

Procesiranje i svojstva makroporoznih nosača na bazi kalcijum-fosfata dopiranih jonima magnezijuma, bakra i cinka prevučeni želatinom

OLIVERA Z. DRAGUTINOVIĆ, Univerzitet u Beogradu

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

SUZANA I. DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ,

Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

DORĐE N. VELJOVIĆ, Univerzitet u Beogradu

Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd

Originalni naučni rad

UDC: 615.466

DOI: 10.5937/tehnika2305252D

Osnovni cilj ove studije je bio ispitivanje mogućnosti za dobijanje makroporoznih nosača definisanih svojstava na bazi kalcijum-fosfata dopiranih jonima magnezijuma, bakra i cinka, prevučeni želatinom, koji bi potencijalno nakon implantacije omogućili kontrolisane uslove za nastajanje novog koštanog tkiva. U radu je najpre autoklaviranjem prekursorskog rastvora dobijenog pri molskom odnosu Ca/P od 1,52 sintetisan multi-dopiran nanočestični hidroksiapatit (HAp), koji predstavlja glavnu komponentu neorganskog dela koštanog tkiva. Kalcijum je u polaznom rastvoru delimično zamenjen jonima magnezijuma (5 mol.%), bakra (0,4 mol.%) i cinka (0,4 mol.%). Dobijeni prah je zatim kalcinisan, a promene u morfologiji prahova tokom kalcinacije na 1.000°C ogledale su se u prelasku sferično aglomerisanih štapićastih nanočestica multidopiranog praha hidroksiapatita u sferične čestice sačinjene od formiranih zrna. Makroporozne biokeramičke strukture su dobijene metodom replike sundjera, a polazni uzorci dobijeni nanošenjem paste sačinjene od kalcinisanog praha, polivinil alkohola i vode na poliuretanske sundjere su sinterovani na 1.370°C i 1.430°C. Rendgenskom difrakcionom analizom utvrđeno je da prisustvo magnezijuma u strukturi hidroksiapatita pospešuje faznu transformaciju HAp u β -trikalcijum-fosfat (β -TCP), što je doprinelo formiranju dvofaznog sistema HAp/ β -TCP tokom kalcinacije prahova, ali i tokom sinterovanja makroporoznih nosača. Ispitivanja antimikrobne aktivnosti dobijenih makroporoznih nosača prema *E. coli* su pokazala veći stepen inhibicije u poređenju sa *S. aureus*. Značajno povećanje pritiska čvrstoće sinterovanih makroporoznih nosača dobijeno je nakon formiranja prevlake na bazi 7,5% rastvora želatina.

Cljučne reči: makroporoznost, kalcijum-fosfat, dopiranje, želatin, mehanička svojstva

1. UVOD

Poslednjih nekoliko decenija intezivna naučna istraživanja su fokusirana ka sintezama različitih biokeramičkih materijala za biomedicinske potrebe. Najviše proučavan i korišćen biokeramički materijal u različitim granama medicine, pre svega ortopedije i stomatologije, je hidroksiapatit (HAp) [1]. Hidroksiapatit predstavlja glavnu komponentu neorganskog dela koštanog i zubnog tkiva i zaslužan je za njihovu čvrstoću i tvrdoću [2, 3]. HAp poseduje izuzetna svoj-

stva kao što su bioaktivnost, biokompatibilnost, osteokonduktivnost i netoksičnost [4]. Zahvaljujući navedenim svojstvima hidroksiapatit se primenjuje prilikom procesiranja različitih vrsta materijala za regeneraciju koštanog i zubnog tkiva, zatim u sistemima za kontrolisanu isporuku lekova, proteina itd [1, 4, 5].

Osnovna svojstva biomaterijala, kao što su morfologija, fazni sastav, mehanička svojstva itd, se mogu poboljšati i prilagoditi medicinskim potrebama dodavanjem jona dopanata koji su inače prisutni u strukturi kostiju [5, 6]. Ugradnja jona dopanata u strukturu hidroksiapatita koji ulazi u sastav koštanih implantata može pozitivno da utiče na formiranje novog koštanog tkiva, ali i da obezbedi lokalnu antimikrobnu aktivnost i poboljšanu osteointegraciju [5, 6]. Dopiranjem hidroksiapatita jonima magnezijuma može se pospešiti biokompatibilnost, bioaktivnost, proliferacija okolnih ćelija osteoblasta i mineralizacija koštanih defekata [7, 8,

Adresa autora: Olivera Dragutinović, Univerzitet u Beogradu, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, Kamernogijeva 4

e-mail: olivera.dragutinovic97@gmail.com

Rad primljen: 15.03.2023.

