

УДК 611.018.4:616-003.9-07-085:546/.57-022.513.2

УКПП

№ держреєстрації № 0121U100471

Інв. №

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет (СумДУ)
40007, м. Суми, вул. Римського-Корсакова, 2
тел. (0542) 33-35-39 факс. (0542) 33-40-58
e-mail: info@sci.sumdu.edu.ua

ЗАТВЕРДЖУЮ
Проректор з наукової роботи
д-р фіз.-мат. наук, професор

_____ А.М. Черноус

**ЗВІТ
ПРО НАУКОВО-ДОСЛІДНУ РОБОТУ**

**СТАН МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН ПРИ ЗАСТОСУВАННІ НОВИХ
КОМПОЗИТІВ З НАНОЧАСТИНКАМИ Ag^+ ТА Cu^{2+}
(остаточний)**

Науковий керівник
проф., д.мед наук

Р.А. МОСКАЛЕНКО

2023

Рукопис закінчено 15 грудня 2023 р.

Результати роботи розглянуто науковою радою СумДУ, протокол № від _____ грудня 2023 р.

СПИСОК АВТОРІВ

Керівник НДР гол.наук. співроб., д.мед. наук	_____ (підпис) _____ (дата)	Р.А. Москаленко (реферат, вступ, розділи 1, 2, 3, 4, 5, висновки)
Відповідальний виконавець наук.співроб.	_____ (підпис) _____ (дата)	Є.В. Гусак (розділи 2, 3, 4)
Ст. наук співроб. к.мед.наук	_____ (підпис) _____ (дата)	Ю.В. Москаленко (розділ 1)
Мол.наук. співроб.	_____ (підпис) _____ (дата)	О.О. Коломієць (розділ 4)
Лаборант	_____ (підпис) _____ (дата)	Н.В. Казбан (розділ 2)
Мол.наук. співроб.	_____ (підпис) _____ (дата)	Р.А. Чижма (розділ 2)
Мол.наук. співроб.	_____ (підпис) _____ (дата)	А.П. Денисенко (розділ 1)
Лаборант	_____ (підпис) _____ (дата)	Т.Р. Савченко (розділ 1)
Н.с.	_____ (підпис) _____ (дата)	М.С. Скиданенко (розділ 2)

РЕФЕРАТ

Звіт про НДР: 115 с., 25 рис., 259 джерел.

ГІСТОЛОГІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ, КАЛЬЦИФІКАТИ, КЛІНІЧНІ ДОСЛІДЖЕННЯ, МІНЕРАЛІЗОВАНІ ТКАНИНИ, НАНОЧАСТИНКИ, СРІБЛО

Об'єкт дослідження – мінералізовані тканини.

Предмет досліджень – зміни метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з структурно-інтегрованими наночасточками срібла та міді.

Мета роботи – визначити особливості метаболізму мінералізованих тканин при використанні остеопластичних матеріалів з наночасточками міді та срібла.

Для досягнення поставленої мети були визначені такі завдання:

- Синтез наночасточок металів (Cu, Ag), в тому числі з використанням технології «зеленого синтезу» та вивчення їх фізико-хімічних характеристик (розміри, форма, розчинність, агрегація);
- Структурування остеопластичних матеріалів на основі кальцій-фосфатів новими наночасточками;
- Визначити особливості структурних та функціональних змін регенерату та кісткової тканини при імплантації остеопластичних матеріалів з наночастинками міді та срібла;
- Сформувати рекомендації щодо проведення клінічних досліджень остеопластичних матеріалів з наночастинками міді та срібла.

Методи дослідження - аналіз закордонних та вітчизняних джерел щодо складу наночастинок та властивостей іонів-ефекторів, гістологічне та гістохімічне дослідження (забарвлення гематоксилином та еозином), сканувальна електронна мікроскопія з мікроаналізом, рентгенівська дифракція мінералізованих тканин в нормі та патології.

ЗМІСТ

ВСТУП	5
1 СИНТЕТИЧНІ КАЛЬЦІЄВО-ФОСФАТНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ КІСТКОВОЇ ПЛАСТИКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ, АНАЛІЗ ПРОБЛЕМИ ТА ПЕРСПЕКТИВИ)	7
2 СИНТЕЗ, ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ (ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ 1 ЕТАПУ)	27
3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА У КОМПОЗИТІ З ГІДРОКСИАПАТИТОМ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНОГО ВПЛИВУ AgNPs (ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ 2 ЕТАПУ)	35
4 НОВИЙ БІОІНДУКТИВНИЙ НАНОМАТЕРІАЛ ДЛЯ КІСТКОВОГО ТРАНСПЛАНТУВАННЯ НА ОСНОВІ ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ НА/В-ТСР (ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ 3 ЕТАПУ)	56
5 ВИСНОВКИ	85
ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ	86

ВСТУП

Матеріали для остеопластики широко використовуються для лікування дефектів кісткової тканини після травм, пухлинних процесів та інших станів. Композитні матеріали на основі кальцію та фосфатів є особливо популярними через їх високу ефективність та властивості, враховуючи будову самої кісткової тканини. Останнім часом спостерігається зростання інфекційних ускладнень після операцій через поширення штамів мікроорганізмів, що стали резистентними до антибіотиків. Комбінація антибіотиків з остеопластичними матеріалами не виявила очевидних переваг у клінічних дослідженнях, тому потрібна розробка альтернативних стратегій. У той же час, наночастинки металів проявили високу ефективність проти резистентних штамів мікроорганізмів, але питання безпечного застосування ще залишається відкритим. Інші дослідження показали відсутність цитотоксичності деяких наночастинок міді та срібла на клітинних моделях, але вплив їх застосування на кісткову тканину залишається невивченим. Недавні дослідження виявили зміни в мінералізації тканин при використанні різних концентрацій наночастинок срібла та міді з остеопластичним кальцій-фосфатним матеріалом, і це дозволить визначити межі безпеки та рекомендації для клінічних досліджень.

У сфері травматології та ортопедії проблема інфекційних ускладнень та відторгнення osteoімплантів та ендопротезів вимагає докладного дослідження фундаментальних процесів ремінералізації та репарації кісткової тканини, її взаємодії з імплантами та ендопротезами. Це є критично важливим для практичної медицини, особливо в контексті зростання тривалості життя та старіння населення. Проблеми, пов'язані з переломами, складними травмами опорно-рухового апарату, особливо внаслідок військових подій, є актуальними для України та впливають на якість життя та соціально-економічний стан держави. Це призводить до підвищення потреби в ендопротезуванні, osteoімплантах та спеціальних цементних сумішах для

ортопедії. Супутня патологія, така як остеоартроз, цукровий діабет, ревматоїдний артрит, часто спричиняє запальні ускладнення та знижує ефективність лікування.

На світовому рівні розвиток механізмів стійкості патогенних мікроорганізмів до антибіотиків є проблемою. Це спонукало дослідників до пошуку нових протимікробних засобів. Використання наночастинок металів є ефективним методом боротьби з цими стійкими патогенами. Дослідження впливу нових композитів з наночастинками срібла та міді на мінералізацію тканин допоможе розробити передові матеріали для лікування складних травм опорно-рухового апарату людини.

1 СИНТЕТИЧНІ КАЛЬЦІЙ-ФОСФАТНІ МАТЕРІАЛИ ДЛЯ КІСТКОВОЇ ПЛАСТИКИ (ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ)

Регенеративна медицина фокусується на різних патологіях кісткової тканини [1]. З регенеративної точки зору кісткова структура — це васкуляризована сполучна тканина, яка має властиву здатність до ремоделювання у відповідь на зовнішні та внутрішні фактори під час росту та розвитку скелета, а також до регенерації після травм і патологічних станів. Ці процеси включають серію складних міжклітинних і внутрішньоклітинних біологічних взаємодій між різними типами клітин і молекулярними сигнальними шляхами [2]. Загоєння переломів кістки є однією з найпоширеніших форм регенерації в клінічних умовах [3,4]. Прикладом є значна втрата кісткової тканини в черепно-лицьовій області через такі фактори, як пухлини, травматичні ушкодження, захворювання пародонту, вроджені аномалії або резорбція внаслідок втрати зуба. У галузі ротової та щелепно-лицьової хірургії та ортопедії бувають випадки, коли кісткова регенерація потрібна у більшій кількості, що перевищує нормальну здатність до самовідновлення. Наприклад, при реконструкції великих дефектів скелета, таких як зубні імпланти, або коли вроджена здатність до регенерації порушена, як це спостерігається при остеопорозі, оптимізація процесу регенерації має вирішальне значення для підвищення ймовірності успіху лікування [5]. Для покращення загоєння кісткових дефектів кісткова пластика включає аутотрансплантати або алотрансплантати [6,7]. При цьому слід враховувати, що лікування аутотрансплантатом має обмеження, внаслідок відносно високого рівня захворюваності на місці донора та дефіцит доступних трансплантатів. Алотрансплантати мають інші недоліки, пов'язані з васкуляризацією та інтеграцією з кісткою-господарем [8]. Вирішенням є, біоінженерна кісткова тканина яка має потенціал до подолання цих проблем і недоліків [9].

Формування кісткової тканини відбувається шляхом диференціювання клітин-попередників остеогенезу або в мезенхімальні остеобласти, які синтезують безладно переплетену кістку, або в поверхневі остеобласти, які утворюють високовпорядковану пластинчасту кістку [10]. Недавні дослідження показують, що ендохондральне та внутрішньомембранозне окостеніння відбувається постнатально, зокрема під час регенерації скелета після травми [11]. Під час процесу загоєння кісткова тканина наслідує розвиток кісток плоду для досягнення повної регенерації без утворення фіброзного рубця [12]. У цей процес залучаються декілька типів тканин, у тому числі фіброзний мозоль, низькомінералізований хрящ і кісткова тканина [13,14]. Ці проміжні типи тканин забезпечують початкову механічну стабільність і з часом замінюються впорядкованою пластинчастою кісткою [14]. У той час як кістка має внутрішню здатність до регенерації та загоєння [4] і зазнає постійного ремоделювання [15], неповний або нерегулярний постнатальний остеогенез може мати місце у випадку великих кісткових дефектів. Порушення регенерації може бути спричинено значною травмою, резекцією пухлини, аномаліями скелета, інфекціями або системними розладами, такими як остеопороз [16].

Довгоочікуваною метою інженерії кісткової тканини є досягнення контрольованого, керованого та повного формування кістки. Аутологічні кісткові трансплантати широко використовуються в ортопедичній та щелепно-лицевій хірургії завдяки їхній чудовій гістосумісності, структурній підтримці та мінімальному ризику імуногенної відповіді [17]. Для повного та кращого розуміння функціональності біоматеріалів важливо коротко розглянути процеси репаративної регенерації кісткової тканини. Першою стадією є утворення гематоми. Клітини крові накопичуються в місці пошкодження, запобігаючи подальшій кровотечі. Цьому ж сприяє звуження кровоносних судин. Накопичені клітини крові і фібриноген плазми формують гематому через кілька годин. Гематома є джерелом різних факторів росту, ініціюючи подальші регенеративні процеси. Хоча ця опосередкована гематомою стимуляція є

корисною, в умовах утворення грануляційної тканини гематома займає вільний простір і перешкоджає кровообігу, що призводить до уповільнення процесу регенерації. Згодом тромб зменшується і піддається протеолізу перед тим, як епітелій проникне в нього [18].

Лікування значних за площею кісткових дефектів залишається серйозною медичною проблемою. Тому імплантація біоматеріалів вважається важливим підходом до сприяння відновленню кістки, хоча її ефективність все ще викликає проблеми [19–22]. Процеси загоєння кісткової тканини включають ранню імунну регуляцію запалення, ангіогенез, остеогенну диференціацію та фізико-хімічні та механічні властивості, пов'язані з формуванням кістки [4,16,23–28]. При використанні біоматеріалів часто ігнорується регуляторна роль імунної системи в опосередкованому біоматеріалом мікрооточенні кістки, що може призвести до небажаних ефектів відновлення [29]. Імплантація в організм біоматеріалів може викликати запальну відповідь за рахунок взаємодії матеріалу з імунними клітинами. Терапевтичні результати залежать від типу залучених клітин і тривалості відповіді [30]. Тому неконтрольована запальна реакція може викликати порушення гомеостазу кісток, що призведе до сповільненого загоєння рани і регенерації кісток в цілому. Біоматеріали зі сприятливим протизапальним імунним мікрооточенням можуть посилити диференціювання кісткових клітин, стимулювати формування кровоносних судин і забезпечити успішну довготривалу імплантацію [31,32]. Регенерація скелетної тканини, досягнута шляхом поєднання попередньо вирощених клітин і факторів росту з відповідним каркасом, є багатообіцяючим підходом. Однак синтетичні замінники кісткового трансплантата з притаманними остеоіндуктивними властивостями можуть запропонувати більш комплексне рішення даної проблеми [33]. У наш час в якості матриць слугує широкий спектр біоматеріалів. Проте основними проблемами є, такі як збільшення тривалості операції, обмежена доступність і ризик захворюваності донорської

ділянки [34]. Ці обмеження сприяли розробці синтетичних замінників кісткового трансплантата [16].

Біосумісні матеріали можна розділити на метали, біоскло, кераміку та композити, які служать стабільною заміною для різних клінічних застосувань, таких як щелепно-лицева хірургія, імплантологія, нейрохірургічна реконструкція черепа та ортопедична хірургія [12, 35–37]. Вони зазвичай використовуються у формі скаффолдів (наприклад, безцементна протезна фіксація, гвинти, фіксуючі пластини), внутрішньокісткової аугментації (наприклад, цементопластика, алотрансплантат), мембран для керованої кісткової регенерації та інших матеріалів [38].

Таким чином, дефекти кісток, викликані різними факторами, можуть мати значний вплив на якість життя пацієнта [39,40]. Синтетичні кісткові матеріали мають такі важливі характеристики, як адгезія білків, деградація *in-vivo* та остеопровідність [41]. Індукція остеоіндуктивності може бути досягнута шляхом створення макропористого тривимірного середовища [42]. Кілька видів біокераміки зазвичай використовуються для загоєння кісткових дефектів і регенерації кісткової тканини завдяки їх чудовій біосумісності, остеопровідності та остеоіндуктивності. До них належать гідроксиапатит, β -трикальційфосфат, акерманіт і біоскло 45S5 [43–47].

Тривимірні (3D) пористі скаффолди відіграють вирішальну роль у відновленні дефектів кістки та інженерії кісткової тканини. Вони забезпечують механічну підтримку, підтримують форму та цілісність тканин, сприяють з'єднанню з навколишніми тканинами та спрямовують ріст тканин [48–50]. Пориста структура полегшує клітинну міграцію, ріст, транспортування поживних речовин і метаболітів, а також стимулює інтеграцію кістки та реваскуляризацію [51-53]. Крім того, деякі каркаси можуть вивільняти біологічно активні іони, які сприяють фізіологічній стимуляції клітин [51-53]. Таким чином, 3D-пористі каркаси є ключовими елементами в інженерії кісткової тканини. Для виготовлення каркасів на основі біокераміки застосовувалися різні технології на основі конкретних

характеристик і технічних вимог. До них відносяться шаблонний метод, сублімаційна сушка, метод спінювання, електроформування та 3D-друк [51-53].

Кісткова тканина складається з гідроксиапатиту (ГА) (69–80 %), колагену (17–20 мас. %) та інших речовин (води, білків тощо) [54]. Тому для заміщення кісткової тканини широко використовуються композиційні матеріали на основі біополімерів і фосфатів кальцію [55]. Також полімери природнього походження є хорошою заміною синтетичних полімерів. Їх хімічний склад імітує позаклітинний матрикс (ЕСМ); вони біологічно розсмоктуються, біосумісні, біологічно розкладаються та здатні адсорбувати біологічно активні молекули. Біополімерні композити для медичних застосувань повинні мати подібність до складної архітектури людського тіла та полімерних композитів. Окрім того, такі системи вивільнення ліків і біоактивних речовин з біополімерів повинні бути розроблені як багатофункціональні системи для підтримки функціональності біологічних молекул [56,57]. Існує близько 28 типів колагену, проте найпоширенішим типом, який зустрічається в ЕСМ сухожильних і кісткових тканин, є колаген І типу [58]. Гідроксиапатит відкладається між колагеном І типу в процесі біомінералізації кісткової тканини [59]. Тому за рахунок композиційних і структурних аналогій з природними кістками, композити колагену і ГА становлять особливий інтерес серед усіх видів замінників кісткової тканини [57,60].

Як вже було зазначено, матеріали на основі фосфатів кальцію широко використовуються для регенерації кісткової тканини завдяки їх схожому хімічному складу з мінеральним компонентом кісток. Клінічні дослідження підтвердили, що в процесі резорбції висококристалічний гідроксиапатит піддається більш повільній трансформації порівняно з високодисперсними матеріалами, такими як нанокристалічні фосфати кальцію. Основною відмінністю ГА у кісткових тканинах від синтетичного ГА є його

ультрадисперсна (нано) структура, де майже 25% атомів розташовані на поверхні кристаліту.

Ці поверхневі атоми впливають на хімічні і метаболічні процеси, що відбуваються на поверхні, а також в активації механізмів остеосинтезу. Отже, провідним фактором у досягненні структури ГА, яка дуже нагадує кісткову тканину людини, є створення наноструктурованого рельєфу поверхні та нанопористості на підкладці. Такий підхід полегшує осадження нанорозмірних кристалів ГА, надаючи унікальні фізико-хімічні властивості, які значно сприяють механізмам біоактивації [61].

Біомінералізація це природній шлях формування кальцій-фосфатної кераміки в твердих тканинах людського тіла. З точки зору біосумісності штучні матеріали з фосфатів кальцію повинні мати оптимальні хімічні та фізіологічні властивості. Однак біологічні фосфати кальцію демонструють важливі характеристики, такі як погана кристалічність, високий ступінь заміщення елементів у композиції та дуже маленькі кристаліти, які часто знаходяться в тісному контакті з білковою матрицею [62].

Кальцій-фосфатні композити підвищують біоактивність, механічну міцність, еластичність, ієрархічну структуру та пористість [63–65]. Однак отримання матеріалів, які за своїм складом, структурою, кристалічністю, морфологією та біологічними властивостями схожі на природні тканини, є складним завданням для дослідників. Нанорозмірний низькокристалічний гідроксиапатит, отриманий за допомогою вологого хімічного осадження, має схожість за хімічним складом і розміром частинок з біологічним апатитом, але не містить істотних іонів заміщення, таких як Na^+ , K^+ , Mg^{2+} і Cl^- , і демонструє високу реакційну здатність [66].

Важливо зазначити, що не всі сполуки фосфату кальцію мають біомедичне застосування. Багато синтетичних фосфатів кальцію не зустрічаються в природі в біологічних системах. У скелетних структурах вони знаходяться переважно у вигляді слабо кристалізованого кальційдефіцитного апатиту апатиту. Наприклад сполуки з іонним

співвідношенням $\text{Ca/P} < 1$ непридатні для імплантації через високу розчинність і кислотність. Так само ТТСП (тетракальцій фосфат) не підходить для медичного використання через його основну природу. Однак за умови правильного поєднання та включення інших фосфатів і хімічних речовин навіть ці сполуки можна успішно використовувати в медицині.

При використанні кальцій-фосфатних матеріалів слід враховувати їх хімічний склад, кристалічні властивості та наявність катіонних або аніонних заміщень у решітці апатиту. Ці всі аспекти впливають на ступінь розчинності фаз цих матеріалів. [67–69]. Наприклад, при порівнянні розчинності СаР матеріалів в ацетатному буфері порядок розчинності такий: кістка > емаль > β -ТСП > ГА. β -ТСП демонструє більш швидке розчинення, ніж ГА у фізіологічних розчинах. На розчинність кераміки СаР також впливають такі фактори, як пористість і розмір частинок. Вища пористість збільшує площу поверхні в контакті з рідиною, що призводить до пришвидшення розчинення [70]. Таким чином, гідроксиapatит, або гідроксиapatит з дефіцитом кальцію, є найбільш часто використовуваним фосфатом кальцію для регенерації кісткової тканини. Брушит і октакальційфосфат також присутні в організмі людини. Вони складають зубний камінь та сприяють патологічній кальцифікації, а також служать проміжними сполуками під час відкладення більш термодинамічно стабільного ГА під час мінералізації кісткової тканини. Брушит, або дигідрофосфат кальцію, може існувати як проміжна фаза під час осадження ГК і мінералізації кісткової тканини [60]. Прикладом використання кальцій-фосфатних матеріалів з брушитом ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) є перевірки резорбтивної активності *in-vivo* [71–73].

Отже, синтетичні кісткові трансплантати активно досліджуються як альтернатива аутологічним і алогенним кістковим трансплантатам. Вони усувають необхідність повторної хірургічної процедури та мінімізують потенційні ускладнення на місці донора. Такі синтетичні кісткові трансплантати потребують вдосконалення та розробки ідеального матеріалу для заміни кістки.

The Diamond concept [74,75] передбачає, що для безперешкодного загоєння перелому необхідні наступні важливі параметри: остеогенні клітини, остеокондуктивний каркас, фактори росту та стабільне механічне середовище. Згодом васкуляризація у місці дефекту була визнана важливим фактором для процесу загоєння перелому [76]. Тому ідеальний матеріал для кісткового трансплантата повинен відповідати цим критеріям. У цьому відношенні особливо привабливою є біокераміка. Біокераміку можна класифікувати на біоінертну (наприклад, оксид алюмінію або діоксид цирконію) і біоактивну/біорезорбційну. Біокераміка на основі фосфату кальцію, біокераміка на основі сульфату кальцію та біоактивне скло на основі діоксиду кремнію є одними з широко вивчених біоактивних/біорезорбуючих біокерамік. Khabraken та ін. [77] окреслив характеристики ідеального біокерамічного матеріалу для інженерії кісткової тканини наступним чином:

1. Біорозкладаний для підтримки ремоделювання кісток;
2. Макропориста структура для полегшення проростання тканин;
3. Механічно стабільний і простий у використанні;
4. Остеопровідність, що спрямовує ріст кістки навколо та всередині матеріалу;
5. Підходить для використання як носій факторів росту або клітин.

Отже, синтетичні біоматеріали для використовують відновлення кісткової тканини завдяки їх біологічній ефективності, яка характеризується біосумісністю, біоактивністю та остеокондуктивними властивостями [78]. Такі замінники CaP сприяють прикріпленню, проліферації, міграції та фенотиповій експресії клітин кісткової тканини, що призводить до утворення нової кістки в прямому контакті з біоматеріалом [79]. CaP матеріали для зазвичай доступні у вигляді гранул, блоків і, останнім часом, цементу.

Серед CaP матеріалів популярними є кальцієво-фосфатні цементи (КФЦ) є особливо привабливими для клінічного використання завдяки їх ін'єкційній здатності та формуванню, що забезпечує мінімально інвазивне

застосування та оптимальне заповнення кісткових дефектів неправильної форми [80,81].

Навпаки, коли для імплантації використовуються гранули або блоки, вони зазвичай змішуються з рідиною (наприклад, кров'ю), що призводить до неоптимального контакту між кісткою та імплантатом. Крім того, блоки не можуть бути встановлені за допомогою мінімально інвазивної хірургії, і їх розмір потрібно відкоригувати відповідно до дефекту шляхом різання, формування або свердління.

У процедурах регенерації кісток із застосуванням КФЦ перевага надається повній деградації та заміні КФЦ новою кістковою тканиною. Однак, як згадувалося раніше, здатність до біологічного розкладання КФЦ є відносно низькою. В ідеалі швидкість біодеградації КФЦ повинна точно відповідати швидкості утворення нової кістки, щоб забезпечити поступове відновлення механічних властивостей у новоутвореній кістковій тканині.

Деградація КФЦ *in-vivo* може відбуватися за допомогою двох різних механізмів: 1) пасивна деградація через розчинення керамічної матриці в позаклітинній рідині та 2) активна деградація, опосередкована клітинною активністю, включаючи остеокласти, гігантські клітини та макрофаги. Швидкість пасивної деградації матеріалу передбачає розчинення матриксу в позаклітинній рідині та залежить від властивостей КФЦ, таких як площа поверхні, співвідношення кальцію до фосфату (Ca/P), кристалічність, розчинність, рН рідини організму. перфузія [82,83]. Попередні наукові дослідження [84,85] свідчать, що фізичне руйнування КФЦ, а саме втрата механічної цілісності, може призвести до йоноутворення і фрагментації частинок. З іншого боку, активна деградація КФЦ в основному відбувається під дією гігантських клітин та остеокластів, причому макрофаги також відіграють значну роль у фагоцитозі фрагментованих частинок [86–88]. Дослідження вказують, що макрофаги незабаром після імплантації колонізують поверхню КФЦ, що може відігравати вирішальну роль у біодеградації біоматеріалу [89]. Окрім того, частинки біоматеріалу, що

вивільняються з КФЦ, можуть взаємодіяти з імунними клітинами, викликаючи вивільнення медіаторів запалення [90]. Таким чином макрофаги, стикаючись з частинками фосфату кальцію, прикріплюються до них і активуються для фагоцитозу [83]. У той час як макрофаги мають провідне значення для фагоцитозу дрібних частинок і фрагментів, остеокласти головним чином відповідають за процеси активної біодеградації КФЦ. Остеокласти локально знижують рН поблизу біоматеріалу, що призводить до деградації КФЦ *in vivo* [91].

Пористість кальцій-фосфатних цементів сприяє їх деградації та різним корисним ефектам. Пори полегшують потік фізіологічних рідин, включаючи перфузію у випадку взаємопов'язаної пористості, а також сприяють міграції та проліферації остеобластів у ЦФК. Також пори відіграють роль васкуляризації та покращують стабільність інтерфейсу тканина-імплантат, завдяки більшій площі поверхні для проліферації клітин і регенерації тканин.

Оптимізація пористої структури кісткових замінників має вирішальне значення для ефективного регулювання клітинних реакцій у тканинній інженерії. Маленькі пори корисні для прикріплення клітин, але вони можуть обмежувати життєздатність клітин, проліферацію та диференціацію [92]. З іншого боку, високопористі біоматеріали з більшим розміром пор забезпечують кращу дифузію кисню, що може підвищити життєздатність клітин [93]. Біокераміка з градуйованими порами, особливо в діапазоні розмірів 500–800 мкм, продемонструвала значне покращення клітинної адгезії, підвищення життєздатності клітин і посилення експресії генів, пов'язаних з ангіогенезом, що узгоджується з результатами, опублікованими в літературі [94].

Пори в ЦФК матеріалах можна класифікувати за їх розміром як мікропори (ширина внутрішньої пори <1 мкм), мезопори (ширина внутрішньої пори 1–100 мкм) і макропори (ширина внутрішньої пори >100 мкм). Формування мікропористості в КФЦ пояснюється процесом затвердіння, коли кристали ростуть у голчасті або пластинчасті структури, створюючи

мікропористу структуру [95]. Показник мікропористості КФЦ може досягати 60%, що збільшує площу поверхні матеріалу, полегшує процеси проникнення рідини та сприяє адсорбції білка [97].

Розмір мікропор можна контролювати, за рахунок таких параметрів обробки, як розмір частинок порошкової фази та співвідношення кальцію до фосфату (Са/Р). Попередні дослідження показали, що зменшення розміру використаних частинок призводить до зменшення розмірів пор, а при низькому співвідношенні Са/Р розмір пор зменшується через зменшення простору між частинками в суміші [97]. Температурний режим спікання порошкової фази також впливає на показник мікропористості, причому використання більш високих температур призводить до зменшення мікропористості та зміни розміру кристалів [98,99]. З іншого боку, мезопори та макропори відносяться до розмірів пор, що перевищують 1 мкм і 100 мкм відповідно. Однак впровадження мезо- та макропористості в ЦФК потребує специфічних методів. Пори більші за розміром необхідні для міграції клітин, проліферації остеобластів і мезенхімальних клітин, а також сприяння вrostанню кісткової тканини.

Досліджено, що висока пористість і великі розміри пор посилюють проростання кісткової тканини в ЦФК. Дослідження, які порівнюють пористий і непористий гідроксиапатит, вказують, що остеогенез відбувається в пористих ЦФК, але не в твердих матеріалах [100]. Розмір пор 100 мкм зазвичай вважається достатнім для успішних регенеративних процесів, оскільки пори менші за розміром можуть призвести до вrostання немінералізованої кісткової або фіброзної тканини, перешкоджаючи проростанню кровоносних судин [101]. Також є дані, які підтверджують, що пори розміром понад 300 мкм також можуть сприяти остеогенезу, тоді як пори розміром менше 100 мкм, як було вказано, полегшують формування кістки або вrostання в синтетичні матеріали [102–106].

Іншим важливим аспектом пористості ЦФК є сполучення пор, як вони взаємопов'язані. Взаємопов'язані пори мають переваги перед «тупиковими»

порами, оскільки вони забезпечують ефективний потік рідини, і як наслідок міграцію клітин і розподілу їх у межах ЦФК. Наявність зв'язаних пір також сприяє утворенню кровоносних судин, які мають вирішальне значення для розвитку та ремоделювання нової кісткової тканини [107–109].

