

UNIVERZITET U BEOGRADU
TEHNOLOŠKO-METALURŠKI FAKULTET

Tamara Z. Matić

**BIOAKTIVNI MATERIJALI NA BAZI
KALCIJUM-FOSFATA I MEZOPOROZNOG
BIOSTAKLA DOPIRANIH JONIMA
MAGNEZIJUMA I/ILI STRONCIJUMA:
SINTEZA, PROCESIRANJE,
KARAKTERIZACIJA I PRIMENA U
BIOMEDICINI**

Doktorska disertacija

Beograd, 2024.

UNIVERSITY OF BELGRADE
FACULTY OF TECHNOLOGY AND METALLURGY

Tamara Z. Matic

**BIOACTIVE MATERIALS BASED ON
CALCIUM PHOSPHATES AND MESOPOROUS
BIOGLASS ION-DOPED WITH MAGNESIUM
AND/OR STRONTIUM: SYNTHESIS,
PROCESSING, CHARACTERIZATION AND
BIOMEDICAL APPLICATION**

Doctoral dissertation

Belgrade, 2024.

Mentor:

dr Đorđe Veljović, vanredni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

Članovi komisije:

dr Đorđe Janačković, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Rada Petrović, redovni profesor
Univerziteta u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet

dr Maja Zebić, naučni saradnik
Univerziteta u Beogradu, Stomatološki fakultet

dr Lia Rimondini, redovni profesor
Univerziteta u Istočnom Pijemontu,
(*Università del Piemonte Orientale - UPO, Novara, Italia*)

Datum odbrane: _____

Zahvalnica

Ova doktorska disertacija je najvećim delom urađena na katedri za Neorgansku hemijsku tehnologiju Tehnološko-metalurškog fakulteta, Univerziteta u Beogradu pod mentorstvom prof. dr. Đorđa Veljovića u okviru istraživanja finansiranih od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (br. 451-03-65/2024-03/200135), i projekta Fonda za nauku Republike Srbije (br. 7470, „*Novel hybrid biomimetic macroporous composites with tuned biodegradability, improved osteointegration and anticancer properties for bone tissue regeneration—HyBioComBone*”). Deo disertacije je urađen na Nacionalnom Tehničkom Univerzitetu u Atini (*National Technical University of Athens, NTUA, Athens, Greece*) u okviru Erasmus+ studentske razmene, dok su biološka istraživanja urađena na Univerzitetu Istočnog Pijemonta (*University of Eastern Piedmont, UPO, Novara, Italy*) u okviru projekta EU Horizon 2020 Twinning projekta Excell Mater (br. 952033).

Izrada ove doktorske disertacije u ovom obliku ne bi bila moguća bez podrške i pomoći mnogih ljudi i institucija, kojima dugujem veliku zahvalnost.

Pre svega, želim da izrazim duboku zahvalnost svom mentoru, prof. dr Đorđu Veljoviću, na dugogodišnjoj saradnji, predanom vođenju, neiscrpnim idejama i nesebičnoj podršci tokom izrade ove doktorske disertacije. Njegova strpljivost, razumevanje i poverenje koje mi je ukazao bili su ključni u mom ličnom i profesionalnom razvoju, kao i u razvoju ove multidisciplinarne doktorske disertacije.

Posebnu zahvalnost dugujem članovima komisije, prof. dr Đorđu Janaćkoviću, prof. dr Radi Petrović, prof. dr Lii Rimondini i dr. Maji Zebić na dragocenim savetima i nesebičnoj pomoći tokom izrade eksperimentalnog dela, kao i prilikom izrade i pisanja ove doktorske disertacije. Posebno se zahvaljujem na vremenu koje su posvetili čime su značajno unapredili kvalitet moje disertacije.

Zahvaljujem se svim kolegama u partnerskim insitucijama na saradnji tokom izrade ove doktorske disertacije: prof. dr Vesni Miletić sa Univerziteta u Sidneju na dugogodišnjoj saradnji, obuci i nesebičnoj pomoći u oblasti stomatoloških materijala, prof. dr Andrea Cochis i Farah Daou sa Univerziteta Istočnog Pijemonta na obuci i pomoći u izradi bioloških analiza, dr Isaaku Trajkoviću i dr Milošu Miloševiću sa Inovacionog centra Mašinskog fakulteta na analizi otpornosti loma zuba, prof. dr Sanji Jevtić sa Tehnološko-metalurškog fakulteta na termogravimetrijskoj analizi, prof. dr Aleksandri Dapčević sa Tehnološko-metalurškog fakulteta na kristalografskoj analizi, Jeleni Petrović sa Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta i Ivani Banićević sa Tehnološko-metalurškog fakulteta za pomoć pri analizi nosača ćelija u bioreaktoru, prof. dr. Miljani Popović sa Tehnološko-metalurškog fakulteta na poliranju uzoraka, dr Zvezdani Baščarević sa Instituta za multidisciplinarna istraživanja na EDS analizi, dr Tamari Đukić sa Inovacionog centra Tehnološko-metalurškog fakulteta za određivanje Z-potencijala, dr Biljani Dojčinović sa Instituta za hemiju, tehnologiju i metalurgiju na hemijskim analizama sastava, dr Ivani Cvijović-Alagić iz Instituta za nuklearne nauke Vinča na analizama tvrdoće sinterovanih uzoraka, dr Mirjana Novaković iz Instituta za nuklearne nauke Vinča na HRTEM analizama, dr Mini Medić iz Instituta za nuklearne nauke Vinča na XRD analizama, prof. dr Costasu Charitidis sa Nacionalnog Tehničkog Univerziteta u Atini na obuci iz oblasti mask-stereolitografije.

Veliko hvala svim kolegama sa Katedre za NHT na divnom druženju i dragocenim savetima. Posebnu se zahvaljujem svojim saborcima i prijateljima Mariji Milivojević, Milici Stefanović, Jani Petrović, dr. Nemanji Baraću, dr. Vukašinu Ugrinoviću, dr. Tamari Đukić i Jeleni Petrović. Vaša nesebična pomoć i podrška tokom doktorskih studija su bili neprocenjivi. Stručno savetovanje, timski rad i, pre svega, prijateljstvo učinili su ovaj period ne samo lakšim, već i ispunjenijim.

Na kraju, iz dubine srca želim da se zahvalim svojoj porodici. Vaša beskrajna ljubav, neverovatno strpljenje i nepokolebljivo razumevanje pratile su me kroz sve godine ove disertacije, ali i kroz svaki korak mog obrazovanja. Bez vaše podrške i nesebičnog navijanja, ovaj trenutak ne bi bio ni zamisliv. Hvala vam što ste mi uvek bili oslonac i što ste verovali u mene, čak i kada sam ja sumnjala. Ovaj uspeh je jednako vaš koliko i moj!

Bioaktivni materijali na bazi kalcijum-fosfata i mezoporoznog biostakla dopiranih jonima magnezijuma i/ili stroncijuma: sinteza, procesiranje, karakterizacija i primena u biomedicini

SAŽETAK

U okviru ove doktorske disertacije sintetisani su i ispitani prahovi na bazi kalcijum-fosfata (CaP) i mezoporoznog bioaktivnog stakla (MBAG) dopirani jonima magnezijuma (Mg^{2+}) i/ili stroncijuma (Sr^{2+}). Različitim metodama procesiranja, a polazeći od sintetisanih prahova, dobijeni su kontrolisano porozni kompakti i makroporozni nosači ćelija, a u nastavku je ispitan njihov potencijal za primenu u stomatologiji i biomedicini.

Pokazano je da istovremeno prisustvo jona Sr^{2+} i Mg^{2+} u strukturi hidroksiapatita (HAP) destabilizuje HAP rešetku, rezultujući bifaznim CaP sastavom, dok prilikom sinterovanja stabilizuje β -TCP fazu odlaganjem transformacije u α -TCP. Najbolja mehanička svojstva su potvrđena kod SrMgHAP uzorka dopiranog sa po 3 mol.% Sr^{2+} i Mg^{2+} (5,02 GPa i 1,12 MPa·m^{1/2}).

Sferne nanočestice SrMgMBAG su uspešno sintetisane mikroemulzionom tehnikom. Binarno dopiranje je uticalo na stvaranje radijalne dendritske mezoporozne strukture, što je ubrzalo otpuštanje leka ibuprofena u poređenju sa nedopiranim česticama.

Procesirani kompakti kontrolisane poroznosti na bazi dopiranih HAP su ispitani za primenu u stomatologiji u vidu dentalnih inserata. Predložen je novi protokol za restauraciju velikih kaviteta zuba korišćenjem dentalnih inserata na bazi HAP. Ekstrahovani ljudski molari restaurirani korišćenjem konvencionalnog postupka i primenom novopredloženog protokola su imali sličnu otpornost na lom.

Dobijeni makroporozni nosači ćelija na bazi SrMgCaP i njihovi kompoziti sa MBAG predstavljaju adekvatne nosače ćelija za primenu u inženjerstvu koštanog tkiva, omogućuju dobru adheziju i proliferaciju BM-MSC i EA.hy926 ćelija, ali i pokazuju pro-osteogena i pro-angiogena svojstva. Nanošenje biorazgradive biokompozitne prevlake na bazi želatina i čestica Sr,MgMBAG je značajno poboljšalo pritisnu čvrstoću makroporoznih nosača.

Ključne reči: kalcijum-fosfati; mezoporozno bioaktivno staklo; dentalni insert; skafoldi;

Naučna oblast: Tehnološko inženjerstvo

Uža naučna oblast: Inženjerstvo materijala

Bioactive Materials based on Calcium Phosphates and Mesoporous Bioglass ion-doped with Magnesium and/or Strontium: Synthesis, Processing, Characterization and Biomedical Application

ABSTRACT

Within this doctoral dissertation powders based on calcium phosphates (CaP) and mesoporous bioactive glass (MBAG) doped with magnesium (Mg^{2+}) and/or strontium (Sr^{2+}) ions were synthesized. Using various techniques the obtained powders were processed in the form of compacts with controlled porosity, or scaffolds, and their possible biomedical or dental application was evaluated.

It was shown that simultaneous presence of Sr^{2+} and Mg^{2+} in the hydroxyapatite (HAP) structure destabilizes the HAP lattice resulting in the biphasic CaP composition, while also stabilizing the β -TCP phase during sintering by postponing its transformation into α -TCP. The best mechanical properties were obtained in the case of SrMgHAP doped with 3 mol.% of Sr^{2+} and Mg^{2+} (5,02 GPa i 1,12 MPa·m^{1/2}).

Spherical SrMgMBAG nanoparticles were successfully synthesized using microemulsion sol-gel technique. The binary doping influenced formation of radial dendritic mesoporous structure, which increased the rate of ibuprofen drug release, compared to pristine particles.

Obtained compacts with controlled porosity based on doped HAP were analyzed for application in dentistry as dental inserts. A novel protocol for restoration of large tooth cavities using dental inserts based on HAP was proposed. Extracted human molars were restored using convectional and novel protocols, and their fracture resistance was shown to be similar.

Fabricated scaffolds based on SrMgCaP and their composites with MBAG were shown to be adequate cell carriers for application in bone tissue engineering, by showing good cells adhesion and proliferation of BM-MSC and EA.hy926 cells, as well as pro-osteogenic and pro-angiogenic properties. Coating the scaffolds with biodegradable biocomposites based on gelatine and SrMgMBAG particles showed significantly improved compressive strength of the scaffolds.

Key words: calcium phosphates; mesoporous bioactive glass; dental insert; scaffold;

Scientific field: Technological engineering

Scientific subfield: Materials Engineering

Sadržaj

I Uvod	1
II Teorijski deo	2
1. Kalcijum-fosfati	
1.1. Kalcijum-hidroksiapatit: Struktura, svojstva i primena u biomedicini	3
1.2. Trikalcijum-fosfati: Struktura, svojstva i primena u biomedicini	5
2. Bioaktivno staklo	7
2.1. Mezoporozno bioaktivno staklo	8
2.2. Mikroemulziona sol-gel tehnika	8
3. Magnezijum i stroncijum kao dopanti	10
3.1. Uloga u organizmu	10
3.2. Uticaj dopiranja jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} na strukturu i svojstva biokeramičkih materijala	10
3.2.1. Dopiranje kalcijum-fosfata	10
3.2.2. Dopiranje mezoporoznog bioaktivnog stakla	15
4. Zubno tkivo	18
4.1. Anatomija zubnog tkiva	18
4.2. Zubni karijes	18
4.3. Ispun kaviteta	19
5. Koštano tkivo	22
5.1. Anatomija i fiziologija koštanog tkiva	22
5.2. Procesi osteogeneze i regeneracije	24
5.3. Makroporozni nosači za regeneraciju koštanog tkiva	25
5.3.1. Metoda replike suđera	26
5.3.2. 3D štampa	27
III Ekperimentalne metode	29
6. Postupak sinteze nanočestica kalcijum-fosfata dopiranih jonima Sr^{2+} i/ili Mg^{2+}	29
7. Postupak sinteze nanočestica mezoporoznog bioaktivnog stakla dopiranog Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima	30
8. Procesiranje kontrolisano poroznih kompakata i makroporoznih nosača	31
8.1. Procesiranje kontrolisano poroznih kompakata na bazi kalcijum-fosfata	31
8.2. Procesiranje makroporoznih nosača ćelija metodom 3D štampe	31
8.2.1. Priprema „mastila“ za 3D štampu	31
8.2.2. 3D štampa	32
8.3. Procesiranje makroporoznih nosača ćelija tehnikom replike suđera	32
9. Metode karakterizacije nanočestica, kompakata kontrolisane poroznosti i makroporoznih nosača	33
9.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija	33
9.2. Energetska disperzivna spektroskopija (EDS)	34
9.3. Transmisiona elektronska mikroskopija sa EDS	34
9.4. Rendgenska difrakciona analiza	34
9.5. Specifična površina i mezoporoznost	34
9.6. Zeta-potencijal	35
9.7. <i>In vitro</i> bioaktivnost	35
9.8. Priprema ekstrakata MBAG	35
9.9. Induktivno spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES)	36
9.10. Sposobnost vezivanja i otpušanja leka	37
9.11. Termogravimetrijska analiza (TGA)	37
9.12. Relativno linearno skupljanje i gustina kompakata	37
10. Mehanička ispitivanja	37
10.1. Tvrdća po Vickersu i žilavost loma	37

10.2.	Pritisna čvrstoća	38
11.	Ispitivanja relevantna za primenu dentalnih inserata u stomatologiji	38
11.1.	Test jačine veze dentalnih inserata sa restaurativnim materijalima	38
11.1.1.	Priprema uzoraka za test jačine veze sa adhezivnim sistemima	39
11.1.2.	Priprema uzoraka za test jačine veze sa Maxcem cementom	39
11.1.3.	Ispitivanje jačine veze na smicanje	40
11.1.4.	Određivanje tipa loma nakon testa jačine veze	40
11.2.	Dentalni inserti kao dentinski zamenci	40
11.2.1.	Postupak preparacije kaviteta	41
11.2.2.	Protokol restauracije kaviteta konvencionalnim postupkom	41
11.2.3.	Protokol restauracije kaviteta primenom dentalnih inserata	41
11.2.4.	Termocikliranje	42
11.2.5.	Zatapanje u akrilnu smolu	42
11.2.6.	Testiranje otpora na lom restauriranih zuba	43
12.	Biološka ispitivanja	43
12.1.	Indirektni test citokompatibilnosti	43
12.1.1.	2D ćelijska kultura sa BM-MSC	44
12.1.2.	3D ćelijska kultura sa EA.hy926	44
12.2.	Direktni test citokompatibilnosti makroporoznih nosača ćelija	45
12.3.	Pro-steogeni potencijal	45
12.3.1.	Analiza aktivnosti alkalne fosfataze (ALP)	45
12.3.2.	Bojenje alizarin crvenim S	46
12.3.3.	Analiza genske ekspresije	46
12.4.	Fluorescentna mikroskopija	47
12.4.1.	Kvalitativno određivanje vijabilnosti i infiltracije ćelija u nosače	47
12.4.2.	Pro-angiogeni potencijal	47
13.	Statistička analiza	48
IV	Rezultati i diskusija	49
14.	Nanočestice kalcijum-fosfata dopirane jonima Mg^{2+} i/ili Sr^{2+} sintetisane na 150 °C	49
15.	Sinterovani kompakti kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-fosfata sintetisanih na 150°C dopirani jonima Mg^{2+} i/ili Sr^{2+}	53
16.	Uticaj parametara sinteze prahova na krajnja svojstva sinterovanih kompakata	58
17.	Primena sinterovanih kalcijum-fosfatnih kompakata kao dentalnih inserata u stomatologiji	62
17.1.	Monodopirani kalcijum-fosfatni dentalni inserti	62
17.2.	Binarno Sr,Mg-dopirani kalcijum-fosfatni dentalni insert	66
17.3.	Otpor na lom restauriranih zuba primenom dopiranih kalcijum-fosfatnih dentalnih inserata	68
18.	Nanočestice mezoporoznog bioaktivnog stakla – nedopirane i dopirane magnezijumom i stroncijumom	71
18.1.	Morfologija, hemijski i elementni sastav, i površinska svojstva	71
18.2.	<i>In vitro</i> bioaktivnost	74
18.3.	Profil otpuštanja jona	75
18.4.	Citokompatibilnost na matičnim ćelijama u 2D kulturi	77
18.5.	Pro-osteogeni potencijal	77
18.6.	Citokompatibilnost na endotelnim ćelijama u 3D kulturi	79
18.7.	Pro-angiogeni potencijal	80
18.8.	Sposobnost vezivanja i otpuštanja lekova	82
19.	Procesiranje makroporoznih nosača ćelija	84
19.1.	Kalcinisane čestice dopiranih kalcijum-fosfata	84
19.2.	Biokompozitni 3D štampani makroporozni nosači ćelija	85

19.3. Keramički makroporozni nosači ćelija	87
19.3.1. Mehanička svojstva, mikrostruktura, elementni i fazni sastav binarno dopiranih nosača ćelija	88
19.3.2. <i>In vitro</i> bioaktivnost u statičkim uslovima i perfuzionom bioreктору	92
19.3.3. Uticaj biokompozitne prevlake na mehanička svojstva nosača	93
19.3.4. Primena keramičkih makroporoznih nosača za kultivaciju ćelija	94
19.3.5. Citokompatibilnost	94
19.3.6. Pro-osteogeni potencijal	98
19.3.7. Pro-angiogeni potencijal	99
V Zaključak	101
Literatura	

I Uvod

Predmet istraživanja ove doktorske disertacije predstavlja razvoj, procesiranje i karakterizacija nanostrukturnih biomaterijala na bazi kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla, dopiranih jonima magnezijuma i/ili stroncijuma u obliku prahova, kompakata kontrolisane poroznosti i makroporoznih nosača ćelija, kao i ispitivanje njihove potencijalne primene prilikom reparacije i regeneracije koštanog i zubnog tkiva.

Biomaterijali na bazi kalcijum-fosfata i bioaktivnog stakla se intenzivno primenjuju za reparaciju i regeneraciju koštanog i zubnog tkiva zahvaljujući njihovoj biokompatibilnosti, biodegradabilnosti, osteokonduktivnosti i odličnoj integraciji sa nativnim tkivom. Bioaktivna stakla su rastvorljivija u fiziološkim uslovima u odnosu na kalcijum-fosfate, te poseduju bolju bioaktivnost i biodegradabilnost, što ih čini posebno atraktivnim za primenu u regeneraciji tkiva. Mezoporozna nanočestična bioaktivna stakla (BAG) predstavljaju poslednju generaciju bioaktivnih stakala izuzetno velike specifične površine koja omogućuje bržu resorpciju u organizmu i dodatnu mogućnost inkorporacije jona i biološki aktivnih supstanci.

Cilj istraživanja ove disertacije je bio razvoj bioaktivnih materijala za regeneraciju i reparaciju koštanog i zubnog tkiva na bazi nanočestica kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla dopiranih jonima magnezijuma i stroncijuma. Dobijeni materijali imaju za cilj da nadomeste defekt u mineralizovanom tkivu, nastao usled traume ili bolesti, uz obezbeđivanje dobre integracije nakon implementacije. Prisustvo jona magnezijuma i stroncijuma ima za cilj da potpomogne regeneraciju defekta, kao i da obezbedi odgovarajuća fizičko-hemijska, biološka i mehanička svojstva biomaterijala.

Pojedinačni ciljevi u okviru ove disertacije su sledeći:

- optimizacija parametara sinteze i procesiranja nanočestičnih prahova na bazi kalcijum-fosfata (CaP) i mezoporoznog bioaktivnog stakla (MBAG) dopiranih biološki aktivnim jonima magnezijuma i/ili stroncijuma;
- optimizacija sadržaja dopanata, ispitivanje njihovog uticaja na elementni i fazni sastav, morfologiju, fizičko-hemijska, biološka i mehanička svojstva dobijenih materijala;
- ispitivanje potencijalne primene dobijenih CaP prahova u biomedicini i stomatologiji u vidu: kalciniranih čestica kao bioaktivnih punilaca u biokompozitima, kompakata kontrolisane poroznosti kao dentinskih zamenika za primenu u restaurativnoj stomatologiji i makroporoznih nosača ćelija za primenu u inženjerstvu koštanog tkiva;
- ispitivanje primene nanočestica MBAG u biomedicini za regeneraciju koštanog tkiva;
- razvoj kompozitnih makroporoznih nosača ćelija na bazi dopiranih CaP i MBAG, uz optimizaciju njihovog odnosa i parametara procesiranja;
- ispitivanje mogućnosti unapređenja mehaničkih svojstava razvijenih biokeramičkih makroporoznih nosača nanošenjem biokompozitnih prevlaka na bazi biorazgradivih polimera i MBAG čestica.

II Teorijski deo

1. Kalcijum-fosfati

Kalcijum-fosfati (CaP) predstavljaju grupu minerala koja je široko zastupljena u prirodi, a čini osnovnu komponentu mineralizovanog dela kostiju i zuba (Tabela 1). Kada je kao fosfatni anjon prisutna PO_4^{3-} grupa reč je o ortofosfatima koji, u zavisnosti od broja vodonikovih jona vezanih za anjon, mogu biti mono-, di-, tri- i tetrakalcijum-fosfati. Postoji čak 12 poznatih nesupstituisanih kalcijum-ortofosfata sa molskim odnosom Ca/P u rasponu od 0,5-2,0, pri čemu sa smanjenjem Ca/P odnosa dolazi do povećanja njihove rastvorljivosti [1].

Tabela 1. Karakteristični sastav neorganske faze u mineralizovanim tkivima odraslog čoveka [1], HAP- kalcijum-hidroksiapatit, β -TCP – β -trikalcijum-fosfat

<i>Sastav</i>	<i>Gleđ</i>	<i>Dentin</i>	<i>Kost</i>	<i>Hidroksiapatit</i>
<i>Kalcijum [mas.%]</i>	36,5	35,1	34,8	39,6
<i>Fosfor [mas.%]</i>	17,7	16,9	15,2	18,5
<i>Magnezijum [mas.%]</i>	0,44	1,23	0,72	/
<i>Ca/P [mol. odnos]</i>	1,63	1,61	1,71	1,67
<i>Voda [mas.%]</i>	1,5	10	10	/
<i>Produkti zagrevanja (800°C)</i>	β -TCP + HAP	β -TCP + HAP	HAP+CaO	HAP

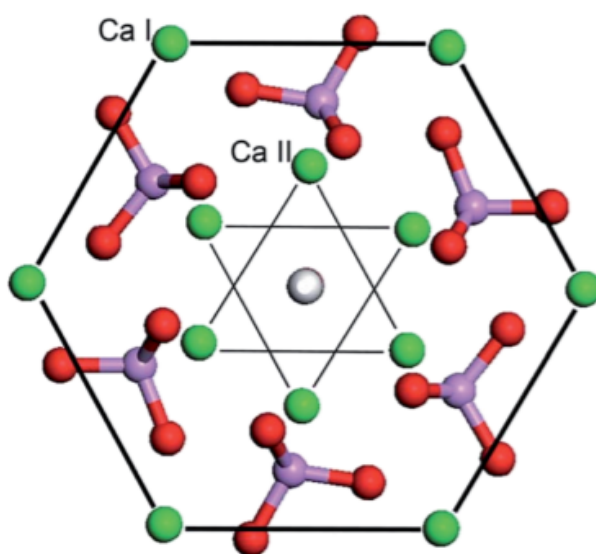
Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata su prvi put sintetisani 70-ih godina XX veka, i od tada se intenzivno istražuju za primenu u biomedicini za reparaciju i regeneraciju koštanih defekata zahvaljujući svojoj strukturnoj i hemijskoj sličnosti sa mineralnim delom kosti. Osim toga, neki kalcijum-ortofosfati kao što su kalcijum-hidroksiapatit i trikalcijum-fosfat, poseduju visok stepen bioaktivnosti i osteokonduktivnosti, što omogućava dobru integraciju sa nativnim tkivom. Osnovna prednost primene CaP materijala za regeneraciju koštanog tkiva jeste činjenica da njihovim razlaganjem u organizmu ne dolazi do pojave toksičnih produkata, već dolazi do otpuštanja jona kalcijuma i fosfatnih jona koji stimulišu formiranje i rast mineralizovanog tkiva.

Kalcijum-ortofosfatni biokeramički materijali se u zavisnosti od broja faza mogu klasifikovati u monofazne, bifazne i multifazne. Najčešće se dizajniraju bifazni keramički materijali na bazi dva kalcijum-fosfata različitih svojstava, poput kalcijum-hidroksiapatita (HAP) i β -trikalcijum-fosfata (β -TCP), takvi da se iskoriste prednosti obe faze. Veliki broj materijala na bazi kalcijum-fosfata je komercijalno dostupan i primenjuje se u ortopediji, kranio- i maksifacijalnoj hirurgiji i stomatologiji za zamenu i regeneraciju koštanog i zubnog tkiva. Primene CaP podrazumevaju nadogradnju alveolarnog grebena, rekonstrukciju maksifacijalne regije, lečenje mandibularnih i periodontalnih defekata, zamenu zuba, spinalnu fuziju, reparaciju koštanih defekata itd. [1,2].

Materijali na bazi CaP se mogu primenjivati u vidu različitih formi: bioaktivnih cemenata, čestičnih i granularnih punilaca u biokompozitima, biokeramičkih prevlaka na metalnim implantatima, sinterovanih gustih i kontrolisano poroznih kompakata, kao i makroporoznih nosača za primenu u inženjerstvu tkiva [3,4].

1.1. Kalcijum-hidroksiapatit: struktura, svojstva i primena u biomedicini

Hemijska formula kalcijum-hidroksiapatita je $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ sa Ca/P odnosom 1,67. Hemijski čist HAP kristališe u monokliničnom kristalnom sistemu (prostorna grupa $\text{P}2_1/\text{b}$) koji podleže transformaciji zagrevanjem na temperaturama iznad 250°C u stabilniji heksagonalni sistem (prostorna grupa $\text{P}6_3/\text{m}$) [1]. Postojanje nečistoća, vakansija i drugih defekata dovodi do stabilizacije heksagonalne rešetke na sobnoj temperaturi, usled čega HAP najčešće ima heksagonalnu kristalnu rešetku. Heksagonalna jedinična ćelija kalcijum-hidroksiapatita ima parametre rešetke $a=b=9,4302\text{ \AA}$ i $c=6,88911\text{ \AA}$. U strukturi kalcijum-hidroksiapatita razlikuju se dve vrste atoma kalcijuma u odnosu na njihov položaj: kolonarni i heksagonalni, koji se označavaju sa CaI i CaII pa se hemijska formula HAP može preciznije napisati kao $\text{Ca}_4\text{CaII}_6(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Naziv kolonarni i heksagonalni može biti zbunjujući s obzirom da i kolonarni i heksagonalni atomi kalcijuma grade heksaedar kada se jedinična ćelija projektuje na bazalnu ravan (Slika 1), pri čemu kolonarni Ca atomi grade veći heksaedar u čijem centru se nalaze heksagonalni Ca atomi [5].



Slika 1. Šematski prikaz strukture HAP projektovane na bazalnu ravan, zelene kuglice predstavljaju Ca, crvene O, ljubičaste P, a bele OH, preuzeto iz [6]

Kolonarni Ca atomi (CaI) su dobili naziv po tome što su grupisani u kolonama koje se neprekidno prostiru kroz rešetku i daju geometrijski oblik jediničnoj ćeliji. Po šest CaI atoma oivičavaju tri heksaedra koja se nalaze u paralelnim ravnima ($z=0$, $z=1/2$ i $z=1$). Na Slici 1 se vidi samo jedna od tri ravni. Iako ih ima ukupno 18 unutar kristalne rešetke, jednoj jediničnoj ćeliji kalcijum-hidroksiapatita pripada samo 4 CaI atoma, jer je svaki CaI atom iz bazalnih ravni ($z=0$ i $z=1$) zajednički za 6 susednih jediničnih ćelija, dok se CaI atomi u ravni koja se nalazi između njih ($z=1/2$) dele između tri susedne jedinične ćelije. Ako se posmatra apatitna struktura projektovana na bazalnu ravan (Slika 1), heksagonalni atomi kalcijuma (CaII) oivičavaju „unutrašnji“ heksaedar u čijem centru se nalazi hidroksilni kanal. Šest heksagonalnih atoma kalcijuma se nalaze celom svojom zapreminom u jediničnoj ćeliji HAP i zapravo grade dva trougla koja se međusobno nalaze pod uglom od 60° u položajima $z=1/4$ i $z=3/4$ duž c -ose.

Fosfatni PO_4^{3-} tetraedri se nalaze u dva sloja koja leže u ravni sa CaII atomima, dok se CaI atomi nalaze između ovih fosfatnih slojeva. Svaki CaI atom je koordinisan sa 6 fosfatnih tetraedara preko devet atoma kiseonika, dok se CaII atomi imaju koordinacioni broj 7 i povezuju se sa 6 atoma kiseonika iz fosfatnih grupa i jednom OH^- grupom. Hidroksilne grupe su raspoređene duž c -ose u centru jedinične rešetke, gradeći hidroksilni kanal unutar trouglova koje formiraju CaII atomi [5].

Kalcijum-hidroksiapatit se javlja u tri modifikacije:

- stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit,
- kalcijum-deficitarni hidroksiapatit (CDHAP) i
- oksihidroksiapatit (OHAP).

OHAP, koji predstavlja HAP strukturu u kojoj su hidroksilni joni zamenjeni kiseoničnim jonima i vakansijama, najmanje je stabilan pa i najmanje istražen kalcijum-fosfat. Stehiometrijski kalcijum-hidroksiapatit ima molarni odnos Ca/P 1,67, sa teorijskim sastavom 39,6 mas.% Ca i 18,5 mas. % P [7]. Kalcijum deficitarni hidroksiapatit ima manji molski odnos Ca/P koji varira u opsegu 1,50 - 1,67. Deficitarnost kalcijuma kod CDHAP podrazumeva postojanje katjonskih vakansija, usled čega se višak negativnog naelektrisanja kompenzuje deficitarnošću OH^- jona. Kompenzacija naelektrisanja u CDHAP strukturi usled nedostatka Ca^{2+} jona se vrši zamenom OH^- jona molekulima vode, koja dovodi do hidroksilne deficitarnosti i pojave čvrsto vezane vode u strukturi [1].

Pri maloj deficitarnosti kalcijuma, struktura CDHAP se može posmatrati kao HAP sa prisutnim ponekim jonskim vakansijama, međutim sa povećanjem deficitarnosti kalcijuma, broj vakansija raste, a struktura postaje sve neuređenija, što se odražava na svojstva hidroksiapatitnog materijala. Termičkim tretmanom iznad 700 °C kalcijum deficitarni hidroksiapatit sa molskim odnosom Ca/P=1,5-1,67 transformiše u bifazni kompozit kalcijum-hidroksiapatita (HAP) i β -trikalcijum-fosfata (β -TCP) tzv. bifazni kalcijum-fosfat (*eng. biphasic calcium phosphate, BCP*), dok pri istim uslovima CDHAP sa Ca/P odnosom 1,5 može da se transformiše potpuno u β -TCP fazu.

Biološki HAP predstavlja veći deo mineralne komponente u ljudskom organizmu. U prirodi se retko može naći u čistom obliku već sa određenim nečistoćama, te je preciznije reći da biološki HAP sadrži kalcijum-deficitarnu apatitnu strukturu dopiranu različitim jonima poput: Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} itd. na mestu Ca^{2+} , CO_3^{2-} na mestu PO_4^{3-} , kao i F^- , Cl^- i CO_3^{2-} i H_2O na mestu OH^- . Kako CDHAP predstavlja modifikaciju HAP, termin HAP kao opštiji će biti korišćen u daljem tekstu.

Sintetički HAP se intenzivno primenjuje kao biomaterijal za reparaciju i regeneraciju kostiju i zuba usled svoje strukturne i hemijske sličnosti sa biološkim kalcijum-hidroksiapatitiom, visoke biokompatibilnosti, bioaktivnosti, osteokonduktivnosti, otpornosti na koroziju i tvrdoće slične tvrdoći gleđi i dentina. Pod bioaktivnošću se podrazumeva sposobnost materijala da na svojoj površini stvori novi sloj apatita koji se vezuje za kolagenska vlakna nativne kosti i tako obezbeđuje jaku vezu između biomaterijala i kosti. Sintetički HAP ima sposobnost da stimuliše endogenu ekspresiju osteogenih faktora rasta i poveća aktivnost alkalne fosfataze (*eng. alkaline phosphatase, ALP*) u mezenhimalnim matičnim ćelijama, što je od izuzetne važnosti u začetku procesa mineralizacije prilikom formiranja nove kosti [8]. Iako biodegradibilan, HAP ima ograničenu rastvorljivost, zbog čega je za regeneraciju defekata gde je neophodno kontrolisano rastvaranje biomaterijala pogodnije koristiti visoko rastvoljive α - i β -polimorfe trikalcijum-fosfata (TCP).

HAP i njegove modifikacije se mogu sintetisati različitim metodama poput precipitacije, hidrotermalne sinteze, kao i hidrolize drugih kalcijum-fosfata. U zavisnosti od uslova sinteze, HAP čestice mogu biti od nano do mikrodimenzija i različite morfologije: igličaste, sferične, romboične i u obliku viskersa.

U ovoj disertaciji biće sintetisan kalcijum deficitarni hidroksiapatit hidrotermalnom metodom kako bi se dobila igličasta morfologija koja ima svojstva najpribližnija biološkom apatitu.

1.2. Trikalcijum-fosfati: struktura, svojstva i primena u biomedicini

Trikalcijum-fosfat (TCP) je trobazni kalcijum-fosfat hemijske formule $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ sa molskim odnosom $\text{Ca/P}=1,5$. Postoje tri polimorfna oblika TCP: niskotemperaturna β -TCP, i visokotemperaturne α - i α' -TCP faze, od kojih poslednja nema praktični značaj jer je stabilna samo na temperaturama iznad 1400°C . β -TCP faza nastaje termičkim tretmanom kalcijum deficitarnog HAP na temperaturama u intervalu $700\text{--}1100^\circ\text{C}$, dok daljim zagrevanjem iznad $\sim 1125^\circ\text{C}$ β -TCP transformiše u α -TCP fazu [1].

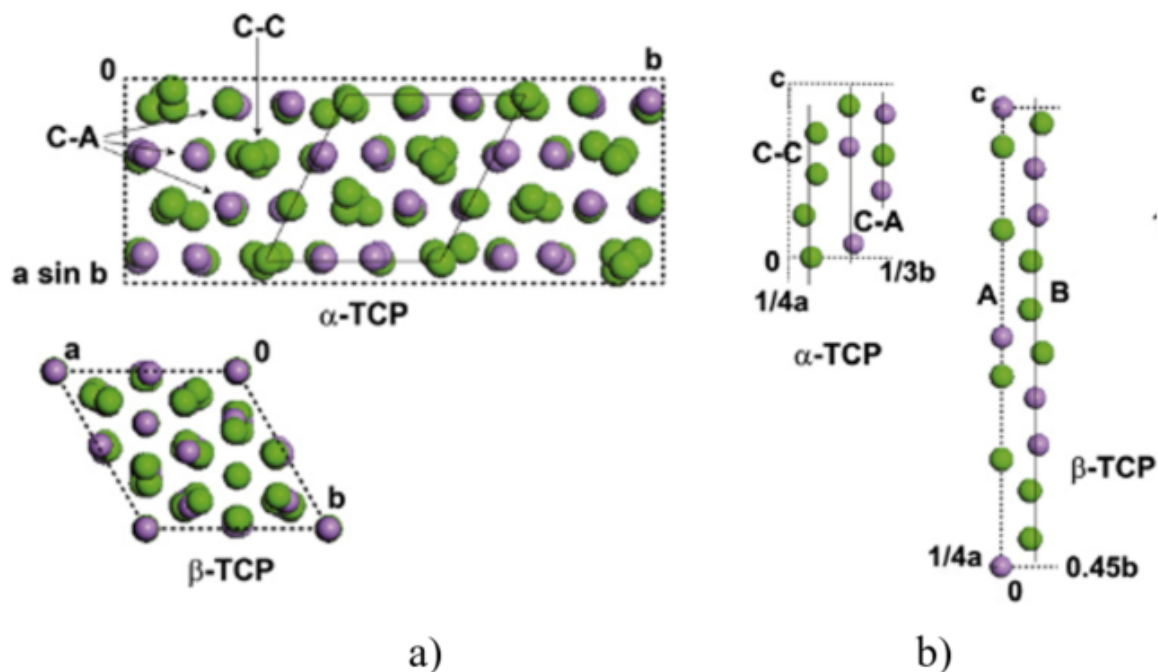
Temperatura β - α fazne transformacije se može menjati stabilisanjem jedne od faza, pa tako npr. prisustvo Mg dovodi do stabilisanja β -TCP faze i pomeranja temperature transformacije ka višim temperaturama [9]. Sa druge strane, prisustvo silicijuma dovodi do stabilizacije α -TCP faze, te dolazi do β - α -TCP fazne transformacije na temperaturama već oko $800\text{--}1000^\circ\text{C}$ [10,11].

Polimorf α -TCP kristališe monoklinično (prostorna grupa $\text{P}2_1/\text{a}$) sa parametrima rešetke $a=12,887\text{ \AA}$, $b=27,280\text{ \AA}$, $c=15,219\text{ \AA}$ i uglom od 126° između njih [1]. Joni kalcijuma i fosfatni joni koji grade jediničnu ćeliju α -TCP se grupišu u kolone duž c -ose, koje mogu biti sačinjene samo od katjona kalcijuma (C-C kolona) ili od katjona kalcijuma i fosfatnih anjona (C-A kolona), gde je svaka C-C kolona okružena sa šest C-A kolona [12]. Na Slici 2 a) je šematski prikazana α -TCP struktura projektovana na bazalnu ravan, a punom linijom je označen romb koji oivičava ćeliju sličnu HAP.

β -TCP polimorf kristališe romboedarski (prostorna grupa $\text{R}3\text{cH}$) sa parametrima rešetke $a=b=10,4183\text{ \AA}$, $c=37,3464\text{ \AA}$, i uglom od 120° između njih [1]. U svojoj strukturi, za razliku od α -TCP, ne poseduje C-C kolone već dve vrste C-A kolona sa redosledom pakovanja A tj. $-\text{P}-\text{Ca}-\text{Ca}-\text{P}-\dots$, i redosledom pakovanja B $\dots-\text{P}-\text{Ca}-\text{Ca}-\text{Ca}-\text{P}-\text{P}-\dots$, pri čemu je svaka A kolona okružena sa šest B kolona, dok je svaka B okružena sa po dve A i četiri B kolone [12]. U β -TCP strukturi postoje pet različitih mesta koje zauzimaju joni kalcijuma: CaI, CaII, CaIII, CaIV i CaV koji su koordinisani sa 8-9 atoma kiseonika, pri čemu je CaIV samo polovično popunjeno mesto sa distorziranim koordinacionim brojem 9 [13]. Na Slici 2 b) je šematski prikazana β -TCP struktura projektovana na bazalnu ravan.

Razlike u kristalnoj strukturi između α -TCP i β -TCP imaju za posledicu njihova različita fizičko-hemijska svojstva, poput bioaktivnosti, biodegradabilnosti i mehaničkih svojstava. Trikalcijum-fosfatna faza reaguje sa vodom ili telesnim fluidima, na 37°C i formira se kalcijum-hidroksiapatit prema jednačini 1:





Slika 2. Šematski prikaz kristalne strukture TCP: a) projektovano na bazalnu ravan, b) pogled sa strane; zelene sfere označavaju kalcijum, a ljubičaste fosfor, dok je kiseonik izostavljen radi jednostavnosti, C-C: katjon-katjon kolona, C-A: katjon-anjon kolona. Puna tanka linija unutar α -TCP strukture prikazuje jediničnu ćeliju sličnu HAP, preuzeto iz [12].

Usled veće rastvorljivosti α -TCP brže se formiraju kristali apatita na površini tj. bioaktivnost α -TCP je veća u odnosu na β -TCP i HAP. Velika rastvorljivost i biodegradibilnost α -TCP je čak veća u odnosu na brzinu formiranja kosti, što materijale na bazi α -TCP čini nepovoljnim za primenu kod regeneraciji kosti. Stoga se za inženjerstvo koštanog tkiva češće koristi stabilnija β -TCP faza, koja se u fiziološkoj sredini rastvara relativno brzo i lako podleže resorpciji pod uticajem osteoklasta, što dalje dovodi do stimulacije aktivnosti osteoblasta u procesu stvaranja kosti [14].

Treba napomenuti da se mehanička svojstva kalcijum-fosfata pogoršavaju sa smanjenjem teorijske gustine (ρ_t) u nizu HAP ($\rho_t = 3,16 \text{ g/cm}^3$) > β -TCP ($\rho_t = 3,08 \text{ g/cm}^3$) > α -TCP ($\rho_t = 2,86 \text{ g/cm}^3$), te fazna transformacija HAP-TCP negativno utiče na mehanička svojstva dobijene biokeramike [1]. Stoga se u cilju dobijanja biomaterijala optimalnih mehaničkih i resorbilnih svojstava, teži dobijanju BCP keramike koja predstavlja kompozit HAP i β -TCP faze u različitom odnosu i na taj način objedinjuju pozitivna svojstva obe faze uz mogućnost kontrolisanja mehaničkih i resorbilnih svojstava.

2. Bioaktivno staklo

Prvo bioaktivno staklo (*eng. bioactive glass, BAG*), 45S5 Biostaklo, je pronašao L. Hench 1969. godine, u cilju dobijanja materijala koji će omogućiti dobru integraciju sa nativnim tkivom [15]. BAG predstavlja prvi sintetički materijal koji je imao sposobnost vezivanja za nativno tkivo bez stvaranja fibrozne kapsule na međugranici tkiva i biomaterijala. Ono predstavlja prekretnicu u istoriji primene materijala u medicini, od inertnih netoksičnih tkivnih zamenika do dizajniranja bioaktivnih materijala koji potpomažu regeneraciju tkiva. Bioaktivnost kao termin je prvi put definisan 1987. godine na konferenciji Evropskog društva za biomaterijale i označava „materijal koji ima sposobnost da izazove specifičan odgovor u organizmu“ [16]. U slučaju regeneracije koštanog tkiva, bioaktivni materijal ima sposobnost da u fiziološkim uslovima na svojoj površini nagradi sloj apatita, sličnog biološkom, koji omogućava stvaranje jake veze sa nativnom kosti [17]. Bioaktivna stakla u poređenju sa kalcijum-hidroksiapatitom pokazuju veću bioaktivnost i osteoinduktivnost, kao i bolju biodegradibilnost.

Bioaktivna stakla se mogu ugrubo podeliti na tri vrste: silikatna, fosfatna i boratna, u zavisnosti koji oksid je graditelj mreže (SiO_2 , P_2O_5 , B_2O_3). Ostali oksidi prisutni u staklu se nazivaju modifikatori mreže, poput Na_2O , K_2O , CaO i MgO , koji prekidaju staklastu mrežu čime utiču na svojstva stakla. Najčešće se primenjuju silikatna bioaktivna stakla, koja u osnovi sadrže SiO_2 , CaO , P_2O_5 i Na_2O , ali mogu sadržati i manje količine drugih oksida.

Tokom 1990-ih razvija se sol-gel bioaktivno staklo koje predstavlja tzv. „drugu generaciju BAG“ koje poseduje značajno veću specifičnu površinu i poboljšanu bioaktivnost u poređenju sa topljenim staklima [18,19]. Sol-gel postupak sinteze bioaktivnog stakla omogućava dobijanje homogenog praha visoke čistoće na niskim temperaturama čime se prevazilazi i problem kristalizacije topljenog stakla tokom hlađenja rastopa.

Pokazano je da su bioaktivnost i mehanička svojstva stakala dobijenih topljenjem direktno zavisna od prisutne količine silicijuma, pa tako pri sadržaju SiO_2 ispod 53 mol.% stvaraju HAP na površini stakla u roku od 2 h, dok se pri sadržaju SiO_2 u ospegu 53-58 mol.% prvi kristali HAP stvaraju posle 2 dana. Pri sadržaju SiO_2 većem od 60 mol.% staklo potpuno gubi bioaktivnost i ne inicira kristalizaciju HAP ni posle 4 nedelje [17]. Poređenjem bioaktivnosti topljenog i sol-gel stakla pokazano je da je bioaktivnost sol-gel stakla daleko veća, te da ona ne gube bioaktivnost ni pri sadržaju SiO_2 od 90 mol.%, što se može objasniti njihovom većom specifičnom površinom i zapreminom pora, usled čega je olakšana razmena jona između stakla i simulirane telesne tečnosti. Poređenja radi, specifična površina stakla dobijenog sol-gel metodom je oko $10 \text{ m}^2/\text{g}$, a topljenog stakla je svega oko $0,5 \text{ m}^2/\text{g}$ [17]. Sol-gel stakla su izuzetno istraživana u formi poroznih skafoldnih materijala za inženjerstvo koštanog tkiva zahvaljujući njihovoj osteokonduktivnosti, osteoinduktivnosti i visokom stepenu biodegradibilnosti.

Prednosti sol-gel stakla u odnosu na stakla dobijena topljenjem leže u: a) njihovoj većoj specifičnoj površini, koja im omogućava veću rastvorljivost i bolji ćelijski odgovor; b) njihovom jednostavnijem sastavu tj. manjem broju oksida; c) mogućnosti kontrole veličine i oblika čestica podešavanjem pH sredine i d) mogućnosti dobijanja specifične raspodele pora odabirom prekursora i pH rastvora [20]. Međutim primena ovih stakala je bila ograničena samo na izradu implantata jer je poroznost čestica bila previše mala da bi se koristili kao nosači lekova. Od 2001. godine se razvijaju materijali na bazi mezoporoznog silicijum-dioksida kao sistemi za kontrolisano otpuštanje lekova [21–23], ali za razliku od BAG, oni ne poseduju bioaktivnost.

2.1. Mezoporozno bioaktivno staklo

Mezoporozna bioaktivna stakla (eng. *mesoporous bioactive glass, MBAG*) su najnovije dostignuće sol-gel metode. Razvoj čestica MBAG 2004. godine predstavlja veliki napredak u oblasti biomaterijala gde se sol-gel tehnologija kombinuje sa principima supramolekulske hemije [24]. Ova stakla se smatraju „trećom generacijom bioaktivnih stakala“ i karakterišu ih dimenzije čestica u rasponu 20-800 nm i velika zapremina mezopora veličine od 2-50 nm [25]. Mezoporozni kanali MBAG doprinose boljim površinskim svojstvima i poboljšanoj bioaktivnosti u poređenju sa BAG česticama dobijenim sol-gel postupkom, a njihova velika zapremina pora omogućava primenu ovih čestica i kao nosača lekova, faktora rasta i drugih bioaktivnih molekula [26]. Osim toga, silanolne grupe na površini MBAG mogu lako da se modifikuju različitim funkcionalnim grupama u cilju kontrolisanog otpuštanja terapijskih molekula [25,27]. Poslednjih godina se razvijaju nanočestice MBAG dopirane biološki aktivnim jonima kao novi koncept multifunkcionalnih sistema sa istovremenim lokalnim otpuštanjem jona i lekova koji mogu dovesti do udruženih efekata [25,26].

Istraživači širom sveta se bave inkorporiranjem različitih jona uključujući Li^+ , Ag^+ , Sr^{2+} , Cu^{2+} , Co^{3+} , Zn^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Ce^{4+} , Ga^{3+} , Te^{4+} , Se^{4+} , itd. [28–37] u strukturu nanočestica MBAG kako bi se postigla optimalna fizičko-hemijska i morfološka svojstva. Na ovaj način se postižu specifični terapijski efekti koji nastaju otpuštanjem jona poput: osteogenih, antibakterijskih, angiogenih, anti-inflamatornih, anti-tumornih i drugih. Izvanredna morfološka svojstva (uključujući veliku specifičnu površinu, uređenu mezoporoznu strukturu, kontrolisanu veličinu i zapreminu pora), jednostavna modifikacija površine, odlična bioaktivnost, biokompatibilnost, osteokonduktivnost, kao i mogućnost kontrolisanog otpuštanja lekova i jona, čine dopirane čestice MBAG jedinstvenim i multifunkcionalnim sistemom za primenu u biomedicini [38].

MBAG se mogu potencijalno primeniti u ortopediji i stomatologiji, kraniofacijalnoj i maksilofacijalnoj hirurgiji, kao materijal za regeneraciju defekata nastalih usled traume ili lečenja raka, u vidu koštanih graftova, cemenata, prevlaka na implantima, bioaktivnih komponenti dentalnih kompozita, za remineralizaciju gleđi i prevenciju hipersenzitivnosti dentina, kao i u inženjerstvu mekog i koštanog tkiva, kontrolisanom otpuštanju lekova, dijagnostici tumora i anti-tumorskim terapijama [27,38–43].

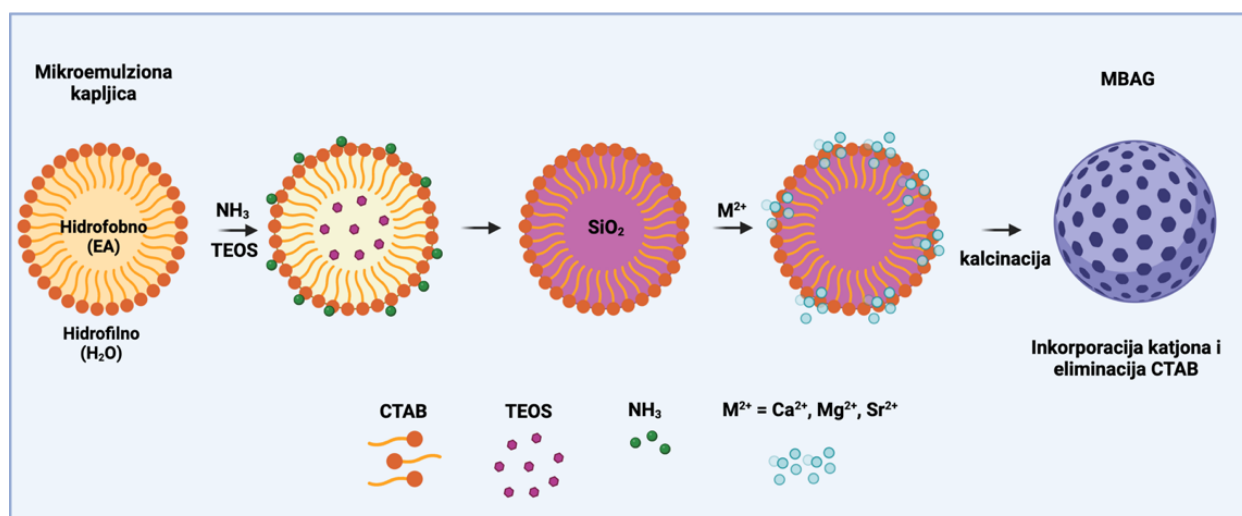
2.2. Mikroemulziona sol-gel tehnika

Jedna od metoda za dobijanje nanočestica MBAG jeste mikroemulziona sol-gel tehnika sa primenom surfaktanta kao strukturnog agensa [25,41,44,45]. Ovom tehnikom se mogu dobiti nanočestice sa uniformnim sastavom i veličinom čestica.

Kao surfaktant najčešće se koristi cetiltrimetilamonijum-bromid (CTAB) koji stabilise mikroemulziju. Mikroemulzija može biti na bazi ulja u vodi, vode u ulju i kontinualnog filma. U ovoj disertaciji koristiće se mikroemulzija na bazi ulja (etil-acetat, EA) u vodi [44,45]. Naime, prvo se rastvori CTAB u vodi da bi se napravio rastvor surfaktanta, zatim se formira mikroemulzija ukapavanjem etil-acetata u vodeni rastvor CTAB uz intenzivno mešanje. Kapljice EA se stabilizuju molekulima CTAB koji se raspoređuju na granici između EA i vode, pri čemu su hidrofobni krajevi orijentisani unutar EA, a hidrofilne glave se nalazi u vodi.

Dodavanjem amonijaka se podešava pH tako da bude bazno katalizovano ($\text{pH}=10,5$), i zatim dodaje TEOS u mikroemulziju kao izvor silicijuma. TEOS će hidrolizovati u prisustvu vode formirajući silicijumovu kiselinu koja će dalje kondenzovati i formirati nanočestice silicijum-dioksida. Ove čestice će dalje rasti unutar kapljica EA, a njihova veličina i oblik zavisice direktno od odnosa CTAB, EA, TEOS i vode, ali i uslova reakcije tj. pH vrednosti i temperature [41]. Nakon dodatka TEOS, dodaju se neorganske soli kao izvori Ca^{2+} i dopanata (Mg^{2+} i Sr^{2+}). Ovi joni se adsorbuju na površini silicijum-dioksida. Centrifugom se izdvajaju čestice u vidu gela koji se dalje

intezivno ispira i suši, a tokom spore kalcinacije na 500-600 °C dolazi do eliminacije surfaktanta i stvaranja mezoporozne strukture čestica MBAG. Pretpostavlja se da katjoni ulaze u strukturu stakla tek tokom procesa kalcinacije, zbog čega ovu metodu odlikuje nizak sadržaj katjona [46]. Na Slici 3 je prikazan predloženi mehanizam nastanka čestica MBAG.



Slika 3. Predloženi mehanizam nastanka čestica MBAG (pripremljeno pomoću BioRender.com)

3. Magnezijum i stroncijum kao dopanti

3.1. Uloga u organizmu

Magnezijum (Mg) predstavlja jedan od osnovnih elemenata u ljuskom organizmu, od čega se 65% nalazi u kalcifikovanim koštanim tkivima [47]. U organizmu učestvuje u mnogim fiziološkim procesima, poput održavanja funkcije mišićnog i nervnog sistema, proizvodnji energije, ima ulogu kofaktora u mnogim enzimskim reakcijama i procesima sinteze proteina i nukleinskih kiselina, ali je važan i u procesu remodelovanja kostiju. Pokazano je da Mg^{2+} joni stimulišu i osteogenezu i angiogenezu, pospešuju proliferaciju i diferencijaciju humanih matičnih ćelija izolovanih iz koštane srži (*eng. human bone marrow-derived MSCs (BM-MSC)*) i osteoblasta *in vitro*, ali i da stimulišu proizvodnju vaskularnog endotelnog faktora rasta (*eng. vascular endothelial growth factor, VEGF*) i neovaskularizaciju tkiva tj. stvaranje novih krvnih sudova [48–53]. Za regeneraciju koštanog defekta, od izuzetne važnosti je da se obezbedi angiogeneza tj. formiranje krvnih sudova, kako bi se obezbedila visoka prokrvljenost tkiva koja omogućuje efikasan prenos kiseonika i nutrijenata kroz tkivo.

Stroncijum jon (Sr^{2+}) je slične veličine i naelektrisanja kao jon kalcijuma, usled čega lako menja Ca^{2+} jone u biološkim procesima u organizmu. Poznato je da stroncijum (Sr^{2+}) stimuliše osteogenezu kako u zdravim tako i u kostima obolelim od osteoporoze zahvaljujući istovremenoj stimulaciji aktivnosti osteoblasta i inhibiciji aktivnosti osteoklasta [54]. Pokazano je da prisustvo jona stroncijuma smanjuje demineralizaciju zubne gleđi *in vitro* u kiselim uslovima [55]. Stroncijum se godinama uspešno koristio u kliničkoj praksi u vidu stroncijum-renelata za lečenje osteoporoze, ali je skoro povučen iz upotrebe zbog mogućih kontraindikacija, usled čega se intenzivno istražuje mogućnost kontrolisanog otpuštanja Sr^{2+} jona iz matrice [56]. Ispitivanja su pokazala da Sr^{2+} joni stimulišu osteogenu diferencijaciju mezenhimalnih matičnih ćelija (MSC) *in vitro* tako što povećavaju ekspresiju osteoblastnih gena (kolagen tipa I, osteopontin, osteokalcin) i povećavaju aktivnost alkalne fosfataze i mineralizaciju ekstracelularnog matriksa [49,57,58]. Biomaterijali za regeneraciju koštanog i dentalnog tkiva sa kontrolisanim otpuštanjem stroncijuma se sve više razvijaju u pravcu stimulisanje regeneracije defekta.

3.2. Uticaj dopiranja jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} na strukturu i svojstva biokeramičkih materijala

3.2.1. Dopiranje kalcijum-fosfata

Kalcijum-hidroksiapatit ima izuzetno fleksibilnu kristalnu rešetku koja omogućava parcijalnu ili potpunu jonsku izmenu bez narušavanja kristalne strukture. Iako struktura β -TCP nije fleksibilna kao HAP, romboedarska β -TCP struktura omogućava lakšu supstituciju jona kalcijuma katjonima dvovalentnih elemenata u odnosu na heksagonalnu strukturu HAP, što direktno proističe iz većeg broja različitih mesta kalcijuma u kristalnoj rešetki (pet u β -TCP u odnosu na dva u HAP) i činjenice da su pozicije CaIV u β -TCP samo polovično popunjene [59].

Koštano tkivo sadrži HAP dopiran različitim jonima poput Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Si^{4+} , Sr^{2+} itd., od kojih svaki igra odgovarajuću ulogu u procesu formiranja, rasta i remodelovanja kosti. Inkorporiranjem različitih jona u strukturu HAP moguće je približiti svojstva sintetičkog biološkom hidroksiapatitu. Ciljano dopiranje materijala na bazi kalcijum-ortofofata predstavlja mogući put za dizajniranje željenih svojstava biomaterijala, poput kontrolisane degradacije i mehaničkih svojstava, kao i indukovanje specifičnog biološkog odgovora nakon implementacije u organizam, poput osteogeneze, angiogeneze i antimikrobne aktivnosti. U poređenju sa inkorporiranjem bioloških jedinjenja u strukturu CaP radi stimulacije osteogeneze, inkorporacija dopanata u vidu biološki aktivnih jona je ekonomski isplativija, i omogućava značajno duže vreme skladištenja. Zahvaljujući

tome, dopirani CaP biomaterijali sve više nalaze primenu u inženjerstvu tkiva i regenerativnoj medicini.

Zahvaljujući svojoj hemijskoj sličnosti sa jonom kalcijuma, jon magnezijuma ga lako supstituiše u apatitnoj strukturi. Magnezijum ima manji jonski poluprečnik u odnosu na jon kalcijuma ($\sim 0,28 \text{ \AA}$) usled čega supstitucijom dolazi do skraćivanja M---O veze ($M = \text{Ca, Mg}$) i stvaranja kompresivnih naprezanja, distorzije rešetke i smanjivanja kristaliničnosti HAP, čime je Mg-HAP rešetka termički destabilizovana, a favorizovana njena transformacija u Mg- β -TCP [60]. Ovo može da se objasni supstitucijom heksagonalnih CaII kalcijuma u HAP strukturi jonima magnezijuma, koji se nagomilavaju duž hidroksilnih kanala gde nastaju HAP domeni bogati magnezijumom koji su skloni faznoj transformaciji [61,62]. Treba napomenuti da je preferabilno mesto jonske izmene Ca^{2+} jona u apatitnoj strukturi Mg^{2+} jonima još uvek predmet diskusije. Po jednom mišljenju, preferabilno je CaI mesto, koje ima manju zapreminu u odnosu na CaII, usled čega je energetski povoljnije za mali jon Mg da se ugradi u CaI poziciju [63,64]. Međutim, CaI ima veću dužinu veze u odnosu na CaII, te bi supstitucijom u CaI poziciji došlo do veće kontrakcije M---O veze, pa druga struja autora smatra da je inkorporiranje u CaII poziciji energetski povoljnije.

Jon magnezijuma se, osim ugradnje u rešetku, takođe adsorbuje na površinu usled čega domeni bogati magnezijumom imaju inhibirani rast u c -pravcu, pa čestice imaju sferičnu morfologiju [65]. U nekim istraživanjima došlo je do skraćivanja c -parametra, a u nekima do skraćivanja a i c -parametara [63]. Farzadi i autori su suprotno, primetili blago povećanje parametra a [66]. Ove razlike se mogu objasniti različitim metodama sinteze [67]. Promene parametara rešetke direktno utiču na svojstva Mg-HAP – povećanu rastvorljivost i biodegradibilnost, kao i favorizovanu transformaciju u β -TCP [67]. Ukupna količina prisutnog Mg u čvrstoj fazi je uvek veća od one koja se ugradi u apatitnu strukturu, gde se višak najčešće nalazi u amorfnoj fazi ili na površini kristala. Pri udelu Mg većem od 35% dobija se potpuno amorfna struktura [67]. Kako je kristalna rešetka Mg dopiranog HAP komprimovana usled distorzije, čestice se nalaze u neposrednoj blizini, usled čega je povećana gustina naelektrisanja, te favorizovana fazna transformacija apatita na nižim temperaturama [68]. Biokeramiku na bazi kalcijum-deficitarnog HAP i β -TCP karakteriše loša sinterabilnost usled β - α -fazne transformacije. Dodatak magnezijuma u HAP strukturu dovodi do stabilizacije β -TCP faze u širem temperaturnom intervalu, te se nepoželjna β - α fazna transformacija pomera ka višim temperaturama, čime se omogućava veći stepen denzifikacije materijala, što rezultuje boljim mehaničkim svojstvima krajnjeg proizvoda [9].

U β -TCP strukturi Mg^{2+} jon može da zauzme CaIV i CaV poziciju, ali se smatra da je preferirabilno mesto CaV zbog kraće M-O veze. Kada se popuni CaV pozicija dolazi do rotacije P-O veze usled čega se CaIV-O veza skraćuje, pa će i pozicija CaIV težiti da se popuni u onim slučajevima kada je CaV mesto zauzeto. Interakcije Mg-O su jače od Ca-O, što smanjuje unutrašnju energiju usled manjih M-O rastojanja [69]. Istraživanja su pokazala da inkorporiranje Mg u HAP strukturu smanjuje rast zrna te povećava žilavost materijala nakon sinterovanja, što se može pripisati velikom udelu β -TCP faze koja je 1,3 puta žilavija od HAP [70]. Treba napomenuti da je poboljšanje densifikacije i mehaničkih svojstava HAP i β -TCP keramike dodatkom magnezijuma moguće samo do određenog kritičnog udela, nakon čega je inhibiran rast zrna i smanjena sinterabilnost. Vrednost kritičnog udela Mg^{2+} jona zavisi od metode sinteze, pa tako npr. predstavlja 1 mas.% MgO u slučaju sinteze reakcijom u čvrstom stanju, dok se u slučaju hidrotermalne sinteze HAP, kritični udeo Mg^{2+} nalazi u opsegu 5-7,5 mol.% [71,72]. Usled pomenute distorzije Mg-HAP rešetke, dolazi i do povećanog stepena rastvorljivosti i biodegradibilnosti HAP u fiziološkoj sredini, što je od velike važnosti za primenu u biomedicini. *In vivo* istraživanja su pokazala da bifazni HAp/ β -TCP dopiran jonima Mg poseduje dobru biodegradibilnost, bez pojave citotoksičnosti i upalnih procesa nakon ugradnje [71]. U kontaktu sa ćelijama, biomaterijal na bazi Mg-dopiranog CaP stimuliše adsorpciju ćelija, ima sposobnost indukovanja osteogene diferencijacije matičnih ćelija, proliferacije osteoblasta i mineralizacije ekstracelularnog matriksa (*eng. extracellular matrix, ECM*) *in vitro*, kao i poboljšanu osteointegraciju *in vivo* [49,73].

Supstitucija kalcijuma većim jonima stroncijuma dovodi do ekspanzije rešetke CaP materijala što se ogleda u povećanju parametara kristalne rešetke. Stroncijum može da zauzima i CaI i CaII pozicije u apatitnoj strukturi, pri čemu je favorizovana CaI pozicija pri malim količinama Sr, dok se sa povećanjem sadržaja Sr zauzimaju i CaII pozicije [67] [74]. Ovo se može objasniti većom dužinom veze MI---O. Pri povećanju količine Sr prisutne u strukturi dolazi do odbijanja atoma u MI poziciji koja bi trebala rezultovati uvećanjem u *c*- pravcu, što se delimično onemogućava inkorporiranjem Sr atoma u MII mesto [75]. Supstitucija CaI jona dovodi do male ili neznačajne ekspanzije kristalne rešetke, što se može povezati sa uniformnim pomeranjem PO₄ tetraedara koji okružuju CaI mesto ka susednim OH⁻ kanalima, dozvoljavajući lakšu ugradnju većih Sr²⁺ jona. Veće količine dopanata dovode do veće distorzije rešetke koja rezultuje pojavom dislokacija i granica zrna, usled čega je povećana rastvorljivost Sr-dopiranog HAP.

