



Sveučilište u Zagrebu

**PRIRODOSLOVNO-MATEMATIČKI FAKULTET**

**Kemijski odsjek**

Poslijediplomski sveučilišni studij Kemija

Suzana Inkret

**BIOKERAMIKE ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA KAO  
NOVI SMJER U INŽENJERSTVU KOŠTANOG TKIVA**

**Kemijski seminar I**

Prema radu: Zhao, C.; Weiye, L.; Zhu, M.; Wu, C. i Zhu, Y.: Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review. *Bioactive Materials* **18** (2022) 383 – 398.

Zagreb, 2023.



## **SADRŽAJ**

<b>1.UVOD .....</b>	<b>1</b>
<b>2.BIOKERAMIKE ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA .....</b>	<b>2</b>
<b>3.SINTEZA I KARAKTERIZACIJA BIOKERAMIČKIH OKOSNICA .....</b>	<b>4</b>
<b>3.1.Načini sinteze biokeramičkih okosnica .....</b>	<b>4</b>
<b>3.2.Karakterizacija biokeramičkih okosnica .....</b>	<b>7</b>
<b>4.ZAKLJUČAK .....</b>	<b>9</b>
<b>5.LITERATURA .....</b>	<b>10</b>

## 1.UVOD

Moderan način života i produljeno trajanje životnog vijeka utječu na sve učestaliju pojavu ozljeda i bolesti čvrstih tkiva kao što su tumori, urođene abnormalnosti i osteoartritis. Navedeno značajno smanjuje kvalitetu života ljudi radi čega se traže što bolja rješenja i tretmani [1,2]. Uobičajeno liječenje bolesti čvrstog tkiva uključuje implantaciju koštanih graftova, obično od metalnih ili kompozitnih materijala. Implantacija, iako jedan od najkorištenijih tretmana, ima svoje nedostatke koji uključuju čestu pojavu infekcije i do dvije godine nakon same operacije. Tijekom liječenja navedenih infekcija obično se poseže za uporabom velikih količina antibiotika ili ponovnim operativnim zahvatom. Obje opcije sa sobom nose velike rizike, prekomjerno korištenje antibiotika može uzrokovati rezistenciju kod bakterija, dok je rizik infekcije pri ponovljenoj implantaciji veći nego kod prvotne operacije [3].

U novije vrijeme se razvoj implant materijala antimikrobnih svojstava, koji omogućuju lokalnu dostavu terapeutika, navodi kao alternativa tradicionalnim terapijama. Među njima posebnu pažnju privlače biokeramike zbog svoje izuzetne biokompatibilnosti, osteoinduktivnosti i osteokonduktivnosti. Najviše se koriste hidroksiapatit,  $\beta$ -trikalcijev fosfat, akermanit te bioaktivna stakla [4–8]. Trodimenzionalne porozne strukture vrlo su značajne jer mogu mehanički održavati svoju strukturu, istovremeno ne utječu na rast i razvoj okolnih stanica te omogućuju normalan transport metabolita. 3D biokeramike, usprkos vrlo dobrim biološkim svojstvima, imaju jednake nedostatke kao i postojeći materijali za koštane implantate. Navedeno je razlog istraživanja antibakterijskih biokeramičkih 3D okosnica (engl. *scaffold*) koji bi posve uklonili ili značajno smanjili vjerojatnost pojave infekcije nakon implantacije. Navedene okosnice mogu biti pripremljene kao kombinacija biokeramičkih materijala te antibakterijskih agensa, kao što su: antibiotici, ioni antibakterijskih svojstava ili biokeramike antibakterijskih svojstava [1].

## 2. BIOKERAMIKE ANTIBAKTERIJSKIH SVOJSTAVA

Biokeramički materijali uglavnom nemaju antimikrobna svojstva, pa ih je potrebno funkcionalizirati kako bi se spriječile infekcije nastale nakon implantacije. Pojava infekcija obično uključuje nastanak biofilma na implantatu što otežava djelovanje imunološkog sustava te sistematično primijenjenih antibiotika čime se odgađa i regeneracija koštanog tkiva.