Rad prihvaćen: 11.09.2023.

9) Makroporozni nosači na bazi hidroksiapatita dopiranog jonima magnezijuma dokazano promoviraju formiranje nove kosti, a prisutni joni magnezijuma dodatno kontrolišu stepen degradacije implantata i regeneraciju okolne kosti [9, 10, 11] Takođe, zamena jona kalcijuma u kristalnoj strukturi hidroksiapatita jonima magnezijuma snižava temperaturu fazne transformacije HAp u bioaktivniju fazu β -TCP, tokom kalcinacije i sinterovanja [5, 9, 11].

Pojava mikroorganizama na površini implantanta nakon ugradnje je veoma česta pojava, što je usmerilo brojne istraživače ka proučavanjima uticaja jona dopanata (bakra, cinka, srebra, itd.) na antimikrobna svojstva biomaterijala [12, 13]

Cink je esencijalan mikroelement, prisutan je u kostima i usko je povezan sa metabolizmom kostiju. Prisustvo jona cinka pospešuje bioaktivnost, biokompatibilnost, promovira proliferaciju osteoblastičkih ćelija, izlučivanje osteokalcina i mineralizaciju okolnog koštanog tkiva [12, 13]. Hidroksiapatit dopiran bakrom pospešuje proliferaciju koštanih ćelija, ali i obezbeđuje lokalnu antimikrobnu aktivnost.

Prirodni biorazgradivi polimeri kao što je želatin obezbeđuju hidrofilno okruženje i olakšavaju ćelijsku adheziju u početnoj fazi osteointegracije [14-18]. Želatin se dobija denaturacijom kolagena, razbijanjem njegovog trostrukog heliksa, a dokazano je da se želatin može koristiti za ispunu koštanog defekata zahvaljujući biodegradabilnosti i netoksičnosti [16]

Cilj ovog naučnog rada je bio ispitivanje mogućnosti i definisanje procesnih parametara za dobijanje makroporoznih nosača definisanih svojstava na bazi kalcijum-fosfata dopiranih jonima magnezijuma, bakra i cinka, naknadno prevučeni slojem želatina.

2. EKSPERIMENTALNI DEO

2.1. Sinteza kalcijum-fosfatnog praha

Polazni prah sintetisan je hidrotermalnom metodom [5] Najpre je formiran prekusorski rastvor za sintezu kalcijum-hidroksiapatita polazeći od sledećih jedinjenja: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (VWR Chemicals Pro-labo, Leuven, Belgija), $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (Carl Roth GmbH, Karlsruhe, Nemačka), EDTA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka) i uree (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Nemačka). Kao izvori jona dopanata koji se ugrađuju tokom hidrotermalne sinteze u kristalnu rešetku hidroksiapatita korišćeni su $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (NRK Inženjering, Beograd, Srbija), $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (Kemika, Zagreb, Hrvatska) i $\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (Merck, Darmstadt, Nemačka), sa idejom da kalcijum u polaznom rastvoru bude zamenjen jonima magnezijuma (5 mol.%), bakra (0,4 mol.%) i cinka (0,4 mol.%). Molski odnos Ca/P bio je

1,52, a na osnovu toga je proračunata masa prekursora prikazana u tabeli 1.

Tabela 1. Korišćeni reaktanti za dobijanje kalcijum-fosfatnog praha

Reaktanti	Masa (g)
$\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	10,1412
EDTA	11,18
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	4,68
Urea	12
$\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,58462
$\text{Cu}(\text{NO}_3)_2 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,04407
$\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0,05426

Prekusorski rastvor je tretiran u autoklavu pri pritisku od 8 bar, na 160°C tokom 3 h. Iz dobijene suspenzije vakuum filtracijom je odvojen talog, koji je zatim ispiran dejonizovanom vodom i osušen na 105°C tokom 2 h.

2.2. Procesiranje makroporoznih nosača

Sintetisani prah je kalcinisan na 1000°C tokom 2 h, a zatim pomešan sa dejonizovanom vodom i polivinil alkoholom u odnosu prikazanom u tabeli 2. Tako dobijena pasta je ultrazvučno tretirana tokom 15 min i nanešena na makroporozne poliuretanske suđere cilindričnog oblika.

