

DOBIJANJE BIOKOMPOZITNIH SKAFOLDA NA BAZI MULTIDOPIRANOG KALCIJUM-HIDROKSIAPATITA I BIORAZGRADIVOG POLIMERA PRIMENOM 3D ŠTAMPE

Autor: ANĐELA PETROVIĆ

e-mail: andjelapetrovic478@gmail.com

Mentor: prof. dr Đorđe Veljović, as. dr Tamara Matić,

Katedra za neorgansku hemijsku tehnologiju

Tehnološko-metalurški fakultet Univerziteta u Beogradu

Uvod: Usled nedostataka koštanih graftova, razvijeno je inženjerstvo koštanog tkiva, koje podrazumeva primenu skafolda – privremenog 3D nosača ćelija. Kalcijum-hidroksiapatit (HAP) se koristi kao biomaterijal za skafolde zbog svoje sličnosti sa biološkim apatitom. Kristalna struktura HAP-a omogućava supstituciju jona stroncijuma, magnezijuma, cinka i bakra, koji poboljšavaju angiogenezu, proliferaciju i osteogenu diferencijaciju ćelija uz antimikrobno dejstvo. Međutim, krtoost keramičkih materijala onemogućava njihovu primenu na mestima većeg opterećenja, pa je poželjno razviti biokompozitne materijale koji simuliraju koštano tkivo.

Cilj: Cilj ovog istraživanja je razvoj biokompozitnih skafolda na bazi multidopiranog HAP-a i biorazgradivog fotoumrežavajućeg polimera polietilen glikol diakrilata (PEGDA) pomoću 3D štampe na bazi mask-stereolitografije (mSLA).

Materijal i metode: Prah hidroksiapatita je dopiran tokom hidrotermalne sinteze sa 2 mol.% Sr, 3 mol.% Mg, 0,4 mol.% Zn i 0,4 mol.% Cu. Morfologija, elementi i fazni sastav čestica su određeni pomoću SEM, EDS i XRD analize. Biokompozitni skafoldi su dobijeni umešavanjem različitih udela multidopiranog HAP-a (0 mas.%, 5 mas.% i 10 mas.%) u mastilo na bazi PEGDA i 3D štampani, nakon čega su poređene struktura i pritiska čvrstoća dobijenih skafolda.

Rezultati: Biokompozitni 3D štampani skafoldi na bazi HAP i PEGDA su uspešno dobijeni metodom mSLA. Skafoldi sa 5% HAP su pokazali poboljšana mehanička svojstva, dok je 10% HAP prouzrokovalo prevelik stepen umreženja i pogoršana mehanička svojstva.

Zaključak: Metoda mSLA je pogodna za sintezu biokompozitnih skafolda i buduća ispitivanja će se baviti pronalaženjem drugih polimernih matrica kako bi se omogućila inkorporacija veće količine čestica HAP.

Ključne reči: skafold, kalcijum-hidroksiapatit, polietilen glikol diakrilat, 3D štampa, mask-stereolitografija.

UVOD

Inženjerstvo koštanog tkiva predstavlja složen interdisciplinarni pristup rešavanju problema koštanih graftova u trenutnoj praksi. Uključeno je korišćenje različitih bioloških i inženjerskih principa kako bi se konstruisale strukture koje mogu obnavljati i održavati normalnu funkciju oštećenih i obolelih kostiju. Ovaj pristup zahteva razvoj biomaterijala sa što sličnijom strukturom i osobinama kostiju i njihovoj preciznoj fizičko-hemijskoj i biološkoj analizi [7].

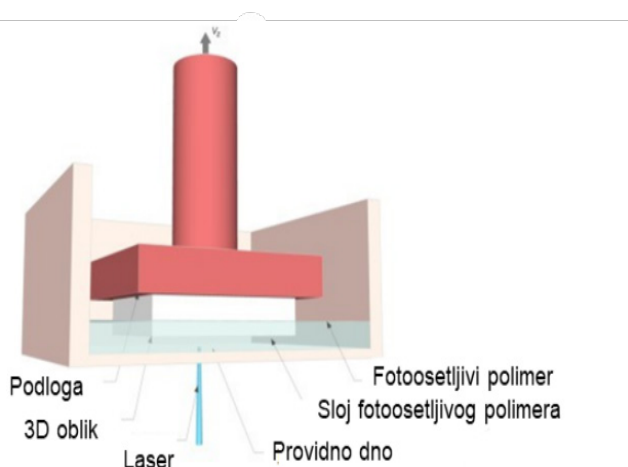
Biomaterijali predstavljaju materijale sa odgovarajućim strukturnim, mehaničkim i biološkim karakteristikama, koji pronalaze potencijalnu primenu u regenerativnoj medicini. Biomaterijali u inženjerstvu koštanog tkiva se najčešće sintetišu u vidu makroporoznih struktura.