Povećana rastvorljivost Sr-dopiranog HAP omogućava veću bioaktivnost i sposobnost otpuštanja jona Sr²⁺ koji stimulišu aktivnost osteoblasta. Dopiranje stroncijumom u radu Curran i autora [76] je dovelo do povećanja tvrdoće HAP sinterovanog na 1200 °C konvencionalnim i mikrotalasnim sinterovanjem, pri čemu se gustina HAP povećavala sa povećanjem sadržaja Sr, ali je savojna čvrstoća naglo opala. Rastvaranje Sr-HAP počinje na mestu defekta, pre svega duž granica zrna. Smatra se da se stroncijum akumulira u granicama zrna kako bi se smanjila slobodna površinska energija. Supstitucija jonima Sr²⁺ dovodi do smanjenja kristala, manje veličine zrna, te većeg broja granica zrna i veće rastvorljivosti [77]. Uticaj prisustva jona stroncijuma na fazne transformacije još uvek nije definitivno utvrđen. Istraživanja Mardziah i Kavitha su pokazala da prisustvo Sr²⁺ u apatitnoj strukturi stabilise HAP i pomera transformaciju HAP u TCP ka višim temperaturama [67]. Sa druge strane, istraživanja Kim i Curran sa autorima su pokazala suprotan trend, da se sa povećanjem količine Sr u apatitnoj strukturi favorizuje transformacija HAP u TCP [76,78]. Dopiranje CaP materijala jonima stroncijuma dovodi do povećane bioaktivnosti, poboljšane proliferacije i osteogene diferencijacije matičnih ćelija, kao i inhibirane aktivnosti osteoklasta *in vitro* [79–81]. U *in vivo* uslovima pokazano je da stroncijumom dopirani biomaterijali na bazi CaP stimulišu formiranje i remodelovanje kosti, osteointegraciju i vezu implantata sa nativnom kosti [49,82]. Neka istraživanja pokazuju i sposobnost blagog antimikrobnog dejstva Sr-dopiranog HAP [83].

U radovima S. Banerjee i Bose (2010, 2011) je *in vitro* i *in vivo* ispitan uticaj binarnog dopiranja oksidima MgO i SrO na mehanička i biološka svojstva guste β-TCP keramike [84,85]. Komercijalni β-TCP prah prosečne veličine čestica od 550 nm je dopiran sa 0,25 ili 1,0 mas.% SrO uz 1,0 mas.% MgO postupkom mlevenja na moko. Za mehanička ispitivanja dobijeni prah je ispresovan uniaksijalno i izostatski na 58 i 414 MPa redom, a zatim sinterovan na 1250 °C. Dopirani uzorci, za razliku od čistog β-TCP, nisu pokazali prisustvo α-TCP faze, već je dobijena monofazna β-TCP keramika. Prisustvo dopanata i povećanje njihovog ukupnog sadržaja dovelo je do smanjenja prosečne veličine zrna i blagog povećanja gustine kompakata usled odsustva α-TCP faze. Sa druge strane, pokazano je da je simultano dopiranje dovelo do statistički značajnog smanjenja pritiska čvrstoće, sa 419 ± 28 MPa za čist, do 359 ± 10 MPa za β-TCP dopiran sa po 1 mas.% MgO i SrO [84]. Biodegradabilnost Sr,Mg-β-TCP keramike je bila sporija u odnosu na čist β-TCP, usled čega je omogućena stabilnost implantata u dužem vremenskom periodu. Tokom 16 nedelja inkubiranja u STT-u pritiska čvrstoća Sr,Mg-β-TCP je postepeno opadala do 234 ± 32 MPa, dok je pritiska čvrstoća čistog β-TCP opala za 50% u prve dve nedelje i nakon 16 nedelja iznosila 158 ± 50 MPa [85]. Simultano dopiranje SrO i MgO dovelo je do poboljšane adhezije i proliferacije ćelija na površini β-TCP keramike, kao i stimulisane ćelijske diferencijacije *in vitro* [84]. *In vivo* test pokazao je da MgO+SrO kao dopanti stimulišu osteokondukciju i osteogenezu, povećanjem brzine formiranja i remodelovanja kosti [84]. Remodelovanje kosti je potvrđeno formiranjem osteona sa Haverzovim sistemom nakon 16 nedelja od implantacije, a uočena je i uniformna i kompaktna međugranica dopiranog β-TCP i tek remodelovane kosti [85].

Kannan i autori (2010) [86] su sintezom iz tečne faze dobili CDHAP dopiran različitim količinama jona Sr²⁺ i Mg²⁺ (1,20-5,80 mol.%), pri konstantnom molskom odnosu (Ca+Mg+Sr)/P =

1,5. Dobijeni prahovi su nakon kalcinisanja na 800 °C imali monofazni β -TCP fazni sastav. Kako je prosečna veličina zbira jona Sr^{2+} i Mg^{2+} $(1,25 \text{ \AA} + 0,89 \text{ \AA})/2 = 1,07 \text{ \AA}$ manja u odnosu na veličinu Ca^{2+} jona, došlo je do smanjenja parametara rešetke β -TCP strukture. Utačnjavanjem strukture pokazano je da jon magnezijuma favorizuje ulazak u CaV, dok Sr^{2+} popunjava CaI-CaIV, s tim da većinski popunjava CaIV. Dati proračuni su bili bazirani na činjenici da CaV mesto ima najkraće veze te lako prima manje Mg^{2+} jone, dok najduže veze poseduje CaIV pa je mesto gde se preferentno smešta veći Sr^{2+} jon. Pokazano je da simultano dopiranje Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima ne menja preferabilna mesta supstitucije Ca^{2+} u β -TCP strukturi.

Aina i autori (2012) [87] su ispitali uticaj simultanog dopiranja jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} tokom sinteze hidroksiapatita precipitacijom iz vodenog rastvora. Sadržaji Sr^{2+} i Mg^{2+} su varirani u opsegu 0,1-1,0 mol.% Mg^{2+} i 0,9-1,9 mol.% Sr^{2+} , tj. ukupna količina dopanata od 0,6-3,0, pri konstantnom molskom odnosu $(\text{Ca}+\text{Sr}+\text{Mg})/\text{P}=1,667$. Dobijeni prahovi su kalcinirani na 1100 °C u trajanju od 16 h. Simultano dopiranje Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima je uticalo na stepen kristaliničnosti i parametre rešetke, kao i na udeo prisutnih faza. Variranjem sadržaja Sr^{2+} i Mg^{2+} jona dobijeni su BCP materijali različitog HAP/ β -TCP odnosa, pri čemu je pri istom sadržaju magnezijuma u monodopiranom HAP dobijeno znatno više β -TCP faze nego u slučaju bidopiranog jonima Mg^{2+} i Sr^{2+} . Sa druge strane, Imrie i autori (2013) [62] su zaključili da je stabilizacija β -TCP faze Mg^{2+} jonima povećana prisustvom Sr^{2+} jona u binarno supstituisanim kalcijum-ortofosfatima. U ovom radu HAP binarno supstituisan jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} je sintetisan reakcijom u čvrstom stanju, i kalcinisan na 1100 °C u trajanju od 16 h, nakon čega su dobijeni bisupstituisani BCP prahovi.

Tarafder i autori (2013) [88] su fabrikovali skafolde (nosače ćelija) na bazi simultano dopiranog TCP jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} , metodom 3D štampanja praćenog mikrotalasnim sinterovanjem na 1250 °C i ispitali *in vivo* uticaj dobijenih skafolda na osteogenezu. Za polazni prah korišćen je komercijalni β -TCP pomešan sa po 1,0 mas. % MgO i SrO . Skafolde je karakterisala različita veličina međupovezanih pora kvadratnog oblika: 500 μm , 750 μm i 1000 μm . Za razliku od nedopiranih skafolda, dopirani nisu pokazali faznu transformaciju u α -TCP, a imali su bolju densifikaciju i manju veličinu zrna. *In vivo* biološka ispitivanja su pokazala da je formiranje nove kosti i stvaranje osteoida na međugranici nativna kost-implantat i u samim makroporama skafolda bila veća u slučaju bidopiranog SrO , MgO - β -TCP u odnosu na nedopirani β -TCP. Prisustvo MgO i SrO kao dopanata je rezultovalo većom količinom novoformirane kosti sličnoj osteoidu u ranoj fazi formiranja kosti, usled povećane proliferacije i diferencijacije ćelija. Ispitivana grupa sa skafoldom na bazi SrO , MgO - β -TCP je pokazala potpuno formiranje i mineralizaciju novonastale kosti nakon 12 nedelja, što je brže u odnosu na grupu sa nedopiranim β -TCP gde nije uočena potpuna mineralizacija ni nakon 16 nedelja, pri čemu je nedvosmisleno zaključeno da Sr i Mg kao dopanti pospešuju osteogenezu.

Bellucci i autori (2014) [89] su sintetisali kompozite sačinjene od topljenog biostakla i Mg, Sr-dopiranog TCP. Staklo je imalo sledeći sastav: 2,3 mol.% K_2O , 2,3 mol.% Na_2O , 45,6 mol.% CaO , 2,6 mol.% P_2O_5 i 47,3 mol.% SiO_2 i prosečnu veličinu čestica oko 70 μm . Bidopirani Mg,Sr-TCP prahovi su imali nominalni molski odnos $(\text{Ca}+\text{Sr}+\text{Mg})/\text{P}= 1,5$ sa jednakim sadržajem Sr^{2+} i Mg^{2+} jona (0,0625 mol.%). TCP prah je termički tretiran na 900 °C kako bi se obezbedila monofazna β -TCP faza. Dobijeni molski odnos $(\text{Ca}+\text{Sr}+\text{Mg})/\text{P}$ je bio znatno manji od predviđenog i iznosio 1,353, a parametri rešetke su bili slični nedopiranom β -TCP usled suprotnih efekata prisustva dva jona različite veličine. Kompoziti su pripremljeni kao mešavina 50% Sr,Mg-TCP i 50% bioaktivnog stakla i sinterovani na 850 °C u trajanju od 3 h. Pokazana je dobra adhezija i proliferacija ćelija na površini kompozita *in vitro*, kao i povećana aktivnost ALP, sinteza kolagena i mineralizacija ECM, što se može pripisati uticaju prisustva Sr^{2+} i Mg^{2+} jona.

Geng i autori (2016) [90] su hidrotermalno sintetisali Sr,Mg-binarno dopiran HAP na 150 °C u trajanju od 5 h i ispitali uticaj jona na strukturu i biokompatibilnost HAP. Odnos dopanata je variran, dok je ukupna količina iznosila 30 mol.%. Sa povećanjem udela Mg od 5 do 25 mol.% a pri konstantnom ukupnom sadržaju dopanata molski odnos $(\text{Ca}+\text{Sr}+\text{Mg})/\text{P}$ je opadao od 1,60 do 1,34,

usled čega je inhibirana kristalizacija HAP. Pokazano je da je magnezijum destabilizacioni faktor i da povećanje njegove koncentracije dovodi do smanjenja kristaliničnosti, termičke stabilnosti i parametara rešetke HAP. Stroncijum je potpuno supstituisao kalcijum, dok je supstitucija jonima Mg^{2+} bila samo parcijalna. *In vitro* istraživanja su pokazala da HAP koji sadrži 10 mol.% Mg i 20 mol.% Sr stimuliše adheziju, proliferaciju i diferencijaciju ćelija u poređenju sa čistim HAP.

Ke i autori (2019) [73] su ispitali efekat dopiranja TCP sa SrO , MgO i SiO_2 na *in vitro* ekspresiju gena i *in vivo* osteogenezu. Prahovi su sintetisani reakcijom u čvrstoj fazi i ispresovani u diskove koji su dalje sinterovani na $1250\text{ }^{\circ}C$. Ćelije humane preosteoblastne linije kultivisane na Mg-TCP, Sr-TCP i Si-TCP diskovima pokazale su značajno više vrednosti vijabilnosti u odnosu na nedopiran TCP. Za *in vivo* analizu fabrikovani su Si,Mg-TCP dopirani skafoldi metodom 3D štampe, i nakon 16. nedelje implantacije pokazan je značajno veći stepen formiranja kosti u odnosu na grupu sa čistim TCP skafoldima.

Kazemi i autori (2019) [91,92] su ispitali fabrikovanje kompozitnih skafolda na bazi nanočestica 45S5 stakla i Sr-TCP metodom replike suđera pri različitim odnosima BG i TCP. Pokazano je da pri odnosu Sr-TCP/BG od 75/25 čestice stakla nisu povezane, a struktura skafolda ima veliki broj nepravilnih pora. Pri odnosu faza 50/50 tečna staklasta faza je bila homogeno raspoređena i omogućila rast zrna i densifikaciju strukture. Pritisna čvrstoća skafolda sinterovanih na $1250\text{ }^{\circ}C$ je iznosila $0,14\text{ MPa}$ za Sr-TCP, a dodatak 25 mas.% BG je povećao pritisnu čvrstoću na $0,88\text{ MPa}$. Najveća pritisna čvrstoća je postignuta je u slučaju odnosa dve faze 50/50 i iznosila je $1,70\text{ MPa}$ pa je ovaj nosač dalje korišćen za biološke analize *in vitro* i *in vivo*. Nakon 21 dana kultivacije BM-MSC ćelija pacova u nosačima došlo je do povećane ekspresije osteogenih gena u poređenju sa kultivacijom ćelija u 2D sredini. Ćelije kultivisane u nosačima na bazi Sr-TCP su pokazale veću ekspresiju kolagena tipa I (COL1) u odnosu na one kultivisane u nosaču na bazi nedopiranog TCP i kompozitnog skafolda na bazi Sr-TCP i 45S5.

Scalera i autori (2020) [93] su sintetisali bisupstituisani Mg,Sr-HAP precipitacijom u vodenom rastvoru sa po 0,5 mas.% i 1,0 mas.% Mg i Sr pri konstantnom odnosu $(Ca+Sr+Mg)/P=1,67$. Dobijeni precipitati granulacije $125-212\text{ }\mu m$ su kalcinirani na $900\text{ }^{\circ}C$ i korišćeni za fabrikovanje skafolda metodom replike suđera sinterovanjem na $1300\text{ }^{\circ}C$. U ovom radu pokazano je da Sr,Mg binarno dopiranje može dovesti do stabilizacije apatitne strukture, kao sinergetskog efekta prisustva dva jona različitih prečnika. Mehanička svojstva dobijenih Mg,Sr-HAP skafolda su bila slična nedopiranom hidroksiapatitu, posebno u slučaju prisustva po 0,5 mol.% dopanta što je u skladu sa dobijenim skoro monofaznim sastavom dopiranog HAP. Sa druge strane, humane ćelije osteosarkoma MG63, kultivisane na površini SrHAP i MgHAP, su pokazale nešto nižu vijabilnost u odnosu na ćelije kultivisane na površini nedopiranog HAP.

Lu i autori (2023) [94] su ispitali fizičko-hemijska svojstva i biokompatibilnost 3D štampanih nosača na bazi Mg-dopiranog BCP pri sadržaju Mg 0-10 mol.%. Sa povećanjem sadržaja Mg sadržaj HAP u BCP strukturi je opadao. Vijabilnost mišjih BM-MSC ćelija je bila veća u grupi Mg-dopiranih nosača nakon 3 i 7 dana kultivacije. Posle 7 dana kultivacije značajno veća ekspresija osteogenih gena je primećena u grupi Mg-BCP skafolda, ali nakon 14 dana ekspresija je bila slična kao kod nedopiranog BCP. Ekstrakti BCP sa sadržajem Mg većim od 3 mol.% stimulišali su vijabilnost i proliferaciju endotelnih HUVEC ćelija, a ekstrakti BCP dopiranog sa 5 mol.% Mg su u testu angiogeneze u Matrigelu pokazali stimulisanje organizacije endotelnih HUVEC ćelija u tubule i mreže. Matrigel test angiogeneze je laboratorijski test koji se koristi za proučavanje formiranja novih krvnih sudova tj. angiogeneze u kontrolisanim uslovima.

Lu i autori (2024) [95] su metodom precipitacije sintetisali Sr-HAP prah sa 5-50 mol.% Sr i 3D štampanom fabrikovali makroporozne nosače ćelija. Pri sadržaju manjem od 15 mol.% Sr fazni sastav sintetisanog praha je bio bifazni BCP, a pri višim je došlo do formiranja kalcijum-stroncijum-fosfata ($Ca_2Sr(PO_4)_2$). Citokompatibilnost i pro-osteogena svojstva 3D štampanih skafolda su ispitani direktnom kultivacijom mišjih BM-MSC ćelija na površini skafolda i pokazano je da dopiranje jonima Sr^{2+} u opsegu 10-30 mol.% značajno pospešuje vijabilnost ćelija, kao i da pospešuje aktivnost

alkalne fosfataze i stimulise ekspresiju COL1 gena nakon 7 dana kultivacije. Interesantno, nakon 14 dana kultivacije joni Sr^{2+} su doveli do smanjenja ekspresije ovog gena.

Yuan i autori (2024) [96] su ispitali *in vitro* i *in vivo* pro-osteogena i pro-angiogena svojstva 3D štampanih kompozitnih skafolda na bazi β -TCP i magnezijum-silikata, pri sadržaju magnezijum-silikata 10-30 mas.%. Fazni sastav je bio trofazni, pored β -TCP i magnezijum-silikata u strukturi je bio prisutan i diopsid. Dodatak 10-20 mas.% magnezijum-silikata je doveo do pospešenog sinterovanja, što je uticalo na smanjenje poroznosti (sa 80% na 70%) i značajnom povećanju pritisne čvrstoće sa 10 na 20 MPa. Dodatak od 10 mas.% magnezijum-silikata je rezultovao u najboljoj citokompatibilnosti sa mišjim BM-MSC ćelijama, značajno poboljšanoj proliferaciji ćelija i ekspresiji osteogenih gena (ALP, OCN, COL1) nakon 10 dana kultivacije. Pored pro-osteogenih svojstava, ispitana su i pro-angiogena svojstva uzgajanjem endotelnih HUVEC ćelija u Matrigelu sa dodatkom ekstrakta skafolda. Pokazano je da su ekstrakti koji sadrže jone Mg^{2+} i Si^{4+} uticali pozitivno na organizaciju endotelnih ćelija u tubule i mreže potvrđujući pro-angiogena svojstva ovih nosača. *In vivo* ispitivanja su pokazala da dodatak 10 mas.% magnezijum-silikata utiče na bolja osteogena i angiogena svojstva skafolda u ranoj fazi regeneracije koštanog defekta.

Jedan od ciljeva ove doktorske disertacije jeste procesiranje makroporoznih nosača ćelija na bazi binarno dopiranog CaP jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} i njegovih kompozita sa mezoporoznim bioaktivnim staklom, i ispitivanje strukture i svojstava ovih nosača, kao i potencijalne primene u inženjerstvu koštanog tkiva.

3.2.2. Dopiranje mezoporoznog bioaktivnog stakla

Prisustvo jona metala u strukturi stakla ima značajan uticaj na fizičko-hemijska svojstva stakla, na morfologiju, mezoporoznost, rastvorljivost, bioaktivnost, kao i na mehanička svojstva. Cilj dopiranja mezoporoznog stakla jeste indukovanje specifičnog odgovora u organizmu, a inkorporiranje više od jednog jona moglo bi da dovede do formiranja multi-funkcionalnih (bioaktivnih, osteogenih, angiogenih itd) biomaterijala za inženjerstvo koštanog i dentalnog tkiva. Sol-gel sinteza omogućava inkorporiranje velikog broja jona metala u strukturu biostakla, usled čega se dopiranje biostakla jonima različitih biološki aktivnih elemenata poput Sr, Zn, Co, Cu, Ce, Ga, Ag, Mg itd. intenzivno istražuje. Sve češće istraživanja idu u smeru dopiranja MBAG sa dva jona [33,97–102].

Iako je inkorporiranje jona Sr^{2+} ili Mg^{2+} jona u strukturu MBAG ispitivano u različitim studijama [36,37,103–106], i dalje ima jako malo informacija o njihovom udruženom efektu [107]. Binarno dopiranje MBAG jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} može dovesti do ubrzane regeneracije kostiju, ali takođe prisustvo dopanata može uticati i na rastvorljivost čestica i mezoporožna svojstva, čime direktno može ugroziti njihovu bioaktivnost [37,44] i sposobnost vezivanja i otpuštanja lekova [43]. Kako su procesi vezani za lečenje koštanih defekata često povezani sa inflamatornim procesima uzorkovanim infekcijama, vezivanje anti-inflamatornih lekova poput ibuprofena i diklofenaka na čestice MBAG, i njihovo lokalno otpuštanje na mestu implantacije predstavlja značajan interes za ubranu regeneraciju kostiju [40]. U nastavku dat je kratak pregled uticaja dopiranja mezoporoznog bioaktivnog stakla jonima Mg^{2+} i/ili Sr^{2+} .

Lee i autori (2017) [103] su sintetisali čestice MBAG sastava 85 mas.% SiO_2 –10 mas.% CaO –5 mas.% SrO sol-gel metodom sa primenom ultrazvuka i PEG kao strukturnog agensa. Dobijene čestice su bile veličine oko 60 nm sferne morfologije. Specifična površina nedopiranih čestica bila je svega 44,7 m^2/g sa zapreminom pora od 0,084 cm^3/g , dok je dopiranje stroncijumom povećalo ove vrednosti na 66,6 m^2/g i 0,12 cm^3/g . Čestice su pokazale odsustvo citotoksičnog efekta prema humanim MSC ćelijama izolovanim iz zubne pulpe do koncentracije od 320 $\mu\text{g}/\text{mL}$ u slučaju MBAG, odnosno 160 $\mu\text{g}/\text{mL}$ za SrMBAG pri direktnom testu. Obe vrste čestica su pokazale stimulativni efekat ka osteogenezi/odontogenezi merenjem ekspresije gena od interesa nakon kultivacije u

osteogenom medijumu 7, 14 i 21. dana, pri čemu su veće vrednosti dobijene za SrMBAG pokazujući pro-osteogeni efekat jona stroncijuma. U ovoj studiji sposobnost vezivanja i otpuštanja leka sa čestica SrMBAG je testirana sa lekom fenamilom i pokazano je naglo otpuštanje leka, 53 % leka u prvih 6 h odnosno 80 % u prvih 30 h. *In vivo* testom je potvrđena veća pro-osteogena sposobnost SrMBAG čestica u poređenju sa MBAG.

Fiorilli i autori (2018) [104] su ispitali dve različite tehnike sinteze Sr-dopiranog mezoporoznog bioaktivnog stakla (SrMBAG) pri dodatku 2 i 4 mol.% Sr^{2+} jona metodom raspršivanje-sušenje (*eng. spray-dry*) za dobijanje mikročestica i sol-gel sintezom za dobijanje nanočestica i daljom sporom kalcinacijom na 600 °C u trajanju od 5 h. Nanočestice dobijene sol-gel metodom su bile sferične morfologije i veličine 100-200 nm. Analizom hemijskog sastava čestica pokazano je da je sadržaj Sr inkorporiran u staklu značajno manji od nominalne količine Sr. Srednja veličina pora je bila oko 4 nm, a povećanje sadržaja Sr^{2+} jona je uticalo na značajno smanjenje specifične površine čestica sa 803 na 551 m^2/g , kao i na smanjenje zapremine pora sa 0,82 na 0,45 cm^3/g . Bioaktivnost ovih čestica je primećena nakon 3 i 14 dana u STT. Čestice su pokazale odsustvo citotoksičnog efekta prema ćelijama fibroblasta L929 u indirektnom testu pri koncentraciji od 1 mg/mL. Ćelije uzgajane sa ekstraktima nanočestica MBAG su pokazale veću ekspresiju COL1 u odnosu na ekstrakte mikročestica nakon 72 h kultivacije, dok je suprotan efekat uočen nakon 7 dana kultivacije.

Shoaib i autori (2021) [105] su sintetisali Mg-dopirane čestice MBAG kiselinom katalizovanom sol-gel sintezom u sistemu 51% SiO_2 – 18% CaO – 20% Na_2O – 4% P_2O_5 – 7% MgO (mol.%). Nakon 7 dana u STT XRD analizom pokazana je mineralizacija apatita potvrđujući bioaktivnost ovih čestica. Otpuštanje leka mitomicina iz ovih čestica je bilo naglo, pri čemu je u prvih sat vremena otpušteno preko 50% vezanog leka. Analize citokompatibilnosti sa fibroblastnom ćelijskom linijom su pokazale zadovoljavajući citokompatibilnost čestica u rasponu koncentracija 3-100 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

U radu Taghvaei i autora (2020) [106] sintetisane su MBAG čestice u sistemu 80 SiO_2 –15 CaO –5 P_2O_5 sa 5 mol.% SrO (80 SiO_2 –10 CaO –5 SrO –5 P_2O_5) i 10 mol.% SrO u sistemu 80 SiO_2 –10 CaO –10 SrO . Količina inkorporiranog SrO je bila duplo manja od nominalne. Dopiranje sa 5 mol.% SrO uz dodatak 5 mol.% P_2O_5 nije značajno uticalo na veličinu čestica, a povećalo je specifičnu površinu sa 463 na 480 m^2/g , dok je 10 mol.% SrO uticalo na blago povećanje čestica i smanjenje specifične površine na 408 m^2/g . Autori su pretpostavili da prisustvo stroncijuma dovodi do narušavanja uređenosti mezoporozne strukture kao posledica poremećaja elektrostatičkih interakcija usled supstitucije jona kalcijuma većim jonom Sr^{2+} . Dopiranje stroncijumom nije ugrozilo bioaktivnost čestica, ali je dovelo do promene morfologije i kristaliničnosti novoformiranog apatita. Autori su takođe pokazali da dopiranje jonima stroncijuma nije značajno uticalo na sposobnost vezivanja i otpuštanja ibuprofena, sa naglim otpuštanjem 50% leka u prvih 24 h. Citokompatibilnost ekstrakata čestica testirana na matičnim ćelijama iz adipoznog tkiva i fibroblastima pokazala je odsustvo toksičnog efekta pri koncentraciji 25% v/v, dok je za više koncentracije pokazano smanjenje vijabilnosti kod matičnih ćelija.

Tabia i autori (2019) [37] su ispitali uticaj prisustva Mg (1-10 mol.%) na strukturu i svojstva mezoporoznog stakla dobijenog sol-gel metodom u sistemu 85 SiO_2 -15 CaO . Sa porastom sadržaja Mg povećana je specifična površina čestica sa 211 m^2/g za nedopirane čestice na 311 m^2/g za MBAG sa 10 mol.% Mg, kao i zapremina pora sa 0,26 cm^3/g na 0,41 cm^3/g . Čestice MBAG sa 10 mol.% Mg nisu pokazale bioaktivna svojstva ni posle 14 dana u STT, dok su čestice sa 3 i 5 mol.% Mg pokazale blage pikove na XRD koji mogu ukazivati na stvaranje apatita, ali se na SEM mikrografijama nisu uočavali karakteristični apatitni kristali. Autori su ispitali vezivanje i otpuštanje leka amoksicilina sa česticama aminovanih MBAG, sa povećanjem sadržaja Mg blago je opao kapacitet vezivanja leka sa 54% na 50%, a brzina otpuštanja leka je rasla. Sve čestice su pokazale naglo otpuštanje leka u prvih 100 h, s tim da je kod nedopiranog otpušteno oko 30% a kod dopiranog sa 5 mol.% Mg oko 55%.

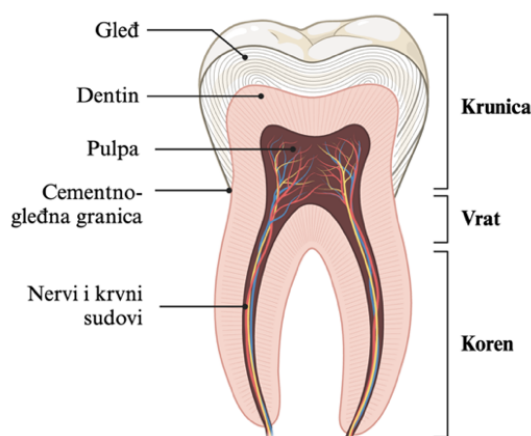
Jedina poznata studija koja je pokazala uticaj istovremenog dopiranja stroncijumom i magnezijumom na strukturu i svojstva MBAG jeste studija Pouroutzidou i autora (2021) [107]. Sintetisane su MBAG čestice sol-gel metodom sa primenom CTAB tako što su u nominalnom sastavu akermanita (41 mas.% CaO – 15 mas.% MgO – 44 mas.% SiO₂) menjali sadržaj MgO sa 2-6 mol.% SrO. Dobijene čestice su bile veličine 80-300 nm, sa srednjom veličinom pora 3 nm. Sposobnost vezivanja leka moksifloksacina je porasla kada je pored Mg u strukturi bilo prisutno 4 mol.% SrO (sa 11 na 14% vezanog leka), ali pri sastavu od 6 mol.% SrO sposobnost vezivanja leka je naglo opala sa 14 % na 2 %. Ekstrakti Sr,MgMBAG čestica dobijenih u ovoj studiji nisu pokazale citotoksičan efekat prema humanim fibroblastnim ćelijama izolovanim iz periodontalnog ligamenta u rasponu koncentracija 60-250 µg/mL, osim u slučaju čestica sa 6 mol.% Sr nakon 24 h kultivacije.

Jedan od ciljeva ove disertacije bila je sinteza multifunkcionalnih čestica MBAG binarno dopiranih jonima Sr²⁺ i Mg²⁺ mikroemulzionom sol-gel tehnikom za stimulisanu regeneraciju kosti i kontrolisano otpuštanje anti-inflamatornog leka ibuprofena. Uticaj dopiranja MBAG stroncijumom i magnezijumom na fizičko-hemijska, površinska, pro-osteogena i pro-angiogena svojstva ovih čestica je ispitan u okviru ove disertacije.

4. Zubno tkivo

4.1. Anatomija zubnog tkiva

Zubi su usađeni u alveolarne nastavke maksile (gornje vilice) i mandibule (donje vilice) obrazujući dentalne lukove, i imaju osnovnu ulogu u mastikaciji, odnosno sečenju i žvakanju hrane. Morfološki gledano, zub se sastoji iz krunice, vrata i korena zuba (Slika 4). Svaki zub se sastoji od pulpnog i tri kalcifikovana tkiva: gleđi, dentina i cementa. Dentin je u kruničnom delu prekriven gleđi, a u korenskom cementom. U središnjem delu kruničnog i korenskog dela se nalazi zubna pulpa koja sadrži krvne sudove i nervne završetke. Gleđ predstavlja najviše mineralizovano tkivo u organizmu sa preko 95 mas.% neorganske faze, gde je većinski prisutan hidroksiapatit i male količine magnezijuma, karbonata, hlorida, fluorida i sulfata [108]. Strukturu gleđi čini više miliona gleđnih prizmi koje se pružaju spiralno ili talasasto od dentina ka površini gleđi. Dentin čini najveći deo zubne mase i predstavlja mineralizovano visokopermeabilno tkivo koje čini oko 70 mas.% kristala hidroksiapatita, 15-20 mas.% organske materije koju čine u najvećoj meri kolagen tipa I i 10 mas.% vode [108]. Specifičnu strukturu dentina čine dentinski tubuli koji se pružaju celom dužinom od pulpe do gleđi. Tubuli su okruženi peritubularnim dentinom, koji predstavlja visokomineralizovano tkivo sa nekolagenskom materijom. Između tubula se nalazi intertubularni dentin, koji se sastoji od mineralizovanog kolagena. Neminerlizovan je samo tanak sloj dentina – predentin, koji se nalazi neposredno uz sloj odontoblasta i ovičava granicu između pulpe i dentina. Iako se pulpa i dentin razlikuju po histološkoj građi i hemijskoj strukturi, oni su u bliskoj morfofunkcionalnoj vezi, pa se i fiziološke i patološke reakcije u jednom tkivu odražavaju na drugo, npr. reakcija na karijes ili restaurativnu proceduru [108,109].

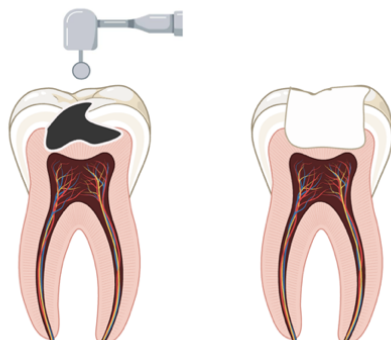


Slika 4. Anatomija molara (pripremljeno pomoću BioRender.com)

4.2. Zubni karijes

Karijes predstavlja oboljenje mineralizovanog zubnog tkiva, a karakterišu ga procesi demineralizacije i remineralizacije. Bakterije razlažu ugljene-hidrate iz hrane, čime nastaju organske kiseline i proteolitički enzimi usled čega dolazi do smanjenja pH vrednosti dentalnog plaka. U tako kiseloid sredini vremenom dolazi do rastvaranja gleđnih minerala, pri čemu se iz kiseline izdvajaju joni vodonika, a iz gleđi joni Ca^{2+} i PO_4^{2-} , OH^- , CO_3^{2-} , F^- , Na^+ i Mg^{2+} . Gubitak mineralne komponente je praćen dezintegracijom organske komponente, usled čega nastaje karijes. Ukoliko joni kalcijuma i fosfatni joni difunduju iz strukture gleđi, uspostavlja se ravnoteža demineralizacije i remineralizacije zubnog tkiva. Remineralizacija predstavlja proces rekristalizacije hidroksiapatita i u normalnim uslovima se dešava spontano u kontaktu sa pljuvačkom koja je bogata jonima Ca^{2+} i PO_4^{2-} . Onog momenta kad procesi demineralizacije uznapreduju na površini zuba nastaje kavititet koji narušava

integritet zubne površine i predstavlja karijesnu leziju. Najčešće karijesni proces napreduje i širi se sa gleđi u dentinsko tkivo. Klinički postupak tretiranja karijesom zahvaćenog zubnog tkiva podrazumeva uklanjanje zahvaćenih potpuno ili delimično demineralizovanih tkiva čime nastaje kavit (šupljina, Slika 5), koji je zatim neophodno ispuniti restaurativnim materijalima adekvatnih zaptivnih i mehaničkih svojstava.



Slika 5. Šematski prikaz uklanjanja karijesa čime nastaje zubni kavit (pripremljeno pomoću BioRender.com)

4.3. Ispun kaviteta

Najčešće korišćeni restaurativni materijal za ispunu kaviteta predstavljaju dentalni kompoziti na bazi smola koji očvršćavaju svetlosnom polimerizacijom. Ovi materijali imaju izuzetna estetska i zaptivna svojstva, i predstavljaju standardni ispun kaviteta zuba. Međutim, u slučaju velikih i dubokih kaviteta u bočnoj regiji zuba ovakvi ispuni imaju relativno kratak vek trajanja usled pojave sekundarnog karijesa i/ili frakture ispuna [110]. Istraživanja su pokazala da godišnje čak 2,2% restauracija bude zamenjeno usled pojave marginalnog procepa, sekundarnog karijesa ili frakture restauracije [111].

Naime, ispuna velikih kaviteta zahteva primenu veće količine dentalnog kompozita, što dovodi do veće polimerizacione kontrakcije i stvaranja procepa na međugranici zuba i restauracije. Kroz formiran procep omogućen je prodor pljuvačke i mikroorganizama, usled čega nastaje sekundarni karijes. Treba napomenuti da polimerizaciono skupljanje dovodi i do stvaranja naprezanja u restauraciji, usled čega su njena mehanička svojstva oslabljena i teže mogu da se odupru silama koje se razvijaju prilikom mastikacije.

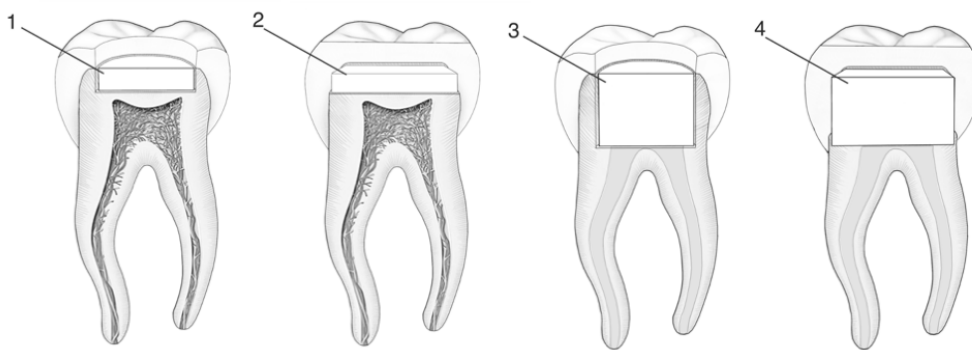
Kako bi se smanjio stepen polimerizacionog skupljanja, u kliničkoj praksi se koristi tehnika postepenog nanošenja tankih slojeva dentalnog kompozita i njihova pojedinačna polimerizacija. Ovakav postupak je ne samo zametan, već i predstavlja rizik za zaostajanje vazdušnih mehurova između slojeva kompozita, koji predstavljaju slabu tačku restauracije i mogu dovesti do njenog loma. Kako bi se prevazišao ovaj problem od 1980-tih godina se primenjuju neorganski dentalni inserti kao dentinski zamenici, koji imaju ulogu megapunioca za ispunu kaviteta. Sa smanjenjem primenjene količine polimera, direktno se smanjuje i polimerizaciono skupljanje. Komercijalno dostupni dentalni inserti su bazirani na inertnim materijalima poput feldspata, alumine i kvarca koji imaju značajno drugačiji sastav i svojstva u odnosu na prirodni dentin.

Trenutno se u restaurativnoj stomatologiji fokus istraživanja kreće u smeru bioaktivnih dentalnih restaurativnih materijala, koji su prema definiciji Svetske stomatološke federacije materijali koji pored restauracije zubnog tkiva i njegove funkcije, ispoljavaju i jasan biološki i/ili hemijski efekat bez pojave značajnih kontraindikacija [112]. Bioaktivnost bi trebala da ublaži mogućnost nastanka sekundarnog karijesa, ali i da potpomogne pulpnoj zaštiti.

Prvi dentalni inserti na bazi CaP su razvijeni 2015. godine u vidu bioaktivnih dentinskih zamenika hemijski sličnih prirodnom dentinu [113]. Ispitivanja Ležaje i autora su pokazala da primena CaP inserata obezbeđuje tri puta manju polimerizacionu kontrakciju, kao i značajno

smanjenje naprezanja u restauraciji *in vitro* [113]. Pored toga, njihova sličnost sa dentinom omogućava ostvarivanje jake veze sa komercijalno dostupnim restaurativnim materijalima [113–115] koji su već optimizovani za primenu koja podrazumeva dobru vezu sa dentinom [116,117].

Inserti mogu biti prethodno fabrikovani u različitim veličinama i oblicima tako da se mogu primeniti u restaurativnoj stomatologiji za zamenu uklonjenog dentinskog tkiva kod velikih kaviteta nakon uklanjanja zubnog karijesa, postupka endodontskog lečenja zuba ili zamene starih ispuna (Slika 6). Po potrebi standardne forme inserata se mogu dodatno prilagoditi stomatološkim instrumentima tako da odgovaraju specifičnim oblicima zubnog kaviteta. Kako keramika ima svojstva termičkog izolatora, primena CaP dentalnih inserata može dodatno smanjiti i izloženost pulpe promenama temperature u oralnoj sredini.



Slika 6. Različiti oblici inserata: cilindar (1,3) i kvadar (2,4), različite visine inserta za zamenu dentinskog tkiva nakon uklanjanja karijesa (1,2) i kod endodontski lečenih zuba (3,4)

Primena dentalnih inserata u restaurativnoj stomatologiji podrazumeva da se dentalni inserti pričvršćuju za dno i bočne strane kaviteta nekim samovezujućim dentalnim adhezivom ili glas-jonomer cementom, a da se gornji sloj restauracije, u zoni gleđi zuba, ispunjava dentalnim kompozitom kako bi se iskoristila izvanredna zaptivna i estetska svojstva ovih materijala. U radu Ležaje i autora (2015) pokazano je da inserti na bazi CaP, čiji trofazni sastav čini većinski prisutan HAP i manje količine β -TCP i α -TCP, ostvaruju odličnu vezu sa različitim restaurativnim materijalima. Najjača veza (12,2 MPa) je ostvarena sa Z250 mikrohbridnim Z520 kompozitom vezanim sa adhezivom Single Bond Universal (SBU) prema protokolu totalnog kiselinskog nagrizanja inserata 37% fosfornom kiselinom (TE) [113]. Kiselinski predtretman je inicirao povećanje postojećih i otvaranje novih pora na površini inserta, što je pogodovalo mikromehaničkoj retenciji adheziva SBU. Adheziv aplikovan po samonagrizavajućem protokolu (bez primene kiseline, pri čemu nagrizanje supstrata vrše kiseli monomeri iz sastava samih adheziva) takođe je inicirao otvaranja pora, ali u manjem stepenu u poređenju sa protokolom totalnog nagrizanja.

Kasnije je studija Ayoub i autora (2018) pokazala nešto manje vrednosti jačine veze kompozitnih inserata na bazi HAP i itrijum-stabilisanog ZrO_2 (YSZ) sa komercijalnim materijalima, pri čemu je najviša postignuta vrednost jačine veze sa mikrohbridnim Z250 kompozitom vezanim prema SBU_TE protokolu (Z250_SBU_TE) iznosila 9,3 MPa [115]. Interesantno je da su u ovoj studiji veće vrednosti postignute primenom samonagrizavajućeg protokola (10,5 MPa), ali i tada su vrednosti bile niže u poređenju sa insertima na bazi CaP [113–115].

U radu Ayoub i autora (2020) poređena su svojstva različitih dentalnih inserata na bazi HAP, HAP/YSZ i HAP/TCP gde je najjača veza postignuta u grupi Z250_SBU prema samonagrizavajućem protokolu (Z250_SBU_SE) sa gustim monofaznim HAP insertom i iznosila je 18,5 MPa [114]. Kontrolisano porozni dentalni inserti na bazi HAP/TCP su pokazali jačinu veze sa Z250 kompozitom nanetim prema protokolu SBU_TE 14,3 MPa, odnosno prema protokolu SBU_SE 15,7 MPa. Kiselinski predtretman inserata pre nanošenja Maxcem cementa je značajno ojačao vezu u slučaju

HAP/TCP i HAP/YSZ inserata u ovoj studiji sa 3,7 na 8,2 MPa odnosno sa 3,2 na 7,6 MPa, tim redom navedeno [114]. Razlike u polaznim prahovima, njihovom sastavu i morfologiji su značajno uticale da krajnja svojstva dentalnih inserata i njihovu sposobnost vezivanja sa restaurativnim materijalima.

U master završnom radu Tamare Matić (2018) ispitana je mogućnost procesiranja i jačina veze inserata na bazi CaP dopiranog sa 5 mol.% Mg sintetisanog na 160 °C i pokazano je da se najjača veza ostvaruje sa mikrohibridnim kompozitom Z250 vezanim sa insertom prema SBU_TE protokolu (15,9 MPa), kao i da kiselinsko nagrivanje značajno ojačava vezu sa Maxcem cementom (sa 3,1 na 8,0 MPa), što je u skladu sa rezultatima prethodno pomenutih radova [118].

Jedan od ciljeva ove disertacije jeste ispitivanje mogućnosti procesiranja dentalnih inserata na bazi mono- i binarno dopiranih kalcijum-fosfata jonima Sr^{2+} i/ili Mg^{2+} i poređenje njihovih svojstava i jačine veze sa različitim komercijalno dostupnim restaurativnim materijalima. Dentalni inserti optimalnih svojstava će biti dalje aplikovani u ekstrahove humane molare prema novopredloženom protokolu restauracije kaviteta, a biće ispitana i otpornost na lom tako restauriranih zuba.

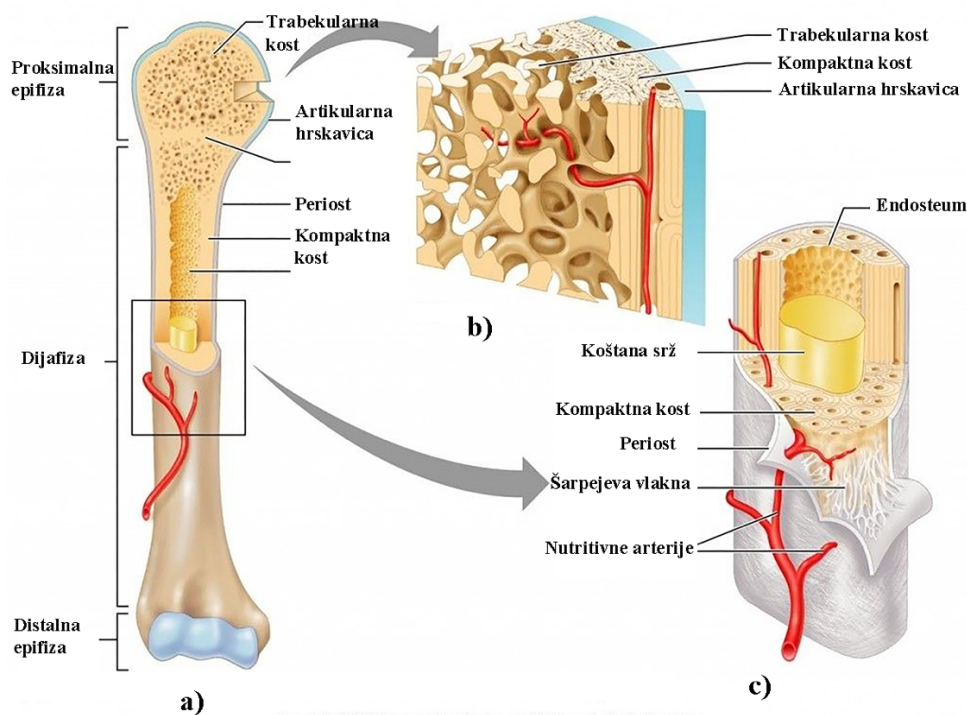
5. Koštano tkivo

5.1. Anatomija i fiziologija koštanog tkiva

Koštano tkivo predstavlja čvrsto vezivno tkivo koje se sastoji od mineralizovanog ekstracelularnog matriksa, kolagena i ćelija. Njegov osnovni zadatak jeste da štiti unutrašnje organe, obezbedi potporu tela i omogući njegovo kretanje tela. Koštano tkivo obezbeđuje sredinu za stvaranje i skladištenje krvnih ćelija i minerala, mesto za koje se vežu mišići i tetive [119]. Kost je prirodni kompozit koji se sastoji od minerala, vode i kolagenog matriksa u kojem su raspoređene koštane ćelije. Najveći deo kosti čine minerali (50-60 mas. %) i organska matrica (30-40 mas. %), dok ostatak predstavlja voda [120]. Osnovnu komponentu koštanih minerala predstavljaju kristali HAP, kao i male količine primesa poput H_3PO_4 , jona Na^+ , Mg^{2+} , K^+ , Cl^- , F^- itd. Organska vlaknasta matrica se sastoji od kolagena tipa I, glikozoaminoglikana i glikoproteina.

Makroskopski gledano, kod zdravog odraslog čoveka razlikuju se dva tipa kostiju: kortikalna i trabekularna. Iako se hemijski sastav kostiju u različitim delovima skeleta ne razlikuje, njihove makroskopske i mikroskopske strukture mogu biti potpuno drugačije, pa s toga i njihove biomehaničke osobine. Kortikalna kost je gusta i kompaktna, većim delom mineralizovana i ima veliku otpornost na savijanje i uvrtnje. Ona čini 80% skeleta i predstavlja spoljašnji omotač svih koštanih struktura, pa tako kod epifize u tankom sloju oblaže trabekularnu kost, a kod diafize okružuje centralnu šupljinu unutar koje je smeštena koštana srž (Slika 7). Uloga kortikalne kosti jeste pre svega da obezbedi dobra mehanička svojstva, ali ona učestvuje i u metaboličkim procesima, pogotovo u slučaju velikog i naglog deficita minerala.

Trabekularna kost je poroznija pa stoga i elastičnija, brže se remodeluje u odnosu na kortikalnu te igra značajniju metaboličku ulogu. Ona takođe doprinosi mehaničkoj stabilnosti, pogotovo kod vertebralnih kosti, a u slučaju akutne deficitarnosti predstavlja izvor minerala [121].



Copyright © 2006 Pearson Education, Inc., publishing as Benjamin Cummings.

Slika 7. Šematski prikaz: a) epifize i dijafize, b) trabekularne. c) kortikalne kosti, adaptirano prema [122]

Ćelije koštanog tkiva čine svega oko 3% zapremine kosti, ali je njihova uloga od izuzetnog značaja za stvaranje, održavanje i remodelovanje kostiju [14]. Po tipu i funkciji ove ćelije mogu biti osteoblasti, osteociti i osteoklasti. Osteoblasti potiču od mezenhimalnih matičnih ćelija (MSC), formiraju i mineralizuju koštani matriks i regenerišu staru kost, i proizvode širok opseg faktora rasta

pod uticajem različitih stimulusa. U osteoblastima se nalaze hormonski receptori, poput insulina, progesterona, prolaktina, hormona rasta i drugih [121].

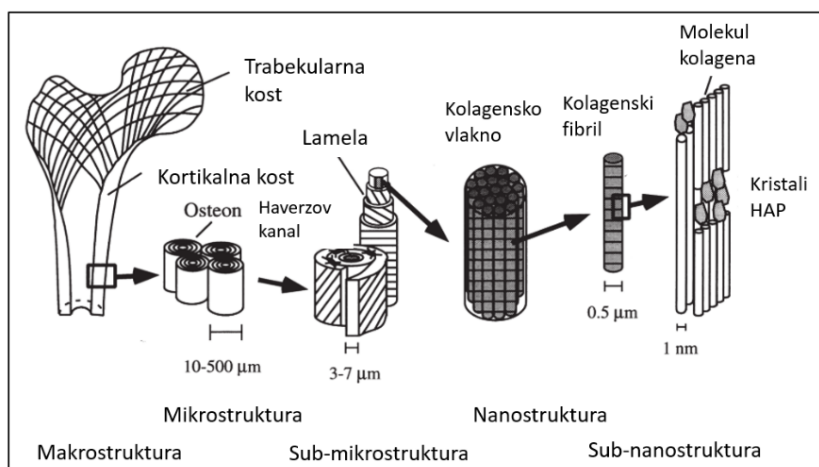
Osteoklasti su velike ćelije odgovorne za odigravanja procesa resorpcije mineralizovanog tkiva, resorbuju kost tako što povećavaju kiselost sredine i vrše proteolizu koštanog matriksa i HAP kristala [121]. Ćelije osteoklasta poseduju izuzetnu aktivnost, te samo jedna ovakva ćelija resorbuje istu količinu kosti, za koju je potrebno čak 100-1000 osteoblasta da izgradi za isti vremenski interval [14]. Osteociti su tipične ćelije koštanog tkiva i predstavljaju osteoblaste koji su zarobljeni u mineralizovanom matriksu. Njihova aktivnost je smanjena i ne učestvuju u remodelovanju kosti, ali proizvode proteine.

Osim koštanih ćelija, u ECM nalaze se i različiti citokini kao što su fibroblastni faktori rasta (FGF), insulinski faktori rasta (IGF), vaskularni endotelni faktori rasta (VEGF), koštani morfogenetički proteini (BMP) i mnogi drugi, koji regulišu metabolizam koštanog tkiva, njegovu funkciju i proces regeneracije koštanog tkiva [123].

Struktura kostiju se može posmatrati kroz:

- Makrostrukturu ($> 500 \mu\text{m}$): kortikalna (kompaktna) i trabekularna (spongiozna) kost
- Mikrostrukturu ($10\text{-}500 \mu\text{m}$): Harversov sistem, osteoni i trabekule
- Sub-mikrostrukturu ($1\text{-}10 \mu\text{m}$): lamele
- Nanostrukturu ($500 \text{ nm} - 1 \mu\text{m}$): kolagenska vlakna
- Sub-nanostrukturu ($1\text{-}500 \text{ nm}$): kolagenske fibrile, molekuli kolagena

Na sub-nano nivou se molekuli kolagena samoorganizuju u fibrile koje su periodično ojačane pločastim apatitnim kristalima (Slika 8). Prosečna veličina HAP kristala je $50 \times 25 \text{ nm}$ i debljine oko $2\text{-}3 \text{ nm}$ [124]. U slobodnom prostoru nalaze se voda i nekolageni proteini poput osteokalcina, koji ima značajnu ulogu u vezivanju jona kalcijuma, stabilizaciji hidroksiapatita u koštanom matriksu i regulaciji stvaranja kosti inhibiranjem prerane ili neodgovarajuće mineralizacije [121]. Osteokalcin povezuje HAP kristale sa kolagenom, tako što se sa jedne strane vezuje za mineral dok sa druge stvara kompleksno jedinjenje sa kolagenom, a na taj način dolazi do mineralizacije kolagenskih fibrila. Impregnacijom mineralizovanih kolagenskih fibrila nastaje snop fibrila tj. kolagensko vlakno, koje dalje formira lamele. Lamele debljine od oko $3\text{-}7 \mu\text{m}$ mogu da se slažu paralelno (trabekularna kost) ili koncentrično oko krvnih sudova čineći Haverzov sistem lamela koji okružuju Harverzove kanale (kortikalna kost). Harverzov kanal sa sistemom Haverzovih lamela čini jedan osteon koji predstavlja jedinicu građe kortikalne kosti. Kod trabekularne kosti struktura se sastoji od otvorene mreže trabekula i ima poroznost veću od 75% [14,124].



Slika 8. Šematski prikaz strukture kostiju od makroskopskog ka nano nivou adaptirano prema [124]

5.2. Procesi osteogeneze i regeneracije

Makroskopski gledano se može učiniti da je skelet statički organ, ali na mikroskopskom nivou on zapravo predstavlja izuzetno dinamično tkivo. Sposobnost kostiju da svakodnevno nose velika opterećenja zavisi od konstantne reparacije mikropukotina koje nastaju u trabekularnoj i u kortikalnoj kosti [125]. Rast, modelovanje i remodelovanje koštanog tkiva predstavljaju tri osnovna procesa razvoja i regeneracije kostiju. Formiranje kosti se odigrava u tri stupnja: stvaranjem i sazrevanjem osteoidnog matriksa i njegovom daljom mineralizacijom. Stvaranje kosti započinje tako što osteoblasti luče kolagen čime se formira osteoid koji zatim mineralizuje [121]. Mineralizacija osteoida se odvija nukleacijom HAP kristala duž kolagenskih vlakana i taloženjem jona na kristale. Tokom faze rasta kost dobija makroskopski izgled.

Modelovanje kosti podrazumeva njeno oblikovanje rastvaranjem jednog dela i stvaranjem drugog dela kosti, sve dok se ne postigne konačni oblik. Modelovanje se javlja u ranoj životnoj dobi kada igra važnu ulogu u formiranju skeleta. Remodelovanje se odigrava tokom celog životnog veka i ima ulogu da prilagodi kosti mehaničkim naprezanjima i ukloni defekte koji se javljaju u strukturi. Na ovaj način se 2-5% kortikalne kosti remodeluje godišnje [121]. Za razliku od modelovanja, remodelovanje je dinamičan fiziološki proces koji podrazumeva razlaganje i stvaranje nove kosti. Proces remodelovanja se odvija u pet faza: 1) aktivacija, 2) resorpcija, 3) preokret, 4) stvaranje i 5) mirovanje [119]. Tokom faze aktivacije dolazi do migracije delimično diferenciranih mononuklearnih preosteoklasta ka površini kosti gde dolazi do formiranja multinuklearnih (aktiviranih) osteoklasta [121]. U fazi resorpcije se aktivirani osteoklasti vezuju za površinu kosti i rastvaraju koštani matriks ostavljajući za sobom šupljine. Tokom faze preokreta završena je resorpcija i mononuklearne ćelije tada obezbeđuju signale neophodne za diferencijaciju matičnih ćelija i kretanje osteoblasta ka šupljinama. U fazi stvaranja osteoblasti luče kolagen, formiraju osteoid koji zatim postepeno mineralizuje čime se na mestu resorbovane kosti stvara nova kost [126]. Nakon što je formirana, nova kost ulazi u stanje mirovanja sve dok se ne inicira sledeći ciklus remodelovanja. Usled starenja i osteoporoze proces remodelovanja se ne odvija u potpunosti, pa se veća zapremina kosti resorbuje nego što se stvori, usled čega dolazi do smanjenja gustine i progresivnog gubitka mase kostiju [127].

Regeneracija defekata nastalih u strukturi koštanog tkiva se vrši procesom remodelovanja. Proces resorpcije kosti traje oko 2 nedelje, faza preokreta oko 4-5 nedelja, dok stvaranje nove kosti može da traje i do 4 meseca [121]. Ovakva regeneracija je uspešna do određene veličine defekta tzv. kritične veličine defekta koja u proseku iznosi 4 cm [128]. U slučaju nastanka oštećenja većih od kritične veličine, vaskularizacija tkiva je ograničena i koštano tkivo ne može da se regeneriše u centralnom delu defekta, te je neophodna hirurška intervencija kako bi se povratila prethodna funkcija kosti. Istraživanja su pokazala da se 150 miliona ovakvih defekata javlja svake godine širom sveta, a obično nastaju usled povrede, infekcije ili lečenja tumora [129].

Trenutno se u kliničkoj praksi defekti kritične veličine saniraju transplatacijom koštanih zamenika – graftova. Uloga koštanih graftova je da premoste defekat i potpomognu proces regeneracije stimulišući rast i razvoj koštanog tkiva [130,131]. Koštano tkivo predstavlja jedno od najčešće transplatiranih tkiva sa preko 4 miliona operacija sprovedenih godišnje širom sveta [8]. Za transplataciju koštanog tkiva moguće je koristiti tkivo samog pacijenta (autograft), tkivo dobijeno od donora (alograft) i tkivo životinjskog porekla (ksenograft). Autograftovi predstavljaju „zlatni standard“ u kliničkoj praksi, a podrazumevaju uzimanje dela kosti pacijenta, najčešće iz ilijačne kosti, i transplataciju na mesto defekta. Autograftovi sadrže sve komponente kosti, između ostalog osteogene ćelije samog pacijenta i osteoinduktivne proteine poput koštanog morfogenetskog proteina 2 (BMP2) koji obezbeđuju optimalne osteogene, osteoinduktivne i osteokonduktivne uslove [132]. Sa druge strane, njihova primena podrazumeva dodatnu hiruršku intervenciju, što komplikuje postoperativni oporavak i povećava bol kod pacijenta. Osim toga, izvor autolognog tkiva kao i njegov oblik i veličina su ograničeni. Alograftovi su koštani zamenici dobijeni od živih donora ili kadavera. Glavna prednost alograftova je u tome što se mogu skladištiti zamrznuti, te su odmah dostupni u

različitim veličinama i oblicima. Mogu biti u formi praha, ljuspica ili cele kosti (masivni alograftovi). Alograftovi imaju manji osteogeni potencijal u poređenju sa autograftovima, a osim toga mogu izazvati imuni odgovor i odbacivanje, kao i potencijalno preneti bolesti. Ksenograftovi se najčešće uzimaju iz goveda i svinja, a koriste se i korali. Odlikuje ih velika dostupnost, odgovarajuća poroznost i mehaničke karakteristike slične nativnoj kosti, ali mogu dovesti do pojave imunog odgovora, kao i neželjenog prenosa zoonoza [132]. Osim toga, njihova primena može predstavljati etički i religijski problem.

Potrebe za regeneracijom defekata koštanog tkiva postaju sve veće, a problemi koji se javljaju u trenutnoj kliničkoj praksi prilikom transplatacije koštanih graftova poput ograničenog izvora tkiva, pojave imunološkog odgovora, odbacivanja transplatata, mogućnosti prenosa bolesti i dr. i dalje ostaju neprevaziđeni. Primena autograftova, iako trenutno predstavlja „zlatni standard“, zahteva nekoliko hirurških intervencija koje smanjuju kvalitet života pacijenta i povećavaju verovatnoću pojave post-operativnih infekcija [132].

5.3. Makroporozni nosači za regeneraciju koštanog tkiva

Poslednjih decenija istraživanja u oblasti regeneracije koštanog tkiva su usmerena ka inženjerstvu koštanog tkiva (*eng. bone tissue engineering, BTE*) koje podrazumeva kultivaciju tkiva u laboratoriji, gajenjem ćelija na makroporoznim nosačima (*eng. scaffold, skafold*) u biološki aktivnoj sredini koju obezbeđuje bioreaktor. Kao rezultat treba da se dobije tkivo koje po sastavu, strukturi i morfologiji odgovara prirodnom tkivu, a nakon implementacije se integriše u okolno tkivo i vrši odgovarajuću funkciju. Svojstva idealnog nosača za BTE uključuje biokompatibilnost, kontrolisanu biodegradabilnost, osteokonduktivnost i osteoinduktivnost, adekvatnu poroznost sa međupovezanim porama i odgovarajućim mehaničkim svojstvima [8,133].

Od izuzetne važnosti je da i nosač i produkti njegovog razlaganja budu biokompatibilni tj. da su netoksični prema ćelijama i da ne dovode do nekontrolisanog imunog odgovora organizma. Površina nosača treba da bude pogodna za adheziju ćelija, njihovu proliferaciju i osteogenu diferencijaciju. Bioaktivnost nosača omogućava njegovu interakciju i vezivanje sa nativnim tkivom. Za uspešnu regeneraciju koštanog tkiva poželjno je da nosač poseduje osteokonduktivna i osteoinduktivna svojstva. Osteokonduktivna svojstva nosača omogućavaju adheziju i rast osteoblasta i formiranje ekstracelularnog matriksa na površini i u porama nosača, a osteoinduktivnost je sposobnost nosača da indukuje diferencijaciju matičnih ćelija u osteoblaste [134].

Nosači nisu namenjeni da ostanu u organizmu već da potpomognu ćelije domaćina da lakše deponuju ECM koji će vremenom zameniti nosač, te je neophodno da nosač bude biodegradabilan i da se kontrolisano resorbuje u organizmu sličnom brzinom kojom se formira nova kost. Ukoliko bi nosač previše brzo degradirao, došlo bi do njegovog loma i ne bi više predstavljao mehaničku potporu za regeneraciju tkiva. Sa druge strane, ukoliko ne bi degradirao dovoljno brzo, moglo bi da dođe do inflamatornog procesa usled prisustva stranog tela, što bi ugrozilo regeneraciju tkiva [8,135]

Poroznost nosača za inženjerstvo koštanog tkiva treba da bude slična poroznosti trabekularnoj kosti, sa optimalnom veličinom pora između 100-500 μm . Veličina pora treba da bude takva da se omogući adhezija i rast ćelija, difuzija kiseonika i nutrienata u tkivo, difuzija nusproizvoda iz tkiva, kao i vaskularizacija tkiva. Sa smanjenjem veličine pora, specifična površina nosača raste usled čega i broj ćelija koji može da adherira. Međutim, ako su pore suviše male, ćelije ne mogu da migriraju u unutrašnjost nosača, pa je smanjena njihova adhezija za nosač. Povećana makroporoznost nosača podstiče angiogenezu *in vivo*, dok određeni udeo mikroporoznosti (pore manje od 10 μm) može da poboljša interakciju ćelija sa nosačem, te je najbolje da nosač poseduje kombinaciju makro- i mikropora [8]

Nosač za inženjerstvo koštanog tkiva treba da ima mehanička svojstva približna nativnoj kosti u koju će se implementirati. Elastični biomaterijali koji imaju Jungov moduo elastičnosti manji

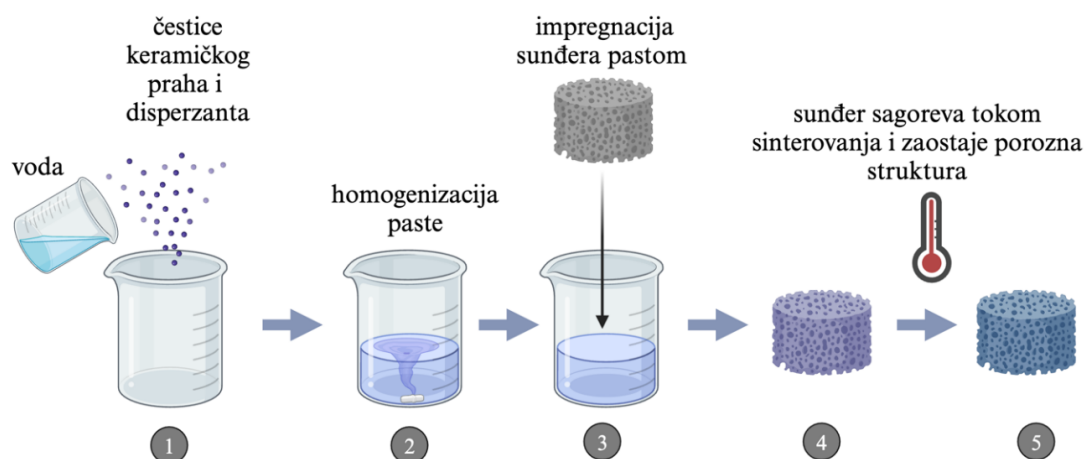
u odnosu na nativnu kost mogu da se koriste samo za regeneraciju koštanih defekata koji nisu pod opterećenjem, jer ako bi se mehanički opteretili vršili bi pritisak na okolno koštano tkivo, usled čega bi došlo do prekomerne osifikacije. Sa druge strane, biomaterijali koji imaju veći Jungov moduo elastičnosti od nativne kosti preuzimaju svo opterećenje na sebe i ćelije koštanog tkiva nisu mehanički stimulirane zbog čega dolazi do resorpcije kosti i olablivanja implantata [136]. Treba napomenuti i da nosač treba da bude takav da omogućí lako rukovanje prilikom implantacije, kao i da dati nosač može da se oblikuje u različite veličine i forme, kako bi se prilagodio individualnim potrebama pacijenata. Međutim, treba napomenuti da mehanička stabilnost nosača opada sa povećanjem poroznosti, te da nije jednostavno postići odgovarajuća mehanička svojstva i zadovoljavajuću poroznost.