Tabela 2. Mase reaktanata korišćenih za dobijanje kompozitne paste

Reaktanti	Masa (g)
Kalcinisan prah HAp	1
Voda	0,117
Polivinil alkohol	2,217

Makroporozni suđeri su zatim osušeni tokom 2 dana na vazduhu i sinterovani na temperaturama 1.370°C i 1430°C tokom 2 h.

2.3 Prevlačenje makroporoznih nosača prevlakama na bazi želatina

Rastvori za prevlačenje sinterovanih makroporoznih nosača su formirani tako što su mase želatina iz tabele 3 rastvorene u dejonizovanoj vodi, tako da ukupna zapremina rastvora iznosi 5 ml i mešani na temperaturi od 50°C na magnetnoj mešalici.

Tabela 3. Mase želatina korišćene za pripremu rastvora korišćenih za dobijanje prevlaka na nosačima

Komponente	Masa (g)
Želatin 3%	0,150
Želatin 7,5%	0,375

U trenutku postizanja željene homogenosti, u rastvor su dodavani makroporozni nosači, a prevlaka je formirana uz održavanje konstantne temperature od

50°C tokom 2 h. Prevučeni makroporozni nosači su izvađeni i osušeni na sobnoj temperaturi.

2.4. Metode karakterizacije

2.4.1. Rendgenska difrakciona analiza

Rendgenska difrakciona analiza (XRD) izvršena je na uređaju Rigaku Smartlab diffractometer korišćenjem zračenja Cu K α linije opsega 2 θ ugla od 20 do 50° sa korakom od 0,02° s⁻¹. Difrakcioni maksimumi su poređeni sa karticama JCPDS 09–0432 i JCPDS 09–0169 za HAp i β -TCP, tim redom.

2.4.2. Skenirajuća elektronska mikroskopija

Morfologija sintetisanih i kalciniranih prahova i mikrostruktura skafolda ispitana je na uređaju TESCAN MIRA 3 XMU pri radnom naponu od 20 keV. Priprema za skenirajuću elektronsku mikroskopiju (SEM) podrazumevala je nanošenje prahova i skafolda na nosače preko lepljive grafitne trake, a nakon toga naparavanje tankim slojem zlata.

2.4.3. Energetska disperziona spektroskopija

Energetskom disperzionom spektroskopijom (EDX) su određeni elementni sastavi prahova. Uređaj koji je korišćen za ovu analizu je tip Oxford Inca 3.2, spregnut sa skenirajućim elektronskim mikroskopom Jeol JSM 5800. Radni napom tokom ispitivanja bio je 20 KeV.

2.4.4. Mehanička karakterizacija

Određivanjem pritiska čvrstoće pomoću uređaja Universal Testing Machine, AG-X Plus Shimadzu procenjena su mehanička svojstva makroporoznih nosača, pri brzini deformacije od 5 mm/min i 10% deformacije.

2.5. Antimikrobna aktivnost

Antimikrobna svojstva sinterovanih nosača ispitana su na dve bakterijske kulture *Escherichia coli* ATCC 25922 i *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Kao inokulum upotrebljena je kultura gajena preko noći u tripton soja bujonu (komercijalna podloga, Torlak, sa dodatkom 0,6% kvašćevog ekstrakta). Sterilan tripton soja agar (TSA) je razliven u Petri šolje i inkubiran na 37°C, 24 h, radi sušenja.

Priprema kultura za određivanje antimikrobne aktivnosti je vršena razblaživanjem pune kulture u fosfatno slanom puferu do cca 10⁷ cfu/ml u kontroli i suspenzijama sa uzorkom. Suspenzije su inkubirane na 37°C u šejkeru 3 h. Po završetku inkubacije napravljena je serija razblaženja za određivanje broja preživelih mikroorganizama na pripremljenim Petri šolja. Petri šolje su inkubirane 24 h, nakon čega su kolonije izbrojane i izračunat je stepen inhibicije (IR) prema formuli 1:

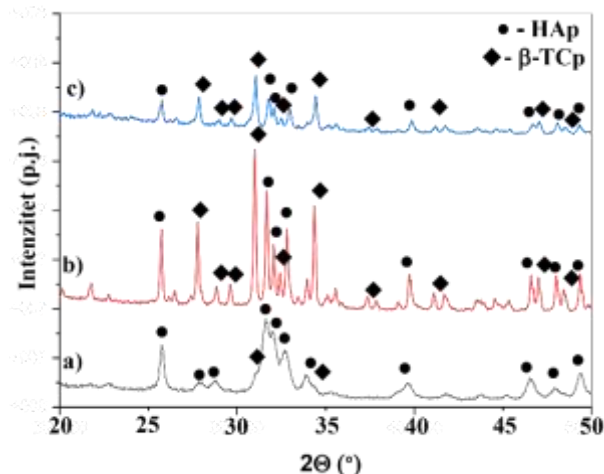
$$IR = ((K-U)/K) \times 100\% \quad (1)$$

Gde je K broj kolonija u kontroli (suspenzija bez dodatog uzorka), U koncentracija kulture u fosfatno slanom puferu sa uzorkom (makroporozni nosač).

3. REZULTATI I DISKUSIJA

3.1. XRD analiza prahova i sinterovanih makroporoznih nosača

Difrakcioni maksimumi na difraktogramu sintetisanog praha prikazanog na slici 1a se poklapaju sa vrednostima na JCPDS 9-432 kartici za hidroksiapatit.



Slika 1 - Difraktogram (a) sintetisanog kalcijum-fosfatnog praha, (b) kalcinisanog kalcijum-fosfatnog praha, i (c) makroporoznog nosača sinterovanog na 1430 °C

Na difraktogramu se pored dominantnih pikova karakterističnih za HAp uočavaju pikovi koji se poklapaju sa vrednostima na kartici JCPDS 09–0169 karakterističnoj za β -TCP. Utačnjavanjem kristalne strukture praha pomoću „PowderCell“ softvera, određen je kvantitativan sastav sintetisanog praha, pri čemu je ustanovljeno da je kalcijum-fosfatni prah sačinjen od 78,5% HAp i 21,35% β -TCP. Korišćenjem istog softvera određeni su parametri jedinične kristalne rešetke dopiranog praha. Dobijene su sledeće vrednosti: a = b = 9,425 [Å], odnosno c = 6,867 [Å]. Poređenjem sa dobijenim vrednostima za hidroksiapatit sintetisan pri identičnim uslovima, bez jona dopanata (a = b = 9,429 [Å], odnosno c = 6,874 [Å]), može se zaključiti da su parametri jedinične kristalne rešetke u slučaju dopiranog praha nešto manji, što potencijalno može da ukaže na ulazak jona dopanata u kristalnu strukturu hidroksiapatita umesto jona kalcijuma. Oblik pikova ukazuje na relativno nizak stepen kristaliničnosti, a prisustvo jona magnezijuma uticalo je na stabilizaciju β -TCP faze tokom sinteze.

Inkorporiranje jona magnezijuma u strukturu hidroksiapatita i termički tretman od 1000°C doveli su do intenzivne fazne transformacije HAp u β -TCP, što je u saglasnosti sa literaturno dostupnim podacima [5, 9,

19] Fazni sastav kalcinisanog praha je prikazan na difraktogramu na slici 1b. Na difraktogramu kalcinisanog praha se jasno uočava bifazni sistem sa dominantnom fazom β -TCP i značajno većim stepenom kristaliničnosti.

Rendgenskom difrakcionom analizom makroporoznog nosača sinterovanog na maksimalnoj temperaturi od 1.430°C zaključeno je da su makroporozni nosači takodje dvofazni na bazi HAp/ β -TCP, što je prikazano na slici 1c. Utačnjavanjem strukture utvrđeno je da je 34,1% pripada HAp, dok je 65,9% β -TCP. Dopiranjem hidroksiapatita jonima magnezijuma obezbeđena je stabilnost β -TCP faze na izuzetno visokim temperaturama, pri čemu je izbegnuta fazna transformacija u α -TCP.

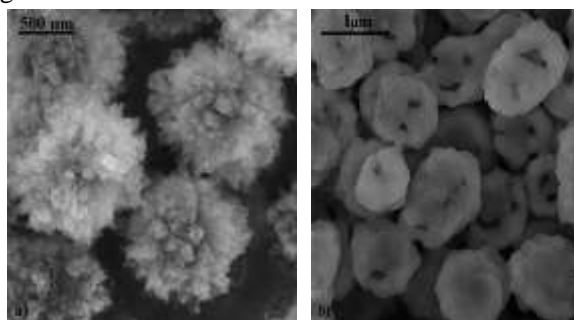
Fazna transformacija hidroksiapatita u β -TCP i α -TCP tokom sinterovanja u temperaturnom intervalu od 900 do 1.500°C se odvija zahvaljujući kalcijum deficitarnom odnosu Ca/P u hidroksiapatitu. Izbegavanjem fazne transformacije u α -TCP na temperaturi sinterovanja povećana je stabilnost hidroksiapatita kao osnovne mineralne faze kostiju i β -trikalcijum-fosfata kao bioaktivne faze koja ne utiče negativno na mehanička svojstva pri formiranju makroporoznih nosača [8, 9, 18].