Skafoldi su specifično dizajnirani privremeni nosači ćelija sa definisanom poroznošću

i strukturom pora, koja je ujedno povoljna za adheziju i proliferaciju ćelija, ali i za vaskularizaciju novonastalog tkiva. Skafold takođe predstavlja i strukturnu podršku za olakšano vođenje procesa zarastanja oštećenih delova koštanog tkiva.

Skafold treba da bude procesiran tako da poseduje biodegradibilnost, biokompatibilnost, bioaktivnost, kao i da ispunjava specifične zahteve oblika i veličine samog defekta. Sa tehnološke tačke gledišta, veliki izazov je dizajniranje ovako specifičnog biomaterijala koji je pogodan za adheziju ćelija i koji može da se održi u dovoljno dugom vremenu u ljudskom telu [6].

U zavisnosti od uloge i vrste materijala od kog se skafold izrađuje, postoje različite metode za procesiranje ovih makroporoznih nosača ćelija. U ovom radu je za procesiranje biokompozitnih skafolda na bazi polimerne matrice i keramičkog punioca korišćena mask-stereolitografska metoda 3D štampe (Slika 1.).



Slika 1. Šematski prikaz mSLA uređaja po *bottom-up* pristupu

Mask-stereolitografska (mSLA) tehnika 3D štampe koristi ultraljubičasto (UV) zračenje za očvršćavanje datih područja fotopolimera na površini nekog materijala, prilikom čega dolazi do nastajanja 3D oblika prema softverski zadatom modelu. Ova tehnologija je pogodna zbog mogućnosti izrade složenih 3D delova bez kalupa u kratkom vremenu. Proces štampanja temelji se na korišćenju programskog modela 3D oblika koji je podeljen u niz 2D slojeva poprečnog preseka. Pomoću mSLA metode tanki slojevi fotoosetljivog monomera postupno se po zadatim maskama izlažu UV zračenju do izrade konačnog 3D oblika. Štampač koji je korišćen temelji se na fotopolimerizaciji koja se izvodi pomoću izvora zračenja smeštenog ispod posude. Dno ove posude mora biti providno da omogući prolazak UV zraka. Platforma se podiže svaki put kad se pojedini sloj polimerizuje i time se omogućuje da fotoosetljivi monomer teče između dna posude i 3D oblika [7].

Kost se može posmatrati kao kompozitni materijal koji se sastoji od neorganske čvrste faze i organske polimerne faze. Kristali kalcijum-hidroksiapatita ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, HAp) predstavljaju glavni mineral koštanog tkiva. Razlog korišćenja hidroksiapatita u inženjerstvu koštanog tkiva je njegova odlična biokompatibilnost i bioaktivnost, kao i sličan hemijski sastav sa mineralnom komponentom kostiju. Ove podudarnosti su neophodne da bi se ovaj biomaterijal uspešno koristio u izgradnji i regeneraciji koštanog tkiva [8].

Hidroksiapatit sa stehiometrijskim odnosom $\text{Ca/P}=1,67$ je heksagonalne kristalne strukture koja omogućava laku inkorporaciju željenih katjona ili anjona. Modifikacija

HAP-a dopiranjem anjona ili katjona proširuje potencijalnu biomedicinsku primenu ovog materijala i jako utiče na poboljšanje njegovih svojstava. Dobijanje multijonskog dopiranog HAP-a (multi-HAP) moguće je primenom hidrotermalne metode. Magnezijum, stroncijum, cink i bakar relativno lako tokom sinteze praha ulaze u kristalnu strukturu hidroksiapatita zahvaljujući hemijskoj sličnosti sa kalcijumom.

Poznato je da joni magnezijuma promovišu mineralizaciju kostiju i proliferaciju ćelija, čime se povećava bioaktivnost i biokompatibilnost materijala i bolja simulacija svojstva normalnih bioloških tkiva [2].

Stroncijum aktivno učestvuje u metaboličkim procesima i može da poboljša osteogenu diferencijaciju, proliferaciju i aktivnost osteoblasta. Osim bioloških svojstava, inkorporirani stroncijum u strukturi hidroksiapatita može imati uticaj i na fizička i hemijska svojstva biokeramičkih materijala [8].

U cilju sprečavanja infekcije bakterijama na mestu hirurškog zahvata vrši se dopiranje HAP-a jonima metala poput bakra i cinka, za koje je potvrđeno da poseduju antimikrobna svojstva [4]. Količina ovih jona se mora ograničiti jer se u slučaju njihove prevelike koncentracije mogu ispoljiti njihova toksična svojstva u organizmu.

Pored hemijske modifikacije dopiranjem katjonima, unapređenje svojstava HAP-a se može postići kombinovanjem sa velikim brojem polimera koji moraju biti biodegradibilni da bi se koristili u inženjerstvu koštanog tkiva. Polimeri koji se mogu koristiti u ovu svrhu su raznoliki, neki od njih su polietilen glikol (PEG), polivinil alkohol, poli(mlečna-ko-glikolna kiselina) (PLGA) i poli(2-hidroksietil metakrilat) (PMMA). U ovom istraživanju će se kao polimerna matrica u kompozitnom skafoldu koristiti biorazgradivi polimer poli(etilen glikol) diakrilat (PEGDA). Nakon implantacije u koštani defekt, polimerna komponenta, ojačana hidroksiapatitom, u tkivu se resorbuje i na taj način ustupa svoje mesto regenerisanom tkivu, dok je faza HAP-a stabilna u ispitivanom vremenskom intervalu [4].