U zavisnosti od vrste materijala i željene strukture makroporoznog nosača, razne tehnike izrade nosača se mogu koristiti poput elektrospininga, liofilizacije, metode replike sunđera, tehnike izluživanja čestica, faznog razdvajanja i različitih metoda 3D štampe. U ovoj disertaciji će makroporozni nosači ćelija na bazi kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla biti procesirani metodom replike sunđera, dok će kompozitni nosači na bazi sintetskog polimera i kalcijum-fosfatnih čestica biti procesirani metodom 3D štampe.

5.3.1. Metoda replike sunđera

Metoda replike sunđera predstavlja jednostavnu tehniku za procesiranje keramičkih formi visoke poroznosti (70-90%) sa međusobno povezanim otvorenim porama [137,138]. Ova metoda se bazira na oblaganju zidova pora sunđera pastom i naknadnim sagorevanjem sunđera tokom procesa sinterovanja, na čijem mestu zaostaje poroznost. Makroporozna struktura ovako dobijenih nosača direktno zavisi od poroznosti korišćenog sunđera, dok mikrostruktura zavisi od denzifikacije i eliminisanja mikroporoznosti tokom procesa sinterovanja. Postupak je šematski prikazan na Slici 9.

Za pripremanje paste neophodno je pored rastvarača i čestica koristiti i aditive poput vezivnog sredstva i disperzanta, kako bi se uspešno stabilisala i postigla odgovarajuća reologija za ravnomernu impregnaciju sunđera. Višak paste se uklanja nežnim istiskivanjem suspenzije iz nosača, rastvarač eliminiše sušenjem, dok sunđer i polimerni aditivi sagorevaju u procesu sinterovanja. Kako ne bi došlo do urušavanja strukture ili paljenja sunđera tokom visokotemperaturnog procesa, neophodno je da se proces sinterovanja sprovede u dva stupnja, prvi u kome dolazi do sagorevanja sunđera pri sporom zagrevanju (300-700 °C), i drugi brži stupanj koji ide do temperature sinterovanja čestica polaznog materijala (700-1500 °C).



Slika 9. Postupak dobijanja makroporoznog nosača metodom replike sunđera (pripripremljeno korišćenjem aplikacije BioRender.com)

Osnovna prednost ove metode za dobijanje makroporoznih nosača ćelija je to što nije potrebna nikakva specifična oprema za dobijanje nosača visoke poroznosti, niska cena suđera i jednostavnost postupka. Najveći trošak se odnosi na visokotemperaturni tretman koji je nezaobilazan deo procesiranja keramičkih materijala. Pored osnovnih struktura, metodom replike suđera može se dobiti i nosač sa hijerarhijskom poroznosti korišćenjem pored suđera i određenih surfaktanta čime se postiže dobijanje nosača sa makro- i mezoporama. Mana ove tehnike jeste nedovoljna reproduktivnost i velika zavisnost kvaliteta od operatera, pa je onemogućena standardizacija procesa i uniformnost svojstava, što otežava komercijalizaciju nosača dobijenih ovom metodom [137].

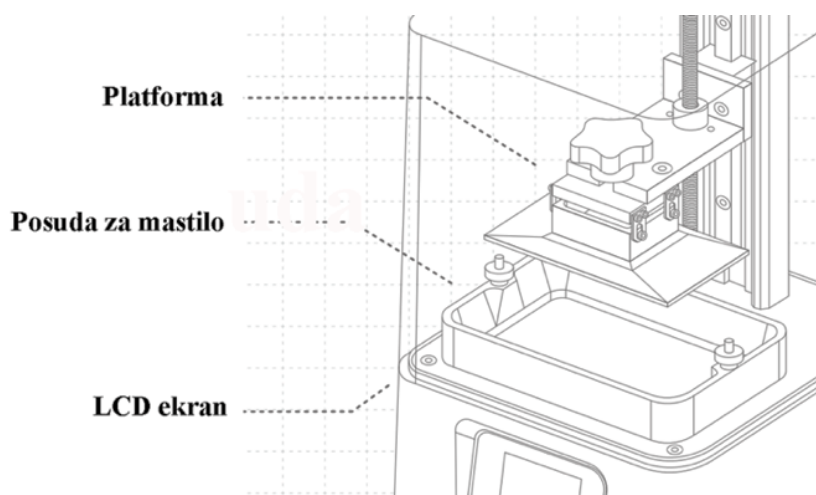
5.3.2. 3D štampa

Za razliku od metode replike suđera, 3D štampa omogućava preciznu kontrolu postupka procesiranja nosača, čime se omogućava visoka reproduktivnost. Željeni oblik i struktura nosača se mogu dizajnirati u specifičnim programima za dizajn modela (*eng. computer aided design, CAD*) koji se pomoću posebnih programa za sečenje 3D modela (*eng. slicer*) raščlanjuju na pojedinačne 2D slojeve koje 3D štampač štampa sloj po sloj [139,140].

Različite tehnike 3D štampe mogu da se koriste za dobijanje makroporoznih nosača ćelija. Za dobijanje nosača na bazi bioaktivne keramike ili kompozita najčešće se koristi metoda ekstruzije [141–144] gde se materijal u obliku paste istiskuje kroz špic sloj po sloj, ali ovu metodu odlikuje nizak stepen preciznosti štampe, zbog čega je ograničena na jednostavne oblike. 3D štampa polimerizacijom smole iz posude (*eng. VAT polimerization, VAT*) omogućava visoku preciznost štampe sa mogućnošću dizajniranja arhitekture nosača sa međupovezanim porama, precizno kontrolišući oblik i veličinu pora [145,146]. Osim toga, ova metoda omogućava dizajniranje kompleksnih modela koji simuliraju prvobitnu anatomsku strukturu koja idealno odgovara defektu pacijenta, omogućavajući personalizovani pristup [139,147]. Primena ove metode se zasniva na fotopolimerizaciji, pa se moraju koristiti svetlosno osetljivi polimeri (fotopolimeri) u tečnoj fazi i fotoinicijator. Podvrste VAT 3D štampe predstavljaju stereolitografija (*eng. stereolithography, SLA*), mask-stereolitografija (*eng. mask-stereolithography, mSLA*) i digitalno svetlosno štampanje (*eng. digital light processing, DLP*).

Mask-stereolitografija je tehnika 3D štampe koja kombinuje principe stereolitografije i projekcionih maski za selektivno očvršćevanje fotopolimera. Za razliku od stereolitografije koja koristi laserski snop za selektivno očvršćevanje tečnog fotopolimera metodom sloj po sloj, mSLA metoda koristi digitalnu projekcionu masku da bi selektivno osvetlila i očvrstnula čitav sloj odjednom, usled čega je process značajno brži. LCD ekran se koristi kao izvor UV svetlosti, a unapred zadate maske definišu oblasti koje će biti osvetljene odnosno koje će očvrstnuti. Ova tehnologija radi po sličnom principu kao DLP metoda, ali se suštinski razlikuju po načinu na koji projektuju svetlost. Dok DLP koristi uređaj sa mikroogledalima za reflektovanje svetlosti, mSLA koristi LCD ekran.

Na Slici 10 je dat šematski prikaz jednog mSLA 3D štampača i njegovih delova.



Slika 10. Šematski prikaz delova mSLA 3D štampača Phrozen Sonic Mini 4K (uputstvo proizvođača)

Fotopolimerizujuće „mastilo“ (fotopolimer ili smola) odgovarajuće reologije stoji u posudi sa providnim dnom tako da LCD ekran osvetljava unapred zadate maske. Platforma se spušta do zadate visine sloja (h), kada započinje ostvetljavanje sloja UV zracima. Kada se završi osvetljavanje sloja, platforma se podiže da dozvoli mastilu da ponovo popuni dno posude, a zatim se platforma opet spušta, i na prethodno očvrstnutom sloju očvršćava sledeći sloj. Na ovaj način se dobija 3D zadati oblik metodom sloj po sloj pri čemu je štampani predmet zakačen naopačke za platformu, zbog čega je potrebno da se ostvarili dobra adhezija za platformu, kako ne bi odštampani oblik pao. Osnovni parametri koji se podešavaju za dobijanje precizne štampe jesu: visina sloja (h) koji se prosvetljava i vreme izlaganja pojedinačnog sloja UV zracima (t) i vreme izlaganja donjih slojeva (t_{bott}).

Poslednjih godina se sve više razvija 3D štampa kompozitnih, ali i keramičkih nosača VAT metodom [145,146,148]. U slučaju keramičkih nosača, keramičke čestice (najčešće kalcijum-fosfati ili cirkonijum-dioksid) se umešavaju sa fotopolimerom da naprave kompozitno „mastilo“, a 3D štampani oblik se dalje sinteruje kako bi se eliminisala polimerna faza. Kompozitni nosači ćelija se za razliku od keramičkih dobijaju odmah procesom 3D štampe bez naknadnog termičkog tretmana, a prisustvo polimerne faze pozitivno utiče na mehanička svojstva.

III Ekperimentalne metode

U ovom delu disertacije obuhvaćene su: 1) metode sinteze nanočestica na bazi dopiranih kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla, 2) optimizacija njihovog sastava i parametara sinteze, 3) postupci procesiranja kompakata kontrolisane poroznosti i makroporoznih nosača ćelija, kao i 4) metode karakterizacije dobijenih materijala za primenu u biomedicini. Karakterizacija je podrazumevala ispitivanje fizičko-hemijskih, mehaničkih i bioloških svojstava dobijenih materijala u skladu sa njihovom potencijalnom primenom: u stomatologiji u vidu dentalnih inserata i u inženjerstvu košanog tkiva kao makroporoznih nosača ćelija za stimulisanu regeneraciju koštanih defekata.

6. Sintaza nanočestica kalcijum-fosfata dopiranih jonima Sr^{2+} i/ili Mg^{2+}

Nanočestični prah kalcijum-hidroksiapatita nedopiran i dopiran jonima magnezijuma i/ili stroncijuma je sintetisan modifikovanom hidrotermalnom metodom [149–152]. Početni rastvor je napravljen sukcesivnim rastvaranjem sledećih reageanasa u 1,5 L dejonizovane vode: $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (>99%, Thermo Fisher Scientific, SAD), $\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, Acros Organics, Španija), $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ($\geq 99\%$, Acros Organics, Španija), urea ($\geq 99.5\%$, Acros Organics, Nemačka), $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98-102%, Carlo Erba, Francuska) i/ili $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ($\geq 99\%$, Acros Organics, Nemačka).

Optimizacija sadržaja dopanata u odnosu na jone kalcijuma je ispitana u opsegu 3-6 mol.% Mg i 1-5 mol.% Sr, tj. ukupna količina dopanata kod binarno dopiranog HAP je iznosila 5-11 mol.%. Kod monodopiranog HAP jonima stroncijuma odabran je sastav od 5 mol.%. Nominalni molski odnos $(\text{Ca} + \text{Sr} + \text{Mg})/\text{P}$ je bio stehiometrijski Ca/P odnos za HAP koji iznosi 1,67. Sastav početnih rastvora za hidrotermalnu sintezu za pojedinačne uzorke je dat u Tabeli 2a i Tabeli 2b. Nakon potpunog rastvaranja svih komponenti, početni rastvor je hidrotermalno tretiran u trajanju od 3 h. Svi uzorci su sintetisani na 150 °C i pritisku od 6 bar, dok su odabrani uzorci cHAP, Mg5 i Sr1Mg5, sintetisani i na višim temperaturama tj. 150, 160, 170 i 180 °C (pritisku 6, 8, 10 i 12 bar), a Sr3Mg3 na 150 °C i 160 °C radi određivanja uticaja parametara hidrotermalne sinteze na sastav i svojstva sinterovanih materijala kod mono- i binarno dopiranog kalcijum-hidroksiapatita. Dobijene čestice su izdvojene vakuum filtracijom, isprane sa 0,5 L dejonizovane vode i 5 h sušene na 105 °C.

Tabela 2a. Sastav početnih rastvora za hidrotermalnu sintezu hidroksiapatitnih prahova bez dopanata (cHAP) i monodopiranih jonima Sr^{2+} ili Mg^{2+}

Uzorak	cHAP	Sr5	Mg5
Količina dopanata	/	5 mol.% Sr	5 mol.% Mg
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [g]	11,80	11,22	11,22
$\text{Na}_2\text{H}_2\text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [g]	11,18	11,18	11,18
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ [g]	4,68	4,68	4,68
Urea [g]	12,00	12,00	12,00
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [g]	/	/	0,641
$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ [g]	/	0,529	/

Tabela 2b. Sastav početnih rastvora za hidrotermalnu sintezu hidroksiapatitnih prahova binarno dopiranih jonima Sr^{2+} ili Mg^{2+}

<i>Uzorak</i>	<i>Sr1Mg5</i>	<i>Sr3Mg3</i>	<i>Sr5Mg3</i>	<i>Sr5Mg4</i>	<i>Sr5Mg5</i>	<i>Sr5Mg6</i>
<i>Količina dopanata</i>	1 mol.% Sr	3 mol.% Sr	5 mol.% Sr	5 mol.% Sr	5 mol.% Sr	5 mol.% Sr
	5 mol.% Mg	3 mol.% Mg	3 mol.% Mg	4 mol.% Mg	5 mol.% Mg	6 mol.% Mg
<i>Ukupna količina dopanata</i>	6 mol.%	6 mol.%	8 mol.%	9 mol.%	10 mol.%	11 mol.%
<i>Ca(NO₃)₂·4H₂O [g]</i>	11,10	11,10	10,86	10,74	10,62	10,51
<i>Na₂H₂EDTA·2H₂O [g]</i>	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18	11,18
<i>NaH₂PO₄·2H₂O [g]</i>	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68	4,68
<i>Urea [g]</i>	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00	12,00
<i>Mg(NO₃)₂·6H₂O [g]</i>	0,641	0,385	0,385	0,513	0,641	0,769
<i>Sr(NO₃)₂ [g]</i>	0,106	0,317	0,529	0,529	0,529	0,529

7. Sinteza nanočestica mezoporoznog bioaktivnog stakla dopiranog Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima

Za sintezu mezoporoznog nanočestičnog bioaktivnog stakla modifikovana je poznata mikroemulziona sol-gel tehnika [44,153], ultrazvučnim talasima velike energije. Aparatura za sintezu prikazana je na Slici 11. Primena ultrazvuka dovodi do akustične kavitacije, formiranja, rasta i pucanja mehurića usled čega je ubrzana inicijacija reakcije [154]. Kao surfaktant i mezoporozni strukturni agent čijim sagorevanjem nastaje mezoporozna struktura korišćen je cetiltrimetilamonijum-bromid (CTAB, $\geq 99\%$, Sigma Aldrich, SAD).



Slika 11. Aparatura za sintezu MBAG nanočestica

Ukratko, 7,0 g CTAB je rastvoreno u 330 mL dejonizovane vode na temperaturi 30 ± 2 °C. Kada je rastvor postao providan 100 mL etil-acetata ($\geq 99,5\%$, Fisher Chemical, Belgija) je ukapano

brzinom 40 kapi/min i mešano još 30 min. Nakon toga je primenjena ultrazvučna sonda energije 1 000 000 J u trajanju od 30 min u pulsirajućem režimu (10/10 s) uz simultano mešanje i hlađenje u vodenom kupatilu, vodeći računa da se održava temperatura od 30 ± 2 °C. Pomoću amonijaka (28-30 mas.% $\text{NH}_3/\text{H}_2\text{O}$, *Acros Organics*) je podešena $\text{pH} = 10,50 \pm 0,20$ (3,5 mL) i mešano 15 min, nakon čega je 30,8 mL tetraetil ortosilikata (*TEOS*, $\geq 99\%$, *Sigma Aldrich*, *SAD*) ukapano brzinom 40 kapi/min uz neprestano mešanje. Kada je završeno ukapavanje nastavljeno je mešanje još 30 min pre nego što su dodate odgovarajuće soli redom na po 30 min razmaka: u slučaju nedopiranog stakla (*cBAG*) dodat je samo kalcijum-nitrat tetrahidrat $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ($>99\%$, *Thermo Scientific*, *SAD*), dok su u slučaju stakla dopiranog jonima stroncijuma i magnezijuma (*SrMgBAG*) dodati i magnezijum-nitrat heksahidrat $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (98-102%, *Carlo Erba*, *Francuska*), i anhidrovani stroncijum-nitrat $\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ ($\geq 99\%$, *Acros Organics*, *Nemačka*).

Količine dodatih soli date su u Tabeli 3. Nakon dodavanja poslednje soli, mešanje je nastavljenotokom 4 h. Kako bi se odvojio talog korišćena je centrifuga (*Hermle Z206A*) na 6000 rpm u trajanju od 15 min, nakon čega je talog ispiran 3 puta (2 puta dejonizovanom vodom i jednom 96% alkoholom) u trajanju od po 5 min, na 6000 rpm. Isprani gel je ostavljen da se suši 10 h na 60 °C, a zatim kalcinisan na 600 °C u trajanju od 5 h, pri sporom zagrevanju brzinom od 2 °C/min.

Tabela 3. Dodate količine soli prilikom sinteze mezoporoznog bioaktivnog stakla

<i>Uzorak</i>	<i>$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ [g]</i>	<i>$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ [g]</i>	<i>$\text{Sr}(\text{NO}_3)_2$ [g]</i>
<i>cBAG</i>	58,82	/	/
<i>SrMgBAG</i>	40,00	6,40	8,80

8. Procesiranje kontrolisano poroznih kompakata i makroporoznih nosača

8.1. Procesiranje kontrolisano poroznih kompakata na bazi kalcijum-fosfata

Kontrolisano porozni kompakti su dobijeni dvostepenim presovanjem sintetisanih prahova kalcijum-fosfata u cilindrične polazne kompakte i njihovim sinterovanjem. Korišćenjem kalupa od nerđajućeg čelika uniaksijalno su ispresovani cilindrični oblici $\varnothing 6$ mm, $h = 2$ mm na 100 MPa, a zatim su dodatno izostatski presovani na 400 MPa primenom hladne izostatske prese (*CIP-15*, *MTI Corporation*, *SAD*). Ispresci su dalje sinterovani na 1200 °C u trajanju od 2 h u visokotemperaturnoj peći (*Elektron*, *Srbija*).

8.2. Procesiranje makroporoznih nosača ćelija metodom 3D štampe

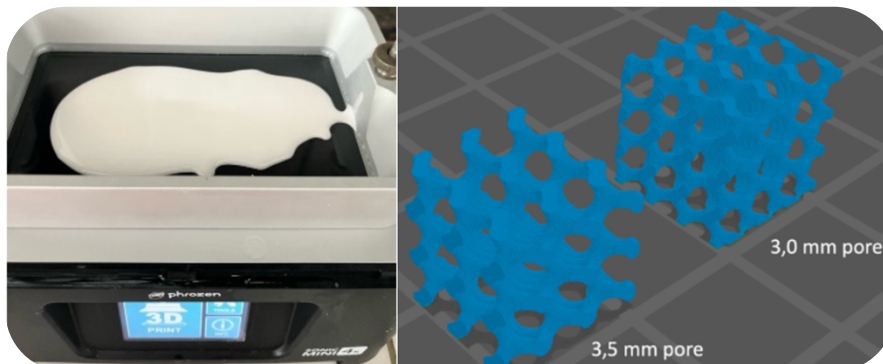
3D štampač koji radi po principu mask-stereolitografije (*mSLA*, *Phrozen Sonic Mini 4K*, *SAD*) je korišćen za dobijanje polimernih i kompozitnih makroporoznih nosača ćelija na bazi hidrogela poli(etilenglikol) diakrilata (*PEGDA*, $M_n = 700$, *Sigma Aldrich*, *SAD*) i čestica Sr_3Mg_3 kalcinisanih na 1000 °C u trajanju od 4 h.

8.2.1. Priprema “mastila” za 3D štampu

Polimerni rastvor sastava 70 mas.% *PEGDA* i 30 mas. % H_2O (naznačen kao *PEGDA70*), sa 0,5 mas.% fotoinicijatora *TPO* (eng. *diphenyl(2,4,6-trimethylbenzoyl)phosphine oxide - TPO*, *Sigma Aldrich*, *SAD*) u odnosu na količinu *PEGDA* je korišćen kao osnovno „mastilo“ za štampu. Biokompozitna „mastila“ na bazi Sr_3Mg_3 i *PEGDA* (uzorak obeležen kao $\text{Sr}_3\text{Mg}_3/\text{PEGDA}$) su pripremljena tako što su u *PEGDA70* „mastilo“ dodate kalcinisanе čestice Sr_3Mg_3 (20 mas.% Sr_3Mg_3 u odnosu na masu *PEGDA70*) i poli(etilenglikol) (*PEG*) kao disperzant (2 mas.% u odnosu na masu praha)

8.2.2. 3D štampa

Optimizacija parametara 3D štampe PEGDA mastila i kompozitnog mastila $\text{Sr}_3\text{Mg}_3/\text{PEGDA}$ je vršena variranjem visine sloja h [μm] i vremena ekspozicije UV zračenja t [s]. Za 3D štampu makroporoznog nosača ćelija korišćen je dizajn kocke sa otvorenom poroznošću (Slika 12).



Slika 12. $\text{Sr}_3\text{Mg}_3/\text{PEGDA}$ mastilo u 3D štampaču i dizajn makroporoznog nosača ćelija sa različitim veličinama pora

8.3. Procesiranje makroporoznih nosača ćelija tehnikom replike sundera

Makroporozni nosači ćelija dobijeni su metodom replike sundera, infiltriranjem paste u pore sundera i njegovim naknadnim uklanjanjem [155]. Paste su pripremljene mešanjem 30 mas.% praha, 3 mas.% polivinil alkohola (PVA, $M_w = 9-10\ 000$, 80% hidrolizovan, Sigma Aldrich, SAD) kao disperzanta i 67 mas. % dejonizovane vode. Za pripremu pasti korišćeni su prahovi cHAP i Sr_3Mg_3 sintetisani hidrotermalno na $160\ ^\circ\text{C}$, i dalje kalcinirani na $1000\ ^\circ\text{C}$ u trajanju od 4 h, i čestice cBAG i SrMgBAG.

Četiri različite paste i odgovarajući makroporozni nosači su pripremljeni:

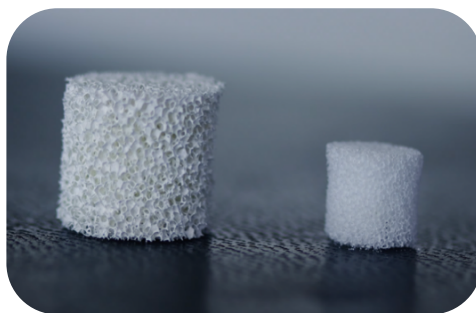
1. CaP (100 mas.% kalc cHAP)
2. SrMgCaP (100 mas.% kalc Sr_3Mg_3)
3. BAG (90 mas.% kalc Sr_3Mg_3 + 10 mas. % cBAG)
4. SrMgBAG (90 mas. % kalc Sr_3Mg_3 + 10 mas.% SrMgBAG)

Prvo je 0,1 g PVA rastvoreno u dejonizovanoj vodi na $80\ ^\circ\text{C}$, a zatim je 1 g kalcinisanog praha cHAP ili Sr_3Mg_3 umešan i ultrazvučno tretiran 2 min kako bi se dobila uniformna pasta. Za pripremu kompozitnih skafolda na bazi kalcijum-fosfata i MBAG, prvo su ultrazvučno deaglomerisane čestice MBAG u rastvoru PVA, pa tek onda dodat kalcinirani prah Sr_3Mg_3 , umešan i ultrazvučno tretiran još 2 min kako bi se dobila uniformna pasta.

Poliuretanski sunderi cilindričnog oblika prečnika i visine 10 mm su natopljeni pastom, višak je uklonjen, nosači osušeni na sobnoj temperaturi u trajanju od 48 h i dalje sinterovani u dva stupnja:

- i) Sporo zagrevanje brzinom $2\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ do $750\ ^\circ\text{C}$ i zadržavanje 20 min radi sporog sagorevanja sundera bez urušavanja strukture, i
- ii) Brzo zagrevanje brzinom $10\ ^\circ\text{C}/\text{min}$ do 1350 ili $1400\ ^\circ\text{C}$ i zadržavanje od 2 h radi denzifikacije strukture

Na Slici 13 prikazan je izgled makroporoznog nosača pre i posle sinterovanja.



Slika 13. Makroporozni nosač ćelija pre i posle sinterovanja

U cilju dodatnog ojačanja SrMgCaP nosača, pripremljena je i nanešena biokompozitna prevlaka na bazi želatina i nanočestica SrMgBAG. Suspenzija je napravljena tako što su čestice SrMgBAG ultrazvučno dispergovane u dejonizovanoj vodi pri koncentraciji 1 mas.%, nakon čega je suspenzija zagrejana na 60 °C i u njoj rastvoren želatin (želatin od goveđe kože tip B, Sigma Aldrich, SAD) (2 mas.%) i potom dodatno homogenizovana na mešalici tokom 1 h na 60 °C. Zatim su SrMgCaP nosači potopljeni u dobijenu suspenziju tokom 3 h i ohlađeni u frižideru tokom narednih 24 h.

9. Metode karakterizacije nanočestica, kompakata kontrolisane poroznosti i makroporoznih nosača

9.1. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija nanočestica kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla, određena je pomoću skenirajuće elektronske mikroskopije (FE-SEM, Tescan Mira 3 XMU) pri radnom naponu od 20 keV. Srednja veličina čestica MBAG je određena pomoću Image-J softverske analize 200 čestica sa FE-SEM mikrografija (100 kx uvećanje).

Pomoću FE-SEM je takođe određena mikrostruktura preseka i površine sinterovanih kompakata. Srednja veličina pora i srednja veličine zrna kompakata određena je na osnovu dobijenih mikrografija ispoliranih termički nagriženih uzoraka (1100 °C tokom 15 min), pri čemu je za određivanje srednje veličine zrna izmereno 100 zrna, dok je srednja veličina pora određena na osnovu merenja dimenzija pora na 3 nasumično odabrana mesta na uzorku pri uvećanju od 10 kx puta.

Kod ispitivanja potencijalne primene kontrolisano poroznih kompakata u stomatologiji u vidu dentalnih inserata, FE-SEM je korišćen za analizu izgleda površine i poprečnog preseka inserata pre i nakon nagrizanja 37% fosfornom kiselinom, kao i poprečnog preseka veze inserta sa dentalnim restaurativnim materijalima. Longitudinalni presek restauriranih zuba primenom novopredloženog postupka korišćenjem dentalnih inserta je analiziran pomoću FE-SEM kako bi se utvrdila interakcija inserta sa cementom sa jedne strane, i inserta sa adhezivom i kompozitom sa druge. Za dobijanje longitudinalnog preseka je korišćena testera (*Isomet 4000, Buehler, Illinois, SAD*).

Kod utvrđivanja *in vitro* bioaktivnosti uzoraka, FE-SEM je korišćen za analizu površine čestica ili nosača ćelija radi utvrđivanja bioaktivnosti tj. sposobnosti formiranja karakterističnih kristala hidroksiapatita.

FE-SEM je takođe korišćen i za analizu strukture makroporoznih nosača ćelija, kao i interakcije ćelija sa materijalom, njihovom sposobnosti da adheriraju za zidove nosača i da se međusobno povezuju kroz pore nosača. Nosači sa ćelijama su isprani PBS-om (*phosphate buffered saline, PBS*), ćelije su fiksirane 2,5% glutaraldehidom na 4 °C preko noći, isprane PBS-om i sukcesivno dehidrirane pomoću niza rastvora etanola povećavajući sadržaj etanola (30%, 50%, 70%, 90% i 100% dva puta) u trajanju od 30 min. Nakon toga su tretirani heksametil-disilazanom (HMDS)

tokom 30 min i osušeni. Pre analize svi uzorci su napareni tankim slojem zlata koristeći naparivač (*Polaron SC503, Fisions Instruments*).

9.2. Energetska disperzivna spektroskopija (EDS)

Elementni sastav dobijenih prahova i kompakata ispitan je pomoću detektora za energetske disperzione spektroskopije (*EDS, INCa Penta FETx-3, Velika Britanija*) povezanog sa SEM (*Tescan Vega TS 5130MM, Češka*). Rezultati EDS analize su prikazani kao srednja vrednost at.% elemenata i predstavljaju srednju aritmetičku vrednost 4 merenja pri radnom naponu od 20 keV i uvećanju od 1000x. Elementno mapiranje makroporoznih nosača ćelija je izvršeno pomoću EDS detektora (*EDS, Oxford Instruments 5175, Velika Britanija*) povezanog na FE-SEM mikroskopom (*Tescan Mira 3 XMU, Češka*) pri radnom naponu od 20 keV.

9.3. Transmisiona elektronska mikroskopija sa EDS

Uticaj dopanata na morfologiju i mezoporoznost čestica bioaktivnog stakla ispitan je pomoću transmisione elektronske mikroskopije (*TEM, FEI Talos F200X sa X-FEG izvorom, SAD*) pri radnom naponu od 200 kV. Mikrografije su snimljene pomoću CCD kamere rezolucije 4096×4096 piksela korišćenjem *User Interface Software* paketa. Raspored elemenata u nanočesticama je utvrđen EDS mapiranjem pomoću detektora povezanog sa TEM uređajem u režimu transmisije skeniranja (*eng. scanning transmission, STEM*). Snimci prstenastog tamnog polja pod velikim uglom (*eng. high-angle annular dark-field, HAADF*) su zabeleženi u režimu snimanja *nanoprobe-TEM* sa sondom veličine ispod 1 nm i kamerom dužine oko ~200 mm. Pre snimanja, uzorci za TEM analizu su pripremljeni standardnom procedurom gde je prah MBAG dispergovan u etanolu, a zatim je kap disperzije nanešena na bakarnu TEM mrežicu obloženu ugljenikom i osušena na vazduhu.

9.4. Rendgenska difrakciona analiza

Kristaliničnost i fazni sastav sintetisanih prahova, kalciniranih prahova, sinterovanih kompakata i makroporoznih nosača ćelija utvrđen je pomoću rendgenske difrakcione analize (XRD). XRD analiza uzoraka je urađena na Rigaku Smartlab difraktometru sa $\text{CuK}\alpha$ zračenjem ($1.54 \text{ \AA}$) pri 2θ uglu od 10° do 70° i brzini snimanja od $0.02^\circ \text{ s}^{-1}$. Prisutne faze su identifikovane poređenjem dobijenih difraktograma sa karticama iz referentne baze podataka JCPDS (*eng. Joint Committee on a Powder Diffraction Standards*): JCPDS 09-0432, JCPDS 09-0169, JCPDS 09-0348 za HAP, β -TCP, i α -TCP redom.

Za identifikaciju i kvantifikaciju faza, kao i za strukturno određivanje parametara jedinične rešetke, naprezanja i veličine kristalita korišćeni su softverski paketi Profex 5.2 i PowderCell, tim redom. Veličina kristalita kod β -TCP and α -TCP faza su određene za sve ravni, dok je kod HAP određeno za ravan (211) gde je pik najintenzivniji. Za poređenje parametara jedinične kristalne rešetke, sledeće teorijske vrednosti su korišćene za HAP rešetku: $a=b=9,424(4) \text{ \AA}$, $c=6,879(4) \text{ \AA}$, za β -TCP rešetku: $a=b=10,429(2) \text{ \AA}$, $c=37,380(3) \text{ \AA}$ i za α -TCP: $a=12,887 \text{ \AA}$, $b=27,280 \text{ \AA}$, $c=15,219 \text{ \AA}$, $\beta=126^\circ$.

9.5. Specifična površina i mezoporoznost

Specifična površina MBAG je određena pomoću adsorpcije azota na temperaturi tečnog azota (*Micromeritics ASAP 2020, Micromeritics Instruments, SAD*) i izračunata prema Brauner-Emet-Teller metodi (BET) na osnovu linearnog dela izoterme adsorpcije azota [156]. Ukupna zapremina pora (V_{tot}) je data za $p/p_0 = 0,998$. Zapremina mezopora (V_{meso}) je izračunata na osnovu desorpcionih izoterma prema BJH modelu (*Barrett-Joyner-Halend*) [157], dok je zapremina mikropora (V_{micro}) izračunata iz alfa-S krive [158].

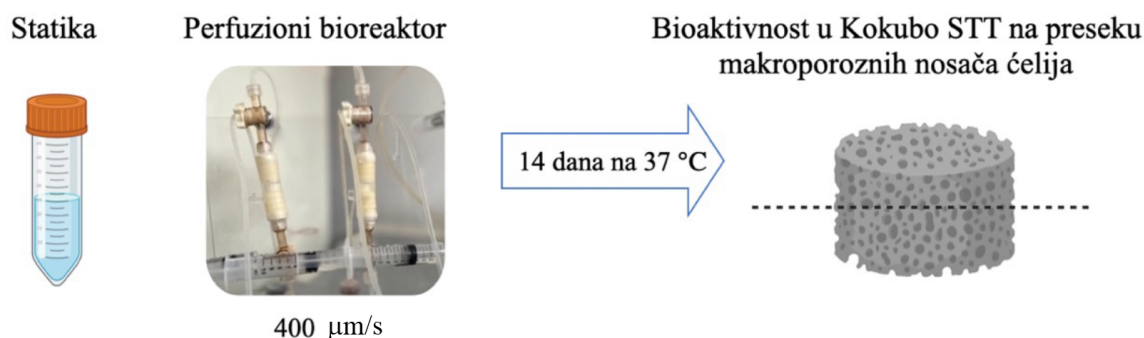
9.6. Zeta-potencijal

Zeta-potencijal (ζ) MBAG čestica dispergovanih u dejonizovanoj vodi i etanolu je određen pomoću Zetasizer uređaja (*NANO ZS, Malvern Instruments, Velika Britanija*).

9.7. *In vitro* bioaktivnost

Bioaktivnost čestica MBAG je određena odležavanjem sterilnih čestica u Kokubo simuliranoj telesnoj tečnosti (STT) u statičkim uslovima pri koncentraciji 1 mg/mL u trajanju od 7 i 14 dana na temperaturi od 37 °C. Čestice su prethodno suvo sterilisane na 180 °C u trajanju od 4 h, dok je STT sterilisan pomoću sterilnih filtera (0,22 μ m poroznosti). Na svakih 48 h je menjan STT uz prethodno temperiranje na 37 °C. Nakon 7 i 14 dana čestice su odvojene centrifugiranjem, osušene i posmatrane na FE-SEM.

Bioaktivnost makroporoznih nosača ćelija je određen u Kokubo STT u statičkim i dinamičkim uslovima u perfuzionom bioreaktoru nakon 14 dana na temperaturi od 37 °C. Test bioaktivnosti makroporoznih nosača ćelija u dinamičkim uslovima je rađen u “3D Perfuse” (Inovacioni centar Tehnološko-metalurškog fakulteta d.o.o, Srbija) perfuzionom bioreaktoru. U komoru prečnika 12 mm, zapremine oko 1 mL, postavljen je uzorak prečnika oko 8 mm. Veći prečnik komore je odabran zbog krte prirode uzorka. Svaki uzorak je ispitivan u posebnom bioreaktoru koji je bio povezan na cirkularni tok fluida koji čine silikonska creva, rezervoar za STT, i trokraki zaptivni ventil sa špricima za razmenu fluida. U svaki perfuzioni bioreaktor, kao i pri statičkim uslovima je sipano po 15 mL sterilnog STT. Kontinualno strujanje fluida površinskom brzinom 400 μ m/s tj. pri protoku od 2,7 mL/min je omogućeno peristaltičkom pumpom (*Masterflex, Cole-Parmer, SAD*), a u skladu sa prethodnim istraživanjima [159]. Kokubo STT je menjan na svaka 2 dana, vodeći računa da se održava temperatura od 37 °C. Nastanak kristala hidroksiapatita na prelomnoj površini nosača praćen je nakon 14 dana u STT pomoću FE-SEM analize kao što je prikazano šematski na Slici 14.



Slika 14. Šematski prikaz testiranja bioaktivnosti makroporoznih nosača ćelija u statičkim i perfuzionim uslovima

9.8. Priprema ekstrakata MBAG

Za indirektni *in vitro* test biokompatibilnosti čestica, kao i njihovu sposobnost da stimuliraju osteogenezu i angiogenezu pripremljeni su ekstrakti čestica MBAG u ćelijskim medijumima adekvatnim za kultivaciju humanih matičnih mezenhimalnih ćelija poreklom iz koštane srži (*eng. bone marrow-derived mesenchymal stem cells, BM-MSC*) i endotelnih EA.hy926 ćelija. Kako bi se odredio uticaj koncentracije jona otpuštenih iz čestica na biokompatibilnost, osteogenezu i angiogenezu, analiziran je i profil otpuštanja jona u periodu 24 h i 7 dana pomoću ICP-OES analize.

Ekstrakti su pripremljeni tako što su čestice MBAG suvo sterilisane na 180 °C u trajanju od 3 h, a zatim dodate u koncentraciji 1 mg/mL u odgovarajuću zapreminu Dulbekovog modifikovanog „Eagle“ ćelijskog medijuma (eng. *Dulbecco modified Eagle Medium, DMEM*) sa visokim sadržajem glukoze (eng. *high glucose, DMEM-HG, Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD*) i sa niskim sadržajem glukoze (eng. *low glucose, DMEM-LG, Gibco, Thermo Fisher Scientific, SAD*) bez ikakvih dodataka. Dobijene suspenzije su postavljene u orbitalni šejker u trajanju od 24 h i 7 dana na 37 °C, nakon čega su centrifugirani na 5000 rpm tokom 15 min i filtrirani pomoću sterilnih filtera sa porama 0,22 µm pre analiziranja koncentracije Ca, Sr, Mg, Si i P u DMEM. Kao polazna tačka na 0 h korišćeni su čisti DMEM ćelijski medijumi. Dobijeni ekstrakti su označeni kao cBAG LG, SrMgBAG LG, cBAG HG i SrMgBAG HG prema tipu korišćenog DMEM. Profil oslobađanja jona u ćelijskom medijumu je dalje određen pomoću ICP-OES metode.

9.9. Induktivno spregnuta plazma sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES)

Hemijski sastav MBAG čestica i količina otpuštenih jona iz MBAG čestica u ekstraktima su određeni pomoću analitičke tehnike induktivno spregnute plazme sa optičkom emisionom spektrometrijom (ICP-OES, *iCAP 6500 Duo ICP, Thermo Fisher Scientific, Kembridž, Velika Britanija*).

Ekstrakti su snimani direktno bez prethodne pripreme, dok je za analizu hemijskog sastava MBAG čestica bilo neophodno potpuno rastvoriti čestice metodom mikrotalasne digestije. Digestija uzoraka MBAG je urađena pomoću naprednog mikrotalasnog sistema (*Ethos 1, Milestone, Italija*) korišćenjem HPR-1000/10S segmentiranog rotora koji radi pod visokim pritiskom. Korišćene su PTFE posude otporne na pritisak (zapremina 100 mL). Oko 50 mg uzorka je precizno izmereno sa tačnošću ±0,1 mg direktno u posudu i preliveno sa 3 mL H₂SO₄ (96 mas.%, *Suprapur®*, *Merck, Nemačka*), 3 mL H₃PO₄ (ACS reagents, ≥85 mas.%, *Merck, Nemačka*), 1 mL HNO₃ (65 mas.%, *Suprapur®*, *Merck, Nemačka*) i 1 mL HF (40 mas.%, *Suprapur®*, *Merck, Nemačka*). Temperatura je postepeno podizana mikrotalsanim zračenjem koje generišu dva magnetrona (generatora) automatskim doziranjem snage u opsegu 0-1000 W, kako bi bio zadovoljen unapred zadati temperaturni režim grejanja. Temperatura je linearno podizana od 25 do 200 °C u prvih 15 min, i zadržana na 200 °C u trajanju od 20 min, a zatim je brzo smanjena na sobnu temperaturu. Posle hlađenja i bez filtracije, rastvor je razblažen do fiksne zapremine od 50 mL u volumetrijskom normalnom sudu. Za razblaživanje je korišćena ultra-čista voda koja je imala električnu provodljivost od 0,05 µS/cm, a pripremljena je korišćenjem Barnstead™ GenPure™ Pro (*Thermo Scientific, Nemačka*).

Za ICP-OES analizu, standardni rastvori za kalibraciju instrumenta su pripremljeni od sertifikovanih standardnih rastvora: *Multi-Element Plasma Standard Solution 4, Specpure® (1000 µg/mL, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Nemačka)* i *Silicon, Plasma Standard Solution, Specpure®, (Si 1000 µg/mL, Alfa Aesar GmbH & Co KG, Nemačka)*. Koncentracije elemenata su određene na sledećim emisionim linijama: Ca II 396,847 nm, Mg II 379,553 nm, Sr II 421,552 nm i Si I 251,611 nm. Za svaki uzorak ICP-OES merenje je rađeno u tri ponavljanja (n=3). Relativna standardna devijacija (RSD) ponovljenih merenja je bila <1%. Granica detekcije (LOD) za sve elemente je bila u opsegu 0,05-1,5 µg/L, a granica kvantifikacije (LOQ) je bila u opsegu 0,1-5 µg/L.

Analitička kontrola kvaliteta procesa izvedena je korišćenjem sertifikovanog referentnog materijala *EPA Method 200.7 LPC Solution (ULTRA Scientific, SAD)*. Postignuto poklapanje sa sertifikovanim vrednostima za sve sertifikovane elemente je bilo u opsegu od 98-103%. Koncentracije elemenata u uzorcima izražene su kao mol.%.

9.10. Sposobnost vezivanja i otpušanja leka

Anti-inflamatorni nesteroidni lek ibuprofen (*IBU*, $\geq 98\%$, *Sigma Aldrich, SAD*) je korišćen kao model leka za analizu sposobnosti vezivanja i otpušanja leka sa česticama MBAG. Čestice MBAG su dispergovane u etanolu pri koncentraciji 50 mg/mL u ultrazvučnom kupatilu tokom 2 min, i zatim mešane na sobnoj temperaturi u trajanju od 24 h. *In vitro* otpušanje leka iz čestica je određeno metodom difuzije iz dijalizatorskih membrana, tako što je 100 mg čestica MBAG sa vezanim IBU (*cBAG@IBU*, *SrMgBAG@IBU*) postavljeno u dijalizatorsku membranu (*Servapor, MVCO, 12 000-14 000, Serva, Nemačka*) i potopljeno u 40 mL PBS (pH=7,4, 37 °C). U određenim vremenskim intervalima je uzimano po 2 mL alikvota, filtrirano i analizirano pomoću UV-VIS spektroskopije (*Shimadzu, UV 1800, Japan*) na talasnoj dužini $\lambda = 264$ nm, a alikvot je zatim vraćan nazad u PBS rastvor.

9.11. Termogravimetrijska analiza (TGA)

Termogravimetrijska analiza (TGA) čestica MBAG pre vezivanja leka, nakon vezivanja leka i nakon 55 h otpušanja leka ibuprofena je urađena pomoću uređaja za simultanu DSC-TGA analizu (*SDT K600, TA Instruments, SAD*). Uzorci su zagrevani u standardnim korundnim lončićima od sobne temperature do 500 °C, pri brzini zagrevanja od 10 °C/min u atmosferi azota sa protokom od 0,1 L/min. Kapacitet vezivanja leka je određen na osnovu gubitka mase u temperaturnom intervalu od 200-500 °C uzoraka sa vezanim lekom.

9.12. Relativno linearno skupljanje i gustina kompakata

Gustine [g/cm^3] sinterovanih kompakata su izračunate kao odnos mase i zapremine cilindra, pri čemu je masa merena analitičkom vagom [g], a dimenzije kompakata nonijusom [mm].

Relativno linearno skupljanje (RLS) izračunato na osnovu jednačine (2):

$$\text{RLS} = (d_0 - d) / d_0 \cdot 100 [\%] \quad (2)$$

pri čemu je d prečnik sinterovanog uzorka, a d_0 prečnik kompakta pre sinterovanja, mereno nonijusom.

10. Mehanička ispitivanja

10.1. Tvrdća po Vickersu i žilavost loma

Tvrdća po Vickersu (*eng. Vickers hardness, HV*) i žilavost loma (K_{IC}) poliranih sinterovanih kompakata su određeni pomoću uređaja za analizu tvrdoće po Vickersu (*Buehler Indentament Macroidentation Hardness Tester, Model 1114*). Merenja su izvedena pri opterećenju od 500 g u trajanju od 5 s. HV vrednosti su dobijene na osnovu dijagonala otiska na površini kompakata, dok su vrednosti K_{IC} izračunati na osnovu Čarls-Evansove jednačine (3):

$$K_{IC} = 0,0824 \cdot P \cdot c^{-3/2} [\text{MPa} \cdot \text{m}^{1/2}] \quad (3)$$

pri čemu je P - primenjena sila [N], c – dužina dijagonale otiska [μm]. HV i K_{IC} vrednosti su predstavljene kao srednja aritmetička vrednost 5 merenja po uzorku.

10.2. Pritisna čvrstoća

Pritisna čvrstoća makroporoznih nosača ćelija (σ_c) bez i sa nanetom biokompozitnom prevlakom je određena pomoću kidalice (*Universal Testing Machine AG-XPlus, Shimadzu, Japan*), opremljene alatom koji funkcioniše pri maksimalnoj sili od 1000 N (pri rasponu sile od 0,01 do 1000 N), pri brzini testiranja od 5 mm/min. Prosečne dimenzije cilindričnih makroporoznih nosača merene nonijusom date su u Tabeli 4. Vrednosti pritiskne čvrstoće predstavljaju maksimalno naprezanje koja se dostiže u tački loma materijala, a softverski izračunava prema jednačini (4):

$$\sigma_c = F_m/A \text{ [MPa]} \quad (4)$$

pri čemu je F_m – maksimalna detektovana sila pri lomu [N], A – površina poprečnog preseka nosača [mm²] softverski izračunata na osnovu dimenzija pojedinačnog nosača. Vrednosti pritiskne čvrstoće σ_c predstavljene su kao srednja aritmetička vrednost merenja 4 uzorka.

Tabela 4. Srednje dimenzije makroporoznih nosača ćelija

<i>Temperatura sinterovanja</i>	<i>Uzorak</i>	<i>d [mm]</i>	<i>h [mm]</i>
1350 °C	CaP	5,83 ± 0,23	5,85 ± 0,07
1400 °C	CaP	5,72 ± 0,13	5,58 ± 0,16
1350 °C	SrMgCaP	6,38 ± 0,16	6,26 ± 0,17
1400 °C	SrMgCaP	6,01 ± 0,10	6,12 ± 0,06
1350 °C	BAG	6,03 ± 0,15	6,20 ± 0,09
1400 °C	BAG	5,24 ± 0,24	5,81 ± 0,09
1350 °C	SrMgBAG	5,36 ± 0,23	5,46 ± 0,05
1400 °C	SrMgBAG	4,87 ± 0,26	5,52 ± 0,11

11. Ispitivanja relevantna za primenu dentalnih inserata u stomatologiji

11.1. Test jačine veze dentalnih inserata sa restaurativnim materijalima

Pomoću analize jačine veze smicanjem je ispitana sposobnost ostvarivanja veze sinterovanih dentalnih inserata (dobijenih na bazi Sr5, Mg5 i Sr3Mg3 sintetisanih na pritisku od 6 bar), sa sledećim restaurativnim materijalima korišćenim u kliničkoj praksi: samonagrizajući-samovezujući cement Maxcem Elite (Maxcem), dentalni kompozit (Filtek Z250) vezan sa 2 različita adhezivna sistema (Single Bond Universal – SBU, i Clearfil Universal Bond Quick – Cf) u skladu sa prethodnim istraživanjem inserata na bazi Mg5 sintetisanog na pritisku od 8 bar [118]. Sastav korišćenih restaurativnih materijala je dat u Tabeli 5. Pripremljeno je po 5 uzoraka (n=5) po grupi, odnosno po vrsti dentalnog inserta i tipu restaurativnog materijala, odnosno protokola. Sve površine inserata su dobro isprane vodom i osušene komprimovanim vazduhom pre nanošenja restaurativnog materijala. Za aplikovanje restaurativnih materijala korišćeni su silikonski kalupi donjeg prečnika 6 mm i visine 2 mm za smeštanje inserta i gornjeg dela (3 mm Ø, 2 mm visina) namenjenog za nanošenje restaurativnog materijala. Svi uzorci su čuvani tokom 24 h na vazduhu na temperaturi od 37 °C pre testa jačine veze.

Tabela 5. Sastav korišćenih restaurativnih materijala

Materijal	Proizvođač	Sastav prema uputstvu proizvođača
<i>Single Bond Universal (SBU)</i>	3M ESPE, SAD	BisGMA, HEMA, DMDMA, etanol, voda, silicijum-dioksidni punioci (5–15 mas.%), 2-propenska kiselina, 10-MDP, kopolimer akrilne i itakonske kiseline, kamforhinon, EDMAB, toluen
<i>Clearfil Universal Bond Quick (Cf)</i>	Kuraray Noritake Dental Inc., Japan	BisGMA, HEMA, etanol, 10-MDP, hidrofilni alifatski dimetakrilat, koloidni silicijum-dioksid, DL-kamforhinon, silansko sredstvo za umrežavanje, akceleratori, inicijatori, voda
<i>Filtek Z250</i>	3M ESPE, SAD	Keramika tretirana silanom, BisEMA6, UDMA, BisGMA, TEGDMA
<i>Maxcem Elite</i>	Kerr, Italija	Monomeri metakrilnih estara, mineralni punioci, iterbijum-fluorid, aktivatori, stabilizatori, boje

Skraćenice: BisEMA6 - bisfenol A polietilen glikol dieter dimetakrilat; BisGMA - bisfenol A diglicidil etar dimetakrilat; DMDMA - dekametilen dimetakrilat; EDMAB - etil 4-dimetil aminobenzoat; HEMA - 2-hidroksietil metakrilat; UDMA - diuretan dimetakrilat, TEGDMA - trietilen glikol dimetakrilat, 10-MDP -10-metakriloiloksidecil dihidrogen fosfat

11.1.1. Priprema uzoraka za test jačine veze sa adhezivnim sistemima

Dva različita protokola nanošenja adhezivnih sistema su korišćena: a) protokol sa kiselinskim nagrivanjem (*eng. total etch, TE*) i b) protokol bez nagrivanja (*eng. self etch, SE*), a uzorci su obeleženi u odnosu na to koji je adhezivni sistem korišćen kao SBU_SE, Cf_SE, SBU_TE, Cf_TE. Kiselinsko nagrivanje je vršeno 37% fosfornom kiselinom (*Scotchbond, Universal Etchant, 3M ESPE, SAD*) prema preporuci proizvođača za tretman dentina odnosno, u trajanju od 15 s u slučaju SBU i 10 s u slučaju Cf adheziva. Sve površine inserta su dobro isprane vodom i osušene komprimovanim vazduhom pre nego što je adheziv nanešen sa jednokratnim aplikatorom u trajanju od 20 s i isto toliko svetlosno polimerizovan na rastojanju od 1 mm pomoću LED polimerizacione lampe (*LEDition, Ivoclar, Vivadent, Shaan, Lihtenštajn*) intenzitetom 800 mW/cm². U donji deo držača koji odgovara dimenzijama inserta je unet insert tako da strana sa nanetim adhezivom bude okrenuta naviše ka delu držača namenjenom za unošenje restaurativnog materijala. Jedan sloj dentalnog kompozita (visine 2 mm) je nanešen na površinu inserta sa adhezivom i svetlosno polimerizovan tokom 40 s, nakon čega je kalup nežno uklonjen. Izgled uzoraka za test jačine veze dat je na Slici 15.

11.1.2. Priprema uzoraka za test jačine veze sa Maxcem cementom

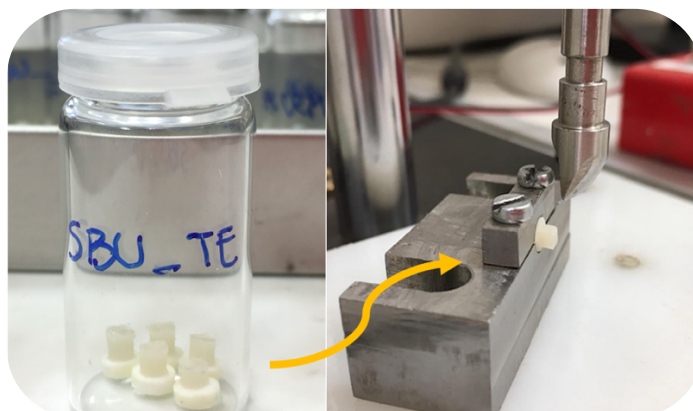
U prvoj grupi Maxcem Elite cement je direktno nanet na čistu površinu inserta bez kiselinskog predtretmana (SE protokol), dok je u drugoj grupi prvo površina inserta kiselinski nagrivena sa 37% fosfornom kiselinom u trajanju od 15 s, isprana, osušena komprimovanim vazduhom i onda aplikovan cement i osvetljen tokom 10 s na rastojanju od 1 mm sa LED lampom kako bi se inicirala polimerizacija.

11.1.3. Ispitivanje jačine veze na smicanje

Jačina veze na smicanje je određena pomoću kidalice za merenjem maksimalne sile na smicanje (*Force Gauge PCEFM200, PCE Instruments, Velika Britanija*) do loma. Insert je fiksiran u metalni kalup i primenjena je smicajna sila brzinom 1 mm/min na rastojanju od 1 mm od kontakta inserta sa restaurativnim materijalom (Slika 15). Jačina veze (τ) se izračunava na osnovu jednačine (5):

$$\tau = F_m/A \text{ [MPa]} \quad (5)$$

gde τ predstavlja jačinu veze [MPa], F_m - maksimalnu dostignutu silu u momentu loma [N], A – površinu vezivanja sa insertom (mm²).



Slika 15. Uzorci inserta sa nanetim restaurativnim materijalom i uređaj za testiranje jačine veze

11.1.4. Određivanje tipa loma nakon testa jačine veze

Tip loma nakon testa jačine veze na smicanje je utvrđen pomoću stereomikroskopa na uvećanju od 30x i klasifikovan kao: a) adhezivni – lom na spoju materijala i inserta, b) kohezivni – lom unutar materijala ili unutar inserta, c) mešoviti – prelom na granici koji delimično zahvata ili insert ili materijal). Vrednosti jačine veze su prikazane kao srednje aritmetičke vrednosti 5 uzoraka po grupi.

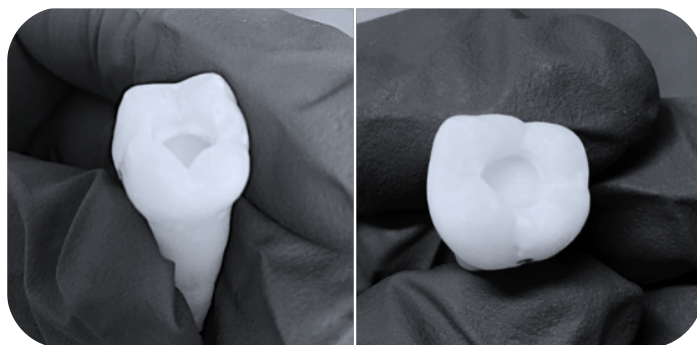
11.2. Dentalni inserti kao dentinski zamenici

Za ispitivanje primene dentalnih inserata na bazi HAP kao dentinskih zamenika u stomatologiji kod velikih kaviteta zuba, poređena je mehanika restauriranih zuba primenom kalcijum-fosfatnih inserata sa mehanikom zuba restauriranih po konvencionalnoj metodi.

Preparacija i restauracija ekstrahovanih molara u okviru ove disertacije je urađena na Stomatološkom fakultetu, Univerziteta u Beogradu u skladu sa odobrenjem Etičke komisije (br. Odluke 36/12 od 09.05.2022.). Zubi su prikupljeni u saradnji Klinike za bolesti zuba sa Klinikom za oralnu hirurgiju, Stomatološkog fakulteta, Univerziteta u Beogradu, a ekstrahovani zbog nepovoljnog položaja u vilicama ili usled impaktiranosti uz prethodno dobijenu saglasnost pacijenata. Nakon odgovarajućeg čišćenja, ekstrahovani zubi su čuvani u 0,5% rastvoru hloramina na +4 °C. U studiji je korišćeno 20 humanih intaktnih donjih molara.

11.2.1. Postupak preparacije kaviteta

Zubi su podeljeni u parove u dve eksperimentalne grupe sa po 8 zuba ($n=8$) tako da su međusobno sličnih dimenzija i oblika. Jedna grupa je restaurirana kontrolnim protokolom, a druga grupa protokolom koji uključuje dentalne inserte. Okluzalni kaviteti prečnika 5 mm i dubine 5 mm (Slika 16) su pripremljeni pomoću visokoturažne bušilice sa dijamantskim borerom sfernog oblika (*br. 856-016F-FG, NTI-Kahla, GmbH, Kala, Nemačka*) uz vodeno hlađenje za preparaciju gleđi (pri velikim brzinama od 100 000 obrataja/min), i sa karbidnim borerom cilindričnog oblika (*br. T21RX-010-FG, NTI-Kahla, GmbH, Kala, Nemačka*) pri brzini od 10 000 obrataja/min. Pripremljeni kaviteti su bili modifikovane klase I tako da budu standardizovanog cilindričnog oblika. Tolerisane su dimenzije kaviteta $4,90 \pm 0,5$ mm u prečniku (srednja vrednost 5 merenja), vodeći računa da ne dođe do otvaranja komore pulpe, u suprotnom taj zub je bio odbačen i odabran nov sličnih dimenzija.



Slika 16. Pripremljen kavitet molara modifikovane klase I

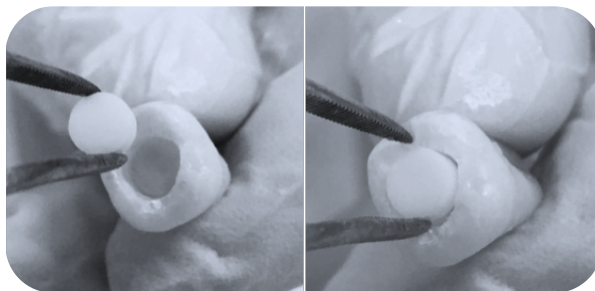
11.2.2. Protokol restauracije kaviteta konvencionalnim postupkom

U kontrolnoj grupi („Kontrola“) kaviteti su restaurisani konvencionalnim postupkom primenom komercijalnog mikrohibridnog kompozita Filtek Z250 uz primenu univerzalnog adheziva SBU po protokolu selektivnog nagrizanja. Gleđ je nagrižena 37% orto-fosfornom kiselinom u trajanju od 15 sekundi, potom isprana vodom i osušena komprimovanim vazduhom. Adheziv je nanet na sve zidove kaviteta i svetlosno polimerizovan LED lampom (*LEDition; Ivoclar Vivadent, Lihtenštajn, jačine 800 mW/cm²*). Ceo kavitet je zatim restauriran u tankim slojevima od po 2 mm, a svaki sloj polimerizovan tokom 40 s. Okluzalna površina ispunjena je zatim obrađena i polirana po konvencionalnom postupku tako da se formira anatomski oblik zuba.

11.2.3. Protokol restauracije kaviteta primenom dentalnih inserata

U skladu sa rezultatima dobijenim tokom ispitivanja jačine veze dentalnih inserata i komercijalnih materijala, u grupi „Inserti“ odabran je dentalni insert Mg5 sintetisan na 160 °C (prečnika 4,90 mm i visine 1,70 mm, Slika 17) za restauraciju zuba. Spoljašnje površine inserta i gleđi preparisanog zuba su nagriženi 37 % orto-fosfornom kiselinom u trajanju od 15 sekundi, potom isprani vodom i osušeni komprimovanim vazduhom. Na dno i bočne strane kaviteta je nanet tanak sloj MaxCem Elite cementa (*dual-cure, self-etch, self-adhesive cement na bazi smola*), tako da se prekrije cela donja površina kaviteta, i zatim je dentalni insert utisnut u cement u centralni deo kaviteta, kako bi se ravnomerno rasporedio cement i povezao bočne strane inserta sa dentinom. Kavitet je zatim svetlostno polimerizovan tokom 10 sekundi LED lampom (*LEDition; Ivoclar Vivadent, Lihtenštajn*) jačine 800 mW/cm², a višak cementa uklonjen. Adheziv SBU je nanet po preostaloj, slobodnoj površini inserta i po preostalim zidovima kaviteta i svetlosno polimerizovan u trajanju od 20 s. Deo restauracije iznad inserta, u zoni gleđi, je restauriran kompozitnim materijalom

korišćenim u kontrolnoj grupi (Filtek Z250), u dva zasebna sloja, svaki polimerizovan po 40 sekundi. Okluzalna površina ispunjena je zatim obrađena i polirana po konvencionalnom postupku tako da se formira anatomski oblik zuba.



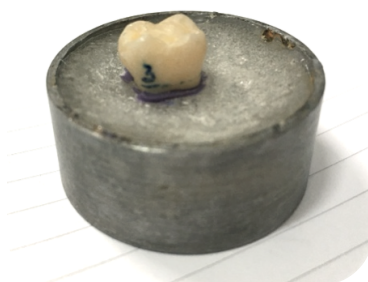
Slika 17. Odgovaranje inserta dimenzijama kaviteta

11.2.4. Termocikliranje

Pre testa na otpor na lom restauriranih zuba primenjen je postupak termocikliranja kako bi se ubrzalo starenje restaurativnih materijala. Koreni restauriranih zuba su umetnuti u silikonski kalup do cementno-gledne granice prilikom termocikliranja kako bi se sprečilo njihovo sudaranje odnosno nastanak eventualnog oštećenja zuba. Zubi su podvrgnuti uobičajenom procesu termocikliranja koji čini 10 000 ciklusa naizmeničnog potapanja u vodena kupatila na 5 °C i 55 °C, sa zadržavanjem od 15 s i vremenom tranzicije između kupatila od 5 s. Prethodno je pokazano da termocikliranje u trajanju od 10 000 ciklusa odgovara vremenu od 1 godine *in vivo* degradacije, dok temperature 5 °C i 55 °C predstavljaju temperature granice bola kod ljudi kada naizmenično konzumiraju toplu i hladnu hranu [160].

11.2.5. Zatapanje u akrilnu smolu

Nakon termocikliranja, zubi su zatopljeni u samovezujuću akrilnu smolu (Slika 18), koristeći protokol sa simulacijom periodontalnog ligamenta prethodno opisanog u radu Soaers i autora [161]. Koreni zuba su uronjeni prvo u istopljeni vosak do udaljenosti 2 mm od cementno-gledne granice i fiksirani u cilindrične metalne kalupe. Akrilna smola (*Ortopoli, Polident, Slovenija*) pripremljena prema uputstvu proizvođača je zatim ulivena u kalupe do visine od 2 mm od cementno-gledne granice. Kada se smola potpuno vezala, kalupi su potopljivi u vrelu vodu kako bi se otopio vosak i izvadili zubi iz smole. U smoli je ostao utisnut otisak zuba. Vosak je potpuno uklonjen sa površine korena kao i iz akrilne smole. Za simulaciju periodontalnog ligamenta korišćen je polietarski materijal za otiske (*Impregnum Soft, 3M, Nemačka*) koji je uliven u otiske zuba u akrilnoj smoli, a zatim zubi vraćeni u otisak istiskujući višak materijala. Nakon očvršćavanja višak materijala iznad površine akrilne smole je uklonjen pomoću skalpela.



Slika 18. Zatopljen molar u akrilnoj smoli

11.2.6. Testiranje otpora na lom restauriranih zuba

Uzorci zuba fiksirani u akrilnoj smoli su čuvani tokom 24 h na 37 °C u vodenom kupatilu pre testiranja na otpor na lom (F_m). Otpor na lom je testiran korišćenjem kidalice (*Universal Testing Machine, AGS-X, Shimadzu, Japan*) opremljene alatom koji može da se primeni do maksimalne sile od 100 kN. Testiranje je vršeno pomoću utiskivača od nerđajućeg čelika sa kontaktnom površinom oblika sfere prečnika 3 mm, pri brzini prirasta sile od 0,5 mm/min (Slika 19). Uzorci zuba u akrilatu su u samoj kidalici fiksirani pomoću metalnog graničnika, a utiskivač pozicioniran na centar okluzalne površine krunice zuba. Kalajna folija debljine 0,5 mm (99,8%, *Alfa Aesar*) je stavljena između utiskivača i zuba kako bi se smanjila akumulacija naprezanja i simulirao sloj hrane prilikom mastikacije [162]. Uniaksijalna pritisna sila je primenjena do loma uzorka, odnosno maksimalna izmerena sila F_m [N] predstavlja otpor na lom zuba. Polomljeni uzorci su analizirani kako bi se kategorisao tip loma prema tome da li ga je moguće restaurirati: a) da – ako je iznad gleđno-cementne granice, ili b) ne – nalazi se ispod gleđno-cementne granice (katastrofalni lom) [163].