3.2. Rezultati EDX analize – elementni sastav

Analizom elementnog sastava sintetisanog kalcijum-fosfatnog praha izvršenom energetsom disperzionom spektroskopijom procenjen je udeo dopanata u polaznom prahu. EDX metodom je potvrđen kalcijum deficitarni odnos Ca/P, a pokazano je da su u strukturi hidroksiapatita prisutni joni magnezijuma (0,34 at. %) i bakra (0,085 at. %). Joni cinka nisu detektovani EDX metodom, a uzrok može da bude koncentracija koja je ispod granice detekcije uređaja na kome su ispitivanja izvršena.

3.3. SEM analiza prahova i sinterovanih makroporoznih nosača

Mikrografija dopiranog kalcijum-fosfatnog praha sintetisanog hidrotermalnom metodom prikazanog na slici 2a pokazuje da su štapičaste nanočestice sferično aglomerisane.

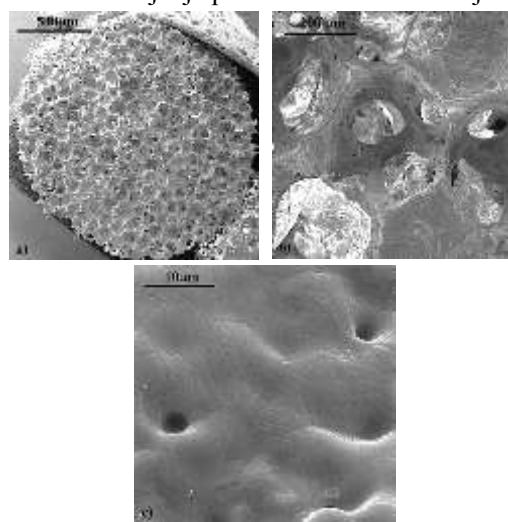


Slika 2 - Mikrografija kalcijum-fosfatnih prahova: a) sintetisanog praha, b) kalcinisanog praha

Nakon termičkog tretmana praha na 1.000°C tokom 2 h primetne su promene u morfologiji. Na slici 2b uočava se zrnasta nanostruktura čestica čiji se oblik i dalje može aproksimirati sferama, ovog puta nešto manjih dimenzija u poređenju sa sintetisanim aglomeratima sačinjenim od štapičastih nanočestica.

Na slici 3 prikazana je mikrostruktura makroporoznog nosača sinterovanog na 1.430°C. Na mikrografiji 3a uočava se pravilna makroporozna struktura sa porama veličine oko 200 μ m, koje bi u *in vivo* uslovima bile dovoljne da omoguće proliferaciju ćelija i vaskularizaciju novoformiranog koštanog tkiva.

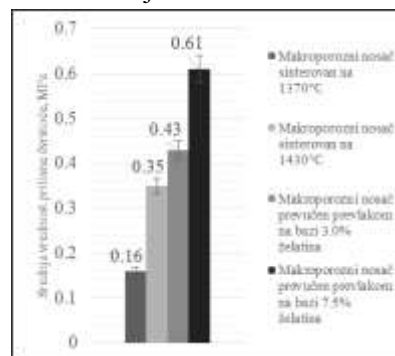
Na slici 3b se vidi međusobna povezanost formiranih makropora, čime je omogućen nesmetan protok telesne tečnosti kroz nosač. Sinterovana zrnasta struktura prikazana na slici 3c ukazuje na dobru densifikaciju vratova, ali otkriva i prisutne pore koje mogu da utiču na smanjenje pritiska čvrstoće materijala.



Slika 3 - Mikrostruktura sinterovanih makroporoznih nosača

3.4. Rezultati ispitivanja mehaničke karakterizacije

Mehanička svojstva biokeramičkih materijala koji čine osnovu i formiraju kontrolisanu zapreminu za formiranje novog koštanog tkiva treba da budu što je moguće bolja, kako bi dobijena tkivna struktura imala slična mehanička svojstva čvrstoći biološke kosti [19].