Biokompozitni skafold se ugrađuje na mesto kritičnog defekta kosti koja nema sposobnost samoregeneracije. Skafold kao privremena struktura se vremenom razgrađuje, a zamenjuje ga novonastalo koštano tkivo. Brzina razgradnje skafolda mora biti jednaka brzini nastajanja novog koštanog tkiva, jer bi u suprotnom moglo doći do neuspešne regeneracije. Zbog sposobnosti biorazgradnje nema potrebe za naknadnim uklanjanjem skafolda, što je još jedna od njegovih prednosti.

Cilj ovog istraživanja je razvoj biokompozitnih skafolda na bazi biokeramičkih čestica multidopiranog HAP-a i biorazgradivog fotoumrežavajućeg polimera PEGDA pomoću mSLA 3D štampe.

MATERIJAL I METODE

1. Materijali i metoda korišćeni za sintezu multidopiranog praha kalcijum-hidroksiapatita

Za sintezu kalcijum-hidroksiapatita korišćeni su kalcijum-nitrat tetrahidrat ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 99+%, Acros Organics, Gel, Belgija), etilendiamin-tetrasirćetna kiselina dinatrijumova so dihidrat ($\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99+%, Acros Organics, Gel, Belgija), natrijum-dihidrogen-fosfat dihidrat ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 99,8%, VWR International, PA, USA) i urea (Acros Organics, Gel, Belgija). Sintetisani hidroksiapatit je dopiran jonima stroncijuma, magnezijuma, bakra i cinka. Joni kalcijuma supstituisani su katjonima Mg^{2+} , Sr^{2+} , Cu^{2+} i Zn^{2+} dodavanjem redom soli magnezijum-nitrat heksahidrata ($\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, CARLO ERBA Reagents, Kornaredo, Italija), stroncijum-nitrata ($\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$, Acros Organics, Gel, Belgija), bakar(II)-nitrat trihidrata ($\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, Thermo Scientific Chemicals, Voltam, Masačusets) i cink-nitrat heksahidrata ($\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, Kemika, Zagreb, Hrvat-

ska). Sadržaj dopiranih katjona je optimizovan u ranijim istraživanjima [1], [2] i iznosio je 3 mol. % Mg^{2+} , 2 mol. % Sr^{2+} , 0,4 mol. % Cu^{2+} i 0,4 mol. % Zn^{2+} u odnosu na kalcijum.

Hidrotermalnom metodom sintetisana su tri praha na bazi multidopiranog kalcijum-hidroksiapatita rastvaranjem reaktanata u količinama koje su navedene u Tabeli 1. u 1,5 dm³ dejonizovane vode. Sinteza je vršena u autoklavu tretiranjem pripremljenih rastvora na temperaturi od 160°C i pritisku od 8 bar, u trajanju od 3 h. Nakon sinteze se vodeni rastvor sa formiranim talogom dekantovao, vakuum filtrirao, isprao dejonizovanom vodom i sušio u sušilici na 105°C tokom 2 h.

Reaktant	Masa, g
$Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$	11,12
$Na_2H_2EDTA \cdot 2H_2O$	11,18
$NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$	4,68
Urea	12,00
$Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,384
$Sr(NO_3)_2$	0,212
$Cu(NO_3)_2 \cdot 3H_2O$	0,0483
$Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$	0,0595

Tabela 1. Mase korišćenih reaktanata u hidrotermalnoj sintezi multidopiranog HAp-a

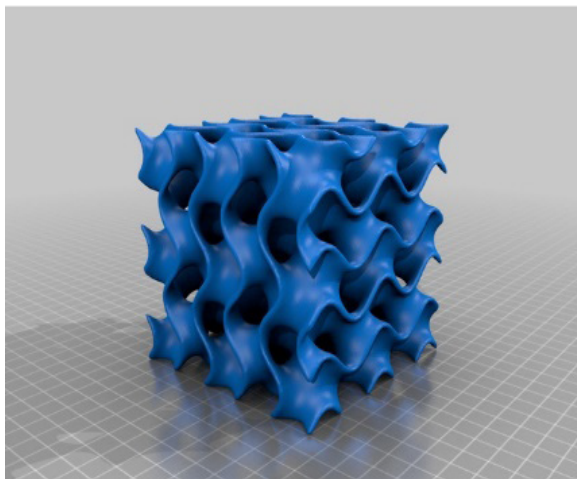
2. Materijali i metoda korišćeni za formiranje kompozita