Kao potencijalno rješenje istražuju se biokeramike koje u sebi sadrži antibiotike koji tako ciljano i lokalno djeluju na izvor infekcije. S obzirom na to da do pojave infekcije može doći i mjesecima, pa čak i godinama, nakon ugradnje implantata, važno je da materijal može kontrolirano i kontinuirano otpuštati antibiotik. Obično se to postiže prevlačenjem ili vezanjem antibiotika na biokompatibilne polimere, prevlačenje nanoniti ili stvaranje višeslojne strukture koja omogućuje postepeno otpuštanje. Jedan od načina kontrole otpuštanja antibiotika ilustriraju Mg-Ca-TiO<sub>2</sub> 3D okosnice s doksiciklinom, gdje se otpuštanje antibakterijske tvari kontrolira koncentracijom doksiciklina unutar biokeramičke okosnice te karakteristikama pora. Osim toga moguće je 3D-bioprintanjem pripremiti kompozit biokeramika i biopolimera gdje se otpuštanje antibiotika kontrolira polimerom [9]. Postoji mogućnost nanošenja organske prevlake na površinu implanta koje sadrže antibiotik, kao npr. prevlačenje TiO<sub>2</sub> površina s poli(laktičnom-ko-glikolnom) kiselinom koja sadrži aminoglikozidni antibiotik. Navedena 3D okosnica omogućuje naglo prvotno otpuštanje antibiotika nakon čega slijedi dugo ustaljeno otpuštanje. Takav način pripreme ima svoj antibakterijski doseg gdje nakon nekog vremena koncentracije antibiotika unutar okosnice te ona u mikrookolini dolaze u ravnotežu te on prestaje imati učinak. Glavni problem, kojim se bavi većina znanstvenika tijekom pripreme biokeramika s antibioticima, je kako strogo kontrolirati otpuštanje lijeka te samim dizajnom biokeramika poboljšati njihova antibakterijska svojstva [1].

Biokeramike dopirane ionima antibakterijskog djelovanja imaju navedeni učinak prilikom spore i kontrolirane razgradnje okosnice koja omogućuje održavanje antibakterijskog učinka kroz duže vrijeme. Većina dopiranih biokeramičkih sklopova prilikom razgradnje otpušta ione u mikrookolinu što lokalno mijenja pH te onemogućuje rast acidofilnih bakterija [10]. Iako u teoriji mogu inhibirati rast bakterija, nisu ih sposobni uništiti osobito ako se radi o već nastalom biofilmu. Zbog toga se uvode razni ioni koji imaju sposobnost ubijanja bakterija poput Ag<sup>+</sup>, Zn<sup>+</sup>, Cu<sup>2+</sup>, La<sup>3+</sup>, itd. Takvi ioni obično imaju sposobnost promjene pH i osmotskog tlaka što uzrokuje depolarizaciju

membrane bakterija i posljedično njihovu smrt. Biokeramike se mogu funkcionalizirati navedenim ionima dopiranjem, ugrađivanjem ili prevlačenjem u obliku oksida, iona ili nanočestica. Postoji nekoliko uvjeta prilikom odabira vrste tvari koja će se ugraditi ili kojom će se prevlačiti keramika. Neki od njih su; navedena tvar mora biti biokompatibilna s normalnim stanicama, letalna za bakterija i ne smije utjecati na osteogenezu okosnice. Ioni antibakterijskog djelovanja obično ne ispunjavaju sva tri zahtjeva. Navedeno je razlog za modificiranje i ispitivanja utjecaja različitih oblika u kojima dolaze ioni kako bi se njihovo štetno djelovanje maskiralo i smanjilo [1].

Biokeramike mogu imati antibakterijsko djelovanje, obično radi nekog fizikalnog svojstva poput površinskog naboja ili strukture površine. Promjena mikrookoline biokeramike, koja uzrokuje smrt bakterija, također može biti izazvana vanjskim čimbenicima kao što su svjetlo, magnetsko polje ili ultrazvuk. Takve biokeramike, iako naslovno imaju samostalno djelovanje, sintetizirane su kao kompoziti, no ne dolazi do otpuštanja tvari ili iona iz strukture. Navedeno je razlog da se za pripremu takvih biokeramika koriste dvije vrste materijala, jedan dobrih mehaničkih i strukturnih svojstava te drugi antibakterijskog djelovanja [1].