Отже, наявність пор у ЦФК, зокрема мікропор і взаємопов'язаної пористості, забезпечує потік рідини, міграції клітин, васкуляризації та сприяє вrostанню та регенерації кісткової тканини. Сьогодні продовжується дослідження оптимальних розмірів пор, ступеня пористості та сполученості пір, щоб розробити КФЦ, які ефективно підтримають процеси загоєння та відновлення кісткової тканини.

Пористість і взаємоз'єднання пір кальцій-фосфатних цементів можна оцінити за допомогою різних підходів, включаючи методи на основі зображень і фізичні методи. Методи аналізу зображень із використанням скануючої електронної мікроскопії (SEM) або мікрокомп'ютерної томографії (мікро-КТ) зазвичай використовуються для вимірювання пористості та розміру пор. SEM-зображення аналізуються за допомогою програмного забезпечення для кількісної оцінки пористості та визначення розміру пор [110,111]. Мікро-КТ-зображення дозволяє трансформувати 2D рентгенівські зображення в 3D-моделі, уможливлуючи вилучення кількісних морфологічних даних [112,113]. Тоді як фізичні методи оцінки пористості включають гравіметрію та ртутну порозиметрію. Гравіметрія передбачає обчислення ступеня загальної пористості шляхом порівняння щільності матеріалу, з якого складається ЦФК, з уявною щільністю самого ЦФК [114,115]. Ртутна інтрузійна порозиметрія — це техніка, при якій ртуть вводять у конструкції ЦФК під зростаючим тиском. Цей метод надає інформацію про відкриту та закрити пористість (об'єм проникнення ртуті в ЦФК), а також розмір пор (на основі зменшення радіуса пор, які можуть бути заповнені зі збільшенням тиску) [115–117].

Щоб посилити регенерацію кістки та вирішити обмежену деградацію ЦФК, стає необхідним зробити матеріал макропористим. Макропористість

можна отримати за допомогою різних методів, таких як використання піноутворювачів, методів швидкого створення прототипів або введення спінювачів. Також важливо враховувати, що хоча збільшення макропористості є вирішальним для регенерації кісткової тканини, воно може одночасно призвести до зниження механічних властивостей і змін маніпуляційних властивостей ЦФК. Тому необхідно досягти компромісу в дизайні макропористих ЦФК, щоб збалансувати макропористість для регенерації кісткової тканини з іншими важливими властивостями матеріалу. Це гарантує, що отримані ЦФК демонструють бажану поведінку при деградації, механічну стабільність і характеристики керування.

Спінення є простим методом створення макропористості в кальцієво-фосфатному цементі, і його можна досягти шляхом утворення внаслідок хімічної реакції. Учені розробили різні методи створення макропор у ЦФК за допомогою наступних хімічних реакцій. Almirall та ін. розробив методику з використанням розкладання перекису водню для введення кисневих макропор у цементну пасту α -ТСР. Завдяки контролю таких параметрів, як співвідношення Ca/P і концентрації перекису водню, вони досягли високих рівнів пористості до 66% [118]. Real та ін. використовували кислотну реакцію між NaH_2PO_4 і NaHCO_3 для створення бульбашок CO_2 в КФЦ. Цей підхід дозволив отримати пористість до 50% [117]. Наступні дослідження продемонстрували, що макропористі КФЦ проявили значно більше кісткоутворення порівняно з контрольними КФЦ без макропористості. Через 10 тижнів після імплантації козам, макропористі КФЦ були майже повністю деградовані, і спостерігалось утворення нової кістки, тоді як контрольні КФЦ залишалися незмінними [119]. Подібні позитивні результати спостерігалися на тваринних моделях, таких як щури [120] і кролики [121,122].

Інший метод включає введення бульбашок CO_2 в КФЦ за рахунок кислотно-основної реакції між NaHCO_3 і моногідратом лимонної кислоти ($\text{C}_6\text{H}_8\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Такий підхід дозволив отримати макропори розміром 100 мкм і макропористість до 21% [123]. Цей метод був успішно застосований у кількох

дослідженнях, включаючи створення преваскуляризованих ЦФК через сокультивування ендотеліальних клітин і остеобластів, які мають потенційне застосування в регенерації кісткової тканини [124,125]. Ці дослідження демонструють ефективність методів спінування у створенні макропористих ЦФК, і результуюча макропористість показала багатообіцяючі результати у сприянні формуванню кісток і регенерації тканин на різних моделях тварин.

Іншим підходом до створення спінених кальцій-фосфатних цементів є введення поверхнево-активних речовин. Поверхнево-активні речовини можуть бути як природними, такими як альбумін або желатин, так і синтетичними, такими як полісорбати. Синтетичні поверхнево-активні речовини, зокрема, були ретельно вивчені, і було показано, що вони дають високопористі ЦФК з рівнем пористості близько 70%, виявляючи остеокондуктивні та остеоіндуктивні властивості [126–130].

Для усунення недоліків процедури нарощування кісткової тканини, були розроблені ін'єкційні кісткові цементи, які приділяють все більшу увагу завдяки їх мінімально інвазивному застосуванню. Кальцій-фосфатні композити особливо відомі своєю здатністю до самовирівнювання *in-vivo*, що робить їх перевагами для мінімально інвазивної хірургії [131–133]. У 1983 році дослідження Брауна та Чоу призвели до розробки нової ін'єкційної форми СаР, яка включала тетракальцій фосфат, дикальцій фосфат дигідрат, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ і безводний дикальцій фосфат (CaHPO_4) [134]. Ці розроблені матеріали продемонстрували такі властивості, як здатність до самозатвердіння, хороша здатність до ін'єкцій, формування, підвищена реактивність і висока придатність для розробки нових систем доставки ліків [133, 135].

Щоб покращити когезійність і здатність ін'єкційної кераміки з фосфату кальцію, науковці дослідили поєднання з полімерними розчинами та різними добавками. Як природні, так і синтетичні полімери були включені у вигляді рідкої фази в ін'єкційний ЦФК для покращення адгезії, здатності до ін'єкцій, часу схоплювання та механічних властивостей [136, 137–140].

Хітозан, природний амінополісахарид, використовується як добавка в рідкій фазі для модифікації фізичних властивостей ЦФК, таких як здатність до ін'єкцій, час застигання, одночасно підвищуючи біоактивність *in-vivo* [141]. Альгінат натрію, колаген, желатин, гіалуронова кислота та похідні целюлози, такі як гідроксипропілметилцелюлоза, метилцелюлоза та карбоксиметилцелюлоза, також використовувалися як рідкі фази для формування ЦФК [142–151]. Комбінація з біополімерами дозволяє регулювати когезійність, ін'єкційну здатність, механічні властивості та біоактивність отриманого цементу.

Включення мікрочастинок полі(молочної гліколевої кислоти) у ЦФК показало утворення макропор *in-situ* та підвищення міцності цементу, що є корисним для реконструкції кістки [152]. Показано, що додавання лимонної кислоти як розріджувача покращує ін'єкційну здатність ЦФК [153]. Дослідження показали, що лимонна кислота також може збільшити час затвердіння ЦФК і міцність на стиск, залежно від концентрації добавки [137,138].

Інші спроби регулювання фізико-хімічних і біологічних властивостей ЦФК включають додавання гліцерину, карбонату стронцію, поліетиленгліколю, піноутворювачів і β -дикальцієвого силікату [154–158]. Ці комбінації та добавки сприяють покращенню продуктивності та функціональності ЦФК для інженерії та регенерації кісткової тканини.

В останні роки зростає інтерес до поєднання кальцій-фосфатних цементів з біоактивними стеклами (БС) для покращення їхніх властивостей. Біоактивне скло, таке як 45S5 Bioglass®, відоме з 1969 року і складається з оксиду кремнію (SiO_2), оксиду кальцію (CaO), оксиду фосфору (P_2O_5) і оксиду натрію (Na_2O) [159,160]. БС може хімічно зв'язуватися з кісткою, сприяючи росту кісток. Склад БС можна варіювати для створення різних варіантів, регулюючи базове співвідношення $\text{SiO}_2\text{-CaO-P}_2\text{O}_5\text{-Na}_2\text{O}$ [159].

Коли БС контактує з кістковою тканиною, воно вивільняє іони кремнію зі своєї поверхні. Ці іони утворюють шар силікагелю з подальшим осадженням

аморфного фосфату кальцію і наступним утворенням шару гідроксиапатиту. Цей шар ГА активує міграцію клітин і сприяє утворенню нової кістки, полегшуючи інтеграцію ГА з материнською кістковою тканиною [161]. Висока щільність силанольних груп (Si-OH) на шарі кремнезему створює негативно заряджену поверхню, яка відіграє вирішальну роль у індукуванні зародження ГА [160].

Встановлено, що продукти розчинення БС стимулюють експресію генів у клітинах остеобластів, додатково сприяючи формуванню кісток [162,163]. Крім того, останні дослідження показали, що БС мають ангіогенні властивості, сприяючи утворенню нових кровоносних судин [164]. БС також продемонстрували антибактеріальну та протизапальну дію як *in-vitro*, так і *in-vivo*, що робить їх цінними для різних застосувань у інженерії твердих тканин [166,167]. БС можна використовувати окремо або як неорганічну фазу в композитах або гібридних матеріалах, що сприяє їх широкому використанню в галузі інженерії кісткової тканини [162]. Поєднання ЦФК з БС забезпечує перспективний підхід до розробки біоактивних і функціональних матеріалів для регенерації та відновлення кісток.

Біологічна активність біоактивних стекел була широко вивчена, зосереджуючись на впливі пористості та питомої площі поверхні на їх ефективність. Коли БС вступає в контакт з фізіологічними рідинами, відбувається початкове вивільнення іонів, що може призвести до значного підвищення рН. Цей підвищений рівень рН може бути шкідливим для навколишніх клітин і тканин [168]. Однак кінцевий рН можна контролювати шляхом включення інших іонів у БС, тим самим змінюючи швидкість вивільнення та концентрацію іонів у розчині. Мікроелементи, такі як стронцій (Sr), цинк (Zn), мідь (Cu) або кобальт (Co), які в природі присутні в організмі людини, відомі своїм сприятливим впливом на процеси регенерації кісткової тканини. Включення цих іонів у ЦФК та БС може модулювати їхню поведінку щодо розчинення у фізіологічних рідинах та покращувати біологічні властивості матеріалів [169,170].

Щоб усунути обмеження як кальцій-фосфатних цементів, так і БС, а також покращити їхні властивості *in-vitro* та *in-vivo*, були спроби їх синергічного поєднання. Спробу об'єднання ЦФК і БС було досліджено у формі композитних матеріалів, з характеристикою їх фізико-хімічних та остеогенних властивостей. Беллуччі та ін. та Karadjian та ін. зробили комплексний огляд літературних даних про композити з КФЦ та БС, висвітлюючи їхні характеристики та потенційні застосування [171,172]. Однак, наскільки відомо, не було організовано попереднього систематичного огляду, де б конкретно було обговорення включення БС у ін'єкційний кістковий цемент ЦФК. Подальші дослідження в цій галузі були б цінними для розуміння синергетичних ефектів і потенційних застосувань цих композитних матеріалів.

Рентгеноконтрастність є важливою характеристикою, яку слід враховувати при розробці біоматеріалів для регенерації кістки, оскільки вона дозволяє візуалізувати матеріал під час і після операції. Це забезпечує правильне розміщення біоматеріалу на місці дефекту та дозволяє легко виявляти та контролювати будь-які потенційні проблеми чи збої під час подальшого спостереження. Хоча кальцієво-фосфатні цементи мають певний рівень внутрішньої рентгеноконтрастності, їх може бути недостатньо для точного рентгеноскопічного контролю або відрізнення біоматеріалу від навколишньої кістки під час операції [173]. Було проведено декілька систематичних досліджень для оцінки рентгеноконтрастності ін'єкційних КФЦ. Ці дослідження підкреслили важливість дослідження рентгеноконтрастності ін'єкційного кісткового цементу [174–177]. На додаток до рентгеноконтрастності, інші властивості, такі як механічні властивості, профіль деградації та пористість, є важливими параметрами для вивчення композитів КФЦ. Механічні властивості КФЦ, які зазвичай оцінюють при стисненні, можна порівняти з трабекулярною кісткою (4–12 МПа). Деякі конкретні композиції КФЦ мають конкретні характеристики: з апатитом міцність на стиск становить до 80 МПа і до 52 МПа для КФЦ з брушиту [178].

Однак притаманна крихкість для КФЦ все ще обмежує їх клінічне використання з додатками.

Для покращення механічних властивостей КФЦ досліджувалися різні підходи, і однією з таких спроб є зміна пористості цементу. Важливо ретельно розглянути зменшення пористості, оскільки це може впливати на біологічні властивості КФЦ, включаючи швидкість розкладання *in-vitro* та *in-vivo*. Швидкість деградації матеріалу повинна відповідати етапам та швидкості регенерації кісткової тканини. Тому при виборі матеріалу вкрай важливо досягти балансу між бажаними механічними властивостями, внутрішньою структурою та швидкістю деградації для ефективного задоволення клінічних потреб.

Вплив кальцієво-фосфатних цементів на регенерацію та ріст кісткової тканини було широко вивчено, підкреслюючи певні проблеми, пов'язані зі швидкістю резорбції. Проблемами можуть бути як повільні, так і швидкі темпи резорбції. Повільна швидкість резорбції може перешкоджати остеоінтеграції, в той час пришвидшена резорбція може призвести до вимивання фракцій КФЦ із місця дефекту.

Щоб вирішити проблему швидкого розсмоктування, були запропоновані комбінації різних фосфатів кальцію. Наприклад, швидкість резорбції трикальційфосфату можна контролювати за допомогою двофазних кальційфосфатних цементів, які сповільнюють процес резорбції. Різні композиції КФЦ можуть викликати різні біологічні реакції на основі таких факторів, як хімія КФЦ, кристалічність, стехіометрія, поведінка розчинення/осадження, хімічний склад поверхні та пористість. Хоча КФЦ демонструють хорошу остеопровідність, їх вплив на остеогенну диференціацію обмежений через їхню відносно низьку поверхневу реактивність. Дослідження *in-vitro* показали утворення поверхневого шару гідроксиapatиту в simulated body fluids (SBF) як індикатор «біологічної активності» матеріалів, що контактують з кістковою тканиною. Проте дослідження *in-vivo* з β -ТСР показали суперечливі результати щодо їх

здатності безпосередньо зв'язуватися з кісткою, незважаючи на утворення шару ГА у SBF.

Отже, біоактивне скло показує свою потенцію безпосереднього зв'язування з кістковою та навколишніми тканинами. Вони можуть служити альтернативою КФЦ. Нещодавно з'явилася комбінація БС з кальцієво-фосфатними цементами, завдяки чому підвищується здатність БС інтегруватись з кістками та тканинами. Загалом дослідження в цій галузі спрямовані досліджувати оптимізацію композицій КФЦ, швидкості резорбції та включення біоактивних стекол для підвищення біологічної активності та ефективності замінників кісткових трансплантатів.

Для розробки біоматеріалів важливо розуміти процеси прямого зв'язку між кальцієво-фосфатним цементом і кісткою, що відбувається через утворення шару, подібного до ГА, на поверхні матеріалу. Початкові етапи цього процесу включають швидкий іонний обмін, де іони натрію (Na^+) обмінюються іонами водню (H^+) і іонами гідроксонію (H_3O^+). Після цього відбувається реакція поліконденсації поверхневих силанолів, що призводить до утворення шару силікагелю з великою площею поверхні. Згодом на поверхні відбувається зародження і кристалізація шару гідроксикарбонатного апатиту. Утворений шар дуже нагадує мінеральну фазу кісткової тканини, уможливаючи проліферацію та диференціювання остеобластів у цьому шарі для формування позаклітинного матриксу. Таким чином, включення біологічно активних стекол у КФЦ є перспективним підходом до підтримки біоактивності як *in-vitro*, так і *in-vivo*.

Цікавим є порівняльне дослідження Campion et al. Вони продемонстрували, що силікат-заміщені ГА матеріали виявляють вищу біологічну активність порівняно з комерційно доступними β -ТСР замінниками кісткового трансплантата. Дослідження показало, що β -ТСР демонструє характеристики октакальційфосфату з меншою кількістю кристалів, утворених на його поверхні. Навпаки, силікатно-заміщені матеріали ГА мали товстий безперервний шар кристалів гідроксикарбонату апатиту, нанесений на

їхню поверхню. Крім того, однією з головних причин поєднання кальцій-фосфатних цементів з біоактивними стеклами є вивільнення іонів із БС, що може сприяти ангиогенезу (утворенню нових кровоносних судин) і остеогенній диференціації (диференціювання клітин у клітини, що утворюють кістку). Це додатково покращує біологічні властивості та ефективність композитного матеріалу.

Тканинні СаР каркаси можуть бути створені з використанням як синтетичних, так і природних полімерів. Синтетичні полімери пропонують такі переваги, як регульовані механічні властивості та контрольована швидкість деградації. Однак вони часто демонструють менше місць клітинної адгезії, нижчу біологічну активність і знижену біосумісність порівняно з природними полімерами. Природні полімери набули популярності в тканинній інженерії завдяки своїй доступності та схожості з компонентами природного позаклітинного матриксу, що міститься в сполучних тканинах. Природні каркаси на основі полімерів можуть бути отримані з білків, таких як шовк, желатин, колаген, фібрин і соя, або полісахаридів, таких як целюлоза, хітозан і альгінат. Ці природні полімери створюють сприятливе середовище для прикріплення, проліферації та диференціювання клітин, сприяючи процесам регенерації тканин.

Загалом вибір типу полімеру для тканинних каркасів залежить від конкретних вимог застосування, бажаних властивостей і сумісності з таргентною тканиною або органом. Дослідники продовжують досліджувати та оптимізувати матеріали каркасів і методи виготовлення, щоб підвищити їх ефективність у сприянні регенерації та відновлення тканин.

Примітка. Основою для розділу слугувала публікація учасників проекту Mishchenko, O.; Yanovska, A.; Kosinov, O.; Maksymov, D.; *Moskalenko, R.*; Ramanavicius, A.; Pogorielov, M. Synthetic Calcium–Phosphate Materials for Bone Grafting. *Polymers* 2023, 15, 3822. <https://doi.org/10.3390/polym15183822>

2 СИНТЕЗ, ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА ТА КІНЕТИКИ ВИХОДУ ІОНІВ (ОСНОВНІ РЕЗУЛЬТАТИ 1 ЕТАПУ)

2.1 Поліольний метод отримання наночастинок срібла

Спосіб синтезу наночастинок срібла був розроблений на базі модифікованого поліольного методу [Zhao T, 2010]. Послідовність дій викладена у протоколі синтезу наночастинок срібла. Всі вихідні реагенти повинні бути високої чистоти (не нижче рівня «чисті для аналізу»).

Протокол синтезу наночастинок срібла

1. Співвідношення вихідних реагентів наступне: на 10 мл етиленгліколю приходить 1,5 г полівінілпірролідону (ПВП). Зазначену суміш нагрівають на олійній бані до температури 160°C, поки розчин не стане світло-жовтим.

2. Паралельно готується інший розчин зі наступним співвідношенням: 10 мл етиленгліколю відповідають 0,17 г нітрату срібла. Отриманий розчин повільно, по краплях додається у нагрітий розчин ПВП в етиленгліколі (отриманий на попередньому етапі). Отриману суміш тримають при температурі 160°C впродовж 4 годин за умов перемішування.

3. Розчин срібла і ПВП у етиленгліколі поступово охолоджували до кімнатної температури та змішували з ацетоном у кількості, яка дозволяла випасти преципітату бурого кольору.

4. Бурий осад, який утворився, центрифугували при 8000 об/хв впродовж 30 хвилин.

5. Центрифугат промивали у чистому ацетоні тричі.

6. Утворені НЧ срібла висушували впродовж 5 год у вакуумній сушці при температурі 40°C.

7. Потім НЧ срібла розчиняли у бідистильованій воді та обробляли в ультразвуковій ванні (УЗДН-А, «СЕЛМІ», Україна) з частотою 22±1,65 кГц впродовж 1 хв.

8. Отриманий колоїд срібла фільтрували за допомогою мембрани зворотного осмосу (Osmotec M300-O) з тиском у діапазоні від 2,8 до 3 бар до отримання концентрації срібла 3 г/л.

2.2 Кінетика виходу іонів срібла з наночастинок та вплив ультразвуку на них

Вивільнення іонів залежить від різних факторів, таких як розмір наночастинок, стабілізація агентів і форма. Кінетика вивільнення іонів недостатньо добре описана і вимагала більш детального дослідження.

Є деякі дані, що вказують на залежність антимікробного впливу наночастинок на різні фактори (розмір, форму, склад середовища) та на здатність до утворення активних Ag^+ іонів у розчині [180]. Але, складно розрізнити частку AgNPs від Ag^+ через їх спільну присутність. Деякі автори [181] продемонстрували токсичність Ag^+ іонів порівняно з комерційно доступним AgNP ($35,4 \pm 5,1$ нм, покриті аморфним вуглецем). Це дослідження показало, що в анаеробних умовах AgNPs були в 20 разів менш токсичний для *E.coli*, ніж Ag^+ іони (EC_{50} : $2,04 \pm 0,07$ проти $0,10 \pm 0,01$ мг/л), однак токсичність AgNP зросла 2,3 рази після дії на повітрі протягом 0,5 год (EC_{50} : $0,87 \pm 0,03$ мг / L), що сприяло вивільненню Ag (+). Інші дослідження [182] демонструють, що мінімальна інгібуюча концентрація (МІК) і мінімальна бактерицидна концентрація (МБК) для AgNP є $1,406\text{--}5,625$ мкг/мл і $2,813\text{--}5,625$ мкг/мл для Ag (+), відповідно.

Стабільність наночастинок срібла забезпечується не тільки поліольними компонентами дисперсійного середовища, а також за досить високим вмістом AgNP в комерційних розчинах - від 3 до 5 г/л наночастинок. Такі розчини повинні бути перед використанням розведені водою і лише потім використані як антимікробний розчин. Однак при розведенні AgNP, а також під час їх подальшого зберігання, можливі процеси агрегації наночастинок та зміни структури дифузійного шару колоїда [183]. Процеси, пов'язані з укрупненням

наночастинок можуть призвести до зміни вмісту іонів срібла розчину і до зниження антибактеріального ефекту. Метою роботи було вивчення стабільності розведеного розчину наночастинок срібла при зберіганні, а також кінетика виділення іонів срібла.

А. Синтез і характеристика матеріалу

Початковий AgNP, виготовлений, як описано вище у протоколі. Реакцію проводили при інтенсивному перемішуванні протягом 4 годин. На наступному кроці отриманий колоїд срібла фільтрували за допомогою мембрани зворотного осмосу (Osmotec M300-O) з тиском у діапазоні від 2,8 до 3 бар до отримання концентрації срібла 3 г/л. Наночастинок використовували без додаткового очищення. Морфологію та хімічні закономірності НЧ оцінено в SEM (JOEL JSM-7800F) оснащеним рентгенівським енергетичним диспергатором та спектроскопічним (EDX) аналізатором.

Б. Вивільнення іонів срібла

Для приготування розчину наночастинок використовували вихідний розчин розведений дистильованою водою до 60 мкг/мл. Його досліджували протягом 7 днів для визначення вивільнення іонів срібла у розчин. Для цього 10 мл розчину що містить 60 мкг/мл AgNPs центрифугували зі швидкістю 8000 об/хв. протягом 10 хв. Вміст іонів срібла визначали в фільтраті. Щоб оцінити вплив ультразвуку на виділення срібла, перед цим розчин витримували 30 хв в ультразвуковій ванні центрифугування. Рисунок 1 демонструє, що наночастинок після центрифугування осідають на дно; отже, над осадом містяться переважно іони срібла.

Визначення іонів срібла в розчинах проводили за методом атомно-абсорбційної спектроскопії за допомогою C-115 M1 спектрофотометра. Параметри аналізу були такими: лампа з порожнистим катодом для срібла з довжиною хвилі 328,1 нм. Для розпилення використовували окисне полум'я та використовувалася суміш газів пропан-бутан-повітря.

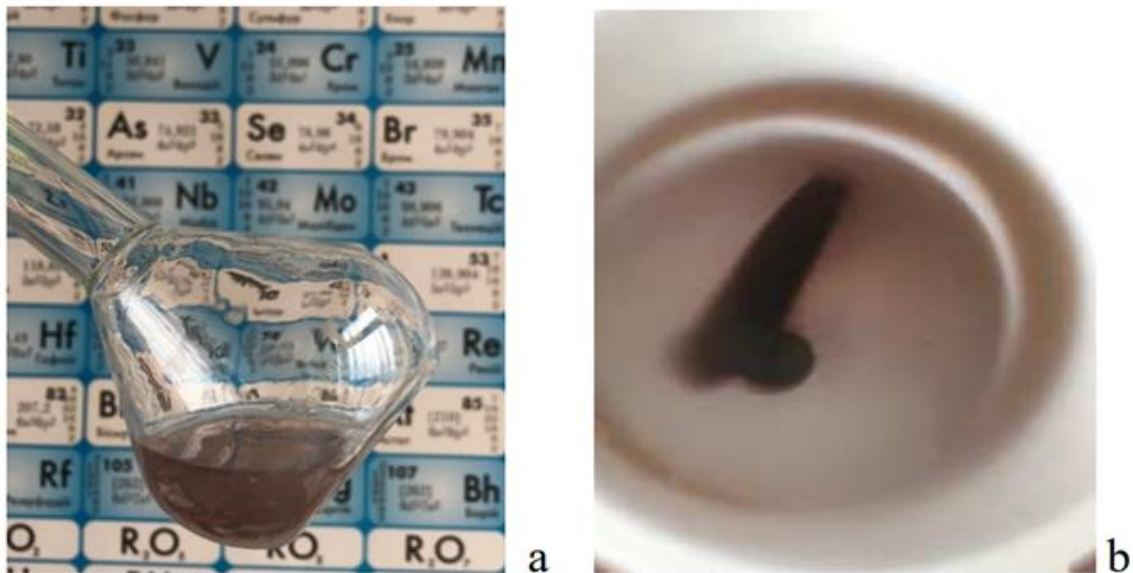


Рисунок 2.1 – Загальний вигляд робочого розчину наночастинок срібла і той же розчин після центрифугування: а) колоїдний розчин наночастинок срібла 60 мкг /мл; б) розчин після центрифугування (осад наночастинок срібла

Вивчення виділення іонів срібла з наночастинок також була здійснена методом центрифугування. Після центрифугування робочого розчину наночастинок, верхня частина фільтрату була злита і досліджена на вміст іонів, а решту осаду наночастинок розбавляли водою до вихідного об'єму. Цю операцію повторювали 4 рази. Базовий розчин AgNP містив 4,5 г/л AgNP. При розведенні робочий приготований розчин з антимікробними властивостями, містить 90 мкг/мл наночастинок.

В. Характеристика AgNPs

Виготовлені наночастинок мають кубічну форму розміром від 80 нм до 800 нм. Менші наночастинок срібла з розмірами порядку кількох десятків нм і сферичної форми також може бути спостерігається на стінках куба (рис. 2.2). Спектри EDX (рис.2) показують наявність срібла. Атоми вуглецю, кисню і азоту походять з полівінілпіролідону (кінцева кришка). Наявність кристалів хлориду натрію обумовлені перетворенням гіпохлориту натрію в хлорид натрію під час синтезу. Сигнали хрому і заліза походять з диска із зразками під час вимірювання.

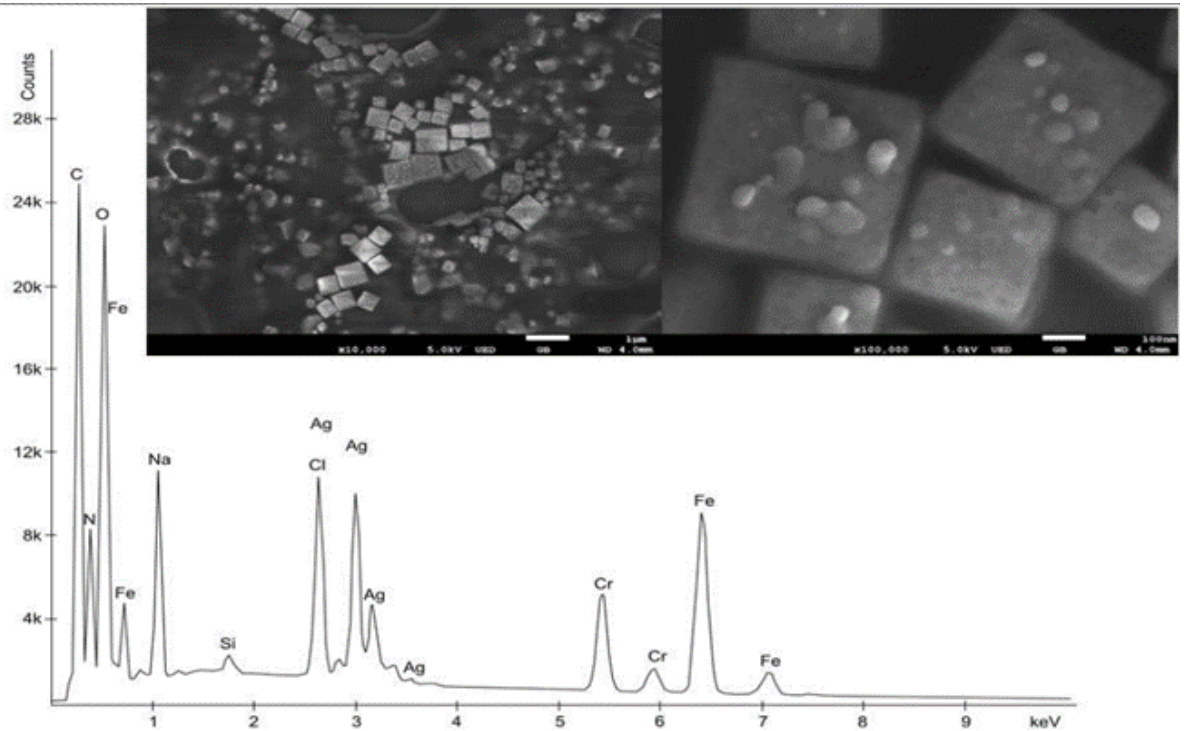


Рисунок 2.2 – EDX-спектри наночастинок срібла за допомогою сканувальної електронної мікроскопії (вставка).

