



Sveučilište u Zagrebu

FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Luka Dornjak

BIORAZGRADLJIVI HIDROGELOVI KAO NOSAČI LIJEKA PRI LIJEČENJU TUMORA KOSTI

DOKTORSKI RAD

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu

FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Luka Dornjak

**BIODEGRADABLE HYDROGELS AS DRUG
CARRIERS IN THE TREATMENT OF BONE
TUMORS**

DOCTORAL THESIS

Zagreb, 2025



Sveučilište u Zagrebu
FAKULTET KEMIJSKOG INŽENJERSTVA I TEHNOLOGIJE

Luka Dornjak

BIORAZGRADLJIVI HIDROGELOVI KAO NOSAČI LIJEKA PRI LIJEČENJU TUMORA KOSTI

DOKTORSKI RAD

Mentor: Izv. prof. dr. sc. Anamarija Rogina

Zagreb, 2025.



Sveučilište u Zagrebu
FACULTY OF CHEMICAL ENGINEERING AND TECHNOLOGY

Luka Dornjak

BIODEGRADABLE HYDROGELS AS DRUG CARRIERS IN THE TREATMENT OF BONE TUMORS

DOCTORAL THESIS

Supervisor: Assoc. Prof. Anamarija Rogina

Zagreb, 2025.

Sažetak

Tradicionalne metode liječenja agresivnih tumora poput osteosarkoma često rezultiraju narušavanjem strukturnog integriteta kosti nakon resekcije tumora, dok popratna kemoterapija često izaziva sistemsku toksičnost, uključujući kardiotoksičnost i imunosupresiju. Takvi problemi naglašavaju potrebu za razvojem ciljanih, višenamjenskih sustava koji ne samo da djeluju kao sustavi za ciljanu dostavu lijekova, već istovremeno potiču obnovu koštanog tkiva kroz osteogena i angiogena svojstva. Biorazgradljivi polimerni sustavi, osobito oni temeljeni na prirodnim polimerima poput kitozana, zbog svoje sličnosti s izvanstaničnom matricom, posjeduju visok stupanj biokompatibilnosti i biorazgradljivosti. Inkapsulacijom kemoterapeutika unutar polimerne matrice kitozana osigurava se zaštita lijeka od prerane razgradnje i postiže ciljano otpuštanje lijeka, što može smanjiti nuspojave i povećati terapijsku učinkovitost tijekom liječenja. Kombinacija sustava za ciljanu dostavu lijekova s inovativnim biokeramičkim materijalima, kao što je hidroksiapatit (HAp), i spojevi bora, poput borne kiseline, ima veliki potencijal u obnovi koštanog tkiva. Kombinacijom HAp biokeramike (potpomaže osteointegraciju i osteogenezu) i borne kiseline (potpomaže angiogenezu) s polimernom matricom kitozana omogućuje se stvaranje kompozitnih biomaterijala koji mogu služiti kao biorazgradljivi sustavi za ciljanu dostavu lijekova uzistovremeno poticanje obnove tkiva .

U ovome doktorskom radu pripravljene su bornom kiselinom modificirane kompozitne okosnice na temelju kitozana i HAp-a kao sustavi za ciljanu dostavu kemoterapeutika. Visokoporozne okosnice s različitim udjelom HAp i borne kiseline pripravljene su metodom toplinski inducirane fazne separacije praćenom procesom liofilizacije. Identifikacija pripremljenih sustava provedena je rendgenskom difrakcijskom analizom i infracrvenom spektroskopijom s Fourierovim transformacijama. Morfologija i bioaktivnost kompozitnih okosnica istražene su pretražnom elektronskom mikroskopijom koja je ukazala na makroporoznu strukturu okosnica s međusobno povezanim porama, te prisutnost interaktivnog apatitnog sloja na površini okosnice upućujući na bioaktivnost okosnica. Svojstva enzimske razgradnje i kapacitet apsorpcije istraženi su u fiziološkom (fosfatnom) mediju gdje je utvrđena enzimska razgradnja okosnica i visoki kapacitet apsorpcije (do 3000%) u ovisnosti o pH-vrijednosti. Otpuštanje inkapsuliranog lijeka, doksorubicina (DOX), ispitano je u fosfatnom i staničnom mediju pri čemu je potvrđeno otpuštanje lijeka u ovisnosti o pH-vrijednosti, te izostanak utjecaja dodatka HAp-a na profil otpuštanja lijeka. Dodatak