Slika 19. Testiranje otpora na lom restauriranih zuba

12. Biološka ispitivanja

Sva biološka ispitivanja su rađena na odseku za medicinske nauke Centra za translaciju istraživanja autoimunih i alergijskih bolesti (*Centro per le malattie autoimmuni e allergiche, CAAD*), pri Univerzitetu istočnog Pijemonta (UPO, Novara, Italija) u okviru studentskog boravka preko projekta Excell Mater (Twinning Horizon 2020, br. 952033).

Za sva biološka ispitivanja korišćeni su suvo sterilisani uzorci na 180 °C tokom 3 ili više sati. Zbog hidrofobnosti biokeramičkih makroporoznih nosača ćelija, pre svih bioloških analiza oni su potopljeni u odgovarajući ćelijski medijum u trajanju od 10 min.

12.1. Indirektni test citokompatibilnosti

Citokompatibilnost čestica MBAG je određena na dve vrste ćelija – BM-MSC u 2D kulturi ćelija i endotelnim EA.hy926 ćelijama u 3D kulturi ćelija. Ekstrakti dobijeni mešanjem čestica stakla sa ćelijskim medijumom u trajanju od 24 h pri koncentraciji 1 mg/mL su korišćeni za indirektni test citokompatibilnosti (priprema ekstrakata BAG je prikazana u sekciji 9.8.).

Humane imortalizovane BM-MSC ćelije linije Y201 su uzgajane u 2D kulturi u DMEM-LG sa dodatkom 15% fetalnog goveđeg seruma (*eng. fetal bovine serum, FBS*) (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc, SAD*) i 1% antibiotika (*penicilin/streptomycin, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc, SAD*) u inkubatoru na 37 °C i u atmosferi sa 5% CO₂. Humane endotelne ćelije EA.hy926 su kupljene

od američke kolekcije tipskih kultura (*American Type Culture Collection, ATCC, SAD*) i kultivisane u DMEM-HG sa dodatkom 10% FBS (*Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.SAD*) i 1% antibiotika (*penicilin/streptomycin, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc.SAD*) u inkubatoru na 37 °C i u atmosferi sa 5% CO₂. Obe ćelijske linije su kultivisane do 80-90% konfluentnosti, nakon čega su sakupljene enzimskom digestijom uz pomoć tripsin/etilendiamintetrasirćetne kiseline (*trypsin/EDTA, Gibco, Thermo Fisher Scientific, Inc, SAD*) za dalje analize.

12.1.1. 2D ćelijska kultura sa BM-MSc

BM-MSc su zasejane u ploči za kulturu ćelija sa 12 bunarića u koncentraciji 5×10^3 ćelija/bunaru. Ćelije su inkubirane preko noći kako bi se omogućila adhezija ćelija, nakon čega su tretirane različitim medijumima po grupama:

1. BAG-LG ekstrakt sa 15% FBS
2. SrMgBAG-LG ekstrakt sa 15% FBS
3. DMEM-LG sa 15% FBS (regularni medijum)
4. Osteogeni medijum (DMEM-LG sa 10% FBS, 20 mM β -glicerofosfata, 50 μ M askorbinska kiselina 2-fosfata, 10^{-7} M deksametazona)

Citokompatibilnost je analizirana kao vijabilnost ćelija korišćenjem kolorimetrijskog testa redukcije resazurina indirektnom metodom nakon 24 h i 3 dana kultivacije ćelija sa ekstraktima. U datim vremenskim intervalima u bunariće sa tretiranim ćelijama je dodato po 15 μ L 1% rastvora natrijum-resazurin soli (*Merck, Nemačka*) u PBS kako bi se postigla krajnja koncentracija od 0,015 % [v/v] u ćelijskom medijumu. Inkubacija je nastavljena tokom naredna 4 h, nakon čega je po 100 μ L alikvota uzorkovano i prebačeno u crne ploče za analizu fluorescencije (*Tecan GENios Microplate Reader, Spark, Tecan Trading AG, Švajcarska*). Za kvantifikaciju fluorescencije korišćene su ekscitovana i emitovana talasna dužina od 530 i 590 nm, redom. Blank je bio čist rastvor resazurina. Rezultati predstavljaju srednju vrednost 3 biološka replikata (n=3). Rezultati vijabilnosti su prikazni kao udeo vijabilnih ćelija u ispitivanoj grupi u odnosu na ćelije tretirane regularnim medijumom (pozitivna kontrola), za koju je data vrednost 100 %.

12.1.2. 3D ćelijska kultura sa EA.hy926

Po ~150.000 EA.hy926 ćelija je resuspendovano u 200 μ L 0,5% kolagena (5 mg/mL, PureCol EZ Gel solution, Merck) i uliveno u bunariće ploče za kulturu ćelija sa 24 bunarića, zatim stavljena u inkubator na 37 °C tokom 4 h kako bi kolagen polimerizovao. Nakon toga su tretirane različitim medijumima po grupama: 2 ekstrakta, regularni ćelijski medijum ili ćelijski medijum obogaćen angiogenim faktorom rasta:

1. DMEM-HG sa 10% FBS
2. BAG-HG ekstrakt sa 10% FBS
3. SrMgBAG-HG ekstrakt sa 10% FBS
4. DMEM-HG sa 10% FBS i 100 ng/mL vaskularnog endotelnog faktora rasta (*vascular endothelial growth factor, VEGF*)

Kolorimetrijski test resazurinom je urađen isto kao u sekciji 12.1.1. pri čemu su alikvoti uzimani nakon 24 h, 3 dana i 7 dana. Rezultati vijabilnosti su prikazni kao udeo vijabilnih ćelija u ispitivanoj grupi u odnosu na ćelije tretirane regularnim medijumom (pozitivna kontrola), za koju je data vrednost 100%.

12.2. Direktni test citokompatibilnosti makroporoznih nosača ćelija

Citokompatibilnost biokeramičkih makroporoznih nosača ćelija je određena direktnim testom – kultivacijom ćelija u samim nosačima u 3D modelu za kultivaciju ćelija u rastvoru 0,5% kolagena. Za ovu analizu su korišćene su BM-MSC i endotelne EA.hy926 ćelije. Ćelije su kultivisane kao što je opisano u sekciji 6.1.1 do postizanja 80-90% konfluentnosti, nakon čega su sakupljene enzimskom digestijom za dalje analize.

Sterilni nosači su postavljeni u ploču sa 12 bunarića za uzgajanje ćelija. Na svaki uzorak je zasejano po 400.000 ćelija (BM-MSC ili EA.hy926) resuspendovanih u ćelijskom medijumu sa 40 μL 0,5% rastvora kolagena (PureCol EZ Gel solution, Merck, Italija). Suspenzija je naneta kap po kap na površinu uzoraka i inkubirano je tokom 3-4 h na 37 °C da se rastvor kolagena stegne i omogući adhezija ćelija za nosač, nakon čega su nosači prebačeni u novu ploču i u svaki bunarić je dodat odgovarajući regularni ćelijski medijum. Uzorci su kultivisani 7 dana u tri biološka replikata ($n=3$).

Citokompatibilnost je analizirana kao vijabilnost ćelija korišćenjem kolorimetrijskog testa redukcije resazurina. Kolorimetrijski test resazurinom je urađen isto kao u sekciji 12.1.1. pri čemu su alikvoti uzimani nakon 24 h i 7 dana kultivacije ćelija. Kao pozitivna kontrola korišćen je nosač na bazi CaP.

12.3. Pro-osteogeni potencijal

Pro-osteogeni potencijal sintetisanih prahova MBAG je ispitan u 2D kulturi BM-MSC ćelija nakon 7 dana kultivacije sa ekstraktima (opisano u sekciji 9.8) analizom aktivnosti alkalne fosfataze (ALP) i mineralizacije ekstracelularnog matriksa bojenjem alizarin crvenom S bojom (ARS). Sa druge strane, pro-osteogeni potencijal makroporoznih nosača ćelija na bazi CaP, SrMgCaP i kompozitnih nosača ćelija je ispitan analizom genske ekspresije nakon 21 dana kultivacije BM-MSC ćelija u nosačima.

12.3.1. Analiza aktivnosti alkalne fosfataze (ALP)

Radi detekcije aktivnosti ALP enzima nakon 7 dana kultivacije ekstrakata sa BM-MSC korišćen je komercijalni kolorimetrijski p-nitrofenil-fosfatni test (*pNPP, Alkaline Phosphatase Assay Kit (Colorimetric), Abcam, Velika Britanija*). Ćelijski lizati su dobijeni tako što je uklonjen ćelijski medijum iz bunarića, ispiran sa PBS, a zatim dodato 50 μL ALP pufera za ispitivanje aktivnosti i sprovedena 3 ciklusa zamrzavanja-odmrzavanja na -80 °C. Dobijeni ćelijski lizati su zatim centrifugirani u trajanju od 15 min na 4 °C i $12,5 \times g$ (g - centrifugalna sila), a supernatanti sakupljeni u epruvete za mikrocentrifugu i čuvani na -80 °C. Test aktivnosti ALP je urađen prema uputstvu proizvođača: 50 μL svakog ćelijskog lizata je pomešano sa 50 μL 5mM rastvora pNPP. Ploča je inkubirana u mraku na 25 °C u trajanju od 60 min. Reakcija je zaustavljena dodavanjem 20 μL komercijalnog rastvora za zaustavljanje reakcije (eng, Stop Solution), a apsorbancu izmerena na $\lambda = 405$ nm pomoću čitača mikrotitar ploča (*Tecan GENios Microplate Reader, Spark, Tecan Trading AG, Švajcarska*). Aktivnost ALP enzima je zatim izračunata na osnovu jednačine (6):

$$\text{ALP aktivnost} = (B / \Delta T \cdot V) \cdot D \quad (6)$$

gde je B količina korišćenog pNPP u bunariću preračunata na osnovu standardne krive [μmol], ΔT vreme reakcije [min], V originalna zapremina koja je dodata u bunarić [mL], a D faktor razblaženja.

Grupa ćelija tretirana regularnim medijumom je predstavljala negativnu kontrolu.

12.3.2. Bojenje alizarin crvenim S

Kako bi se utvrdilo da li je došlo do mineralizacije odnosno taloženja kalcijuma kod BM-MSK ćelija kultivisanih sa ekstraktima, korišćen je postupak bojenja alizarin crvenim S (*eng, alizarin red S, ARS, Merck, SAD*) prema uputstvu proizvođača nakon 7 dana kultivacije sa BM-MSK. Ukratko, ćelije su isprane PBS-om, fiksirane sa 4% paraformaldehidom na sobnoj temperaturi u trajanju od 15 min, a zatim nakon ispiranja PBS-om obojene sa 40 mM rastvora ARS u trajanju od 30 min pri nežnom mućkanju. Obojeni monosloj je identifikovan pomoću fazne mikroskopije koristeći invertni mikroskop. Za kvantifikaciju ARS boje korišćena je 10% sirćetna kiselina, nakon čega je ploča inkubirana 30 min uz nežno mućkanje. Ćelije u 10% sirćetnoj kiselini su odvojene i prebačene u epruvete za mikrocentrifugu, vorteksirane u trajanju od 30 s, a zatim zagrejane na 85 °C na 10 min i prebačene na led na 5 min, zatim centrifugirane na $20\,000 \times g$ u trajanju od 15 min. 250 µL dobijenog supernatanta je prebačeno u novu epruvetu za centrifuge i dodato 100 µL 10% amonijaka za neutralizaciju kiseline. Alikvoti od 100 µL su uliveni u ploče za kulturu ćelija sa 96 bunara sa providnim dnom, a tamnim stranama. Apsorbanca je očitana na 405 nm koristeći čitač za mikrotirar ploče (*Tecan GENios Microplate Reader, Spark, Tecan Trading AG, Švajcarska*). Rezultati su prikazani kao srednja vrednost tri biološka replikata ($n = 3$). Grupa ćelija tretirana regularnim medijumom je predstavljala negativnu kontrolu.

12.3.3. Analiza genske ekspresije

Osteogeni potencijal makroporoznih nosača ćelija je određen pomoću analize ekspresije gena od interesa nakon 21 dana kultivacije BM-MSK ćelija unutar makroporoznih nosača ćelija. Promena ekspresije gena od interesa je određena tako što je izolovana ukupna informaciona RNK (iRNK), iz nje sintetisana komplementarna DNK (kDNK), a zatim su u reakciji kvantitativne lančane polimeraze (PCR) umnožavani geni primenom specifičnih prajmera.

Ukupna RNK je ekstrahovana pomoću komercijalnog reagensa za izolaciju RNK - TRIzol™ (*Invitrogen Life Technologies, SAD*) prema uputstvu proizvođača. Prinos RNK i njen kvalitet je određen pomoću spektrofotometra (*NanoDrop One, Thermo Fisher Scientific Inc, SAD*). Dalje je 1 µg ukupne RNK tretiran dezoksiribonukleazom I (DNase I) i preveden u komplementarnu DNK (kDNK) upotrebom komercijalnog seta namenjenog za reverznu transkripciju (*iScript™ gDNA Clear cDNA Synthesis Kit, Bio-Rad Laboratories, SAD*) i termociklera (*Mastercycler X50s, Eppendorf, Nemačka*).

Izabrani geni su bili: alfa-1 lanac kolagena tipa I (COL1A1) kao osteogeni marker, alfa-1 lanac kolagena tipa II (COL2A1) kao hondrogeni marker i ribozomalni protein L34 (RPL34) kao referentni gen. Sekvence parova prajmera su date u Tabeli 6. Na osnovu sintetisane kDNK i odgovarajućih prajmera vršena je amplifikacija rtq-PCR metodom. Za rtq-PCR reakciju korišćeno je 1 ng/uL kDNK i komercijalni set SsoAdvanced™ Universal SYBR® Green Supermix (*Bio-Rad Laboratories, SAD*) sa odgovarajućim prajmerima pri koncentraciji od 2,5 µM. Reakcija lančanog umnožavanja u realnom vremenu odigravala se u termocikleru za rtq-PCR (*CFX96™ Real-Time System, Bio-Rad Laboratories, SAD*) prema standardnom protokolu. Ekspresija gena od interesa je normalizovana prema referentnom genu, a relativna genska ekspresija je određena primenom Livak metode ($2^{-\Delta\Delta C_q}$) poređenjem sa kontrolnom grupom (CaP makroporozni nosač).

Tabela 6. Sekvence korišćenih prajmera za rt-qPCR

COL1A1	F	5'- GGA TTC CAG TTC GAG TAT GG -3'
	R	5'- CAG TGG TAG GTG ATG TTC TG -3'
COL2A1	F	5'- AGG ATG GGC AGA GGT ATA AT -3'
	R	5'- CAG ATT ATG TCG TCG CAG AG -3'
RPL34	F	5'- GAC GTA GGC TTT CCT ACA ATA C -3'
	R	5'- GTG CTT TCC CAA CCT TCT T -3'

12.4. Fluorescentna mikroskopija

12.4.1. Kvalitativno određivanje vijabilnosti i infiltracije ćelija u nosače

Nakon 7 dana kultivacije BM-MSK i EA.hy926 ćelija unutar biokeramičkih makroporoznih nosača vizualizovana je vijabilnost ćelija, kao i njihova infiltracija i raspored u samom nosaču pomoću fluorescentnog bojenja živih i mrtvih ćelija (*LIVE/DEAD™ set za određivanje vijabilnosti/citotoksičnosti ćelija sisara, Invitrogen Life Technologies, Italija*). Nosači su inkubirani u odgovarajućem ćelijskom medijumu koji sadrži 2 μ M kalcein-AM koji boji žive ćelije zeleno i 2 μ M etidium homodimer-1 (EthD-1) koji boji mrtve ćelije crveno. Nakon 15 minuta inkubacije na 37°C u atmosferi 5% CO₂ ćelije su vizualizovane pomoću fluorescentnog mikroskopa za analizu 3D ćelijske kulture (*Thunder Imager Live Cell & 3D Assay, Leica Microsystems, Nemačka*).

12.4.2. Pro-angiogeni potencijal

Morfologija endotelne ćelije je praćena pomoću fluorescentnog mikroskopa kako bi se utvrdilo da li materijali imaju pro-angiogeni karakter odnosno da li stimulišu endotelne ćelije da grade tubule i mreže.

Kod 3D modela ćelijske kulture EA.hy926, ćelije su fiksirane trećeg i sedmog dana kultivacije, a kod analize EA.hy926 ćelija kultivisanih unutar makroporoznih nosača, ćelije su fiksirane 14. dana kultivacije. Oba tipa uzoraka su pripremljena za analizu na sledeći način: pomoću 4% paraformaldehida (PFA) u trajanju od 15 minuta na sobnoj temperaturi, zatim su bunarići isprani tri puta sa PBS. Filamenti aktina u citoskeletonu i nukleus ćelija su obojeni pomoću fluorescentnih boja: faloidin i 4',6-diamidin-2-fenilindol (DAPI) (*Actin Cytoskeleton / Focal Adhesion Staining Kit, Merck, Nemačka*), redom na sledeći način: 0,5% rastvor faloidina i 0,5% rastvor goveđeg serum albumina (eng. *Bovine Serum Albumine, BSA*) u PBS-u su dodati u bunariće i inkubirani preko noći na 4° C, nakon čega su bunarići isprani PBS-om. Permeabilnost ćelijskih membrana je obezbeđena primenom Triton (Triton™ X-100, Merck), zatim su ćelije isprane sa PBS i obojene sa 1 μ g/mL DAPI sa 0,5% BSA u PBS, a zatim isprane 3 puta sa PBS.

Fluorescentne slike su dobijene pomoću fluorescentnog mikroskopa za analizu 3D ćelijske sredine (*Thunder Imager Live Cell & 3D Assay, Leica Microsystems, Nemačka*) na uvećanju od 5x i 20x.

13. Statistička analiza

Značajnost razlika vrednosti tvrdoće po Vickersu, žilavosti loma, i pritisne čvrstoće je određena pomoću *GraphPad Prism 9* softvera. Analizirane grupe su prošle test normalnosti (*Shapiro-Wilk*). U slučaju vrednosti tvrdoće po Vickersu i žilavosti loma korišćen je „ANOVA“ test sa „*Tukey post-hoc*“ testom. Vrednosti pritisne čvrstoće su analizirane korišćenjem student t-testa.

Statistička analiza jačine veze inserata i otpornosti na lom restauriranih zuba sa različitim restaurativnim materijalima je određena pomoću softvera Minitab16 (*Minitab LLC, State College, PA, SAD*). Prvo su provereni uslovi za parametarsku analizu, Kolmogorov-Smirnov test je korišćen za test normalnosti i Levenov test jednakosti razlika. Podaci za jačinu veze su analizirani pomoću „*two way-ANOVA*“ testa za varijable „inserti“ i „restaurativni materijal“ uz primenu Bonferonijeve korekcije i „*Tukey post-hoc*“ komparacije među grupama. Vrednosti otpornosti na lom restauriranih zuba su analizirane parametarskim student t-testom.

Za biološke analize podataka, statistička poređenja su vršena pomoću programa R, RStudio i Tidyverse paketa korišćenjem one-way ANOVA testa sa „*Tukey post-hoc*“ testom ili pomoću student t-testa.

Za sve statističke analize primenjen je prag značajnosti od 0,05.

IV Rezultati i diskusija

14. Nanočestice kalcijum-fosfata dopirane jonima Mg^{2+} i/ili Sr^{2+} sintetisane na 150 °C

U prvom delu doktorske disertacije je ispitan uticaj mono- i binarnog dopiranja jonima magnezijuma i/ili stroncijuma na morfologiju i sastav hidrotermalno sintetisanog hidroksiapatita. Ispitan je uticaj binarnog dopiranja variranjem udela magnezijuma u intervalu 3-6 mol.%, odnosno 1-5 mol.% stroncijuma, tako da je ukupni udeo dopanata bio u opsegu 6-11 mol.% u odnosu na količinu kalcijuma. Uticaj istovremenog prisustva oba dopanta na morfologiju, fazni i elementni sastav i strukturu je poređen sa efektima monodopiranja.

U Tabeli 7 prikazani su rezultati analize elementnog sastava dobijenih kalcijum-fosfatnih prahova sa različitim sadržajem dopanata. Potvrđeno je prisustvo dopanata u svim prahovima, ali odnos $(Ca+M)/P$ (gde je $M = Sr, Mg$) je bio manji od stehiometrijskog $Ca/P = 1,67$ što ukazuje na nastanak kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita. Očekivano, sa porastom nominalne količine dopanata dodate u prekusorsku smešu rastao je i detektovani sadržaj dopanata u prahovima. Pri istom nominalnom sadržaju jona magnezijuma i stroncijuma u prekusorskoj smeši (5 mol.%) značajno veća količina stroncijuma je inkorporirana (1,81 at.% Sr^{2+} jona u Sr5 uzorku) u odnosu na količinu magnezijuma (0,41 at.% Mg^{2+} jona u Mg5 uzorku), što potvrđuje veći afinitet jona stroncijuma u odnosu na jone magnezijuma ka supstituciji jona kalcijuma u strukturi hidroksiapatita [65,164,165].

Posmatrajući elementni sastav prahova u nizu Mg5-Sr1Mg5-Sr5Mg5 vidi se da inkorporirana količina Mg raste sa porastom sadržaja Sr, iako je nominalni sadržaj Mg konstantan. Isti rastući trend se primećuje i u slučaju stroncijuma u nizu Sr5-S5Mg3-Sr5Mg6. Na osnovu ovoga se zaključuje da binarno dopiranje hidroksiapatita jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} omogućava inkorporiranje veće količine jona u odnosu na monodopiranje istim jonima.

Tabela 7. Elementni sastav sintetisanih prahova [152]

Uzorak	Ca [at. %]	P [at. %]	Sr [at. %]	Mg [at. %]	Ca/P odnos	(Ca+Sr+Mg)/P odnos
Sr5	15,18	12,30	1,81	/	1,23	1,38
Mg5	18,45	14,37	/	0,41	1,28	1,31
Sr1Mg5	17,74	14,39	0,56	0,50	1,23	1,31
Sr3Mg3	17,11	14,11	1,33	0,30	1,21	1,33
Sr5Mg3	16,68	14,32	2,11	0,38	1,16	1,34
Sr5Mg4	16,57	14,68	2,09	0,48	1,13	1,30
Sr5Mg5	16,65	14,65	2,17	0,69	1,07	1,26
Sr5Mg6	14,52	14,52	2,17	0,86	1,00	1,21

Poznato je da kod jednojonske supstitucije Ca^{2+} jona jonima manjeg poluprečnika, kao što je jon Mg^{2+} , dolazi do sabijanja kristalne rešetke hidroksiapatita, odnosno suprotno supstitucijom većim jonima kao što je Sr^{2+} dolazi do relaksiranja atoma u neposrednoj okolini i ekspanzije kristalne rešetke [166]. Kao što je već rečeno, u strukturi HAP postoje dve pozicije Ca^{2+} jona: stubasta Ca-I pozicija sa koordinacionim brojem 9 i Ca-II pozicija sa koordinacionim brojem 7 koja se nalazi duž

hidroksilnog kanala. Katjoni malog prečnika teže da zauzmu mesta sa manjim koordinacionim brojem kako bi smanjili elektrostatičko odbijanje okolnih anjona, dok veći katjoni imaju tendenciju da zauzmu pozicije sa većim koordinacionim brojem, kako bi formirali više jonskih veza sa susednim anjonima [167,168].

Pretpostavlja se da mali joni Mg^{2+} zauzimaju Ca-II pozicije duž hidroksilnog kanala, dok se veći joni Sr^{2+} smeštaju u veće Ca-I pozicije čime se smanjuju naprezanja u kristalnoj rešetki i uravnotežuje distorzija kristalne rešetke. Moguće je da se na ovaj način kompenzuju naprezanja koja nastaju sabijanjem HAP rešetke usled prisustva Mg^{2+} jona, što omogućava inkorporiranje veće količine dopanata u HAP strukturu u poređenju sa monodopiranjem. Domeni bogati magnezijumom duž hidroksilnog kanala imaju značajan uticaj na termalnu destabilizaciju apatita i podstiču njegovu faznu transformaciju u visokotemperaturnu β -TCP fazu [60,63].

Na Slici 20 prikazani su difraktogrami sintetisanih prahova sa identifikovanim fazama i obeleženim odgovarajućim karakterističnim kristalnim ravnima za HAP fazu (uzorak Sr5) i β -TCP fazu (Sr5Mg6 uzorak). Na osnovu XRD analize prahova može se uočiti da monodopirani Mg5 i Sr5 prahovi pokazuju difrakcione maksimume karakteristične samo za apatit, odnosno da imaju monofaznu apatitnu strukturu. Sa druge strane, kod svih binarno dopiranih prahova mogu se uočiti pored difrakcionih maksimuma karakterističnih za HAP i difrakcioni maksimumi koji odgovaraju β -TCP fazi odnosno svi Sr,Mg-dopirani prahovi dobijeni u ovoj disertaciji imaju bifaznu kalcijum-fosfatnu strukturu.

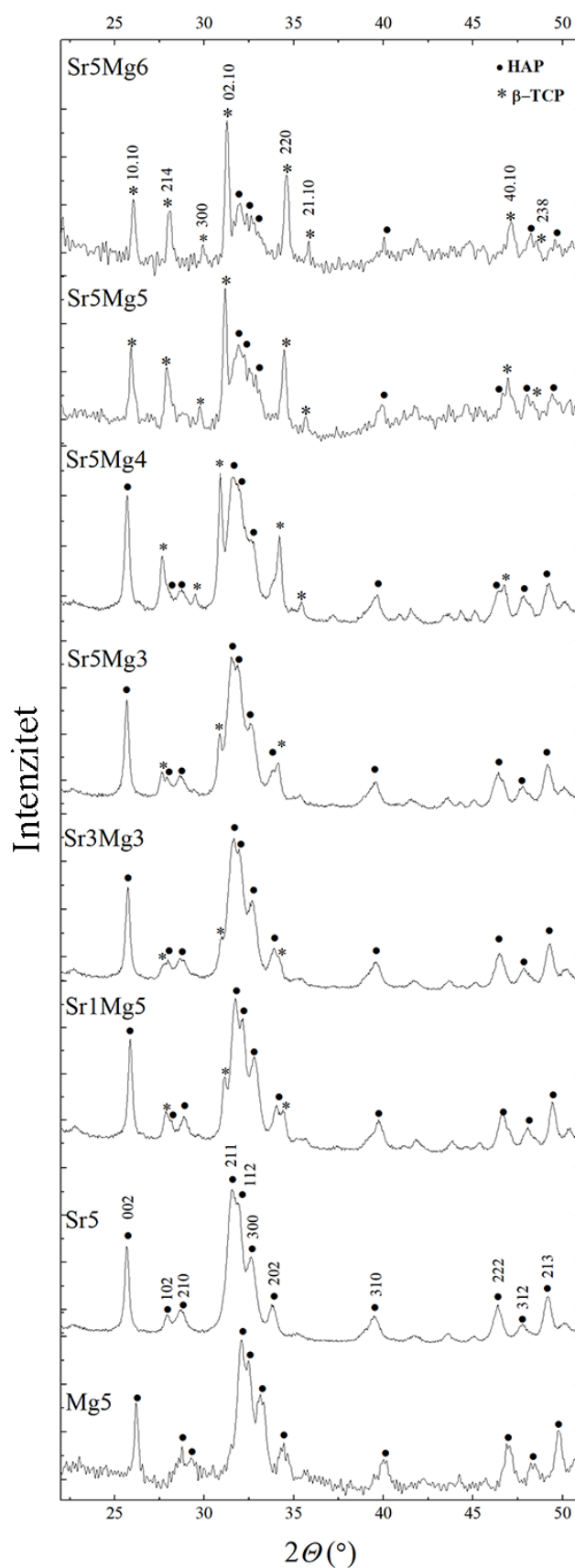
Difrakcioni maksimumi β -TCP faze postaju sve intenzivniji u nizu Sr5Mg3 - Sr5Mg4 - Sr5Mg5 - Sr5Mg6, i β -TCP faza postaje dominantna faza kod uzorka Sr5Mg6, što pokazuje da je nastanak β -TCP faze favorizovan sa povećanjem sadržaja Mg^{2+} jona u strukturi. Međutim, treba napomenuti da pored količine magnezijuma na faznu transformaciju HAP u β -TCP utiče i ukupna količina prisutnih supstitucijskih katjona, čime je došlo do destabilizacije apatitne strukture i formiranja β -TCP faze, što je u skladu sa većom sposobnošću β -TCP strukture da primi supstitucijske katjone.

Naime, romboedarska β -TCP struktura poseduje veći broja slobodnih Ca-pozicija u odnosu na heksagonalu strukturu HAP (pet u poređenju sa dva), uz to samo polovina Ca-IV mesta u β -TCP je zauzeta omogućavajući inkorporiranje veće količine katjona [86,169,170]. Prema literaturi, supstitucijski katjoni dvovalentnih elemenata u β -TCP rešetki zauzimaju Ca-IV i Ca-V pozicije, pri čemu je pronađeno da Mg^{2+} joni preferabilno zauzimaju Ca-V poziciju, a Sr^{2+} joni Ca-IV poziciju zbog većeg koordinacionog broja [69]. Matsunaga i autori su takođe prethodno utvrdili da je energija formiranja defekta negativna za Mg^{2+} jon u poziciji Ca-V, i za Sr^{2+} jon u poziciji Ca-IV, što je vezano za termalnu stabilnost dopiranog β -TCP u vodenoj sredini, čime se potvrđuje zaključak da zajedničko prisustvo jona stroncijuma i magnezijuma sinergetski favorizuje nastanak β -TCP faze [171].

Kristalografskom analizom sintetisanih prahova utačnjavanjem strukture pomoću *Powder Cell* softvera određena je kvantifikacija faza, parametri kristalnih rešetki HAP i β -TCP, veličina kristalita i naprezanje u kristalnoj rešetki, koji su prikazani u Tabeli 8. Veličina kristalita se smanjivala sa povećanjem ukupne količine dopanata što je dovelo do većeg uticaja nano-efekata na izgled difrakcionih maksimuma za vrednosti 2θ u rasponu 30° to 35° kod uzorka Sr5Mg5 i Sr5Mg6 (Slika 20). Iako je kristaliničnost smanjena, prilikom kristalografske analize nije pronađeno prisustvo amorfne faze. Zbog nejednake kristaliničnosti prahova nije moguće uočiti jasan trend promene parametara rešetke i naprezanja sa povećanjem količine dopanata, ali se može izvesti generalni zaključak da je naprezanje u HAP rešetki kod binarno dopiranih prahova nešto manje (0,10-0,26%) nego naprezanje kod monodopiranih prahova (0,30-0,33%).

Ovo smanjenje naprezanja u HAP rešetki je bilo praćeno nastankom β -TCP faze, što se može i kvantitativno videti u Tabeli 8. Osim toga, parametri rešetke a i c kod HAP faze su povećani u poređenju sa teorijskim vrednostima kod svih sintetisanih prahova osim Sr5Mg6. Parametar a kod β -TCP rešetke je bio povećan, dok je parametar c smanjen kod većine uzoraka, što može biti posledica

simultanog dopiranja jonima različite veličine. Smanjenje veličine parametara rešetke kod obe faze u slučaju Sr5Mg6 uzorka je verovatno posledica velike količine inkorporiranih Mg^{2+} jona.



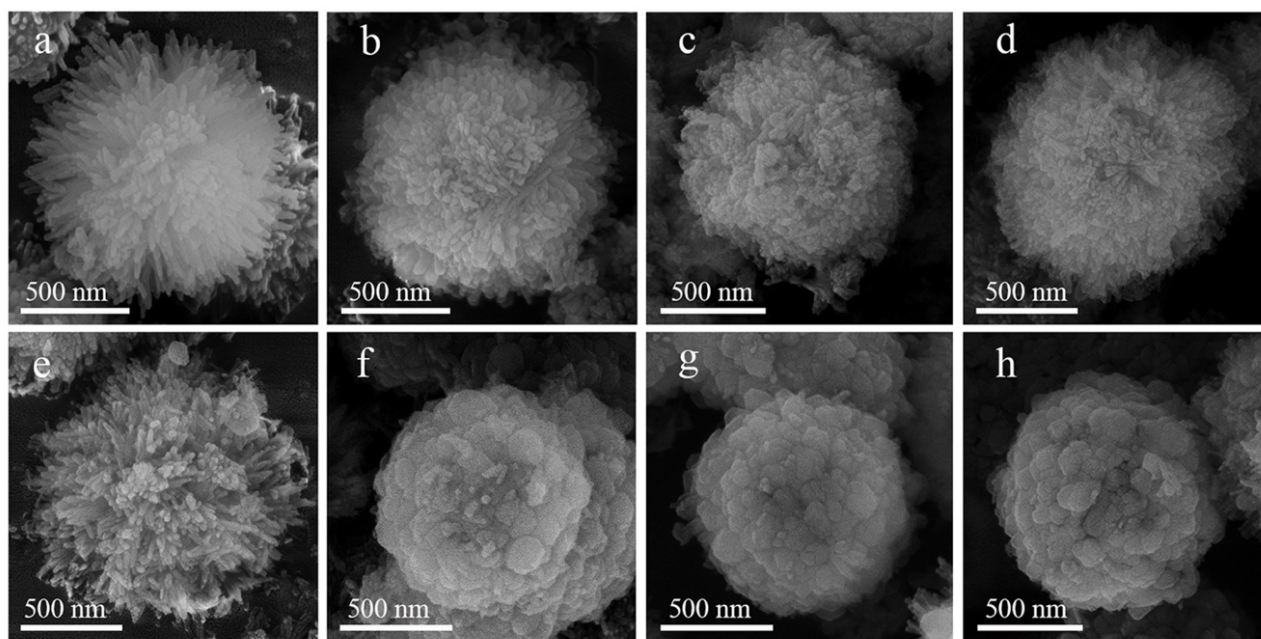
Slika 20. Difraktogrami sintetisanih prahova sa označenim difrakcionim maksimumima za karakteristične kristalne ravni [152]

Tabela 8. Kvantitativni fazni sastav, parametri rešetke, veličina kristalita i naprezanje u kristalnoj rešetki kod sintetisanih prahova, određeni utačnjavanjem strukture pomoću Powder Cell softvera [152]

<i>Uzorak</i>	<i>Fazni sastav</i>	<i>a = b [Å]</i>	<i>c [Å]</i>	<i>Veličina kristalita [nm]</i>	<i>Naprezanje [%]</i>
Mg5	100% HAP	9,4378	6,8793	26,64	0,3048
	76% HAP	9,4310	6,8691	24,87	0,2524
Sr1Mg5	24% β-TCP	10,4116	37,2029	46,59	0,3454
	77% HAP	9,4451	6,8858	20,15	0,2166
Sr3Mg3	23% β-TCP	10,4742	37,2689	13,16	0,4401
	100% HAP	9,4607	6,9005	22,90	0,3258
Sr5	76% HAP	9,4542	6,9033	17,52	0,0999
	24% β-TCP	10,4666	37,3140	24,16	0,1421
Sr5Mg3	65% HAP	9,4506	6,8907	28,25	0,1520
	35% β-TCP	10,4451	37,3846	29,41	0,2895
Sr5Mg4	50% HAP	9,4782	6,9178	16,69	0,2646
	50% β-TCP	10,4661	37,4948	35,54	0,0462
Sr5Mg5	43% HAP	9,3930	6,9045	15,02	0,2344
	57% β-TCP	10,3701	37,0606	51,85	0,1589

Morfologija kalcijum-fosfatnih prahova mono- i binarno dopiranih jonima stroncijuma i magnezijuma sintetisanih hidrotermalno je prikazana na Slici 21. Uočava se da se sferični aglomerati veličine 1-1,5 μm sastoje od čestica nanodimenzija. Kao što se može uočiti, vrsta i količina prisutnih dopanata ima značajan uticaj na veličinu i oblik ovih nanočestica. Naime, supstitucija Ca²⁺ jona većim Sr²⁺ jonima dovodi do ekspanzije rešetke i stimulisanja rasta HAP kristala duž *c* ose, što za posledicu ima izduženi štapičasti oblik čestica Sr-dopiranog HAP [65,172]. Suprotno tome, pored činjenice da mali Mg²⁺ joni ulaze u strukturu HAP i komprimuju rešetku, oni mogu i da budu adsorbovani na površini HAP kristala čime se inhibira rast kristala u *c* pravcu, rezultujuću sa mnogo kraćim i sferičnim česticama [63,65]. Zahvaljujući tome uzorci sa velikim sadržajem Sr (Sr5 i S5Mg3) pokazuju nešto duže nanočestice, u poređenju sa uzorcima sa visokim sadržajem Mg (Mg5 i Sr1Mg5). Povećavanjem ukupne količine dopanata u binarnim Sr,Mg-HAP prahovima morfologija se menjala u skladu sa faznim sastavom, tako da ima štapičasti oblik kod prahova gde je apatitna faza dominantna

(Sr1Mg5, Sr3Mg3, Sr5Mg3), dok sa porastom sadržaja β -TCP faze je morfologija sve više bila sferična stvarajući oblik aglomeratnih čestica nalik karfiolu.



Slika 21. Morfologija čestica sintenisanih prahova hidrotermalno: a) Sr5, b) Mg5, c) Sr1Mg5, d) Sr3Mg3, e) Sr5Mg3, f) Sr5Mg4, g) Sr5Mg5, h) Sr5Mg6 [152]

15. Sinterovani kompakti kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-fosfata sintetisanih na 150 °C dopirani jonima Mg^{2+} i/ili Sr^{2+}

U ovoj sekciji su korišćeni prahovi sintetisani i okarakterisani u sekciji 14, njihovim oblikovanjem u cilindrične kompakte i daljim sinterovanjem dobijeni su sinterovani kompakti kontrolisane poroznosti na bazi kalcijum-fosfata dopiranih jonima magnezijuma i/ili stroncijuma.

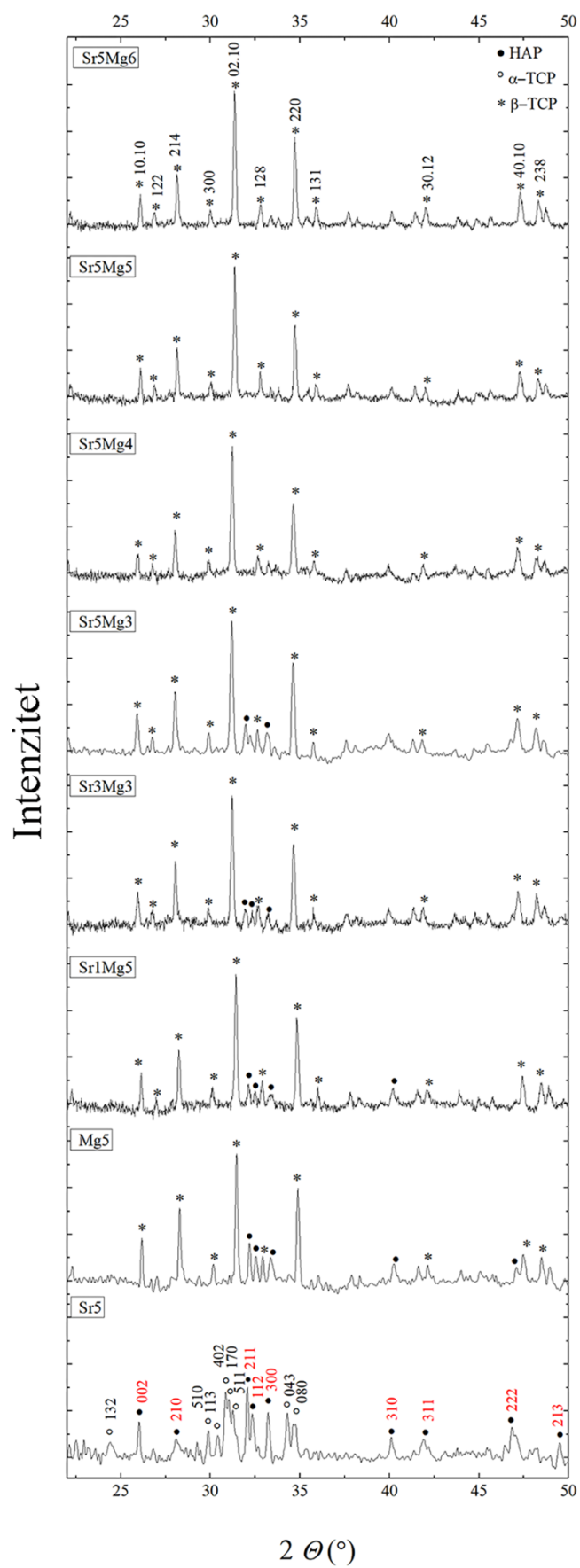
Zagrevanjem kalcijum-deficitarnog hidroksiapatita na temperaturama višim od 800 °C, odnosno 1125 °C dolazi do fazne transformacije HAP u β -TCP i α -TCP fazu, redom. Faza α -TCP je najrastvorljivija faza u nizu, ali takođe i mehanički najslabija, pa je kod biomaterijala namenjenih za primenu pod opterećenjem poželjno izbegavati $\beta \rightarrow \alpha$ transformaciju. Sa druge strane, da bi se eliminisala poroznost, odnosno dobila gusta struktura sinterovanog materijala i eliminisala poroznost, neophodno je primeniti visoke temperature sinterovanja. Jedan od načina kako može da se prevaziđe ovaj problem, jeste dopiranje HAP jonima magnezijuma koji favorizuju nastanak β -TCP faze, ali i tako što pomeraju temperaturu transformacije β -TCP u α -TCP ka višim temperaturama [9,69]. Na ovaj način se omogućava uspešno sinterovanje na visokim temperaturama bez pojave α -TCP faze, što je potvrđeno i u ovoj disertaciji (Slika 22).

Još uvek ne postoji konsenzus kako joni stroncijuma utiču na termalnu stabilnost HAP s obzirom da u literaturi postoje oprečni rezultati koji pokazuju sa jedne strane da joni Sr^{2+} stabilišu HAP, a sa druge da stabilišu β -TCP strukturu. U radovima Curran i autora [76] i Renaudin i autora [173] pokazano je da dopiranje jonima Sr^{2+} dovodi do stabilizacije β -TCP faze, dok je u radovima Mardziah i autora [174] kao i Kavitha i autora [175] pokazano da prisustvo Sr^{2+} jona stabilise HAP strukturu i odlaže njegovu transformaciju u β -TCP pri zagrevanju na 900 °C, odnosno 1100 °C. Očigledno je da efekat stroncijuma na fazni sastav nakon termičkog tretmana značajno zavisi od metode sinteze čestica HAP i količine inkorporiranog Sr.

Na Slici 22 prikazani su difraktogrami kompakata sinterovanih na 1200 °C, identifikovane faze i obeležene karakteristične kristalne ravni za HAP (Sr5 uzorak), β -TCP (Sr5Mg6 uzorak) i za α -TCP (Sr5 uzorak).

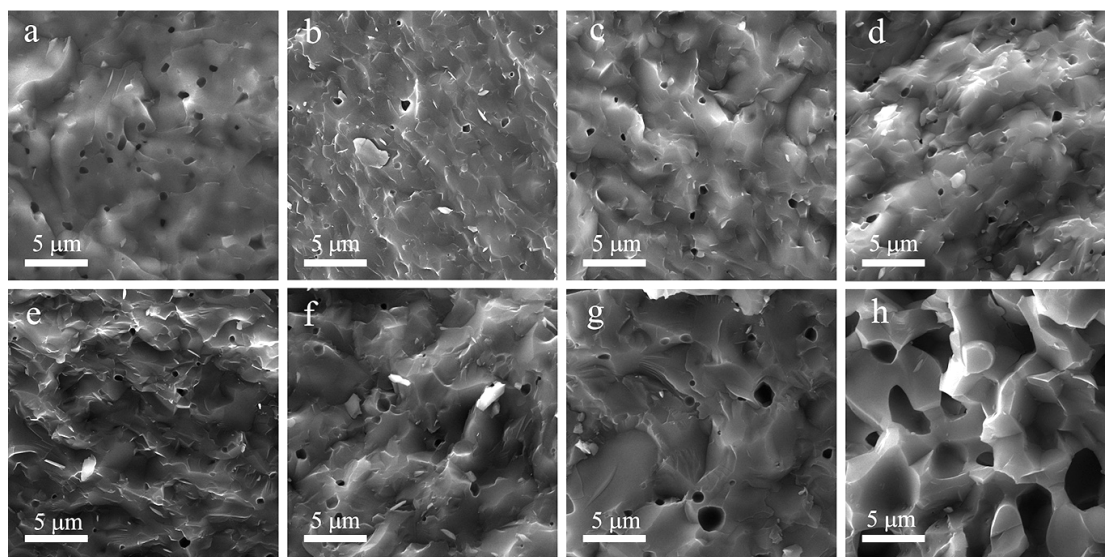
Rezultati dobijeni u ovoj disertaciji pokazuju da supstitucija 5 mol.% Ca^{2+} jonima Sr^{2+} pri hidrotermalnoj sintezi HAP (150 °C, 6 bar) dovodi do stabilizacije apatitne strukture i njene dalje transformacije u α -TCP fazu pri sinterovanju na 1200 °C. Ukoliko se uporedi fazni sastav Sr5 sa sastavom nedopiranog cHAP [150] nakon sinterovanja na 1200 °C može se uočiti niži stepen kristaliničnosti, veći sadržaj α -TCP faze i potpuno odsustvo β -TCP faze. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da inkorporiranje jona stroncijuma u hidrotermalno sintetisani HAP dovodi do stabilizacije α -TCP faze.

Prethodno su Imrie i autori pokazali da simultano dopiranje HAP jonima stroncijuma i magnezijuma reakcijom u čvrstom stanju dovodi do uspešne stabilizacije β -TCP faze [62], dok je sa druge strane u radu Scalera i autora [93] pokazan potpuno suprotan trend stabilizacije apatitne strukture. Na XRD difraktogramima svih binarno dopiranih HAP uzoraka dobijenih u ovoj disertaciji se vide karakteristični difrakcioni maksimumi za β -TCP fazu, dok je HAP faza prisutna u maloj količini (uzorci Sr1Mg5, Sr3Mg3, Sr5Mg3) ili potpuno odsutna. Ovi rezultati ukazuju da simultano dopiranje Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima pri hidrotermalnoj sintezi HAP dovodi do stabilizacije β -TCP faze i pomeranja njene transformacije u α -TCP ka višim temperaturama.

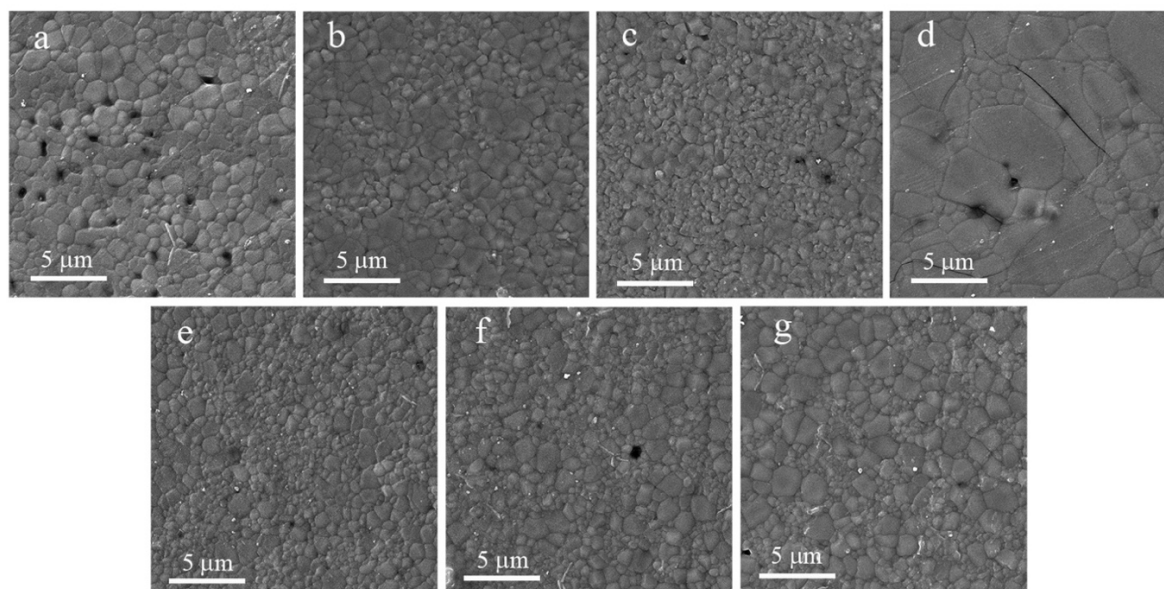


Slika 22. XRD difraktogram Sr i/ili Mg dopiranih HAP kompakata sinterovanih na 1200 °C (radi jasnoće karakteristične kristalne ravni za α -TCP i HAP su obeležene na Sr5 uzorku, a za β -TCP na Sr5Mg6 uzorku) [152]

Na Slici 23 je prikazana mikrostruktura prelomne površine sinterovanih kalcijum-fosfatnih kompakata. Mikrostruktura keramičkih kompakata značajno zavisi od faznog sastava i parametara procesiranja kao što su visina primenjenog pritiska tokom presovanja, temperatura i vreme sinterovanja, ali i od morfologije polaznih čestica odnosno prisustva mekih i tvrdih aglomerata koji utiču na sposobnost organizacije čestica prilikom presovanja. Sa povećanjem količine dodatog magnezijuma, kalcijum-fosfatne nanočestice su bile sve gušće pakovane u sferične aglomerate, što je uticalo na njihovu organizaciju prilikom presovanja i dovelo do zaostale poroznosti u strukturi odnosno smanjene gustine sinterovanih uzoraka (Slika 23). Na Slici 24 prikazane su mikrografije termički nagriženih, prethodno ispoliranih površina sinterovanih kalcijum-fosfatnih kompakata, dok su u Tabeli 9 date vrednosti srednje veličine zrna, srednje veličine pora, gustine i relativnog linearnog skupljanja.



Slika 23. FESEM mikrografije mikrostrukture preloma uzoraka sinterovanih na 1200 °C: a) Sr5, b) Mg5, c) Sr1Mg5, d) Sr3Mg3, e) Sr5Mg3, f) Sr5Mg4, g) Sr5Mg5, h) Sr5Mg6 [152]



Slika 24. FESEM mikrografije termički nagriženih uzoraka sinterovanih na 1200 °C: a) Sr5, b) Sr5Mg3, c) Sr5Mg4, d) Sr5Mg5, e) Mg5, f) Sr1Mg5, g) Sr3Mg3 [152]

Kalcijum-fosfatni kompakti koji sadrže magnezijum u strukturi su pokazali više vrednosti gustine u odnosu na Sr5 uzorak (Tabela 9) sve do određenog ukupnog sadržaja dopanata (n=9, uzorak Sr5Mg4), nakon čega je gustina značajno opala. Relativno linearno skupljanje (RLS) binarno dopiranih kalcijum-fosfatnih kompakata nakon sinterovanja na 1200 °C je opadalo u nizu Sr5Mg3-Sr5Mg4-Sr5Mg5-Sr5Mg6 sa 17,3 na 10,2% što je u skladu sa mikrografijama mikrostrukture preseka kompakata.

Tabela 9. Srednja veličina zrna (SVZ), srednja veličina pora (SVP), gustina, relativno linearno skupljanje (RLS) kalcijum-fosfatnih uzoraka sitnerovanih na 1200 °C [152]

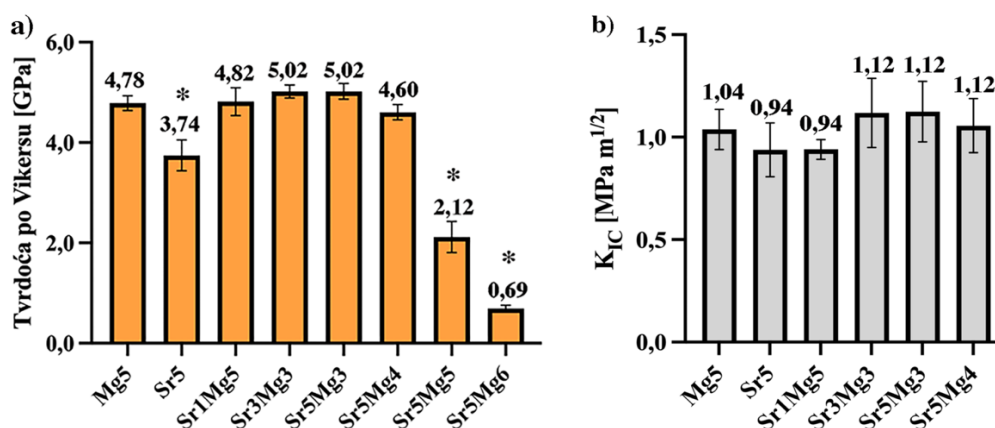
<i>Uzorak</i>	<i>SVZ [μm]</i>	<i>SVP [μm]</i>	<i>ρ [g/cm^3]</i>	<i>RLS [%]</i>
Sr5	0,50	0,97	2,73	16,6
Mg5	0,40	0,61	2,89	17,8
Sr1Mg5	0,45	0,62	2,80	17,0
Sr3Mg3	0,40	0,72	2,93	17,8
Sr5Mg3	0,40	0,71	2,85	17,3
Sr5Mg4	0,63	0,64	2,76	17,0
Sr5Mg5	1,85	1,93	2,53	15,3
Sr5Mg6	/	/	2,15	10,2

Srednja vrednost veličine zrna monodopiranog Sr5 je bila skoro 60% veća u odnosu na veličinu zrna kod Mg5 (Slika 24, Tabela 9), što potvrđuje da Mg^{2+} joni imaju inhibiraju rast zrna u HAP strukturi [70]. Srednja veličina zrna kod binarno dopiranih uzoraka je iznosila oko 0,40-0,45 μm u slučaju Sr1Mg5, Sr3Mg3 i Sr5Mg3, i dalje je rasla sa povećanjem ukupnog sadržaja dopanata, pa je tako srednja veličina zrna kod Sr5Mg5 iznosila 1,85 μm . Srednja veličina pora je bila manja kod monodopiranog Mg5 nego kod Sr5 uzorka (0,61 u odnosu na 0,97 μm), dok je veličina pora kod binarno dopiranih kalcijum-fosfata bila u opsegu 0,62-0,72 μm osim u slučaju Sr5Mg5 gde je ona bila značajno veća i iznosila 1,93 μm .

Može se zaključiti da simultano dopiranje jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} do ukupnog sadržaja od 10 mol.% doprinosi smanjenju prosečne veličine zrna, potpomaže denzifikaciju i povećava stepen relativnog linearnog skupljanja u poređenju sa monodopiranim HAP sa 5 mol.% Sr^{2+} . Najveće vrednosti relativnog linearnog skupljanja i gustine su uočene kod uzorka Sr3Mg3 – 17,8% i 2,94 g/cm^3 , što predstavlja 95 % teorijske gustine za β -TCP.

Mehanička svojstva materijala, odnosno tvrdoća po Vickersu i žilavost loma materijala na bazi HAP i BCP mogu da variraju u opsegu 1,2-13,6 GPa i 0,9-1,75 $\text{MPa}\cdot\text{m}^{1/2}$ [150,176,177]. Vrednosti tvrdoće po Vickersu i žilavosti loma dopiranih kalcijum-fosfatnih kompakata dobijenih u ovoj disertaciji se nalaze u pomenutim opsezima. Mg5 uzorak je pokazao značajno veću tvrdoću po Vickersu u poređenju Sr5 (4,78 GPa u poređenju sa 3,74 GPa) kao posledica manje poroznosti i manje veličine zrna kod uzorka Mg5. Binarno dopiranje HAP jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} je značajno poboljšalo tvrdoću materijala suzbijanjem nastanka α -TCP faze prilikom sinterovanja u poređenju sa nedopiranim HAP dobijenim sličnom metodom (3,71 GPa) [114].

U poređenju sa Sr5, simultano prisustvo Sr^{2+} i Mg^{2+} jona je značajno smanjilo poroznost i srednju veličinu zrna, kao i inhibiralo nastanak α -TCP faze, što je rezultovalo značajno višim vrednostima tvrdoće po Vikersu ($p < 0,05$) (Slika 25). Svi dopirani uzorci sa ukupnom količinom supstitucijskih jona $n < 10$ mol.% su imali sličnu tvrdoću, što je u skladu sa njihovim sličnim veličinama zrna i pora. Međutim, kada je količina supstitucijskih jona dalje povećavana, srednja veličina zrna je više nego udvostručena, a mikroporoznost povećana. Velika zrna i pore u mikrostrukтури, zajedno sa pojavom pukotina koje se prostiru kroz zrna usled abnormalnog rasta zrna Sr5Mg5 uzorka je dovelo do značajnog smanjenja tvrdoće u poređenju sa uzorcima sa manjim sadržajem dopanata. Dalje povećanje koncentracije Mg^{2+} jona je dovelo do visoko porozne strukture Sr5Mg6 male gustine ($2,15 \text{ g/cm}^3$) kao posledica nepotpune densifikacije.

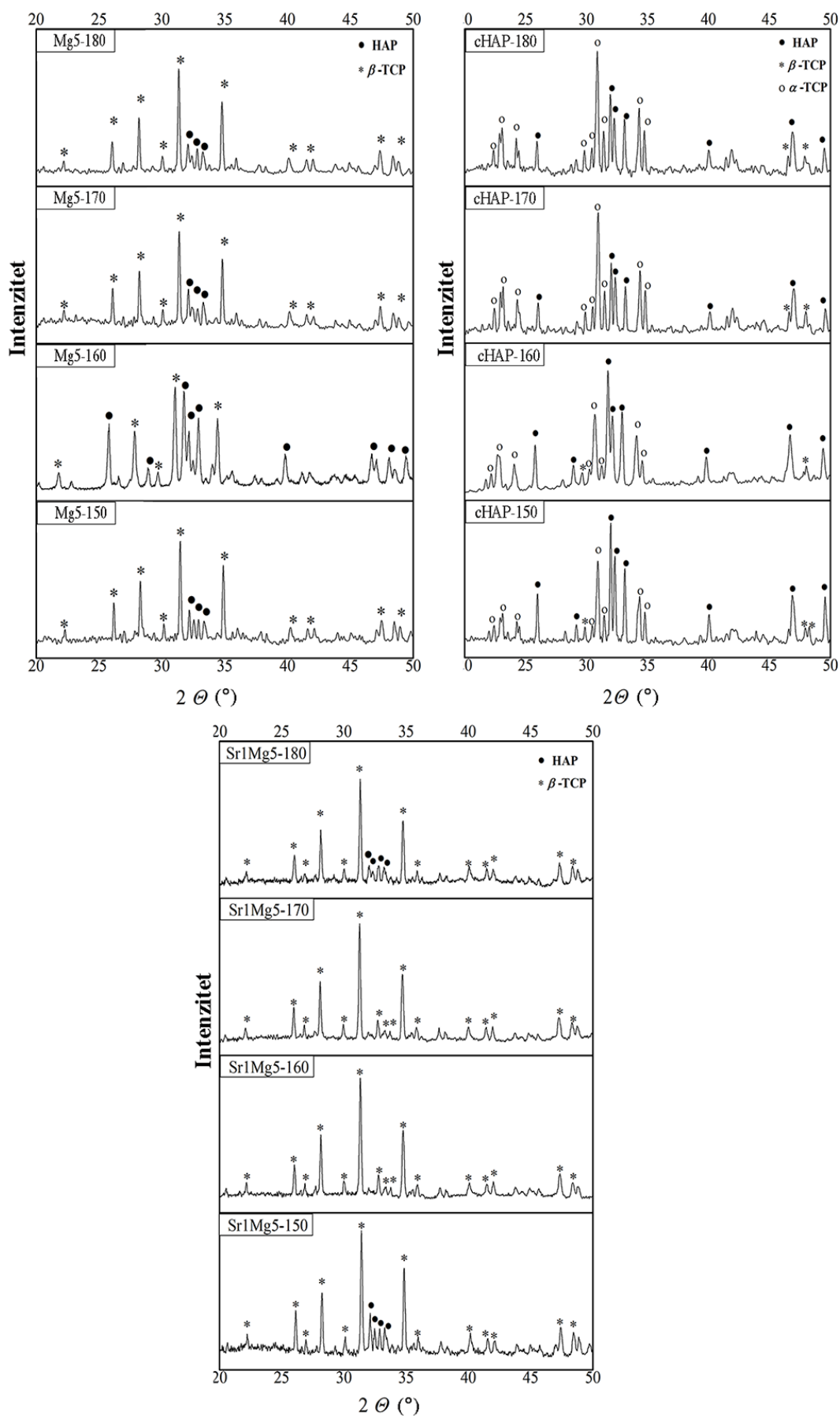


Slika 25. Tvrdoća po Vikersu i žilavost loma sinterovanih kompakata na bazi HAP dopiranog jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} , * - statistička značajnost $p < 0,05$ [152]

Žilavost loma kod svih binarno dopiranih Sr,Mg-HAP sinterovanih kompakata je bila slična ($p > 0,05$) kao i kod monodopiranih HAP, kao i nedopiranog HAP dobijenog sličnom metodom [114]. Dobijene vrednosti za žilavost loma kod Sr,Mg-HAP sinterovanih materijala su slične prethodno literaturnim vrednostima za dentin kod ljudi, koji je bio u opsegu $1,13\text{--}2,02 \text{ MPa m}^{1/2}$ [178], što čini sinterovane Sr,Mg kompakte pogodnim materijalima za primenu u restaurativnoj stomatologiji u vidu dentalnih inserata za zamenu dentina.

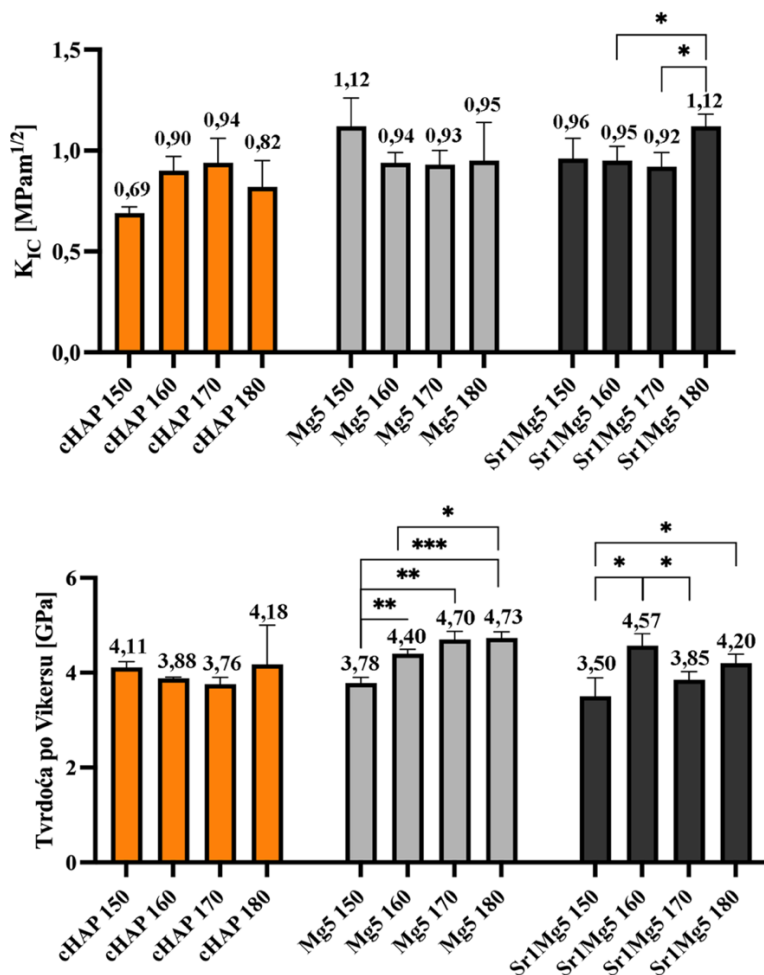
16. Uticaj parametara sinteze prahova na krajnja svojstva sinterovanih kompakata

U ovoj sekciji je ispitan uticaj parametara sinteze dopiranih prahova HAP na svojstva sinterovanih kompakata. Uslovi hidrotermalne sinteze za dobijanje prahova HAP su varirani u rasponu od $150\text{--}180^\circ\text{C}$ odnosno opsegu pritisaka od 6-12 bar. U tu svrhu izabrani su prahovi sledećeg sastava: nedopirani HAP kao kontrola (cHAP), monodopirani Mg5 i binarno dopirani HAP sastava Sr1Mg5. U nastavku su dati fazni sastavi i rezultati mehaničkih ispitivanja kompakata presovanih na 300 MPa uniaksijalno i sinterovanih na 1200°C fabrikovani polazeći od prahova dobijenih na različitim temperaturama. Na difraktogramima sinterovanih materijala se ne uočava jasan trend uticaja temperature sinteze na fazni sastav nakon sinterovanja, pa tako kod nedopiranog HAP su fazni sastavi slični za uslove sinteze $150\text{--}160^\circ\text{C}$ gde je HAP dominantna kristalna faza i za $170\text{--}180^\circ\text{C}$ gde po intenzitetu dominiraju difrakcioni maksimumi karakteristični za α -TCP, ali se i međusobno razlikuju u količini prisutne β -TCP faze (Slika 26). Sa druge strane, kod Mg5 jedina temperatura koja „odskae“ je 160°C gde se javlja značajno veći sadržaj HAP faze, a kod Sr1Mg5 uzorka je fazni sastav sinterovanih kalcijum-fosfatnih kompakata sličan za temperature sinteze $160\text{--}170^\circ\text{C}$, a razlikuje se od faznog sastava kompakata gde je kao polazni prah korišćen Sr1Mg5 sintetisan na 150°C ili 180°C , koji sadrže i sekundarnu HAP fazu.