Г. Вивільнення іонів срібла

Результати виділення іонів срібла наведені в таблиці 2.1.

Таблиця 2.1 – Вихід іонів срібла у фільтрат після центрифугування розчину з наночастинками срібла

Зразок	Кількість наночастинок срібла в розчині мкг\мл	Час контакту, години	Ультразвуковий вплив, 30 хв	Кількість іонів срібла у фільтраті, мкг\мл
1	60	1	-	4.05
2	60	24	-	4.04
3	60	24	+	4.84
4	60	72	-	4.30
5	60	72	+	8.05
6	60	144	-	4.06
7	60	144	+	9.26

Вивільнення іонів срібла з наночастинок у розчин спостерігається як у перші години спостережень, так і після 7 днів (рис. 2.3).

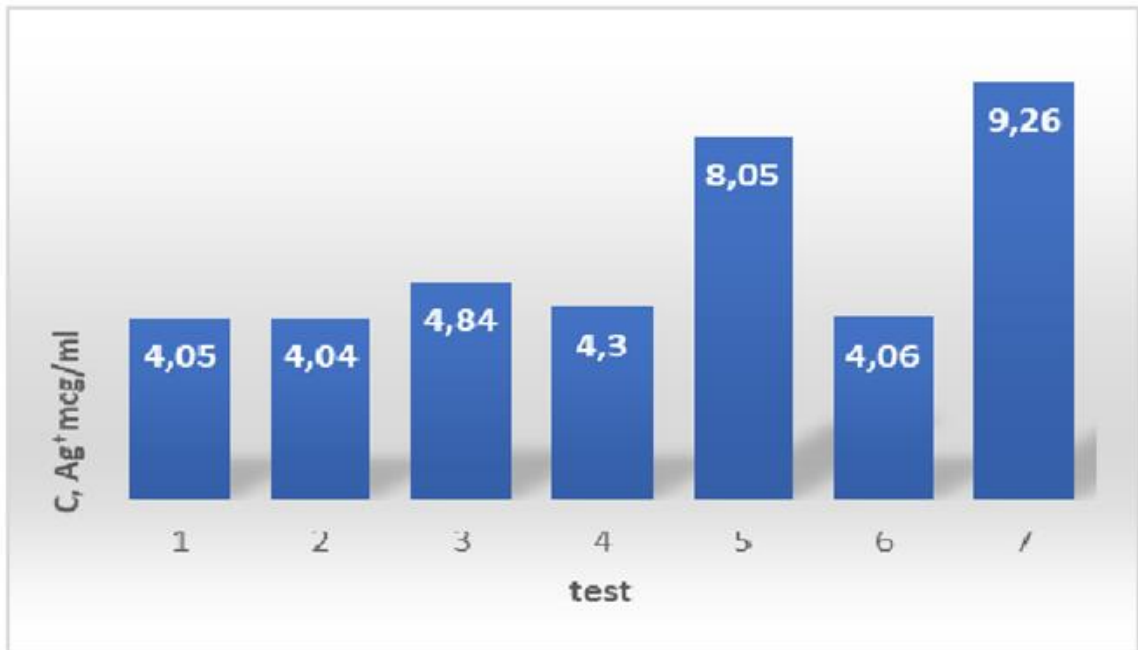


Рисунок 2.3 – Кількість іонів срібла мкг/мл у фільтраті після центрифугування.

Спільна присутність іонів срібла і певної кількості наночастинок в розчині після центрифугування можливо. Слід зазначити, що швидкість вивільнення постійна протягом 7 днів експерименту. Ультразвукова обробка збільшує виділення іонів приблизно 2 рази на 5 і 7 дні (зразок 5 і 7). Ми можемо зробити висновок, що час зберігання робочого розчину з антимікробними властивостями істотно не впливає на вміст іонів у розчині. В результаті послідовних операцій центрифугування - збір фільтрату і подальшого розведення до початкового об'єму (50 мл), результати представлені в таблиці 2.2 і на рис. 2.4

Дослідження виділення іонів срібла з розчину демонструють, що вивільнення Ag⁺ від наночастинок виникає постійно. Під час обстеження того ж розчину наночастинок, кількість виявлених іонів срібла після центрифугування злегка зменшується з кожним наступним зразком, на 0,7-1,1 мкг/мл, що дає можливість передбачити пролонговану дію наночастинок у порівнянні з дією іонів срібла, отриманих з розчинів солей. Після попередньої

обробки розчин, що містить наночастинки в ультразвуковій ванні виділення іонів срібла в розчин дещо збільшується (зразки 3, 5, 7 – табл. 2.1).

Таблиця 2.2 – Кінетика виходу іонів срібла у фільтрат після послідовного центрифугування того ж перехідного розчину наночастинок срібла

Зразок	Кількість наночастинок срібла в розчині мкг\мл	Час контакту, години	Кількість іонів срібла у фільтраті, мкг/мл	Перерахунок до початкової концентрації (90 мкг/мл)
1	90	0	22.37	22.4
2	85	10	17.76	21.3
3	82	20	15.13	20.4
4	79	30	8.46	19.6

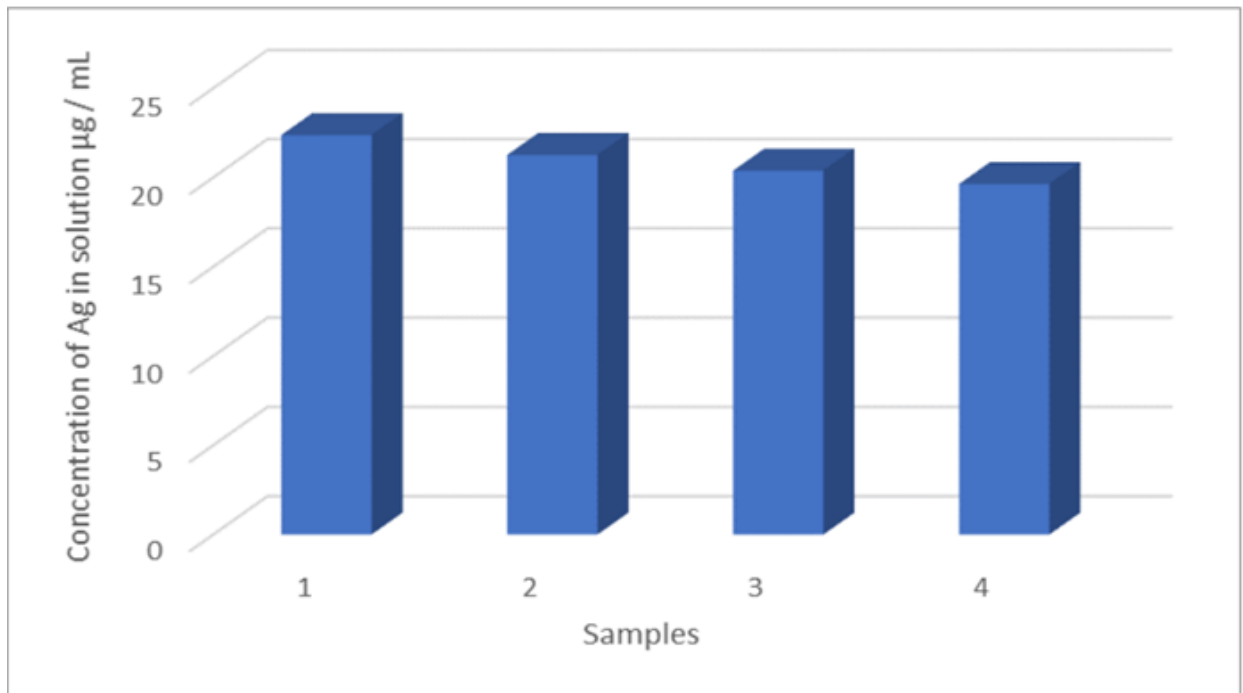


Рисунок 2.4 –. Поетапне виділення іонів срібла мкг/мл у фільтрат після центрифугування того ж розчину наночастинок срібла.

Як описано раніше, наночастинки можуть забезпечити антибактеріальний ефект завдяки прямій взаємодії з бактеріальною стінкою [184]. Цей механізм може бути реалізований для розробки антибактеріальної поверхні для стоматологічних і ортопедичних імплантатів,

а також для медичних антибактеріальних поверхонь. У наших попередніх дослідженнях ми продемонстрували високий рівень ефективності покриттів, що містять AgNPs, проти різних бактерій, а також чудову біосумісність [185]. Пригнічення бактерій, що супроводжується високою біосумісністю через низький контакт з еукаріотичними клітинами, що продемонстровано в численних дослідженнях [186, 187]. Навпаки, вивільнення іонів срібла може забезпечити більш цільову антибактеріальну активність далеко від розміщення і може використовуватися для лікування інфікованих ран [188, 189]. При цьому іони можуть забезпечити значущу клітинну токсичність, що обмежувала їх застосування в клініці через надмірне вивільнення з НЧ [190]. У нашому дослідженні ми продемонстрували повільне, але постійне вивільнення іонів срібла з НЧ які можуть контролювати токсичність.

Наночастинки Ag, виготовлені в УФ-реакторі, мають кубічну форму розміром від 80 до 800 нм із залишками Cl і Na. Інкубація AgNP демонструє повільне вивільнення Ag⁺ що не перевищує 5 мкг/мл за 24 години. Обробка ультразвуком збільшує вивільнення іонів, які можна використовувати в комбінованому лікуванні інфікованих ран.

3 ДОСЛІДЖЕННЯ ОСОБЛИВОСТЕЙ ФІЗИКО-ХІМІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ НАНОЧАСТИНОК СРІБЛА У КОМПОЗИТІ З ГІДРОКСИПАТИТОМ (ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ 2 ЕТАПУ)

3.1 Кінетика вивільнення іонів срібла з композиту НА-AgNPs та стабільність наночастинок при різних типах обробки.

Гідроксиапатит (ГА) широко використовується для виготовлення імплантатів завдяки його високій хімічній подібності до мінерального компоненту позаклітинного матриксу кісткової тканини [191]. Наночастинки срібла (AgNP) ефективно використовують для лікування бактеріальної інфекції різної локалізації [192]. Інфекційні захворювання кісткової тканини, спеціальні післяімплантаційні та хірургічні процедури вимагають застосування місцевих антибактеріальних матеріалів, а ГА з наночастинками срібла міг бути ефективним способом запобігання бактеріальної інфекції [192]. Традиційно вважається, що наночастинки срібла та іони Ag^+ мають антимікробні та бактерицидні властивості [193, 194]. Клінічне застосування AgNPs значно розвинулося в галузі стоматології та ортопедії, де периопераційна інфекція є постійною загрозою від імплантованих пристроїв або протезів під час хірургічної заміни суглобів [195]. Незважаючи на доведену антимікробну ефективність комбінації AgNPs-НА, існує багато питань, які необхідно вирішити перед практичним застосуванням цих матеріалів, зокрема швидкість вивільнення іонів срібла з AgNPs, адсорбційна здатність НА до AgNPs, швидкість десорбції іонів Ag^+ з AgNPs-НА [196]. Вивільнення іонів Ag^+ у довгострокових дослідженнях є одним з вирішальних моментів для забезпечення антимікробної ефективності композитів. Дослідження вивільнення іонів срібла з часом в одному і тому ж розчині демонструє, що кількість іонів срібла після центрифугування зменшується на 0,7-1,1 мкг/мл. Після попередньої обробки розчину, що містить AgNPs, в ультразвуковій ванні вивільнення іонів срібла в розчин дещо

збільшується [197]. Дослідження фізико-хімічних властивостей, поведінки вивільнення іонів Ag^+ та антибактеріальних властивостей отриманих нанокмпозитів все ще залишається актуальною темою в даний час [198].

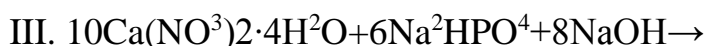
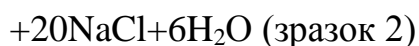
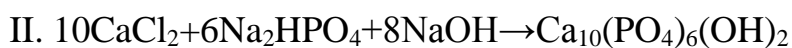
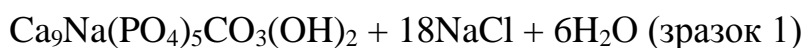
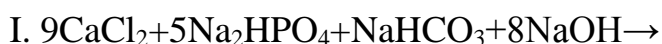
Матеріали і методи

А. Дослідження вивільнення іонів з AgNPs.

Базова суспензія AgNPs (NanoPure) була виготовлена, як описано в [198], і використовувалась без будь-якого подальшого очищення. Морфологію та хімічну структуру наночастинок оцінювали за допомогою SEM (JOEL JSM-7800F), оснащеному аналізатором рентгенівської енергодисперсійної спектроскопії (EDX). Розчин наночастинок (НЧ) срібла розбавляли дистильованою водою до концентрації 60 мкг/мл. Для оцінки впливу ультразвуку на вивільнення іонів срібла розчин витримували 30 хв в ультразвуковій ванні (40 Гц). Центрифугування при 8000 об/хв (10 хв) проводили для відділення іонів Ag^+ від НЧ Ag внаслідок седиментації НЧ. Концентрацію іонів Ag^+ у супернатанті вимірювали методом атомно-абсорбційної спектроскопії (ААС) за допомогою спектрофотометра С-115 М1. Параметри аналізу: лампа з порожнистим катодом для срібла ($\lambda(\text{Ag}) = 328,1$ нм), окисне полум'я – суміш газів пропан-бутан-повітря.

В. Синтез ГА

Зразки гідроксиапатиту синтезували трьома способами:



Була виміряна сорбційна здатність різних типів ГА. Отриманий Зразок 1 ГА мав нестехіометричну кальційдефіцитну природу; Зразки 2 і 3 – стехіометричний ГА, синтезовані двома різними способами. Зразки ГА змішували з розчином AgNPs у співвідношенні 1 до 1 і після центрифугування

вимірювали концентрацію іонів Ag^+ у надосадовій рідині. Концентрація НЧ Ag у вихідному розчині становила 18,625 мкг/мл. Зразки ГА контактували з розчином НЧ протягом 72 годин при 25°C . Також було досліджено вплив обробки ультразвуком на вивільнення іонів Ag^+ з отриманих матеріалів НА AgNs .

С. Характеристика адсорбції та десорбції іонів срібла.

Для дослідження сорбції AgNP був обраний ГА. Адсорбцію розраховували за формулою:

$$A = (C_0 - C) \cdot V / m \text{ адсорбенту,}$$

де C_0 – вихідна концентрація AgNP в мкг/мл,

C – концентрація AgNP в мкг/мл, V – загальний об'єм ГА та AgNP у мл;

m – маса адсорбенту (ГА) в г;

A – адсорбція, мкг/г.

Процес десорбції досліджували за ізотермічних умов з постійним перемішуванням. Зразки ГК з адсорбованими наночастинками Ag змішували з дистильованою водою (співвідношення твердої речовини до рідини = 1:20) при постійній $T = 298 \text{ K}$ протягом 24 годин. Потім після центрифугування кількість срібла оцінювали у фільтраті за допомогою ААС.

$$D = C \cdot V / C_{(\text{Ag})\text{HA}},$$

де D – десорбція (мкг/г);

$C_{(\text{Ag})\text{HA}}$ – маса Ag , адсорбована ГА (мкг/г);

C – концентрація Ag у фільтраті після десорбції (мкг/мл); V – об'єм розчину (мл).

D. Оцінка морфологічної стабільності AgNPs.

Для оцінки морфологічної стабільності було підготовлено три набори зразків AgNP. Дослідження проводили шляхом порівняння вихідної суспензії НЧ із суспензією після обробки. Для дослідження морфологічних змін AgNP використовували скануючу електронну мікроскопію. На першому етапі суспензію НЧ Ag (3000 мкг/мл) центрифугували при 8000 об/хв (10 хв). НЧ Ag, що осідають на дні кювети; потім супернатант відділяли (переносили). Потім осад ресуспендували з додаванням достатньої кількості дистильованої води для отримання базової концентрації. Процедуру повторювали тричі. Другий вид обробки представляв собою ультразвук протягом 2 хв. Базовий розчин та суспензію після обробки готували для аналізу SEM, поміщаючи 10 мкл розведеного зразка 10 разів на підкладку.

E. Дослідження антибактеріальних властивостей AgNPs.

Дослідження антимікробної активності наночастинок проводили з використанням НЧ Ag, розчинених у живильному бульйоні в концентраціях 20, 100, 200 і 300 мкг/мл. Було підготовлено три серії зразків AgNPs. Перша серія пробірок містила базовий розчин. Другу серію пробірок центрифугували, а супернатант і осад осадів збирали. Третю серію пробірок із супернатантом і осадом AgNPs обробляли ультразвуком протягом 2 хвилин перед аналізом. Після цього пробірки інкубували при 37 °С протягом 1, 2 або 3 днів. Потім 200 мкл *S. aureus* (10^6 КУО/мл) додавали до 1,8 мл підготовлених AgNP та інкубували протягом 24 годин при 37 °С. Після цього була проведена оцінка оптичної густини в досліджуваних зразках за допомогою Multiskan FC Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) з довжиною хвилі 595 нм.

Антибактеріальні властивості композитів AgNPs-НА досліджували при концентраціях AgNPs у НА 5, 10, 20, 50, 100, 200 мкг/мл. Спочатку композитні суспензії поміщали в термостат на ніч при 37°C. Потім 10 мл суспензії наносили на фільтрувальний папір і висушували при кімнатній температурі. Бактеріальні суспензії 10^5 КУО/мл висівали на чашки з поживним агаром і сушили протягом 1 години. Попередньо підготовлені диски поміщали на агар

і інкубували протягом 24 год при 37°C. Результат оцінювався вимірюванням зони затримки росту навколо дисків.

Результати та обговорення

А. Дослідження вивільнення іонів Ag⁺

Час адсорбції для всіх зразків ГА становив 72 години (3 дні) при температурі 25 °С. Результати наведено в таблиці 3.1.

Зразки 1, 2 і 3 відповідають ГА, отриманим у трьох видах синтезу, група зразків а – відповідає зразкам без ультразвукової (УЗ) обробки, група зразків б – відповідає зразкам, обробленим ультразвуком.

Таблиця 3.1 – Адсорбція ГА іонів срібла

Зразок	Умови адсорбції	Концентрація Ag ⁺ іонів у фільтраті після адсорбції мкг/мл	Адсорбція гідроксиапатитом, мг/л
1a	Без ультразвукової обробки	1.36 ±0.05	0.8632±0.03
1b	З ультразвуковою обробкою	1.29±0.05	0.8667±0.03
2a	Без ультразвукової обробки	0.44±0.05	0.2797±0.03
2b	З ультразвуковою обробкою	0.69±0.05	0.2759±0.03
3a	Без ультразвукової обробки	0.13±0.05	0.4456±0.03
3b	З ультразвуковою обробкою	0.12±0.05	0.4459±0.03

Концентрацію іонів Ag⁺ вимірювали в надосадовій рідині після центрифугування. Зразки 1b, 2b і 3b обробляли ультразвуком при 40 кГц протягом 30 хв. Здатність ГА зменшувати вивільнення іонів Ag⁺ з НЧ Ag за рахунок адсорбції досліджено для трьох типів гідроксиапатитів, які відрізнялися співвідношенням компонентів і типами синтезу. Результати представлені на рис.3.1.

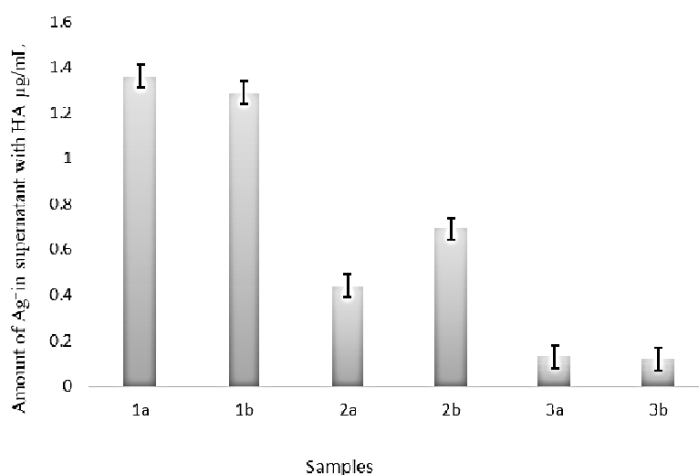


Рисунок 3.1 – Концентрація іонів Ag⁺ у надосадовій рідині, вивільненій із суспензії HA-AgNPs після центрифугування. Зразки 1b, 2b і 3b були оброблені ультразвуком. Зразок 1 (синтез I); зразок 2 (синтез II); зразок 3 (синтез III) – різні типи ГА.

Як видно з рисунку 6. після контакту ГА з AgNP (початкова концентрація становила 18,625 мкг/мл) і після центрифугування суспензії іони срібла залишались в супернатантному розчині. Зразки ГА, які контактували з розчинами AgNPs, вивільняли майже 1,2-1,3 мкг/мл іонів срібла. Найбільшу кількість вивільнених іонів срібла спостерігали в надосадовій рідині для кальційдефіцитного ГА (зразок 1). Ультразвукова обробка зразків під час адсорбції суттєво не вплинула на цей процес. Досліджено також здатність іонів срібла вивільнятися з колоїдного розчину НЧ Ag (початкова концентрація 60 мкг/мл) без ГА (рис. 3.2).

Вивільнення іонів срібла з AgNPs у розчин спостерігалось як в перші години, так і після 6 днів зберігання. Середня швидкість вивільнення становила не більше 4 мкг/мл за 24 години. Після попередньої обробки AgNPs в ультразвуковій ванні вивільнення іонів срібла збільшується. У присутності HA вивільнення іонів срібла з AgNP дещо знижується. При розведенні розчину НЧ Ag, який контактував з ГА в концентрації 60 мкг/мл, концентрація знизилась до 18,625 мкг/мл (у 3,2 раза), вивільнення іонів Ag зменшувалось у 2,9 раза. Отримані результати дозволяють зробити висновок, що ГА не

пригнічує вивільнення іонів Ag^+ з AgNPs, отже, така здатність може бути використана для пролонгованої антибактеріальної активності композитних матеріалів.

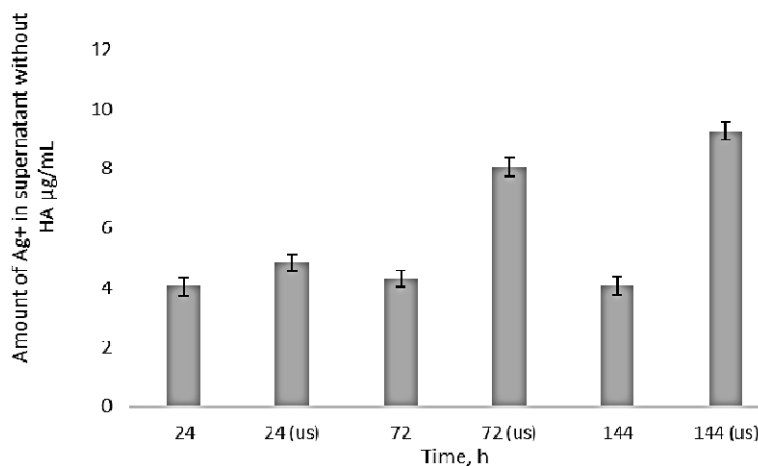


Рисунок 3.2 – Вивільнення іонів срібла з колоїдного розчину AgNPs.

Кількість ГА у суспензіях оцінювали для характеристики адсорбційної здатності ГА, які були використані у дослідженні. Фіксований об'єм суспензії зважували, висушували до постійної маси і знову зважували. Результати дослідження наведено в таблиці 3.2.

Таблиця 3.2 – Концентрація ГА в приготованих суспензіях

Зразок	Об'єм суспензії, мл / Маса суспензії, г	Маса висушеного ГА, г	Концентрація ГА в суспензії, г/мл
1	12 / 12.10	0.485	0.04
2	12 / 12.68	1.582	0.13
3	12 / 12.57	0.997	0.08

Найменшу кількість ГА у суспензії спостерігали для кальційдефіцитного гідроксиапатиту, отриманого синтезом I. Кількість сухого осаду ГА у 2 рази менше, ніж для синтезу III, і в 3,2 рази менше, ніж у суспензії синтезу II. Оцінка сухого ГА у суспензії дає можливість знайти адсорбційну здатність ГА,

синтезованого різними методами. Отримана адсорбційна здатність різних зразків ГА представлена в табл. 3.3.

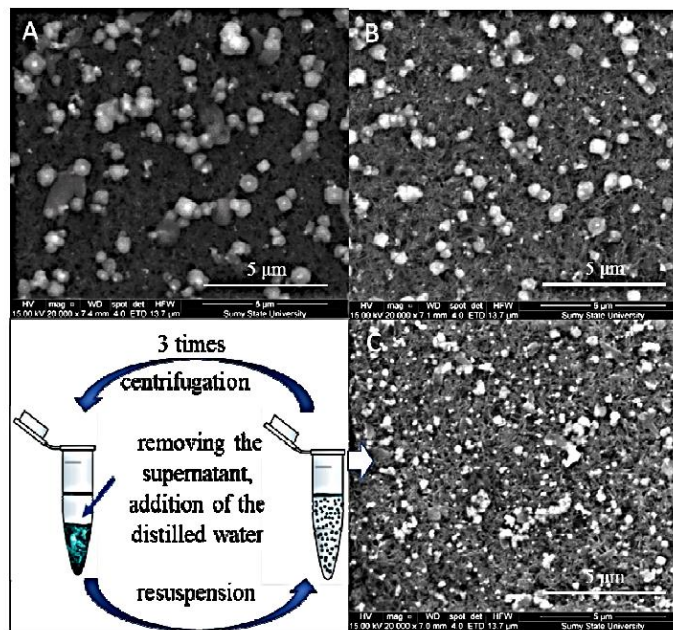
Таблиця 3.3 – Адсорбція – десорбція іонів срібла зразками ГА з та без ультразвукової обробки

Зразок	Концентрація іонів Ag ⁺ у фільтраті після десорбції, мкг/мл	Адсорбція ГА, мг/г	Концентрація Ag ⁺ іонів у фільтраті після десорбції, мкг/мл	Десорбція Ag з ГА, мг/л
1a	1.36 ±0.05	0.8632±0.03	0.09±0.01	0.0021 ±0.001
1b	1.29±0.05	0.8667±0.03	0.12±0.01	0.0028 ±0.001
2a	0.44±0.05	0.2797±0.03	0.10±0.01	0.0071 ±0.001
2b	0.69±0.05	0.2759±0.03	0.12±0.01	0.0087 ±0.001
3a	0.13±0.05	0.4456±0.03	0.14±0.01	0.0063 ±0.001
3b	0.12±0.05	0.4459±0.03	0.10±0.01	0.0045 ±0.001

Як видно з таблиці 3.3, усі синтезовані зразки ГА мають високу адсорбційну здатність (0,3-0,9 мг/г ГА). Найвищу адсорбційну здатність мають кальцій дефіцитні ГА (синтез I). Істотного процесу десорбції іонів срібла з HA-AgNPs не спостерігається. Найбільша кількість іонів Ag⁺ десорбується з ГК, отриманого в синтезі II. Ультразвукова обробка зразків при десорбції істотно не вплинула на десорбцію.

В. Вплив розведення та ультразвукової обробки на форму AgNP.

Підготовлені сети NP аналізували з вивченням морфології частинок за допомогою SEM-аналізу. Контрольні наночастинки мали морфологію куба з ядром наночастинки всередині. На сканограмі було видно покриття НЧ. Під час SEM візуалізації, AgNPs були добре дисперговані: без агломерації або агрегації частинок (рис. 3.3).



Рисунгк 3.3 – SEM дослідження AgNPs А) вихідний розчин, В) вихідний розчин + ультразвук, С) 3 рази центрифугування – ресуспензійна обробка.

Ймовірно, це пов'язано з присутністю PVP, яке допомогло частинкам протистояти групуванню. Візуальне спостереження другого набору частинок виявило утворення кластерів внаслідок коагуляції, викликаній розрідженням або зникненням покриття. Зображення також показали, що AgNPs все ще були у формі наночастинок після обробки ультразвуком (рис. 3.3).

