizikalno-kemijskih svojstava nosača.

ZAHVALA

Ovaj je rad sufinancirala Hrvatska zaklada za znanost projektom IP-2014-09-3752.

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

ALP	– alkalna fosfataza – alkaline phosphatase
BTE	– inženjerstvo koštanog tkiva – bone tissue engineering
DAPI	– 4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid – 4',6-diamidino-2-phenylindol-dihydrochloride
DNK/DNA	– deoksiribonukleinska kiselina – deoxyribonucleic acid
ECM	– izvanstanična matrica (međustanična tvar) – extracellular matrix
EthD-1	– etidijev homodimer-1 – ethidium homodimer-1
FTIR	– Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom – Fourier-transform infrared spectroscopy
G'	– modul pohrane – storage modulus
G''	– modul gubitka – loss modulus
GAG	– glikozaminoglikan – glycosaminoglycan
HAp	– hidroksiapatit – hydroxyapatite
HBSS	– Hankova uravnotežena otopina soli, Hankov pufer – Hank's balanced salt solution
Hek293	– stanična linija ljudskih embrionalnih stanica bubrega – human embryonic kidney cell line
hMSC	– ljudske mezenhimске matične stanice – human mesenchymal stem cells
k	– konstanta brzine reakcije – reaction rate constant
L929	– mišji fibroblasti – mouse fibroblast cells
MC3T3-E1	– mišja preosteoblastna stanična linija – mouse pre-osteoblast cell line
Mg_HAp	– magnezijem supstituirani hidroksiapatit – magnesium substituted hydroxyapatite
mRNK/ mRNA	– glasnička ribonukleinska kiselina – messenger ribonucleic acid
MTT	– 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolij bromid – 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
n	– Avramijev eksponent – Avrami exponent
PCL	– polikaprolakton – polycaprolactone
PLA	– poli(mliječna kiselina), polilaktid – poly(lactic acid)

qPCR	– kvantitativna lančana reakcija polimeraze – quantitative polymerase chain reaction
RUNX2	– transkripcijski čimbenik povezan s proteinom "runt"2 (genski marker osteoblastne aktivnosti) – Runt-related transcription factor 2
SEM	– pretražna elektronska mikroskopija – scanning electron microscopy
TEM	– transmisijska elektronska mikroskopija – transmission electron microscopy
XRD	– rendgenska difrakcija – x-ray diffraction
α	– doseg pretvorbe aragonita u HAp – extent of aragonite transformation into hydroxyapatite
τ	– vrijeme inkubacije – incubation time
w	– maseni udjel – mass fraction