Slika 26. Uticaj parametara sinteze na fazni sastav sinterovanih kompakata nedopiranog (cHAP) i kalcijum-fosfata monodopiranih jonima Mg^{2+} (Mg5) ili jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} (Sr1Mg5)

Temperatura sinteze nije značajno uticala na tvrdoću sinterovanih kompakata cHAP ($p=0,6038$), dok je kod Mg5 i Sr1Mg5 temperatura imala značajnu ulogu, pri čemu je statistička značajnost bila veća u slučaju Mg5 (Slika 27). Na tvrdoću materijala direktno utiče veličina zrna, odnosno sa porastom veličine zrna dolazi do opadanja vrednosti tvrdoće, što je u skladu sa određenom veličinom zrna Mg5 i Sr1Mg5 sinterovanih materijala datih u Tabeli 10. Kod monodopiranog Mg5 se vidi jasan trend smanjenja srednje veličine zrna sa porastom temperature sinteze sa 150 °C na 180 °C, dok je ovaj trend kod Sr1Mg5 nelinearan tj. najmanja zrna su uočena u slučaju uzorka dobijenog na 160 °C, a najveća za uzorak sintetisan na 150 °C.

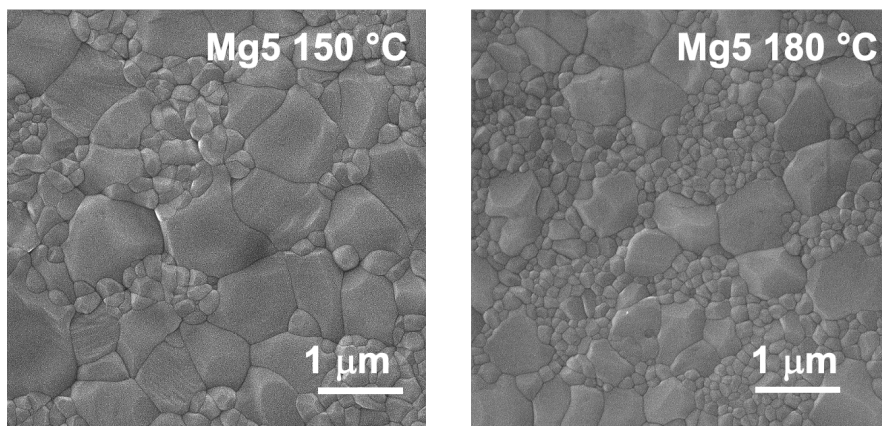


Slika 27. Mehanička svojstva kompakata sinterovanih na 1200 °C na bazi nedopiranog HAP (cHAP), monodopiranog jonima magnezijuma (Mg5) i binarno dopiranog HAP jonima stroncijuma i magnezijuma (Sr1Mg5) u zavisnosti od temperature hidrotermalne sinteze (150-180 °C)

Tabela 10. Srednja veličina zrna mono- i binarno dopiranih kalcijum-fosfatnih kompakata procesiranih od polaznih prahova sintetisanih hidrotermalno na različitim temperaturama

Srednja veličina zrna [μm]				
	150 °C	160 °C	170 °C	180 °C
Mg5	0,46 $\pm$ 0,30	0,35 $\pm$ 0,23	0,29 $\pm$ 0,28	0,24 $\pm$ 0,20
Sr1Mg5	0,41 $\pm$ 0,32	0,29 $\pm$ 0,14	0,37 $\pm$ 0,17	0,38 $\pm$ 0,16

Istovremeno prisustvo malih i velikih zrna kod Mg5 kompakta na bazi praha sintetisanog na 180 °C (Slika 28) je dovelo do statistički značajno više vrednosti za tvrdoću u poređenju sa sintezama na 150 i 160 °C.



Slika 28. Uporedni prikaz uticaja temperature sinteze Mg5 praha na mikrostrukturu Mg5 sinterovanih kompakata

U slučaju binarno dopiranog Sr1Mg5, vrednosti tvrdoće su rasle u skladu sa opadanjem veličine zrna, a najviša vrednost je uočena kod uzorka sintetisanog na 160 °C, koja je značajno viša u odnosu na Sr1Mg5 sintetisan na 150 i 170 °C.

Žilavost loma sinterovanih materijala je imala suprotan trend odnosno opadala je sa smanjenjem veličine zrna, međutim ove vrednosti se nisu značajno razlikovale kod cHAP i Mg5 uzoraka. Statistički značajno povećanje žilavosti loma je postignuto samo kod binarno dopiranog Sr1Mg5 dobijenog hidrotermalno na 180 °C u poređenju sa prahovima dobijenim na 160 i 170 °C.

Dobijeni rezultati su od izuzetne važnosti za translaciju rezultata istraživanja na nivo industrijske proizvodnje koji zahteva poznavanje parametara sinteze i procesiranja koji mogu uticati na neujednačenost kvaliteta krajnjeg proizvoda. Na osnovu ovih rezultata može se zaključiti da je precizno kontrolisanje parametara sinteze polaznog praha izuzetno bitno i da razlike u temperaturi od 10 °C mogu dovesti do značajnih promena u faznom sastavu i mehaničkim svojstvima krajnjeg proizvoda, što može imati posledice na krajnju primenu.

17. Primena sinterovanih kalcijum-fosfatnih kompakata kao dentalnih inserata u stomatologiji

U prethodnim istraživanjima Ležaja i autora i Ayoub i autora je ispitana potencijalna primena dentalnih inserata baziranih na HAP kao dentinskih zamenika za ispunu velikih kaviteta zuba u posteriornoj regiji [113–115]. Budući da bi inserti trebalo da budu prekriveni dentalnim kompozitom za dobra zaptivna i estetska svojstva, pored zadovoljavajućih mehaničkih svojstava, oni treba da poseduju i dobru sposobnost vezivanja sa komercijalno dostupnim restaurativnim materijalima. Ranije je potvrđeno da dentalni inserti na bazi HAP bez prisustva dopanata ostvaruju odličnu vezu sa komercijalnim dentalnim materijalima sa vrednostima jačine veze na smicanje (SBS) u opsegu od 9,3-14,3 MPa za SBU_TE i 8,2-15,7 MPa za SBU_SE protokol [113–115].

Kao što je pokazano u prethodnim sekcijama, dopiranje kalcijum-fosfata jonima stroncijuma i magnezijuma dovodi do distorzije kristalne rešetke i uticaja na fizičko-hemijska i mehanička svojstva materijala. Da bi se dobila gusta keramika sa zadovoljavajućim mehaničkim svojstvima neophodno je primeniti sinterovanje na temperaturama višim od 1000 °C, usled čega dolazi do fazne transformacije hidroksiapatita u visokotemperaturne TCP faze. Prisustvo rastvorljive i bioaktivne α -TCP faze može biti nepovoljno za primenu kao dentalnog restaurativnog materijala usled pogoršanih mehaničkih svojstava. Kako prisustvo Mg^{2+} jona stabilise β -TCP fazu i odlaže formiranje α -TCP, inserti bazirani na Mg-dopiranom HAP mogu zapravo imati superiornija svojstva u odnosu na čist HAP. Osim toga, uticaj dopiranja na fazni sastav dovodi do drugačijeg ponašanje prilikom primene kliničkih protokola poput kiselinskog nagrizanja.

U nastavku je prikazan uticaj prisustva Sr^{2+} i/ili Mg^{2+} u strukturi CaP na jačinu veze inserata sa komercijalno dostupnim restaurativnim materijalima aplikovanih korišćenjem dva klinička protokola: bez kiselinskog nagrizanja (*eng. self-etch, SE*) i sa totalnim kiselinskim nagrizanjem (*eng. total etch, TE*) 37% fosfornom kiselinom. Na ovaj način je optimizovan tip inserta u vidu faznog sastava i mehaničkih svojstava, tip restaurativnog materijala, kao i klinički protokol nagrizanja. Usled postojanja značajnih razlika u sastavu i svojstvima Mg5 dobijenih na 150 i 160 °C, oba uzorka su ispitana kao potencijalni dentinski zamenici za primenu u stomatologiji zajedno sa uzorkom Sr5 (150 °C). Pored toga, dalje je ispitana i mogućnost primene binarno dopiranog Sr3Mg3 sinterovanog kompakta i upoređena svojstva sa monodopiranim HAP insertima Sr5 i Mg5.

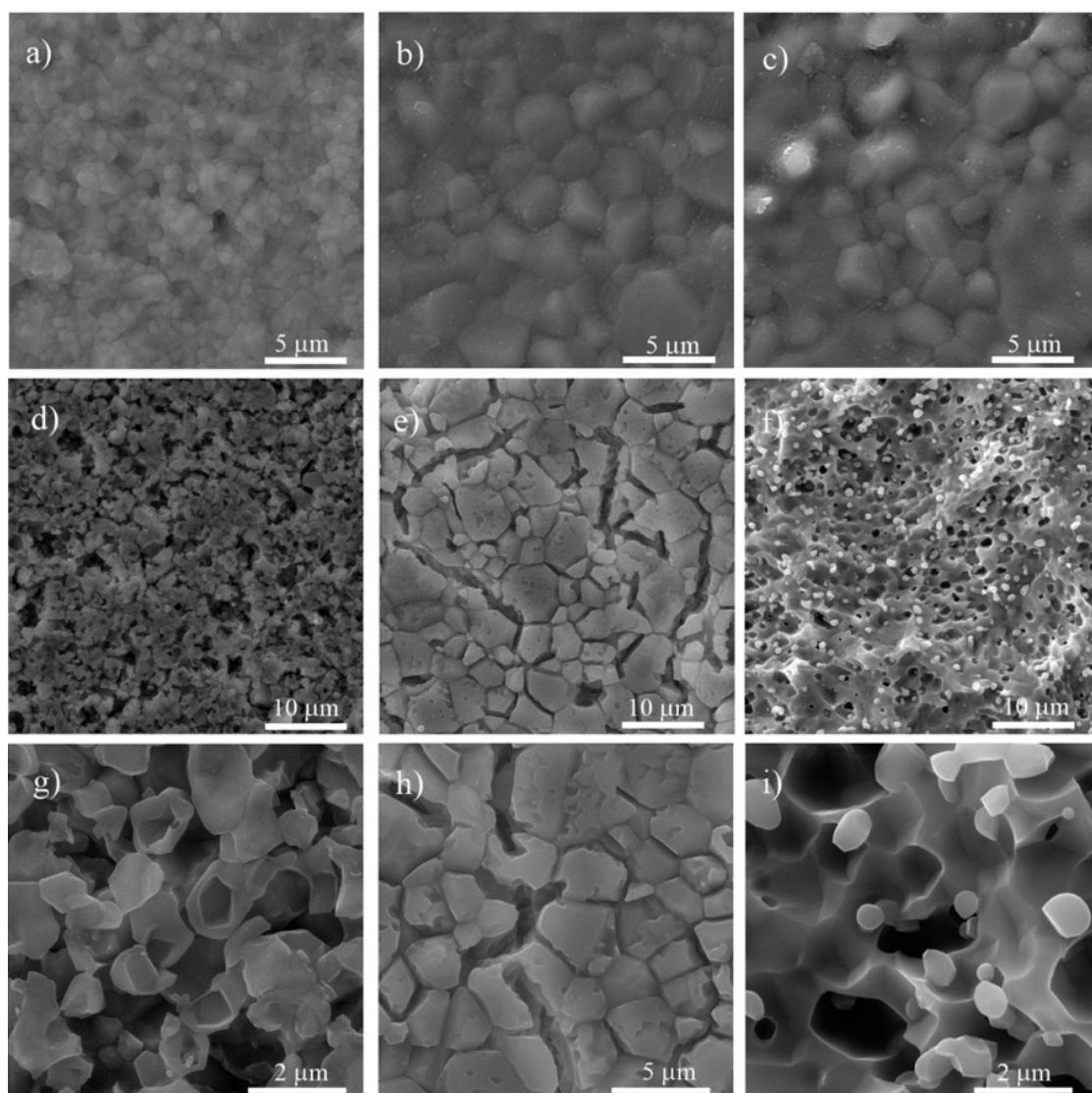
17.1. Monodopirani kalcijum-fosfatni dentalni inserti

Radi lakšeg poređenja u Tabeli 11 je dat pregled svojstava inserata Sr5, Mg5-150 i Mg5-160. Dentalni inserti na bazi Sr5 imaju dvofaznu strukturu sa većinskim udelom α -TCP faze, dok kod Mg-dopiranih figurišu HAP i β -TCP u različitim odnosima. Imajući u vidu različitu hemijsku i mehaničku postojanost ovih faza, očekivano je da će se drugačije ponašati prilikom kiselinskog nagrizanja za primenu kliničkog protokola totalnog nagrizanja, kao i prilikom testa na smicanje.

Na Slici 29 su prikazane mikrografije površina površina dentalnih inserata pre i posle nagrizanja 37% H_3PO_4 u trajanju od 15 s. Na mikrografijama se jasno uočava različiti stepen rastvaranja i stvaranje mikroporoznosti u zavisnosti od vrste uzorka. Mg5-160 pokazuje intragranularno rastvaranje u kristalnim zrnima, dok je kod Mg5-150 dominantno rastvaranje po granicama zrna usled čega su formirane pore u obliku kanala u strukturi. Razlika u rastvaraju ova dva uzorka verovatno je posledica različitog odnosa HAP/ β -TCP faza u strukturi. Kod uzorka Sr5 koji sadrži najrastvorljiviju α -TCP fazu, nakon kiselinskog nagrizanja je uočeno prisustvo sfernih pora ravnomerno raspoređenih po celoj površini, dajući izgled površine sličan dentinu.

Tabela 11. Uporedni prikaz svojstava pojedinih dentalnih inserata (Mg5-160 prethodno ispitan u master tezi Tamare Matić [118])

<i>Uzorak</i>	<i>Fazni sastav</i>	<i>HV</i> [GPa]	<i>K_{IC}</i> [MPa·m ^{1/2}]	<i>ρ</i> [g/cm ³]	<i>RLS</i> [%]
<i>Sr5</i>	48% HAP	3,74 ± 0,31	0,94 ± 0,13	2,80	16,60
	52% α-TCP				
<i>Mg5-150</i>	20% HAP	4,78 ± 0,15	1,04 ± 0,10	2,92	17,80
	80% β-TCP				
<i>Mg5-160 [118]</i>	60% HAP 40% β-TCP	5,15 ± 0,23	1,00 ± 0,12	3,03	21,70



Slika 29. Površina inserta pre (a-c) i nakon (d-i) kiselninskog predtretmana sa 37% fosforinom kiselinom u trajanju od 15 s, a,d,g- Mg5-160, b,e,h-Mg5-150, c,f,i- Sr5 [118,179]

Vrednosti žilavosti loma kod svih inserata se nalaze u opsegu 0,94-1,04 MPa·m^{1/2} što je slično vrednostima za inserte na bazi nedopiranog HAP [114], kao i približno vrednostima za dentin koje se kreću u opsegu 1,13-2,02 MPa·m^{1/2} [178]. Srednja vrednost tvrdoće uzoraka je značajno varirala u opsegu 3,74-5,15 GPa u zavisnosti od tipa inserta. Mg-dopirani inserti bez obzira na temperaturu sinteze su pokazali značajno veću tvrdoću ($p < 0,05$) u odnosu na Sr5 uzorak. Kao što je u prethodnoj sekciji pokazano, Sr5 mikrostrukturu čine velika zrna sa prisustvom transgranularnih pukotina koje dodatno slabe strukturu. Vrednost tvrdoće raste sa smanjenjem veličine zrna, a poznato je da dopiranje HAP Mg²⁺ jonima inhibira rast zrna, što objašnjava veću tvrdoću po Vickersu Mg-dopiranih inserata u poređenju sa Sr5. Najveća vrednost RLS kod Mg5-160 pokazuje najveći stepen densifikacije strukture nakon sinterovanja na 1200 °C. Inserti na bazi Mg5-160 su takođe pokazali i najvišu vrednost za tvrdoću po Vickersu, što je verovatno sinergijska posledica hidrotermalnog tretmana na višoj temperaturi i dopiranja Mg²⁺ jonima. Viša temperatura i pritisak tokom sinteze su uticali na nešto veći sadržaj Mg²⁺ jona inkorporiranog u prah, što je dovelo do drugačijeg faznog sastava i mikrostrukture, pre svega smanjene veličine zrna koja je rezultirala povećanjem tvrdoće. Mehanička svojstva inserata slična prirodnom zubu ukazuju da konvencionalni instrumenti u kliničkoj praksi mogu da se koriste za postavljanje i uklanjanje inserata, kao i adaptaciju njihovog oblika bez potrebe za ulaganjem u dodatne specifične instrumente, što je od velike važnosti za samu kliničku primenu.

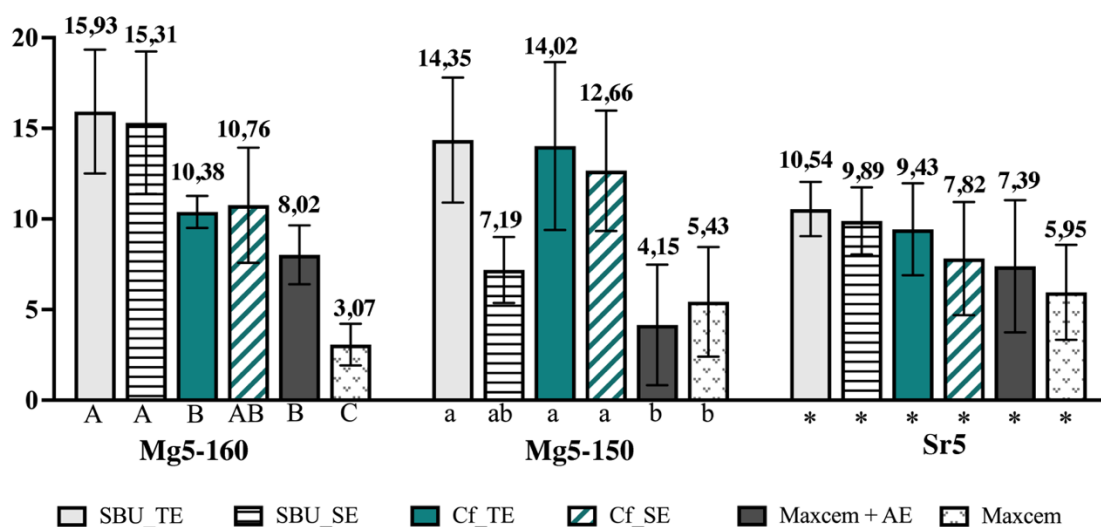
Sposobnost vezivanja monodopiranih inserata sa hibridnim univerzalnim kompozitom Filtek Z250 aplikovanim sa dva različita univerzalna adheziva koji sadrže MDP: *Single Bond Universal* i *Clearfil Universal*, kao i sposobnost vezivanja sa Maxcem Elite dentalnim cementom na bazi smole je ispitan koristeći SE i TE protokole sa 37% fosfornom kiselinom. Adhezivi koji sadrže MDP su odabrani jer MDP poseduje metakrilne i fosfatne grupe koje mogu da reaguju sa Ca²⁺ jonima iz HAP da nagrade soli [116,117]. Dodatno, hidrofobnost MDP može smanjiti permeabilnost vode čime se smanjuje degradacija usled hidrolize [180].

Vrednosti jačine veze koju ostvaruju monodopirani inserti sa različitim restaurativnim materijalima aplikovanim prema SE i TE kliničkim protokolima su prikazani na Slici 30. Svi inserti su pokazali vrednosti jačine veze na smicanje u rang u prethodno publikovanih za dentin [181]. Najviša SBS vrednost monodopiranih inserata je uočena kod Mg5-160 inserta, koja je bila statistički značajno viša u poređenju sa Sr5. Ovo je verovatno posledica sa jedne strane njegove bifazne strukture bogate HAP-om i odsustva α -TCP faze, a sa druge usled gušće mikrostrukture koja je uticala na mehanička svojstva i površinsko rastvaranje usled kiselinskog nagrivanja inserta.

Rezultati testa jačine veze restaurativnih materijala i inserata su pokazali postojanje statistički značajne razlike za različite inserte ($p = 0,028$) kao i za različite restaurativne materijale ($p < 0,001$). Što se tiče tipa inserta, Mg5-160 je ostvario značajno jaču vezu ($10,6 \pm 4,8$ MPa) sa restaurativnim materijalima u odnosu na Sr5 ($8,6 \pm 1,7$ MPa) ($p < 0,05$), dok je Mg5-150 imao vrednosti između ova dva tipa inserta ($9,6 \pm 4,6$ MPa) [179]. Svi ispitani inserti na bazi monodopiranih CaP su imali SBS vrednosti sa SBU univerzalnim adhezivom slične onim za inserte na bazi nedopiranih CaP: 10,54-15,93 MPa u poređenju sa 9,3-14,3 MPa za TE protokol, i 7,19-15,31 MPa u poređenju sa 8,2-18,5 MPa za SE protokol [113,114]. Mg5-160 je pokazao najvišu srednju vrednost jačine veze (~ 16 MPa) među svim CaP insertima, pri čemu je korišćen SBU adheziv i TE protokol.

U proseku, SBU adheziv je imao nešto više SBS vrednosti u poređenju sa Cf adhezivom bez obzira na primenjen protokol. Međutim, razlika između ova dva adheziva je bila statistički značajna samo u slučaju Mg5-160 inserta sa primenom TE protokola. Nedavno je pokazano da Cf ima značajno veći ugao kvašenja (manju kvašljivost) sa gleda u poređenju sa SBU adhezivom, što može predstavljati objašnjenje za ostvarivanje bolje veze između inserata bogatih HAP fazom i SBU adheziva [182].

Jačina veze na smicanje [MPa]

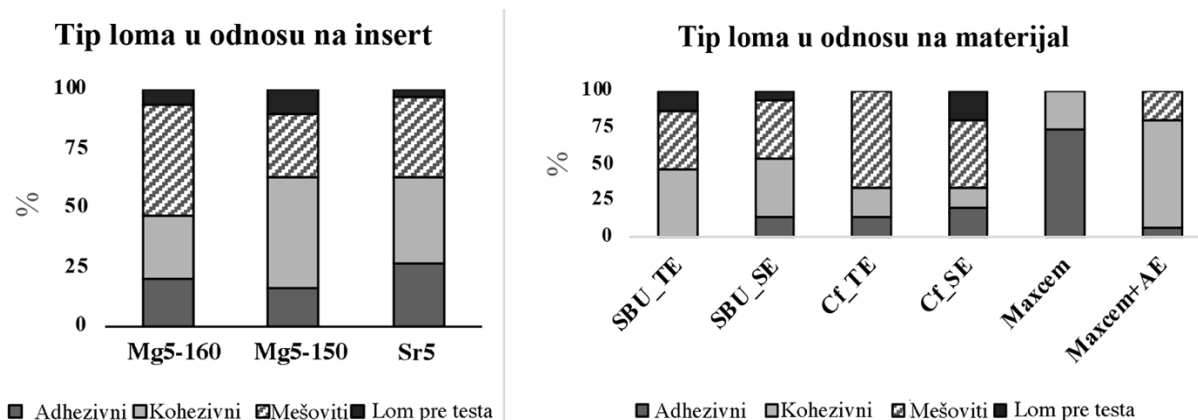


Slika 30. Jačina veze na smicanje dentalnih inserata na bazi monodopiranog HAP sa različitim komercijalnim restaurativnim materijalima (SBU-Single Bond Universal adheziv, Cf- Clearfil Universal adheziv, Maxcem -Maxcem Elite cement, TE- totalno nagrivanje, SE- samonagrivanje, AE – kiselinsko nagrivanje). Različita velika slova ukazuju na statističku značajnost u okviru Mg5-160 grupe, različita mala slova ukazuju na statističku značajnost u okviru Mg5-150 grupe, isti simboli u Sr5 grupi ukazuju na odsustvo statistički značajnih razlika [179]

Ukoliko bi svetlosno polimerizujući kompozit bio korišćen ne samo za prekrivanje inserta već i za vezivanje sa dnom kaviteta, sam insert bi predstavljao barijeru za prodor zraka za izazivanje polimerizacije usled čega bi došlo do nepotpune polimerizacije kompozita, tj. zaostalih toksičnih monomera i oslabljene veze inserta sa dnom kaviteta. Usled toga, ispitana je jačina veze inserata sa Maxcem univerzalnim cementom, čija polimerizacija započinje mešanjem dve komponente cementa i pokazano je da su SBS vrednosti slične vrednostima za nedopiran CaP, tj. 3,2-6,3 MPa bez kiselinskog nagrivanja, odnosno 6,4-8,2 MPa sa kiselinskim predtretmanom [114]. SBS vrednosti u Maxcem grupi bile su uglavnom značajno niže nego u slučaju SBU i Cf adheziva ($p < 0,001$), što je u skladu sa rezultatima dobijenim za druge CaP-inserate. Značajno poboljšanje jačine veze ($p < 0,05$) kiselinskim predtretmanom je uočeno kod uzorka Mg5-160, što je u skladu sa rezultatima u radu Ayoub i autora za nedopirane HAP inserte sa kontrolisanom poroznošću [114].

Bez obzira na značajno različit uticaj kiselinskog nagrivanja na izgled površine inserta, u većini slučajeva izbor protokola nije imao statistički značajan uticaj na jačinu veze sa adhezivima. Suprotno tome, kiselinski predtretman može biti od velikog značaja kod primene cemenata na bazi smole, ali je pokazano da je ovaj efekat zavisao od vrste inserta. Na osnovu ovih rezultata, kiselinsko nagrivanje se preporučuje kao predtretman kod primene Maxcem cementa sa Mg5-160 dentalnim insertom [179]. Iako generalno nije uočeno statistički značajno poboljšanje jačine veze primenom TE protokola, zastupljenost adhezivnog loma tokom SBS testa je smanjena. Univerzalni adhezivni sistemi su poznati da imaju blagu moć nagrivanja što rezultuje u nižim prosečnim vrednostima jačine veze kod SE protokola. Kiselinsko nagrivanje dovodi do stvaranja mikro-retentivne površine dozvoljavajući penetraciju adheziva u nastale pore u strukturi inserta. Osim toga, analizom uticaja nagrivanja na jačinu veze adheziva sa gleđi, pokazano je da postupak kiselinskog nagrivanja poboljšava hemijski afinitet MDP molekula u adhezivu prema HAP kristalima tako što povećava kvašljivost površine gleđi i stvara negativno naelektrisanje čime se ubrzava hemijska reakcija stvaranja MDP-Ca soli [182].

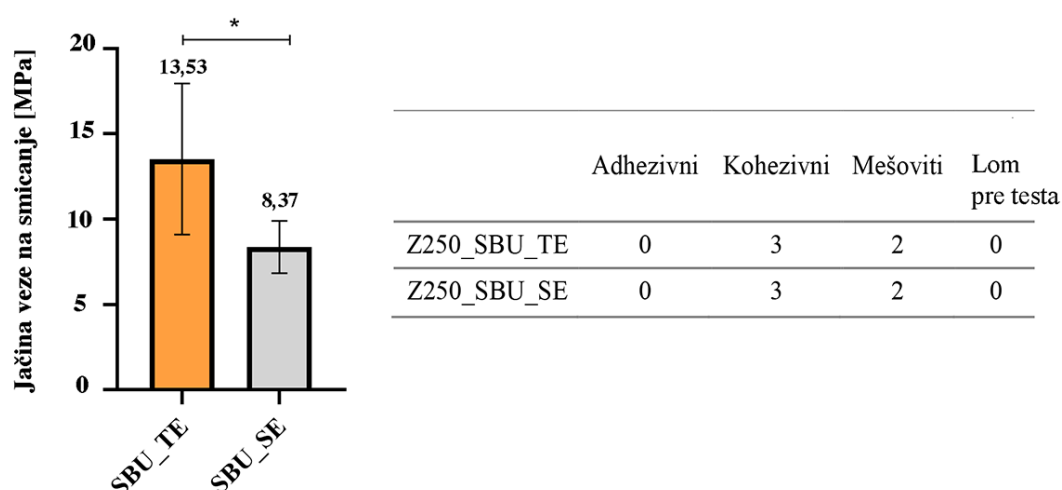
Vrsta loma nakon testiranja jačine veze na smicanje je zavisila od testiranog tipa inserta, restaurativnog materijala i korišćenog protokola (Slika 31). Većinski je dolazilo do kohezivnog ili mešovitog loma, dok je adhezivni tip loma uglavnom bio prisutan kod Sr5 uzorka. Ako se uporede vrste loma prema vrsti restaurativnog materijala i protokola koji je korišćen, vidi se da u slučaju SBU_TE nije došlo do pojave adhezivnog loma uopšte, dok je kod Maxcem grupe većina lomova bila adhezivna, verovatno usled slabe moći samonagrizanja cementa. Ovu hipotezu dodatno potvrđuje činjenica da je posle kiselinskog predtretmana inserata tip loma kod Maxcem cementa postao uglavnom kohezivni usled mehaničkog povezivanja cementa sa insertom.



Slika 31. Raspodela tipa loma nakon testiranja jačine veze na smicanje [179]

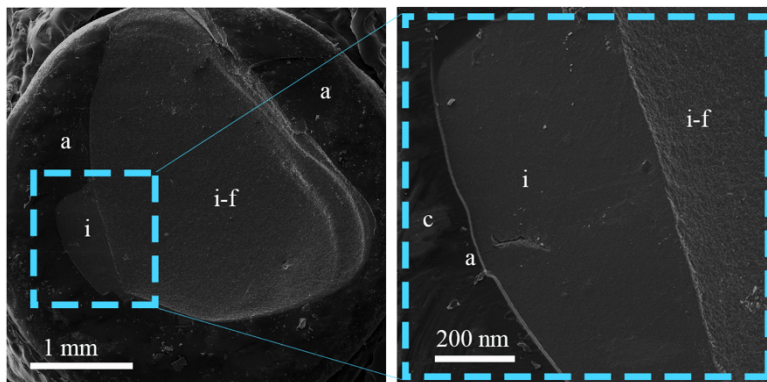
17.2. Binarno Sr,Mg-dopirani kalcijum-fosfatni dentalni insert

Uzorak Sr3Mg3 je izabran za ispitivanje potencijalne primenu u vidu dentalnog inserta usled posedovanja najboljih mehaničkih svojstava iz grupe Sr,Mg-binarno dopiranih kalcijum-fosfata razvijenih u ovoj disertaciji. Ispitana je jačina veze Sr3Mg3 uzoraka sa SBU dentalnim adhezivom i Z250 dentalnim kompozitom uz primenu SE i TE protokola, a rezultati su prikazani na Slici 32 i predstavljaju srednju vrednost merenja 5 uzoraka.



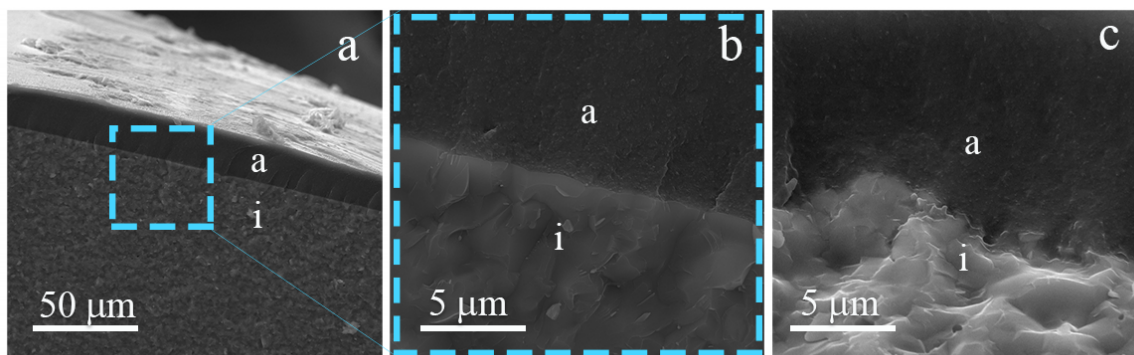
Slika 32. Jačina veze na smicanje dentalnih inserata na bazi binarno dopiranog Sr3Mg3 sa komercijalnim restaurativnim materijalom i tipovi loma nakon testiranja jačine veze na smicanje (SBU-Single Bond Universal adheziv, TE- totalno nagrizanje, SE - samonagrizanje) [152]

Dobijene vrednosti bez obzira na primenjeni protokol su u opsegu prethodno dobijenih vrednosti za inserte na bazi nedopiranih [113,114] i monodopiranih kalcijum-fosfata prikazanih u prethodnoj sekciji. Lom je bio uglavnom kohezivni i mešoviti, bez prisustva adhezivnog loma. Primer mešovitog loma nakon testa jačine veze je prikazan na mikrografijama na Slici 33, gde su oblasti kohezivnog loma u insertu označene kao *i-f*, a adhezivni lom se uočava na mestu delaminacije adheziva *a* i inserta *i*.



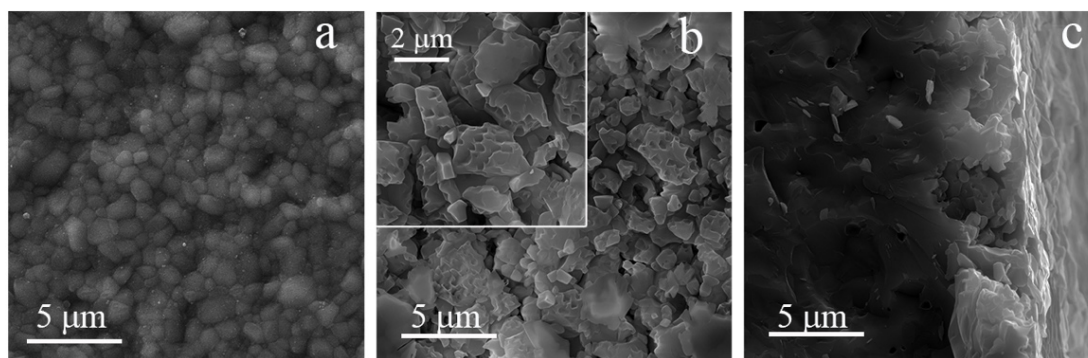
Slika 33. SEM mikrografije mešovitog loma Sr3Mg3 dentalnog inserta nakon SBS testa u SE grupi (*a* – adheziv, *c* – kompozit, *i* – površina inserta, *i-f* – polomljeni insert). Oblasti kohezivnog loma u samom insertu su obeležene kao *i-f*, dok je oblast adhezivnog loma u predelu gde se vidi netaknuta površina inserta (*i*) [152]

Kao što se može uočiti na mikrografiji preseka inserta (Slika 34) nakon SE protokola kontaktna površina inserta i adheziva je ravna bez prisustva mikrošupljina na površini inserta, te ne dolazi do penetracije adheziva u površinski sloj inserta. Sa druge strane, primenom TE protokola kiseliniski predtretman dovodi do stvaranja mikropora dubine 4,5-5 μm , čime se poboljšava mikromehanička retencija adheziva na površini inserta [152].



Slika 34. SEM mikrografija kontakta Sr3Mg3 dentalnog inserta sa restaurativnim materijalom: *a,b*) prelom inserta pripremljenog po SE protokolu, *c*) poprečni presek inserta po TE protokolu (*a* – adheziv, *i* – insert) [152]

Na Slici 35 je prikazana površina inserta pre i posle TE protokola 37% fosfornom kiselinom u trajanju od 15 s. Kiselinsko nagrivanje dovodi do rastvaranja granica zrna i delimičnog nagrivanja zrna (Slika 35b), čime nastaje hrapava površina inserta. Ova hrapavost omogućava prodor restaurativnog materijala u strukturu inserta ostvarujući mikromehaničko povezivanje adheziva sa insertom, što ima za rezultat statistički značajno jaču vezu kod primene TE protokola (13,5 MPa) u odnosu na SE protokol (8,5 MPa), dajući kao rezultat vrednosti slične prethodno prijavljenim vrednostima za dentin ($12 \pm 5,7$ MPa) [181].

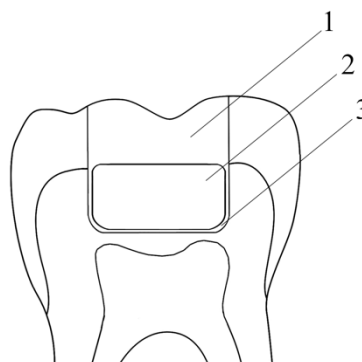


Slika 35. Mikrostruktura Sr_3Mg_3 inserta a) površina pre nagrivanja, b) površina nakon nagrivanja 37% fosfornom kiselinom u trajanju od 15s (TE protokol), c) poprečni presek inserta nagrivenog 37% fosfornom kiselinom u trajanju of 15s (TE protokol) [152]

17.3. Otpor na lom zuba restauriranih primenom dopiranih kalcijum-fosfatnih dentalnih inserata

Prethodno je pokazano da primena dentalnih inserata na bazi kalcijum-fosfata smanjuje polimerizaciono skupljanje kod velikih restauracija zuba [113], ali krtoost ovih materijala može ipak negativno uticati na otpornost na lom restauriranog zuba. Cilj ovog dela disertacije je bio da se uporedi otpornost na lom molara sa velikim kavitetima, restauriranih primenom konvencionalnog postupka (kontrola) i primenom novopredloženog protokola sa dentalnim insertom na bazi dopiranih kalcijum-fosfata kao dentinskim zamenikom (Šema 1). Na osnovu pregleda literature, ovo je prva studija u kojoj je ispitan uticaj primene inserata na bazi kalcijum-fosfata na mehanička svojstva restauriranih zuba [179].

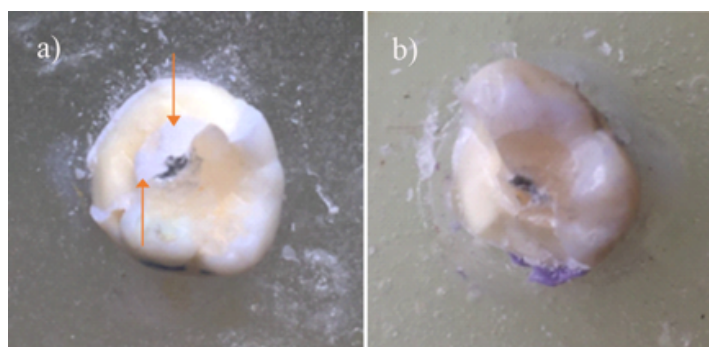
Odabrani tip inserta je bio monodopirani Mg5-160, a korišćeni restaurativni materijali mikrohbridni dentalni kompozit Z250 vezan adhezivom *Single Bond Universal* (SBU) po protokolu kiselinskog nagrivanja (TE) za primenu u prekrivnom sloju i Maxcem cement sa kiselinskim predtretmanom za ostvarivanje veze sa dnom kaviteta. U kontrolnoj grupi korišćen je dentalni kompozit Z250 vezan adhezivom SBU po protokolu selektivnog nagrivanja. Mg5-160 dentalni insert je izabran zbog superiornijih svojstava u odnosu na ostale inserte u pogledu ostvarivanja najjače veze sa restaurativnim materijalima kao posledica njegove najveće gustine i bifaznog BCP sastava sa dominantnom HAP fazom.



Šema 1. Molar sa okluzalnim kavitetom klase I, restauriran primenom dentalnog inserta: 1) sloj dentalnog kompozita Z250 vezan adhezivom *Single Bond Universal* (SBU), 2) dentalni insert, 3) Maxcem cement sa kiselinskim predtretmanom za ostvarivanje veze sa dnom kaviteta

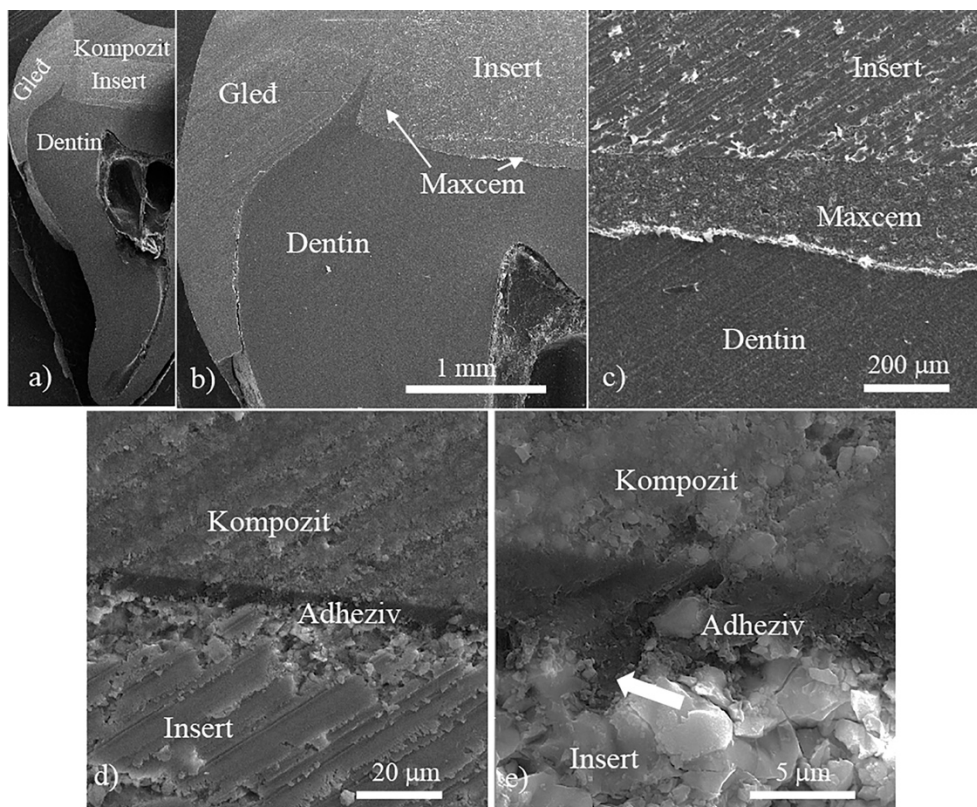
Kako bi simulirali *in vivo* starenje restauracije u laboratorijskim uslovima, restaurirani zubi su podvrgnuti termocikliranju (5-55 °C) tokom 10 000 ciklusa. Prethodno je pokazano da termocikliranje ima negativan uticaj na svojstva kompozita i adheziva jer topla voda ubrzava hidrolizu nezaštićenog kolagena i nedovoljno polimerizovanih oligomera u smoli [183]. Osim toga, neslaganje koeficijenta termičkih širenja zuba, smole i punioca u dentalnim kompozitima mogu dovesti do nagomilavanja naprezanja u restauraciji i stvaranja pukotine na granici restauracije i zuba.

Rezultati su pokazali da je otpornost na lom zuba restauriranih korišćenjem inserta slična otpornosti na lom zuba restauriranih po konvencionalnoj metodi: $3,0 \pm 0,30$ kN i $3,2 \pm 0,42$ kN, redom ($p=0,281$). Pri tome dominantni tip loma nakon pritisknog opterećenja do totalnog loma u obe grupe je klasifikovan kao katastrofalan (nereparabilan) tj. da zalazi ispod gleđno-cementne granice (Slika 36) sa lomom u delu koji započinje na granici restauracije i zuba i zalazi u koren zuba, što je tipično za velike i duboke kavitete [184]. Maksimalna izmerena sila koja se razvija u molarnoj regiji prilikom mastikacije (žvakanja) varira u rasponu 300-600 N [185], što je značajno manje od sile razvijene u ovom testu (3000 N), pa stoga činjenica da je lom klasifikovan kao nepopravljiv nije ograničavajući faktor za kliničku primenu. Prisustvo inserta nije dovelo do negativnog uticaja na otpor na lom restauriranih zuba u poređenju sa kontrolom, ukazujući na sličnu sposobnost ovako restauriranih zuba da se odupru okluzalnim silama.



Slika 36. Reprezentativni tipa loma klasifikovan kao nepopravljiv kod molara sa okluzalnom restauracijom klase I: a) korišćen protokol sa insertom, b) konvencionalni protokol. Strelice ukazuju na gotovo neoštećenu strukturu inserta koji štiti pulpu nakon loma [179]

Na Slici 37 se vide mikrofografije preseka zuba restauriranog primenom inserta, gde se uočava međusobna interakcija inserta, dentina i restaurativnih materijala. Intimna veza SBU adheziva i Maxcem cementa sa insertom je ostvarena kroz njihovu penetraciju u poroznu strukturu inserta (bela strelica na Slici 37 e ukazuje na penetraciju adheziva), što omogućava mikromehaničko povezivanje sa nagriženim insertom.



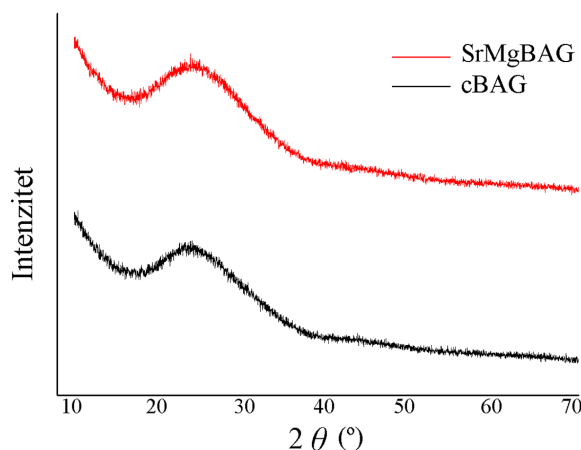
Slika 37. Presek zuba restauriranog po protokolu koji uključuje insert: a-b) prikaz pozicije inserta u zubu, c) uvećana granica insert-Maxcem-dentin, d-e) uvećana granica insert-adheziv-kompozit. Bela strelica na slici e) pokazuje na penetraciju adheziva u nagriženu strukturu inserta koja dovodi do poboljšane mikromehaničke retencije [179]

18. Nanočestice mezoporoznog bioaktivnog stakla – nedopirane i dopirane magnezijumom i stroncijumom

U ovom delu doktorske disertacije je ispitana mogućnost sinteze nanočestica mezoporoznog bioaktivnog stakla binarno dopiranog jonima magnezijuma i stroncijuma modifikovanom mikroemulzionom sol-gel tehnikom uz primenu ultrazvučnih talasa. Ispitan je uticaj inkorporiranja jona stroncijuma i magnezijuma na morfologiju, mezoporoznost i bioaktivnost nanočestica mezoporoznog bioaktivnog stakla. Imajući u vidu multifunkcionalnost ovih čestica za potencijalnu primenu u biomedicini, u ovoj sekciji ispitani su i citokompatibilnost na dve vrste humanih ćelija primenom 2D i 3D modela kulture ćelija, sposobnost čestica da stimulišu osteogenezu i angiogenezu, ali i njihova sposobnost da vežu i otpuste antiinflamatorni lek ibuprofen.

18.1. Morfologija, hemijski i elementni sastav, i površinska svojstva

Nedopirane i Sr,Mg-dopirane nanočestice mezoporoznog bioaktivnog stakla su uspešno dobijene mikroemulzionom sol-gel tehnikom uz primenu ultrazvučnih talasa. XRD analiza (Slika 38) je potvrdila potpuno amorfnu strukturu čestica nakon kalcinacije na 600 °C bez pojave kristalnih faza CaO, MgO i SrO, što ukazuje da su dopanti potpuno inkorporirani u staklastu strukturu MBAG.



Slika 38. Difraktogram MBAG čestica, cBAG – nedopiran uzorak, SrMgBAG – dopiran jonima Sr^{2+} i Mg^{2+}

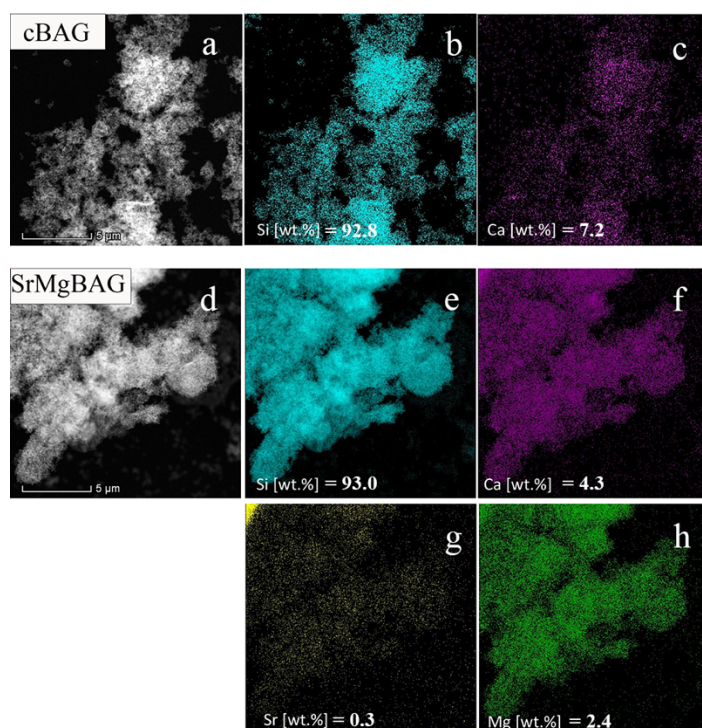
Rezultati ICP analize hemijskog sastava dobijenih nanočestica stakla prikazani su u Tabeli 12. Na osnovu hemijske analize uočava se značajno odstupanje realnog od nominalnog sastava, što je i bilo očekivano s obzirom da osnovnu manu mikroemulzione tehnike odnosno slabu kontrolu sastava. U bazno katalizovanoj sol-gel sintezi soli katjona se dodaju tek nakon formiranja nanočestica SiO_2 , pa su katjoni samo adsorbovani na površini SiO_2 do postupka kalcinacije kada bivaju inkorporirani u strukturu stakla [41,46]. U toku sinteze obavezno je detaljno ispiranje čestica kako bi se eliminisala organska faza i sprečila aglomeracija čestica tokom kalcinacije, što nažalost dovodi i do spiranja adsorbovanih katjona rezultujući sastavom koji čini oko 90% SiO_2 . Interesantno, u ovoj studiji binarno dopiranje Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima u jednakim nominalnim količinama je dovelo do inkorporacije značajno veće količine MgO nego SrO (4,74 mol.% u odnosu na 0,26 mol.% , redom) što može ukazati na favorizovanu adsorpciju Mg^{2+} jona u odnosu na Sr^{2+} and Ca^{2+} . Prema ICP analizi, ukupan sadržaj dopanata SrO+MgO u strukturi SrMgBAG je iznosio 5 mol.%. Mapiranje elemenata na nanočesticama analiziranim pomoću EDS detektora povezanih sa TEM-om je ukazalo na homogenu raspodelu elemenata u česticama, sa najzastupljenijim silicijumom, što je u skladu sa hemijskim sastavom (Slika 39).

Tabela 12. Rezultati ICP analize sastava MBAG čestica

Uzorak	Sastav čestica (mol.%)			
	SiO ₂	CaO	MgO	SrO
cBAG	91,61	8,39	/	/
SrMgBAG	88,96	6,04	4,74	0,26

Inkorporiranje Sr²⁺ i Mg²⁺ u stukturu SrMgBAG čestica nije imala značajan uticaj na specifičnu površinu u poređenju sa cBAG (Tabela 13), ali je dovelo do povećanja ukupne zapremine pora. Poredeći dobijene rezultate za cBAG sa MBAG česticama dobijenim sličnom metodom bez primene ultrazvučne sonde [44], možemo zaključiti da su ultrazvučni talasi doveli do značajnog povećanja ukupne zapremine pora sa 0,29 na 0,84 cm³/g i povećanja specifične površine sa 229 na 386 m²/g (Tabela 13), bez promene veličine čestica. Sa druge strane, dobijeni sadržaj CaO u cBAG je bio nešto manji u ovoj studiji u poređenju sa česticama dobijenim u radu Nescakova i autora gde je sadržaj CaO iznosio 11,6 mol.% [44].

Veličina čestica cBAG je bila u rasponu 67 – 164 nm, sa srednjom vrednošću 118 nm, dok je veličina čestica SrMgBAG bila u rasponu 70-156 nm sa srednjom vrednošću od 112 nm (dato kasnije, Slika 42). U radu Liang i autora pokazano je da veličina sferičnih čestica MBAG može da varira u rasponu 130-250 nm u zavisnosti od koncentracije dodatog amonijaka u toku mikroemulzione sinteze, što dalje utiče i da njihova specifična površina varira od 685 do 259 m²/g, tim redom [153]. Binarno dopiranje stroncijumom i magnezijumom je dovelo do povećanog ζ–potencijala u poređenju sa cBAG česticama, a ovaj efekat je bio izraženiji kada je kao rastvarač korišćen etanol nego voda (Tabela 13).



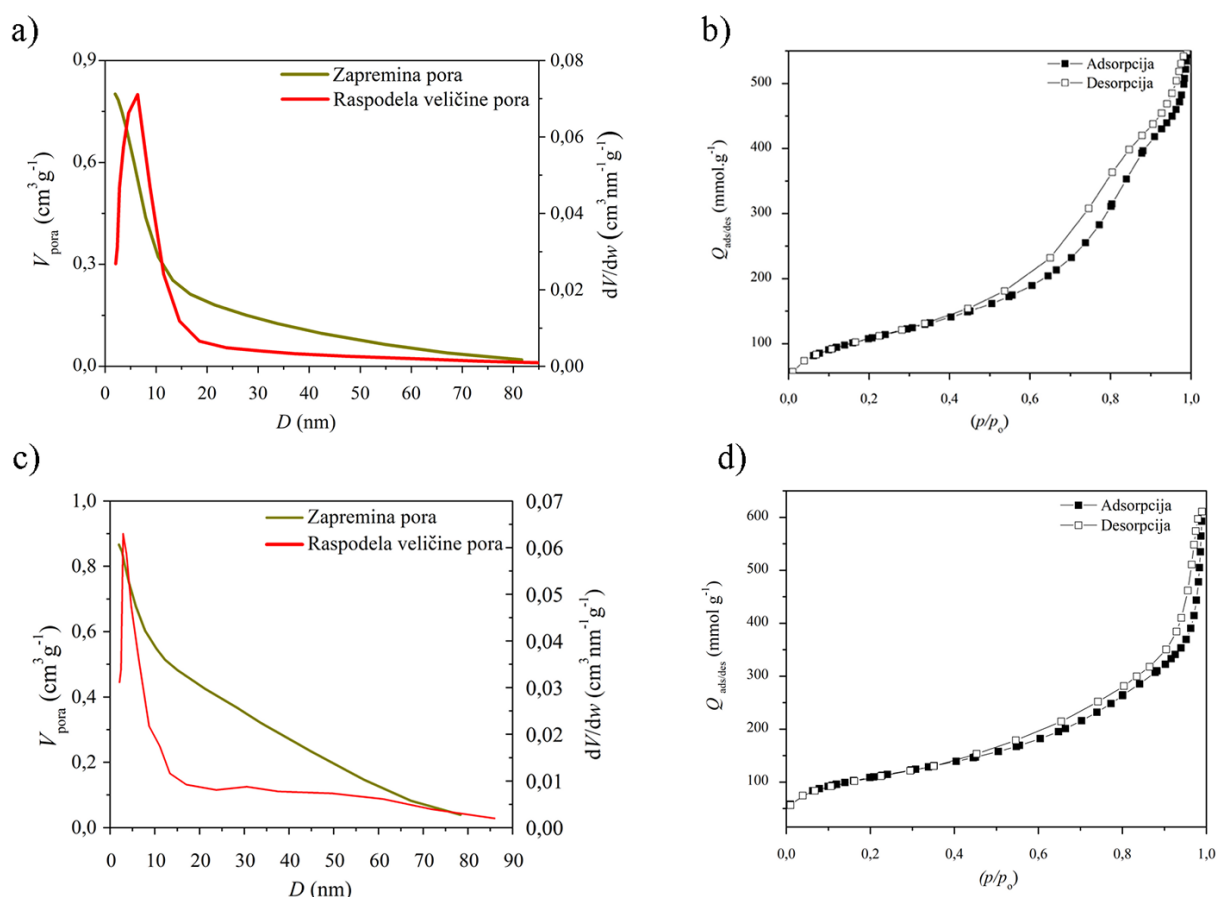
Slika 39. Elementno mapiranje čestica nedopiranog cBAG i SrMgBAG pomoću EDS metode povezane sa TEM-om [186]

Tabela 13. Teksturalna svojstva dobijenih čestica MBAG [186]

Uzorak	Sp [m ² /g]	V_{uk} [cm ³ /g]	V_{mezo} [cm ³ /g]	V_{mikro} [cm ³ /g]	Dsr_p [nm]	$Dmax_p$ [nm]	ζ -potencijal [mV]	
							etanol	H ₂ O
cBAG	386,17	0,8382	0,801	0,114	7,356	6,376	-10	-11,5
SrMgBAG	383,40	0,9235	0,867	0,119	9,530	2,919	0,17	-9,49

gde je Sp - specifična površina čestica, Dsr_p – srednja veličina pora, $Dmax_p$ -veličina najzastupljenijih pora

Adsorpciono/desorpcione krive prikazane na Slici 40 predstavljaju izoterme tipa IV prema IUPAC nomenklaturi, sa histerezisnom petljom tipa 3 koja je karakteristična za mezoporozne materijale sa uskim porama koje liče na proreze. Katjoni - dopanti dodati u toku mikroemulzione sol-gel sinteze mogu ostvariti elektrostatičku interakciju sa katjonskim surfaktantom, kao što je CTAB⁺, čijim sagorevanjem nastaje porozna struktura, usled čega dopanti mogu negativno uticati na poroznost i dovesti do nastanka neuređene mezostrukture [41,187].

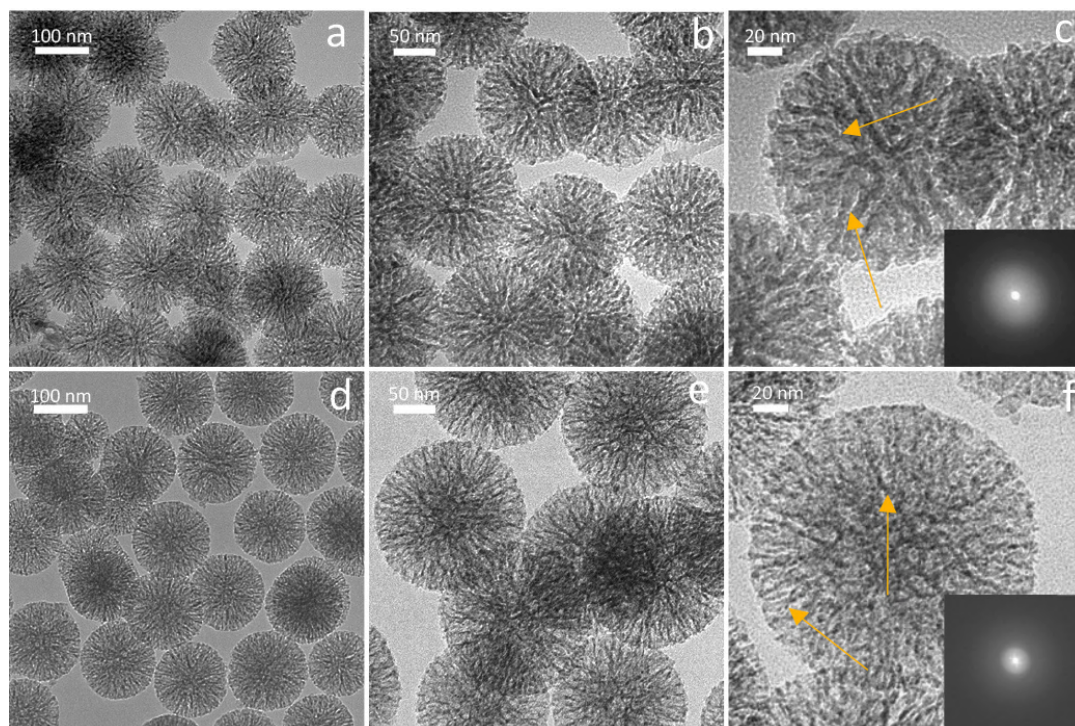


Slika 40. Raspodela veličina pora i adsorpcione/desorpcione krive cBAG (a,b) i SrMgBAG (c,d) [186]

TEM mikrografije cBAG čestica ukazuju na postojanje crvolike mezostrukture, dok se kod SrMgBAG uočava prisustvo radialno raspoređenih dendritnih mezoporoznih kanala [186] (Slika 41).

Ove strukturne razlike mogu biti posledica većeg broja prisutnih katjona u sistemu i njihove interakcije sa CTAB, ali mogu biti i posledica dužeg vremena mešanja u toku sinteze SrMgBAG u poređenju sa cBAG usled dodavanja više različitih soli u razmaku od 30 min [188–190].

Srednja veličina pora kod SrMgBAG je veća u odnosu na cBAG (9,53 i 7,56 nm, redom), što je zapravo posledica bimodalne raspodele veličina čestica radijalnih dendritskih mezopora kod SrMgBAG koje su veće na površini čestica, a manje u centru (Slika 41). Iako je najveći broj prisutnih pora mnogo manji kod SrMgBAG (2,92 nm) uzorka nego kod cBAG (6,38 nm), u oba slučaja pore su u opsegu 2-10 nm koje se smatraju optimalnim za kačenje i otpuštanje lekova i drugih biološki aktivnih molekula [43]. HAADF slike dobijenih čestica takođe potvrđuju amorfnu strukturu nedopiranih i dopiranih čestica MBAG, što je u skladu sa prethodno prikazanim difraktogramom na Slici 38.



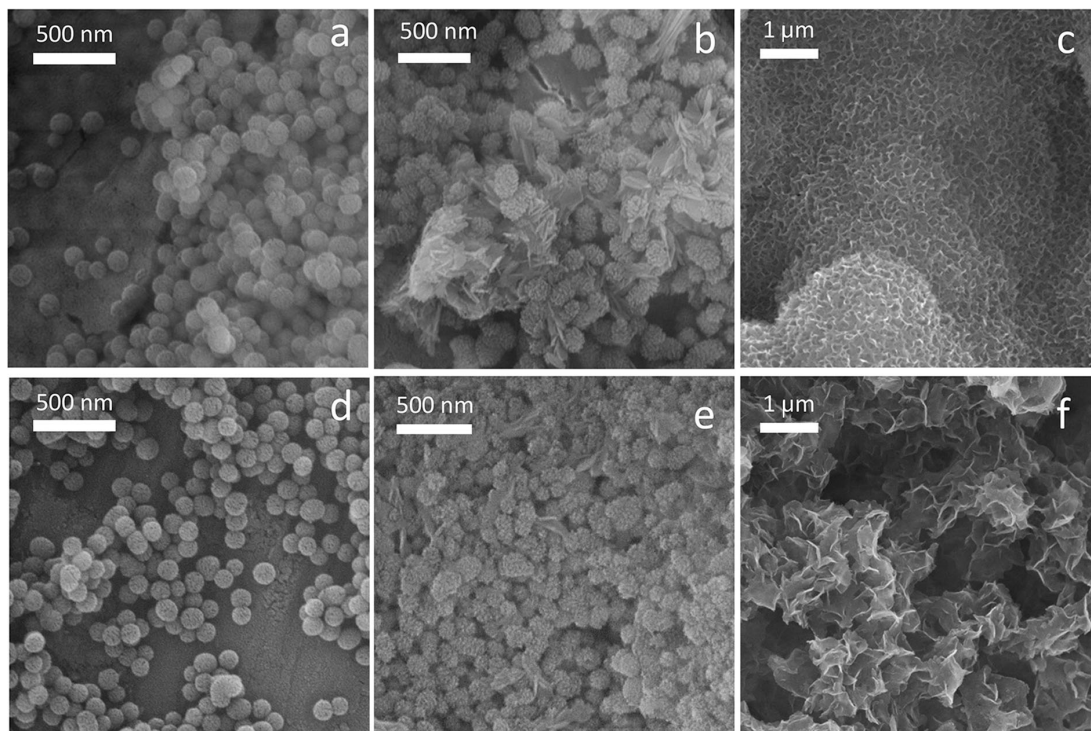
Slika 41. TEM mikrografije i HAADF slike dobijenih mezoporoznih čestica cBAG (a,b,c) i SrMgBAG (d,e,f); strelice ukazuju na oblik mezopora: nepravilan kod cBAG i radijalno dendritski oblik kod SrMgBAG [186]

18.2. *In vitro* bioaktivnost

Bioaktivnost materijala predstavlja njegovu sposobnost da na površini nagradi novi sloj biomimičnog HAP (obično karbonatno supstituisanog- HCA) nakon potapanja u simuliranu telesnu tečnost (STT). Dopiranje kod stakala utiče na njihovu rastvorljivost, pa samim tim utiče i na bioaktivnost [43,44]. Prethodno je pokazano da dopiranje jonima Mg^{2+} u mezoporoznom bioaktivnom staklu u binarnom SiO_2 -CaO sistemu dovodi do inhibiranja bioaktivnosti, preciznije na formiranje amornog sloja CaP [37]. Čak i nakon 14 dana testa bioaktivnosti nije došlo do formiranja HCA kada je više od 3 mol.% Mg bilo inkorporirano u MBAG. Sa druge strane, supstitucija stroncijumom nije ukazala na inhibiciju bioaktivnosti [104,191].