С. Антибактеріальні результати

Завантаження НА з AgNPs використовується для забезпечення антибактеріальної активності отриманих матеріалів. Ефективність AgNPs проти *S. aureus* спостерігалася при концентраціях вище 100 мкг/мл (рис. 3.4а). У той же час порівняння ефективності супернатанту та осаду показало нижчу антибактеріальну активність супернатанту по відношенню до осаду (рис. 3.4б-с). Час інкубації зразків істотно не впливав на їхню активність.

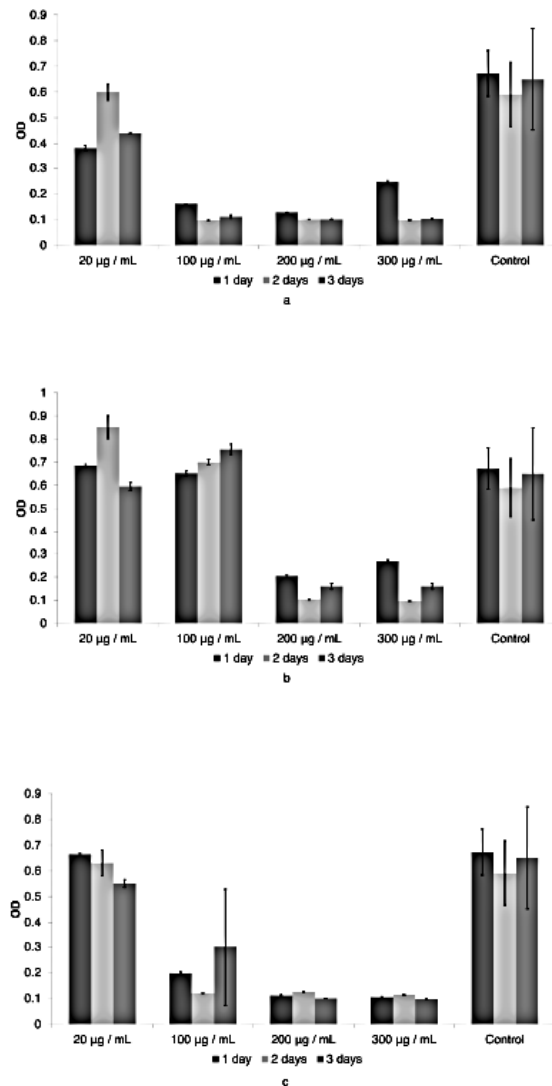


Рисунок 3.4 – Антибактеріальна ефективність AgNPs проти *S. aureus* (базовий розчин (a), супернатант (b), осад наночастинок (c)).

У нашій попередній роботі [199] було продемонстровано, що ультразвукова обробка AgNPs підвищує їх антимікробну активність. Було припущено, що попередня обробка осаду наночастинок срібла та супернатанту ультразвуком може вплинути на їх антимікробну активність. Проте наш результат не підтвердив цю гіпотезу. Рисунок 3.5 демонструє неефективність ультразвукової обробки для зниження антимікробної активності супернатанту та осаду AgNPs. Навіть ми можемо спостерігати суперечливий ефект у випадку антибактеріальної активності супернатанту.

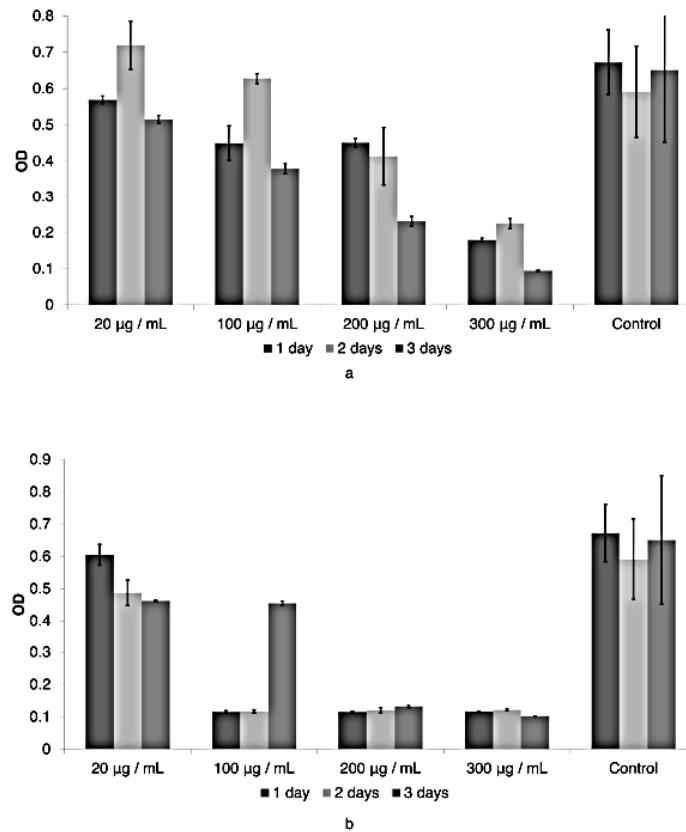


Рисунок. 3.5 – Антибактеріальна ефективність AgNPs, оброблених ультразвуком, проти *S.aureus*, супернатант (а), осад наночастинок (б).

На наступному етапі ми оцінили антимікробну активність композитів AgNPs-НА. На рисунку 3.6 показано утворення зони затримки росту, яка оточує диск з композитами AgNPs-НА.

Впливу концентрації композитів на їх антимікробну активність не виявлено (зона інгібування становила 1-2 мм). Передбачається, що антибактеріальна активність AgNPs реалізується через контактні механізми та вивільнення іонів.

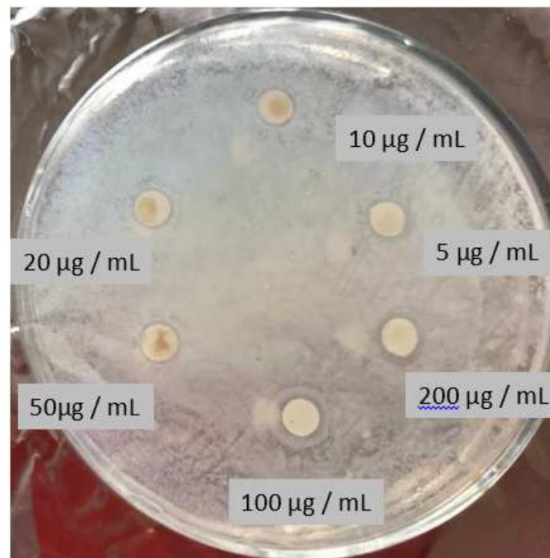


Рисунок 3.6 – Антибактеріальна ефективність композиту AgNPs-НА проти *S. aureus*.

Наші результати підтвердили активацію обох видів антибактеріальної активності різною мірою. Основну роль в антибактеріальній активності досліджуваного композиту відіграє контактне інгібування.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНИЙ ВПЛИВ AgNPs НА ФОРМУВАННЯ БІОПЛІВОК *ENTEROCOCCUS FAECALIS*.

Ентерококи є умовно-патогенними бактеріями нормальної флори шлунково-кишкового тракту людини і тварин, і вони можуть викликати важкі інфекції при зниженні природних механізмів резистентності [200]. Інфекції, викликані ентерококами, все важче лікувати через їхню внутрішню та набуту резистентність до деяких антибіотиків, включаючи кліндаміцин, пеніцилін, аміноглікозиди та цефалоспорини. Таким чином, ці мікроорганізми мають селективну перевагу перед іншою фекальною флорою в стаціонарі, де активно застосовуються антимікробні препарати [201]. *Enterococcus faecalis* (*E. faecalis*) є одним із найбільш ізольованих видів серед клінічних зразків, і його часто виявляють у разі внутрішньолікарняних інфекцій. Бактерія є збудником сечовивідних шляхів, ранових інфекцій, ендокардиту, бактеріємії [202]. Основним чинником патогенності бактерій є здатність утворювати біоплівку, яка підвищує резистентність до антибактеріальних засобів, що асоціюється з гіршим прогнозом. Крім того, біоплівка, що утворюється, сприяє захисту від імунної відповіді хазяїна і таким чином сприяє виживанню та персистенції патогенів [203]. Сьогодні не вистачає препаратів, спрямованих спеціально на бактеріальні біоплівки [204]. Тому розробка нових терапевтичних рішень із ефектом антибіоплівки є пріоритетом високого рівня. Наноматеріали є перспективними речовинами з антимікробною дією через їхні унікальні фізико-хімічні властивості, такі як надмалі розміри, велике співвідношення площі поверхні до маси та підвищена хімічна реакційна здатність [205]. В літературі є багато даних про визначення фізико-хімічні параметри наночастинок срібла (AgNPs) з особливостями синтезу. Однак відтворюваність різних методологій дуже низька [206], і пошук ефективного та надійного хімічного синтезу наночастинок срібла є гарячою темою в нанонауці [207]. Виявлено, що антибактеріальні та антибіоплівкові властивості наночастинок срібла залежать від їх розміру, форми, концентрації та типу мікроорганізму [208] або архітектурних особливостей бактеріальної

біоплівки [209]. Хоча кілька звітів показали антибактеріальну та антибіоплівкову активність AgNPs проти різних організмів [210], є кілька документів, пов'язаних з обробкою біоплівок *E. faecalis* AgNPs. N.S. Swidan взагалі виявили ефективність 1 мг/мл розчину AgNP проти ізолятів *E. faecalis* [210]. Однак в іншій роботі повідомлялося про неефективність 0,1% розчину AgNPs проти 4-тижневих біоплівок *E. faecalis* [211]. У нашій попередній роботі ми повідомили про ефективність хімічно синтезованих AgNP проти клінічних штамів *Escherichia coli* та *Staphylococcus aureus* при низькій концентрації [211]. Крім того, мало уваги приділено морфологічним змінам у структурі клітин *E. faecalis*, оброблених AgNPs [212]. Таким чином, наше дослідження мало на меті оцінити вплив хімічно синтезованих наночастинок срібла проти *E. faecalis* у формі планктону та біоплівки з акцентом на структурні зміни в бактеріальних клітинах.

Матеріали та методи

A. Штами бактерій та умови культивування\ Наночастинки срібла.

Усі експерименти проводили з еталонним штамом *E. faecalis* B-7497 (Українська національна колекція мікроорганізмів, Інститут мікробіології та вірусології ім. Д.К. Заболотного НАН України). Поживні середовища (бульйон і ентерококовий агар) були придбані у Hi Media (Індія). AgNPs були хімічно синтезовані в присутності PVP як відновлювача згідно з раніше описаною методологією [212]. Основна концентрація срібла становила 3 г/л.

B. Антимікробна активність.

Антимікробну активність AgNP досліджували методом серійного розведення пробірок з визначенням МІК (мінімальної інгібіторної концентрації) та МВС (мінімальної бактерицидної концентрації) відповідно до міжнародних рекомендацій, наданих Клінічним і Лабораторним Інститутом стандартів [213]. Кожен дослід супроводжувався контролем стерильності поживного середовища та контролем росту мікроорганізмів. Усі тести проводили в трьох повторах.

C. Інгібування утворення біоплівки.

Утворення біоплівки оцінюють за допомогою аналізу Gentian Violet (GV) на полістирольних 96-лункових планшетах. З нічної культури *E. faecalis* готували бактеріальну суспензію в живильному бульйоні з концентрацією 10^6 КУО/мл. 180 мкл суспензій бактерій поміщали в кожну лунку 96-лункових полістирольних планшетів, що містили 20 мкл розчинів AgNPs при концентрації 1 MIC. Лунки, що містять лише бактерії, використовували як позитивний контроль, а лунки без бактерій використовували як негативний контроль. Планшети інкубували протягом 24 годин при 37 °С. Потім середовище з лунок видаляли і лунки тричі промивали PBS для видалення неприкріплених бактеріальних клітин. Після цього прикріплену біомасу фарбували 0,1% (мас./об.) генціанвіолетом протягом 30 хвилин при кімнатній температурі. Потім планшети тричі промивали 0,9% хлоридом натрію, сушили та додавали 200 мкл 80% об'ємного спирту на 2 хвилини для розчинення зв'язаного барвника. Потім солюбілізований GV переносили на новий планшет і вимірювали оптичну густину за допомогою Multiskan FC Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA) при 570 нм. Кожен тест повторювався шість разів. Для кожного ряду визначали середню OD.

D. Вплив AgNPs на встановлену масу біоплівки

Щоб вивчити вплив AgNPs на сформовану біоплівку *E. faecalis*, бактеріальну культуру інкубували протягом 24, 48 і 120 годин при 37 °С у полістирольних 96-лункових планшетах. Щодня змінювали живильне середовище на свіже. Через певний час AgNPs, розведені поживним бульйоном (200 мкМ) у концентрації 10, 20, 30 та 40 мкг/мл, додавали до лунок та інкубували протягом 24 годин при 37,0°С. Потім середовища видаляли з лунок і промивали PBS. Компоненти біоплівки, які були зафіксовані в лунках, фарбували та оцінювали, як описано раніше.

E. Дія наночастинок срібла на структури біоплівок.

Щоб оцінити вплив AgNPs на структуру біоплівки *E. faecalis*, ми провели скануючу електронну мікроскопію (SEM). Стерильні предметні скла (5x5 мм) поміщали в 24-лунковий планшет з живильним бульйоном і засівали

E. faecalis у концентрації 5×10^5 КУО. Зразки інкубували протягом 1, 2 і 5 днів при 37 °С. Потім у кожен лунку додавали AgNPs у концентрації 10, 20, 30 та 40 мкг/мл та інкубували протягом 24 годин при 37 °С. Після цього предметні скла брали з культурального середовища та тричі промивали PBS для видалення планктонних клітин. Зразки фіксували шляхом занурення в 2,5% глутаровий альдегід на 30 хв при кімнатній температурі. Після цього зразки двічі промивали буфером і зневоднювали серією етанолу (v/v) у діапазоні від 50%, 70%, 90% до 96% протягом 30 хвилин при кімнатній температурі на кожному етапі. Зразки були висушені та напилені сріблом, щоб уникнути заряду під час SEM дослідження. Морфологію клітин і структуру біоплівки досліджували за допомогою мікроскопа SEO-SEM Inspect S50-B (виробництва Oxford Instruments plc).

F. Статистична обробка

Статистичну обробку результатів проводили непараметричним методом з визначенням похибки відносних величин та критерієм Манна-Вітні за допомогою GraphPad. Різницю між групами вважали статистично значущою при $p < 0,05$.

Результати та обговорення

Оцінка антибактеріальної ефективності AgNP проти *E. faecalis* виявила МІК та МВС 5,0 мкг/мл та 10 мкг/мл відповідно. Оскільки біоплівка має захисні бар'єри, впливати на неї складніше, ніж на планктонні мікроорганізми. Тому, щоб вивчити вплив наночастинок срібла на біоплівку, ми перевірили концентрації вище МІС. Відповідно до аналізу, AgNPs у концентраціях, що дорівнюють 0,5 МІС та 1 МІС, не пригнічують утворення біоплівки *E. faecalis* (рис. 13а). Не було статистично значущих відмінностей ($p = 0,25$ і $0,17$ відповідно для 0,5 МІС і 1 МІС) у прикріпленні бактерій до поверхні серед контрольних груп і груп, які отримували AgNPs. Результати аналізу дії НЧ Ag на 1-, 2- і 5-денні біоплівки в концентраціях 10, 20, 30 і 40 мкг/мл узагальнені на рис.3.7 (b,c,d). Виявлено достовірне зниження маси біоплівки в групах 1- та

2-денних біоплівки, оброблених AgNPs, порівняно з контрольною групою ($p \leq 0,05$).

Проте вплив НЧ Ag на 5-денну масу біоплівки не спостерігався ($p > 0,05$). Для оцінки впливу НЧ Ag на морфологічні особливості біоплівки *E. faecalis* було використано дослідження SEM (рис. 3.8). Архітектуру біоплівки в обох групах (контрольної та обробленої) оцінювали за допомогою сканограм, отриманих після першого, другого та п'ятого днів інкубації.

Клітини *E. faecalis* утворювали біоплівки, що формувались шляхом адгезії (седиментації), фіксації, коагрегації та дисперсії [215]. Клітини контрольного штаму мають гладку поверхню та представлені кокобацилами. Після першої доби інкубації контрольний штам утворював моношарові мікроколонії з матрицею позаклітинних полімерних речовин. На другий день інкубації колонії мав з'єднані ланцюжки, в результаті чого утворюється складна біоплівка. Однак бактерії не змогли повністю покрити поверхню. Ми показали, що клітини *E. faecalis* повільно колонізували поверхню скла в контрольній групі. На 5-й день експерименту спостерігали розріджену біоплівку *E. faecalis* з ділянками старої культури. Підвищення концентрації AgNPs продемонструвало негативний вплив на здатність патогенів утворювати біоплівку (рис. 3.8). Досліджені 1- та 2-денні біоплівки руйнувались за допомогою нанесених AgNPs. Ефект антибіоплівко утворення значно посилювався зі збільшенням концентрації AgNPs порівняно з контрольною групою бактерій. Вплив наночастинок на 5-денні біоплівки відображався в порушеній морфології бактеріальних клітин при скануючому електронному мікроскопічному аналізі, тоді як аналіз Gentian Violet не виявив статистично значущої різниці в масі біоплівки в експериментальній і контрольній групах, як показано на рисунку 3.7. SEM-аналіз одnodенної біоплівки, обробленої AgNPs (10 мкг/мл), виявив клітини, згруповані в ланцюги, тоді як у контролі ми спостерігали групи клітин зібрані у конгломерати (рис. 3.8). SEM чітко підкреслює інгібування утворення біоплівки. На рисунку 3.8 показано, що дія AgNPs на 2-денні біоплівки

спричинила більш виражені зміни, включаючи ознаки утворення бульбашок і більш мінливу форму клітин із усадкою та руйнуванням мембрани. Кількість клітин на поверхні також зменшується. Морфологічні зміни біоплівки чітко проявляються на 5-й день після обробки. Спостерігається витік, що спричиняє різноманітну форму клітин та їх усадку, і клітини значно відрізняються порівняно з клітинами у формі коко-бацил, які спостерігаються без обробки НЧ. Аналіз отриманих зразків продемонстрував агреговані кластери імовірно мертвих клітин.

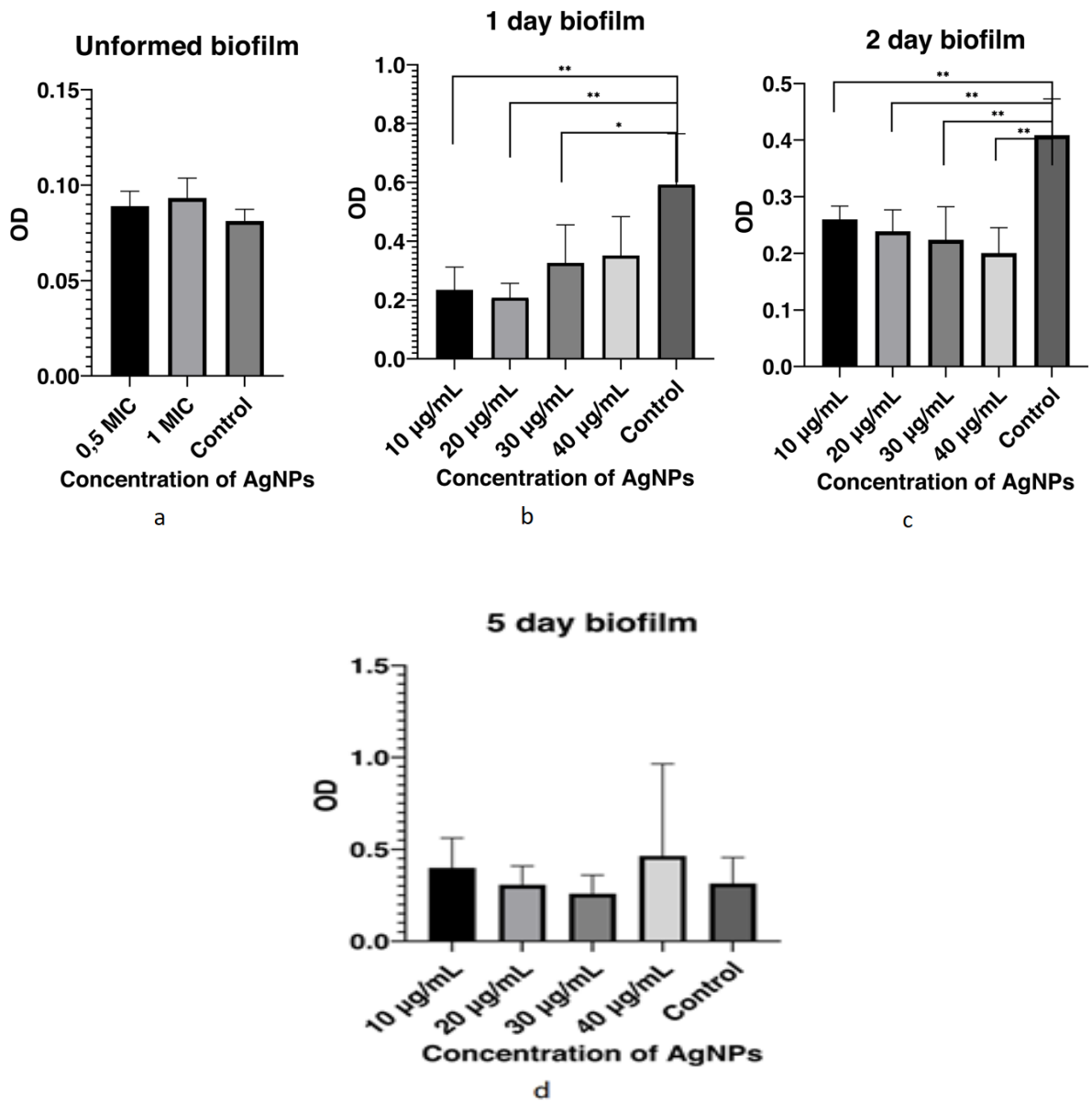
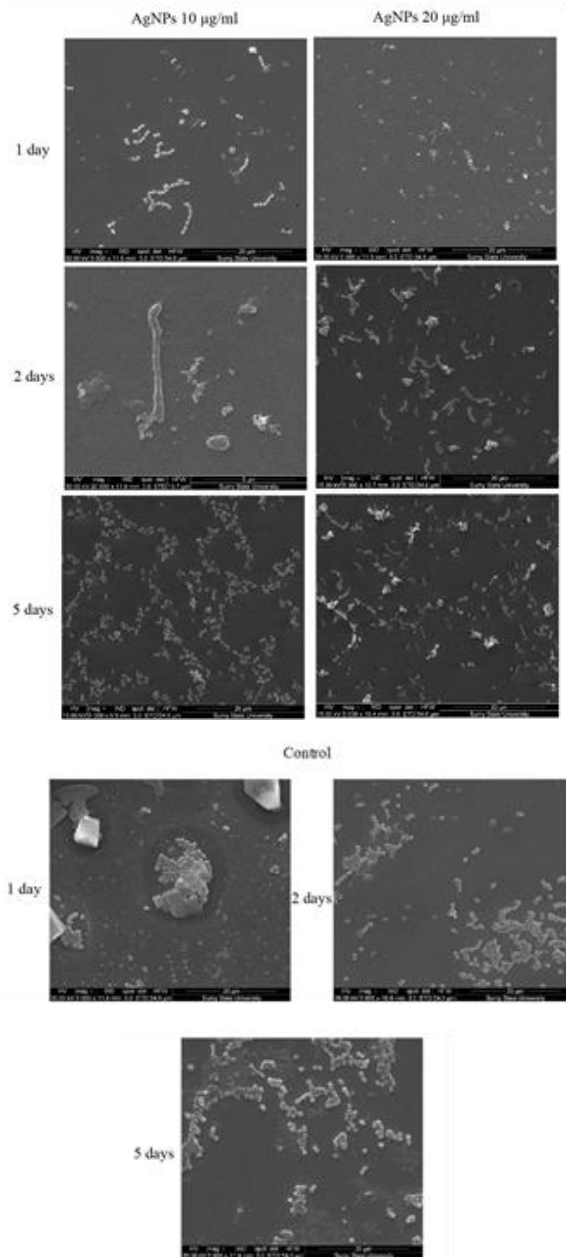


Рисунок 3.7: а - Інгібування утворення біоплівки *E. faecalis* наночастинками срібла; b,c,d - Антибіоплівкова активність тестованих

наночастинок срібла проти *E. faecalis* протягом 1, 2 та 5 днів біоплівки відповідно.



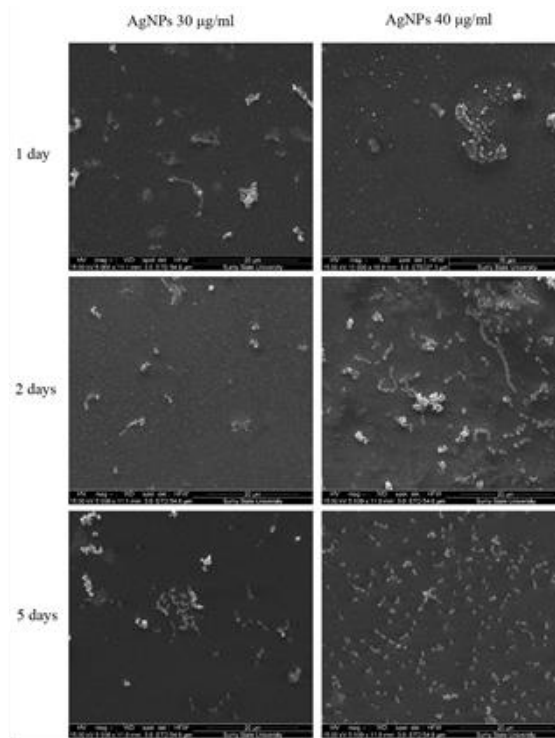


Рис. 3.8. SEM мікрофотографії біоплівки *E. faecalis* 1-го дня, 2-го дня та 5-го дня після дії AgNPs при 10-40 мкг/мл та контрольних груп

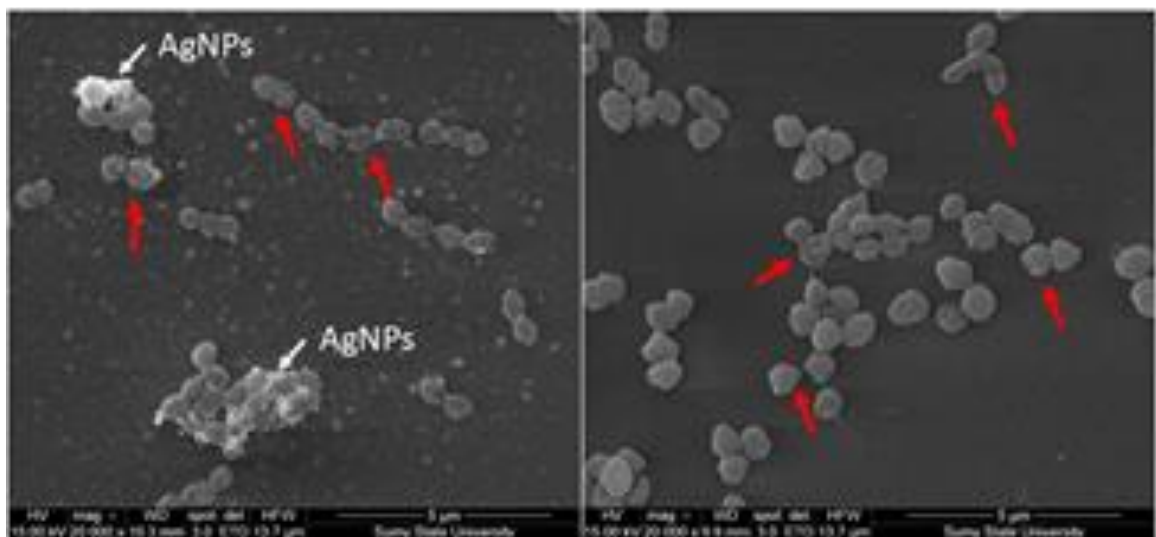


Рис. 3.9. SEM-зображення, що показують вплив AgNPs на морфологію бактеріальних клітин.

Рисунок 3.9 чітко демонструє, що обробка AgNPs вплинула на форму клітини. Біоплівка стає менш регулярною, а покриття поверхні зменшується (червона стрілка вказує на морфологічну зміну клітини). SEM-зображення

свідчать про фізичне пошкодження бактеріальних клітин, оброблених AgNPs, у порівнянні з необробленими клітинами. На поверхні бактерій видно поглиблення та пори, що призводить до витоку цитоплазми та уламків, що свідчить про втрату тургорного тиску. Візуалізовані морфологічні зміни бактеріальної клітини, ймовірно, пов'язані з порушенням зовнішньої мембрани, тоді як аналіз витоку везикул може свідчити про порушення цитоплазматичної мембрани. Пошкодження клітини може бути наслідком прямого прикріплення AgNPs до клітинної стінки та клітинної мембрани бактерії з подальшим проникненням у клітину [214].