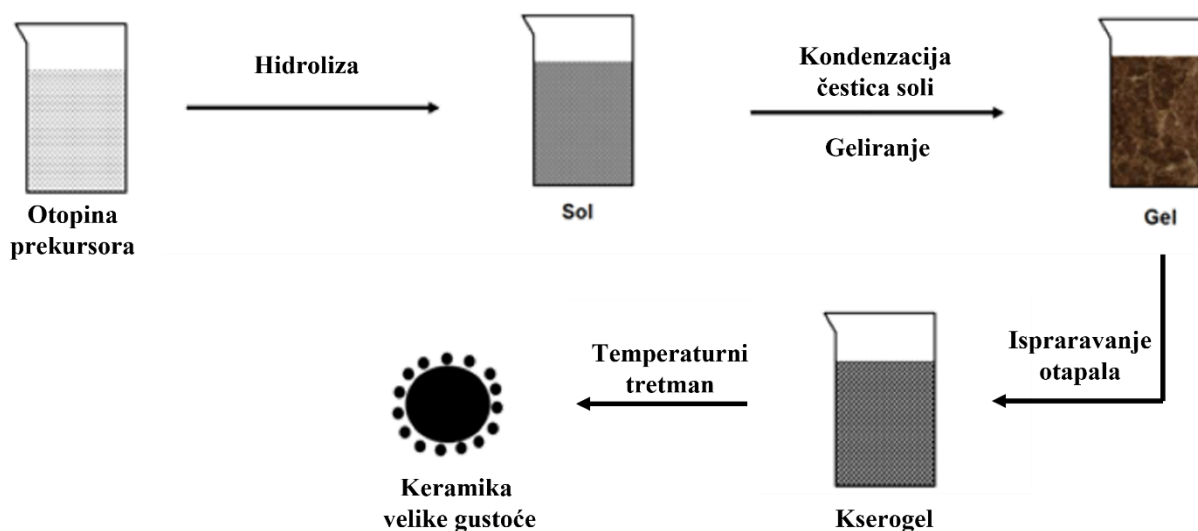
Nadalje, moguće je sintetizirati biokeramike na temelju fizikalnog termalnog efekta koji omogućuje materijalima specifičnih fizikalnih svojstava poput apsorpcije energije svjetla ili zvuka. Navedena energija uzrokuje vibracije rešetke, generiranje termalne energije te povišenje temperature što omogućuje selektivno antibakterijsko djelovanje. Takvo svojstvo imaju grafenski derivati, ugljikove nanotube te neki metalni nanokompoziti, poput bakrovog ili molibdenovog sulfida [1]. Navedeni materijali često se koriste prilikom pripreme biokeramika kako bi se na taj način postiglo antimikrobno djelovanje.

Biokeramike antibakterijskih svojstava temeljene na jednom antibakterijskom agensu funkcioniraju vrlo dobro, no pokazalo se kako jedna antibakterijska strategija obično nije dovoljna za pojedine primjene. Iz tog razloga istražuju se biokeramike nekoliko načina antibakterijskog djelovanja, kao što su kombiniranje dvaju ili više antibiotika, kombinacija iona antimikrobnog djelovanja s antibioticima te kombinacija polimera s antibakterijskim djelovanjem i antibiotika [1].

### 3.SINTEZA I KARAKTERIZACIJA BIOKERAMIČKIH OKOSNICA

#### 3.1.Načini sinteze biokeramičkih okosnica

Jedan od načina pripreme biokeramičkih materijala je sol-gel metoda, koja se temelji na jednostavnom otapanju pojedinih reaktanata u vodi u prisutnosti katalizatora. Tom metodom pripremljena je  $\text{SiO}_2\text{-CaO-Na}_2\text{O-P}_2\text{O}_5$  staklena biokeramika [11] pri čemu su prekursori otopljeni u vodi, a dobivena otopina gelirana pomoću otopine amonijaka. Tako dobiven gel je nakon 24 sata posušen u peći kako bi se dobio prah koji je zatim zagrijavan na različitim temperaturama za uklanjanje viška katalizatora nitrata. Prekristalizacijom pri različitim temperaturama mogu se dobiti keramike različitog sastava te različitih stabilnosti i svojstava. Tako na primjer prah dobiven zagrijavanjem do  $300\text{ }^\circ\text{C}$  još sadrži ostatke nitrata, dok se zagrijavanjem od  $300 - 700\text{ }^\circ\text{C}$  dobiva stabilnija forma natrijevog kalcijevog silikata. Prekristalizacijom iznad  $700\text{ }^\circ\text{C}$  staklena keramika kristalizira u drugom kristalnom sustavu [11]. Navedeno govori kako naizgled jednostavna sinteza može dati puno različitih produkata ako se odvija u nekontroliranim uvjetima.