Literatura References

1. F. J. O'Brien, *Biomaterials & scaffolds for tissue engineering*, *Mater. Today* **14** (2011) 88–90, doi: [https://doi.org/10.1016/S1369-7021\(11\)70058-X](https://doi.org/10.1016/S1369-7021(11)70058-X).
2. C. Liu, Z. Xia, J. T. Czernuszka, *Design and development of three-dimensional scaffolds for tissue engineering*, *Chem. Eng. Res. Des.* **85** (2007) 1051–1064, doi: <https://doi.org/10.1205/cherd06196>.
3. I. M. El-Sherbiny, M. H. Yacoub, *Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges*, *Glob. Cardiol. Sci. Pract.* **2013** (2013) 316–342, doi: <https://doi.org/10.5339/gcsp.2013.38>.
4. L. Đudarić, S. Zoričić Cvek, O. Cvijanović, A. Fužinac-Smojver, T. Čelić, D. Martinović, *Osnove biologije koštanog tkiva*, *Med. Flum.* **50** (2014) 21–38.
5. V. Čadež, *Nove metode priprave bioimplantata: značaj istraživanja biomineralne strukture morskih beskralješnjaka za razumijevanje procesa mineralizacije kralješnjaka*, *Med. Vjesn.* **43** (2011) 91–101.
6. T.-M. De Witte, L. E. Fratila-Apachitei, A. A. Zadpoor, N. A. Peppas, *Bone tissue engineering via growth factor delivery: from scaffolds to complex matrices*, *Regen. Biomater.* **5** (2018) 197–211, doi: <https://doi.org/10.1093/rb/rby013>.
7. M. H. Fathi, A. Hanifi, V. Mortazavi, *Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder*, *J. Mater. Process. Technol.* **202** (2008) 536–542, doi: <https://doi.org/10.1016/j.jmatprotec.2007.10.004>.
8. J. R. Woodard, A. J. Hilldore, S. K. Lan, C. J. Park, A. W. Morgan, J. A. C. Eurell, S. G. Clark, M. B. Wheeler, R. D. Jamison, A. J. Wagoner Johnson, *The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity*, *Biomater.* **28** (2007) 45–54, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.021>.
9. H. Ivanković, G. Gallego Ferrer, E. Tkalčec, M. Ivanković, *Preparation of highly porous hydroxyapatite ceramics from cuttlefish bone*, *Adv. Sci. Tech.* **49** (2006) 142–147, doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AST.49.142>.
10. H. Ivanković, S. Orlić, D. Kranželić, E. Tkalčec, *Highly porous hydroxyapatite ceramics for engineering applications*, *Adv. Sci. Tech.* **63** (2010) 408–413, doi: <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/AST.63.408>.
11. H. Ivanković, G. Gallego Ferrer, E. Tkalčec, S. Orlić, M. Ivanković, *Preparation of highly porous hydroxyapatite from cuttlefish bone*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **20** (2009) 1039–1046, doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3674-0>.
12. H. Ivanković, E. Tkalčec, S. Orlić, G. Gallego Ferrer, Z. Schauerperl, *Hydroxyapatite formation from cuttlefish bones: Kinetics*, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **21** (2010) 2711–2722, doi: <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4115-4>.
13. D. Milovac, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, *PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: morphology, mechanical properties and bioactivity*, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **4** (2014) 437–445, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.09.036>.
14. D. Milovac, T.C. Gamboa-Martinez, M. Ivanković, G. Gallego Ferrer, H. Ivanković, *PCL-coated hydroxyapatite scaffold derived from cuttlefish bone: In vitro cell culture studies*, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **42** (2014) 264–272, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.034>.
15. E. Tkalčec, J. Popović, S. Orlić, S. Milardović, H. Ivanković, *Hydrothermal synthesis and thermal evolution of carbonate-fluorhydroxyapatite scaffold from cuttlefish bones*, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **42** (2014) 578–586, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.079>.
16. A. Rogina, M. Antunović, D. Milovac, *Biomimetic design of bone substitutes based on cuttlefish bone-derived hydroxyapatite and biodegradable polymers*, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* **107** (2019) 197–204, doi: <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34111>.
17. Y. Zhang, J. R. Venugopal, A. El-Turki, S. Ramakrishna, B. Su, C. T. Lim, *Electrospun biomimetic nanocomposite nanofibers of hydroxyapatite/chitosan for bone tissue engineering*, *Biomater.* **29** (2008) 4314–4322, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.07.038>.
18. M. E. Frohbergh, A. Katsman, G. P. Botta, P. Lazarovici, C. L. Schauer, U. G. Wegst, P. I. Lelkes, *Electrospun hydroxyapatite-containing chitosan nanofibers crosslinked with genipin for bone tissue engineering*, *Biomater.* **33** (2012) 9167–9178, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2012.09.009>.
19. M. Peter, N. Ganesh, N. Selvamurugan, S. V. Nair, T. Furuike, H. Tamura, R. Jayakumar, *Preparation and characterization of chitosan-gelatin/nanohydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering applications*, *Carbohydr. Polym.* **80** (2010) 687–694, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2009.11.050>.
20. A. Rogina, M. Ivanković, H. Ivanković, *Preparation and characterization of nano-hydroxyapatite within chitosan matrix*, *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* **33** (2013) 4539–4544, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2013.07.008>.
21. A. Rogina, P. Rico, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, *Effect of in situ formed hydroxyapatite on microstruc-*