4 НОВИЙ БІОІНДУКТИВНИЙ НАНОМАТЕРІАЛ ДЛЯ КІСТКОВОГО ТРАНСПЛАНТУВАННЯ НА ОСНОВІ ДЕФІЦИТУ КАЛЬЦІЮ НА/В-ТСР (ОГЛЯД РЕЗУЛЬТАТІВ 3 ЕТАПУ)

У наш час процедура синус-ліфтингу широко використовується для збільшення обсягу твердих тканин у задній ділянці верхньої щелепи перед встановленням зубних імплантатів. Потреба у цій процедурі виникає внаслідок явища пневматизації синусів, яке зменшує обсяг вертикальної кістки, доступної для використання. Традиційний підхід до синус-ліфтингу передбачає відкриття бічної стінки верхньої щелепи, підняття основи гайморової пазухи та введення кісткового трансплантату під прямою візуалізацією [215].

Існує кілька матеріалів, які можна використовувати для процедури синус-ліфтингу, вони характеризуються своїми перевагами та недоліками [216]. Автогенні кісткові трансплантати, взяті з тіла пацієнта, вважаються золотим стандартом для кісткового трансплантування. Вони є пріоритетними у виборі та сприяють природному росту кістки. Однак для їх отримання потрібне друге хірургічне втручання, що може збільшити незручності для пацієнта та час відновлення [217]. Донорські аллографти, зазвичай від трупа, мають перевагу у тому, що не потребують другого хірургічного втручання. Вони доступні у різних формах, таких як демінералізований кістковий матрикс або ліофілізований кістковий алотрансплантат. Однак успішність аллографтів може бути нижчою, ніж у автогенних трансплантатів, і існує ризик передачі захворювань [218]. Ксенографти - це кісткові матеріали, які мають походження від іншого виду, наприклад бичачого чи поросячого походження. Такі матеріали мусять бути додатково оброблені для видалення всієї органічної речовини. Такі трансплантанти мають перевагу у відсутності потреби другого хірургічного втручання та володіють легкою доступністю. Однак вони можуть мати нижчу ефективність у порівнянні з автогенними трансплантатами, та нести малий ризик імунної реакції [219]. Найбільш успішними матеріалами, які

використовуються сьогодні для процедур синус-ліфтингу, є синтетичні замітники кістки, що імітують структуру та склад кістки. Серед переваг - легко доступність, відсутнє друге хірургічне втручання, а також відсутність ризику передачі захворювань [220]. Однак їхня ефективність може бути нижчою, ніж у автогенних трансплантатів, а їхня довгострокова стабільність та інтеграція з природною кісткою можуть бути під питанням.

Враховуючи переваги синтетичних кісткових трансплантатів, у клінічній практиці використовуються різні типи таких матеріалів. Полімери, такі як полі(молочна-гліколева кислота) (PLGA) і полікапролактон (PCL), є біосумісними, біологічно розкладаються та можуть бути розроблені таким чином, щоб мати різні механічні та хімічні властивості [221]. Однак їх остеопровідність може бути обмеженою, і вони можуть не забезпечувати достатньої довгострокової стабільності [222]. Біоактивне скло, алюмінат кальцію та силікат кальцію як біокераміка використовуються завдяки їх відносно високій біосумісності та остеокондуктивності, а також здатності сприяти регенерації кісткової тканини та ангіогенезу [223]. На жаль, через низькі механічні властивості їх застосування обмежене [224]. Матеріали на основі сульфату кальцію, наприклад, напівгідрат сульфату кальцію (CSH), крім біосумісності та остеокондуктивності, можуть з часом розсмоктуватися та замінюватися новою кісткою. Однак вони мають відносно короткий час резорбції і можуть не забезпечити достатньої тривалої стабільності [225]. Найбільш часто використовуваними матеріалами в клінічній практиці є матеріали на основі фосфату кальцію, включаючи гідроксиапатит (НА) і трикальцій фосфат (ТСР), які є природними мінералами, знайденими в кістках [226]. Імітуючи природну кісткову мінеральну матрицю, вони мають високу остеокондуктивність і остеоіндуктивність, але НА має вищу кристалічність і нижчу швидкість резорбції, тоді як ТСР має нижчу кристалічність і більш швидку резорбцію [227].

У поточному дослідженні ми досліджуємо нові матеріали, які поєднують як НА, так і ТСР в одному пористому трансплантаті, що може покращити деградацію трансплантата та остеointegraцію та забезпечити позитивні

клінічні результати. Формування нової кістки під впливом трансплантатів є ключовою метою синус-ліфтингу і може бути досягнуто шляхом остеогенезу, остеоіндукції та остеокондукції. Остеогенез відбувається в ауотрансплантатах за рахунок наявного каркаса, факторів росту для остеогенезу та клітин, які виробляють кістковий матрикс. Механізм остеоіндукції характерний для аутогенної кістки, аlogenної кістки та ксенотрансплантатів і передбачає диференціювання остеогенних клітин у відповідь на остеоіндуктори — кісткові морфогенетичні білки (BMP) або інші фактори росту. Механізм остеокондукції (остеопривідності), який передбачає використання тривимірних біологічних каркасів, заснований на утворенні нової кістки над трансплантатом, при цьому трансплантат потенційно піддається реваскуляризації та вбудовуванню в нову кісткову тканину [228].

Клінічне використання будь-яких біологічних матеріалів вимагає відповідності основним вимогам до біоматеріалів та доказів їх безпеки та ефективності. Серед обов'язкових вимог до використання біологічних матеріалів з кісткової тканини є кілька факторів [229]: По-перше, каркаси повинні бути тривимірними та мати достатню площу поверхні для взаємодії з клітинами та тканинами в зоні використання. По-друге, матеріал повинен бути пористим і мати зв'язки між порами. Ця вимога є необхідною умовою для забезпечення клітинної адгезії, міграції та проліферації кісткових клітин у відповідному напрямку. Ефективна адгезія клітини до біоматеріалу та структурна анізотропія також впливають на подальшу орієнтацію клітини та взаємодію клітина-матрикс. По-третє, біоматеріал повинен бути нетоксичним і біорозкладаним. Однак при цьому зразки біоматеріалу повинні мати відповідні механічні властивості, і ці характеристики повинні бути порівняні з міцністю кортикальної кістки [230].

Проте особливої уваги заслуговують питання імуногенності біоматеріалів. Незалежно від специфіки кісткових трансплантатів, які використовуються для аугментації, їх виконання супроводжується імунологічною відповіддю на чужорідні речовини. Було показано, що, незважаючи на ретельну обробку, алогенна кістка зберігає потенційну

антигенність, яка індукує опосередковані Т-клітинами імунні відповіді проти алотрансплантата [231]. Це пов'язано з наявністю в алогенних кісткових блоках молекул головного комплексу гістосумісності (МНС). Важливо відзначити, що реакція імунної системи на трансплантацію кістки є складною і включає участь таких клітин, як Т-лімфоцити, В-лімфоцити та макрофаги.

Важливо підкреслити, що імунні клітини забезпечують не тільки запальну відповідь на чужорідний матеріал. Існує тісний зв'язок між метаболізмом кісткової тканини та імунною системою. Активовані Т-клітини можуть впливати на резорбцію кісткової тканини та остеогенез через дію інтерферону гамма (IF-гамма) або інтерлейкіну 17 (IL-17) [232]. Важливу роль також відіграє RANKL, який зв'язується з рецептором-активатором ядерного фактора карра-В (RANK) на попередниках остеокластів і індукує остеокластогенез з подальшою резорбцією кісткової тканини [233].

У фізіологічних умовах більшість макрофагів демонструють фенотип M2, який допомагає підтримувати тканинний гомеостаз [234]. Як резидентні M2, так і запальні макрофаги M1 можуть впливати на формування кісток. Остеокласти традиційно вважаються резидентними макрофагами в кістці. В останні роки була ідентифікована велика популяція макрофагів, які постійно знаходяться в кістках. Ці макрофаги називаються *osteomacs*, які можуть надавати проанаболічну підтримку остеобластам і сприяти формуванню кісток [235]. У контексті процедур імплантації макрофаги опосередковують як репаративні процеси, так і запальні відповіді на імплантовані біоматеріали [236]. Імпланти з біонаноматеріалів індукують поляризацію макрофагів M1, що призводить до запальної відповіді на сторонні тіла та утворення гранульоми. Механізми впливу різних біонаноматеріалів на інтеграцію, ремоделювання та імунну відповідь після процедур аугментації все ще є предметом активних досліджень [237]. Лише невелика кількість досліджень надала фактичну інформацію про реакцію тканин пародонту та специфічний структурний склад зони синус-ліфтингу з використанням алогенних біонаноматеріалів. Гістологічна оцінка відповіді на загоєння кістки після трансплантації різних типів кісткових біонаноматеріалів в організм

людини полегшить використання наноматеріалу кісткового трансплантата хірургом і дозволить встановити період загоєння імплантату відповідно до клінічної ситуації пацієнта. Крім того, оцінка імунної, ангіогенної та остеогенної клітинної відповіді на новий матеріал для кісткової трансплантації дозволить розшифрувати механізми морфогенетичних ефектів кісткового біонаноматеріалу.

У поточному дослідженні ми продемонстрували повний цикл, від розробки до клінічного застосування, нового гідроксиапатиту з дефіцитом кальцію (суміш HA та β -TCP) з детальним фокусом на імунній реакції тканин і ремоделюванні кісток.

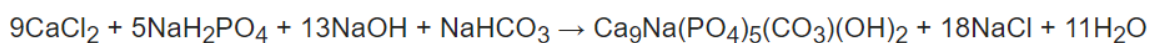
МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ

1 Матеріали

Хлорид кальцію безводний (CaCl_2), одноосновний фосфат натрію безводний (NaH_2PO_4) і гідроксид натрію (NaOH) були придбані у Pol-Aura (Варшава, Польща), а бікарбонат натрію (NaHCO_3) був придбаний у Thermo Fisher Scientific (Великобританія). Кількість чистої речовини становила понад 99,5%. Альгінат натрію був придбаний у Shanghai Macklin Biochemical Technology Co., Ltd. (Шанхай, КНР). Реагенти використовували в отриманому вигляді без додаткового очищення. Усі середовища та хімікати для експериментів з культурою клітин та гістологічної оцінки були придбані у Sigma-Aldrich (Дармштадт, Німеччина) і використані в тому вигляді, в якому вони були отримані.

2 Біоактивний синтез трансплантата

У нашому дослідженні кальційдефіцитний гідроксиапатит був отриманий вологим осадженням. Синтез проводили під контролем перемішування, швидкості додавання, рН і температури за такою реакцією:



Два різних розчини були приготовлені окремо:

Варіант 1.

Розчин CaCl_2 (0,09 M) готували шляхом розчинення відповідної кількості CaCl_2 у дистильованій воді. Розчин нагрівали при перемішуванні до $80\text{ }^\circ\text{C}$. Як реагент, що вводить групи CO_3^{2-} , використовували гідрокарбонат натрію (NaHCO_3) у кількості 0,01 M.

Варіант 2.

Готували розчин NaH_2PO_4 (0,05 M). Потім другий розчин додавали по краплях до першого розчину для отримання гідроксиапатиту з дефіцитом кальцію при перемішуванні та нагріванні до $80\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 2 годин. Під час синтезу рН реакційного середовища стабілізували на >11 за допомогою розчину гідроксиду натрію. Через 2 години рН знижували до 9. Суспензію витримували 24 години при кімнатній температурі. Верхній розчин видаляли декантацією. Отриманий осад тричі промивали деіонізованою водою, поки рН розчину не ставав 7, а потім його використовували як суспензію.

Отриману суспензію гідроксиапатиту з дефіцитом кальцію змішували з 3% водним розчином альгінату натрію у співвідношенні 3:1. Отриману суміш додавали по краплях до 0,1 M розчину CaCl_2 для отримання гранул ГК в альгінатній оболонці. Їх заморожували при $-80\text{ }^\circ\text{C}$ протягом ночі з подальшим висушуванням при $60\text{ }^\circ\text{C}$. Отримані зразки прожарювали при $900\text{ }^\circ\text{C}$ для отримання суміші НА та β -ТСП і видалення органічної фази. Висушені зразки подрібнювали в дрібний порошок і використовували для дослідження характеристик.

3 Характеристика біоактивного графта

Морфологічний аналіз отриманого гідроксиапатиту проводили за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEO-SEM Inspect S50-B) з використанням енергодисперсійного спектрометра AZtecOne з детектором X-MaxN20 (Oxford Instruments plc, Abingdon, UK). Рентгеноструктурний аналіз (РФА) проводили на рентгенівському дифрактометрі ДРОН-3М (Буревісник), підключеному до автоматизованої системи контролю експерименту та обробки даних. Використовували випромінювання $\text{CuK}\alpha$ (довжина хвилі $0,154$

нм) методом фокусування Брегга–Брентано. Сила струму в рентгенівській трубці становила 20 мА і 40 кВ відповідно. Сканування проводилося в режимі безперервної реєстрації з кроком $0,02^\circ$ і швидкістю сканування $1^\circ/\text{хв}$ в діапазоні 2θ 20– 80° . Усі експериментальні дані обробляли за допомогою пакета програм DifWin-1. Фазову ідентифікацію проводили за допомогою каталогу карток JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards) [23].

Структурні компоненти молекули були ідентифіковані за допомогою методу інфрачервоної спектроскопії з перетворенням Фур'є за допомогою апарату ThermoNicolet Nexus 470, придбаного у Thermo Fisher Scientific (Waltham, MA, USA), оснащеного адаптером ATR. Вимірювання та аналіз спектрів проводили за допомогою програмного забезпечення приладу. Спектри записували в спектральному діапазоні 550–4000 см^{-1} з номінальною роздільною здатністю 4 см^{-1} і 32 сканами для кожного вимірювання. Усі зразки перед аналізом висушували [202].

4 Оцінка біосумісності

Для оцінки біосумісності синтезованого гідроксиапатиту використовували первинні остеобласти (Пасаж 4), отримані з колекції Центру біомедичних досліджень. Перед експериментом клітини культивували в модифікованому Дульбекко середовищі Ігла/поживній суміші F-12 (DMEM, Gibco, MA, США) з додаванням 10% фетальної бичачої сироватки, 100 одиниць/мл пеніциліну, 100 мкг/мл стрептоміцину та 2,5 мкг/мл амфотерицину В (Gibco, MA, США) в умовах 37°C і 5% CO_2 . Порошок ГК (100 мг) поміщали на дно 96-лункового планшета, і поверх матеріалу висівали остеобласти з щільністю 4×10^4 клітин/ см^2 . Біосумісність матеріалу для кісткової трансплантації оцінювали за допомогою аналізу відновлення резазурину, як описано в іншій роботі, на 1, 3, 5 і 7 дні [237]. Клітинну проліферацію на планшеті для культури тканин (TCP) використовували як позитивний контроль. Для цього до клітин додавали резазурин у кінцевій концентрації 15 мкг/мл та інкубували протягом 8 годин. Сто мікролітрів середовища потім переносили в інший 96-лунковий планшет і вимірювали оптичну густина (поглинання) за допомогою пристрою для зчитування

планшетів Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, США) при 570 і 595 нм. Результати були кількісно визначені за допомогою формули з Методу вимірювання цитотоксичності або проліферації за допомогою спектрофотометрії Alamar Blue (Bio-Rad Laboratories, Геркулес, Каліфорнія, США).

Колаген, який синтезувався клітинами остеобластів і накопичувався на зразках, був виявлений за допомогою фарбування барвником Sirius Red. Фарбування проводили наступним чином [238]: клітини висівали поверх матеріалу з щільністю клітин 10^4 клітин на лунку, а на 7-й і 14-й дні інкубації зразки переносили в інший 24-лунковий планшет і промивали 3 рази з охолодженим PBS (40 °C). Потім до кожної лунки додавали 1,5 мл розчину Буена на 1 годину при кімнатній температурі. Після видалення розчину зразки промивали холодною водопровідною водою та сушили у витяжній шафі протягом ночі. На наступний день до зразків додавали 1,5 мл барвника Sirius Red на 1 год, потім видаляли і кожну лунку промивали 4 рази 0,01 М HCl. Розчин NaOH (1 мл 0,1 М) додавали до кожної лунки, щоб відновити зв'язаний барвник. Планшет поміщали на шейкер на 30 хвилин, після чого 100 мкл елюйованого барвника з кожної лунки переносили в 96-лунковий планшет і вимірювали абсорбцію за допомогою Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) планшет-рідер на довжині хвилі 570 нм.

5 Тест на згортання крові

Загалом 4,0 г наноматеріалу для кісткової пластики зважили та помістили в шість чашок Петрі діаметром 6 см. Для контролю швидкості згортання крові готували шість додаткових порожніх чашок Петрі. Цільну венозну кров (60 мл) збирали у чоловіка-добровольця, який дав згоду на дослідження. Перед проведенням дослідження етичний комітет медичних досліджень Медичного інституту Сумського державного університету затвердив протокол. Потім до кожної чашки, що містила наноматеріал для кісткової трансплантації, негайно додавали 5 мл крові. Зразки обережно перемішували скляною паличкою, щоб забезпечити рівномірний розподіл крові. Таймер запускався, щойно було додано кров, і зупинявся, коли

утворювався згусток. Для наступного аналізу за допомогою скануючої електронної мікроскопії (SEM) наноматеріал для трансплантації кісткової тканини зі згорнутою кров'яною масою приблизно 0,5 г фіксували в 2,5% розчині глутаральдегіду, а потім зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації протягом 24 годин. Після висихання зразки покривали шаром срібла 30–50 нм за допомогою вакуумної установки ВУП-5М (SELMІ, Суми, Україна). SEM зображення згустку крові на гідроксиапатиті були отримані за допомогою FEI Inspect S50B (FEI, Брно, Чеська Республіка) з детектором вторинних електронів Everhart-Thornley.

6 Експеримент на тваринах

У даному дослідженні було отримано 36 лабораторних щурів з Віварію СумДУ. Тварин утримували при 22 ± 2 °С з 12-годинним циклом світла/темряви та мали вільний доступ до їжі та води. Кожна тварина містилася в окремій клітці відповідно до Directive 2010/63/EU of the European Parliament and of the Council від 22 вересня 2010 року про захист тварин, які використовуються в наукових цілях. Дослідження було схвалено Комісією з дотримання норм біоетики в експериментальних і клінічних дослідженнях. Тварин випадково розподілили на контрольну та дослідну групи по 18 тварин у кожній. Контрольну групу склали тварини, які після операції не отримували жодного замітника кістки, а експериментальну — тварини, які отримували новий біоактивний наноматеріал кісткового трансплантата для заміщення кісткового дефекту в середній третині великогомілкової кістки. Перед операцією тваринам голили ноги під наркозом (кетамін 10 мг на 1 кг). Хірургічне поле було оброблено 70% етанолом, щоб запобігти бактеріальному забрудненню, а потім оточене стерильною тканиною. В експериментальній групі за допомогою стоматологічного бора (d-2,2 мм) створювали кістковий дефект у середній третині великогомілкової кістки та заповнювали його новим кістковим наноматеріалом (рис. 4.1). Рану зашили простими вузловими швами, наклали асептичну пов'язку. Тварин евтаназували на 7, 14 і 28 добу досліду передозуванням кетаміну (70 мг/кг).

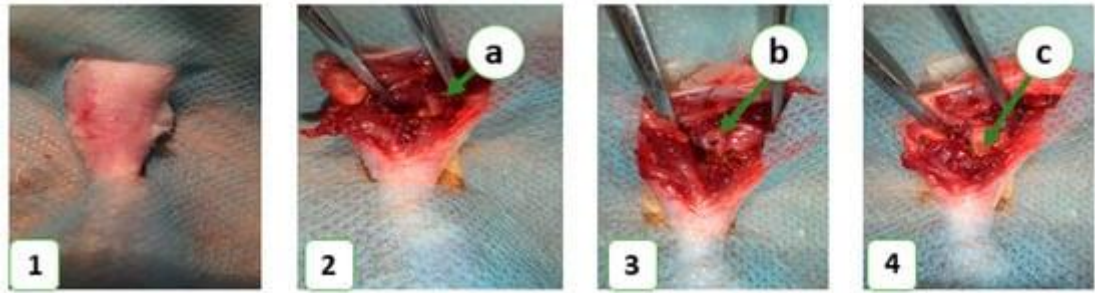


Рисунок 4.1. Операція з пластики дефекту кістки. 1—підготовлена зона перед операцією; 2 — загальний вигляд операційної зони (a) — кістка до утворення дефекту; 3 — загальний вигляд стадії утворення дефекту кістки (b) — дефект кістки; 4 — загальний вигляд останнього етапу операції (c) — дефект, заповнений кістковим наноматеріалом.

Матеріал фіксували в 10% нейтральному (забуференому) розчині формальдегіду протягом 24 год. Усі процедури обробки тканин (фіксація, декальцинація, насичення парафіном, заливання) проводили за загальноприйнятими методиками. Серійні зрізи товщиною 4–5 мкм фарбували гематоксиліном Майєра та еозином.

7 Клінічне застосування

Після успішної оцінки біосумісності *in-vitro* та оцінки ефективності *in-vivo* наноматеріал для кісткової пластики було схвалено для клінічного застосування згідно з протоколом №12-75/19 (Запорізький державний медичний університет). Відкриту операцію синус-ліфтингу проводили за таким протоколом (рис. 4.2): Після седації аналгетиком (Кетанов) і застосування кровоспинного засобу (Дицинон) у ділянці передньої стінки верхньощелепної пазухи сформували слизово-періостальний клапоть на всю товщину з наступним скелетуванням передньої стінки верхньощелепної пазухи. Використовуючи круглий бор із зрошенням, кортикальний шар кістки видаляли, щоб оголити мембрану синуса (мембрана Шнайдера). Потім мембрану відшаровували від дна гайморової пазухи та бічної стінки носа за допомогою синус-елеваторів і піднімали на висоту бажаного збільшення. Простір, що утворився між дном синуса і куполом мембрани, заповнювали трансплантатом, попередньо змоченим розчином антибіотика та антисептика

(діоксидин, хлоргексидину біглюконат 0,05%). Трансплантат рівномірно розподілявся по об'єму та ущільнювався із зусиллям до 150 г/см². Контролювали цілісність шнейдерової мембрани, а також оцінювали ступінь васкуляризації реципієнтної зони за швидкістю змочування аугментату кров'ю. Вікно в передній стінці верхньощелепної пазухи закрили мембраною (PLA), наклали та зашили слизово-періостальний клапоть і призначили стандартну протизапальну терапію. Шви були зняті на десятю добу, ускладнень в післяопераційному періоді не спостерігалось.

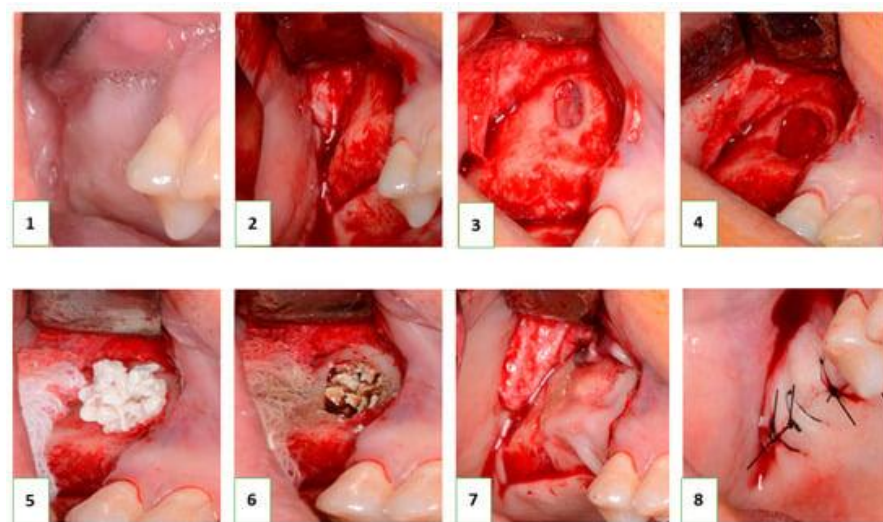


Рисунок 4.2. Процедура синус-ліфтингу (опис в тексті): 1 — права верхня кістка, дефект зубної дуги; 2 — сформовано та відшаровано трапецієподібний слизово-періостальний клапоть, скелетовано альвеолярний відросток і передню стінку правої верхньощелепної пазухи; 3 — у передній стінці правої верхньощелепної пазухи утворилось вікно; 4 — мобілізація мембрани Шнейдера до висоти запланованого збільшення; 5 — навантаження, розподіл і ущільнення трансплантата в ділянці нижньої стінки правої верхньощелепної пазухи; 6—Контроль ступеня васкуляризації реципієнтної ділянки та контроль цілісності мембрани Шнейдера; 7 — введення мембрани APRF під слизово-періостальний клапоть у ділянці вікна на передній стінці верхньощелепної пазухи; 8 — слизово-періостальний клапоть повернений у вихідне положення і рану наглухо зашито.

У всіх випадках імплантація була рекомендована пацієнтам через 8 місяців. На наступному етапі виконувалась установка гвинтових імплантатів за стандартним протоколом з одночасним взяттям фрагмента кістки із зони аугментації за допомогою трубчастого бора. Терміни імплантації становили

від 8 до 12 місяців і визначалися виходячи з клінічної ситуації. Це клінічне дослідження включало 6 клінічних випадків з детальним аналізом біопсії тканини перед імплантацією.

8 Гістологічна оцінка кісткової аугментації за допомогою HA/ β -ТСР

Втручання та подальша біопсія були виконані відповідно до Гельсінської декларації. Протокол дослідження схвалено етичним комітетом (протокол № 12-75/19). Усі пацієнти дали свою інформовану згоду перед зарахуванням у дослідження, і всі пацієнти успішно завершили дослідження та отримали можливість безкоштовного повторного огляду після втручання.

Зразки, отримані після біопсії, негайно фіксували зануренням у 10% забуферений формалін на 24–48 год з подальшою декальцифікацією в EDTA (4,1% розчин динатрію етилендіамінтетраоцтової кислоти). Після завершення декальцинації проводили обробку біоптатів за стандартним протоколом з подальшим депонуванням у парафін (Парапласт). Парафінові блоки розрізали на 4–5 мкм, а гістологічні предметні скла фарбували гематоксилином і еозином, а також толуїдиновим синім для звичайного гістологічного дослідження. Дослідження гістологічних зразків проводили з використанням параметрів, адаптованих з тих, що використовувалися для оцінки загоєння та ремоделювання кістки. Частки простору, заповненого кістковими трабекулами, наноматеріалом трансплантата та сполучною тканиною, вимірювали гістоморфометрично [205]. Крім того, товщину кісткових трабекул вимірювали в трьох областях трьох серійних зрізів у трьох репрезентативних областях при великому збільшенні (Leica Microsystems GmbH, Вецлар, Німеччина). Інтенсивність остеогенезу оцінювали напівякісно за такою бальною системою: 0 = відсутність особливостей остеогенезу; 1 = формування кістки навколо трансплантата (наприклад, гранульоми) з появою остеобластів і відкладенням остеοїду; 2 = утворення кісткової тканини навколо трансплантата з первинними ознаками кістки; 3 = утворення кісткових трабекул навколо трансплантатів з особливостями активного ремоделювання (виявлення пластинчастої кістки з первинними остеонами та остеοцитами, виявлення судин, залишки фіброзної кістки в пластинчастій кістці та залишки

наноматеріалу для заміни кістки, вбудованого в/на кістку); 4 = зріла пластинчаста кістка з остеонами [224]. Крім того, оцінювали імунну реакцію на NanoGraft (NG) за допомогою напівкількісної оцінки за такою схемою: 0 = немає; 1 = пухкі інфільтрати, дисеміновані або вогнищеві; 2 = щільні, помірно великі лімфоцитарні інфільтрати; 3 = великі, щільні лімфоцитарні інфільтрати з набряком і вогнищевими гігантськими клітинами; 4 = виражена запальна реакція, включаючи гігантські клітини та некроз [239]. Оцінку проводили два незалежні спостерігачі наосліп.

9 Імуногістохімічне дослідження

Для аналізу реакції тканин і клітин хазяїна на NanoGraft було проведено імуногістохімічне (ІНС) дослідження. Серійні зрізи товщиною 4 мкм вирізали, депарафінували та гідратували. Активність ендогенної пероксидази блокували за допомогою 3% метанолу в перекису водню. Після вилучення антигену проводили інкубацію з первинними антитілами. Після промивання до предметних стекол додавали мічені полімерні вторинні антитіла (Envision Detection System, Dako). Активність пероксидази була виявлена за допомогою діамінобензидину (DAB), що дало продукт коричневого фарбування. Скельця контрастно фарбували гематоксиліном Майєра. Для ІНС використовували наступні біомаркери: CD8 (DAKO; Clone C8/144B) використовували для візуалізації цитотоксичних Т-клітин як ефекторних клітин клітинно-опосередкованого імунітету, а FOXP3 (Cell Marque, Clone EP340) використовували для оцінки Т-регуляторів лімфоцити, що виробляють протизапальні та профіброгенні агенти. CD68 (DAKO, Clone KP1) і CD163 (Cell Marque, Clone MRQ-26) використовували для оцінки макрофагів типів M1 і M2. Для оцінки ангиогенезу ми використовували антитіла проти CD34 (DAKO, Clone QBEnd 10). Нарешті, для аналізу остеогенного потенціалу трансплантата було застосовано SATB2 (Cell Marque, Clone EP281) як маркер диференціації остеогенної лінії.