Slika 4 - Pritisna čvrstoća makroporoznih nosača

U ovom radu ispitivan je uticaj formiranih prevlaka želatina na pritisnu čvrstoću makroporoznih nosača, a rezultati su prikazani na slici 4. Prikazane su srednje vrednosti tri merenja pritisne čvrstoće makroporoznih nosača sinterovanih na 1.370°C i 1.430°C kao i nosača prevučeni prevlakama na bazi 3% i 7,5% želatina.

Makroporozni nosač sinterovan na temperaturi od 1.430°C je imao veće vrednosti pritisne čvrstoće u odnosu na makroporozni nosač sinterovan na 1.370°C. Razlog tome je što su dobra mehanička svojstva uslovljena velikom densifikacijom, koja je ispostavilo se bila manja u slučaju bifaznih sistema na nižim temperaturama [8]. Za dalja ispitivanja koršćeni su uzorci sinterovani na 1.430°C. Makroporozni nosači prevučeni polimernim prevlakama na bazi 3% i 7,5% želatina imali su veće vrednost pritisne čvrstoće 0,43 MPa i 0,61 MPa, tim redom. Vrednost pritisne čvrstoće makroporoznih nosača prevučeni polimerom na bazi 7,5% želatina je značajno veća u odnosu na incijalne makroporozne nosače. Uzrok tome je veliki modul elastičnosti želatina koji povećava otpornost skafolda prilikom loma [16], ali i popunjavanje mikropukotina polimernim slojem, koje su nastale usled nesavršenosti procesa sinterovanja.

3.5. Rezultati antimikrobne aktivnosti

Nakon što je kvantativno određen broj kolonija i izračunata srednja vrednost (SV_r), procenat inhibicije rasta (PIR) mikroorganizama je prikazan u tabeli 4.

Tabela 4. Procenat inhibicije rasta mikroorganizama:

	S. aureus		E. coli	
	SV _r , N/ml	PIR, %	SV _r , N/ml	PIR, %
Kontrola	2,3·10 ⁷		1,1·10 ⁸	
Uzorak	3,5·10 ⁷	-	8,5·10 ⁷	23

U ovom istraživanju je detektovana slabija antimikrobna aktivnost i to samo prema bakteriji *Escherichia coli*. Osim visokog početnog broja ćelija i relativno male rastvorljivosti visokotemperaturne β-trikalcijum-fosfatne faze, jedan od mogućih razloga dobijenih rezultata leži u razlici u građi ćelijskog zida između gram-pozitivnih i gram-negativnih bakterija. Naime, kod gram-pozitivnih bakterija poput *S. aureus*, ćelijski zid je deblji i sadrži murein, lipoteihoičnu kiselinu i mukoproteine, što može povećati otpornost na testirani uzorak [20]. Prema nekim izvorima, *S. aureus* može razviti dodatne mehanizme za zaštitu od toksičnog dejstva jona bakra [21].

Antimikrobni efekat jona bakra zasniva se na formiranju veze sa aminima, amidima i disulfidnim mostovima proteina i enzima prisutnih kod bakterija, što

uzrokuje oštećenja DNA i RNA, što rezultira inhibicijom reprodukcije bakterija ili njihove smrti. Osim toga, makrofagi takođe koriste antibakterijska svojstva jona bakra kako bi poboljšali svoju sposobnost inaktivacije mikroorganizama [20]. Sa druge strane, pretpostavlja se da antibakterijska aktivnost jona magnezijuma podrazumeva adsorpciju jona magnezijuma koji ometaju replikaciju DNK, proizvodnju ATP, pri čemu takođe mogu izazvati formiranje reaktivnih vrsta kiseonika i na taj način oštetiti ćelijske membrane [21].

4. ZAKLJUČAK

Makroporozni nosači pravilne strukture dobijeni su sinterovanjem na 1.430°C metodom replike sunđera, polazeći od multidopiranog nanočestičnog kalcijum-fosfatnog praha. Kalcinacijom multi-dopiranog kalijum-fosfatnog praha došlo je do promena u morfologiji koje su opisane kao prelazak iz štapičaste u zrnastu strukturu čestica. Joni magnezijuma ugrađeni u strukturu kalcijum-fosfata hidrotermalnom metodom, uticali su na stabilizaciju β-TCP faze tokom kalcinacije praha i kasnije sinterovanja makroporoznih nosača.