Kompozitna smeša je pravljena umešavanjem biokeramičkih čestica multi-HAp-a u biorazgradivi polimer PEGDA (*Sigma Aldrich*, Sent Luis, Misuri). U ovom istraživanju sintetisane su kompozitna mastila sa 5 mas. % multi-HAp u PEGDA i sa 10 mas. % multi-HAp u PEGDA. U obe smeše je odnos polimera i vode iznosio 70 : 30. Pošto je količina polimera konstantna, konstantan je i udeo fotoinicijatora 2,4,6-trimetilbenzoildifenil fosfin oksida (TPO, *Sigma Aldrich*, Sent Luis, Misuri) koji se ubacuje u odnosu na količinu polimera u odnosu 0,5 mas. %. Količina biokeramičkih čestica dodata je u odnosu na ukupnu količinu reakcione smeše, dok je 2 mas. % disperzanta poli(etilen-glikola) (PEG, Mw 700, *Sigma Aldrich*, Sent Luis, Misuri) dodata u odnosu na količinu čestica multi-HAp-a. Takođe se pripremala i smeša na bazi čistog polimera za štampu referentnog skafolda. Tačne količine svih supstanci koje se nalaze u ovim smešama date su u Tabeli 2. Zbog reaktivnosti fotoinicijatora, njegovo dodavanje u sistem se mora obavljati u tamnim balonima da bi se sprečilo prevremeno započinjanje polimerizacije.

Reaktant	Masa, g		
	0 mas. % multi-HAp	5 mas. % multi-HAp	10 mas. % multi-HAp
PEGDA	21,0	21,0	21,0
Dejonizovana H ₂ O	9	9	9
TPO	0,105	0,105	0,105
Multi-HAp	0	1,5	3
PEG	0	0,03	0,06

Tabela 2. Masa korišćenih reaktanata u sintezi kompozitne smeše sa 0 mas. %, 5 mas. %, 10 mas. % multi-HAp u PEGDA

Metoda mSLA štampe se uveliko koristi za štampanje fotopolimerizujućih sistema. Pripremljene kompozitne smeše štampane su po zadatom 3D modelu (Slika 2.) koji je programski osmišljen tako da poseduje određen nivo makroporoznosti koji je neophodan da bi se pospešila regeneracija koštanog tkiva. U toku istraživanja je urađena optimizacija parametra štampe koji će dovesti do najbolje printabilnosti skafolda. Parametri štampe koji su korišćeni su: visina sloja od 30 μm , vreme štampe prvih 5 slojeva (dna) 15 s, vreme štampe pojedinačnog sloja 2,5 s.



Slika 2. Zadati model skafolda u programu 3D štampe

3. Metode korišćene za karakterizaciju multi-dopiranog praha hidroksiapatita

3.1. Energetska disperziona spektroskopija (EDS)

Elementni sastav multidopiranog praha hidroksiapatita je određivan korišćenjem energetske disperzione spektroskopije (EDS). Ispitivanje je izvršeno na EDS (*Oxford Instruments* 5175) kuplovanom sa SEM mikroskopom *Tescan FE-SEM Mira 3 KSMU*, na 20 keV.

3.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

Rendgenska difrakciona analiza je korišćena za faznu identifikaciju uzorka praha multidopiranog HAp-a. XRD analiza uzoraka je urađena u laboratoriji Instituta za nuklearne nauke „Vinča“ na *Rigaku Smartlab* difraktometru sa CuK α zračenjem (1.54 Å) pri 2θ uglu od 10° do 70° i brzini snimanja od 0.02° s⁻¹. Dobijeni rezultati su upoređeni sa JCPDS bazom podataka za identifikaciju hidroksiapatitne faze.

3.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Skenirajući elektronski mikroskop (*Tescan FE-SEM Mira 3 KSMU*), koji radi na 20 keV, korišćen je za ispitivanje morfologije nanostrukturiranih prahova. Pre SEM analize, svi uzorci su obloženi zlatom pomoću uređaja za naparavanje (*Polaron SC503, Fisons Instruments*).

4. Metode korišćene za karakterizaciju 3D makroporoznih struktura

4.1. Stereomikroskopija

Makrostruktura i poroznost sintetisanih kompozitnih skafolda su posmatrani pomoću *Leica* stereomikroskopa.

4.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Mikrostruktura skafolda je analizirana skenirajućim elektronskim mikroskopom (*Tescan FE-SEM Mira 3 KSMU*), koji radi na 20 keV. Priprema uzorka je odrađena na način kao i za nanočestice praha, naparavanjem uzoraka zlatom pomoću uređaja za nanošenje raspršivanjem (*Polaron SC503, Fisons Instruments*).

4.3. Mehanička svojstva 3D makroporoznih struktura

Mehanička svojstva sintetisanih skafolda su određivana nakon njihovog bubrenja u fosfatnom puferu (PBS). Za ispitivanje mehaničkih svojstava korišćena je kidalica (*Universal Testing Machine AG-XPlus, Shimadzu, Japan*). Izmerene su maksimalne pritisne čvrstoće (MPa) skafolda koje su dovele do njihovog loma prilikom primene pritisne sile.