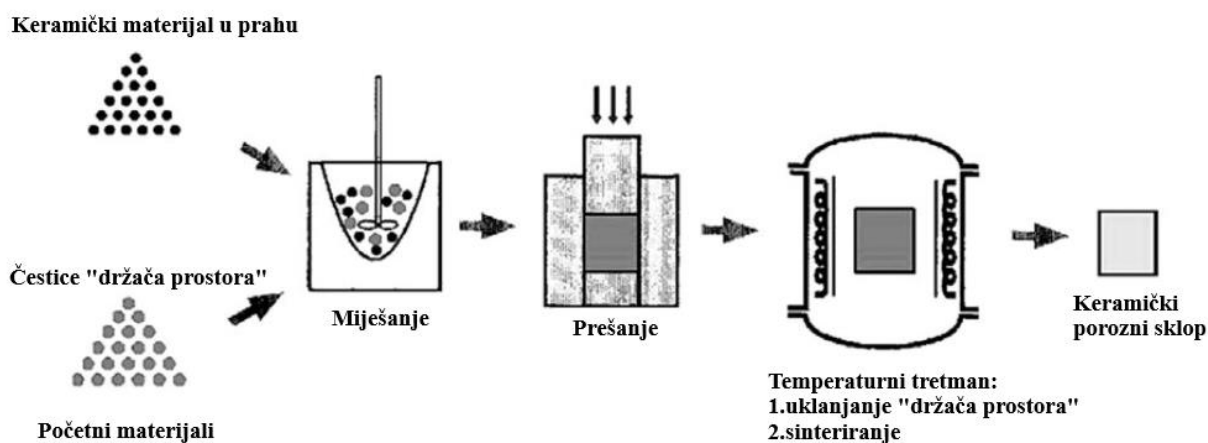


**Slika 1.** Shematski prikaz sol-gel metoda pripreme keramika [12].

S obzirom na to da se biokeramičke okosnice sintetiziraju kao implantati/materijali za regeneraciju kosti, njihova sinteza mora biti zelena, odnosno bez korištenja agresivnih kemikalija i ekstremnih uvjeta u smislu jako kiselog/bazičnog pH, ekstremnog tlaka i temperature. Većina uvjeta se može

zadovoljiti, ali su ekstremne temperature obično potrebne za postizanje materijala željenih svojstava. Tako se za dobivanje biokompatibilnog fosterita, otapaju prekursori magnezija i silikata u etanolu, nakon čega se dobivena otopina zrači u modificiranoj mikrovalnoj pećnici. Dobiveni prah se zagrijava do 800 °C kako bi se dobio fosterit velike kristaliničnosti [13].

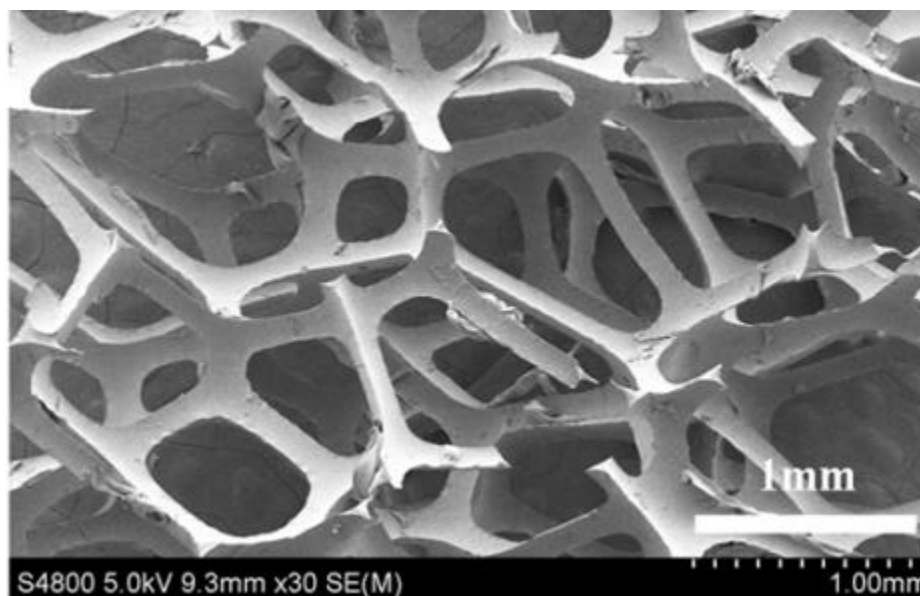
Najstarija metoda pripreve poroznih struktura je sinteriranje praha. Na taj način dobiva se porozna struktura pri čemu šupljine nastaju na mjestu gdje kontakt čestica praha nije bio potpun. Veličina i oblik tako dobivenih šupljina ovisi u potpunosti o veličini i obliku čestica praha. Na taj način moguće je dobivanje strukture s do 35 % poroznosti. Kako bi se dobile poroznije strukture, čak do 80 %, koristi se slična, modificirana metoda: metoda držača razmaka kojom se dobivaju 3D okosnice s porama kontrolirane veličine i oblika. Navedeni postupak uključuje korištenje praha početnog materijala od kojeg se pravi okosnica te čestica koje će se koristiti kao “držači prostora” (Slika 2.). Navedeni materijali potom se miješaju, prešaju i zagrijavaju tako da se uklone čestice koje služe kao držači prostora i kako bi se dobila čvrsta, ali porozna struktura. Držači prostora obično su materijali poput karbamida, saharoze, natrijeva klorida, koji se zagrijavanjem ili tijekom sinteriranja mogu ukloniti iz strukture [14]. Opisana metoda omogućuje pripremu keramičkog dijela biokeramičke okosnice koji samostalno često nema antibakterijsko djelovanje. Tako pripremljenim keramikama najčešće se dodaju antibiotici. Jedan od načina je uranjanje poroznih biokeramičkih sklopova u otopinu antibiotika 24 sata, nakon čega se suše [15].