Щоб оцінити вплив аугментації на загальний результат, була проведена гістоморфометрія з оцінкою частки зразка, заповненого кістковою тканиною, наноматеріалом трансплантата та сполучною тканиною. Для оцінки

потенційного імуногенного ефекту біонаноматеріалу, використаного для аугментації, досліджували інтенсивність запалення за допомогою напівкількісного аналізу. Крім того, наявність і щільність клітин вродженого та адаптивного імунітету вважалися адаптивними. Оцінювали реакції про- (CD68+) та протизапальних (CD163+) підтипів макрофагів. Крім того, оцінювали щільність імунореактивних (CD8+) та імуносупресивних (FOXP3+) Т-клітин. Щоб розглянути ангиогенез, кількість судин оцінювали з використанням клітин, позитивних на судинний біомаркер CD34. Характеристики біомаркерів представлені в таблиці 4.1.

Таблиця 4.1. Характеристики біомаркерів, що використовуються для імуногістохімічної оцінки аугментаційних біоптатів.

Biomarker	Description	Antibody Manufacturer	Clone
CD8	CD8 is an integral membrane glycoprotein found on the surface of cytotoxic T lymphocytes.	DAKO, Agilent	C8/144B
FOXP3	Forkhead Box P3 (FOXP3) is a transcription regulator, essential for the development and suppressive function of regulatory T cells (Treg).	Cell Marque,	EP340
CD68	CD68 antigen is a member of the lysosomal/endosomal-associated membrane glycoprotein family typical for human monocytes and macrophages. It is also expressed in bone osteoclasts (Ashley JW, 2011).	DAKO, Agilent	KP1
CD163	CD163 is a macrophage-associated scavenger receptor, typically expressed in alternatively activated M2 type macrophages.	Cell Marque	MRQ-26
CD34	CD34 is an adhesion molecule marking endothelial cells at the sites of active angiogenesis (Siemerink MJ, 2012).	DAKO, Agilent	QBEnd 10
SATB2	SATB2 is a protein binding to DNA that is involved in transcriptional regulation of gene expression during osteoblast differentiation. It is involved in pre-osteoblast proliferation as well (Dowrey T, 2019).	Cell Marque	EP281

Щоб зробити висновок про остеогенні властивості трансплантата, ми оцінили формування кісткової тканини, вимірявши частку кісткових трабекул у зразку та щільність і просторовий розподіл остеогенних клітин, виділених SATB2. Цифрові фотографії гістологічних та імуногістохімічних зразків були зроблені за допомогою цифрової камери (Leica Microsystems), розміщеної над світловим мікроскопом (Leica Microsystems).

РЕЗУЛЬТАТИ

1 Електроосадження поліпіролу з молекулярним відбитком

Новий НА/β-ТСП – це наноматеріал, представлений гранулами із середнім розміром $1,4 \pm 0,30$ мм у діаметрі зі сполученими порами. Розмір пор змінювався від $25 \pm 3,8$ мкм до $196 \pm 25,6$ мкм у поперечному вимірі (рис. 3). Пори утворюються за рахунок елімінації органічної фази під час циклу заморожування та нагрівання (від -80 °С до 900 °С). Утворення пор забезпечить проникнення крові та клітин, що є критичним для остеокондуктивності та остеointegraції [240]. Беручи до уваги різну поведінку деградації НА та ТСП, останній буде видалено з трансплантата протягом короткого періоду часу (приблизно 2–3 тижні) [241] і буде замінено новоутвореною кістковою тканиною. Ця особливість нового НА/β-ТСП підтримуватиме баланс між резорбцією наноматеріалів і вrostанням кісткової тканини.

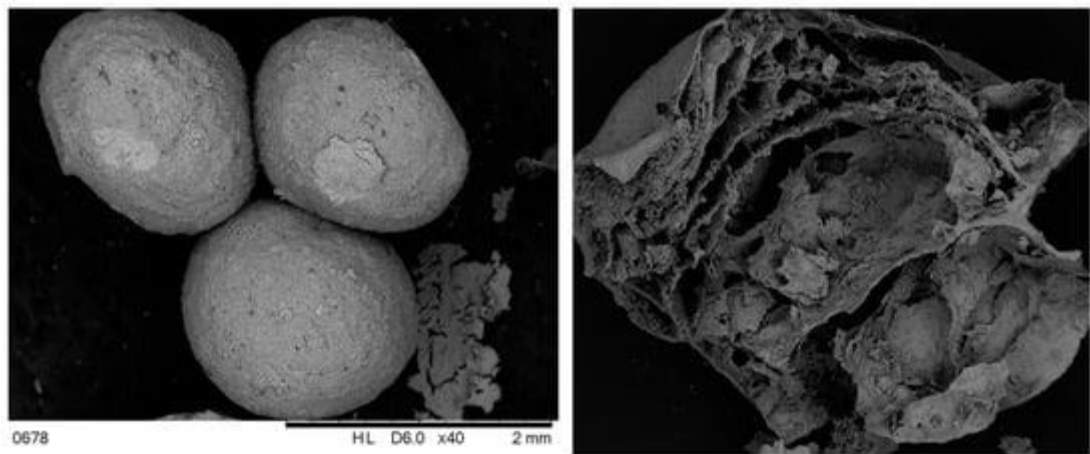


Рисунок 4.3 – Скануюча електронна мікроскопія біоактивного наноматеріалу НА/β-ТСП (ліворуч, збільшення $\times 40$) із зображенням поперечного перерізу (праворуч, збільшення $\times 100$).

На рисунку 4.4 представлені спектри FT-IR біоактивного наноматеріалу НА/β-ТСП. Піки поглинання, розташовані при 1018 cm^{-1} , виникли внаслідок асиметричного розтягування (ν_3) PO_4^{3-} , а при 561 і 599 cm^{-1} були приписані сигналам вигину (ν_4) PO_4^{3-} відповідно. Симетричні валентні сигнали (ν_1 і ν_2) PO_4^{3-} також спостерігалися приблизно при 961 cm^{-1} , тоді як слабкий різкий пік

при 3568 cm^{-1} відповідав валентним коливанням іонів решітки OH^- . Типові смуги HA , які можна віднести до асиметричного розтягування PO_4^{3-} , розташованого на частоті коливань 1018 cm^{-1} (ν_3), $599\text{--}561\text{ cm}^{-1}$ (ν_4), і валентного коливання O-H при 3368 cm^{-1} , були виявлені в отриманому зразку гідроксиапатиту. Смуги приблизно $1400\text{--}1415\text{ cm}^{-1}$ (ν_3) і 870 cm^{-1} (ν_2) також можна спостерігати через присутність CO_3^{2-} [242].

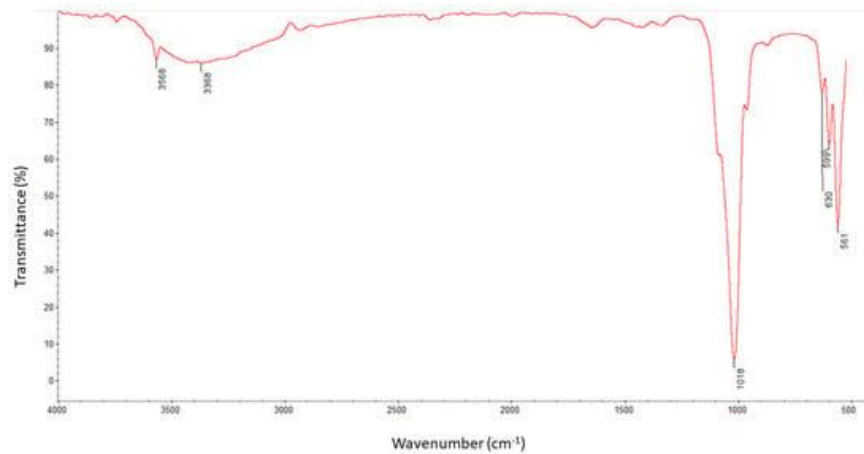


Рисунок 4.4 – Аналіз FTIR біоактивного кісткового трансплантата.

Результати XRD-аналізу (рис. 4.5) показують, що підготовлений зразок відповідає гідроксиапатиту (JCPDS 9-0432). HA можна назвати нестехіометричним через невеликий зсув основних піків вправо. Після обробки зразків при $900\text{ }^\circ\text{C}$ спостерігається додаткова фаза $\beta\text{-TCP}$. Відповідає картці (JCPDS 09-169) [236]. Дифрактограми, отримані для готового зразка, підтверджують наявність погано кристалічної фази апатиту без інших додаткових піків для порошку. Проте прожарювання при $900\text{ }^\circ\text{C}$ вплинуло на формування фази $\beta\text{-TCP}$ для спеченого зразка, що можна пояснити перетворенням апатиту з дефіцитом кальцію на двофазні суміші HA та $\beta\text{-TCP}$, як видно з рисунка 4. Одновалентні іони, включаючи Na^+ замість Ca^{2+} , у структурі апатиту викликають дисбаланс зарядів, який можна нейтралізувати створенням додаткових вакансій [243] або виникненням одночасних заміщень катіонів та аніонів, як, наприклад, у випадку заміщення Ca^{2+} на Na^+ і PO_4^{3-} CO_3^{2-} , без утворення вакансій або втрати балансу заряду [242-44].

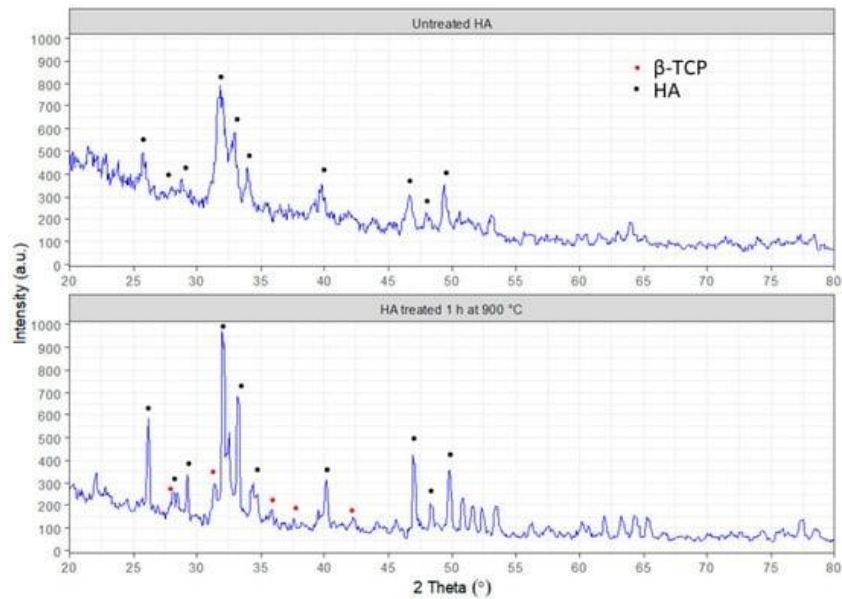


Рисунок 4.5 – XRD синтезованого гідроксиапатиту з дефіцитом кальцію у вигляді готового висушеного порошку (верхнє зображення) та спеченого порошку при 900 °C (нижнє зображення).

2 Результати тесту на згортання крові, біосумісності та експериментів на тваринах

Клітини остеобластів продемонстрували остеоіндуктивні моделі нового біоактивного наноматеріалу HA/β-TCP: аналіз життєздатності клітин показав значно краще прикріплення клітин на 1-й день, а також проліферацію остеобластів на 3-й і 5-й дні порівняно з контролем TCP (рис. 4.6А). Неорганічний фосфат кальцію відомий як природний стимулятор проліферації та диференціювання кісткових клітин [244], і завдяки β-TCP новий наноматеріал продемонстрував передові остеоіндуктивні властивості. Крім проліферації клітин, новий наноматеріал продемонстрував стимуляцію експресії колагену — рівень колагену на 1 і 2 тижнях збільшився вдвічі порівняно з контролем TCP. У попередніх дослідженнях ми продемонстрували, що ГК може бути специфічним фактором для стимуляції експресії колагену, але тут комбінація як ГК, так і β-TCP забезпечила значну перевагу для нових біологічно активних наноматеріалів як заміника кістки.

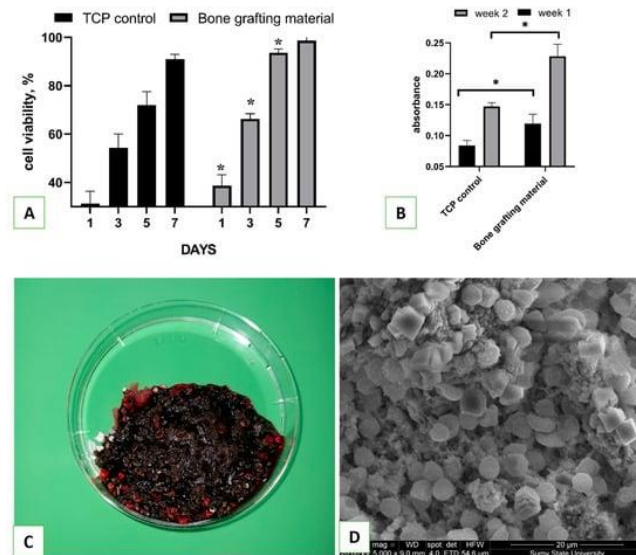


Рисунок 4.6 – Аналіз життєздатності клітин остеобластів людини протягом 7 днів культивування з біоактивним наноматеріалом HA/β-TCP (A) з аналізом продукції колагену через 1 і 2 тижні після посіву клітин (B). *— статистична значущість ($p \leq 0,05$ між контрольною та експериментальною групами). Зображення утворення тромбу протягом однієї хвилини після взаємодії матеріалу з кров'ю людини (C) із SEM-зображенням біоактивного наноматеріалу HA/β-TCP (D) після експерименту згортання крові.

Відразу після нанесення біоматеріалу під час процедури синус-ліфтингу відбувається його контакт з кров'ю, що є початковою фазою організації тканин. Експеримент із взаємодією крові продемонстрував, що середній час утворення тромбу при контакті з гідроксиапатитом становив 55 ± 17 секунд. Хоча наноматеріал був гідрофільним, він не поглинав весь об'єм крові без деякого змішування. Однак, після формування згусток, міцно прилипав до окремих фрагментів зразків, а також до дна чашки (Рис. 4.6C). Навпаки, цільна кров у чашках Петрі без матеріалу для трансплантації кістки згорталася за $3,4 \pm 22$ хвилини. Цікаво, що коли цільну венозну кров вводили до гідроксиапатиту, відбулася швидка зміна кольору від темно-червоного до яскраво-червоного із зеленим відтінком, що вказує на взаємодію між кров'ю та матеріалом. Навпаки, кров без будь-яких проб залишалася темно-червоною. SEM аналіз продемонстрував, що біоактивний наноматеріал HA/β-TCP був покритий клітинами крові, головним чином тромбоцитами та еритроцитами, з

утворенням тонких фібринових волокон (рис. 6D). Відомо, що іони Ca можуть стимулювати АДФ-індуковану агрегацію тромбоцитів людини та сприяти перетворенню фібриногену у фібрин [245]. У нашому експерименті ми можемо спостерігати утворення тромбу після взаємодії з кров'ю, яка створила «природний органічний каркас» навколо біоактивного кісткового трансплантата, який міг стимулювати утворення нової кістки після розміщення матеріалу в гайморовій пазусі.

Утворення нової кістки в експерименті на тваринах проходило через утворення гематоми та стадії запалення з грануляцією (7-й день), початком утворення нової кістки (14-й день), утворенням зрілої кістки (28-й день) та ремоделюванням (не виконано в нашому експерименті). І контрольна, і експериментальна групи продемонстрували нормальний остеогенез, але група НА/β-ТСР мала деякі важливі відмінності (рис. 4.7). Залишок матеріалів для трансплантації кістки на 7-й день дозволив утворити компактну зернисту тканину з більш швидким вrostанням кістки на 14-й день. У другий часовий проміжок ми спостерігали більш швидку кальцифікацію, ймовірно, через додаткове джерело неорганічного Ca та P з фази β-ТСР. На 28 день новоутворена кістка в групі НА/β-ТСР продемонструвала більш компактну структуру та утворення зрілих остеонів. Залишки біологічно активних матеріалів все ще були присутні, демонструючи низьку біорезорбцію фази ГК у новому наноматеріалі.

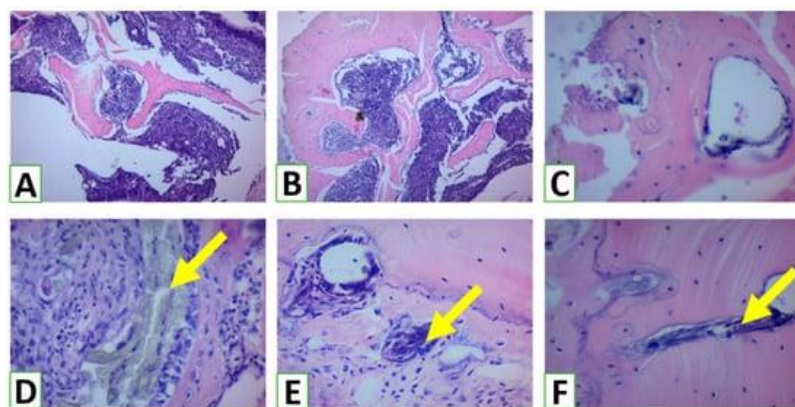


Рисунок 4.7 – Гістологічна оцінка зони кісткового дефекту після травми на 7, 14 та 28 день у контрольній групі (А–С) та після застосування

біоактивного матеріалу HA/β-TCP (D–F). Стрілки демонструють залишки наноматеріалу HA/β-TCP. Забарвлення гематоксиліном і еозином. Збільшення ×100.

3 Результати клінічних досліджень

Після процедури синус-ліфтингу протягом 8–12 місяців спостереження у жодного пацієнта не було суттєвих ускладнень. З метою відновлення кісткової тканини всім пацієнтам через 6 місяців проводили контрольну КТ та проводили контроль якості кісткової тканини. У період від 8 місяців до 1 року ми спостерігали формування якісної кісткової тканини, яка б дозволяла встановити зубний імплант. На малюнку 8 (прикладний випадок) представлено КТ пацієнта з повною беззубістю верхньої щелепи та дефіцитом об'єму кісткової тканини в бічних відділах верхньої щелепи (рисунок 4.8А). Через 6 місяців після синус-ліфтингу за допомогою нового біоактивного наноматеріалу HA/β-TCP ми спостерігали утворення нової кісткової тканини всередині матеріалу (рис. 4.8В,С). Процедура імплантації, виконана через 9 місяців після синус-ліфтингу з новим наноматеріалом (рис. 4.8D), не показала клінічних ускладнень у ранньому післяопераційному періоді.

Перед імплантацією була проведена біопсія кістки після отримання інформованої згоди. Оцінка біоптатів тканин показала гістологічні особливості остеогенезу з ознаками активного ремоделювання кісткової тканини. Більші площі біоптатів були заповнені розгалуженими кістковими трабекулами різної товщини від 20 до 190 мкм. Гістоморфометрія показала, що кісткові трабекули займали $44,6 \pm 1,73$ % (95 % СІ 41,1–48,2 %) об'єму тканини біопсії (рис. 4.9). При цьому сполучна тканина та залишки біонаноматеріалу становили відповідно $46,6 \pm 1,70$ % (95 % СІ 43,1–50,1 %) та $9,7 \pm 0,99$ (95 % СІ 7,6–11,8 %).

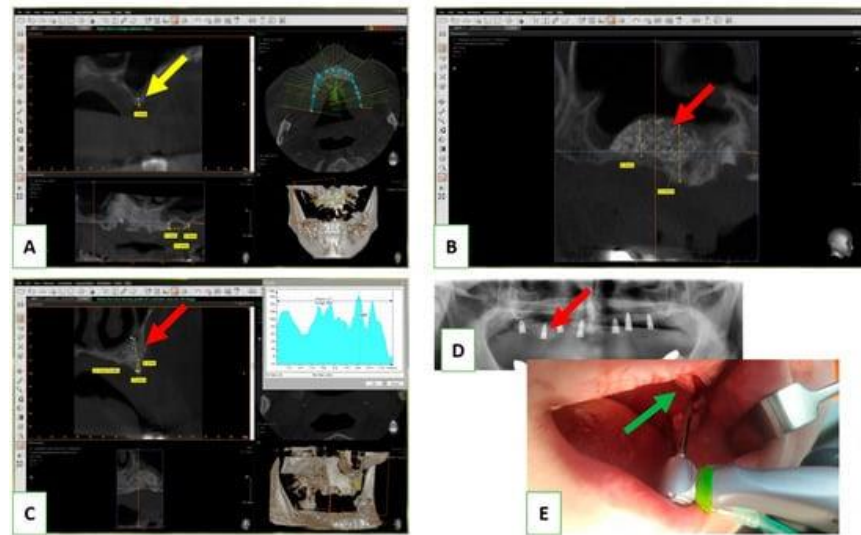


Рисунок 4.8 – КТ пацієнта з повною адентією верхньої щелепи та дефіцитом об'єму кісткової тканини бічних відділах верхньої щелепи до синус-ліфтингу (А); 6 місяців після процедури (В,С); після операції імплантації зубів (D) із забором кісткової тканини (Е). Жовта стрілка — місце дефіциту кістки; червона стрілка — біоактивний наноматеріал HA/β-TCP; зелена стрілка — місце забору кістки.

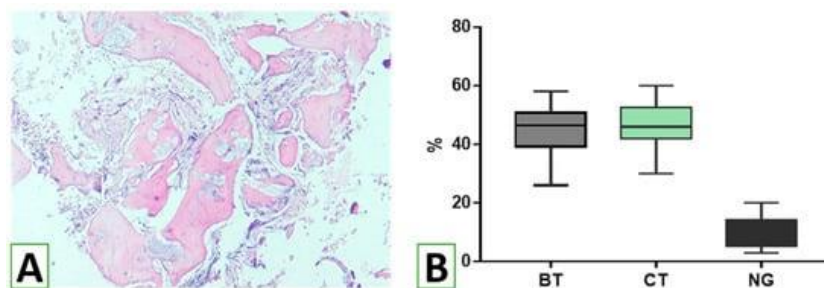


Рисунок 4.9 – Структурні компоненти зон синус-ліфтингу. Видно особливості остеогенезу в місці розширення пазухи (А). Навколо залишків HA/β-TCP (NG) виявляються численні кісткові трабекули (BT) різної товщини та структури. Проміжки між кістковими трабекулами заповнені сполучною тканиною (СТ). Структурна оцінка тканини з біопсії (В) виявила рівні об'єми кісткових трабекул (BT) і сполучної тканини (СТ) і невеликі залишки HA/β-TCP (NG). (А) — гістологічний препарат біоптату із зон збільшення. Фарбування гематоксилином і еозином. Збільшення $\times 40$.

Загалом остеогенез здебільшого оцінювався як 3 (понад 40% трабекул) за шкалою (табл. 4.2). Кісткові трабекули 2-го та 4-го балів були знайдені майже в 20–28%, і лише деякі ділянки являли собою початкові фази остеогенезу (рис. 4.10). У більшості випадків виявлені ознаки активного ремоделювання. Були виявлені товсті трабекули, в яких відсутні залишки $\text{NA}/\beta\text{-TSP}$, але ознаки заміщення первинної кісткової тканини на вторинну. Первинна кісткова тканина з хаотичною організацією матриксу і лакун, що містять остецити, була оточена пластинками вторинної кісткової тканини з правильно організованими світлими і темними кістковими пластинками.

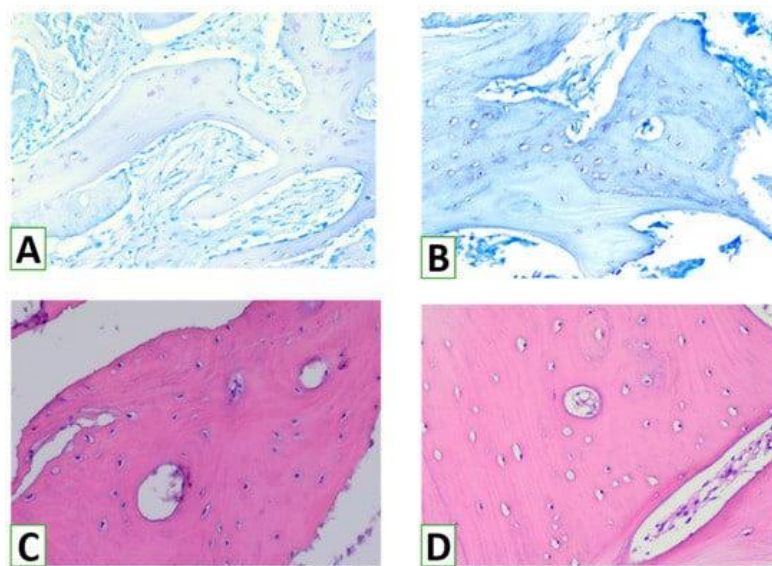


Рисунок 4.10 – Неоднорідність будови та зрілості кісткових трабекул в межах зон аугментації. Більшість кісткових трабекул відповідали 2–3 балам остеогенезу. Залишки $\text{NA}/\beta\text{-TSP}$ були в основному резорбовані та оточені первинною кісткою (А), з нерегулярним утворенням матриці та розподілом остеоцитів, які пізніше були замінені вторинною кісткою (В), з добре помітними пластинами та правильною орієнтацією остеоцитів у лакунах (С), з подальшим утворенням остеоцитів навколо каналів з кровоносними судинами (D). (А, В) — фарбування толуїдиновим синім, що демонструє новоутворені кісткові трабекули, утворені первинною кісткою, з подальшою заміною вторинною кісткою. Збільшення $\times 100$. (С, D) — фарбування гематоксиліном і еозином, що відображає дозрівання кісткових трабекул, утворених вторинною кісткою з остеонами. Збільшення $\times 200$.

Таблиця 4.2. Характеристика остеогенезу в біоптатах зон синус-ліфтингу.

Score	Description	The Rate of Trabeculae Having the Corresponding Features
0	Freely situated biomaterial. No features of osteogenesis around the remnants of the biomaterial.	3.2%
1	There are osteoblasts and osteoid around or within the graft	4.9%
2	The primary (reticulofibrose) bone with osteoblasts and osteocytes surrounds or interferes with the remnants of the graft. There are features of initial remodeling.	21.3%
3	The bone trabeculae are formed by secondary (lamellar) bone with primary osteons, osteocytes, and vessels. The remnants of primary bone and biomaterial are present.	42.5%
4	There is mature secondary bone with conventional osteons.	27.1%

Особливості ремоделювання були пов'язані з щільною інфільтрацією навколишньої сполучної тканини макрофагами (з численними клітинами CD163+). Цікаво, що велика кількість CD68+ клітин (включаючи макрофаги та великі остеокласти) була розподілена навколо залишків NG і між трабекулами, тоді як CD163+ макрофаги були численні як поблизу, так і навколо кісткових трабекул (Рисунок 4.11.). Архітектоніка кісткових трабекул пронизана протоками, заповненими сполучною тканиною з численними судинами. ІРС виявила численні клітини CD34+. Крім того, різні судини були знайдені навколо формування кістки, демонструючи хороше кровопостачання. Поверхня мережі кісткових трабекул була покрита шаром остеобластів, позитивних на SATB2. Крім того, численні рекрутовані остеогенні клітини візуалізувалися навколо кісткових трабекул або в периваскулярних областях. Загалом оцінка кількості різних клітин продемонструвала переважання макрофагів і остеогенних клітин у зонах аугментації (рис. 4.11F).

Оцінка імунної інфільтрації та адаптивної відповіді імунних клітин продемонструвала, що HA/β-TCP був імуноінертним. Загалом бал для запальної реакції був низьким (рис. 4.12). Запальну інфільтрацію оцінювали як 0 або 1. Гістологічне дослідження не виявило ознак гострого чи хронічного запалення в досліджуваних зразках. В одному випадку спостерігався лише незначний локальний запальний інфільтрат із незначним накопиченням лімфоцитів у сполучній тканині з новоутворених кісткових трабекул. ІГХ

виявила дефіцит CD8+ клітин. У той же час ми не виявили клітин FOXP3+ у досліджуваних зразках.