REZULTATI

1. Karakterizacija multidopiranog praha HAp-a

1.1. Energetska disperziona spektroskopija (EDS)

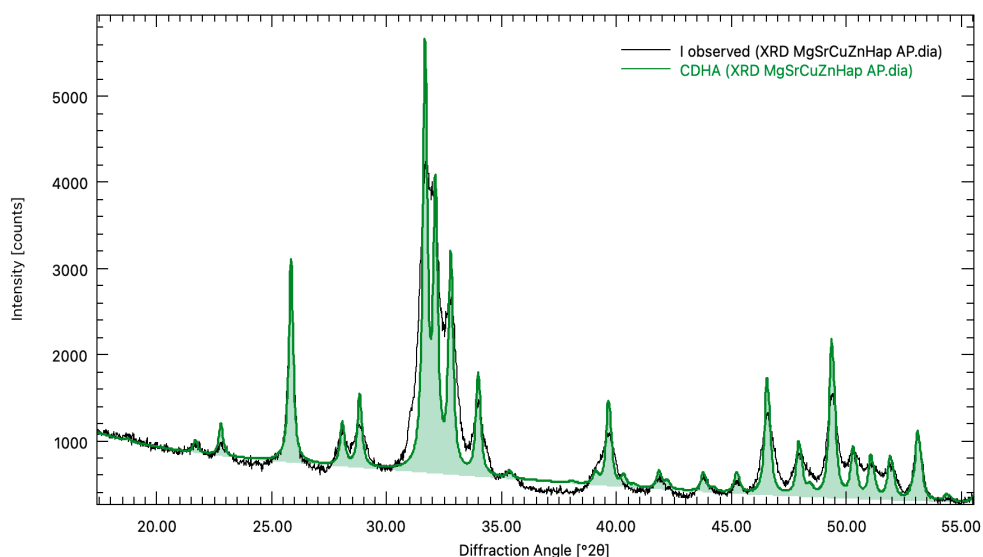
Rezultati EDS analize elementnog sastava sintetisanog multi-HAp praha prikazani su u Tabeli 3.

Element	Atomski udeo, at. %
O	74,41
Na	0,35
Mg	0,20
P	9,95
Ca	14,46
Cu	0,07
Zn	0,00
Sr	0,56

Tabela 3. Prikaz elementnog sadržaja određenog EDS analizom

1.2. Rendgenska difrakciona analiza (XRD)

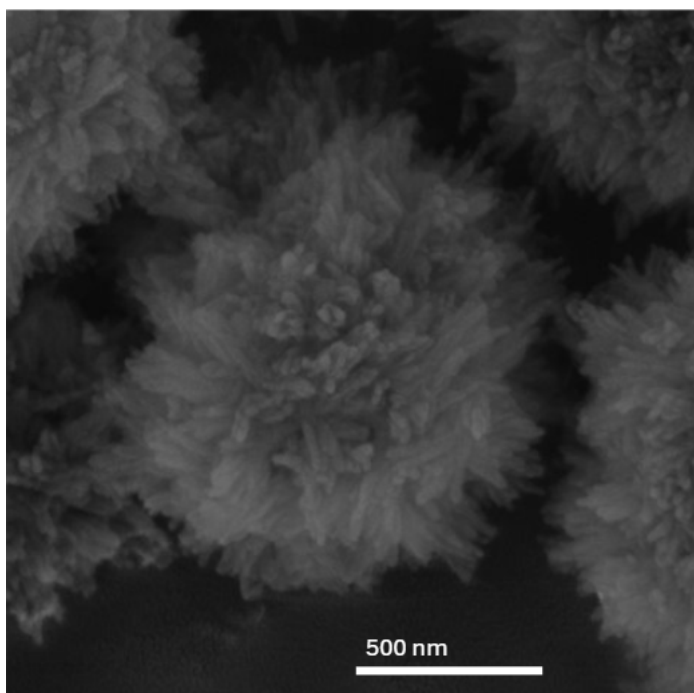
Na Slici 3. je prikazan difraktogram sintetisanog multidopiranog praha na kom se vidi preklapanje sa pikovima karakterističnim za hidroksiapatit iz baze podataka (površina obojena zelenom bojom).



Slika 3. Difraktogram ispitivanog multidopiranog praha HAp-a

1.3. Skenirajuća elektronska mikroskopija (SEM)

Na Slici 4. je prikazana SEM mikrografija morfologije sintetisanog multidopiranog praha.