Formirana prevlaka na bazi želatina uticala je na značajno poboljšanje mehaničkih svojstava makroporoznih nosača bazi kalcijum-fosfata. Sinergetskim delovanjem jona dopanata obezbeđuje se antimikrobna aktivnost makroporoznih nosača prema bakteriji *E.coli*. Na osnovu definisanih svojstava može se zaključiti da dobijeni makroporozni nosači imaju potencijal za primenu u biomedicini i inženjerstvu koštanog tkiva.

5. ZAHVALNICA

Ova istraživanja su podržana od strane Ministarstva nauke, tehnološkog razvoja i inovacija Republike Srbije (br. 451-03-47/2023-01/200135).

LITERATURA

- [1] Nayak A. Hydroxyapatite synthesis methodologies: An overview, *International journal of Chemtech research*, Vol. 2, No. 2, pp. 903-907, 2010.
- [2] Parkers J, Lakes RS. Biomaterials an introduction, Springer, New York, 2007.
- [3] Ibrahim M, Labaki M, Giraudon J, Lamonier J. Hydroxyapatite, a multifunctional material for air, water and soil pollution control: A review, *Journal of Hazardous Materials*, Vol. 383, pp. 121139, 2020.
- [4] Predoi D, Iconaru S, Predio M, Stan G, Buton N. Synthesis, characterization, and antimicrobial activity of magnesium-doped hydroxyapatite suspensions, *Nanomaterials*, Vol. 9, No. 9, 1295, 2019.

- [5] Veljović Đ, Matić T, Stamenić T, Kojić V, Dimitrijević-Branković S, Lukić M, Jevtić S, Radovanović Ž, Petrović R, Janačković Đ. Mg/Cu co-substituted hydroxyapatite-biocompatibility, mechanical properties and antimicrobial activity, *Ceramics International*, Vol. 45, No. 17, pp. 22029–22039, 2019.
- [6] Vranceanu DM, Ionescu I. C, Ungureanu E, Cojocaru M. O, Vladescu A, Cotrut C. M. Magnesium Doped Hydroxyapatite-Based Coatings Obtained by Pulsed Galvanostatic Electrochemical Deposition with Adjustable Electrochemical Behavior, *Coatings*, Vol. 10, No. 8, pp. 727, 2020.
- [7] Iconaru SL, Pedroi MV, Motelica-Heino M, Predoi D, Buton N, Megier C, Stan GE. Dextran-Thyme Magnesium-Doped Hydroxyapatite Composite Antimicrobial Coatings, *Coatings*, Vol. 10, No. 1, pp. 57, 2020.
- [8] Veljović Đ. Bioeramički materijali na bazi kalcijum-fosfata: procesiranje, svojstva, primena, Tehnološko-metalurški fakultet, Beograd, 2020.
- [9] Matić T, Ležaja Zebić M, Miletić V, Cvijović-Alagić I, Petrović R, Janačković Đ, Veljović Đ. Sr, Mg codoping of calcium hydroxyapatite: Hydrothermal synthesis, processing, characterization and possible application as dentin substitutes, *Ceramics International*, Vol. 48, No. 8, pp. 11155–11165, 2022.
- [10] Shi H, Zhou Z, Li W, Fan Y, Li Z, Wei J. Hydroxyapatite Based Materials for Bone Tissue Engineering: A Brief and Comprehensive Introduction, *Cryostals*, Vol. 11, No. 2, pp. 149, 2021.
- [11] Cacciotti I, Bianco A, Lombardi M, Montanaro L. Mg-substituted hydroxyapatite nanopowders: Synthesis, thermal stability and sintering behaviour, *Journal of the European Ceramic Society*, Vol. 29, No. 14, pp. 2969–2978, 2009.
- [12] Radovanović Ž, Veljović Đ, Jokić B, Dimitrijević S, Bogdanović G, Kojić V, Petrović R, Janačković Đ. Biocompatibility and antimicrobial activity of zinc(II)-doped hydroxyapatite, synthesized by a hydrothermal method, *Journal of the Serbian Chemical Society*, Vol. 77, No. 12, pp. 1787–1798, 2012.
- [13] Chi W, Zou J, Ai J. F, Lin Y, Li W, Cao C, Yang K, Zhou K. Research of Cu-Doped Hydroxyapatite Microbeads Fabricated by Pneumatic Extrusion Printing, *Materials*, Vol. 12, No. 11, pp. 1769, 2019.
- [14] Bikuna-Izagirre M, Aldazabal J, Paredes J. Gelatin Blends Enhance Performance of Electrospun Polymeric Scaffolds in Comparison to Coating Protocols, *Polymers*, Vol. 14, No. 7, pp. 1311, 2022.
- [15] Ugrinović V, Milutinović M, Božić B, Petrović R, Janačković Đ, Panić V, Veljović Đ. Poly(methacrylic acid)/gelatin interpenetrating network hydrogels reinforced by nano-structured hydroxyapatite particles-improved drug delivery systems, *International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials*, doi.org/10.1080/00914037.2022.2164281, 2023.
- [16] Kim S. M, Yi S. A, Choi S. H, Kim K. M, Y. K. Lee Y. K. Gelatin-layered and multi-sized porous β -tricalcium phosphate for tissue engineering scaffold, *Nanoscale Research Letters*, Vol. 7, No. 1, pp. 78, 2012.
- [17] Ugrinović V, Panić V, Veljović Đ, Spasojević P, Šešelja S, Janačković Đ. Uticaj neutralizacije na svojstva poroznih hidrogelova nabazi hidroksiapatita i poli(metakrilne kiseline) sintetisanih slobodnoradikalnom polimerizacijom, *Tehnika*, Vol. 73, No. 5, pp. 613-619, 2018.
- [18] Fadeev I. V, Shvorneva LI, Barinov SM, Orlovskii V. P. Synthesis and Structure of Magnesium-Substituted Hydroxyapatite, *Inorganic Materials*, Vol. 39, No. 9, pp. 947–950, 2003.
- [19] Katundi D, Bayraktar E, Gatamorta F, Miskioglu I. Design of Hydroxyapatite/Magnetite (HAP/Fe₃O₄) Based Composites Reinforced with ZnO and MgO for Biomedical Applications, *Biomedical Journal of Scientific & Technical Research*, Vol. 21, No. 4, pp. 16113-16121, 2019.
- [20] Kolmas J, Groszyk E, Kwiatkowska-Różycka D. Substituted Hydroxyapatites with Antibacterial Properties, *BioMed Research International*, Vol. 2014, No. 2, pp. 178123, 2014.
- [21] Udhayakumar G, Muthukumarasamy N, Velauthapillai D, Santhosh S. B, Asokan V. Magnesium incorporated hydroxyapatite nanoparticles: Preparation, characterization, antibacterial and larvicidal activity, *Arabian Journal of Chemistry*, Vol. 11, No. 5, pp. 645-654, 2018