**Slika 2.** Shematski prikaz pripreve poroznih keramika metodom “držača prostora” [14].



Jedan od najkorištenijih metoda za sintezu poroznog bioaktivnog stakla, jako sličnog kostima, je replikacija metodom spužve. Metoda je opisana na sljedećem primjeru pripreme antibakterijske okosnice biostakla sa srebrom. Priprema se suspenzija bioaktivnog silikatnog stakla i vezivnog spoja te  $\text{AgNO}_3$  kao izvorom srebra. U dobivenu homogenu suspenziju uranjaju se porozni kuboidi poliuretanske spužve (Slika 3.) nakon čega se ona preša radi uklanjanja viška materijala. Postupak se ponavlja nekoliko puta pri čemu se u zadnjem koraku dodaje impregnacija. Tako dobiveni uzorci suše se preko noći nakon čega slijedi zagrijavanje pri temperaturi  $1000\text{ }^\circ\text{C}$  kako bi se spalila polimerna matrica i sinterirale anorganske čestice [16]. Kako bi navedena stakla dobila antibakterijska svojstva potrebno je dodati antibakterijski agens. Jedna od mogućnosti je prevlačenje sklopa hidrogelom na način da alginat (najčešći sastojak hidrogela) veže metalne ione antibakterijskog djelovanja, što je u ovom slučaju srebro [16,17].



**Slika 3.** SEM mikrografija poliuretanske spužve korištene za replikaciju metodom spužvom [18].

Jedan od primjera biokeramika sa samostalnim antibakterijskim djelovanjem je sklop kitozan/zolderonska kiselina/nano-hidroksiapatit. U toj okosnici hidroksiapatit služi kao mehanički potporni materijal, koji je uz to biokompatibilan, dok kitozan i zolderonska kiselina

imaju antibakterijsko i antitumorsko djelovanje. Navedena okosnica pripremljena je *in situ* taloženjem u kiselom mediju, nakon čega je uslijedilo smrzavanje pri temperaturi  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  te sušenje radi uklanjanja viška tekućine. Dobivena okosnica ispirana je kako bi se postigao pH 7 [19]. Navedena sinteza relativno je jednostavna što je vrlo važno za potencijalnu kasniju primjenu.

Osim navedenih tehnika sinteze najnovija metoda koja se koristi je 3D printanje biokeramika. 3D printanje odnosi se na niz tehnoloških procesa koji se koriste za pripremu dijelova čitavog konačnog materijala odnosno sklopa. 3D modeli digitalno se režu u 2D slojeve koji se printaju i slažu. Ovo je puno jednostavniji način dobivanja vrlo kompleksnih i preciznih struktura u odnosu na priprema sklopova pomoću kalupa ili uređaja za obradu. Početni materijali obično su prahovi, suspenzije ili krutine pa ovisno o početnom materijalu razlikuje se tehnika kojom se dobiva konačni sklop. Za suspenzije je tako moguće koristiti fotopolimerizaciju ili ekstrudiranje, dok se za prah koristi selektivno lasersko sinteriranje te selektivno lasersko taljenje [20].