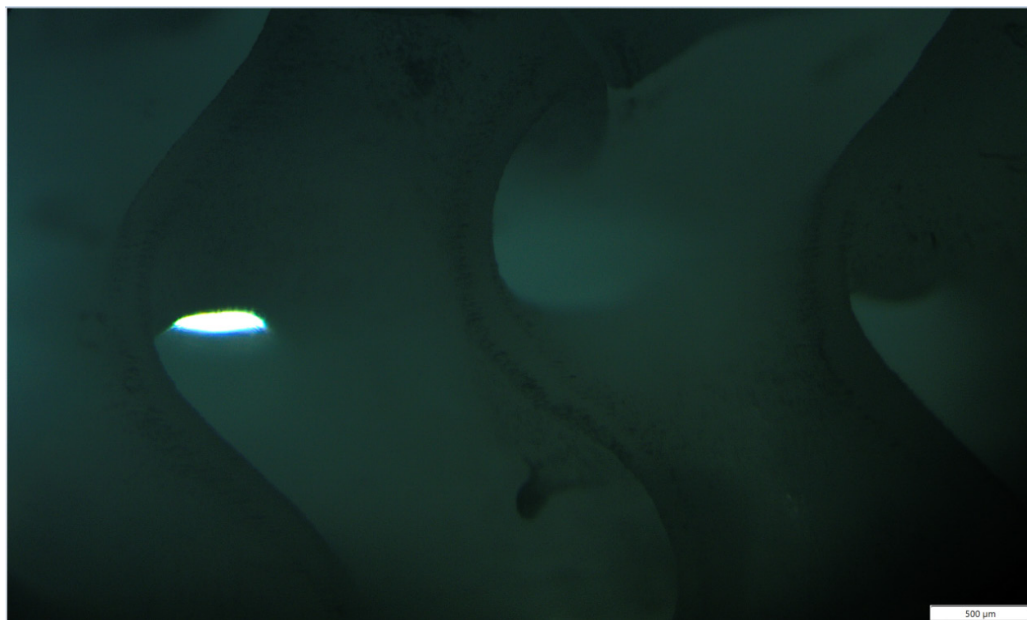


Slika 4. SEM mikrografija sintetisanog multidopiranog praha HAp-a

2. Karakterizacija 3D makroporoznih struktura

2.1. Makrostruktura

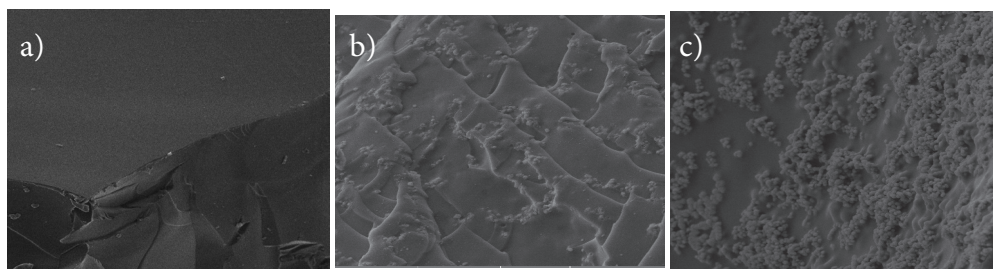
Potvrđena je makroporoznost dobijenih skafolda uz pomoć stereomikroskopa na Slici 5.



Slika 5. Makrostruktura dobijenih skafolda snimljena stereomikroskopom

2.2. Mikrostruktura

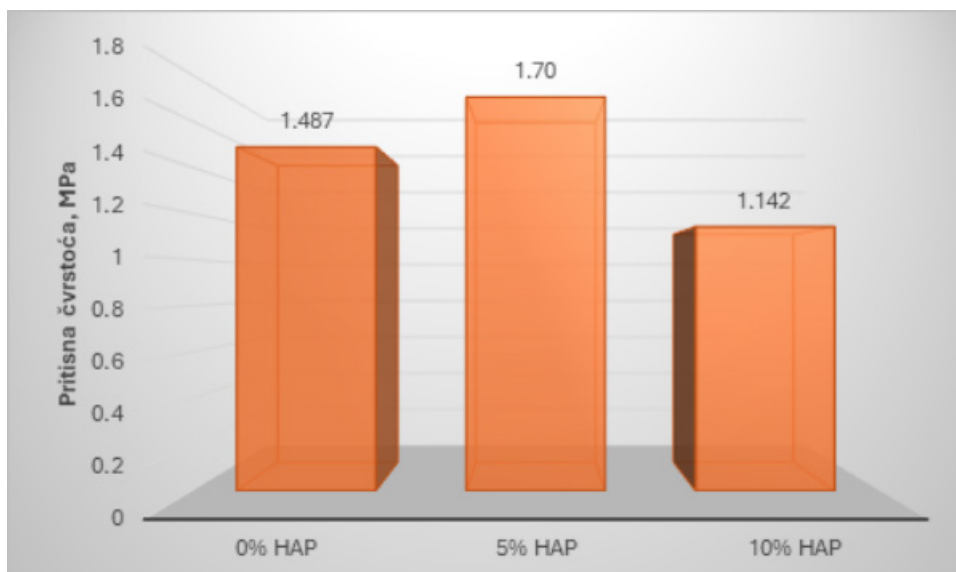
Mikrostruktura skafolda i raspored biokeramičkih čestica multi-HAp-a u polimernoj matrici sa 5 mas. % multi-HAp i 10 mas. % multi-HAp zabeleženi su skenirajućom elektronskom mikroskopijom i upoređivani su sa mikrografijom skafolda sa čistim polimerom PEGDA (Slika 6.)