SUMMARY

PROCESSING AND PROPERTIES OF SCAFFOLDS BASED ON CALCIUM PHOSPHATE DOPED WITH MAGNESIUM, COPPER AND ZINC-IONS COATED WITH GELATIN

*The main goal of this study was to examine the possibility for obtaining macroporous scaffolds with defined properties based on calcium phosphate doped with magnesium, copper and zinc ions, coated with gelatin, which would potentially provide controlled conditions for the formation of new bone tissue after implantation. As a first, multi-doped nanoparticles of hydroxyapatite (HAp), which represents the main component of the inorganic part of bone tissue, was synthesized by autoclaving the precursor solution obtained at a Ca/P molar ratio of 1.52. Calcium in the initial solution was partially replaced by ions of magnesium (5 mol.%), copper (0.4 mol.%) and zinc (0.4 mol.%). Obtained powder was further calcinated, the changes in the morphology of the powders during calcination at 1000 °C were reflected in the transition of spherically agglomerated needle-like nanoparticles of the multi-doped hydroxyapatite powder to a spherical grained morphology. Macroporous bioceramic structures were obtained using the sponge replica method, green macroporous samples made of calcinated multi-doped powder, polyvinyl alcohol and water were sintered at 1.370°C and 1.430°C. X-ray diffraction analysis determined that the presence of magnesium in the structure of hydroxyapatite favors the phase transformation of HAp into β -tricalcium-phosphate (β -TCP), which contributed to the formation of the biphasic HAp/ β -TCP system during the calcination of the powders, but also during the sintering of macroporous beads. Examination of the antimicrobial activity of the obtained macroporous supports against *E. coli* showed a more effective degree of inhibition compared to *S. aureus*. A significant increase in the compressive strength of sintered macroporous scaffolds was obtained after the formation of coating based on 7.5% gelatin solution.*

Key Words: *macroporosity, calcium phosphate, doping, gelatin, mechanical properties*