### ***3.2. Karakterizacija biokeramičkih okosnica***

Nove materijale važno je u potpunosti okarakterizirati kako bi njihova primjena bila preciznija i lakša. Ovisno o svojstvu materijala koje se pokušava odrediti, postoje nekoliko vrsta metoda karakterizacije. U prvom koraku, uobičajeno se koristi rentgenska strukturna analiza. Osim nje važni su Fourier transformirana infracrvena spektroskopija (FTIR), termogravimetrijska analiza (TGA), određivanje specifične površine (BET), elektronska paramagnetska rezonancija (EPR) i druge specifičnije analize. Za vizualizacije uzoraka se koriste pretražna (SEM) i transmisivna (TEM) elektronska mikroskopija, koje također mogu dati informaciju o sastavu ili strukturi uzorka pomoću energetske disperzivne spektroskopije u slučaju SEM-a te difrakcije elektronskih zraka na uzorku u slučaju TEM-a.

Poznato je da difrakcija rentgenskog zračenja daje različite informacije o strukturi analiziranog uzorka pri čemu je najvažnija informacija o kristalnoj strukturi. Pa ipak, ta metoda nije dovoljna za potpunu karakterizaciju nosintetiziranih materijala. Iz difraktograma može se odrediti razlika između kristalnih, slabo kristalnih i amorfnih uzoraka. Ali na primjer nije moguće odrediti postoji li uređenost kratkog dometa unutar amornog uzorka, odnosno postoji li razlika u kvazi-kristalnim nanostrukturama unutar dva amorfna uzorka, pri čemu kristalne nanostrukture ne označuju kristale nanovelicina, već samo uređenost molekula kratkog dometa unutar amornog

uzorka. Iznimka od pravila je snimanje difraktograma na sinkrotronu, što nije uvijek lako dostupno [21].

Pored difrakcije rentgenskog zračenja, koristi se elektronska difrakcija na transmisivskom elektronskom mikroskopu. Takva difrakcija može se koristiti za određivanje kristalne strukture uzorka, no podešavanje uvjeta i parametara za navedenu svrhu je komplicirano. Do difrakcije elektrona dolazi pri prolasku kroz tanak sloj materijala što daje difrakcijsku sliku. Ako je u pitanju monokristal, dobivaju se difrakcijski maksimumi u obliku točaka, dok u slučaju polikristalnog ili amorfno uzorka nastaju difrakcijski maksimumi u obliku prstenova. Pored toga, važno je za napomenuti da se tom metodom može snimati difrakcija iz nekoliko upadnih kutova što omogućuje određivanje pune trodimenzionalne strukture kristala. Metoda se koristi se za određivanje difrakcijske slike tankih materijala obično izoliranih iz suspenzija s obzirom na to da je za TEM dovoljna 1 kap uzorka [22].

FTIR daje informaciju o vibracijama funkcionalnih skupina što je relevantno ako uzorak ima spojeve s kovalentnom vezom, kakva jest većina navedenih biokeramika. Navedena metoda jeftina je od prije navedenih te može dobro prepoznati slaganja u strukturi kratkog dosega. S druge strane, nedostatak joj je slaba rezolucija vrpca. Kako bi se razlikovale različite forme istog materijala koristi se matematička manipulacija FTIR spektara, prva i druga derivacija. One omogućuju detaljniju analizu razlika u spektrima u odnosu na samu usporedbu nederiviranih spektara. Poznato je kako prva derivacija omogućuje točnije određivanje položaja vrpca, dok druga derivacija omogućuje točnije određivanje promjene oblika vrpca i pojava novih vrpca [23].

SEM i TEM su mikroskopske tehnike koje pomažu u vizualizaciji materijala. Pomoću njih određuje se topologija površine te morfologija uzorka, a uz to može se i mjeriti stvarna veličina čestica u uzorku. SEM može razlučivati, ovisno o instrumentu, uzorke veličine manje od 1 nm te s obziromna to da mikrografije imaju veliku dubinu polja, dobiva se 3D vizualizacija što je vrlo korisno za razumijevanje površinske strukture uzoraka. [22].

## 4.ZAKLJUČAK

Biokeramičke okosnice, obzirom da su biokompatibilne, biorazgradljive, osteoinduktivne te osteokonduktivne, često se koriste za regeneraciju kostiju. One daju mehaničku potporu te omogućuju migraciju stanica i prijenos nutrijenata.