U ovoj disertaciji je potvrđena bioaktivnost mezoporoznih nedopiranih nanočestica stakla i čestica koje sadrže 4,76 mol.% MgO i 0,24 mol.% SrO formiranjem HCA kristala na površini čestica (Slika 42). Nakon 7 dana u STT, površina čestica cBAG i SrMgBAG je bila hrapava usled rastvaranja

stakla i precipitacije nanokristala na površini, što je praćeno stvaranjem igličastih kristala HCA. Nakon 14 dana u STT, površina čestica cBAG i SrMgBAG je bila potpuno prekrivena debelim slojem apatitnih kristala potvrđujući biaktivnu prirodu MBAG čestica dobijenih u ovoj disertaciji.

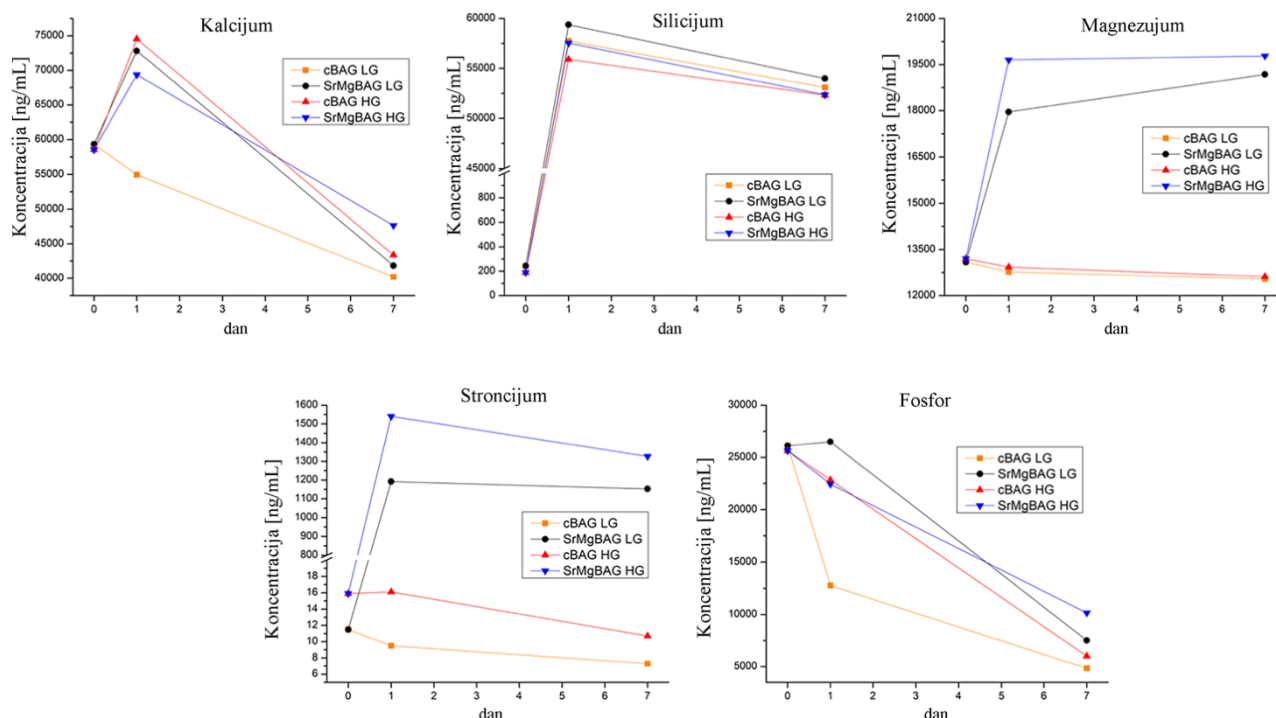


Slika 42. Test bioaktivnosti: cBAG (a,b,c) i SrMgBAG (d,e,f) pre potapanja u STT (a,d), nakon 7 dana u STT (b, e), i nakon 14 dana u STT (c,f) [186]

18.3. Profil otpuštanja jona

Amorfna struktura silikatnog stakla nastaje gradjenjem Si-O-Si veze preko vezujućih atoma kiseonika odnosno povezivanjem SiO_4^{4-} tetraedara. Dodatak katjona modifikatora, kao što su Ca^{2+} , Sr^{2+} i Mg^{2+} u strukturu stakla dovodi do prekidanja nekih Si-O-Si veza i umetanja katjona u šupljine, čime slabi struktura stakla i povećava se njegova rastvorljivost. MgO predstavlja intermedijarni oksid, odnosno u zavisnosti od njegove količine može osim prekidanja mreže, takođe i da se umetne u osnovnu strukturu stakla ponašajući se kao graditelj mreže [192]. Literaturni podaci o uticaju inkorporiranja Mg na rastvorljivost bioaktivnih stakala ukazuju na smanjenu rastvorljivost kod topljenih i sol-gel stakala [193–195]. Suprotno, kod nanočestica MBAG stakla dodatak Mg^{2+} je uticao na povećanje rastvorljivosti što je pripisano većoj specifičnoj površini [37]. Rezultati ove disertacije su pokazali da binarno dopiranje MBAG Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima dovodi do blagog povećanja rastvorljivosti, što se zaključuje na osnovu pronađene više koncentracije silicijuma u DMEM medijumu sa SrMgBAG nego sa cBAG česticama (59 ppm i 57 ppm, redom, Slika 43), iako čestice imaju gotovo iste vrednosti specifične površine. Ovo je u skladu sa činjenicom da smanjenje udela SiO_2 u MBAG staklima dovodi do smanjene otpornosti na degradaciju [196].

Profil otpuštanja jona iz stakla je ispitan u dve vrste ćelijskog medijuma: DMEM sa niskom količinom glukoze (DMEM-LG) i DMEM sa visokom količinom glukoze (DMEM-HG) i prikazan na Slici 43. Nakon 24 h uočen je nagli porast koncentracije silicijuma u oba tipa ćelijskog medijuma, ali je nešto viša koncentracija pronađena kod DMEM-LG, ukazujući na bolju rastvorljivost čestica MBAG u ovom medijumu. Proteini iz seruma u ćelijskom medijumu mogu da se adsorbuju na površini čestica gradeći proteinsku koronu koja utiče na reaktivnost materijala [197], pa samim tim utiče i na drugačiju rastvorljivost MBAG čestica u dva različita ćelijska medijuma.



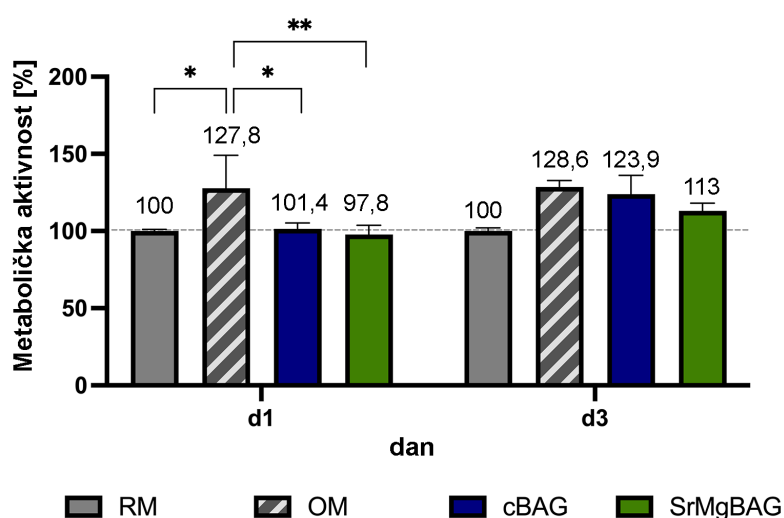
Slika 43. Profil otpuštanja jona iz čestica cBAG i SrMgBAG u dva tipa DMEM ćelijskog medijuma: sa visokim sadržajem glukoze (HG) i sa niskim sadržajem glukoze (LG) [186]

U slučaju kalcijuma povećana je koncentracija u svim grupama nakon 24 h, osim u slučaju cBAG u DMEM-LG. Viša koncentracija Ca^{2+} je otpuštena u DMEM-HG medijumu iz cBAG stakla nego iz SrMgBAG, što je u skladu sa njihovim hemijskim sastavom. Kod SrMgBAG je potvrđeno otpuštanje jona Sr^{2+} i Mg^{2+} nakon 24 h, sa nešto većim vrednostima u slučaju DMEM-HG. Nakon 7 dana primećen je pad koncentracije Ca^{2+} i Sr^{2+} jona, što je verovatno posledica taloženja neorganskih soli i njihove eliminacije tokom postupka filtracije, što je u skladu i sa smanjenjem koncentracije fosfora. Iz binarno dopiranog SrMgBAG je u prvih 24 h otpušteno 4,5-6 ppm Mg^{2+} odnosno 1,2-1,6 ppm Sr^{2+} , u zavisnosti od vrste DMEM medijuma.

Prethodno je pokazano da koncentracija otpuštenih jona iz Sr-dopiranog stakla u opsegu 3-6 ppm ima sposobnost da stimuliše osteogenezu kod humanih MSC (hMSC) [57,58]. Ukupna koncentracija Mg^{2+} jona u SrMgBAG ekstraktima je bila 18-19,5 ppm što se smatra fiziološkim sadržajem Mg^{2+} jona (0,8 mM). Prethodno je ispitan uticaj dodatka Mg^{2+} u rasponu 0,8-10 mM (19-240 ppm) na uticaj na osteogenezu kod MSC. U radu Yoshizava i autora je pokazano da 10mM MgSO_4 dovodi do poboljšane proliferacije humanih BM-MSC, povećane ekspresije osteogenih gena, poboljšane proizvodnje ekstracelularnog matriksa i depozicije minerala [51]. Osim toga, u radu Diaz-Tocados i autora pokazano je da povećanjem koncentracije MgCl_2 u opsegu 0,8-1,8 mM dovodi do povećane proliferacije i pro-osteogene diferencijacije [198].

18.4. Citokompatibilnost na matičnim ćelijama u 2D kulturi

Citokompatibilnost MBAG čestica sintetisanih u ovoj disertaciji je testirana indirektnom metodom merenjem metaboličke aktivnosti ćelija. Kao što je prikazano na Slici 44, ekstrakti cBAG i SrMgBAG prahova nisu pokazali citotoksični efekat prema humanim BM-MSC ćelijama pri koncentraciji od 1 mg/mL ni za jedno testirano vreme. Nakon 24 h kultivacije ćelija, grupa u kojoj je korišćen osteogeni medijum je pokazala statistički značajno povećanje metaboličke aktivnosti u poređenju sa regularnim medijumom ($p=0,015$), cBAG ($p=0,029$) i SrMgBAG ($p=0,006$) ekstraktima. Međutim nakon 3 dana kultivacije, nije uočeno postojanje statistički značajne razlike u metaboličkoj aktivnosti ćelija u različitim grupama. Dobijene vrednosti za vijabilnost ćelija su bile iznad 100%, što ukazuje na odsustvo negativnog uticaja na metaboličku aktivnost ćelija [186]. Dati rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju citokompatibilnost monodopiranih MBAG čestica stroncijumom ili magnezijumom [105–107,199,200] kao i binarno dopiranim jonima stroncijuma i magnezijuma [107].



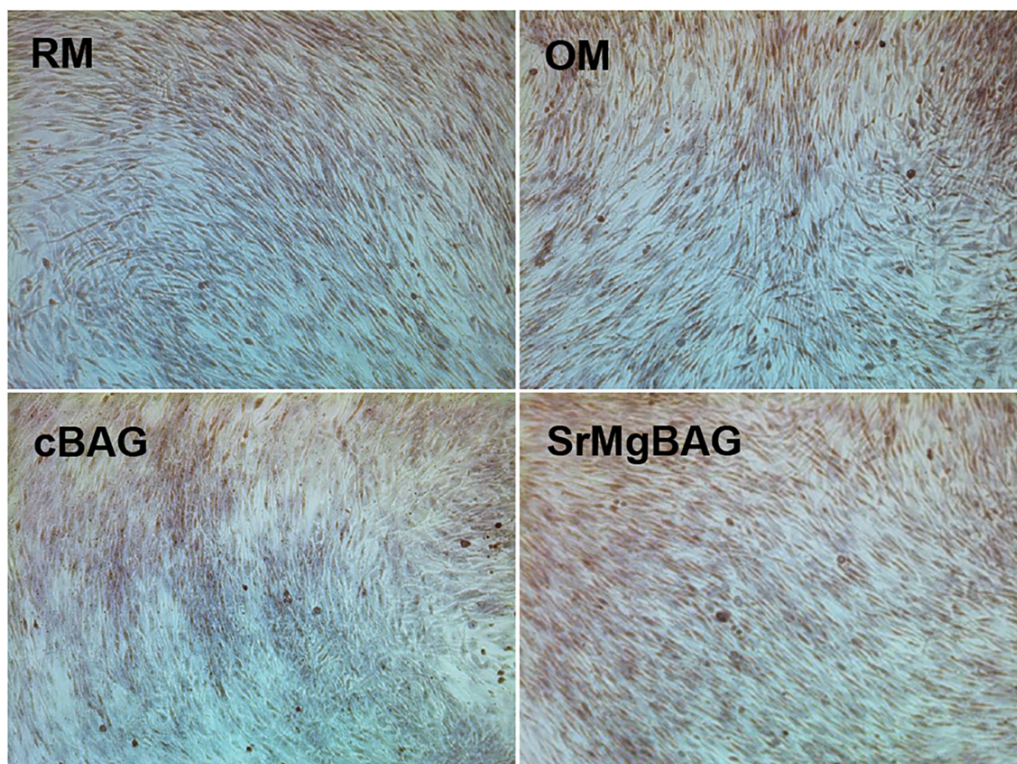
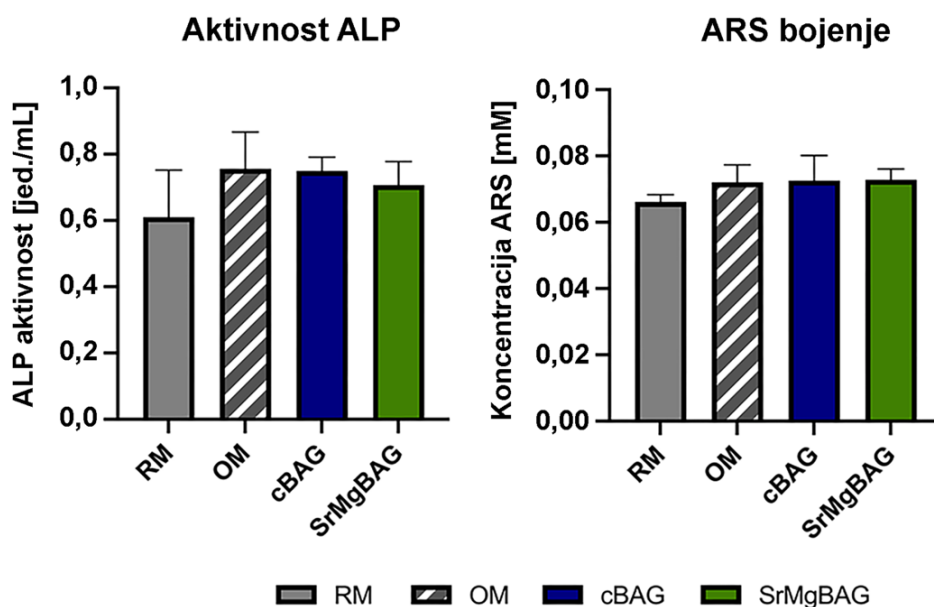
Slika 44. Metabolička aktivnost BM-MSC ćelija u 2D kulturi nakon 1 i 3 dana kultivacije u regularnom medijumu (RM), osteogenom medijumu (OM), ekstraktima cBAG ili SrMgBAG pri koncentraciji 1 mg/mL [$*p<0,05$; $**p<0,01$] [186]

18.5. Pro-osteogeni potencijal

Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) se koristi za ispitivanje rane faze osteogene diferencijacije *in vitro* između 5. i 14. dana inkubacije, dok se bojenje alizarin crvenim S (ARS) koristi za detekciju mineralizacije ekstracelularnog matriksa koji je karakterističan za kasni stadijum osteogene diferencijacije [31]. Kao negativna kontrola je korišćen regularni medijum. Nakon 7 dana kultivacije primećen je blag porast ALP aktivnosti kod BM-MSC ćelija kultivisanih u prisustvu ekstrakata cBAG i SrMgBAG prahova, kao i osteogenog medijuma u poređenju sa kontrolom, ali bez statističke značajnosti ($p>0,05$). Kvantifikacija ARS boje je pokazala da je nešto viša količina istaloženog kalcijuma u prisustvu ekstrakata cBAG i SrMgBAG i OM nego u kontroli, što je u skladu sa kvalitativnim rezultatima (Slika 45). Međutim, razlika u ARS koncentraciji nije bila statistički značajna ni za jednu grupu u odnosu na kontrolu. Ovi rezultati su u skladu sa vremenom kultivacije s obzirom da se sedmog dana očekuje tek početak mineralizacije.

Dopiranje MBAG čestica jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} ispitano u ovoj disertaciji nije uticalo značajno na osteogenezu BM-MSC ćelija što je posledica dosta niže koncentracije Sr^{2+} i Mg^{2+} jona otpuštenih iz MBAG čestica u poređenju sa podacima iz literature [48,57,58]. Naime sadržaj Mg^{2+} jona

detektovan u SrMgBAG ekstraktu se smatra fiziološkim, a količina Sr^{2+} jona je bila duplo niža u odnosu na studiju Naruphontjirakul i autora gde je pokazano da Sr^{2+} joni u ospegu 3-6 ppm imaju pozitivan uticaj na osteogenu diferencijaciju humanih MSC ćelija. Ovo je posledica sa jedne strane manje količine dopanata inkorporiranih u česticama MBAG od željenog, ali i koncentracije stakla za pripremu ekstrakata koja je iznosila 1 mg/mL [186].

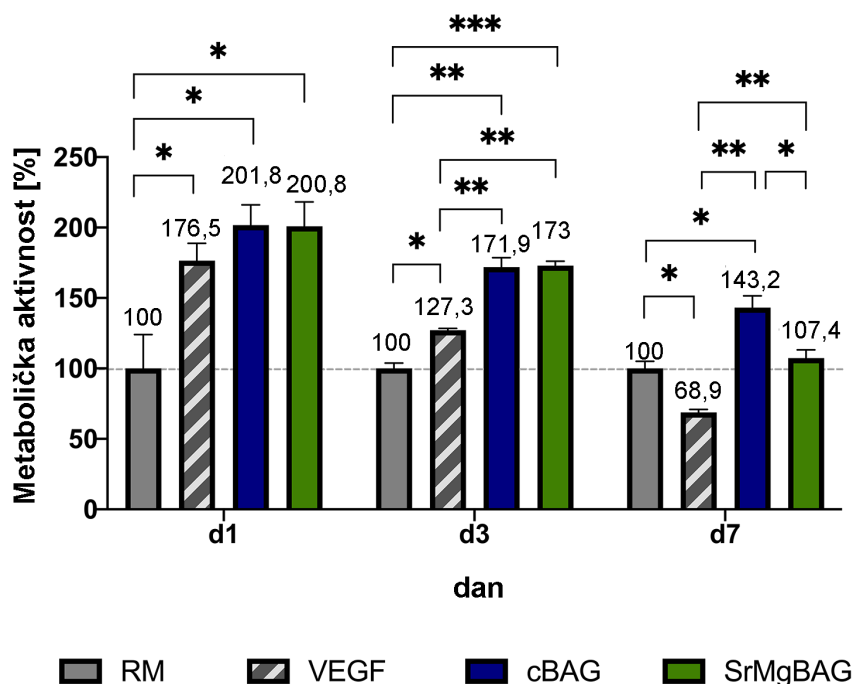


Slika 45. Aktivnost alkalne fosfataze (ALP) i bojenje minerala alizarin crvenim S (ARS) nakon 7 dana kultivacije BM-MSC ćelija u prisustvu regularnog medijuma (RM), osteogenog medijuma (OM), ekstrakata cBAG i SrMgBAG pri koncentraciji 1 mg/mL [186]

18.6. Citokompatibilnost na endotelnim ćelijama u 3D kulturi

Test citokompatibilnosti čestica MBAG je ispitan i na humanim endotelnim ćelijama EA.hy926 indirektnom metodom primenom ekstrakata, ali u 3D modelu ćelijske kulture koja omogućava organizaciju ćelija u sva tri pravca, za razliku od 2D modela gde ćelije rastu u jednom sloju. Ovo je od posebne važnosti kod endotelnih ćelija jer njihova sposobnost da se organizuju u tubule ili mreže ukazuje na početak angiogeneze. Kao negativna kontrola korišćen je regularni medijum za kultivaciju ćelija. Nakon 24 h kultivacije, ekstrakti oba tipa stakla su statistički značajno povećali metaboličku aktivnost odnosno vijabilnost EA.hy926 ćelija u poređenju sa regularnim medijumom, odnosno imali sličan efekat kao dodatak VEGF. Porast metaboličke aktivnosti od preko 75% je ukazao na značajnu stimulaciju proliferacije EA.hy926 ćelija u grupi cBAG, SrMgBAG i VEGF nakon samo 24 h kultivacije. Nakon 3 dana kultivacije, cBAG i SrMgBAG ekstrakti su statistički značajno povećali metaboličku aktivnost EA.hy926 ćelija u predenju ne samo sa regularnim medijumom već i sa dodatkom VEGF (Slika 46).

Kako nije pronađena značajna razlika među cBAG i SrMgBAG grupama, može se zaključiti da osnovni stimulatívni efekat imaju angiogeni joni silicijuma, što je u skladu prethodnim istraživanjima [201]. Sa druge strane, kao i u slučaju BM-MSK ćelija, količina dopanata u SrMgBAG grupi nije bila dovoljna da proizvede značajan efekat na metaboličku aktivnost EA.hy926 ćelija u poređenju sa cBAG grupom.



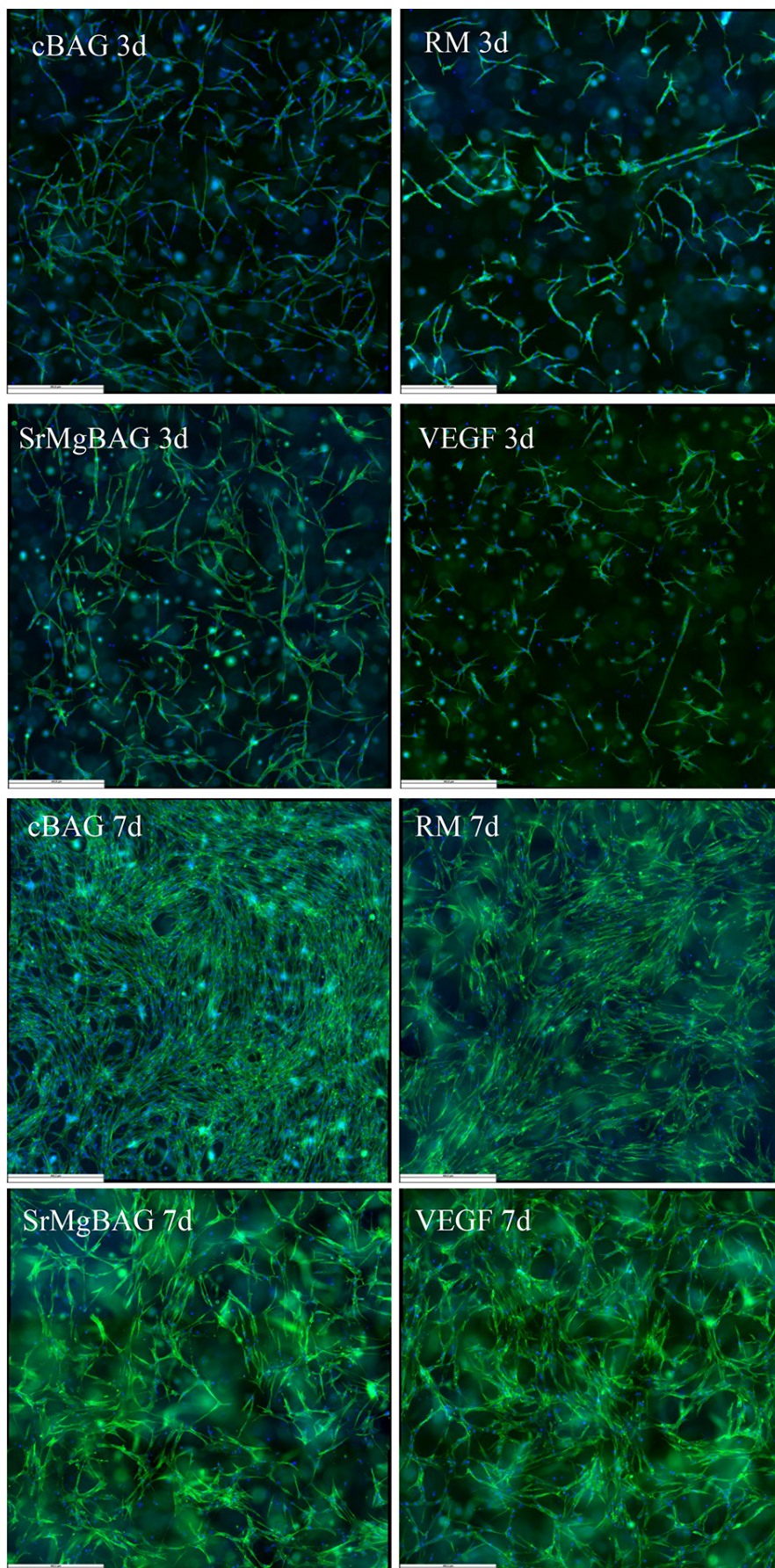
Slika 46. Metabolička aktivnost EA.hy926 ćelija u 3D ćelijskoj kulturi nakon 1, 3 i 7 dana kultivacije u regularnom medijumu (RM), medijumu sa 100 ng/mL VEGF (VEGF), ekstraktima cBAG i SrMgBAG pri koncentraciji 1 mg/mL [* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$] [186]

Nakon 7 dana kultivacije, metabolička aktivnost EA.hy926 ćelija je bila veća u prisustvu ekstrakata cBAG i SrMgBAG u poređenju sa RM i VEGF, ali je ovog puta grupa cBAG pokazala statistički značajnu razliku u odnosu na SrMgBAG grupu ($p=0,027$), dok je čak kod VEGF grupe došlo do značajnog smanjenja metaboličke aktivnosti EA.hy926 ćelija ($p=0,002$ u poređenju sa cBAG, i $p=0,02$ u poređenju sa SrMgBAG). Dobijeni rezultati ukazuju da otpuštena količina Sr^{2+} i Mg^{2+} jona ne samo da nije citotoksična prema EA.hy926 ćelijama, već ekstrakti cBAG i SrMgBAG imaju čak stimulatívni efekat na vijabilnost i proliferaciju EA.hy926 ćelija.

18.7. Pro-angiogeni potencijal

Pro-angiogeni potencijal čestica je ispitan u 3D ćelijskom modelu sa humanim endotelnim EA.hy926 ćelijama kako bi se ispitaio uticaj ekstrakata na organizaciju ćelija u 3D sredini. Kao pozitivna kontrola u ćelijski medijum je dodat VEGF koji pospešuje proliferaciju endotelnih ćelija i njihovo grupisanje u tubule i mreže. Morfologija ćelija je analizirana fluorescentnim mikroskopom za analizu 3D ćelijske kulture *Thunder 3D Cell Imager* nakon 3 i 7 dana kultivacije. Zelenom bojom je obojen citoskeleton ćelija pomoću faloidina, a nukleus ćelija plavom bojom pomoću DAPI boje.

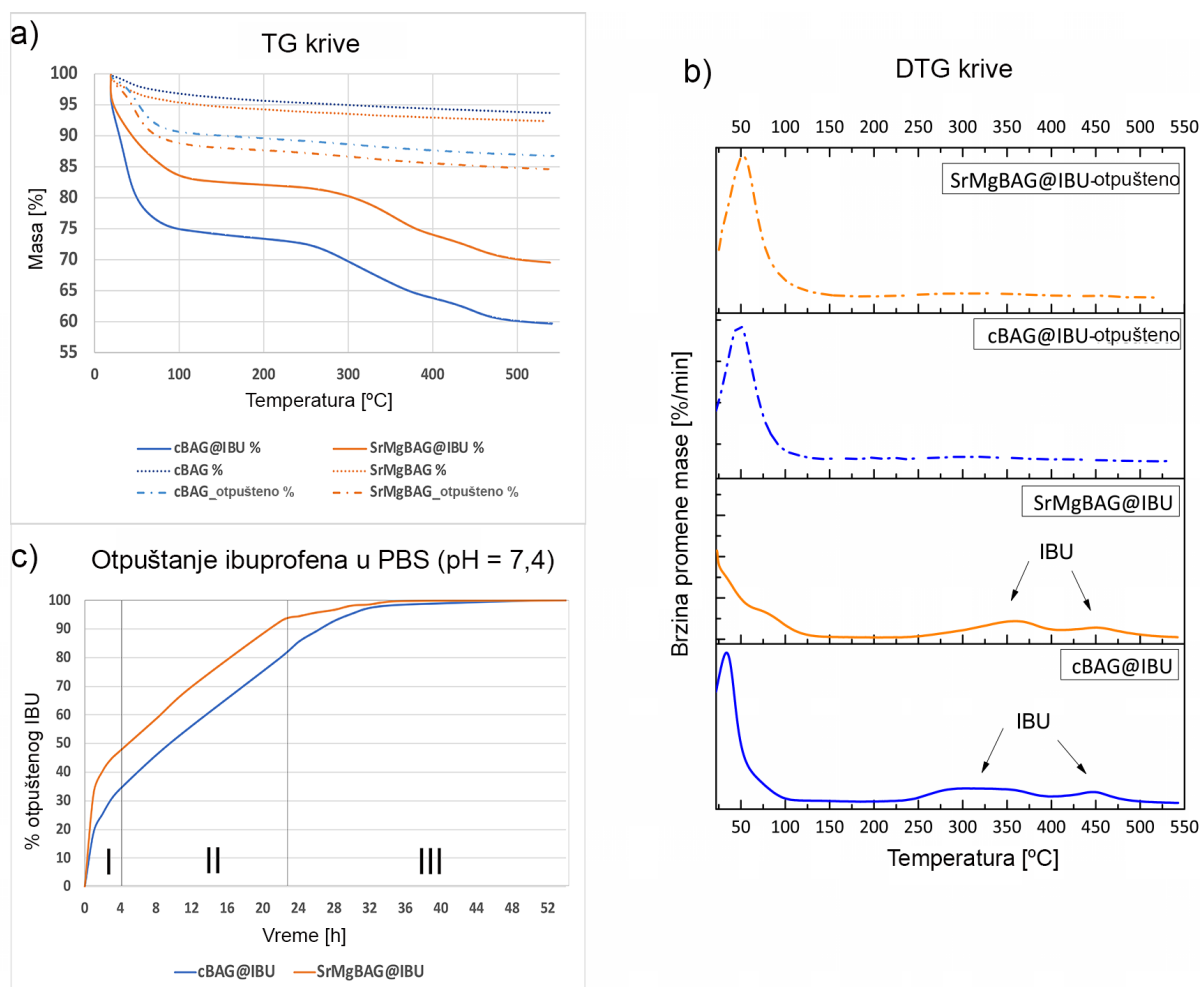
Na Slici 47 mogu se videti slike fluorescentne mikroskopije nakon 3 i 7 dana, gde se uočava značajna proliferacija ćelija između 3. i 7. dana, kao i značajno veći broj ćelija u slučaju cBAG nakon 7 dana u odnosu na sve ostale grupe, što je u skladu sa najvećom metaboličkom aktivnošću ćelija pronađenoj u cBAG grupi. Efekat SrMgBAG ekstrakata na EA.hy926 ćelije je bio sličan VEGF grupi, mada manje izražen: ćelije su se međusobno povezale preko filopodija i počele da se organizuju u tubule i mreže sa malim brojem spojenih nodusa, što može ukazivati na početak angiogeneze, što je i očekivano s obzirom na prisustvo angiogenih jona silicijuma i magnezijuma u ekstraktima SrMgBAG čestica.



Slika 47. Morfologija EA.hy926 ćelija u 3D ćelijskoj kulturi nakon 3 (a) i 7 (b) dana kultivacije u regularnom medijumu (RM), medijumu sa 100 ng/mL VEGF (VEGF), ekstraktima cBAG i SrMgBAG pri koncentraciji 1 mg/mL. Uvećanje 5x, bar = 450 μ m [186]

18.8. Sposobnost vezivanja i otpuštanja lekova

Čestice MBAG mogu lako da vežu lekove kroz više mehanizama: adsorpcijom na površini, vezivanjem unutar mezopora preko kovalentnih ili nekovalentnih veza, ili umetanjem u zatore između čestica [27]. Površina MBAG bogata OH^- grupama obezbeđuje MBAG negativno površinsko naelektrisanje što smanjuje sposobnost vezivanja negativno naelektrisanih lekova kao što je IBU [202]. Ranije je pokazano da ugradnja oksida metala kao što su SrO ili MgO u mrežu silicijum-dioksida povećava kapacitet vezivanja IBU [25] zbog visokog afiniteta između alkalnih funkcionalnih grupa i kiselih karboksilnih grupa IBU. Pored toga, u nedavnoj studiji je objavljeno da povećanje koncentracije SrO sa 0,02 na 1 mol.% u hidrotermalno sintetisanim BG dovodi do većeg kapaciteta vezivanja IBU i produženog vremena otpuštanja leka [191]. Rezultati TG analize čestica bez (cBAG i SrMgBAG) i sa vezanim lekom IBU (cBAG@IBU, SrMgBAG@IBU), kao i nakon 55 h otpuštanja IBU su prikazani na Slici 48 a). Iz razlike gubitka mase uzorka sa IBU i bez IBU određena je količina vezanog IBU. Na osnovu ovih rezultata vidi se da se kapacitet vezivanja IBU blago smanjio nakon dopiranja MBAG čestica jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} sa 15 mas.% na 12 mas.% (Slika 48 a)), uprkos tome što je ukupna zapremina pora i ξ -potencijal elektropozitivnija kod SrMgMBAG čestica. Mogući razlog za ovaj efekat je mnogo manja veličina najzastupljenijih pora (D_{max_p}) kod SrMgBAG čestica.



Slika 48. a) TG krive čestica mezoporoznog stakla nedopiranog (cBAG) i dopiranog jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} (SrMgBAG); pre i posle vezivanja IBU, kao i nakon otpuštanja IBU; b) DTG krive čestica pre i posle otpuštanja IBU; c) profili otpuštanja IBU sa čestica u 40 mL PBS (pH=7,4) [186]

Na Slici 48 b) prikazane su DTG krive uzoraka sa IBU i uzoraka nakon 55 h otpuštanja leka. Kod svih uzoraka se uočava odlazak rastvarača do 200 °C. DTG krive uzoraka sa IBU pokazuju dva pika karakteristična za dekompoziciju IBU: I) 220-400 °C i II) 400-500 °C. Ovi pikovi se ne uočavaju na DTG krivama uzoraka nakon 55 h otpuštanja, što ukazuje da se ukupna količina leka otpustila za to vreme.

Dopiranje MBAG čestica može da utiče na njihovu rastvorljivost u fiziološkoj sredini pa stoga i na promenu u kinetici otpuštanja lekova [43]. U ovoj disertaciji je pokazano da binarno dopiranje jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} dovodi do malo bržeg otpuštanja IBU u odnosu na nedopirano mezoporozno staklo (Slika 48 c)). Otpuštanje leka je lakše kod radijalno raspoređenih dendritskih mezoporoznih kanala usled činjenice da su širom otvoreni pri površini čestice čime je omogućena lakša difuzija leka iz strukture [190].

Profili otpuštanja ibuprofena se mogu podeliti na tri stupnja karakteristična za MBG čestice [203]. Prvo dolazi do naglog otpuštanja fizički adsorbovanih molekula leka u prvih 6 h eksperimenta, pri čemu se otpusti 40 mas.% odnosno 52 mas.% IBU sa čestica cBAG odnosno SrMgBAG, redom. Zatim se u drugom koraku (do 24 h) postepeno difuzijom otpušta lek zarobljen u mezoporama (linearni deo krive), i u trećem koraku se otpuštanje usporava dok se ne dostigne plato. Naglo otpuštanje antiinflamatornog leka, kao što je ibuprofen, moglo bi brže smanjiti inflamaciju i bol, što je poželjno kod akutnih stanja poput postoperativnog oporavka. Sa druge strane, ako se radi o hroničnoj upali, neophodno bi bilo obezbediti kontrolisano sporo oslobađanje leka.

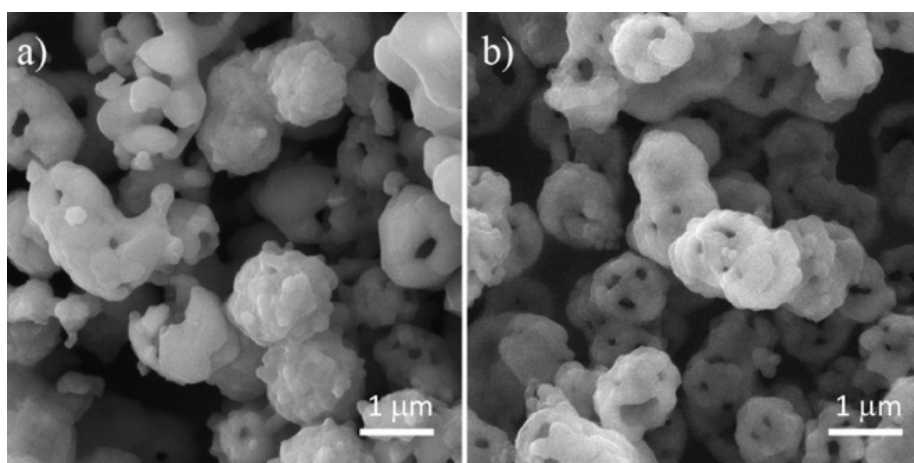
Iako postoji inicijalno naglo otpuštanje IBU sa MBAG čestica, ovaj efekat je mnogo manje izražen u poređenju sa podacima iz literature za mezoporozni silicijum-dioksid gde je za kompletno otpuštanje IBU bilo potrebno svega 20 min [204]. Profil otpuštanja ibuprofena dobijen u ovoj disertaciji je u skladu sa literaturnim podacima za otpuštanje različitih lekova sa površine monodopiranih Sr-MBAG i Mg-MBAG čestica [103,105,106]. Dodatnom modifikacijom površine čestica, kao i uslova inkorporacije leka poput tipa rastvarača i koncentracije leka može se optimizovati proces inkorporacije i otpuštanja lekova tako da se omogući kontrolisano otpuštanje tokom dužeg vremenskog perioda.

19. Procesiranje makroporoznih nosača ćelija

19.1. Kalcinisanе čestice dopiranih kalcijum-fosfata

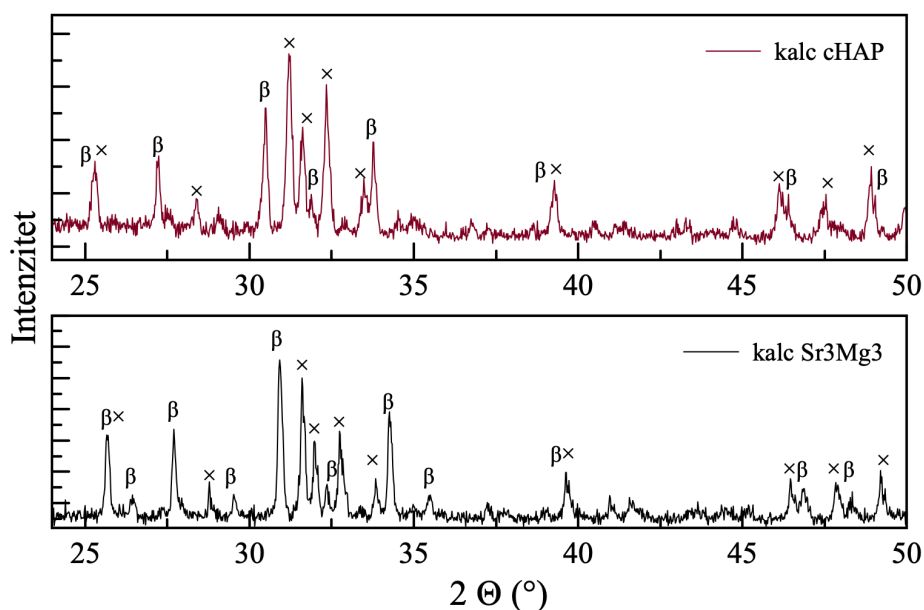
Čestice kalcijum deficitarnog hidroksiapatita tokom kalcinacije podležu faznoj transformaciji u bioaktivniju TCP fazu, i kao takve su poželjne za primenu u biomedicini. Kalcinacija na 1000 °C u ovoj disertaciji je vršena sa ciljem dobijanja bioaktivne β -TCP faze bez formiranja velikih aglomerata. U ovoj sekciji su prikazane kalcinisanе čestice nedopiranog i binarno dopiranih kalcijum-fosfatnih prahova koje će dalje biti korišćene za primenu u vidu bioaktivnih punioca u polimernim kompozitima ili procesirane u vidu makroporoznih nosača ćelija.

Na Slici 49 su date mikrografije čestica cHAP i Sr3Mg3 čestica nakon kalcinacije na 1000 °C u trajanju od 4 h. Tokom kalcinacije Sr3Mg3 i cHAP prahova pri ovim uslovima došlo je do spajanja čestica u čvrste aglomerate veličine 1-2 μ m i početka procesa sinterovanja, odnosno stvaranja zrnaste strukture čestica približno sferne morfologije, unutar kojih i između kojih je prisutna zaostala poroznost (Slika 49). Nije uočen značajan uticaj prisustva dopanata stroncijuma i magnezijuma na morfologiju.



Slika 49. Morfologija kalcinisanih čestica a) kalc cHAP, b) kalc Sr3Mg3

Na Slici 50 prikazani su difraktogrami kalcinisanih prahova sa identifikovanim fazama. U oba slučaja uočavaju se difrakcioni maksimumi karakteristični za HAP i β -TCP fazu, što ukazuje da je na 1000 °C došlo do fazne transformacije i stvaranja dvofazne BCP kristalne strukture kod oba tipa čestica. Za razliku od monofaznog cHAP koji je pre kalcinacije u strukturi imao samo apatitnu fazu, Sr3Mg3 je imao bifazni sastav sa oko 20 % β -TCP faze (rezultati prikazani u sekciji 1 ove disertacije), usled čega je očekivano da nakon kalcinacije Sr3Mg3 poseduje veću količinu β -TCP faze u poređenju sa cHAP. Ovo se na difraktogramima uočava u vidu izraženijih pikova β -TCP faze kod kalcinisanog Sr3Mg3.



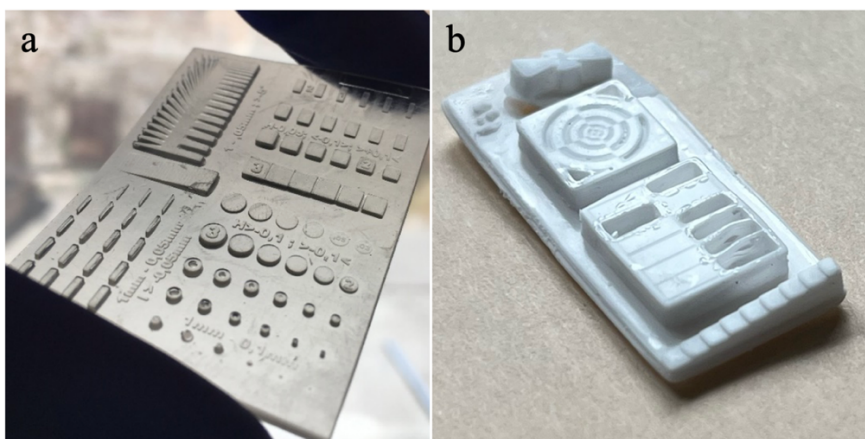
Slika 50. Difraktogrami kalciniranih čestica (x =HAP, β = β -TCP faza)

19.2. Biokompozitni 3D štampani makroporozni nosači ćelija

Makroporozni nosači ćelija predstavljaju privremene 3D strukture koje imitiraju mikrookruženje koštanog tkiva, čime se pospešuju adhezija, proliferacija i diferencijacija ćelija. Svojstva idealnog nosača za BTE uključuje biokompatibilnost, kontrolisanu biodegradabilnosti, osteokonduktivnost i osteoinduktivnost, adekvatnu poroznost sa međupovezanim porama i odgovarajućim mehaničkim svojstvima [8,133]. Poslednjih godina sve više se za fabrikovanje nosača ćelija koriste razne metode 3D štampe.

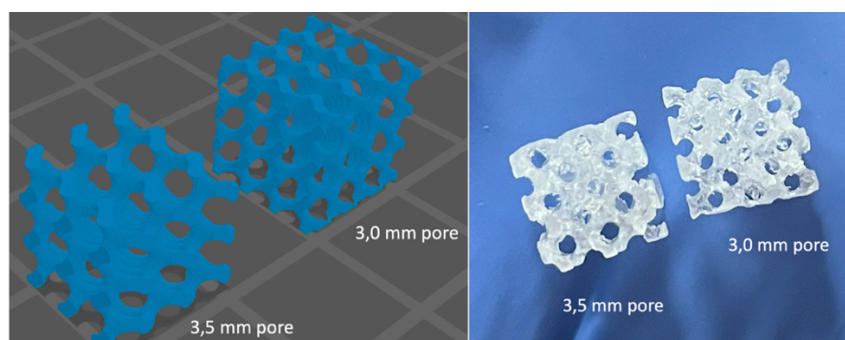
Mask-stereolitografija predstavlja neinvazivnu, jednostavnu i jeftinu metodu 3D štampe sa visokom preciznosti štampanja, ali zahteva primenu mastila sa fotosenzitivnim svojstvima [205]. Dok se polimeri mogu modifikovati tako da imaju fotosenzitivna svojstva, korišćenje neorganskih čestica zahteva umešavanje sa fotosenzitivnim polimerom i dobijanje stabilnih kompozitnih suspenzija. Poli(etilenglikol)-diakrilat (PEGDA) je biokompatibilni fotosenzitivni polimer male viskoznosti i velike rastvorljivosti što ga čini idealnim kandidatom za mSLA štampanje makroporoznih nosača ćelija. Kombinacijom PEGDA i čestica kalcijum-fosfata mogu se dobiti biokompozitni makroporozni nosači ćelija za primenu u inženjerstvu koštanog tkiva. U okviru ove sekcije doktorske disertacije ispitana je mogućnost 3D štampe mSLA metodom biokompozita na bazi PEGDA i sa 20 mas.% kalciniranih čestica Sr3Mg3-HAP (Sr3Mg3/PEGDA).

Pre štampanja krajnjeg oblika neophodno je optimizovati parametre štampe, pre svega visinu pojedinačnog sloja (h) i vremena izlaganja UV zracima pojedinačnog sloja (t) kako bi se ostvarila visoka preciznost štampe. Na Slici 51 je dat prikaz optimizovanih parametara štampanja za čistu PEGDU i kompozit Sr3Mg3/PEGDA. Prisustvo belih čestica CaP dovodi do skretanja UV zraka i rasipanja svetlosti, usled čega preciznost štampanja može biti značajno pogoršana, pa je neophodno odrediti za svaku formulaciju mastila odgovarajuće parametre štampanja. Makroskopski nije primećeno odvajanje faza kod biokompozitnog mastila već je postignuta potpuna uniformnost biokompozitnog 3D odštampanog oblika. Usled postojanja čestica CaP u strukturi kompozit Sr3Mg3/PEGDA je izgubio prozirnost koja se uočava kod PEGDA70 (Slika 51).

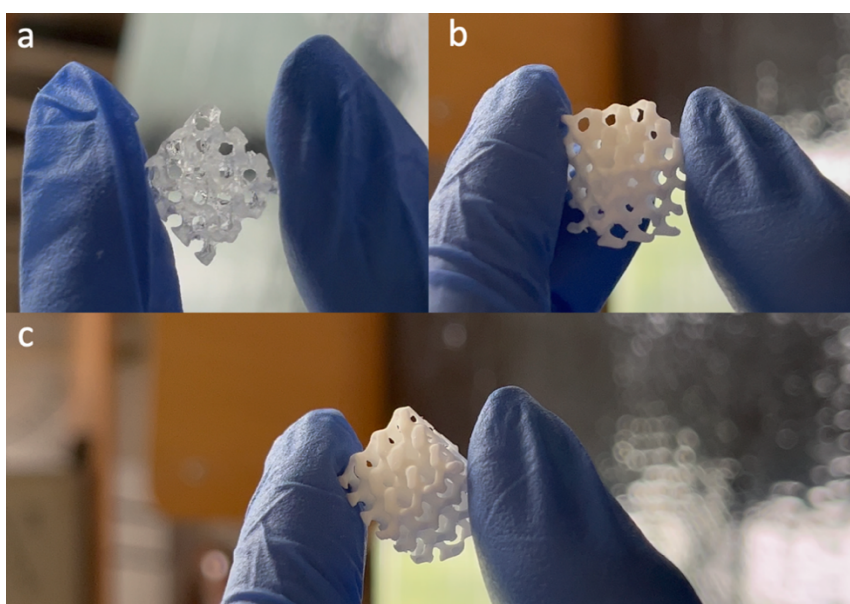


Slika 51. Preciznost štampanja PEGDA70 i Sr3Mg3/PEGDA

Na osnovu digitalnog modela makroporoznog nosača ćelija sa porama veličine 3,0 i 3,5 mm dobijeni su odgovarajući 3D štampani makroporozni nosači ćelija na bazi PEGDA70 (Slika 52). Za dalje eksperimente izabran je model sa porama veličine 3,0 mm. Biokompozitni makroporozni nosači ćelija na bazi Sr3Mg3/PEGDA uspešno su dobijeni mSLA 3D štamptom, tako da imitiraju makroporoznu strukturu kostiju (Slika 53).



Slika 52. Dizajn i dobijeni PEGDA70 makroporozni nosači ćelija sa različitom veličinom pora



Slika 53. Makroporozni nosač ćelija koji imitira strukturu kostiju sa porama od 3,0 mm: a) PEGDA, b) i c) Sr3Mg3/PEGDA

Poslednjih par godina ispitan je dodatak čestica različitih kalcijum-fosfata u PEGDA polimerno mastilo u opsegu 1 mas.% – 42 mas.% [206–210]. Pokazano je da prisustvo čestica kalcijum-fosfata dodatno utiče na umrežavanje PEGDA polimernih lanaca fizičkim umrežavanjem [206], usled čega je u zavisnosti od količine prisutnih čestica i uslova 3D štampe došlo do smanjenja hidrofilnosti i usporene degradabilnosti. Sa druge strane, pokazano je da 5 mas.% HAP značajno poboljšava adheziju hBM-MSC ćelija na makroporoznim nosačima ćelija u poređenju sa odsustvom HAP i prisustvom 1 mas. % HAP [206]. Glatka površina nosača na bazi PEGDA ne dozvoljava efikasnu adsorpciju proteina na svojoj površini usled čega je smanjena adsorpcija i proliferacija ćelija, dok prisustvo biokeramičkih čestica dovodi do stvaranja hrapave površine za koju mogu adherirati ćelije [206,208].

Osim poboljšane interakcije sa ćelijama, dodatak kalcijum-fosfatnih čestica može uticati na mehanička svojstva i stepen bubrenja. U radu Kumar i autora, dodatak 1 mas.% β -TCP nije uticao na pritisnu čvrstoću, ali je dobijena viša vrednost u odnosu na dodatak 1 mas. % HAP, dok je bubrenje bilo veće kod prisustva 1 mas.% β -TCP u odnosu na čist PEGDA i PEGDA sa 1 mas.% HAP [210]. U radu Zhou i autora dodatak 40 mas.% TCP čestica je doveo do značajnog povećanja pritisne čvrstoće sa $3,6 \pm 0,2$ na $8,9 \pm 1$ MPa, kada su nosači testirani u suvom stanju [207].

Srednja vrednost pritisne čvrstoće 3D štampanih Sr3Mg3/PEGDA nosača sa 20 mas.% kalciniranih čestica Sr3Mg3 testiranih nakon bubrenja u PBS iznosila je $0,19 \pm 0,01$ MPa. Slične vrednosti dobijene su u radu Rajabi i autora za 3D štampane nosače na bazi PEGDA i HAP metodom ekstruzije. Pri sadržaju PEGDA 20 %, i HAP u opsegu od 1-5 mas.%, pritisna čvrstoća nosača se kretala u opsegu 0,18 – 0,22 MPa u nabubrelom stanju.

Treba napomenuti da se hidrogelovi testiraju u svom nabubrelom obliku kako bi se ispitala mehanika u relevantnim fiziološkim uslovima, ali kako su ove vrednosti značajno manje, autori često biraju testiranje u suvom stanju zbog čega su vrednosti iz literature međusobno teško uporedive. Osim toga, svaka promena u geometriji 3D oblika, visini sloja i vremenu ekspozicije značajno utiče na polimerizaciju, a time i na mehaniku dobijenih makroporoznih nosača. Nedovoljno polimerizovana struktura sadrži toksične neporeagovale monomere, dok previše polimerizovana struktura ograničava kretanje lanaca usled čega je bubrenje hidrogela smanjeno, a krutost veća. Potrebna je detaljna optimizacija uslova štampanja i ispitivanje interakcije sa ćelijama kako bi se mogla precizno dizajnirati biomehanička svojstva za primenu u inženjerstvu tkiva.

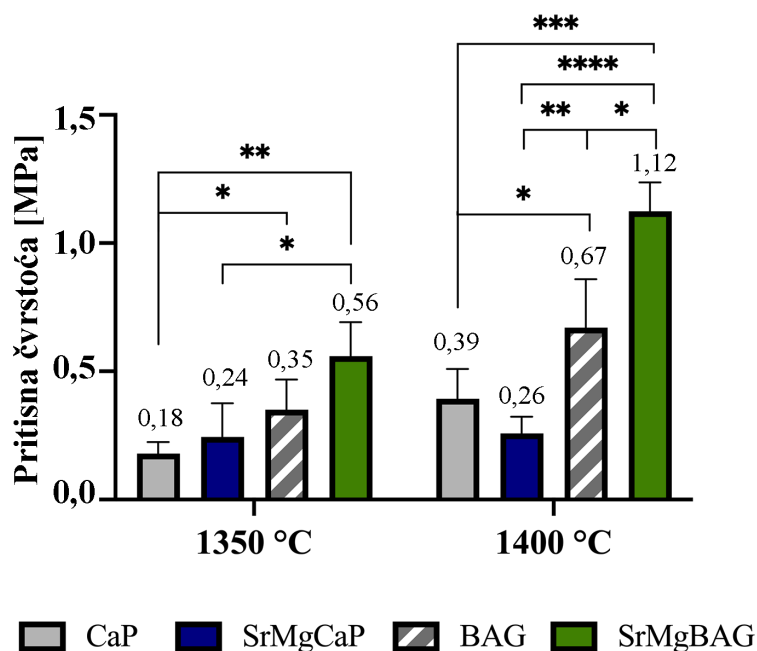
19.3. Keramički makroporozni nosači ćelija

Dopiranje biokeramičkih materijala različitim biološki aktivnim jonima je izuzetno aktuelan pristup kod procesiranja nosača za inženjerstvo košanog tkiva. *In vivo* razgradnja ovih materijala je posredovana osteoklastima, i rezultira oslobađanjem jona kalcijuma i fosfatnih jona koji mogu dodatno da podstaknu formiranje nove kosti putem osteoindukcije [211]. Osim toga, kombinacija CaP i bioaktivnog stakla u kompozitne nosače ćelija može usporiti degradaciju TCP nosača, a istovremeno poboljšati mehanička svojstva tako što omogućava sinterovanje u prisustvu tečne faze [89,92,212–214]. Dodatak BAG je takođe pokazao pozitivan efekat i na adheziju ćelija, njihovu vijabilnost i proliferaciju u poređenju sa CaP, ali ovaj uticaj direktno zavisao od količine prisutnog BAG [213]. Tokom regeneracije košanog tkiva procesi angiogeneze i osteogeneze su usko povezani [215] i stoga je poželjno da makroporozni nosači ćelija pored pro-osteogenih imaju i pro-angiogena svojstva. Velika reaktivnost, male čestice, uniformna raspodela veličina MBAG čestica i visok sadržaj silicijuma može obezbediti uniformnu raspodelu staklaste faze u strukturi nosača, i dodatno stimulisati procese osteogeneze i angiogeneze.

S tim u vezi, u ovom delu disertacije procesirani su keramički makroporozni nosači ćelija na bazi kalciniranih cHAP (CaP) i Sr₃Mg₃ (SrMgCaP) i njihovih kompozita sa 10 mas.% nanočestica cBAG (BAG) i SrMgBAG (SrMgBAG). Ispitana su mehanička svojstva, struktura i fazni sastav razvijenih nosača i njihova potencijalna primena u inženjerstvu koštanog tkiva, odnosno njihova bioaktivnost u statičkim i perfuzionim uslovima, direktna citokompatibilnost sa EA.hy926 i BM-MSK ćelijskim linijama, kao i sposobnost nosača da stimulišu osteogenezu i angiogenezu *in vitro*.

19.3.1. Mehanička svojstva, mikrostruktura, elementni i fazni sastav nosača ćelija

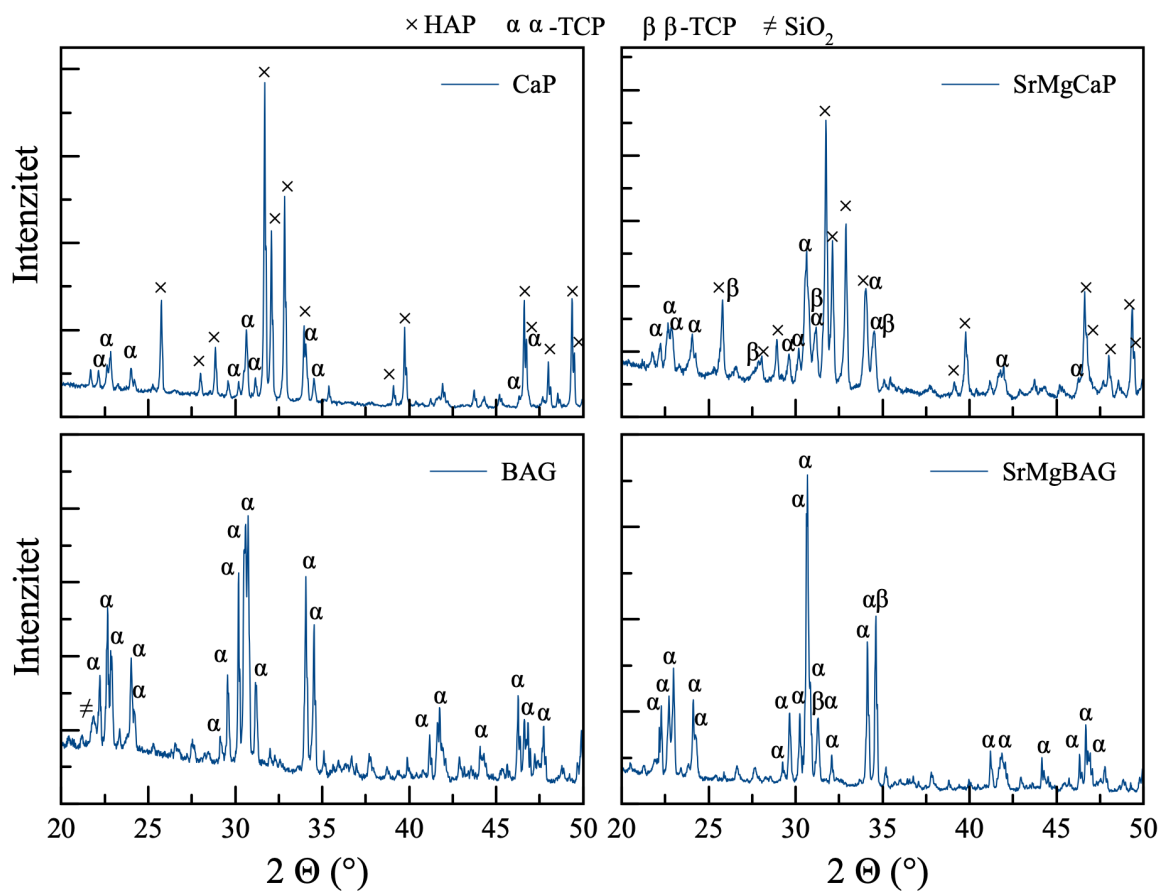
Makroporozni nosači ćelija su sinterovani na 1350 °C ili 1400 °C, a pošto su generalno dobijene značajno više vrednosti pritiska čvrstoće ($p < 0,5$) kod primene više temperature sinterovanja (Slika 54), za dalje istraživanje je korišćena temperatura 1400 °C. Prisustvo čestica mezoporoznog bioaktivnog stakla, bez i sa dopantima, je značajno uticalo na povećanje pritiska čvrstoće nosača na bazi SrMgCaP ($p = 0,0061$). Najveće vrednosti su dobijene za SrMgBAG nosač i to statistički značajno veće u odnosu na sve ostale nosače, tj. sa dodatkom 10 mas.% SrMgBAG čestica su značajno poboljšana mehanička svojstva makroporoznih nosača u odnosu: SrMgCaP ($p < 0,0001$), CaP ($p = 0,0004$) i BAG ($p = 0,0148$).



Slika 54. Pritisna čvrstoća skafolda sinterovanih na 1350°C i 1400 °C [$* p < 0,05$; $** p < 0,01$; $*** p < 0,001$; $**** p < 0,0001$]

Na XRD difraktogramu CaP nosača ćelija sinterovanih na 1400 °C se uočavaju pikovi karakteristični za apatit i α -TCP fazu, bez prisustva β -TCP faze (Slika 55). Za razliku od CaP, kod SrMgCaP nosača visoka temperatura sinterovanja je dovela do smanjene transformacije β -TCP u α -TCP fazu. Ovo je u skladu sa prethodno pokazanim uticajem Sr,Mg-dopiranja na dekompoziciju HAP i stabilisanje β -TCP faze [152,216]. Kvantifikacijom faza pokazano je da u slučaju kompozitnih staklo-keramičkih skafolda fazni sastav čini preko 95% α -TCP faze, bez pojave karakterističnih pikova za apatit, što ukazuje na favorizaciju nastanka α -TCP faze tokom interakcije staklaste faze sa kalcijum-fosfatima. Ovi rezultati su u skladu sa podacima iz literature koji pokazuju da prisustvo silicijumovih jona u HAP nosačima favorizuje formiranje α -TCP faze [138,142,212]. Pretpostavlja se da tokom termičkog tretmana Si^{4+} joni iz stakla ulaze u kristalnu rešetku HAP i β -TCP i delimično supstituišu jone fosfora, usled čega dolazi do distorzije rešetke i podsticanja formiranja i stabilizacije

α -TCP faze. Pored α -TCP faze u strukturi BAG nosača pronađena je i mala količina SiO_2 , odnosno β -TCP faze u strukturi SrMgBAG nosača (Slika 55, Tabela 14).