Slika 6. SEM mikrografija površine skafolda na bazi PEGDA sa
a) 0 mas. % multi-HAp, b) 5 mas. % multi-HAp, c) 10 mas. % multi-HAp

3. Mehanička svojstva

Ispitivanje mehanike skafolda je vršeno na kidalici opterećivanjem skafolda na pritisak nakon njihovog bubrenja u rastvoru PBS-a. Rezultati sa ispitivanja pritisne čvrstoće su prikazani na Slici 7.



Slika 7. Pritisne čvrstoće sintetisanih skafolda

DISKUSIJA

EDS analizom potvrđeno je prisustvo jona magnezijuma, stroncijuma i bakra, dok cink nije detektovan, verovatno zbog niske koncentracije i praga osetljivosti uređaja. Dobijeni molski odnos Ca/P iznosio je 1,45, što je manje od stehiometrijske vrednosti hidroksiapatita (1,67). Ovaj rezultat ukazuje na formiranje kalcijum-deficitarnog HAP-a, što je u skladu sa literaturom koja navodi da se joni dopanata mogu supstituisati na mestu kalcijuma i na taj način doprineti poboljšanoj bioaktivnosti i osteokonduktivnosti [1–3].

Rezultati rendgenske difrakcione analize pokazali su preklapanje difrakcionih pikova sa referentnim hidroksiapatitom, bez pojave sekundarnih faza, što potvrđuje monofaznu strukturu sintetisanog praha. Očuvanje monofaznosti značajno je jer sekundarne faze mogu negativno uticati na biokompatibilnost i mehaničku stabilnost [4].

SEM mikrofografije prikazale su čestice igličastog oblika nanometarskih dimenzija, koje su bile sklone aglomeraciji u sferične strukture. Nanodimenzioni HAP obično pokazuje veću površinsku reaktivnost i bolju pogodnost za adheziju ćelija u poređenju sa mikrometarskim česticama [5].

Analizom poroznosti skafolda stereomikroskopom uočena je međusobna povezanost pora prosečne veličine oko 1 mm. Ova dimenzija i povezanost pora smatraju se pogodnim za osteokondukciju i formiranje krvnih sudova [6,7].

Upoređivanjem skafolda od čistog PEGDA sa kompozitnim varijantama zapaženo je povećano prisustvo i ravnomernija raspodela čestica multi-HAP-a u matrici. Dodavanjem čestica multi-dopiranog HAP-a, primećeno je povećanje hrapavosti površine štampanih kompozitnih skafolda zbog prisustva jasno uočljivih čestica HAP-a ugrađenih u matricu

hidrogela. Kontrolisano hrapava površina na makroporoznim nosačima značajno pogoduje adheziji ćelija. Dosad je dokazano da materijali sa hrapavom površinom često pospešuju adheziju ćelija, što je veoma bitno za oseintegraciju i uspešnu regeneraciju tkiva [10]. Ipak, kod uzorka sa 10 mas.% primećena je izraženija aglomeracija.

Mikrostruktura štampanih skafolda se direktno odrazila na mehanička svojstva: skafoldi sa 5 mas.% multi-HAp-a imali su višu pritisku čvrstoću u odnosu na čisti polimer, dok je dodatak 10 mas.% doveo do njenog smanjenja. Razlog može biti preveliko umreženje polimerne mreže i aglomeracija čestica koja uzrokuje neuniformnu strukturu, što je u skladu sa zapažanjima iz ranijih radova [3,5,8].

Prednost mSLA metode ogleda se u mogućnosti preciznog oblikovanja i kontrole poroznosti skafolda, čime se omogućava njihova bolja reproduktivnost i potencijalna primena u regeneraciji koštanog tkiva [9]. Međutim, i dalje ostaju izazovi u pogledu ravnomerne disperzije čestica i sprečavanja aglomeracije pri većem sadržaju keramičke faze.

Za dalja istraživanja preporučuje se sprovođenje bioloških testova kako bi se procenio osteogeni i angiogeni potencijal dobijenih skafolda, kao i ispitivanje drugih polimernih matrica koje bi omogućile veću količinu multi-HAp čestica bez narušavanja mehaničkih svojstava.

ZAKLJUČAK

U ovom radu je uspešno sintetisan prah kalcijum-hidroksiapatita koji je dopiran jonima magnezijuma, stroncijuma, bakra i cinka. Karakterizacijom praha potvrđeni su nanodimenzije čestica, monofazna struktura i oblik sferično aglomerisanih igličastih čestica. Kombinovanjem ovih biokeramičkih čestica sa biorazgradivim polimerom PEGDA dobijeni su makroporozni skafoldi – privremeni nosači ćelija – čija je poroznost uspešno ostvarena primenom mSLA 3D štampe. Skafold sa 5 mas.% dopiranog HAp-a pokazao je zadovoljavajuća mehanička svojstva, što ga čini pogodnim za primenu na mestima kritičnog koštanog defekta. Dalja ispitivanja bioloških svojstava i interakcije sa ćelijama su neophodna pre praktične primene. Takođe, buduća istraživanja mogu se fokusirati na korišćenje drugih polimernih matrica koje bi omogućile veći sadržaj multidopiranih HAp čestica, bez gubitka mehaničke stabilnosti. Ovi rezultati ukazuju na to da sintetisani makroporozni skafoldi imaju značajan potencijal za primenu u regeneraciji koštanog tkiva, doprinoseći razvoju novih biokompozitnih struktura za tretman kritičnih koštanih defekata.