Kako bi se odgovorilo na glavni problem implantacija, bakterijske infekcije, se biokeramike koje imaju antibakterijska svojstva. Istražuje se nekoliko načina funkcionaliziranja biokeramika: pomoću antibiotika, iona s antimikrobnim djelovanjem te korištenje biokeramike koje imaju fizikalno svojstvo koje posljedično daje antibakterijska svojstva sklopu. Navedeni smjerovi u sintezi biokeramika imaju svoje prednosti pri čemu je prvotno lokalno djelovanje antibakterijskog agensa, no i nedostatke kao što su stvaranje rezistencije na antibiotike ili toksično djelovanje metalnih iona. Iz navedenih razloga se istražuju biokeramike s antibakterijskim djelovanjem koje imaju ugrađeno nekoliko vrsta antibakterijskih agensa, pa tako mogu učinkovitije suzbijati i spriječavati infekcije.

Postoji mnogo metoda pripreme biokeramičkih materijala, od kojih je u posljednje vrijeme najkorištenija ona najnovija 3D-bioprintanje. Za uvođenje antibakterijskih agensa koriste se često jednostavne metode poput uranjanja ili prevlačenja otopinom ili suspenzijom antibakterijskog agensa. Na taj način omogućava se jednostavna priprava materijala, što je važno za komercijalnu primjenu.

## 5.LITERATURA

- [1] C. Zhao, W. Liu, M. Zhu, C. Wu, Y. Zhu, Bioceramic-based scaffolds with antibacterial function for bone tissue engineering: A review, *Bioactive Materials*. 18 (2022) 383–398. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2022.02.010>.
- [2] A. Klug, Y. Gramlich, M. Rudert, P. Drees, R. Hoffmann, M. Weißenberger, K.P. Kutzner, The projected volume of primary and revision total knee arthroplasty will place an immense burden on future health care systems over the next 30 years, *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc.* 29 (2021) 3287–3298. <https://doi.org/10.1007/s00167-020-06154-7>.
- [3] T.F. Moriarty, R. Kuehl, T. Coenye, W.-J. Metsmakers, M. Morgenstern, E.M. Schwarz, M. Riool, S.A.J. Zaat, N. Khana, S.L. Kates, R.G. Richards, Orthopaedic device-related infection: current and future interventions for improved prevention and treatment, *EFORT Open Reviews*. 1 (2016) 89–99. <https://doi.org/10.1302/2058-5241.1.000037>.
- [4] D. Shekhawat, A. Singh, M.K. Banerjee, T. Singh, A. Patnaik, Bioceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties, *Ceramics International*. 47 (2021) 3013–3030. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.214>.
- [5] C. Feng, K. Zhang, R. He, G. Ding, M. Xia, X. Jin, C. Xie, Additive manufacturing of hydroxyapatite bioceramic scaffolds: Dispersion, digital light processing, sintering, mechanical properties, and biocompatibility, *J Adv Ceram.* 9 (2020) 360–373. <https://doi.org/10.1007/s40145-020-0375-8>.
- [6] H. Jodati, B. Yilmaz, Z. Evis, Calcium zirconium silicate (baghdadite) ceramic as a biomaterial, *Ceramics International*. 46 (2020) 21902–21909. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.105>.
- [7] S. Kargozar, F. Baino, S. Hamzehlou, R.G. Hill, M. Mozafari, Bioactive Glasses: Sprouting Angiogenesis in Tissue Engineering, *Trends in Biotechnology*. 36 (2018) 430–444. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.003>.
- [8] Y. Yao, W. Qin, B. Xing, N. Sha, T. Jiao, Z. Zhao, High performance hydroxyapatite ceramics and a triply periodic minimum surface structure fabricated by digital light processing 3D printing, *J Adv Ceram.* 10 (2021) 39–48. <https://doi.org/10.1007/s40145-020-0415-4>.
- [9] M. Wang, H. Li, Y. Yang, K. Yuan, F. Zhou, H. Liu, Q. Zhou, S. Yang, T. Tang, A 3D-bioprinted scaffold with doxycycline-controlled BMP2-expressing cells for inducing bone regeneration and inhibiting bacterial infection, *Bioactive Materials*. 6 (2021) 1318–1329. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2020.10.022>.
- [10] R. Choudhary, A. Chatterjee, S.K. Venkatraman, S. Koppala, J. Abraham, S. Swamiappan, Antibacterial forsterite (Mg<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>) scaffold: A promising bioceramic for load bearing applications, *Bioactive Materials*. 3 (2018) 218–224. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2018.03.003>.
- [11] M.S.K. Mubina, S. Shailajha, R. Sankaranarayanan, L. Saranya, In vitro bioactivity, mechanical behavior and antibacterial properties of mesoporous SiO<sub>2</sub>-CaO-Na<sub>2</sub>O-P<sub>2</sub>O<sub>5</sub> nano bioactive glass ceramics, *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*. 100 (2019) 103379. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2019.103379>.
- [12] T. Xue, S. Attarilar, S. Liu, J. Liu, X. Song, L. Li, B. Zhao, Y. Tang, Surface Modification Techniques of Titanium and its Alloys to Functionally Optimize Their Biomedical Properties: Thematic Review, *Front. Bioeng. Biotechnol.* 8 (2020) 603072. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2020.603072>.