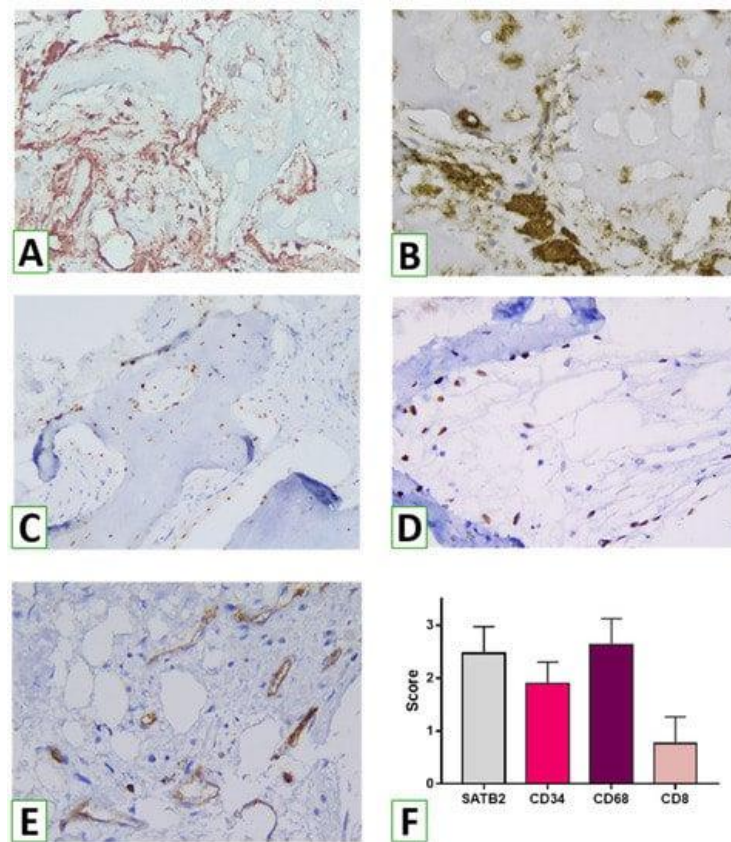


Рисунок 4.11 – Типи клітин всередині зон збільшення синусів. На поверхні та між кістковими трабекулами виявлено численні макрофаги (A) та макрофаги остеокластів (B). Збільшення синусів за допомогою HA/ β -TSP було пов'язане з диференціюванням і рекрутуванням остеогенних клітин (C, D), виявлених у кістковій тканині та в сполучній тканині між трабекулами. Ремоделювання кістки також супроводжувалося ангиогенезом (E). (A) — численні CD163+ макрофаги навколо та між трабекулами, ІНС, збільшення $\times 40$; (B) — CD68+ остеокласти на поверхні резорбованих трабекул, ІНС, збільшення $\times 400$; (C, D) — остеогенні клітини (SATB2+) навколо та між новоутвореними трабекулами, ІНС, збільшення $\times 100$ та $\times 400$ відповідно. (E) — CD34+ ендотеліальні клітини, що відображають ангиогенез, ІНС, збільшення $\times 400$. (F) — стовпчаста діаграма, що демонструє напівкількісні оцінки різних клітин.

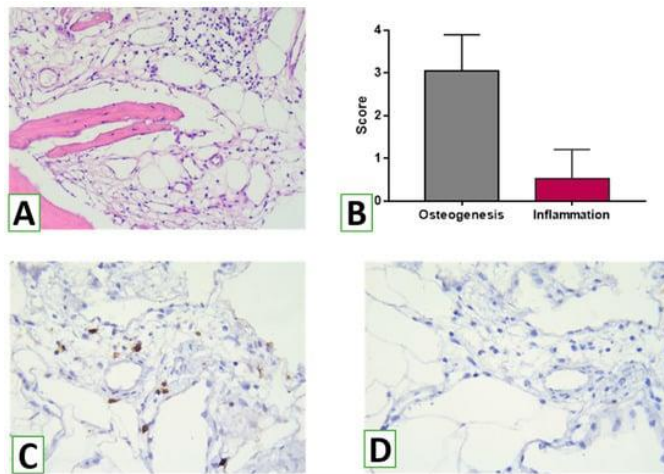


Рисунок 4.12 – Легка запальна інфільтрація сполучної тканини пародонта в місці нарощення (А) з невеликою кількістю Т-цитотоксичних клітин (Б) і відсутністю Тreg-лімфоцитів. (А) — забарвлення гематоксиліном та еозином. Збільшення $\times 100$. (Б) — стовпчаста діаграма, що відображає показники остеогенезу та імунної реакції на HA/ β -ТСР у зонах збільшення. (С, D) — імуногістохімія з використанням моноклональних антитіл до CD8 і FOXP3. Збільшення $\times 400$.

ОБГОВОРЕННЯ

Отримані в дослідженні дані свідчать про ефективне використання наноматеріалу HA/ β -ТСР з клітинами та тканинами альвеолярних відростків. У більшості випадків залишки біоматеріалу були виявлені в кісткових трабекулах, і лише невелика частина була виявлена екстратрабекулярно, демонструючи високу інтеграцію наноматеріалу з новоутвореною кістковою тканиною в зоні синус-ліфтингу. Слід підкреслити, що біоматеріал, використаний для синус-аугментації, був імунологічно неактивним. За даними гістоморфометричного аналізу, значна площа залишків трансплантата в зонах аугментації контактувала з новоутвореною кістковою тканиною, що відображає механізми остеокондуктивного ефекту нового біоактивного наноматеріалу HA/ β -ТСР. Як показали попередні дослідження, кількість новоутвореної кістки, залишків трансплантата та компонентів сполучної тканини значно варіюється при використанні різних матеріалів для синус-ліфтингу [251]. Наприклад, використання аутогенної кістки більшою мірою

стимулювало остеогенез порівняно з двофазним фосфатом кальцію (ВСП) [252]. За даними цього дослідження, через 6–8 місяців після синус-ліфтингу відсоток новоутвореної кістки в зоні аугментації становив 28,2% і 36,8% для ВСП аутогенної кістки відповідно. Більшість ділянок займала сполучна тканина – 38,9 % та 58,4 % відповідно. У цьому випадку фрагменти залишків ВСП становили до 32,9%, що відображає обмежену біодеградацію матеріалу. Натомість при використанні аутогенної кістки фрагменти її залишків становили в середньому 4,8% загального об'єму біоптатів із зон аугментації, що є підставою для позиціонування цього матеріалу як золотого стандарту [253]. Отримані в дослідженні результати значно перевищують показники для ВСП і наближаються до параметрів при використанні аутологічної кісткової тканини, що фактично відображає високу біосумісність і, водночас, відповідну біодеградацію нового НА/β-ТСП, який виконував роль провідника для формування власної кісткової тканини. Результати продемонстрували переваги використання нового НА/β-ТСП порівняно з алогенною кісткою, що призвело до утворення нової кістки лише на $18,65 \pm 12,20\%$, $25,93 \pm 12,36\%$ залишкового алогенного матеріалу та $53,45 \pm 10,34\%$ сполучної тканини [254]. Однак слід зазначити, що нещодавні клінічні дослідження використання комбінованих скаффолдів на основі гідроксиапатиту та полімолочної кислоти або поліетиленіміну, які поєднують характеристики біорозкладаних полімерів і біокераміки, дали результати, порівняні з тими, що представлені в цьому дослідженні [255].

Гістоморфометричний аналіз дав змогу оцінити не лише пропорцію та взаємодію між новоутвореною кісткою та залишками нового матеріалу НА/β-ТСП, але й визначити ступінь дозрівання новоутвореної кісткової тканини в зоні використання трансплантата. Згідно з даними дослідження, більшість кісткових трабекул у біоптатах зон аугментації відповідали третьому етапу остеогенезу — ремодельованню кістки із заміщенням грубоволокнистої кісткової тканини пластинчастою. При цьому ознаки високої зрілості з наявністю остеонів виявлено більш ніж у чверті трабекул. Отримані дані порівнювали з даними дослідження п'яти інших кісткових матеріалів [229].

Формування кістки та ефективний прямий остеогенез фактично є результатом діяльності клітин кісткової тканини — насамперед остеобластів і остеокластів, які беруть участь у процесах остеогенезу та ремоделювання кістки.

У цьому дослідженні було виявлено значну кількість остеогенних клітин, що експресують SATB2, у зоні збільшення. Окрім клітин SATB2⁺ на поверхні кісткових трабекул, значна кількість комітованих остеогенних клітин вільно знаходилась у сполучній тканині між трабекулами. Ці SATB2-позитивні клітини можуть насправді відповідати індукованим клітинам-попередникам, які були залучені в процес остеогенної диференціації. Така картина може відображати остеоіндуктивний потенціал наноматеріалу HA/β-TCP, який стимулював диференціацію та міграцію остеогенних клітин до зон остеогенезу.

Згідно з результатами гістологічних та імуногістохімічних досліджень, використання нового наноматеріалу HA/β-TCP супроводжувалося ознаками незначної запальної реакції. У біоптатах були виявлені лише невеликі дифузні лімфогістіоцитарні інфільтрати, які, на думку різних авторів, можуть бути наслідком транзиторної слабкої імунної відповіді у відповідь на пошкодження в зоні аугментації та нормального процесу ремоделювання кістки (Schmidt-Bleek K et in., 2012). Крім того, було виявлено лише невелику кількість CD8⁺ Т-клітин, які також відіграють роль в остеогенезі та ремоделюванні кістки [256]. Подібні дані були отримані Solakoglu Ö et al., які продемонстрували наявність невеликої кількості інфільтратів і наявність лімфоцитів CD3, CD4⁺ і CD8⁺ при використанні різних варіантів кісткових алотрансплантатів.

Важливо підкреслити, що в біоптатах тканин із зон аугментації під час дослідження не виявлено Т-регуляторних клітин, відповідальних за механізми імунної толерантності. Отримані результати можуть свідчити про первинну низьку імуногенність використаного кісткового наноматеріалу HA/β-TCP. Не можна також виключати роль інших механізмів протизапальної дії, пов'язаних з активністю різних підтипів макрофагів.

Окрім Т-лімфоцитів, макрофаги відіграють важливу роль і мають вирішальне значення для кісткового метаболізму та ремоделювання кісткової тканини [237]. Макрофаги представляють численну популяцію імунних клітин, присутніх у різних тканинах і органах. Традиційно макрофаги швидко накопичуються в пошкоджених ділянках або зонах інфекції, де вони відіграють критичну роль у вродженому імунитеті [257]. Крім того, макрофаги регулюють гомеостаз тканин і здійснення різних патофізіологічних процесів, включаючи вроджений і адаптивний імунитет, регенерацію, ангиогенез і канцерогенез. Крім того, макрофаги не тільки ініціюють запалення тканин, але також сприяють відновленню та ремоделюванню тканин [256]. У кістковій тканині макрофаги є невід'ємним компонентом процесу ремоделювання кістки, оскільки вони координують зв'язок між остеокластами та остеобластами та стимулюють анаболічні процеси, критичні для формування кісток [257].

Загально визнано, що макрофаги представляють спектр активованих фенотипів, а не дискретні стабільні субпопуляції. Дійсно, численні дослідження задокументували їхню гнучкість програмування, за допомогою якої макрофаги перемикаються з одного функціонального фенотипу на інший у відповідь на змінні сигнали з локального мікрооточення [258]. Схематично макрофаги класифікуються на дві підгрупи: класично активовані макрофаги (M1) та альтернативно активовані макрофаги (M2), хоча це надмірне спрощення, і фактичний спектр фенотипів макрофагів є більш складним [259].

Як показали результати цього дослідження, в біоптатах із зони аугментації були виявлені численні макрофаги, як CD68+, так і CD163+. Особливий інтерес викликала густа мережа CD163-позитивних M2 макрофагів. Xia Z та ін. (2006) раніше показали, що макрофаги є домінуючим типом клітин в інфільтраті, який утворюється у відповідь на імплантацію біонаноматеріалів як у м'які, так і в тверді тканини. Ці клітини та їх варіанти, включаючи багатоядерні гігантські клітини чужорідного тіла, є частиною запальної відповіді та реакції на чужорідний матеріал, яка виникає під час будь-яких втручань із залученням біологічних матеріалів. Крім того,

макрофаги відіграють важливу роль у біодеградації біоматеріалів, що використовуються для імплантації, шляхом ініціації фагоцитозу та позаклітинних механізмів деградації.

Примітка. Матеріали розділів 2-4 ґрунтуються на публікації керівника і відповідального виконавця проєкту:

Mishchenko O, Yanovska A, Sulaieva O, *Moskalenko R*, Pernakov M, *Husak Y*, Korniienko V, Deineka V, Kosinov O, Varakuta O, et al. From Synthesis to Clinical Trial: Novel Bioinductive Calcium Deficient HA/ β -TCP Bone Grafting Nanomaterial. *Nanomaterials*. 2023; 13(12):1876.
<https://doi.org/10.3390/nano13121876>

5 ВИСНОВКИ

На завершення, розробка та оцінка нового наноматеріалу для трансплантації кісткової тканини з дефіцитом кальцію HA/ β -TCP, представленого в цьому дослідженні, продемонструвала його потенціал для широкого клінічного застосування в щелепно-лицевій хірургії та загальній практиці ортопедії. Двоступеневий синтез зі стадіями заморожування та прожарювання призводить до отримання високопористого наноматеріалу з ефективними остеокондуктивними властивостями, тоді як фаза β -TCP забезпечує матеріал із високою біосумісністю, остеоіндуктивними властивостями та здатністю до згортання крові. Фаза ГК врівноважує механічні властивості та забезпечує структурну цілісність на всіх етапах остеогенезу. Клінічні випробування показали передові біоіндуктивні властивості, індукуючи рекрутинг остеогенних клітин, пряму активацію остеогенезу та ангиогенезу без значної імунної реакції. Унікальне поєднання структурної цілісності, властивостей деградації та біоактивної відповіді робить цей біонаноматеріал перспективним кандидатом для широкого спектру клінічних застосувань у регенерації та нарощуванні кісткової тканини. Необхідні подальші дослідження, щоб вивчити весь його потенціал і оптимізувати його клінічне застосування.

ПЕРЕЛІК ДЖЕРЕЛ ПОСИЛАННЯ

1. Tran, S.D.; Bakkar, M.O.; Sumita, Y.; Kishimoto, N. Regenerative dentistry in periodontics. *Saudi Dent. J.* 2019, 31, 301–302. <https://doi.org/10.1016/j.sdentj.2019.05.002>.
2. Raggatt, L.J.; Partridge, N.C. Cellular and Molecular Mechanisms of Bone Remodeling. *J. Biol. Chem.* 2010, 285, 25103–25108. <https://doi.org/10.1074/jbc.r109.041087>.
3. Burge, R.; Dawson-Hughes, B.; Solomon, D.H.; Wong, J.B.; King, A.; Tosteson, A. Incidence and Economic Burden of Osteoporosis-Related Fractures in the United States, 2005–2025. *J. Bone Miner. Res.* 2006, 22, 465–475. <https://doi.org/10.1359/jbmr.061113>.
4. Einhorn, T.A.; Gerstenfeld, L.C. Fracture healing: Mechanisms and interventions. *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014, 11, 45–54. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2014.164>.
5. Raja, S.; Byakod, G.; Pudukalkatti, P. Growth factors in periodontal regeneration. *Int. J. Dent. Hyg.* 2009, 7, 82–89. <https://doi.org/10.1111/j.1601-5037.2009.00380.x>.
6. Sakkas, A.; Wilde, F.; Heufelder, M.; Winter, K.; Schramm, A. Autogenous bone grafts in oral implantology—Is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int. J. Implant. Dent.* 2017, 3, 23. <https://doi.org/10.1186/s40729-017-0084-4>.
7. Baldwin, P.; Li, D.J.; Auston, D.A.; Mir, H.S.; Yoon, R.S.; Koval, K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J. Orthop. Trauma* 2019, 33, 203–213. <https://doi.org/10.1097/bot.0000000000001420>.
8. Betz, R.R. Limitations of Autograft and Allograft: New Synthetic Solutions. *Orthopedics* 2002, 25, 561–570. <https://doi.org/10.3928/0147-7447-20020502-04>.
9. Ho-Shui-Ling, A.; Bolander, J.; Rustom, L.E.; Johnson, A.W.; Luyten, F.P.; Picart, C. Bone regeneration strategies: Engineered scaffolds, bioactive molecules and stem cells current stage and future perspectives. *Biomaterials* 2018, 180, 143–162. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2018.07.017>.

10. Shapiro, F. Bone development and its relation to fracture repair. The role of mesenchymal osteoblasts and surface osteoblasts. *Eur. Cells Mater.* 2008, 15, 53–76. <https://doi.org/10.22203/ecm.v015a05>.
11. Ferguson, C.; Alpern, E.; Miclau, T.; Helms, J.A. Does adult fracture repair recapitulate embryonic skeletal formation? *Mech. Dev.* 1999, 87, 57–66. [https://doi.org/10.1016/s0925-4773\(99\)00142-2.12](https://doi.org/10.1016/s0925-4773(99)00142-2.12).
12. Marsell, R.; Einhorn, T.A. The biology of fracture healing. *Injury* 2011, 42, 551–555. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.03.031>.
13. Vetter, A.; Epari, D.R.; Seidel, R.; Schell, H.; Fratzl, P.; Duda, G.N.; Weinkamer, R. Temporal tissue patterns in bone healing of sheep. *J. Orthop. Res.* 2010, 28, 1440–1447. <https://doi.org/10.1002/jor.21175>.
14. Lacroix, D.; Prendergast, P. A mechano-regulation model for tissue differentiation during fracture healing: Analysis of gap size and loading. *J. Biomech.* 2002, 35, 1163–1171. [https://doi.org/10.1016/s0021-9290\(02\)00086-6](https://doi.org/10.1016/s0021-9290(02)00086-6).
15. Hadjidakis, D.J.; Androulakis, I.I. Bone remodeling. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006, 1092, 385–396. <https://doi.org/10.1196/annals.1365.035>.
16. Dimitriou, R.; Jones, E.; McGonagle, D.; Giannoudis, P.V. Bone regeneration: Current concepts and future directions. *BMC Med.* 2011, 31, 66. <https://doi.org/10.1186/1741-7015-9-66>.
17. Bauer, T.W.; Muschler, G.F. Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2000, 371, 10–27.
18. Pountos, I.; Giannoudis, P.V. Fracture Healing: Back to Basics and Latest Advances. In *Fracture Reduction and Fixation Techniques: Upper Extremities*; Giannoudis, P.V., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2018; pp. 3–17; ISBN 978-3-319-68627-1, ISBN 978-3-319-68628-8 (eBook). <https://doi.org/10.1007/978-3-319-68628-8>.
19. Kozik, V.V.; Borilo, L.P.; Lyutova, E.S.; Brichkov, A.S.; Chen, Y.-W.; Izosimova, E.A. Preparation of CaO@TiO₂-SiO₂ Biomaterial with a Sol-Gel Method for Bone Implantation. *ACS Omega* 2020, 5, 27221–27226. <https://doi.org/10.1021/acsomega.0c0333520>.

20. Zhu, L.; Luo, D.; Liu, Y. Effect of the nano/microscale structure of biomaterial scaffolds on bone regeneration. *Int. J. Oral Sci.* 2020, 12, 6. <https://doi.org/10.1038/s41368-020-0073-y>.
21. Jiang, X.Q. Biomaterials for bone defect repair and bone regeneration. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2017, 52, 600–604.
22. Gouveia, P.F.; Mesquita-Guimarães, J.; Galárraga-Vinueza, M.E.; Souza, J.C.; Silva, F.S.; Fredel, M.C.; Boccaccini, A.R.; Detsch, R.; Henriques, B. In-vitro mechanical and biological evaluation of novel zirconia reinforced bioglass scaffolds for bone repair. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020, 114, 104164. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104164>.
23. Yedekçi, B.; Tezcaner, A.; Alshemary, A.Z.; Yilmaz, B.; Demir, T.; Evis, Z. Synthesis and sintering of B, Sr, Mg multi-doped hydroxyapatites: Structural, mechanical and biological characterization. *J. Mech. Behav. Biomed. Mater.* 2020, 115, 104230. <https://doi.org/10.1016/j.jmbbm.2020.104230>.
24. McNamara, S.L.; McCarthy, E.M.; Schmidt, D.F.; Johnston, S.P.; Kaplan, D.L. Rheological characterization, compression, and injection molding of hydroxyapatite-silk fibroin composites. *Biomaterials* 2021, 269, 120643. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2020.120643>.
25. Dewey, M.J.; Nosatov, A.V.; Subedi, K.; Shah, R.; Jakus, A.; Harley, B.A. Inclusion of a 3D-printed Hyperelastic Bone mesh improves mechanical and osteogenic performance of a mineralized collagen scaffold. *Acta Biomater.* 2021, 121, 224–236. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2020.11.028>.
26. Shao, Y.-F.; Qing, X.; Peng, Y.; Wang, H.; Shao, Z.; Zhang, K.-Q. Enhancement of mechanical and biological performance on hydroxyapatite/silk fibroin scaffolds facilitated by microwave-assisted mineralization strategy. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2021, 197, 111401. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111401>.
27. Haugen, H.J.; Lyngstadaas, S.P.; Rossi, F.; Perale, G. Bone grafts: Which is the ideal biomaterial? *J. Clin. Periodontol.* 2019, 46 (Suppl. S21), 92–102. <https://doi.org/10.1111/jcpe.13058>.
28. Safari, B.; Aghanejad, A.; Roshangar, L.; Davaran, S. Osteogenic effects of the bioactive small molecules and minerals in the scaffold-based bone tissue

- engineering. *Colloids Surfaces B Biointerfaces* 2021, 198, 111462. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2020.111462>.
29. Wang, X.; Xu, S.; Zhou, S.; Xu, W.; Leary, M.; Choong, P.; Qian, M.; Brandt, M.; Xie, Y.M. Topological design and additive manufacturing of porous metals for bone scaffolds and orthopaedic implants: A review. *Biomaterials* 2016, 83, 127–141. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2016.01.012>.
30. Eming, S.A.; Wynn, T.A.; Martin, P. Inflammation and metabolism in tissue repair and regeneration. *Science* 2017, 356, 1026–1030. <https://doi.org/10.1126/science.aam7928>.
31. He, J.; Chen, G.; Liu, M.; Xu, Z.; Chen, H.; Yang, L.; Lv, Y. Scaffold strategies for modulating immune microenvironment during bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2020, 108, 110411. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2019.110411>.
32. Wang, Q.; Tang, Y.; Ke, Q.; Yin, W.; Zhang, C.; Guo, Y.; Guan, J. Magnetic lanthanum-doped hydroxyapatite/chitosan scaffolds with endogenous stem cell-recruiting and immunomodulatory properties for bone regeneration. *J. Mater. Chem. B* 2020, 8, 5280–5292. <https://doi.org/10.1039/d0tb00342e>.
33. Hing, K.A. Bone repair in the twenty-first century: Biology, chemistry or engineering? *Philos. Trans. R. Soc. A Math. Phys. Eng. Sci.* 2004, 362, 2821–2850. <https://doi.org/10.1098/rsta.2004.1466>.
34. Finkemeier, C.G. Bone-Grafting and Bone-Graft Substitutes. *J. Bone Jt. Surg. Am.* 2002, 84, 454–464. <https://doi.org/10.2106/00004623-200203000-00020>.
35. Hutmacher, D.W. Scaffolds in tissue engineering bone and cartilage. *Biomaterials* 2000, 21, 2529–2543.
36. Amini, A.R.; Adams, D.J.; Laurencin, C.T.; Nukavarapu, S.P.; Michael, F.M.; Khalid, M.; Walvekar, R.; Ratnam, C.T. Optimally Porous and Biomechanically Compatible Scaffolds for Large-Area Bone Regeneration. *Tissue Eng. Part A* 2012, 18, 1376–1388. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0076>.
37. Nukavarapu, S.P.; Wallace, J.; Elgendy, H.; Lieberman, J.; Laurencin, C.T. Bone and Biomaterials. In *An Introduction to Biomaterials and Their Applications*, 2nd ed.; Hollinger, J.O., Ed.; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2011; pp. 571–593.

38. Albrektsson, T.; Johansson, C. Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur. Spine J.* 2001, 10 (Suppl. 2), S96–S101. <https://doi.org/10.1007/s005860100282>.
39. Mebarki, M.; Coquelin, L.; Layrolle, P.; Battaglia, S.; Tossou, M.; Hernigou, P.; Rouard, H.; Chevallier, N. Enhanced human bone marrow mesenchymal stromal cell adhesion on scaffolds promotes cell survival and bone formation. *Acta Biomater.* 2017, 59, 94–107. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2017.06.018>.
40. Habraken, W.; Habibovic, P.; Epple, M.; Bohner, M. Calcium phosphates in biomedical applications: Materials for the future? *Mater. Today* 2016, 19, 69–87. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2015.10.008>.
41. LeGeros, R.Z. Calcium Phosphate-Based Osteoinductive Materials. *Chem. Rev.* 2008, 108, 4742–4753. <https://doi.org/10.1021/cr800427g>.
42. Habibovic, P.; Yuan, H.; van der Valk, C.M.; Meijer, G.; van Blitterswijk, C.A.; de Groot, K. 3D microenvironment as essential element for osteoinduction by biomaterials. *Biomaterials* 2005, 26, 3565–3575. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.09.056>.
43. Shekhawat, D.; Singh, A.; Banerjee, M.; Singh, T.; Patnaik, A. Bioceramic composites for orthopaedic applications: A comprehensive review of mechanical, biological, and microstructural properties. *Ceram. Int.* 2021, 47, 3013–3030. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.09.214>.
44. Feng, C.; Zhang, K.; He, R.; Ding, G.; Xia, M.; Jin, X.; Xie, C. Additive manufacturing of hydroxyapatite bioceramic scaffolds: Dispersion, digital light processing, sintering, mechanical properties, and biocompatibility. *J. Adv. Ceram.* 2020, 9, 360–373. <https://doi.org/10.1007/s40145-020-0375-8>.
45. Jodati, H.; Yilmaz, B.; Evis, Z. Calcium zirconium silicate (baghdadite) ceramic as a biomaterial. *Ceram. Int.* 2020, 46, 21902–21909. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.105>.
46. Kargozar, S.; Baino, F.; Hamzehlou, S.; Hill, R.G.; Mozafari, M. Bioactive Glasses: Sprouting Angiogenesis in Tissue Engineering. *Trends Biotechnol.* 2018, 36, 430–444. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2017.12.003>.

47. Yao, Y.; Qin, W.; Xing, B.; Sha, N.; Jiao, T.; Zhao, Z. High performance hydroxyapatite ceramics and a triply periodic minimum surface structure fabricated by digital light processing 3D printing. *J. Adv. Ceram.* 2021, 10, 39–48. <https://doi.org/10.1007/s40145-020-0415-4>.
48. Zhang, L.; Yang, G.; Johnson, B.N.; Jia, X. Three-dimensional (3D) printed scaffold and material selection for bone repair. *Acta Biomater.* 2019, 84, 16–33. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.11.039>.
49. Jodati, H.; Yilmaz, B.; Evis, Z. A review of bioceramic porous scaffolds for hard tissue applications: Effects of structural features. *Ceram. Int.* 2020, 46, 15725–15739. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.03.192>.
50. O'Brien, F.J. Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today* 2011, 14, 88–95. [https://doi.org/10.1016/s1369-7021\(11\)70058-x](https://doi.org/10.1016/s1369-7021(11)70058-x).
51. Nikolova, M.P.; Chavali, M.S. Recent advances in biomaterials for 3D scaffolds: A review. *Bioact. Mater.* 2019, 4, 271–292. <https://doi.org/10.1016/j.bioactmat.2019.10.005>.
52. Abbasi, N.; Hamlet, S.; Love, R.M.; Nguyen, N.-T. Porous scaffolds for bone regeneration. *J. Sci. Adv. Mater. Devices* 2020, 5, 1–9. <https://doi.org/10.1016/j.jsamd.2020.01.007>.
53. Roseti, L.; Parisi, V.; Petretta, M.; Cavallo, C.; Desando, G.; Bartolotti, I.; Grigolo, B. Scaffolds for bone tissue engineering: State of the art and new perspectives. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017, 78, 1246–1262. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2017.05.017>.
54. Karageorgiou, V.; Kaplan, D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials* 2005, 26, 5474–5491. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.02.002>.
55. Haroun, A.A.; Migonney, V. Synthesis and in vitro evaluation of gelatin/hydroxyapatite graft copolymers to form bionanocomposites. *Int. J. Biol. Macromol.* 2010, 46, 310–316. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2010.01.005>.
56. Park, S.-B.; Lih, E.; Park, K.-S.; Joung, Y.K.; Han, D.K. Biopolymer-based functional composites for medical applications. *Prog. Polym. Sci.* 2017, 68, 77–105. <https://doi.org/10.1016/j.progpolymsci.2016.12.003>.