- ture of freeze-gelled chitosan-based biocomposite scaffolds, *Eur. Polym. J.* **68** (2015) 278–287, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.05.004>.
22. A. Rogina, P. Rico, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, *In situ* hydroxyapatite content affects the cell differentiation on porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds, *Ann. Biomed. Eng.* **44** (2016) 1107–1119, doi: <https://doi.org/10.1007/s10439-015-1418-0>.
23. A. Rogina, M. Antunović, L. Pribolšan, K. Caput Mihalić, A. Vukasović, A. Ivković, I. Marijanović, G. Gallego Ferrer, M. Ivanković, H. Ivanković, Human Mesenchymal Stem Cells Differentiation Regulated by Hydroxyapatite Content within Chitosan-Based Scaffolds under Perfusion Conditions, *Polym.* **9** (2017) 387(1–17), doi: <https://doi.org/10.3390/polym9090387>.
24. A. Rogina, A. Hanžek, L. Pribolšan, L. Gómez-Estrada, G. Gallego Ferrer, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Macroporous poly(lactic acid) construct supporting the osteoinductive porous chitosan-based hydrogel for bone tissue engineering, *Polym.* **98** (2016) 172–181, doi: <https://doi.org/10.1016/j.polymer.2016.06.030>.
25. R. Jin, L. S. Moreira Teixeira, P. J. Dijkstra, M. Karperien, C. A. van Blitterswijk, Z. Y. Zhong, J. Feijen, Injectable chitosan-based hydrogels for cartilage tissue engineering, *Biomater.* **30** (2009) 2544–2551, doi: <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2009.01.020>.
26. A. Sivashanmugam, R. A. Kumar, M. V. Priya, S. V. Nair, R. Jayakumar, An overview of injectable polymeric hydrogels for tissue engineering, *Eur. Polym. J.* **27** (2015) 543–565, doi: <https://doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2015.05.014>.
27. A. Rogina; A. Ressler, I. Matić, G. Gallego Ferrer, I. Marijanović, M. Ivanković, H. Ivanković, Cellular hydrogels based on pH-responsive chitosan-hydroxyapatite system, *Carbohydr. Polym.* **166** (2017) 173–182, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2017.02.105>.
28. A. Ressler, J. Ródenas-Rochina, M. Ivanković, H. Ivanković, A. Rogina, G. Gallego Ferrer, Injectable chitosan-hydroxyapatite hydrogels promote the osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells, *Carbohydr. Polym.* **197** (2018) 469–477, doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2018.06.029>.
29. J. B. Park, *Biomaterials Science and Engineering*, Plenum Press, New York, 1984., str. 131–135.
30. R. Z. LeGeros, R. Kijkowska, C. Bautista, J. P. LeGeros, Synergistic effects of magnesium and carbonate on properties of biological and synthetic apatites, *Connect. Tissue Res.* **33** (1995) 203–209, doi: <https://doi.org/10.3109/03008209509017003>.
31. M. Vallet-Regí, D. Arcos, *Biomimetic nanoceramics in clinical use: from materials to applications*, R. Soc. Chem. Cambridge, 2008., str. 1–11.
32. R. Z. LeGeros, *Calcium phosphates in oral biology and medicine*, Monogr. Oral Sci., Vol. 15, Karger, Basel, 1991., str. 109–111, doi: <https://doi.org/10.1159/isbn.978-3-318-04021-0>.
33. A. Laskus, J. Kolmas, Ionic Substitutions in Non-Apatitic Calcium Phosphates *Int. J. Mol. Sci.* **18** (2017) Article No. 2542, doi: <https://doi.org/10.3390/ijms18122542>.
34. L. Bauer, M. Ivanković, H. Ivanković, Magnesium-Substituted Hydroxyapatite Scaffolds Hydrothermally Synthesized from Cuttlefish Bone, *Matrib 2018, Proceedings*, Hrvatsko društvo za materijale i tribologiju, Zagreb, 2018., str. 21–34.
35. B. Wopenka, J. D. Pasteris, A mineralogical perspective on the apatite in bone, *Mater. Sci. Eng. C* **25** (2005) 131–143, doi: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2005.01.008>.

SUMMARY

Preparation of 3D Porous Scaffolds for Bone Tissue Engineering

Marica Ivanković, Leonard Bauer, Antonia Ressler, Anamarija Rogina,
Maja Antunović, and Hrvoje Ivanković*

Bone tissue engineering (BTE) is a fast growing field focused on the development of bioactive 3D porous scaffolds as temporary extracellular matrices that support cell attachment, proliferation and differentiation, and stimulate bone tissue formation *in vivo*. Over more than ten years, our group has been devoted to developing new biomaterials and methods to prepare 3D porous scaffolds for BTE applications. The potential of natural porous structures such as marine skeletons, composite materials, and hydrogels based on biodegradable polymers and bioresorbable hydroxyapatite ceramics have been studied. In this paper, an overview of our research and main achievements, published in international scientific publications, is provided.

Keywords

Bone tissue engineering, 3D scaffolds, porous structure, cuttlefish bone, hydroxyapatite, biodegradable polymers, hydrogels

*Faculty of Chemical Engineering and Technology
University of Zagreb
Marulićev trg 19
10 000 Zagreb, Croatia*

*Review
Received July 19, 2019
Accepted September 3, 2019*