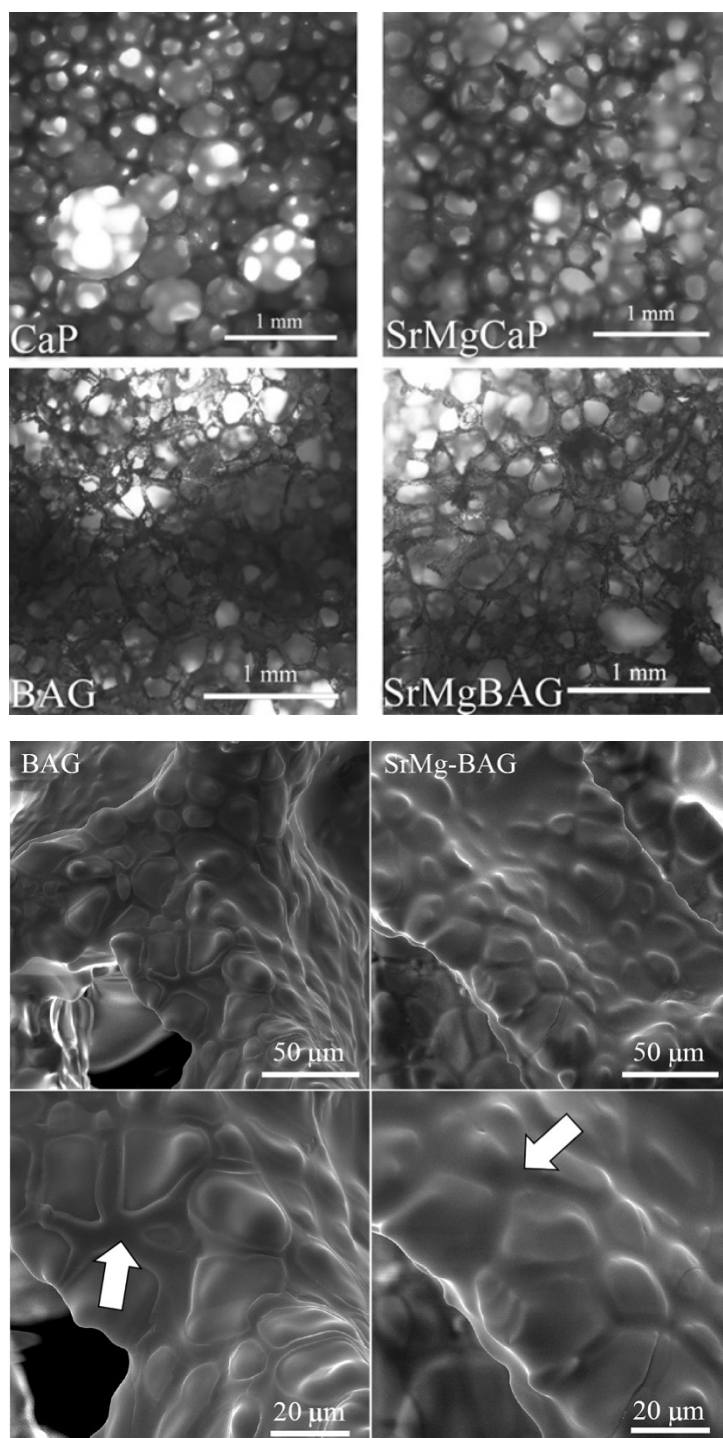
Slika 55. XRD difraktogram makroporoznih nosača ćelija sinterovanih na 1400 °C

Tabela 14. Kvantifikacija faznog sastava makroporoznih nosača ćelija sinterovanih na 1400 °C

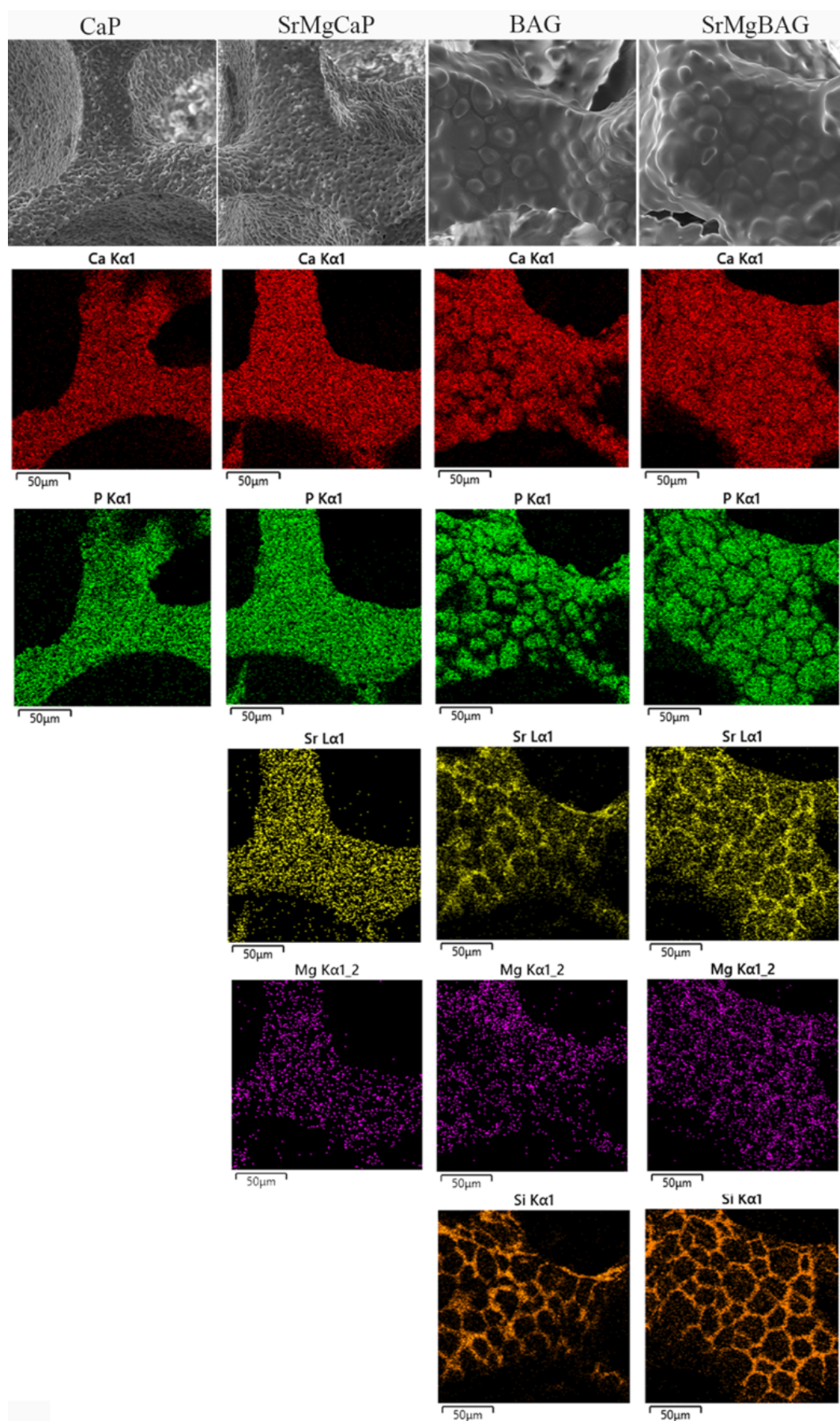
Uzorak	CaP	SrMgCaP	BAG	SrMgBAG
Fazni sastav	73,4% HAP 26,6% α -TCP	46,9% HAP 40,2% α -TCP 12,9% β -TCP	96,5% α -TCP 3,5% SiO_2	96,5% α -TCP 3,5% β -TCP

Makrostruktura nosača analizirana pomoću *Thunder* mikroskopa za 3D analizu ćelijske kulture je potvrdila postojanje otvorene poroznosti i međusobno povezanih pora kod svih uzoraka (Slika 56). FE-SEM analizom je utvrđena mikrostruktura vratova nosača gde je uočena nepotpuna densifikacija strukture tokom sinterovanja nosača na bazi CaP i SrMgCaP. Sa druge strane, dodatak 10 mas.% čestica mezoporoznog stakla cBAG ili SrMgBAG je dovela do potpune eliminacije pora mikronskih dimenzija (Slika 56). Tokom sinterovanja na 1400 °C čestice stakla se tope i omogućavaju odvijanje sinterovanja u prisustvu tečne faze. Tečna faza omogućava brži transport materije tj. bržu difuziju čestica i njihovo preuređivanje što dovodi do veće denzifikacije, odnosno eliminisanja zaostale poroznosti, usled čega je došlo do značajnog povećanja vrednosti pritiska čvrstoća kompozitnih nosača (Slika 54). Na mikrografijama na Slici 56 se može uočiti kontinualna mreža

staklaste faze rasprostranjena duž granica kalcijum-fosfatnih zrna, što je potvrđeno i EDS mapiranjem elemenata (Slika 57). Joni stroncijuma i magnezijuma u strukturi nosača su ravnomerno raspoređeni kod CaP i SrMgCaP dok se kod SrMgBAG nosača jasno uočava razlika u raspodeli Mg^{2+} jona u samim zrnima i duž granica zrna tj. u staklastoj fazi. U slučaju Sr^{2+} jona uočava se veća koncentracija u staklastoj fazi i kod uzorka cBAG i SrMgBAG, što može ukazati na neprecizno merenje raspodele stroncijuma zbog blizine $K\alpha$ energije karakterističnih X-zraka za Sr i Si, s obzirom na očekivano i jasno uočljivo dominantno prisustvo silicijuma u staklastoj fazi.



Slika 56. Makrostruktura nosača analizirana pomoću Thunder mikroskopa i FESEM mikrografije mikrostrukture vratova nosača sinterovanih na 1400 °C na bazi CaP, SrMg-CaP, BAG, SrMg-BAG; strelice ukazuju na staklastu fazu na granicama zrna



Slika 57. EDS mapiranje elemenata različitih nosača ćelija

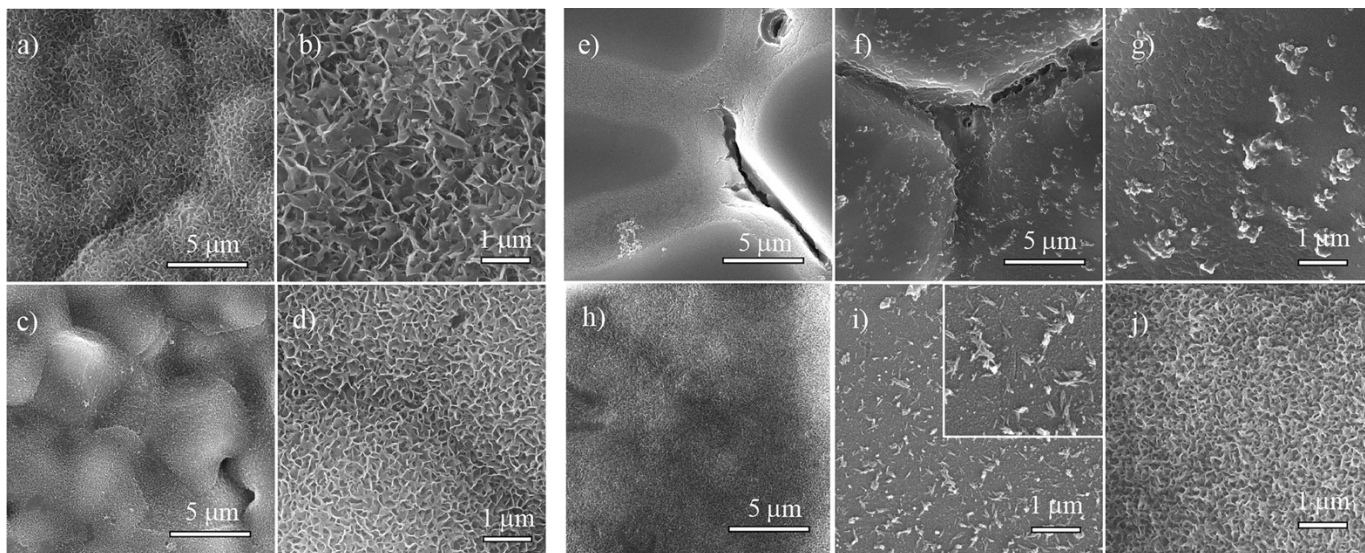
Pritisna čvrstoća makroporoznih nosača ćelija zavisi od tehnike procesiranja nosača odnosno poroznosti i veličina makropora, kao i faznog sastava. Tehnika koja je korišćena u ovoj disertaciji je metoda replike suđera koja je jednostavna i efektivna metoda za dobijanje strukture nalik kosti sa velikom otvorenom poroznošću (70-90%) i međupovezanim porama koje pogoduju adheziji i migraciji ćelija [137]. Imajući u vidu da povećanje poroznosti dovodi do pogoršanja mehaničkih karakteristika, biokeramički skafoldi dobijeni ovom metodom imaju generalno niske vrednosti pritisne čvrstoće, često čak značajno niže u odnosu na vrednosti za trabekularnu kost (2-12 MPa). Vrednosti pritisne čvrstoće svih nosača dobijenih u ovoj disertaciji su bile u opsegu vrednosti pritisnih čvrstoća nosača iz literature, dobijenih metodom replike suđera [92,93,137]. Scalera i autori su pokazali da Sr,Mg-dopiranje HAP nosača ćelija sinterovanih na 1300 °C rezultuje smanjenjem pritisne čvrstoće u poređenju sa čistim HAP ($0,32 \pm 0,06$ MPa naspram $0,48 \pm 0,15$ MPa) [93] iako u uzorku nije bilo mehanički slabe α -TCP faze, a sadržaj β -TCP faze je bio veoma mali. Kazemi i autori su pokazali da dodatak 25 mas.% 45S5 stakla u Sr-TCP nosač dovodi do povećanja srednje vrednosti pritisne čvrstoće sa 0,88 MPa na $1,70 \pm 0,8$ MPa, ali raspodela stakla nije bila uniformna usled čega nije došlo do potpune densifikacije strukture. U ovom slučaju, glavna faza u strukturi je bila silikatna – kombeit i nije identifikovano prisustvo α -TCP [92]. Sa druge strane u studiji Alves i autora, dodatak 7,5 mas. % S53P4 bioaktivnog stakla u 3D štampane TCP nosače je imalo pozitivan uticaj na mehaniku, tj. pritisna čvrstoća je povećana sa $0,35 \pm 0,07$ MPa na $2,4 \pm 1,0$ MPa, uprkos formiranju α -TCP faze [142].

U ovoj disertaciji je pokazano da 10 mas.% cBAG i SrMgBAG čestica statistički značajno povećava srednju vrednost pritisne čvrstoće sa $0,26 \pm 0,06$ na $0,67 \pm 0,19$ MPa i $1,12 \pm 0,11$ MPa redom. Ovo poboljšanje mehaničkih svojstava kompozitnih nosača uprkos formiranju α -TCP faze je direktna posledica eliminacije mikroporoznosti bez značajnog smanjenja makroporoznosti (Slika 56). Iako mikroporoznost negativno utiče na mehanička svojstva, sa druge strane smatra se pogodnom za adheziju ćelija usled veće specifične površine i hrapavosti površine koje omogućavaju intimniju interakciju ćelija sa materijalom [217]. Zbog toga je neophodno dalje optimizovati biomehanička svojstva nosača ćelija za uspešnu primenu u inženjerstvu košanog tkiva.

19.3.2. *In vitro* bioaktivnost u statičkim uslovima i perfuzionom bioreaktoru

Bioaktivnost je ispitana u perfuzionom bioreaktoru i u statičkim uslovima, a zbog najboljih mehaničkih svojstava ispitivanja su izvršena na SrMgBAG skafoldu, dok je kao kontrola korišćen CaP skafold. *In vitro* test bioaktivnosti može ukazati na sposobnost materijala da u kontaktu sa fiziološkom sredinom stvori novi sloj hidroksiapatita na svojoj površini. Kako bi se preciznije simulirali fiziološki uslovi, osim konvencionalnog testa potapanjem u STT na 37 °C u statičkim uslovima, korišćen je i perfuzioni bioreaktor za simulaciju perfuzije telesne tečnosti.

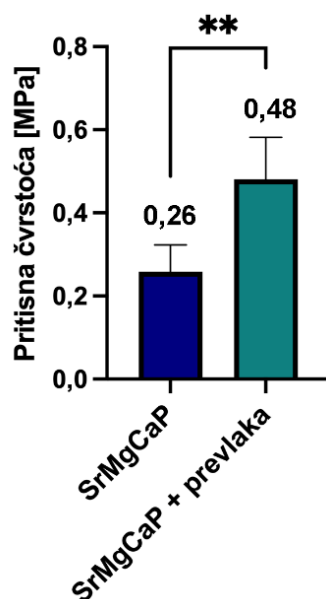
Imajući u vidu dominantno prisustvo veoma rastvorljive α -TCP faze u strukturi SrMgBAG nosača, moglo se očekivati da je ovaj nosač bioaktivniji od CaP, ali to nije bio slučaj (Slika 58). I u statičkim i u dinamičkim uslovima nakon 14 dana u STT na preseku CaP nosača se vidi novoformirana gusta mreža kristalita karakteristične morfologije HCA, koji potvrđuju bioaktivnu prirodu nosača. Sa druge strane, na poprečnom preseku SrMgBAG nosača u statičkim uslovima se uočava samo rastvaranje staklaste faze i začetak precipitacije pre svega duž granica zrna. Ali kada je uzorak SrMgBAG testiran u fiziološki relevantnim uslovima u perfuzionom bioreaktoru potvrđeno je formiranje karakterističnih HCA kristala. Na Slici 58 j) i 58 i) se vidi da novonastali kristali nisu uniformno raspoređeni po celom nosaču, odnosno da postoje oblasti bogate HCA kristalima i oblasti gde se uočava pojava prvih kristalita HCA. Dobijeni rezultati potvrđuju hipotezu da brzina rastvorljivosti nosača na bazi TCP može biti smanjena sa dodatkom MBAG čestica tj.usled pojave veće količine staklaste faze tokom sinterovanja, odnosno da se biodegradabilnost može kontrolisati optimizacijom odnosa CaP/MBAG.



Slika 58. Mikrostruktura preseka nosača nakon testa *in vitro* bioaktivnosti tokom 14 dana u STT: a,b) CaP u statičkim uslovima; c,d) CaP u perfuzionom bioreaktoru; e-g) SrMgBAG u statičkim uslovima; h-j) SrMgBAG u perfuzionom bioreaktoru

19.3.3. Uticaj biokompozitne prevlake na mehanička svojstva nosača

Nanošenje polimernih prevlaka ojačava strukturu makroporoznih nosača ćelija, time što popunjava defekte i pukotine u strukturi nosača. Prethodno je pokazano da prevlaka na bazi želatina poboljšava pritisnu čvrstoću Sr,Mg-dopiranog HAP nosača (4 mol.% Mg 1 mol.% Sr) pripremljenog metodom replike sunđer [155]. Naime u radu Galić i autora, pritisna čvrstoća datih nosača je više nego udvostručena, sa 0,087 MPa na 0,207 MPa. U ovoj disertaciji ispitan je uticaj nanošenja biokompozitne prevlake na bazi želatina (2 mas.%) i SrMgBAG čestica (1 mas.%) i pokazano je da je došlo do statistički značajnog ($p = 0,0112$) poboljšanja pritisne čvrstoće SrMgCaP nosača ćelija sa 0,26 MPa na 0,48 MPa nakon nanošenja kompozitne prevlake (Slika 59).



Slika 59. Pritisna čvrstoća makroporoznih nosača ćelija: SrMgCaP bez i sa biokompozitnom prevlakom na bazi želatina i Sr,Mg-dopiranog mezoporoznog stakla [$** p < 0,01$]

19.3.4. Primena keramičkih makroporoznih nosača za kultivaciju ćelija

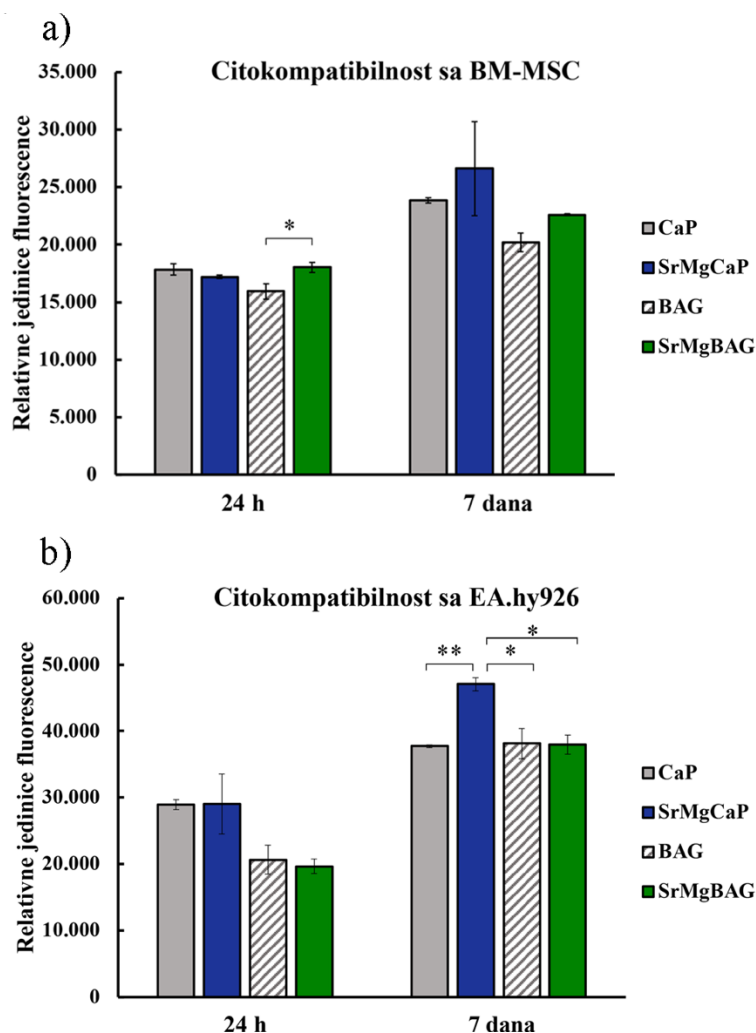
Kako bi se ispitala potencijalna primena razvijenih makroporoznih nosača ćelija u inženjerstvu koštanog tkiva, u ovoj sekciji ispitana je citokompatibilnost nosača sa dve vrste humanih ćelija – matične BM-MSC i endotelne EA.hy926, kao i sposobnost nosača da stimulišu osteogenezu i angiogenezu.

19.3.5. Citokompatibilnost

Citokompatibilnost nosača je ispitana direktnim testom određivanjem metaboličke aktivnosti BM-MSC i EA.hy926 ćelija uzgajanih u samim nosačima nakon 24 h i 7 dana kultivacije, a rezultati su prikazani na Slici 60a. Nakon 24 h kultivacije metabolička aktivnost BM-MSC ćelija je bila najveća kod SrMgBAG nosača, ali je ova razlika bila statistički značajna samo u poređenju sa BAG nosačem. Nakon 7 dana kultivacije kod svih grupa vidi se jasno povećanje metaboličke aktivnosti BM-MSC ćelija koje ukazuje na njihovu proliferaciju unutar skafolda. Najveća metabolička aktivnost BM-MSC ćelija nakon 7 dana kultivacije je primećena kod SrMgCaP nosača, s tim da nije pronađena statistički značajna razlika u odnosu na sve ostale grupe. Humane BM-MSC ćelije kultivisane tokom 7 dana na kompozitnim nosačima na bazi SrMgCaP i 10 mas.% nanočestica mezoporoznog stakla sa i bez dopanata su pokazale manju metaboličku aktivnost u odnosu na ćelije kultivisane u nosačima SrMgCaP i CaP. Deng i autori (2017) su pokazali da dodatak kalcijum-silikata u β -TCP nosače ima negativan efekat na vijabilnost humanih BM-MSC ćelija [218], dok su sa druge strane istraživanja Yuan i autora pokazala da je vijabilnost mišjih BM-MSC ćelija bila značajno stimulisana kod kompozitnih nosača na bazi β -TCP i magnezijum-silikata [96] kao i kompozita β -TCP i cink-silikata [219].

U najnovijim istraživanjima Lu i autora (2024) pokazano je da inkorporiranje 10-30 mol.% Sr [220], kao i 3-10 mol.% Mg [94] u 3D štampane CaP nosače dovodi do povećanja vijabilnosti mišjih BM-MSC ćelija u poređenju sa CaP nakon 7 dana kultivacije. Sa druge strane, Scalera i autori (2020) su pokazali smanjenu vijabilnost humanih MG63 ćelija osteosarkoma kultivisanih u kontaktu sa binarno dopiranim SrMgCaP nosačima u odnosu na nosače na bazi čistog HAP. Rezultati ove disertacije pokazuju pozitivan efekat binarnog Sr,Mg-dopiranja CaP nosača (3 mol.% Sr i 3 mol.% Mg) na vijabilnost humanih BM-MSC kultivisanih u trajanju od 7 dana.

Metabolička aktivnost endotelnih EA.hy926 ćelija nakon 24 h je bila niža kod biokompozitnih nosača sa česticama MBAG, ali bez statističke značajnosti (Slika 60b). Kako ćelije preferiraju hrapavu površinu za koju mogu lakše da adheruju, verovatno je da mikroporozna struktura CaP i SrMgCaP nosača omogućava bolju inicijalnu adheziju EA.hy926 ćelija u poređenju sa kompozitnim nosačima. Nakon 7 dana kultivacije metabolička aktivnost EA.hy926 je bila značajno viša kod nosača SrMgCaP u odnosu na sve ostale nosače ($p < 0,05$), što pokazuje značajan stimulativan efekat Sr,Mg-dopiranja na vijabilnost EA.hy926 ćelija. Ovi rezultati su u skladu sa istraživanjima Lu i autora (2023) gde je pokazano da dopiranje BCP nosača jonima Mg^{2+} u rasponu 3-10 mol.% značajno stimuliše vijabilnost i proliferaciju endotelnih HUVEC ćelija [94]. Iako je prisustvo čestica MBAG pokazalo manju vijabilnost ćelija HUVEC u odnosu na SrMgCaP nakon 7 dana, ako posmatramo stepen proliferacije ćelija kao odnos metaboličke aktivnosti izmerene sedmog i prvog dana, možemo uočiti jasan uticaj prisustva Sr^{2+} , Mg^{2+} i Si^{4+} jona. Naime, najviši stepen proliferacije ćelija je uočen kod SrMgBAG i BAG nosača (~2 puta povećanje), a zatim SrMgCaP nosača (~1,6 puta povećanje), dok je kod čistog CaP iznosio svega 1,3 puta. Treba imati u vidu da osim hemijskog sastava za sposobnost rasta i proliferacije ćelija bitnu ulogu igraju i mikrostruktura i makroporoznost nosača, na koje je uticao dodatak čestica MBAG.

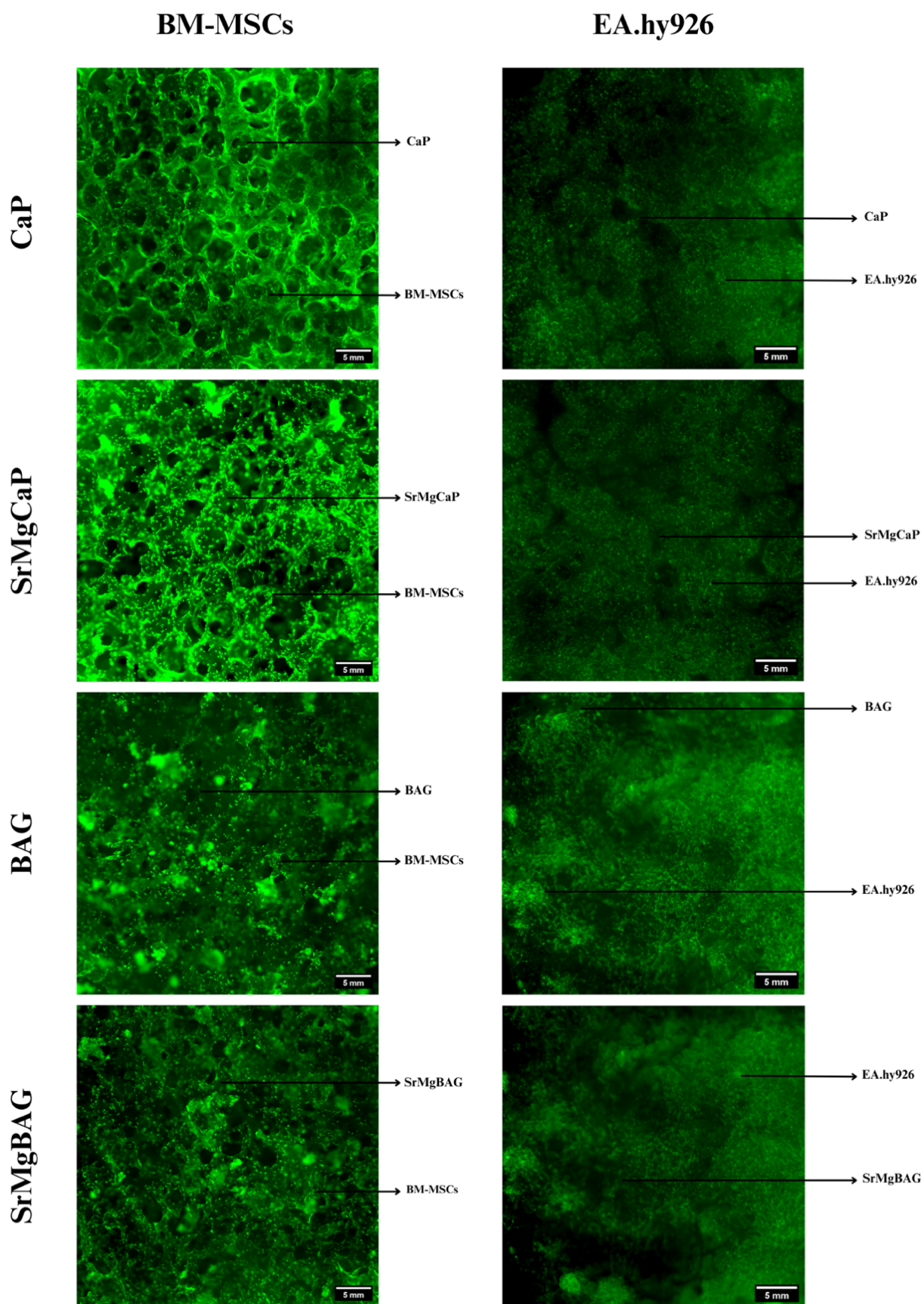


Slika 60. Rezultati *in vitro* testa citokompatibilnosti. a) Metabolička aktivnost BM-MSC ćelija kultivisanih u nosačima, b) metabolička aktivnost endotelinih EA.hy926 ćelija kultivisanih u nosačima. Rezultati redukcije resazurina su prikazani u relativnim jedinicama fluorescencije [$* p < 0,05$; $** p < 0,01$]

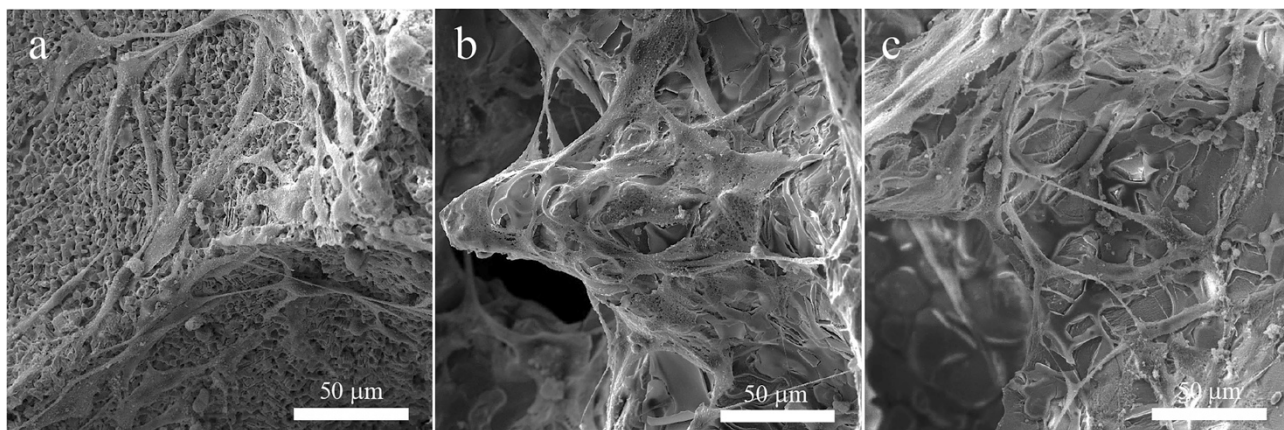
Citokompatibilnost nosača je dodatno potvrđena kvalitativnom analizom citokompatibilnosti (*eng. live/dead test*) pomoću *Thunder* mikroskopa čiji rezultati se vide na Slici 61. Obilje zelene fluorescencije koja potiče od metabolički aktivnih odnosno živih ćelija se vidi u sva četiri tipa nosača, a potpuno odsustvo crvene boje ukazuje da nema značajnog broja mrtvih ćelija nakon 7 dana kultivacije. Na Slici 61 se može uočiti da su ćelije raspoređene uglavnom na zidovima nosača, ali da se prostiru i u manjim porama po cijeloj zapremini nosača.

Pomoću SEM mikroskopije analiziran je kontakt ćelija sa površinom nosača (Slike 62-64) nakon 7 dana i 14 dana kultivacije. Pljosnata, poligonalna morfologija BM-MSC sa prisutnim citoplazmatskim produžecima ukazuje na intimni kontakt i odličnu adheziju ćelija za površinu zidova nosača, što je od izuzetne važnosti za proliferaciju i diferencijaciju matičnih ćelija (Slika 62). Takođe se uočava dobra adhezija EA.hy926 ćelija (Slika 63, 64), kao i ostvarivanje kontakta između samih ćelija preko citoplazmatskih produžetaka, što svedoči o njihovoj proliferaciji.

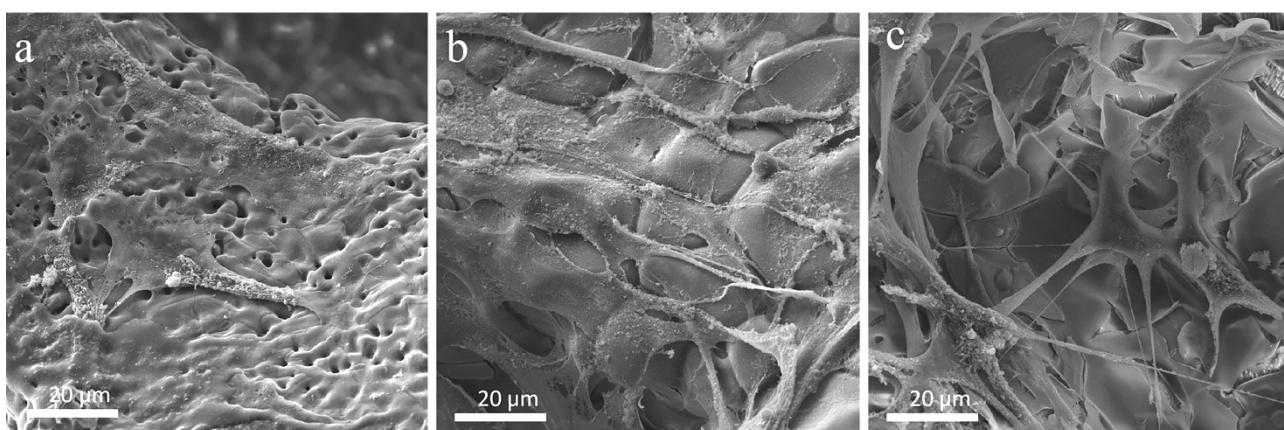
Pozitivna interakcija ćelija sa biomaterijalom makroporoznog nosača ćelija, kao i mogućnost ćelija da migriraju kroz njega je neophodni preduslov za njegovu primenu u inženjerstvu koštanog tkiva, te se može zaključiti da svi biokeramički nosači razvijeni u ovoj disertaciji predstavljaju pogodne 3D sredine za kultivaciju BM-MSC i EA.hy926 ćelija.



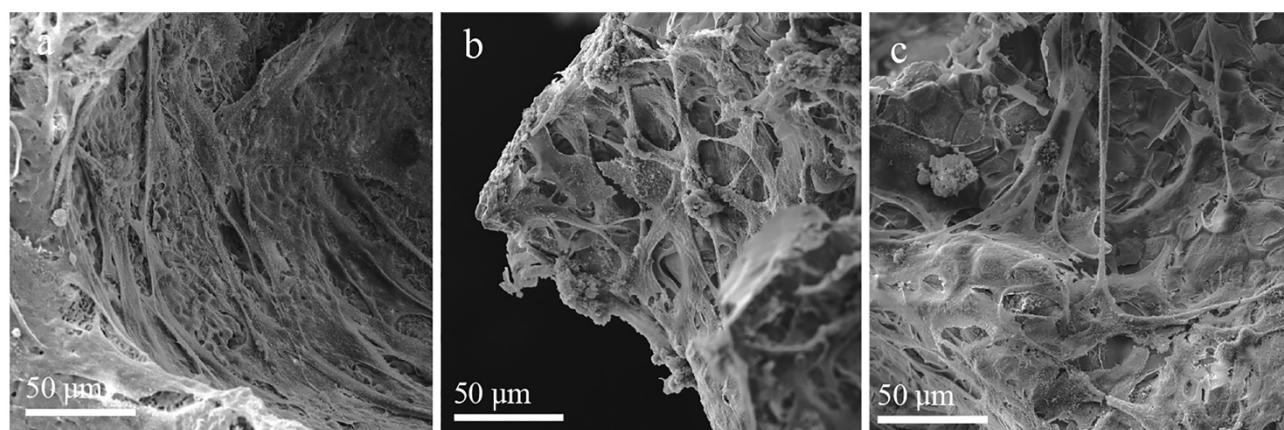
Slika 61. Kvalitativno određivanje citokompatibilnosti nosača CaP, SrMgCaP, BAG, i SrMgBAG sa ćelijama BM-MSCs i EA.hy926 kultivisanim u nosačima u trajanju od 7 dana, analizirano pomoću fluorescentnog mikroskopa za 3D analizu ćelijske sredine (Thunder)



Slika 62. FE-SEM mikrofografije interakcije BM-MSC ćelija sa makroporoznim nosačima ćelija (7 dana kultivacije): a) SrMgCaP, b) BAG, c) SrMgBAG



Slika 63. FE-SEM mikrofografije interakcije EA.hy926 ćelija sa makroporoznim nosačima ćelija (7 dana kultivacije): a) SrMgCaP, b) BAG, c) SrMgBAG

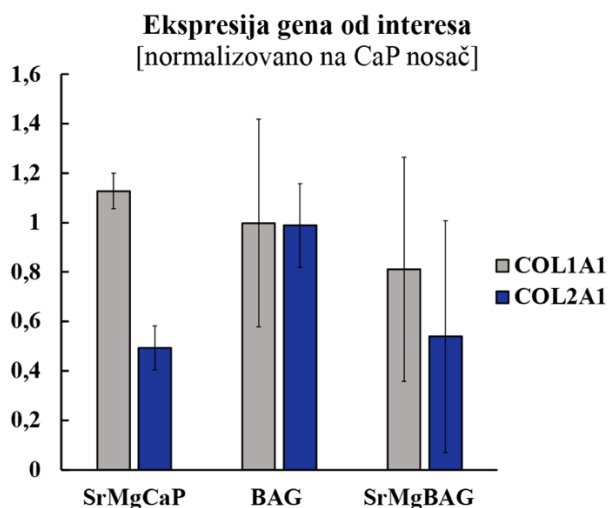


Slika 64. FE-SEM mikrofografije interakcije EA.hy926 ćelija sa makroporoznim nosačima nakon 14 dana kultivacije: a) SrMgCaP, b) BAG, c) SrMgBAG

19.3.6. Pro-osteogeni potencijal

Pored adhezije i proliferacije ćelija, potrebno je i stimulirati osteogenu diferencijaciju matičnih ćelija, kako bi se omogućila uspešna regeneracija koštanog tkiva. Nosači na bazi HAP i TCP imaju osteokonduktivna svojstva, dok bioaktivna stakla imaju pored osteokonduktivnih i osteoinduktivna svojstva. Dopiranje različitim jonima poput Sr^{2+} , Mg^{2+} i Si^{4+} može dovesti do stimulisanja ekspresije gena koji su odgovorni za osteogenezu i angiogenezu, čime dolazi do ubrzane regeneracije kostiju [91,94,96,221–224].

Pro-osteogeni potencijal keramičkih makroporoznih nosača ćelija dopiranih jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} , i biokompozitnih nosača ćelija na bazi Sr,Mg-dopiranih CaP i bioaktivnog stakla je ispitan određivanjem promene ekspresije gena od interesa nakon 21 dana uzgajanja BM-MSC ćelija unutar nosača u regularnom medijumu. Na Slici 65 date su srednje vrednosti promene ekspresije gena normalizovane u odnosu na CaP nosač, koji je korišćen kao osteokonduktivna kontrola kako bi se ispitaio uticaj dopanata i čestica stakla. Analiza genske ekspresije nije pokazala statistički značajne promene u nivoima ekspresije COL1A1 i COL2A1 gena od strane BM-MSC ćelija bez obzira na tip nosača u kom su uzgajane, ali je ekspresija COL1A1 bila veća od COL2A1 za SrMgCaP i SrMgBAG nosače, što može ukazati na indukciju osteogene diferencijacije. Povećana ekspresija COL2A1, koji predstavlja marker hondrogeneze, generalno ukazuje na tendenciju diferencijaranja matičnih ćelija ka hondrocitima. Jedan od najčešćih procesa formiranja kosti jeste endohondralno okoštavanje tj. nastanak i dalja transformacija hrskavičavog tkiva u kost [225].



Slika 65. Ekspresija gena BM-MSC ćelija kultivisanih u makroporoznim nosačima ćelija 21 dan. Relativna ekspresija alfa 1 lanca kolagena tipa 1 (COL1A1) i alfa 1 lanca kolegena tipa 2 (COL2A1) izražena je u odnosu na kontrolne CaP nosače

Lu i autori su ispitali promenu ekspresije osteogenih gena mišjih BM-MSC ćelija kultivisanih na 3D štampanim SrCaP ili MgCaP nosačima u osteogenom medijumu [94,95] i pokazano je da je dopiranje sa Sr^{2+} ili Mg^{2+} jonima značajno stimulisalo ekspresiju COL1 gena u prvih 7 dana, dok je nakon 14 dana kultivacije ekspresija COL1 kod nedopiranog CaP bila veća nego SrCaP, odnosno slična kao MgCaP. Imajući u vidu združeni efekat osteogenih jona i osteogenog medijuma u pomenutim studijama, kao i razlike u ćelijskim linijama i vremenu kultivacije, nije moguće direktno poređenje efekata dopiranja na ekspresiju COL1 gena sa rezultatima dobijenim u ovoj disertaciji.

Rezultati PCR analize prikazani na Slici 65 ukazuju na pozitivni efekat dopiranja Sr^{2+} i Mg^{2+} jonima na ekspresiju COL1A1 gena dvadeset prvog dana kultivacije humanih BM-MSC ćelija, dok je kod kompozitnih nosača BAG i SrMgBAG došlo do neznatno smanjene ekspresije COL1A1 u odnosu na CaP i SrMgCaP nosače. Ovi rezultati su u skladu sa rezultatima Kazemi i autora (2019) gde je nakon 21 dana kultivacije BM-MSC ćelija pacova na nosačima u regularnom medijumu

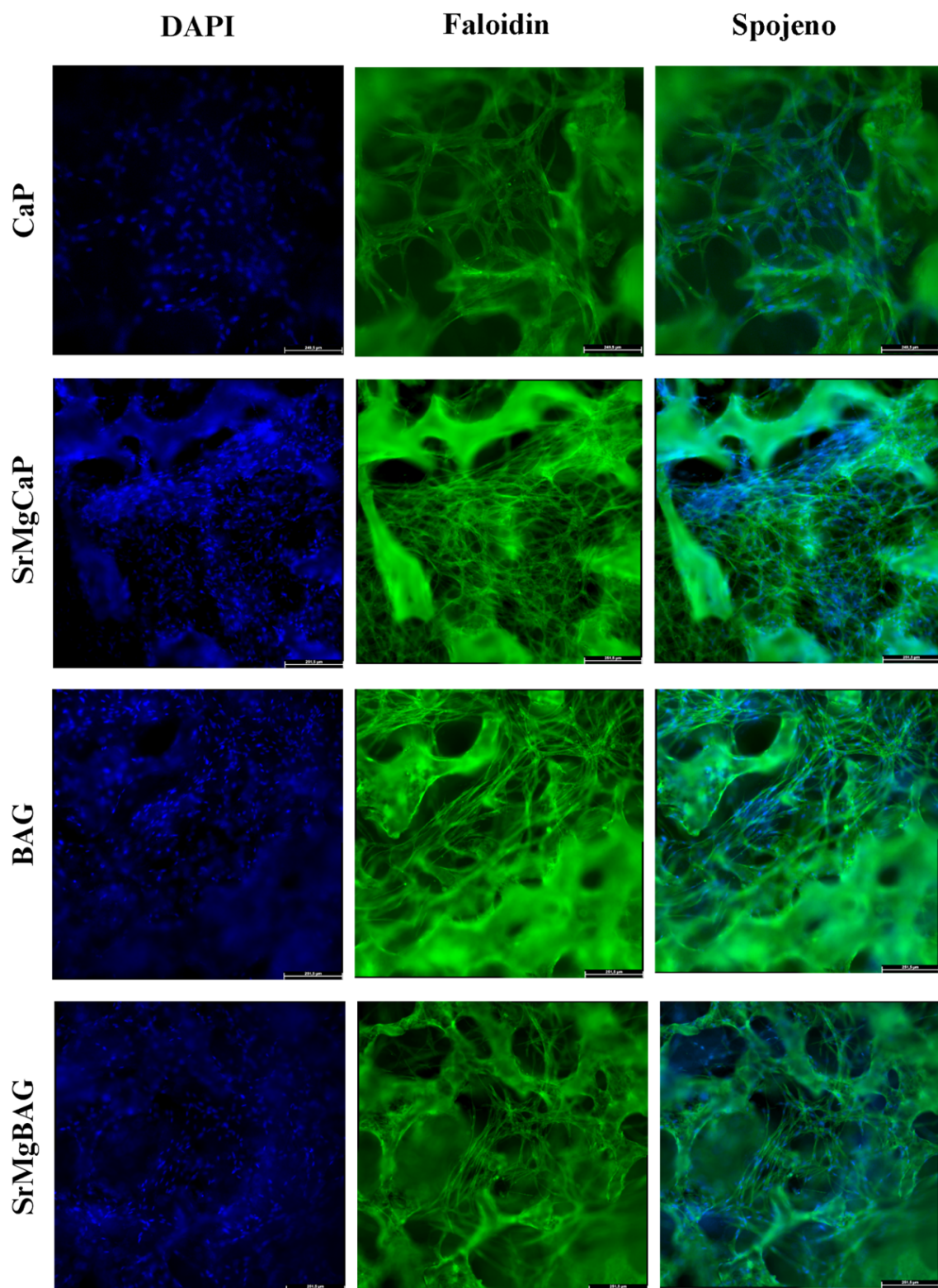
ekspresija COL1 gena bila stimulirana Sr-dopiranjem TCP nosača, a nešto smanjena u kompozitnom nosaču Sr-TCP sa česticama 45S5 bioaktivnog stakla [91].

19.3.7. Pro-angiogeni potencijal

Nastanak novih krvnih sudova predstavlja imperativ za regeneraciju koštanog tkiva jer se perfuzijom krvi omogućava transport nutritijenata i kiseonika, razmena gasova i uklanjanje otpadnih materija. Poslednjih godina istraživanja u oblasti keramičkih biomaterijala su sve više fokusirana na razvoj nosača sa dualnim pro-osteogenim i pro-angiogenim svojstvima [226]. Adekvatna poroznost nosača je ključna za omogućavanje migracije endotelne ćelije i formiranje krvnih sudova tokom regeneracije tkiva. U ovoj disertaciji, pro-angiogeni potencijal makroporoznih nosača ćelija je ispitan analizom morfologije endotelne EA.hy926 ćelija kultivisanih u makroporoznim nosačima, odnosno sklonosti nosača da stimulišu endotelne ćelije da se organizuju u vidu tubula i mreže.

Nakon 14 dana kultivacije jasno se uočava dobra međusobna interakcija EA.hy926 ćelija i njihovo povezivanje u izdužene formacije i mreže kod sva četiri tipa nosača (Slika 66). Veća gustina ćelija i veća povezanost se uočava kod SrMgCaP, BAG i SrMgBAG nosača u poređenju sa CaP, što predstavlja pozitivan uticaj prisustva Sr^{2+} , Mg^{2+} i Si^{4+} jona u strukturi. Najgušća mreža se uočava kod SrMgCaP nosača, što je u skladu sa većom metaboličkom aktivnošću EA.hy926 ćelija kultivisanih u ovim nosačima (Slika 66). Dobijeni rezultati su u skladu sa literaturnim podacima da ekstrakti nosača na bazi BCP dopiranih sa 5 mol.% Mg, kao i kompozitnih nosača na bazi TCP i magnezijum-silikata imaju pro-angiogeni potencijal, odnosno da stimulišu međusobno povezivanje endotelne HUVEC ćelije u mreže posmatrano testom u Matrigelu [94,96].

U ovoj disertaciji je prikazano formiranje mreže endotelne ćelije unutar pora samog keramičkog nosača, gde se jasno uočava izuzetna sposobnost EA.hy926 ćelija da se međusobno povezuju kroz pore nosača formirajući mreže (Slika 66). Dati rezultati ukazuju na indukovanje pro-angiogenih svojstava CaP nosača dopiranjem jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} , kao i inkorporiranjem čestica mezoporoznog bioaktivnog stakla.



Slika 66. Morfologija EA.hy926 ćelija unutar biokeramičkih nosača ćelija nakon 14 dana kultivacije određena pomoću Thunder mikroskopa fluorescentnim bojenjem. Plavim (DAPI) su obojeni nukleusi, a zelenim (faloidin) citoskeleton ćelija. Veličina bara je 251,5 μm .

V Zaključak

Cilj istraživanja ove disertacije je bio razvoj bioaktivnih materijala za regeneraciju i reparaciju koštanog i zubnog tkiva na bazi nanočestica kalcijum-fosfata i mezoporoznog bioaktivnog stakla dopiranih jonima magnezijuma i stroncijuma. Dobijeni materijali imaju za cilj da nadomeste defekt u mineralizovanom tkivu, nastao usled traume ili bolesti, uz obezbeđivanje dobre integracije sa okolnim tkivom nakon implementacije. Prisustvo jona magnezijuma i stroncijuma ima za cilj da potpomogne regeneraciju tkiva, kao i da obezbedi odgovarajuća fizičko-hemijska, biološka i mehanička svojstva biomaterijala.

Na osnovu dobijenih rezultata u okviru ove disertacije mogu se izvesti sledeći zaključci:

- Binarno dopiranje hidroksiapatita jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} omogućuje inkorporiranje veće količine jona u odnosu na monodopiranje istim jonima.
- Svi kalcijum-fosfatni prahovi dopirani jonima stroncijuma i magnezijuma, dobijeni u ovoj disertaciji imaju bifaznu kalcijum-fosfatnu strukturu, a nastanak β -TCP faze je favorizovan sa povećanjem sadržaja Mg^{2+} jona.
- Sa povećavanjem ukupne količine dopanata u Sr,Mg-HAP prahovima, morfologija se menjala u skladu sa faznim sastavom, tako da su čestice imale štapičasti oblik kod prahova gde je apatitna faza dominantna, dok je sa porastom sadržaja β -TCP faze morfologija sve više bila sferična stvarajući oblik aglomeratnih čestica nalik karfiolu.
- Simultano dopiranje jonima stroncijuma i magnezijuma pri hidrotermalnoj sintezi HAP dovodi do stabilizacije β -TCP faze i pomeranja njene transformacije u α -TCP ka višim temperaturama tokom sinterovanja.
- Vrednosti žilavosti loma kod Sr,Mg-HAP sinterovanih materijala su slične literaturnim vrednostima za dentin kod ljudi, što čini ovako dobijene sinterovane kompakte pogodnim materijalima za primenu u restaurativnoj stomatologiji u vidu dentalnih inserata za zamenu dentina.
- Variranje parametara tokom hidrotermalne sinteze Mg-dopiranih čestica HAP dovodi do značajnih promena u faznom sastavu i mehaničkim svojstvima sinterovanih materijala na njihovoj bazi.
- Predložen je novi protokol restauracije velikih kaviteta zuba sa primenom inserata na bazi kalcijum-fosfata, uz primenu adekvatnog tipa inserta u smislu faznog sastava i mehaničkih svojstava (insert procesiran na bazi hidroksiapatitnog praha dopiranog sa 5 mol.% Mg hidrotermalno sintetisanog na 160 °C, Mg5-160), vrste restaurativnog materijala i uz primenu odgovarajućeg kliničkog protokola nagrizanja.
- Tip inserta Mg5-160 je pokazao najveću srednju vrednost jačine veze (~16 MPa) među svim testiranim kalcijum-fosfatnim insertima sa Single Bond Universal adhezivom nanetom po protokolu totalnog nagrizanja.
- Otpornost na lom zuba restauriranih sa Mg5-160 insertom je bila slična otpornosti na lom zuba restauriranih po konvencionalnom postupku: $3,0 \pm 0,30$ kN i $3,2 \pm 0,42$ kN.
- Nanočestice mezoporoznog bioaktivnog stakla, nedopirane i dopirane jonima stroncijuma i magnezijuma su uspešno dobijene modifikovanom mikroemulzionom sol-gel tehnikom uz primenu ultrazvučnih talasa.
- Inkorporiranje Sr^{2+} i Mg^{2+} u strukturu čestica mezoporoznog bioaktivnog stakla (SrMg-MBAG) nije imala značajan uticaj na specifičnu površinu u poređenju sa nedopiranim, ali je dovela do povećanja ukupne zapremine pora sa 0,84 na 0,92 cm^3/g , kao i do povećanja srednje veličine pora sa 7,4 nm na 9,5 nm.
- Nedopirane MBAG čestice su imale crvoliku mezostrukturu, dok su kod SrMg-MBAG radijalno raspoređeni dendritni mezoporozni kanali.

- Dopiranje MBAG čestica jonima stroncijuma i magnezijuma ispitano u ovoj disertaciji nije značajno uticalo na osteogenezu, ispitano na humanim matičnim mezenhalnim ćelijama izolovanim iz koštane srži (BM-MSC) nakon 7 dana kultivacije.
- Ekstrakti nedopiranih i SrMg-dopiranih MBAG čestica nisu pokazali citotoksični efekat prema humanim BM-MSC ćelijama pri koncentraciji od 1 mg/mL ni za jedno testirano vreme.
- Ekstrakti nedopiranih i SrMg-dopiranih MBAG čestica su značajno stimulišali proliferaciju humanih endotelnih EA.hy926 ćelija testirano u 3D kulturi.
- Ekstrakt SrMg-MBAG čestica je posebno imao stimulativni uticaj na endotelne EA.hy926 ćelije, koje su se međusobno povezale preko filopodija i počele da se organizuju u tubule i mreže sa malim brojem spojenih nodusa, što može ukazivati na početak angiogeneze.
- Kapacitet vezivanja ibuprofena za čestice MBAG se blago smanjio nakon dopiranja jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} sa 15 mas.% na 12 mas.%.
- Kompozitni skafoldi na bazi SrMg-dopiranog kalcijum-fosfata (SrMgCaP) i 10 mas.% SrMg-MBAG čestica pokazuju statistički značajno veće pritisne čvrstoće u odnosu na skafold bez MBAG čestica ($1,12 \pm 0,11$ MPa u odnosu na $0,26 \pm 0,06$ MPa). Ovo poboljšanje mehaničkih svojstava kompozitnih nosača uprkos formiranju α -TCP faze je direktna posledica eliminacije mikroporoznosti bez značajnog uticaja na makroporoznost.
- Nanošenje kompozitne prevlake na bazi želatina i SrMg-MBAG čestica je dovelo do značajnog povećanja pritisne čvrstoće SrMgCaP nosača ćelija sa 0,26 MPa na 0,48 MPa.
- Bioaktivnost makroporoznih nosača je potvrđena u perfuzionom bioreaktoru, i pokazano je da brzina rastvorljivosti nosača na bazi trikalcijum-fosfata može biti smanjena sa dodatkom SrMg-MBAG čestica.
- Nakon 7 dana kultivacije metabolička aktivnost humanih BM-MSC i EA.hy926 je bila veća kod nosača SrMgCaP u odnosu na sve ostale nosače.
- Svi biokeramički nosači razvijeni u ovoj disertaciji predstavljaju pogodne 3D sredine za kultivaciju BM-MSC i EA.hy926 ćelija jer omogućuju dobru adheziju i proliferaciju ćelija, a pokazano je i da ćelije imaju sposobnost da migriraju kroz nosač. Pokazano je da se endotelne EA.hy926 ćelije međusobno povezuju kroz pore nosača i formiraju mreže koje su bile najmanje izražene kod CaP nosača, ukazujući na stimulisanje pro-angiogenih svojstava CaP nosača dopiranjem jonima Sr^{2+} i Mg^{2+} , kao i inkorporiranjem čestica MBAG.

Literatura

- [1] S. V. Dorozhkin, Calcium Orthophosphate-Based Bioceramics and Biocomposites, 2016. <https://doi.org/10.1002/9783527699315>.
- [2] S. V Dorozhkin, Dental Applications of Calcium Orthophosphates (CaPO_4), Journal of Dentistry Research 1 (2019) 024–054.
- [3] D. Veljovic, Biokeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata: procesiranje, svojstva i primena, Beograd, Tehnološko-metalurški fakultet, 2020.
- [4] R.G. Ribas, V.M. Schatkoski, T.L. do A. Montanheiro, B.R.C. de Menezes, C. Stegemann, D.M.G. Leite, G.P. Thim, Current advances in bone tissue engineering concerning ceramic and bioglass scaffolds: A review, Ceram Int 45 (2019) 21051–21061. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.096>.
- [5] V. Uskoković, The role of hydroxyl channel in defining selected physicochemical peculiarities exhibited by hydroxyapatite, RSC Adv 5 (2015) 36614–36633. <https://doi.org/10.1039/c4ra17180b>.
- [6] X. Lu, H. Zhang, Y. Guo, Y. Wang, X. Ge, Y. Leng, F. Watari, Hexagonal hydroxyapatite formation on TiO_2 nanotubes under urea modulation, CrystEngComm 13 (2011) 3741–3749. <https://doi.org/10.1039/c0ce00971g>.

- [7] D. Veljovic, Doktorska disertacija na temu "Ispitivanje uticaja parametara procesiranja na svojstva biokeramičkih materijala na bazi kalcijum-hidroksiapatita i kalcijum-fosfata dobijenih različitim tehnikama sinterovanja," Tehnološko-metalurški fakultet, Univerzitet u Beogradu, 2010.
- [8] G. Turnbull, J. Clarke, F. Picard, P. Riches, L. Jia, F. Han, B. Li, W. Shu, 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering, *Bioact Mater* 3 (2018) 278–314. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2017.10.001>.
- [9] M. Frasnelli, V.M. Sglavo, Effect of Mg²⁺ doping on beta-alpha phase transition in tricalcium phosphate (TCP) bioceramics, *Acta Biomater* 33 (2016) 283–289. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.01.015>.
- [10] M. Sayer, A.D. Stratilatov, J. Reid, L. Calderin, M.J. Stott, X. Yin, M. MacKenzie, T.J.N. Smith, J.A. Hendry, S.D. Langstaff, Structure and composition of silicon-stabilized tricalcium phosphate, *Biomaterials* 24 (2003) 369–382. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00327-7](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00327-7).
- [11] J.W. Reid, A. Pietak, M. Sayer, D. Dunfield, T.J.N. Smith, Phase formation and evolution in the silicon substituted tricalcium phosphate/apatite system, *Biomaterials* 26 (2005) 2887–2897. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.005>.
- [12] R.G. Carrodeguas, S. De Aza, α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications, *Acta Biomater* 7 (2011) 3536–3546. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.06.019>.
- [13] E. Boanini, M. Gazzano, C. Nervi, M.R. Chierotti, K. Rubini, R. Gobetto, A. Bigi, Strontium and zinc substitution in β -tricalcium phosphate: An X-ray diffraction, solid state NMR and ATR-FTIR study, *J Funct Biomater* 10 (2019). <https://doi.org/10.3390/jfb10020020>.
- [14] V.-N.G.. Balać, I., Bugarski B., Ćosić I., Dramićanin M., Filipović N., Ignjatović N., Janačković Đ., Kojić M., Manojlović V., Marković Z., Obradović B., Pajić-Lijaković I., Pavlović M., Plavšić M., Raković D., Stojanović B., Trajković V., Uskoković D., Uskoković, *Biomaterijali*, I, Institut tehničkih nauka Srpske akademije nauka i umetnosti, Beograd, 2010.
- [15] L.L. Hench, The story of Bioglass®, *J Mater Sci Mater Med* 17 (2006) 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
- [16] D.F. Williams, On the mechanisms of biocompatibility, *Biomaterials* 29 (2008) 2941–2953. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.04.023>.
- [17] F. Baino, Bioactive glasses – When glass science and technology meet regenerative medicine, *Ceram Int* 44 (2018) 14953–14966. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.05.180>.
- [18] R. Li, A.E. Clark, L.L. Hench, *An Investigation of Bioactive Glass Powders by Sol-Gel Processing*, 1991.
- [19] C.H. Kong, C. Steffi, Z. Shi, W. Wang, Development of mesoporous bioactive glass nanoparticles and its use in bone tissue engineering, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 106 (2018) 2878–2887. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34143>.
- [20] F. Baino, E. Fiume, M. Miola, E. Verné, Bioactive sol-gel glasses: Processing, properties, and applications, *Int J Appl Ceram Technol* 15 (2018) 841–860. <https://doi.org/10.1111/ijac.12873>.
- [21] M. Vallet-Regí, A. Rámila, R.P. Del Real, J. Pérez-Pariente, A new property of MCM-41: Drug delivery system, *Chemistry of Materials* 13 (2001) 308–311. <https://doi.org/10.1021/cm0011559>.
- [22] M. Vallet-Regí, Nanostructured mesoporous silica matrices in nanomedicine, in: *J Intern Med*, Blackwell Publishing Ltd, 2010: pp. 22–43. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2796.2009.02190.x>.
- [23] S. Theivendran, S. Lazarev, C. Yu, Mesoporous silica/organosilica nanoparticles for cancer immunotherapy, *Exploration* 3 (2023). <https://doi.org/10.1002/EXP.20220086>.
- [24] X. Yan, C. Yu, X. Zhou, J. Tang, D. Zhao, Highly ordered mesoporous bioactive glasses with superior in vitro bone-forming bioactivities, *Angewandte Chemie - International Edition* 43 (2004) 5980–5984. <https://doi.org/10.1002/anie.200460598>.
- [25] H. Zhu, K. Zheng, A.R. Boccaccini, Multi-functional silica-based mesoporous materials for simultaneous delivery of biologically active ions and therapeutic biomolecules, *Acta Biomater* 129 (2021) 1–17. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.05.007>.

- [26] M. Vallet-Regí, M. Colilla, I. Izquierdo-Barba, C. Vitale-Brovarone, S. Fiorilli, Achievements in Mesoporous Bioactive Glasses for Biomedical Applications, *Pharmaceutics* 14 (2022). <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics14122636>.
- [27] E. Sharifi, A. Bigham, S. Yousefiasl, M. Trovato, M. Ghomi, Y. Esmaeili, P. Samadi, A. Zarrabi, M. Ashrafizadeh, S. Sharifi, R. Sartorius, F. Dabbagh Moghaddam, A. Maleki, H. Song, T. Agarwal, T.K. Maiti, N. Nikfarjam, C. Burvill, V. Mattoli, M.G. Raucci, K. Zheng, A.R. Boccaccini, L. Ambrosio, P. Makvandi, Mesoporous Bioactive Glasses in Cancer Diagnosis and Therapy: Stimuli-Responsive, Toxicity, Immunogenicity, and Clinical Translation, *Advanced Science* 9 (2022). <https://doi.org/10.1002/advs.202102678>.
- [28] C. Heras, J. Jiménez-Holguín, A.L. Doadrio, M. Vallet-Regí, S. Sánchez-Salcedo, A.J. Salinas, Multifunctional antibiotic- and zinc-containing mesoporous bioactive glass scaffolds to fight bone infection, *Acta Biomater* 114 (2020) 395–406. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.07.044>.
- [29] K. Zheng, P. Balasubramanian, T.E. Paterson, R. Stein, S. MacNeil, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, J. Shepherd, A.R. Boccaccini, Ag modified mesoporous bioactive glass nanoparticles for enhanced antibacterial activity in 3D infected skin model, *Materials Science and Engineering C* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.109764>.
- [30] F. Kurtuldu, N. Mutlu, M. Michálek, K. Zheng, M. Masar, L. Liverani, S. Chen, D. Galusek, A.R. Boccaccini, Cerium and gallium containing mesoporous bioactive glass nanoparticles for bone regeneration: Bioactivity, biocompatibility and antibacterial activity, *Materials Science and Engineering C* 124 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2021.112050>.
- [31] F. Westhauser, S. Wilkesmann, Q. Nawaz, F. Hohenbild, F. Rehder, M. Saur, J. Fellenberg, A. Moghaddam, M.S. Ali, W. Peukert, A.R. Boccaccini, Effect of manganese, zinc and copper on the biological and osteogenic properties of mesoporous bioactive glass nanoparticles, *J Biomed Mater Res A* (2020) 1–11. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.37136>.
- [32] K. Zheng, E. Torre, A. Bari, N. Taccardi, C. Cassinelli, M. Morra, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, G. Iviglia, A.R. Boccaccini, Antioxidant mesoporous Ce-doped bioactive glass nanoparticles with anti-inflammatory and pro-osteogenic activities, *Mater Today Bio* (2020) 100041. <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2020.100041>.
- [33] Y.J. Li, K.W. Wong, Y.C. Huang, C.S. Chien, C.J. Shih, Evaluation of in vitro bioactivity and angiogenesis-promoting effect for mesoporous bioactive glass codoped with copper and silver, *J Non Cryst Solids* 613 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrsol.2023.122371>.
- [34] Y. Zhang, M. Hu, W. Zhang, X. Zhang, Homology of selenium (Se) and tellurium (Te) endow the functional similarity of Se-doped and Te-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles in bone tissue engineering, *Ceram Int* 48 (2022) 3729–3739. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.10.155>.
- [35] H.O. Simila, A.R. Boccaccini, Sol-gel synthesis of lithium doped mesoporous bioactive glass nanoparticles and tricalcium silicate for restorative dentistry: Comparative investigation of physico-chemical structure, antibacterial susceptibility and biocompatibility, *Front Bioeng Biotechnol* 11 (2023). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2023.1065597>.
- [36] X. Liu, Y. Sun, J. Shen, H.S. Min, J. Xu, Y. Chai, Strontium doped mesoporous silica nanoparticles accelerate osteogenesis and angiogenesis in distraction osteogenesis by activation of Wnt pathway, *Nanomedicine* 41 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.nano.2021.102496>.
- [37] Z. Tabia, K. El Mabrouk, M. Bricha, K. Nouneh, Mesoporous bioactive glass nanoparticles doped with magnesium: Drug delivery and acellular: In vitro bioactivity, *RSC Adv* 9 (2019) 12232–12246. <https://doi.org/10.1039/c9ra01133a>.
- [38] Y. Cui, S. Hong, W. Jiang, X. Li, X. Zhou, X. He, J. Liu, K. Lin, L. Mao, Engineering mesoporous bioactive glasses for emerging stimuli-responsive drug delivery and theranostic applications, *Bioact Mater* 34 (2024) 436–462. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2024.01.001>.
- [39] F. Baino, S. Hamzehlou, S. Kargozar, Bioactive glasses: Where are we and where are we going?, *J Funct Biomater* 9 (2018). <https://doi.org/10.3390/jfb9010025>.
- [40] D. Arcos, M.T. Portolés, Mesoporous Bioactive Nanoparticles for Bone Tissue Applications, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24043249>.