HAp-u u polimernu matricu nije utjecao na kovalentno umreživanje okosnica genipinom, dok je reološka analiza ukazala na prirodu „jakog“ gela pripremljenih sustava. ICP-MS analiza otpuštanja kalcija i bora potvrdila je njihovo brzo otpuštanje uranjanjem u fosfatni medij pri fiziološkom pH. Analiza citotoksičnosti kompozitnih okosnica kao nosača lijeka prema HDFa i MG-63 staničnim linijama potvrdila je netoksičnost okosnica bez lijeka, dok su okosnice s inkapsuliranim lijekom bile citotoksične prema svim staničnim linijama. Analiza ekspresije vaskularnog endotelnog čimbenika rasta (engl. *vascular endothelial growth factor*)(VEGF) faktora kao markera angiogeneze ukazala je na porast ekspresije VEGF-a HDFa stanica uzgojenih s kompozitnim okosnicama s nižim udjelom borne kiseline, dok je kod MG-63 stanica uočen značajan porast ekspresije VEGF-a u kontaktu s kompozitnim okosnicama bez borne kiseline.

Ključne riječi: kitozan, hidrogelovi, doksorubicin, osteosarkom, hidroksiapatit, borna kiselina, angiogeneza, osteogeneza.

Biodegradable hydrogels as drug carriers in the treatment of bone tumors

Abstract

Traditional treatment methods for aggressive tumours such as osteosarcoma often result in disruption of the bone's structural integrity following tumour resection, while accompanying chemotherapy frequently induces systemic toxicity, including cardiotoxicity and immunosuppression. These challenges highlight the need for the development of targeted, multifunctional systems that not only serve as platforms for localized drug delivery but also promote bone tissue regeneration through osteogenic and angiogenic properties. Biodegradable polymeric systems, especially those based on natural polymers such as chitosan, exhibit high biocompatibility and biodegradability due to their similarity to the extracellular matrix. Encapsulation of chemotherapeutics within the chitosan matrix protects the drug from premature degradation and enables controlled release, thereby reducing side effects and enhancing therapeutic efficacy. The combination of targeted drug delivery systems with innovative bioceramic materials, such as hydroxyapatite (HAp), and boron compounds, such as boric acid, has great potential in bone tissue regeneration. Integrating HAp bioceramics (supports osteointegration and osteogenesis) and boric acid (supports angiogenesis) with the polymer matrix of chitosan enables the creation of composite biomaterials that can serve as biodegradable systems for the targeted delivery of drugs with simultaneous regenerative properties.

In this doctoral work, boric acid-modified composite scaffolds composed of chitosan and HAp were developed as platforms for the targeted delivery of chemotherapeutics. Highly porous scaffolds with varying contents of HAp and boric acid were fabricated using thermally induced phase separation followed by lyophilisation process. The identification of prepared systems was performed by X-ray diffraction and Fourier transformed infrared spectroscopy. Scanning electron microscopy revealed a macroporous structure with interconnected pores, and the formation of an interactive apatite layer on the scaffold surfaces when incubated in simulated body fluid (SBF) indicating bioactive properties of composite scaffolds. *In vitro* studies in a physiological phosphate medium demonstrated significant enzymatic degradation and pH-dependant absorption capacity (up to 3000%). Release of the encapsulated drug, doxorubicin (DOX), was evaluated in phosphate buffer and cell culture media, confirming pH-dependent drug release profiles, with no significant dependence on the HAp content.

Addition of HAp into the polymer matrix did not affect the covalent crosslinking process between chitosan and genipin, while rheological analysis indicated the "strong" gel nature of the prepared composite systems. ICP-MS analysis of calcium and boron release confirmed rapid release upon immersion in phosphate medium at physiological pH. Cytotoxicity evaluation of the composite scaffolds as drug carriers toward HDFa and MG-63 cell lines confirmed the non-toxicity of scaffolds without the drug, while drug-loaded scaffolds were cytotoxic against all tested cell lines. Analysis of the vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in HDFa cells indicated increase in VEGF expression when cultured with composite scaffold containing lower amount of boric acid, while MG-63 cells expressed significantly higher quantity of VEGF when cultured with scaffolds without the presence of boric acid.

Keywords: chitosan, hydrogels, doxorubicin, osteosarcoma, hydroxyapatite, boric acid, angiogenesis, osteogenesis.