- [13] M. Kheradmandfard, S.F. Kashani-Bozorg, A.H. Noori-Alfesharaki, A.Z. Kharazi, M. Kheradmandfard, N. Abutalebi, Ultra-fast, highly efficient and green synthesis of bioactive forsterite nanopowder via microwave irradiation, *Materials Science and Engineering: C*. 92 (2018) 236–244. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.06.026>.
- [14] B. Arifvianto, J. Zhou, Fabrication of Metallic Biomedical Scaffolds with the Space Holder Method: A Review, *Materials*. 7 (2014) 3588–3622. <https://doi.org/10.3390/ma7053588>.
- [15] H.R. Bakhsheshi-Rad, E. Hamzah, M.P. Staiger, G.J. Dias, Z. Hadisi, M. Saheban, M. Kashefian, Drug release, cytocompatibility, bioactivity, and antibacterial activity of doxycycline loaded Mg-Ca-TiO<sub>2</sub> composite scaffold, *Materials & Design*. 139 (2018) 212–221. <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2017.10.072>.
- [16] M. Miola, E. Verné, C. Vitale-Brovarone, F. Baino, Antibacterial Bioglass-Derived Scaffolds: Innovative Synthesis Approach and Characterization, *Int J Appl Glass Sci*. 7 (2016) 238–247. <https://doi.org/10.1111/ijag.12209>.
- [17] V. Mouriño, P. Newby, A.R. Boccaccini, Preparation and Characterization of Gallium Releasing 3-D Alginate Coated 45S5 Bioglass® Based Scaffolds for Bone Tissue Engineering, *Adv. Eng. Mater.* 12 (2010) B283–B291. <https://doi.org/10.1002/adem.200980078>.
- [18] C. Wang, H. Chen, X. Zhu, Z. Xiao, K. Zhang, X. Zhang, An improved polymeric sponge replication method for biomedical porous titanium scaffolds, *Materials Science and Engineering: C*. 70 (2017) 1192–1199. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2016.03.037>.
- [19] Y. Lu, M. Li, L. Li, S. Wei, X. Hu, X. Wang, G. Shan, Y. Zhang, H. Xia, Q. Yin, High-activity chitosan/nano hydroxyapatite/zoledronic acid scaffolds for simultaneous tumor inhibition, bone repair and infection eradication, *Materials Science and Engineering: C*. 82 (2018) 225–233. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.08.043>.
- [20] Z. Chen, Z. Li, J. Li, C. Liu, C. Lao, Y. Fu, C. Liu, Y. Li, P. Wang, Y. He, 3D printing of ceramics: A review, *Journal of the European Ceramic Society*. 39 (2019) 661–687. <https://doi.org/10.1016/j.jeurceramsoc.2018.11.013>.
- [21] G. Celotti, A. Tampieri, S. Sprio, E. Landi, L. Bertinetti, G. Martra, C. Ducati, Crystallinity in apatites: how can a truly disordered fraction be distinguished from nanosize crystalline domains?, *J Mater Sci: Mater Med*. 17 (2006) 1079–1087. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0534-7>.
- [22] V. Jokanović, Instrumentalne metode ključ razumevanja nanotehnologije i nanomedicine, Inženjerska akademija Srbije, Institut za nuklearne nauke Vinča, Beograd, 2014..pdf, (n.d.).
- [23] V. Uskoković, Visualizing different crystalline states during the infrared imaging of calcium phosphates, *Vibrational Spectroscopy*. 108 (2020) 103045. <https://doi.org/10.1016/j.vibspec.2020.103045>.