- [41] K. Zheng, B. Sui, K. Ilyas, A.R. Boccaccini, Porous bioactive glass micro- And nanospheres with controlled morphology: Developments, properties and emerging biomedical applications, *Mater Horiz* 8 (2021) 300–335. <https://doi.org/10.1039/d0mh01498b>.
- [42] M. Mozafari, F. Sefat, A. Atala, Handbook of tissue engineering scaffolds: Volume one, 2019. <https://doi.org/10.1016/C2017-0-00858-3>.
- [43] M. Vallet-Regi, A.J. Salinas, Mesoporous bioactive glasses for regenerative medicine, *Mater Today Bio* 11 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2021.100121>.
- [44] Z. Neščáková, K. Zheng, L. Liverani, Q. Nawaz, D. Galusková, H. Kaňková, M. Michálek, D. Galusek, A.R. Boccaccini, Multifunctional zinc ion doped sol – gel derived mesoporous bioactive glass nanoparticles for biomedical applications, *Bioact Mater* 4 (2019) 312–321. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.002>.
- [45] K. Zheng, Y. Fan, E. Torre, P. Balasubramanian, N. Taccardi, C. Cassinelli, M. Morra, G. Iviglia, A.R. Boccaccini, Incorporation of Boron in Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles Reduces Inflammatory Response and Delays Osteogenic Differentiation, *Particle and Particle Systems Characterization* 37 (2020). <https://doi.org/10.1002/ppsc.202000054>.
- [46] K. Zheng, A.R. Boccaccini, Sol-gel processing of bioactive glass nanoparticles: A review, *Adv Colloid Interface Sci* 249 (2017) 363–373. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2017.03.008>.
- [47] R.K. et al. Rude, Dietary magnesium reduction to 25% of nutrient requirement disrupts bone and mineral metabolism in the rat., *Bone* 37 (2005) 211–219.
- [48] W. Liu, S. Guo, Z. Tang, X. Wei, P. Gao, N. Wang, X. Li, Z. Guo, Magnesium promotes bone formation and angiogenesis by enhancing MC3T3-E1 secretion of PDGF-BB, *Biochem Biophys Res Commun* 528 (2020) 664–670. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2020.05.113>.
- [49] E. O'Neill, G. Awale, L. Daneshmandi, O. Umerah, K.W.H. Lo, The roles of ions on bone regeneration, *Drug Discov Today* 23 (2018) 879–890. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2018.01.049>.
- [50] S. Bose, G. Fielding, S. Tarafder, A. Bandyopadhyay, Understanding of dopant-induced osteogenesis and angiogenesis in calcium phosphate ceramics, *Trends Biotechnol* 31 (2013) 594–605. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2013.06.005>.
- [51] S. Yoshizawa, A. Brown, A. Barchowsky, C. Sfeir, Magnesium ion stimulation of bone marrow stromal cells enhances osteogenic activity, simulating the effect of magnesium alloy degradation, *Acta Biomater* 10 (2014) 2834–2842. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.02.002>.
- [52] S. Lin, G. Yang, F. Jiang, M. Zhou, S. Yin, Y. Tang, T. Tang, Z. Zhang, W. Zhang, X. Jiang, A Magnesium-Enriched 3D Culture System that Mimics the Bone Development Microenvironment for Vascularized Bone Regeneration, *Advanced Science* 6 (2019). <https://doi.org/10.1002/advs.201900209>.
- [53] J.L. Wang, J.K. Xu, C. Hopkins, D.H.K. Chow, L. Qin, Biodegradable Magnesium-Based Implants in Orthopedics—A General Review and Perspectives, *Advanced Science* 7 (2020). <https://doi.org/10.1002/advs.201902443>.
- [54] K. Zheng, W. Niu, B. Lei, A.R. Boccaccini, Immunomodulatory bioactive glasses for tissue regeneration, *Acta Biomater* 133 (2021) 168–186. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2021.08.023>.
- [55] Y.L. Wang, H.H. Chang, Y.C. Chiang, C.H. Lin, C.P. Lin, Strontium ion can significantly decrease enamel demineralization and prevent the enamel surface hardness loss in acidic environment, *Journal of the Formosan Medical Association* 118 (2019) 39–49. <https://doi.org/10.1016/j.jfma.2018.01.001>.
- [56] S. Chandran, A. John, Osseointegration of osteoporotic bone implants: Role of stem cells, Silica and Strontium - A concise review, *J Clin Orthop Trauma* (2018). <https://doi.org/10.1016/j.jcot.2018.08.003>.
- [57] P. Naruphontjirakul, A.E. Porter, J.R. Jones, In vitro osteogenesis by intracellular uptake of strontium containing bioactive glass nanoparticles, *Acta Biomater* 66 (2018) 67–80. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.11.008>.
- [58] P. Naruphontjirakul, O. Tsigkou, S. Li, A.E. Porter, J.R. Jones, Human mesenchymal stem cells differentiate into an osteogenic lineage in presence of strontium containing bioactive glass nanoparticles, *Acta Biomater* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2019.03.038>.

- [59] P. Nandha Kumar, S.K. Mishra, R. Udhay Kiran, S. Kannan, Preferential occupancy of strontium in the hydroxyapatite lattice in biphasic mixtures formed from non-stoichiometric calcium apatites, *Dalton Transactions* 44 (2015) 8284–8292. <https://doi.org/10.1039/c5dt00173k>.
- [60] D. Laurencin, N. Almora-Barrios, N.H. de Leeuw, C. Gervais, C. Bonhomme, F. Mauri, W. Chrzanowski, J.C. Knowles, R.J. Newport, A. Wong, Z. Gan, M.E. Smith, Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials* 32 (2011) 1826–1837. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.017>.
- [61] M.P. Moreira, G.D. De Almeida Soares, J. Dentzer, K. Anselme, L.Á. De Sena, A. Kuznetsov, E.A. Dos Santos, Synthesis of magnesium- and manganese-doped hydroxyapatite structures assisted by the simultaneous incorporation of strontium, *Materials Science and Engineering C* (2016). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.01.004>.
- [62] F.E. Imrie, V. Aina, G. Lusvardi, G. Malavasi, I.R. Gibson, G. Cerrato, B. Annaz, Synthesis and characterisation of strontium and magnesium co-substituted biphasic calcium phosphates, *Key Eng Mater* 529–530 (2013) 88–93. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.529-530.88>.
- [63] F. Ren, Y. Leng, R. Xin, X. Ge, Synthesis, characterization and ab initio simulation of magnesium-substituted hydroxyapatite, *Acta Biomater* 6 (2010) 2787–2796. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.12.044>.
- [64] A. Tampieri, G. Celotti, E. Landi, M. Sandri, Magnesium doped hydroxyapatite: Synthesis and characterization, in: *Key Eng Mater*, 2004. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.264-268.2051>.
- [65] Z. Geng, Z. Cui, Z. Li, S. Zhu, Y. Liang, W.W. Lu, X. Yang, Synthesis, characterization and the formation mechanism of magnesium- and strontium-substituted hydroxyapatite, *J Mater Chem B* 3 (2015) 3738–3746. <https://doi.org/10.1039/c4tb02148g>.
- [66] A. Farzadi, F. Bakhshi, M. Solati-Hashjin, M. Asadi-Eydivand, N.A.A. Osman, Magnesium incorporated hydroxyapatite: Synthesis and structural properties characterization, *Ceram Int* (2014). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.11.051>.
- [67] M. Šupová, Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review, *Ceram Int* 41 (2015) 9203–9231. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.03.316>.
- [68] C.F. Marques, A.C. Matos, I.A.C. Ribeiro, L.M. Gonçalves, A. Bettencourt, J.M.F. Ferreira, Insights on the properties of levofloxacin-adsorbed Sr- and Mg-doped calcium phosphate powders, *J Mater Sci Mater Med* 27 (2016). <https://doi.org/10.1007/s10856-016-5733-2>.
- [69] L.W. Schroeder, B. Dickens, W.E. Brown, Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β -Ca₃(PO₄)₂. II. Refinement of Mg-containing β -Ca₃(PO₄)₂, *J Solid State Chem* 22 (1977) 253–262. [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(77\)90002-0](https://doi.org/10.1016/0022-4596(77)90002-0).
- [70] C.Y. Tan, A. Yaghoubi, S. Ramesh, S. Adzila, J. Purbolaksono, M.A. Hassan, M.G. Kuttu, Sintering and mechanical properties of MgO-doped nanocrystalline hydroxyapatite, *Ceram Int* 39 (2013) 8979–8983. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2013.04.098>.
- [71] H.S. Ryu, K.S. Hong, J.K. Lee, D.J. Kim, J.H. Lee, B.S. Chang, D.H. Lee, C.K. Lee, S.S. Chung, Magnesia-doped HA/ β -TCP ceramics and evaluation of their biocompatibility, *Biomaterials* 25 (2004) 393–401. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00538-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00538-6).
- [72] D. Veljovic, T. Matic, T. Stamenic, V. Kojic, S. Dimitrijevic-Brankovic, M.J. Lukic, S. Jevtic, Z. Radovanovic, R. Petrovic, D. Janackovic, Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity, *Ceram Int* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.219>.
- [73] D. Ke, S. Tarafder, S. Vahabzadeh, S. Bose, Effects of MgO, ZnO, SrO, and SiO₂ in tricalcium phosphate scaffolds on in vitro gene expression and in vivo osteogenesis, *Materials Science and Engineering C* 96 (2019) 10–19. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.10.073>.
- [74] R.K. Chadha, K.L. Singh, C. Sharma, A.P. Singh, V. Naithani, Effect of microwave and conventional processing techniques on mechanical properties of Strontium substituted hydroxyapatite, *Ceram Int* 46 (2020) 1091–1098. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.09.076>.
- [75] A. Bigi, E. Boanini, C. Capuccini, M. Gazzano, Strontium-substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Inorganica Chim Acta* 360 (2007) 1009–1016. <https://doi.org/10.1016/j.ica.2006.07.074>.

- [76] D.J. Curran, T.J. Fleming, M.R. Towler, S. Hampshire, Mechanical parameters of strontium doped hydroxyapatite sintered using microwave and conventional methods, *J Mech Behav Biomed Mater* 4 (2011) 2063–2073. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2011.07.005>.
- [77] H. Zhu, D. Guo, L. Sun, H. Li, D.A.H. Hanaor, F. Schmidt, K. Xu, Nanostructural insights into the dissolution behavior of Sr-doped hydroxyapatite, *J Eur Ceram Soc* 38 (2018) 5554–5562. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.07.056>.
- [78] H.W. Kim, Y.H. Koh, Y.M. Kong, J.G. Kang, H.E. Kim, Strontium substituted calcium phosphate biphasic ceramics obtained by a powder precipitation method, *J Mater Sci Mater Med* 15 (2004) 1129–1134. <https://doi.org/10.1023/B:JMSM.0000046395.76435.60>.
- [79] C. Capuccini, P. Torricelli, F. Sima, E. Boanini, C. Ristoscu, B. Bracci, G. Socol, M. Fini, I.N. Mihailescu, A. Bigi, Strontium-substituted hydroxyapatite coatings synthesized by pulsed-laser deposition: In vitro osteoblast and osteoclast response, *Acta Biomater* 4 (2008) 1885–1893. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.05.005>.
- [80] C. Capuccini, P. Torricelli, E. Boanini, M. Gazzano, R. Giardino, A. Bigi, Interaction of Sr-doped hydroxy apatite nanocrystals with osteoclast and osteoblast-like cells, *J Biomed Mater Res A* 89 (2009) 594–600. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.31975>.
- [81] S. Rapuntean, P.T. Frangopol, I. Hodisan, G. Tomoaia, D. Oltean-Dan, A. Mocanu, C. Prejmorean, O. Soritau, L.Z. Racz, M. Tomoaia-Cotisel, In vitro response of human osteoblasts cultured on strontium substituted hydroxyapatites, *Revista de Chimie* 69 (2018) 3537–3544. <https://doi.org/10.37358/rc.18.12.6787>.
- [82] R.D. Prabha, M. Ding, P. Bollen, N. Ditzel, H.K. Varma, P.D. Nair, M. Kassem, Strontium ion reinforced bioceramic scaffold for load bearing bone regeneration, *Materials Science and Engineering C* 109 (2020) 110427. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110427>.
- [83] T. Nagyné-Kovács, B. Mészáros, M. Molnár, M. Tolner, I.E. Lukács, I.M. Szilágyi, G. Pokol, Hydrothermal synthesis of Sr-doped hydroxyapatite and its antibacterial activity, *Periodica Polytechnica Chemical Engineering* 64 (2020) 54–60. <https://doi.org/10.3311/PPch.14062>.
- [84] S.S. Banerjee, S. Tarafder, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay, S. Bose, Understanding the influence of MgO and SrO binary doping on the mechanical and biological properties of β -TCP ceramics, *Acta Biomater* 6 (2010) 4167–4174. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2010.05.012>.
- [85] S. Bose, S. Tarafder, S.S. Banerjee, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay, Understanding in vivo response and mechanical property variation in MgO, SrO and SiO₂ doped β -TCP, *Bone* 48 (2011) 1282–1290. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2011.03.685>.
- [86] S. Kannan, F. Goetz-Neunhoffer, J. Neubauer, S. Pina, P.M.C. Torres, J.M.F. Ferreira, Synthesis and structural characterization of strontium- and magnesium-co-substituted β -tricalcium phosphate, *Acta Biomater* 6 (2010) 571–576. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.08.009>.
- [87] V. Aina, G. Lusvardi, B. Annaz, I.R. Gibson, F.E. Imrie, G. Malavasi, L. Menabue, G. Cerrato, G. Martra, Magnesium- and strontium-co-substituted hydroxyapatite: the effects of doped-ions on the structure and chemico-physical properties, *J Mater Sci Mater Med* 23 (2012) 2867–2879. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4767-3>.
- [88] S. Tarafder, N.M. Davies, A. Bandyopadhyay, S. Bose, 3D printed tricalcium phosphate bone tissue engineering scaffolds: Effect of SrO and MgO doping on in vivo osteogenesis in a rat distal femoral defect model, *Biomater Sci* 1 (2013) 1250–1259. <https://doi.org/10.1039/c3bm60132c>.
- [89] D. Bellucci, A. Sola, I. Cacciotti, C. Bartoli, M. Gazzarri, A. Bianco, F. Chiellini, V. Cannillo, Mg and/or Sr-doped tricalcium phosphate/bioactive glass composites: Synthesis, microstructure and biological responsiveness, *Materials Science and Engineering C* 42 (2014) 312–324. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.05.047>.
- [90] Z. Geng, R. Wang, Z. Li, Z. Cui, S. Zhu, Y. Liang, Y. Liu, B. Huijing, X. Li, Q. Huo, Z. Liu, X. Yang, Synthesis, characterization and biological evaluation of strontium/magnesium-co-substituted hydroxyapatite, *J Biomater Appl* 31 (2016) 140–151. <https://doi.org/10.1177/0885328216633892>.
- [91] M. Kazemi, M.M. Dehghan, M. Azami, Biological evaluation of porous nanocomposite scaffolds based on strontium substituted β -TCP and bioactive glass: An in vitro and in vivo study, *Materials Science and Engineering: C* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110071>.

- [92] M. Kazemi, B. Nazari, J. Ai, N. Lotfibakhshaiesh, A. Samadikuchaksaraei, S.M. Tavangar, M. Azami, Preparation and characterization of highly porous ceramic-based nanocomposite scaffolds with improved mechanical properties using the liquid phase-assisted sintering method, *Proceedings of the Institution of Mechanical Engineers, Part L: Journal of Materials: Design and Applications* 233 (2019) 1854–1865. <https://doi.org/10.1177/1464420718795186>.
- [93] F. Scalera, B. Palazzo, A. Barca, F. Gervaso, Sintering of magnesium-strontium doped hydroxyapatite nanocrystals: Towards the production of 3D biomimetic bone scaffolds, *J Biomed Mater Res A* 108 (2020) 633–644. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.36843>.
- [94] T. Lu, Y. Miao, X. Yuan, Y. Zhang, J. Ye, Adjusting physicochemical and cytological properties of biphasic calcium phosphate by magnesium substitution: An in vitro study, *Ceram Int* 49 (2023) 15588–15598. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.01.148>.
- [95] T. Lu, L. Zhang, X. Yuan, J. Ye, A novel calcium phosphate-based ceramic scaffolds with unexpected high osteogenic activity by strontium doping, *Mater Today Chem* 36 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.mtchem.2024.101931>.
- [96] X. Yuan, T. Lu, T. Wu, J. Ye, Enhancing mechanical property, osteogenesis and angiogenesis of 3D-plotted β -tricalcium phosphate bioceramic scaffolds incorporated with magnesium silicate: In Vitro and In Vivo study, *J Eur Ceram Soc* 44 (2024) 3446–3455. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2023.12.048>.
- [97] A. Bari, G. Molino, S. Fiorilli, C. Vitale-Brovarone, Novel multifunctional strontium-copper co-substituted mesoporous bioactive particles, *Mater Lett* 223 (2018) 37–40. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2018.04.006>.
- [98] S. Bano, M. Akhtar, M. Yasir, M.S. Maqbool, A. Niaz, A. Wadood, M.A.U. Rehman, Synthesis and characterization of silver-strontium (Ag-Sr)-doped mesoporous bioactive glass nanoparticles, *Gels* 7 (2021). <https://doi.org/10.3390/gels7020034>.
- [99] P. Naruphontjirakul, M. Li, A.R. Boccaccini, Strontium and Zinc Co-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles for Potential Use in Bone Tissue Engineering Applications, *Nanomaterials* 14 (2024). <https://doi.org/10.3390/nano14070575>.
- [100] F. Kermani, S.M. Beidokhti, F. Baines, Z. Gholamzadeh-Virany, M. Mozafari, S. Kargozar, Strontium-and cobalt-doped multicomponent mesoporous bioactive glasses (MBGS) for potential use in bone tissue engineering applications, *Materials* 13 (2020) 1–20. <https://doi.org/10.3390/ma13061348>.
- [101] Z. Azari, F. Kermani, S. Mollazadeh, F. Alipour, A. Sadeghi-Avalshahr, M. Ranjbar-Mohammadi, B. Jalali Kondori, Z. Mollaei, S.A. Hosseini, S. Nazarnezhad, K. Zheng, F. Baines, S. Kargozar, Fabrication and characterization of cobalt- and copper-doped mesoporous borate bioactive glasses for potential applications in tissue engineering, *Ceram Int* 49 (2023) 38773–38788. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.09.214>.
- [102] F. Kermani, S. Nazarnezhad, Z. Mollaei, S. Mollazadeh, A. Ebrahimzadeh-Bideskan, V.R. Askari, R.K. Oskuee, A. Moradi, S.A. Hosseini, Z. Azari, F. Baines, S. Kargozar, Zinc- and Copper-Doped Mesoporous Borate Bioactive Glasses: Promising Additives for Potential Use in Skin Wound Healing Applications, *Int J Mol Sci* 24 (2023). <https://doi.org/10.3390/ijms24021304>.
- [103] J.H. Lee, N. Mandakbayar, A. El-Fiqi, H.W. Kim, Intracellular co-delivery of Sr ion and phenamil drug through mesoporous bioglass nanocarriers synergizes BMP signaling and tissue mineralization, *Acta Biomater* 60 (2017) 93–108. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.07.021>.
- [104] S. Fiorilli, G. Molino, C. Pontremoli, G. Iviglia, E. Torre, C. Cassinelli, M. Morra, C. Vitale-Brovarone, The incorporation of strontium to improve bone-regeneration ability of mesoporous bioactive glasses, *Materials* 11 (2018). <https://doi.org/10.3390/ma11050678>.
- [105] M. Shoaib, A. Bahadur, S. Iqbal, M.M. AL-Anazy, A. Laref, M.A. Tahir, P.A. Channar, S. Noreen, M. Yasir, A. Iqbal, K.W. Ali, Magnesium doped mesoporous bioactive glass nanoparticles: A promising material for apatite formation and mitomycin c delivery to the MG-63 cancer cells, *J Alloys Compd* 866 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jallcom.2021.159013>.
- [106] A.H. Taghvaei, F. Danaeifar, C. Gammer, J. Eckert, S. Khosravimelal, M. Gholipourmalekabadi, Synthesis and characterization of novel mesoporous strontium-modified bioactive glass nanospheres

for bone tissue engineering applications, *Microporous and Mesoporous Materials* 294 (2020) 109889. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2019.109889>.

- [107] G.K. Pouroutzidou, L. Liverani, A. Theocharidou, I. Tsamesidis, M. Lazaridou, E. Christodoulou, A. Beketova, C. Pappa, K.S. Triantafyllidis, A.D. Anastasiou, L. Papadopoulou, D.N. Bikiaris, A.R. Boccaccini, E. Kontonasaki, Synthesis and Characterization of Mesoporous Mg- and Sr-Doped Nanoparticles for Moxifloxacin Drug Delivery in Promising Tissue Engineering Applications, *Int. J. Mol. Sci* 2021 (2021) 577. <https://doi.org/10.3390/ijms>.
- [108] S. Živković, M. Vujašković, K. Pap, Đ. Grga, A. Lukić, N. Teodorović, *Osnovi restaurativne stomatologije*, Data Status, 2009.
- [109] L. Tronstad, *Clinical Endodontics - prevedeno izdanje*, 2007.
- [110] J.P. Van Nieuwenhuysen, W. D'Hoore, J. Carvalho, V. Qvist, Long-term evaluation of extensive restorations in permanent teeth, *J Dent* 31 (2003) 395–405. [https://doi.org/10.1016/S0300-5712\(03\)00084-8](https://doi.org/10.1016/S0300-5712(03)00084-8).
- [111] B.S. Leyton, R.N. Rached, S.A. Ignácio, · Evelise, M. Souza, Fracture strength of extended class I composite restorations with different restorative techniques, *Odontology* 110 (2022) 269–277. <https://doi.org/10.1007/s10266-021-00656-7>.
- [112] G. Schmalz, R. Hickel, R.B. Price, J.A. Platt, Bioactivity of Dental Restorative Materials: FDI Policy Statement, *Int Dent J* 73 (2023) 21–27. <https://doi.org/10.1016/j.identj.2022.11.012>.
- [113] M. Lezaja, D. Veljovic, D. Manojlovic, M. Milosevic, N. Mitrovic, D. Janackovic, V. Miletic, Bond strength of restorative materials to hydroxyapatite inserts and dimensional changes of insert-containing restorations during polymerization, *Dental Materials* 31 (2015) 171–181. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.11.017>.
- [114] G. Ayoub, M.L. Zebic, V. Miletic, R. Petrović, D. Veljovic, D. Janackovic, Dissimilar sintered calcium phosphate dental inserts as dentine substitutes: Shear bond strength to restorative materials, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 108 (2020) 2461–2470. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34578>.
- [115] G. Ayoub, D. Veljovic, M.L. Zebic, V. Miletic, E. Palcevskis, R. Petrovic, D. Janackovic, Composite nanostructured hydroxyapatite/yttrium stabilized zirconia dental inserts – The processing and application as dentin substitutes, *Ceram Int* 44 (2018) 18200–18208. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.07.028>.
- [116] E. Carrilho, M. Cardoso, M.M. Ferreira, C.M. Marto, A. Paula, A.S. Coelho, 10-MDP based dental adhesives: Adhesive interface characterization and adhesive stability-A systematic review, *Materials* 12 (2019). <https://doi.org/10.3390/ma12050790>.
- [117] F. Han, X. Jin, X. Yuan, Z. Bai, Q. Wang, H. Xie, Interactions of two phosphate ester monomers with hydroxyapatite and collagen fibers and their contributions to dentine bond performance, *J Dent* 122 (2022) 104159. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2022.104159>.
- [118] Matic Tamara, *Procesiranje i primena dentalnih inserata na bazi hidroksiapatita dopiranog magnezijumom i modifikacija dentalnih kompozita puniocima na bazi hidroksiapatita*, Master thesis, Faculty of Technology and Metallurgy, 2018.
- [119] J.O. Gordeladze, H.J. Haugen, S.P. Lyngstadaas, J.E. Reseland, Bone Tissue Engineering: State of the Art, Challenges, and Prospects, *Tissue Engineering for Artificial Organs: Regenerative Medicine, Smart Diagnostics and Personalized Medicine* 2–2 (2016) 525–551. <https://doi.org/10.1002/9783527689934.ch16>.
- [120] M.J. Mirzaali, J.J. Schwiedrzik, S. Thaiwichai, J.P. Best, J. Michler, P.K. Zysset, U. Wolfram, Mechanical properties of cortical bone and their relationships with age, gender, composition and microindentation properties in the elderly, *Bone* 93 (2016) 196–211. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2015.11.018>.
- [121] D.J. Hadjidakis, I.I. Androulakis, Bone remodeling, *Ann N Y Acad Sci* 1092 (2006) 385–396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>.
- [122] Image, Pearson Education, Inc (2006).
- [123] L. Zhu, D. Luo, Y. Liu, Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration, *Int J Oral Sci* 12 (2020) 1–15. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>.

- [124] J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos, Mechanical properties and the hierarchical structure of bone, *Med Eng Phys* 20 (1998) 92–102. [https://doi.org/10.1016/S1350-4533\(98\)00007-1](https://doi.org/10.1016/S1350-4533(98)00007-1).
- [125] E.F. Eriksen, Cellular mechanisms of bone remodeling, *Rev Endocr Metab Disord* 11 (2010) 219–227. <https://doi.org/10.1007/s11154-010-9153-1>.
- [126] P. Kostenuik, *On the Evolution and Contemporary Roles of Bone Remodeling*, Fourth Edi, Elsevier, 2013. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-415853-5.00037-6>.
- [127] D.W. Dempster, C.L. Lambing, P.J. Kostenuik, A. Grauer, Role of RANK ligand and denosumab, a targeted RANK ligand inhibitor, in bone health and osteoporosis: A review of preclinical and clinical data, *Clin Ther* 34 (2012) 521–536. <https://doi.org/10.1016/j.clinthera.2012.02.002>.
- [128] A. Ho-Shui-Ling, J. Bolander, L.E. Rustom, A.W. Johnson, F.P. Luyten, C. Picart, Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives, *Biomaterials* 180 (2018) 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>.
- [129] A.M. Wu et al., Global, regional, and national burden of bone fractures in 204 countries and territories, 1990–2019: a systematic analysis from the Global Burden of Disease Study 2019, *Lancet Healthy Longev* 2 (2021) e580–e592. [https://doi.org/10.1016/S2666-7568\(21\)00172-0](https://doi.org/10.1016/S2666-7568(21)00172-0).
- [130] E.E. Huang, N. Zhang, H. Shen, X. Li, M. Maruyama, T. Utsunomiya, Q. Gao, R.A. Guzman, S.B. Goodman, Novel Techniques and Future Perspective for Investigating Critical-Size Bone Defects, *Bioengineering* 9 (2022). <https://doi.org/10.3390/bioengineering9040171>.
- [131] M.W. Archunan, S. Petronis, *Bone Grafts in Trauma and Orthopaedics*, Cureus (2021). <https://doi.org/10.7759/cureus.17705>.
- [132] L. Vidal, C. Kampleitner, M. Brennan, A. Hoornaert, P. Layrolle, Reconstruction of Large Skeletal Defects: Current Clinical Therapeutic Strategies and Future Directions Using 3D Printing, *Front Bioeng Biotechnol* 8 (2020). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.00061>.
- [133] H. Qu, H. Fu, Z. Han, Y. Sun, Biomaterials for bone tissue engineering scaffolds: A review, *RSC Adv* 9 (2019) 26252–26262. <https://doi.org/10.1039/c9ra05214c>.
- [134] H. Zreiqat, C.R. Dunstan, V. Rosen Editors, *Mechanical Engineering Series A: Tissue Regeneration Approach to Bone and Cartilage Repair*, Springer International Publishing Switzerland, 2015.
- [135] P.M. Mountziaris, A.G. Mikos, Modulation of the inflammatory response for enhanced bone tissue regeneration, *Tissue Eng Part B Rev* 14 (2008) 179–186. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2008.0038>.
- [136] A. Przekora, Current trends in fabrication of biomaterials for bone and cartilage regeneration: Materials modifications and biophysical stimulations, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20020435>.
- [137] E. Fiume, S. Ciavattini, E. Verné, F. Baino, Foam replica method in the manufacturing of bioactive glass scaffolds: Out-of-date technology or still underexploited potential?, *Materials* 14 (2021). <https://doi.org/10.3390/ma14112795>.
- [138] W. Xiang, M. Akinc, Si, Zn-modified tricalcium phosphates: A phase composition and crystal structure study, *Key Eng Mater* 284–286 (2005) 83–86. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.284-286.83>.
- [139] Q. Zhang, J. Zhou, P. Zhi, L. Liu, C. Liu, A. Fang, Q. Zhang, 3D printing method for bone tissue engineering scaffold, *Med Nov Technol Devices* 17 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.medntd.2022.100205>.
- [140] C. Garot, G. Bettega, C. Picart, Additive Manufacturing of Material Scaffolds for Bone Regeneration: Toward Application in the Clinics, *Adv Funct Mater* 31 (2021). <https://doi.org/10.1002/adfm.202006967>.
- [141] S. Chen, Y. Shi, X. Zhang, J. Ma, 3D printed hydroxyapatite composite scaffolds with enhanced mechanical properties, *Ceram Int* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.02.182>.
- [142] A.P.N. Alves, M. Arango-Ospina, R.L.M.S. Oliveira, I.M. Ferreira, E.G. de Moraes, M. Hartmann, A.P.N. de Oliveira, A.R. Boccaccini, E. de Sousa Trichês, 3D-printed β -TCP/S53P4 bioactive glass scaffolds coated with tea tree oil: Coating optimization, in vitro bioactivity and antibacterial properties, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 111 (2023) 881–894. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35198>.

- [143] M.N. Gómez-Cerezo, J. Peña, S. Ivanovski, D. Arcos, M. Vallet-Regí, C. Vaquette, Multiscale porosity in mesoporous bioglass 3D-printed scaffolds for bone regeneration, *Materials Science and Engineering C* 120 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.111706>.
- [144] Z. Xu, X. Qi, M. Bao, T. Zhou, J. Shi, Z. Xu, M. Zhou, A.R. Boccaccini, K. Zheng, X. Jiang, Biom mineralization inspired 3D printed bioactive glass nanocomposite scaffolds orchestrate diabetic bone regeneration by remodeling micromilieu, *Bioact Mater* 25 (2023) 239–255. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2023.01.024>.
- [145] A. Ressler, S. Zakeri, J. Dias, M. Hannula, J. Hyttinen, H. Ivanković, M. Ivanković, S. Miettinen, M. Schwentenwein, E. Levänen, E.J. Frankberg, Vat photopolymerization of biomimetic bone scaffolds based on Mg, Sr, Zn-substituted hydroxyapatite: Effect of sintering temperature, *Ceram Int* (2024). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2024.05.038>.
- [146] I. Bouakaz, C. Drouet, D. Grossin, E. Cobraiville, G. Nolens, Hydroxyapatite 3D-printed scaffolds with Gyroid-Triply periodic minimal surface (TPMS) porous structure: Fabrication and an in vivo pilot study in sheep, *Acta Biomater* (2023). <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2023.08.041>.
- [147] S. Systemans, E. Cobraiville, S. Camby, C. Meyer, A. Louvrier, S.A. Lie, T. Schouman, S. Siciliano, O. Beckers, V. Poulet, N. Ullmann, G. Nolens, V. Biscaccianti, J.L. Nizet, J.Y. Hascoët, Y. Gilon, L. Vidal, An innovative 3D hydroxyapatite patient-specific implant for maxillofacial bone reconstruction: A case series of 13 patients, *Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery* 52 (2024) 420–431. <https://doi.org/10.1016/j.jcms.2024.02.026>.
- [148] I. Bouakaz, E. Sadeghian Dehkord, S. Meille, A. Schrijnemakers, F. Boschini, N. Preux, S. Hocquet, L. Geris, G. Nolens, D. Grossin, A. Dupret-Boriès, 3D printed triply periodic minimal surfaces calcium phosphate bone substitute: The effect of porosity design on mechanical properties, *Ceram Int* (2023). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.10.238>.
- [149] B. Jokić, M. Mitrić, V. Radmilović, S. Drmanić, R. Petrović, D. Janačković, Synthesis and characterization of monetite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method, *Ceram Int* 37 (2011) 167–173. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.08.032>.
- [150] D. Veljovic, T. Matic, T. Stamenic, V. Kojic, S. Dimitrijevic-Brankovic, M.J. Lukic, S. Jevtic, Z. Radovanovic, R. Petrovic, D. Janackovic, Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite – Biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity, *Ceram Int* (2019). <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.07.219>.
- [151] D. Janackovic, I. Petrovic-Prelevic, L. Kostic-Gvozdenovic, R. Petrovic, V. Jokanovic, D. Uskokovic, Influence of synthesis parameters on the particle sizes of nanostructured calcium-hydroxyapatite, *Key Eng Mater* 192–195 (2001) 203–206. <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/kem.192-195.203>.
- [152] T. Matić, M.L. Zebić, V. Miletić, I. Cvijović-Alagić, R. Petrović, D. Janačković, D. Veljović, Sr,Mg co-doping of calcium hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, processing, characterization and possible application as dentin substitutes, *Ceram Int* 48 (2022) 11155–11165. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2021.12.335>.
- [153] Q. Liang, Q. Hu, G. Miao, B. Yuan, X. Chen, A facile synthesis of novel mesoporous bioactive glass nanoparticles with various morphologies and tunable mesostructure by sacrificial liquid template method, *Mater Lett* 148 (2015) 45–49. <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2015.01.122>.
- [154] A. El-Fiqi, M. Bakry, Facile and rapid ultrasound-mediated synthesis of spherical mesoporous silica submicron particles with high surface area and worm-like mesoporosity, *Mater Lett* 281 (2020). <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2020.128620>.
- [155] A. Galic, T. Matic, N. Obradovic, Z. Bascarevic, D. Veljovic, Processing of gelatine coated composite scaffolds based on magnesium and strontium doped hydroxyapatite and yttria-stabilized zirconium oxide, *Science of Sintering* (2023) 19–19. <https://doi.org/10.2298/sos220723019g>.
- [156] A. George, B. Stephen Brunauer, Adsorption of Gases in Multimolecular Layers, 1938.
- [157] O.F. Baugh, E.P. Barrett, L.G. Joyner, P.P. Halenda, The volume and area distributions in porous substances, 1951.
- [158] K.S.W. Sing, Adsorption methods for the characterization of porous materials, 1998.

- [159] J. Stojkowska, J. Zvicer, M. Andrejevic, D. Janackovic, B. Obradovic, D.N. Veljovic, Novel composite scaffolds based on alginate and Mg-doped calcium phosphate fillers: Enhanced hydroxyapatite formation under biomimetic conditions, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 109 (2021) 2079–2090. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34856>.
- [160] Y. Boussès, N. Brulat-Bouchard, P.O. Bouchard, Y. Tillier, A numerical, theoretical and experimental study of the effect of thermocycling on the matrix-filler interface of dental restorative materials, *Dental Materials* 37 (2021) 772–782. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.01.010>.
- [161] C.J. Soares, E. Cristina, G. Pizi, R. Borges Fonseca, L. Roberto, M. Martins, Influence of root embedment material and periodontal ligament simulation on fracture resistance tests Influência do material de inclusão e da simulação do ligamento periodontal nos ensaios de resistência à fratura, *Braz Oral Res* 19 (2005) 11–17.
- [162] X. Huang, L. Zou, R. Yao, S. Wu, Y. Li, Effect of preparation design on the fracture behavior of ceramic occlusal veneers in maxillary premolars, *J Dent* 97 (2020) 103346. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2020.103346>.
- [163] J. Molnár, M. Fráter, T. Sáry, G. Braunitzer, P.K. Vallittu, L. Lassila, S. Garoushi, Fatigue performance of endodontically treated molars restored with different dentin replacement materials, *Dental Materials* 38 (2022) e83–e93. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2022.02.007>.
- [164] A. Bigi, E. Foresti, M. Gandolfi, M. Gazzano, N. Roveri, Isomorphous substitutions in β -tricalcium phosphate: The different effects of zinc and strontium, *J Inorg Biochem* 66 (1997) 259–265. [https://doi.org/10.1016/S0162-0134\(96\)00219-X](https://doi.org/10.1016/S0162-0134(96)00219-X).
- [165] A. Bigi, E. Foresti, A. Ripamonti, L. Compostella, A.M. Fichera, M. Gazzano, N. Roveri, Structural and chemical characterization of inorganic deposits in calcified human mitral valve, *J Inorg Biochem* 34 (1988) 75–82. [https://doi.org/10.1016/0162-0134\(88\)85019-0](https://doi.org/10.1016/0162-0134(88)85019-0).
- [166] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj, H. Ivanković, Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review, *Open Ceramics* 6 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.oceram.2021.100122>.
- [167] K. Matsunaga, A. Kuwabara, First-principles study of vacancy formation in hydroxyapatite, *Phys Rev B Condens Matter Mater Phys* 75 (2007). <https://doi.org/10.1103/PhysRevB.75.014102>.
- [168] J.C. Elliott, *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, Elsevier, Amsterdam, 1994.
- [169] P. Nandha Kumar, S.K. Mishra, R. Udhay Kiran, S. Kannan, Preferential occupancy of strontium in the hydroxyapatite lattice in biphasic mixtures formed from non-stoichiometric calcium apatites, *Dalton Transactions* 44 (2015) 8284–8292. <https://doi.org/10.1039/c5dt00173k>.
- [170] B. Dickens, L.W. Schroeder, W.E. Brown, Crystallographic studies of the role of Mg as a stabilizing impurity in β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. The crystal structure of pure β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, *J Solid State Chem* 10 (1974) 232–248. [https://doi.org/10.1016/0022-4596\(74\)90030-9](https://doi.org/10.1016/0022-4596(74)90030-9).
- [171] K. Matsunaga, T. Kubota, K. Toyoura, A. Nakamura, First-principles calculations of divalent substitution of Ca^{2+} in tricalcium phosphates, *Acta Biomater* 23 (2015) 329–337. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.05.014>.
- [172] M.D. O'Donnell, Y. Fredholm, A. de Rouffignac, R.G. Hill, Structural analysis of a series of strontium-substituted apatites, *Acta Biomater* 4 (2008) 1455–1464. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2008.04.018>.
- [173] G. Renaudin, E. Jallot, J.M. Nedelec, Effect of strontium substitution on the composition and microstructure of sol-gel derived calcium phosphates, *J Solgel Sci Technol* 51 (2009) 287–294. <https://doi.org/10.1007/s10971-008-1854-5>.
- [174] C.M. Mardziah, I. Sopyan, S. Ramesh, Strontium-doped hydroxyapatite nanopowder via sol-gel method: Effect of strontium concentration and calcination temperature on phase behavior, *Trends Biomater Artif Organs* 23 (2009) 105–113.
- [175] M. Kavitha, R. Subramanian, R. Narayanan, V. Udhayabanu, Solution combustion synthesis and characterization of strontium substituted hydroxyapatite nanocrystals, *Powder Technol* 253 (2014) 129–137. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2013.10.045>.

- [176] B. Yedekçi, A. Tezcaner, A.Z. Alshemary, B. Yılmaz, T. Demir, Z. Evis, Synthesis and sintering of B, Sr, Mg multi-doped hydroxyapatites: Structural, mechanical and biological characterization, *J Mech Behav Biomed Mater* 115 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104230>.
- [177] S. Lala, T.N. Maity, M. Singha, K. Biswas, S.K. Pradhan, Effect of doping (Mg,Mn,Zn) on the microstructure and mechanical properties of spark plasma sintered hydroxyapatites synthesized by mechanical alloying, *Ceram Int* 43 (2017) 2389–2397. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2016.11.027>.
- [178] N. Iwamoto, N.D. Ruse, Fracture toughness of human dentin, *J Biomed Mater Res A* 66 (2003) 507–512. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10005>.
- [179] T. Matic, M.L. Zebic, V. Miletic, I. Trajkovic, M. Milosevic, A. Racic, D. Veljovic, Hydroxyapatite-based dental inserts: Microstructure, mechanical properties, bonding efficiency and fracture resistance of molars with occlusal restorations, *J Biomed Mater Res B Appl Biomater* 112 (2023) 1–11. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.35331>.
- [180] N.C. Lawson, A. Robles, C.C. Fu, C.P. Lin, K. Sawlani, J.O. Burgess, Two-year clinical trial of a universal adhesive in total-etch and self-etch mode in non-cariou cervical lesions, in: *J Dent*, Elsevier Ltd, 2015: pp. 1229–1234. <https://doi.org/10.1016/j.jdent.2015.07.009>.
- [181] L. Bracher, M. Özcan, Adhesion of resin composite to enamel and dentin: a methodological assessment, *J Adhes Sci Technol* 32 (2018) 258–271. <https://doi.org/10.1080/01694243.2017.1354494>.
- [182] F. Han, Z. Sun, H. Xie, C. Chen, Improved bond performances of self-etch adhesives to enamel through increased MDP–Ca salt formation via phosphoric acid pre-etching, *Dental Materials* 38 (2022) 133–146. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2021.10.017>.
- [183] J. De Munck, K. Van Landuyt, E. Coutinho, A. Poitevin, M. Peumans, P. Lambrechts, B. Van Meerbeek, Micro-tensile bond strength of adhesives bonded to class-I cavity-bottom dentin after thermo-cycling, *Dental Materials* 21 (2005) 999–1007. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2004.11.005>.
- [184] E.M. Rivera, R.E. Walton, Longitudinal tooth fractures: findings that contribute to complex endodontic diagnoses, *Endod Topics* (2009) 1601–1538.
- [185] M. Bakke, Bite Force and Occlusion, *Semin Orthod* 12 (2006) 120–126. <https://doi.org/10.1053/j.sodo.2006.01.005>.
- [186] T. Matic, F. Daou, A. Cochis, N. Barac, V. Ugrinovic, L. Rimondini, D. Veljovic, Multifunctional Sr,Mg-Doped Mesoporous Bioactive Glass Nanoparticles for Simultaneous Bone Regeneration and Drug Delivery, *Int J Mol Sci* 25 (2024) 8066. <https://doi.org/10.3390/ijms25158066>.
- [187] X. Li, L. Zhang, X. Dong, J. Liang, J. Shi, Preparation of mesoporous calcium doped silica spheres with narrow size dispersion and their drug loading and degradation behavior, *Microporous and Mesoporous Materials* 102 (2007) 151–158. <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2006.12.048>.
- [188] Y. Wang, H. Song, Y. Yang, Y. Liu, J. Tang, C. Yu, Kinetically Controlled Dendritic Mesoporous Silica Nanoparticles: From Dahlia- to Pomegranate-like Structures by Micelle Filling, *Chemistry of Materials* 30 (2018) 5770–5776. <https://doi.org/10.1021/acs.chemmater.8b02712>.
- [189] Y. Bin Wang, Z. Liu, S.H. Shi, K.K. Hu, Y.T. Zhang, M. Guo, Research Progress of Dendritic Fibrous Nano-silica (DFNS), *Wuji Cailiao Xuebao/Journal of Inorganic Materials* 33 (2018) 1274–1288. <https://doi.org/10.15541/jim20180247>.
- [190] J. Hochstrasser, E. Juère, F. Kleitz, W. Wang, C. Kübel, U. Tallarek, Insights into the intraparticle morphology of dendritic mesoporous silica nanoparticles from electron tomographic reconstructions, *J Colloid Interface Sci* 592 (2021) 296–309. <https://doi.org/10.1016/j.jcis.2021.02.069>.
- [191] S. El Baakili, K. El Mabrouk, M. Bricha, Acellular bioactivity and drug delivery of new strontium doped bioactive glasses prepared through a hydrothermal process, *RSC Adv* 12 (2022) 15361–15372. <https://doi.org/10.1039/d2ra02416k>.
- [192] D. Kalim, T. Kovarik, T. Krenek, D. Docheva, T. Stich, J. Pola, Recent Advances and Future Perspectives of Sol-Gel Derived Porous Bioactive Glasses : A Review, *RSC Adv* (2020) 33782–33835. <https://doi.org/10.1039/d0ra04287k>.

- [193] J. Massera, L. Hupa, M. Hupa, Influence of the partial substitution of CaO with MgO on the thermal properties and in vitro reactivity of the bioactive glass S53P4, *J Non Cryst Solids* 358 (2012) 2701–2707. <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2012.06.032>.
- [194] J. Soulié, J.M. Nedelec, E. Jallot, Influence of Mg doping on the early steps of physico-chemical reactivity of sol-gel derived bioactive glasses in biological medium, *Physical Chemistry Chemical Physics* 11 (2009) 10473–10483. <https://doi.org/10.1039/b913771h>.
- [195] J. Ma, C.Z. Chen, D.G. Wang, Y. Jiao, J.Z. Shi, Effect of magnesia on the degradability and bioactivity of sol-gel derived SiO₂-CaO-MgO-P₂O₅ system glasses, *Colloids Surf B Biointerfaces* 81 (2010) 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2010.06.022>.
- [196] M. Schumacher, P. Habibovic, S. van Rijt, Mesoporous bioactive glass composition effects on degradation and bioactivity, *Bioact Mater* 6 (2021) 1921–1931. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.12.007>.
- [197] F. Villanueva-Flores, A. Castro-Lugo, O.T. Ramírez, L.A. Palomares, Understanding cellular interactions with nanomaterials: Towards a rational design of medical nanodevices, *Nanotechnology* 31 (2020). <https://doi.org/10.1088/1361-6528/ab5bc8>.
- [198] J.M. Díaz-Tocados, C. Herencia, J.M. Martínez-Moreno, A. Montes de Oca, M.E. Rodríguez-Ortiz, N. Vergara, A. Blanco, S. Steppan, Y. Almadén, M. Rodríguez, J.R. Muñoz-Castañeda, Magnesium Chloride promotes Osteogenesis through Notch signaling activation and expansion of Mesenchymal Stem Cells, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-08379-y>.
- [199] M.A. Tahir, M. Saif ur Rahman, F. Nisha, F. Shahzad, M.T. Jawad, A. Bahadur, M.A. Qamar, M. Shoaib, Hydroxycarbonate apatite formation and 5-fluorouracil delivery by strontium containing mesoporous bioactive glass nanoparticles, *Ceram Int* 48 (2022) 15862–15867. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.02.126>.
- [200] A.I. Damian-Buda, G. Voicu, B.S. Vasile, A. Banciu, F. Iordache, L.T. Ciocan, Development of mesoporous borosilicate bioactive glass nanoparticles containing Mg²⁺ and Zn²⁺: biocompatibility, bioactivity and antibacterial activity, *J Non Cryst Solids* 594 (2022). <https://doi.org/10.1016/j.jnoncrysol.2022.121819>.
- [201] H. Li, J. Chang, Bioactive silicate materials stimulate angiogenesis in fibroblast and endothelial cell co-culture system through paracrine effect, *Acta Biomater* 9 (2013) 6981–6991. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2013.02.014>.
- [202] A. El-Fiqi, T.H. Kim, M. Kim, M. Eltohamy, J.E. Won, E.J. Lee, H.W. Kim, Capacity of mesoporous bioactive glass nanoparticles to deliver therapeutic molecules, *Nanoscale* 4 (2012) 7475–7488. <https://doi.org/10.1039/c2nr31775c>.
- [203] H. Yao, J. Luo, Y. Deng, Z. Li, J. Wei, Alginate-modified mesoporous bioactive glass and its drug delivery, bioactivity, and osteogenic properties, *Front Bioeng Biotechnol* 10 (2022). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2022.994925>.
- [204] S. Inocêncio, T. Cordeiro, I. Matos, F. Danède, J.C. Sotomayor, I.M. Fonseca, N.T. Correia, M.C. Corvo, M. Dionísio, Ibuprofen incorporated into unmodified and modified mesoporous silica: From matrix synthesis to drug release, *Microporous and Mesoporous Materials* 310 (2021). <https://doi.org/10.1016/j.micromeso.2020.110541>.
- [205] J. Gao, M. Li, J. Cheng, X. Liu, Z. Liu, J. Liu, P. Tang, 3D-Printed GelMA/PEGDA/F127DA Scaffolds for Bone Regeneration, *J Funct Biomater* 14 (2023). <https://doi.org/10.3390/jfb14020096>.
- [206] M. Rajabi, J.D. Cabral, S. Saunderson, M. Gould, M.A. Ali, Development and optimisation of hydroxyapatite-polyethylene glycol diacrylate hydrogel inks for 3D printing of bone tissue engineered scaffolds, *Biomed Mater* 18 (2023). <https://doi.org/10.1088/1748-605X/acf90a>.
- [207] X. Zhou, B. Zou, Q. Chen, Q. Lai, T. Quan, X. Ma, G. Yang, Polyelectrolyte Multilayer Coating on 3D Printed PEGDA/TCP Scaffold with Improved Cell Proliferation, *Additive Manufacturing Frontiers* 3 (2024) 200114. <https://doi.org/10.1016/j.amf.2024.200114>.
- [208] Q. Chen, B. Zou, Q. Lai, K. Zhu, SLA-3d printing and compressive strength of PEGDA/nHAP biomaterials, *Ceram Int* 48 (2022) 30917–30926. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2022.07.047>.
- [209] X. Deng, B. Huang, R. Hu, L. Chen, Y. Tang, C. Lu, Z. Chen, W. Zhang, X. Zhang, 3D printing of robust and biocompatible poly(ethylene glycol)diacrylate/nano-hydroxyapatite

composites via continuous liquid interface production, *J Mater Chem B* 9 (2021) 1315–1324. <https://doi.org/10.1039/d0tb02182b>.

- [210] M. Kumar, S. Ghosh, V. Kumar, V. Sharma, P. Roy, Tribo-mechanical and biological characterization of PEGDA/bioceramics composites fabricated using stereolithography, *J Manuf Process* 77 (2022) 301–312. <https://doi.org/10.1016/j.jmapro.2022.03.024>.
- [211] M. Bohner, L. Galea, N. Doebelin, Calcium phosphate bone graft substitutes: Failures and hopes, *J Eur Ceram Soc* 32 (2012) 2663–2671. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2012.02.028>.
- [212] S.S. Amaral, B.S. de S. Lima, S.O.M. Avelino, B.R. Spirandeli, T.M.B. Campos, G.P. Thim, E. de S. Trichês, R.F. do Prado, L.M.R. de Vasconcellos, β -TCP/S53P4 Scaffolds Obtained by Gel Casting: Synthesis, Properties, and Biomedical Applications, *Bioengineering* 10 (2023) 597. <https://doi.org/10.3390/bioengineering10050597>.
- [213] M. Karadjian, C. Essers, S. Tsitlakidis, B. Reible, A. Moghaddam, A.R. Boccaccini, F. Westhauser, Biological properties of calcium phosphate bioactive glass composite bone substitutes: Current experimental evidence, *Int J Mol Sci* 20 (2019). <https://doi.org/10.3390/ijms20020305>.
- [214] D. Bellucci, A. Sola, V. Cannillo, Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications, *J Biomed Mater Res A* 104 (2016) 1030–1056. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35619>.
- [215] A. Grosso, M.G. Burger, A. Lunger, D.J. Schaefer, A. Banfi, N. Di Maggio, It takes two to tango: Coupling of angiogenesis and osteogenesis for bone regeneration, *Front Bioeng Biotechnol* 5 (2017). <https://doi.org/10.3389/fbioe.2017.00068>.
- [216] C. Besleaga, B. Nan, A.C. Popa, L.M. Balescu, L. Nedelcu, A.S. Neto, I. Pasuk, L. Leonat, G. Popescu-Pelin, J.M.F. Ferreira, G.E. Stan, Sr and Mg Doped Bi-Phasic Calcium Phosphate Macroporous Bone Graft Substitutes Fabricated by Robocasting: A Structural and Cytocompatibility Assessment, *J Funct Biomater* 13 (2022). <https://doi.org/10.3390/jfb13030123>.
- [217] K. Zhang, Y. Fan, N. Dunne, X. Li, Effect of microporosity on scaffolds for bone tissue engineering, *Regen Biomater* 5 (2018) 115–124. <https://doi.org/10.1093/rb/rby001>.
- [218] Y. Deng, C. Jiang, C. Li, T. Li, M. Peng, J. Wang, K. Dai, 3D printed scaffolds of calcium silicate-doped β -TCP synergize with co-cultured endothelial and stromal cells to promote vascularization and bone formation, *Sci Rep* 7 (2017). <https://doi.org/10.1038/s41598-017-05196-1>.
- [219] X. Yuan, T. Lu, F. He, T. Wu, X. Wang, J. Ye, 3D-plotted zinc silicate/ β -tricalcium phosphate ceramic scaffolds enable fast osteogenesis by activating the p38 signaling pathway, *J Mater Chem B* 10 (2022) 9639–9653. <https://doi.org/10.1039/d2tb01868c>.
- [220] L. Teliang, Z. Luhui, Y. Xinyuan, Y. Jiandong, A novel calcium phosphate-based ceramic scaffolds with unexpected high osteogenic activity by strontium doping, *Mater Today Chem* 36 (2024) 101931.
- [221] Q. Miao, X. Yang, J. Diao, H. Ding, Y. Wu, X. Ren, J. Gao, M. Ma, S. Yang, 3D printed strontium-doped calcium phosphate ceramic scaffold enhances early angiogenesis and promotes bone repair through the regulation of macrophage polarization, *Mater Today Bio* 23 (2023). <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2023.100871>.
- [222] C. Rodríguez-Valencia, I. Pereiro, R.P. Pirraco, M. López-Álvarez, J. Serra, P. González, A.P. Marques, R.L. Reis, Human mesenchymal stem cells response to multi-doped silicon-strontium calcium phosphate coatings, *J Biomater Appl* 28 (2014) 1397–1407. <https://doi.org/10.1177/0885328213510056>.
- [223] X. Cui, Y. Zhang, J. Wang, C. Huang, Y. Wang, H. Yang, W. Liu, T. Wang, D. Wang, G. Wang, C. Ruan, D. Chen, W.W. Lu, W. Huang, M.N. Rahaman, H. Pan, Strontium modulates osteogenic activity of bone cement composed of bioactive borosilicate glass particles by activating Wnt/ β -catenin signaling pathway, *Bioact Mater* 5 (2020) 334–347. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.02.016>.
- [224] F. Yang, D. Yang, J. Tu, Q. Zheng, L. Cai, L. Wang, Strontium enhances osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells and in vivo bone formation by activating Wnt/catenin signaling, *Stem Cells* 29 (2011) 981–991. <https://doi.org/10.1002/stem.646>.

- [225] X. Li, S. Yang, G. Yuan, D. Jing, L. Qin, H. Zhao, S. Yang, Type II collagen-positive progenitors are important stem cells in controlling skeletal development and vascular formation, *Bone Res* 10 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41413-022-00214-z>.
- [226] A.K. Rajendran, M.S.J. Anthraper, N.S. Hwang, J. Rangasamy, Osteogenesis and angiogenesis promoting bioactive ceramics, *Materials Science and Engineering R: Reports* 159 (2024). <https://doi.org/10.1016/j.mser.2024.100801>.

Prilog 1

Spisak i objašnjenje korišćenih medicinskih termina

Angiogeneza – formiranje krvnih sudova, uključuje migraciju, rast i diferencijaciju endotelnih ćelija, koje formiraju unutrašnji zid krvnih sudova;

Biomimetično – imitacija biohemijskih procesa u prirodi;

Diferencijacija ćelija – proces u kome se matične ćelije menjaju morfološki i fiziološki čime se specijalizuju za obavljanje određene funkcije;

In vitro bioaktivnost materijala – sposobnost materijala da u kontaktu sa simuliranom telesnom tečnošću izazove formiranje hidroksiapatita na svojoj površini;

Imortalizovane ćelije – ćelije modifikovane tako da imaju neograničeni kapacitet proliferacije;

Impaktirani zub – zub koji nije izrastao iako je završen period nicanja, najčešće umnjak;

Kavitet zuba – prostor unutar zuba nastao preparacijom zuba ili karijesnom lezijom;

Konfluentnost – udeo površine dna posude za ćelijsku kulturu pokriven ćelijama;

Molar – kutnjak, zub bočne regije, može biti prvi, drugi i treći u zavisnosti od vremena formiranja i pozicije, kao i gornji ili donji u zavisnosti od vilice u kojoj se nalazi, a ima ulogu mlevenja hrane;

Osteogeneza – formiranje koštanog tkiva;

Osteoinduktivnost – sposobnost nosača da indukuje diferencijaciju matičnih ćelija u osteoblaste;

Osteokonduktivnost – svojstva nosača koja omogućavaju adheziju i rast osteoblasta i formiranje ekstracelularnog matriksa na površini materijala;

Preparacija zuba – uklanjanje delova tvrdih zubnih tkiva mašinskim putem

Proliferacija ćelija – proces rasta i deobe ćelija kojim se broj ćelija eksponencijalno povećava;

Pro-angiogena svojstva - svojstvo materijala da stimuliše angiogenezu;

Pro-osteogena svojstva – svojstva materijala da stimuliše osteogenezu;

Skafoldi – makroporozne strukture koje imaju funkciju nosača ćelija;

Vijabilnost ćelija – udeo živih ćelija;

Biografija autora

Tamara Z. Matić je rođena 28.09.1994. u Beogradu gde je završila Treću beogradsku gimnaziju. Osnovne studije je upisala 2013. godine, a završila 2017. godine na Tehnološko-metalurškom fakultetu Univerziteta u Beogradu (TMF) na studijskom programu Inženjerstvo materijala sa prosečnom ocenom 9,62. Master studije na istom fakultetu je završila 2018. godine sa prosečnom ocenom 10,00. Doktorske akademske studije upisala je školske 2018/2019. godine na TMF studijski program Inženjerstvo materijala. Od januara 2019. godine do oktobra 2023. godine bila je zaposlena u Inovacionom centru Tehnološko-metalurškog fakulteta kao istraživač pripravnik i istraživač saradnik. Od oktobra 2023. godine zaposlena je kao asistent na TMF. Tamara je naučno i stručno usavršavanje stekla kako u zemlji tako i u inostranstvu: na Univerzitetu u Edinburgu, Ujedinjeno Kraljevstvo, na Nacionalnom Tehničkom Univerzitetu u Atini i na Univerzitetu Istočnog Pijemonta u Italiji.

Od 2019. godine učestvuje u istraživanjima finansiranim od strane Ministarstva prosvete, nauke i tehnološkog razvoja Republike Srbije tj. Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija. Od januara 2024. godine je angažovana na projektu *HyBioComBone* (br.7740) u okviru programa „Prizma“ Fonda za nauku Republike Srbije.

Ko-autor je 11 naučnih radova: 3 u međunarodnim časopisima izuzetnih vrednosti (M21a), 3 u vrhunskim međunarodnim časopisima (M21), 2 u istaknutim međunarodnim časopisima (M22), 2 u međunarodnim časopisima (M23), 1 u časopisu međunarodnog značaja (M24); brojnih saopštenja štampanih u celini i izvodu sa nacionalnih i međunarodnih skupova, 1 tehničkog rešenja (M82), 2 objavljena patenta (M94) i jedne međunarodne nagrade za inovaciju (Z71). Ukupan broj citata naučnih radova iznosi 85, Hiršov indeks $h = 5$.

Изјава о ауторству

Име и презиме аутора: Тамара Матић

Број индекса: 4008/2018

Изјављујем

да је докторска дисертација под насловом

„Биоактивни материјали на бази калцијум-фосфата и мезопорозног биостакла допираних јонима магнезијума и/или стронцијума: синтеза, процесирање, карактеризација и примена у биомедицини“

- резултат сопственог истраживачког рада;
- да дисертација у целини ни у деловима није била предложена за стицање друге дипломе према студијским програмима других високошколских установа;
- да су резултати коректно наведени и
- да нисам кршио/ла ауторска права и користио/ла интелектуалну својину других лица.

Потпис аутора

У Београду, 16.09.2024.

Изјава о истоветности штампане и електронске верзије докторског рада

Име и презиме аутора: Тамара Матић

Број индекса 4008/2018

Студијски програм Инжењерство материјала

Наслов рада „Биоактивни материјали на бази калцијум-фосфата и мезопорозног биостакла допираних јонима магнезијума и/или стронцијума: синтеза, процесирање, карактеризација и примена у биомедицини“

Ментор др Ђорђе Вељовић, ванредни професор Универзитета у Београду, Технолошко-металуршки факултет

Изјављујем да је штампана верзија мог докторског рада истоветна електронској верзији коју сам предао/ла ради похрањена у **Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду**.

Дозвољавам да се објаве моји лични подаци везани за добијање академског назива доктора наука, као што су име и презиме, година и место рођења и датум одбране рада.

Ови лични подаци могу се објавити на мрежним страницама дигиталне библиотеке, у електронском каталогу и у публикацијама Универзитета у Београду.

Потпис аутора

У Београду, 16.09.2024.

Изјава о коришћењу

Овлашћујем Универзитетску библиотеку „Светозар Марковић“ да у Дигитални репозиторијум Универзитета у Београду унесе моју докторску дисертацију под насловом:

„Биоактивни материјали на бази калцијум-фосфата и мезопорозног биостакла допираних јонима магнезијума и/или стронцијума: синтеза, процесирање, карактеризација и примена у биомедицини“

која је моје ауторско дело.

Дисертацију са свим прилозима предао/ла сам у електронском формату погодном за трајно архивирање.

Моју докторску дисертацију похрањену у Дигиталном репозиторијуму Универзитета у Београду и доступну у отвореном приступу могу да користе сви који поштују одредбе садржане у одабраном типу лиценце Креативне заједнице (Creative Commons) за коју сам се одлучио/ла.

1. Ауторство (CC BY)
2. Ауторство – некомерцијално (CC BY-NC)
- 3.** Ауторство – некомерцијално – без прерада (CC BY-NC-ND)
4. Ауторство – некомерцијално – делити под истим условима (CC BY-NC-SA)
5. Ауторство – без прерада (CC BY-ND)
6. Ауторство – делити под истим условима (CC BY-SA)

(Молимо да заокружите само једну од шест понуђених лиценци.
Кратак опис лиценци је саставни део ове изјаве).

Потпис аутора

У Београду, 16.09.2024.

ОЦЕНА ИЗВЕШТАЈА О ПРОВЕРИ ОРИГИНАЛНОСТИ ДОКТОРСКЕ ДИСЕРТАЦИЈЕ

На основу Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду и налаза у извештају из програма iThenticate којим је извршена провера оригиналности докторске дисертације „**Биоактивни материјали на бази калцијум-фосфата и мезопорозног биостакла допираних јонима магнезијума и/или стронцијума: синтеза, процесирање, карактеризација и примена у биомедицини**“, аутора Тамаре Матић, мастер инжењера технологије, констатујемо да утврђено подударање текста износи **8 %**. Овај степен подударности претежно је последица коришћења и интерпретације литературних података (референци, тј. цитата) који су наведени у листи референци, назива коришћених материјала, аналитичких метода (стандардне терминологије приликом описа њиховог извођења и назива уређаја) и хемијских једињења и њихових произвођача, као и претходно публикованих резултата докторандових истраживања, који су проистекли из његове дисертације што је у складу са чланом 9. Правилника. Ни са једним литературним наводом није установљено подударање веће од 1%.

На основу свега изнетог, а у складу са чланом 8. став 2. Правилника о поступку провере оригиналности докторских дисертација које се бране на Универзитету у Београду, изјављујем да извештај указује на оригиналност докторске дисертације, те се прописани поступак припреме за њену одбрану може наставити.

23.09.2024. године

Ментор

Др Ђорђе Вељовић, ванредни професор
Универзитет у Београду,
Технолошко-металуршки факултет