LITERATURA

- [1] Veljović D, Matic T, Stamenic T, Kojic V, Dimitrijevic-Brankovic S, Lukic MJ, Janackovic D. Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity. *Ceram Int.* 2019;45(17):22029–39.
- [2] Matic T, Ležaja Zebić M, Miletić V, Cvijović-Alagić I, Petrović R, Janačković Dj, Veljović Dj. Sr,Mg co-doping of calcium hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, processing, characterization and possible application as dentin substitutes. *Ceram Int.* 2022;48(8):11155–65.
- [3] Bose S, Fielding G, Tarafder S, Bandyopadhyay A. Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics. *Trends Biotechnol.* 2013;31(10):594–605.
- [4] Uskoković D, Milošević D, Ignjatović N. Multifunkcionalni i hibridni sistemi na bazi kalcijum fosfata i hidroksiapatita za preventivnu i regenerativnu medicinu. *Tehnika – Novi materijali.* 2017;26(1):11.
- [5] Ribas RG, Schatkoski VM, do Amaral Montanheiro TL, de Menezes BRC, Stegemann C, Leite DMG, Thim GP. Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review. *Ceram Int.* 2019;45(17):21051–61.
- [6] Jokanović V, Čolović B, Popović-Bajić M, Živković-Sandić M. Skafoldi u inženjerstvu koštanog tkiva.

2017;38–40.

- [7] Krstulović E. Tkivno inženjerstvo [završni rad]. Split: Prirodoslovno-matematički fakultet; 2022.
- [8] Veljović Đ. Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata: procesiranje, svojstva i primena. Beograd: Tehnološko-metalurški fakultet; 2020.
- [9] Ho-Shui-Ling A, Bolander J, Rustom LE, Johnson AW, Luyten FP, Picart C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells – current stage and future perspectives. *Biomaterials*. 2018;180:143–62.
- [10] Deligianni DD, Katsala ND, Koutsoukos PG. Effect of surface roughness of hydroxyapatite on human bone marrow cell adhesion, proliferation, differentiation and detachment strength. *Biomaterials*. 2000;22(1):87–96.

FABRICATION OF BIOCOMPOSITE SCAFFOLDS BASED ON MULTIDOPED CALCIUM HYDROXYAPATITE AND A BIODEGRADABLE POLYMER USING 3D PRINTING

Author: ANĐELA PETROVIĆ

Email: andjelapetrovic478@gmail.com

Mentors: Assoc. Prof. Đorđe Veljović, TA Tamara Matić

Department of Inorganic Chemical Technology

Faculty of Technology and Metallurgy, University of Belgrade

Introduction: Due to the limitations of bone grafts, bone tissue engineering has been developed, involving the application of scaffolds – temporary 3D cell carriers. Calcium hydroxyapatite (HAP) is used as a biomaterial for scaffolds because of its similarity to biological apatite. The crystal structure of HAP allows substitution with strontium, magnesium, zinc, and copper ions, which enhance angiogenesis, proliferation, and osteogenic cell differentiation, while also providing anti-microbial effects. However, the brittleness of ceramic materials prevents their use at load-bearing sites, making it desirable to develop biocomposite materials that mimic bone tissue.

Aim: This study aims to develop biocomposite scaffolds from multi-doped HAP and biodegradable photo-crosslinkable polymer polyethylene glycol diacrylate (PEGDA) using masked stereolithography (mSLA) 3D printing.

Materials and Methods: Hydroxyapatite powder was doped during hydrothermal synthesis with 2 mol.% Sr, 3 mol.% Mg, 0.4 mol.% Zn, and 0.4 mol.% Cu. The morphology, elemental, and phase composition of the particles were determined using SEM, EDS, and XRD analyses. Biocomposite scaffolds were obtained by mixing different amounts of multi-doped HAP (0 wt.%, 5 wt.%, and 10 wt.%) into the PEGDA-based ink and 3D printing them, after which the structure and compressive strength of the obtained scaffolds were compared.

Results: Biocomposite 3D-printed scaffolds based on HAP and PEGDA were successfully fabricated using the mSLA method. Scaffolds with 5% HAP exhibited improved mechanical properties, while 10% HAP caused excessive crosslinking and reduced performance.

Conclusion: The masked SLA method is suitable for fabricating biocomposite scaffolds, and future work will explore alternative polymer matrices in order to allow higher HAP particle loading.

Keywords: scaffold; calcium hydroxyapatite; polyethylene glycol diacrylate; 3D printing; mask stereolithography