57. Yanovska, A.; Bolshanina, S. Chapter 13—Composite materials based on hydroxyapatite embedded in biopolymer matrices: Ways of synthesis and application. In *Materials for Biomedical Engineering*; Alina-Maria, H., Alexandru, M.G., Eds.; Elsevier: Amsterdam, The Netherland, 2019; pp. 403–440, ISBN 9780128169018. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-816901-8.00013-4>.
58. Gelse, K.; Pöschl, E.; Aigner, T. Collagens—Structure, function, and biosynthesis. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2003, 55, 1531–1546. <https://doi.org/10.1016/J.ADDR.2003.08.002>.
59. Patino, M.G.; Neiders, M.E.; Andreana, S.; Noble, B.; Cohen, R.E. Collagen: An Overview. *Implant. Dent.* 2002, 11, 280–285. <https://doi.org/10.1097/00008505-200207000-00014>.
60. Ferreira, A.M.; Gentile, P.; Chiono, V.; Ciardelli, G. Collagen for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2012, 8, 3191–3200. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.06.014>.
61. Yanovska, G.O. Physico-Chemical Features of Calcium-Phosphate Coatings Formation on Titanium and Magnesium Metal Implants. Ph.D. Thesis, in physical chemistry. Sumy, 2014; 194 p.
62. Dorozhkin, S.V. Calcium orthophosphates and human beings: A historical perspective from the 1770s until 1940. *Biomater* 2012, 2, 53–70. <https://doi.org/10.4161/biom.21340>.
63. Vallet-Regí, M. Ceramics for medical applications. *J. Chem. Soc. Dalton Trans.* 2001, 74, 97–108. <https://doi.org/10.1039/b007852m>.
64. Ramiro-Gutiérrez, M.L.; Will, J.; Boccaccini, A.R.; Díaz-Cuenca, A. Reticulated bioactive scaffolds with improved textural properties for bone tissue engineering: Nanostructured surfaces and porosity. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2013, 102, 2982–2992. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.34968>.
65. Romero-Sánchez, L.B.; Borrego-González, S.; Díaz-Cuenca, A. High surface area biopolymeric-ceramic scaffolds for hard tissue engineering. *Biomed. Phys. Eng. Express* 2017, 3, 035012. <https://doi.org/10.1088/2057-1976/aa7001>.

66. Drouet, C. Apatite Formation: Why It May Not Work as Planned, and How to Conclusively Identify Apatite Compounds. *BioMed Res. Int.* 2013, 2013, 490946. <https://doi.org/10.1155/2013/490946>.
67. Groot, K. *Bioceramics of Calcium Phosphate*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA, 2018. <https://doi.org/10.1201/9781351070133>.
68. LeGeros, R.Z. Calcium phosphates in oral biology and medicine. *Monogr. Oral Sci.* 1991, 15, 1–201.
69. Elliot, J.C. *Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates*, 1st ed.; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 1994; pp. 1–62, ISBN 9781483290317.
70. León, B.; John, J. *Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants*; Springer: New York, NY, USA, 2009; pp. 1–328, ISBN 978-0-387-77718-4. <https://doi.org/10.1007/978-0-387-77718-4>.
71. Flautre, B.; Maynou, C.; Lemaitre, J.; Van Landuyt, P.; Hardouin, P. Bone colonization of β -TCP granules incorporated in brushite cements. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 63, 413–417. <https://doi.org/10.1002/jbm.10262>.
72. Böhner, M.; Theiss, F.; Apelt, D.; Hirsiger, W.; Houriet, R.; Rizzoli, G.; Gnos, E.; Frei, C.; Auer, J.; von Rechenberg, B. Compositional changes of a dicalcium phosphate dihydrate cement after implantation in sheep. *Biomaterials* 2003, 24, 3463–3474. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(03\)00234-5](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(03)00234-5).
73. Böhner, M.; Gbureck, U.; Barralet, J. Technological issues for the development of more efficient calcium phosphate bone cements: A critical assessment. *Biomaterials* 2005, 26, 6423–6429. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2005.03.049>.
74. Giannoudis, P.V.; Einhorn, T.A.; Marsh, D. Fracture healing: The diamond concept. *Injury* 2007, 38 (Suppl. 4), S3–S6. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(08\)70003-2](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(08)70003-2).
75. Giannoudis, P.V.; Einhorn, T.A.; Schmidmaier, G.; Marsh, D. The diamond concept—Open questions. *Injury* 2008, 39, S5–S8. [https://doi.org/10.1016/s0020-1383\(08\)70010-x](https://doi.org/10.1016/s0020-1383(08)70010-x).

76. Calori, G.; Mazza, E.; Colombo, M.; Ripamonti, C. The use of bone-graft substitutes in large bone defects: Any specific needs? *Injury* 2011, 42, S56–S63. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.011>.
77. Habraken, W.; Wolke, J.; Jansen, J. Ceramic composites as matrices and scaffolds for drug delivery in tissue engineering. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2007, 59, 234–248. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2007.03.011>.
78. Hannink, G.; Arts, J.C. Bioresorbability, porosity and mechanical strength of bone substitutes: What is optimal for bone regeneration? *Injury* 2011, 42, S22–S25. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2011.06.008>.
79. Urist Marshall, R. Bone: Formation by Autoinduction. *Science* 1965, 150, 893–899. Available online: <http://www.jstor.org/stable/1717499> (accessed on 25 April 2023).
80. Doi, Y.; Shimizu, Y.; Moriwaki, Y.; Aga, M.; Iwanaga, H.; Shibutani, T.; Yamamoto, K.; Iwayama, Y. Development of a new calcium phosphate cement that contains sodium calcium phosphate. *Biomaterials* 2001, 22, 847–854. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00248-9](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00248-9).
81. Hurler, K.; Neubauer, J.; Bohner, M.; Doebelin, N.; Goetz-Neunhoeffler, F. Effect of amorphous phases during the hydraulic conversion of α -TCP into calcium-deficient hydroxyapatite. *Acta Biomater.* 2014, 10, 3931–3941. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2014.03.017>.
82. LeGeros, R.Z. Properties of Osteoconductive Biomaterials: Calcium Phosphates. *Clin. Orthop. Relat. Res.* 2002, 395, 81–98. <https://doi.org/10.1097/00003086-200202000-00009>.
83. Lu, J.; Descamps, M.; Dejou, J.; Koubi, G.; Hardouin, P.; Lemaitre, J.; Proust, J.-P. The biodegradation mechanism of calcium phosphate biomaterials in bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 63, 408–412. <https://doi.org/10.1002/jbm.10259>.
84. Tamimi, F.; Sheikh, Z.; Barralet, J. Dicalcium phosphate cements: Brushite and monetite. *Acta Biomater.* 2012, 8, 474–487. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.08.005>.

85. Radin, S.R.; Ducheyne, P. Effect of bioactive ceramic composition and structure on in vitro behavior. III. Porous versus dense ceramics. *J. Biomed. Mater. Res.* 1994, 28, 1303–1309. <https://doi.org/10.1002/jbm.820281108>.
86. Yamada, S.; Heymann, D.; Bouler, J.M.; Daculsi, G. Osteoclastic resorption of biphasic calcium phosphate ceramic in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 1997, 37, 346–352. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(19971205\)37:3<346::aid-jbm5>3.0.co;2-l](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(19971205)37:3<346::aid-jbm5>3.0.co;2-l).
87. Yamada, S.; Heymann, D.; Bouler, J.-M.; Daculsi, G. Osteoclastic resorption of calcium phosphate ceramics with different hydroxyapatite/ β -tricalcium phosphate ratios. *Biomaterials* 1997, 18, 1037–1041. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(97\)00036-7](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(97)00036-7).
88. Gisepp, A.; Wieling, R.; Bohner, M.; Matter, S.; Schneider, E.; Rahn, B. Resorption patterns of calcium-phosphate cements in bone. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 66A, 532–540. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10593>.
89. Rae, T. The macrophage response to implant materials-with special reference to those used in orthopedics. *CRC Crit. Rev. Biocompat.* 1986, 2, 97–126.
90. Velard, F.; Braux, J.; Amedee, J.; Laquerriere, P. Inflammatory cell response to calcium phosphate biomaterial particles: An overview. *Acta Biomater.* 2013, 9, 4956–4963. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.09.035>.
91. Yuan, H.; Li, Y.; de Bruijn, J.; de Groot, K.; Zhang, X. Tissue responses of calcium phosphate cement: A study in dogs. *Biomaterials* 2000, 21, 1283–1290. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(00\)00016-8](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(00)00016-8).
92. Bobbert, F.S.L.; Zadpoor, A.A. Effects of bone substitute architecture and surface properties on cell response, angiogenesis, and structure of new bone. *J. Mater. Chem. B* 2017, 5, 6175–6192. <https://doi.org/10.1039/c7tb00741h>.
93. Kim, K.; Dean, D.; Wallace, J.; Breithaupt, R.; Mikos, A.G.; Fisher, J.P. The influence of stereolithographic scaffold architecture and composition on osteogenic signal expression with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials* 2011, 32, 3750–3763. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2011.01.016>.
94. Marrella, A.; Lee, T.Y.; Lee, D.H.; Karuthedom, S.; Sylva, D.; Chawla, A.; Khademhosseini, A.; Jang, H.L. Engineering vascularized and innervated bone

- biomaterials for improved skeletal tissue regeneration. *Mater. Today* 2018, 21, 362–376. <https://doi.org/10.1016/j.mattod.2017.10.005>.
95. Rey, C.; Combes, C.; Drouet, C.; Grossin, D.; Bertrand, G.; Soulié, J. 1.11 Bioactive Calcium Phosphate Compounds: Physical Chemistry. In *Comprehensive Biomaterials II*; Elsevier: Amsterdam, The Netherland, 2017; pp. 244–290. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-803581-8.10171-7>.
96. Hing, K.A. Bioceramic Bone Graft Substitutes: Influence of Porosity and Chemistry. *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2005, 2, 184–199. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7402.2005.02020.x>.
97. Espanol, M.; Perez, R.; Montufar, E.; Marichal, C.; Sacco, A.; Ginebra, M. Intrinsic porosity of calcium phosphate cements and its significance for drug delivery and tissue engineering applications. *Acta Biomater.* 2009, 5, 2752–2762. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.03.011>.
98. Daculsi, G.; Aguado, E.; Miramond, T. Essential Requirements for Resorbable Bioceramic Development: Research, Manufacturing, and Preclinical Studies. In *Handbook of Bioceramics and Biocomposites*; Antoniac, I., Ed.; Springer International Publishing: Cham, Switzerland, 2016. https://doi.org/10.1007/978-3-319-12460-5_40.
99. LeGeros, R.Z.; Lin, S.; Rohanizadeh, R.; Mijares, D.; LeGeros, J.P. Biphasic calcium phosphate bioceramics: Preparation, properties and applications. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2003, 14, 201–209. <https://doi.org/10.1023/a:1022872421333>.
100. Kuboki, Y.; Takita, H.; Kobayashi, D.; Tsuruga, E.; Inoue, M.; Murata, M.; Nagai, N.; Dohi, Y.; Ohgushi, H. BMP-induced osteogenesis on the surface of hydroxyapatite with geometrically feasible and nonfeasible structures: Topology of osteogenesis. *J. Biomed. Mater. Res.* 1998, 39, 190–199. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199802\)39:2<190::aid-jbm4>3.0.co;2-k](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199802)39:2<190::aid-jbm4>3.0.co;2-k).
101. Hulbert, S.F.; Young, F.A.; Mathews, R.S.; Klawitter, J.J.; Talbert, C.D.; Stelling, F.H. Potential of ceramic materials as permanently implantable skeletal prostheses. *J. Biomed. Mater. Res.* 1970, 4, 433–456. <https://doi.org/10.1002/jbm.820040309>.

102. Kuboki, Y.; Jin, Q.; Kikuchi, M.; Mamood, J.; Takita, H. Geometry of Artificial ECM: Sizes of Pores Controlling Phenotype Expression in BMP-Induced Osteogenesis and Chondrogenesis. *Connect. Tissue Res.* 2002, 43, 529–534. <https://doi.org/10.1080/03008200290001104>.
103. Tsuruga, E.; Takita, H.; Itoh, H.; Wakisaka, Y.; Kuboki, Y. Pore Size of Porous Hydroxyapatite as the Cell-Substratum Controls BMP-Induced Osteogenesis. *J. Biochem.* 1997, 121, 317–324. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a021589>.
104. Lanao, R.P.F.; Hoekstra, J.W.M.; Wolke, J.G.C.; Leeuwenburgh, S.C.G.; Plachokova, A.S.; Boerman, O.C.; Beucken, J.J.J.P.v.D.; Jansen, J.A. Porous calcium phosphate cement for alveolar bone regeneration. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2014, 8, 473–482. <https://doi.org/10.1002/term.1546>.
105. Lanao, R.P.F.; Sariibrahimoglu, K.; Wang, H.; Wolke, J.G.; Jansen, J.A.; Leeuwenburgh, S.C.; An, J.; Klijn, R.J.; Beucken, J.J.v.D.; Veldhuis, G.; et al. Accelerated Calcium Phosphate Cement Degradation Due to Incorporation of Glucono-Delta-Lactone Microparticles. *Tissue Eng. Part A* 2014, 20, 378–388. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0427>.
106. Renno, A.; van de Watering, F.; Nejadnik, M.; Crovace, M.; Zanotto, E.; Wolke, J.; Jansen, J.; Beucken, J.v.D. Incorporation of bioactive glass in calcium phosphate cement: An evaluation. *Acta Biomater.* 2013, 9, 5728–5739. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2012.11.009>.
107. Gauthier, O.; Bouler, J.-M.; Weiss, P.; Bosco, J.; Daculsi, G.; Aguado, E. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with the implantation of different injectable calcium-phosphate bone substitutes. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999, 47, 28–35. [https://doi.org/10.1002/\(sici\)1097-4636\(199910\)47:1<28::aid-jbm4>3.0.co;2-p](https://doi.org/10.1002/(sici)1097-4636(199910)47:1<28::aid-jbm4>3.0.co;2-p).
108. Jones, A.C.; Arns, C.H.; Sheppard, A.P.; Hutmacher, D.W.; Milthorpe, B.K.; Knackstedt, M.A. Assessment of bone ingrowth into porous biomaterials using MICRO-CT. *Biomaterials* 2007, 28, 2491–2504. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2007.01.046>.

109. Otsuki, B.; Takemoto, M.; Fujibayashi, S.; Neo, M.; Kokubo, T.; Nakamura, T. Pore throat size and connectivity determine bone and tissue ingrowth into porous implants: Three-dimensional micro-CT based structural analyses of porous bioactive titanium implants. *Biomaterials* 2006, 27, 5892–5900. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.08.013>.
110. Damien, E.; Hing, K.; Saeed, S.; Revell, P.A. A preliminary study on the enhancement of the osteointegration of a novel synthetic hydroxyapatite scaffold in vivo. *J. Biomed. Mater. Res.* 2003, 66A, 241–246. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10564>.
111. Kim, H.D.; Valentini, R.F. Retention and activity of BMP-2 in hyaluronic acid-based scaffolds in vitro. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 59, 573–584. <https://doi.org/10.1002/jbm.10011>.
112. Félix Lanao, R.P.; Leeuwenburgh, S.C.G.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A. In vitro degradation rate of apatitic calcium phosphate cement with incorporated PLGA microspheres. *Acta Bio-Mater.* 2011, 7, 3459–3468.
113. Klijn, R.J.; Beucken, J.J.v.D.; Lanao, R.P.F.; Veldhuis, G.; Leeuwenburgh, S.C.; Wolke, J.G.; Meijer, G.J.; Jansen, J.A.; Bodde, E.W.; Habraken, W.J.; et al. Three Different Strategies to Obtain Porous Calcium Phosphate Cements: Comparison of Performance in a Rat Skull Bone Augmentation Model. *Tissue Eng. Part A* 2012, 18, 1171–1182. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2011.0444>.
114. Hu, Y.; Grainger, D.W.; Winn, S.R.; Hollinger, J.O. Fabrication of poly(α -hydroxy acid) foam scaffolds using multiple solvent systems. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 59, 563–572. <https://doi.org/10.1002/jbm.1269>.
115. Maspero, F.A.; Ruffieux, K.; Müller, B.; Wintermantel, E. Resorbable defect analog PLGA scaffolds using CO₂ as solvent: Structural characterization. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 62, 89–98. <https://doi.org/10.1002/jbm.10212>.
116. Botchwey, E.A.; Pollack, S.R.; Levine, E.M.; Laurencin, C.T. Bone tissue engineering in a rotating bioreactor using a microcarrier matrix system. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55, 242–253. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<242::aid-jbm1011>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<242::aid-jbm1011>3.0.co;2-d).

117. del Real, R.; Wolke, J.; Vallet-Regí, M.; Jansen, J. A new method to produce macropores in calcium phosphate cements. *Biomaterials* 2002, 23, 3673–3680. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(02\)00101-1](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(02)00101-1).
118. Almirall, A.; Larrecq, G.; Delgado, J.; Martínez, S.; Planell, J.; Ginebra, M. Fabrication of low temperature macroporous hydroxyapatite scaffolds by foaming and hydrolysis of an α -TCP paste. *Biomaterials* 2004, 25, 3671–3680. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.10.066>.
119. del Real, R.P.; Ooms, E.; Wolke, J.G.C.; Vallet-Regí, M.; Jansen, J.A. In vivobone response to porous calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2003, 65A, 30–36. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.10432>.
120. Huse, R.O.; Ruhe, P.Q.; Wolke, J.G.C.; Jansen, J.A. The use of porous calcium phosphate scaffolds with transforming growth factor beta 1 as an onlay bone graft substitute. *Clin. Oral Implant. Res.* 2004, 15, 741–749. <https://doi.org/10.1111/j.1600-0501.2004.01068.x>.
121. Jansen, J.; Vehof, J.; Ruhé, P.; Kroeze-Deutman, H.; Kuboki, Y.; Takita, H.; Hedberg, E.; Mikos, A. Growth factor-loaded scaffolds for bone engineering. *J. Control. Release* 2005, 101, 127–136. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2004.07.005>.
122. Kroeze-Deutman, H.C.; Ruhé, P.; Spauwen, P.H.; Jansen, J.A. Bone inductive properties of rhBMP-2 loaded porous calcium phosphate cement implants inserted at an ectopic site in rabbits. *Biomaterials* 2005, 26, 1131–1138. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2004.04.021>.
123. Hesaraki, S.; Zamanian, A.; Moztarzadeh, F. The influence of the acidic component of the gas-foaming porogen used in preparing an injectable porous calcium phosphate cement on its properties: Acetic acid versus citric acid. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2008, 86B, 208–216. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31008>.
124. Chen, W.; Thein-Han, W.; Weir, M.D.; Chen, Q.; Xu, H.H. Prevascularization of biofunctional calcium phosphate cement for dental and craniofacial repairs. *Dent. Mater.* 2014, 30, 535–544. <https://doi.org/10.1016/j.dental.2014.02.007>.
125. Thein-Han, W.; Xu, H.H. Prevascularization of a Gas-Foaming Macroporous Calcium Phosphate Cement Scaffold Via Coculture of Human Umbilical Vein

Endothelial Cells and Osteoblasts. *Tissue Eng. Part A* 2013, 19, 1675–1685. <https://doi.org/10.1089/ten.tea.2012.0631>.

126. Ginebra, M.-P.; Delgado, J.-A.; Harr, I.; Almirall, A.; Del Valle, S.; Planell, J.A. Factors affecting the structure and properties of an injectable self-setting calcium phosphate foam. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2007, 80A, 351–361. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30886>.

127. Montufar, E.B.; Traykova, T.; Schacht, E.; Ambrosio, L.; Santin, M.; Planell, J.A.; Ginebra, M.-P. Self-hardening calcium deficient hydroxyapatite/gelatin foams for bone regeneration. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010, 21, 863–869. <https://doi.org/10.1007/s10856-009-3918-7>.

128. Montufar, E.; Traykova, T.; Gil, C.; Harr, I.; Almirall, A.; Aguirre, A.; Engel, E.; Planell, J.; Ginebra, M. Foamed surfactant solution as a template for self-setting injectable hydroxyapatite scaffolds for bone regeneration. *Acta Biomater.* 2010, 6, 876–885. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.10.018>.

129. Barba, A.; Maazouz, Y.; Diez-Escudero, A.; Rappe, K.; Espanol, M.; Montufar, E.B.; Öhman-Mägi, C.; Persson, C.; Fontecha, P.; Manzanares, M.-C.; et al. Osteogenesis by foamed and 3D-printed nanostructured calcium phosphate scaffolds: Effect of pore architecture. *Acta Biomater.* 2018, 79, 135–147. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2018.09.003>.

130. Barba, A.; Diez-Escudero, A.; Maazouz, Y.; Rappe, K.; Espanol, M.; Montufar, E.B.; Bonany, M.; Sadowska, J.M.; Guillem-Marti, J.; Öhman-Mägi, C.; et al. Osteoinduction by Foamed and 3D-Printed Calcium Phosphate Scaffolds: Effect of Nanostructure and Pore Architecture. *ACS Appl. Mater. Interfaces* 2017, 9, 41722–41736. <https://doi.org/10.1021/acsami.7b14175>.

131. O'Neill, R.; McCarthy, H.; Montufar, E.; Ginebra, M.-P.; Wilson, D.; Lennon, A.; Dunne, N. Critical review: Injectability of calcium phosphate pastes and cements. *Acta Biomater.* 2017, 50, 1–19. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2016.11.019>.

132. Ginebra, M.-P.; Canal, C.; Espanol, M.; Pastorino, D.; Montufar, E.B. Calcium phosphate cements as drug delivery materials. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2012, 64, 1090–1110. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2012.01.008>.

133. Ginebra, M.P.; Traykova, T.; Planell, J.A. Calcium phosphate cements as bone drug delivery systems: A review. *J. Contr. Release* 2006, 113, 102–110. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2006.04.007>.
134. Brown, W.E.; Chow, L.C. A new calcium phosphate, water-setting cement. *Cem. Res. Prog.* 1986, 351–379. Available online: <http://ci.nii.ac.jp/naid/10004554570/en/> (accessed on).
135. Thai, V.V.; Lee, B.T. Fabrication of calcium phosphate—Calcium sulfate injectable bone sub-stitute using hydroxy-propyl-methyl-cellulose and citric acid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010, 21, 1867–1874. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4058-9>.
136. A Perez, R.; Kim, H.-W.; Ginebra, M.-P. Polymeric additives to enhance the functional properties of calcium phosphate cements. *J. Tissue Eng.* 2012, 3. <https://doi.org/10.1177/2041731412439555>.
137. Sarda, S.; Fernández, E.; Nilsson, M.; Balcells, M.; Planell, J.A. Kinetic study of citric acid influence on calcium phosphate bone cements as water-reducing agent. *J. Biomed. Mater. Res.* 2002, 61, 653–659. <https://doi.org/10.1002/jbm.10264>.
138. Yokoyama, A.; Yamamoto, S.; Kawasaki, T.; Kohgo, T.; Nakasu, M. Development of calcium phosphate cement using chitosan and citric acid for bone substitute materials. *Biomaterials* 2002, 23, 1091–1101. [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(01\)00221-6](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(01)00221-6).
139. Lee, H.J.; Kim, B.; Padalhin, A.R.; Lee, B.T. Incorporation of chitosan-alginate complex into injectable calcium phosphate cement system as a bone graft material. *Mater. Sci. Eng. C* 2019, 94, 385–392. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2018.09.039>.
140. Ginebra, M.P.; Rilliard, A.; Fernández, E.; Elvira, C.; San Román, J.; Planell, J.A. Mechanical and rheological improvement of a calcium phosphate cement by the addition of a polymeric drug. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 57, 113–118. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200110\)57:1<113::AID-JBM1149>3.0.CO;2-5](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200110)57:1<113::AID-JBM1149>3.0.CO;2-5).
141. Song, H.-Y.; Rahman, A.H.M.E.; Lee, B.-T. Fabrication of calcium phosphate-calcium sulfate injectable bone substitute using chitosan and citric acid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2009, 20, 935–941. <https://doi.org/10.1007/s10856-008-3642-8>.

142. Shi, H.; Zhang, W.; Liu, X.; Zeng, S.; Yu, T.; Zhou, C. Synergistic effects of citric acid—Sodium alginate on physicochemical properties of α -tricalcium phosphate bone cement. *Ceram. Int.* 2019, 45, 2146–2152. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.10.124>.
143. Zhong, W.; Sun, L.; Yu, T.; Zhou, C. Preparation and characterization of calcium phosphate cement with enhanced tissue adhesion for bone defect repair. *Ceram. Int.* 2021, 47, 1712–1720. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.08.288>.
144. Li, D.X.; Fan, H.S.; Zhu, X.D.; Tan, Y.F.; Xiao, W.Q.; Lu, J.; Xiao, Y.M.; Chen, J.Y.; Zhang, X.D. Controllable release of salmon-calcitonin in injectable calcium phosphate cement modified by chitosan oligosaccharide and collagen polypeptide. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2007, 18, 2225–2231. <https://doi.org/10.1007/s10856-007-3084-8>.
145. Caballero, S.S.R.; Ferri-Angulo, D.; Debret, R.; Granier, F.; Marie, S.; Lefèvre, F.; Bouler, J.; Despas, C.; Sohier, J.; Bujoli, B. Combination of biocompatible hydrogel precursors to apatitic calcium phosphate cements (CPCs): Influence of the in situ hydrogel reticulation on the CPC properties. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2021, 109, 102–116. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34685>.
146. Nezafati, N.; Farokhi, M.; Heydari, M.; Hesaraki, S.; Nasab, N.A. In vitro bioactivity and cytocompatibility of an injectable calcium phosphate cement/silanated gelatin microsphere composite bone cement. *Compos. Part B Eng.* 2019, 175, 107146. <https://doi.org/10.1016/j.compositesb.2019.107146>.
147. Oğuz, D.; Ege, D. Preparation of graphene oxide-reinforced calcium phosphate/calcium sulfate/methylcellulose-based injectable bone substitutes. *MRS Commun.* 2019, 9, 1174–1180. <https://doi.org/10.1557/mrc.2019.125>.
148. Babo, P.S.; Santo, V.E.; Gomes, M.E.; Reis, R.L. Development of an Injectable Calcium Phosphate/Hyaluronic Acid Microparticles System for Platelet Lysate Sustained Delivery Aiming Bone Regeneration. *Macromol. Biosci.* 2016, 16, 1662–1677. <https://doi.org/10.1002/mabi.201600141>.
149. Kucko, N.W.; Li, W.; Martinez, M.A.G.; Rehman, I.U.; Ulset, A.-S.T.; Christensen, B.E.; Leeuwenburgh, S.C.G.; Herber, R.-P. Sterilization effects on the handling and degradation properties of calcium phosphate cements containing poly

(D,L-lactic-co-glycolic acid) porogens and carboxymethyl cellulose. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2019, 107, 2216–2228. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.34306>.

150. Thai, V.V.; Lee, B.-T. Fabrication of calcium phosphate–calcium sulfate injectable bone substitute using hydroxy-propyl-methyl-cellulose and citric acid. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2010, 21, 1867–1874. <https://doi.org/10.1007/s10856-010-4058-9>.

151. Oğuz, D.; Ege, D. Rheological and Mechanical Properties of Thermoresponsive Methylcellulose/Calcium Phosphate-Based Injectable Bone Substitutes. *Materials* 2018, 11, 604. <https://doi.org/10.3390/ma11040604>.

152. Link, D.P.; Dolder, J.v.D.; Jurgens, W.J.; Wolke, J.G.; Jansen, J.A. Mechanical evaluation of implanted calcium phosphate cement incorporated with PLGA microparticles. *Biomaterials* 2006, 27, 4941–4947. <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.05.022>.

153. Low, K.L.; Tan, S.H.; Zein, S.H.S.; Roether, J.A.; Mouriño, V.; Boccaccini, A.R. Calcium phosphate-based composites as injectable bone substitute materials. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2010, 94, 273–286. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.31619>.

154. Leroux, L.; Hatim, Z.; Frèche, M.; Lacout, J. Effects of various adjuvants (lactic acid, glycerol, and chitosan) on the injectability of a calcium phosphate cement. *Bone* 1999, 25, 31S–34S. [https://doi.org/10.1016/s8756-3282\(99\)00130-1](https://doi.org/10.1016/s8756-3282(99)00130-1).

155. Wang, X.; Ye, J.; Wang, Y. Influence of a novel radiopacifier on the properties of an injectable calcium phosphate cement. *Acta Biomater.* 2007, 3, 757–763. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2007.01.004>.

156. Chen, F.; Liu, C.; Wei, J.; Chen, X.; Zhao, Z.; Gao, Y. Preparation and characterization of injectable calcium phosphate cement paste modified by polyethylene glycol-6000. *Mater. Chem. Phys.* 2011, 125, 818–824. <https://doi.org/10.1016/j.matchemphys.2010.09.050>.

157. Zhang, J.; Liu, W.; Gauthier, O.; Sourice, S.; Pilet, P.; Rethore, G.; Khairoun, K.; Bouler, J.-M.; Tancret, F.; Weiss, P. A simple and effective approach to prepare injectable macroporous calcium phosphate cement for bone repair: Syringe-foaming

- using a viscous hydrophilic polymeric solution. *Acta Biomater.* 2016, 31, 326–338. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2015.11.055>.
158. Wang, X.; Ye, J.; Wang, Y.; Chen, L. Self-setting properties of a β -dicalcium silicate reinforced calcium phosphate cement. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater.* 2007, 82B, 93–99. <https://doi.org/10.1002/jbm.b.30709>.
159. Hench, L.L. The story of Bioglass®. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2006, 17, 967–978. <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0432-z>.
160. Wu, Z.; Lin, Z.; Yao, A.; Ye, S.; Pan, H.; Cui, X.; Wang, D. Influence of particle size distribution on the rheological properties and mathematical model fitting of injectable borosilicate bioactive glass bone cement. *Ceram. Int.* 2020, 46, 24395–24406. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.06.222>.
161. van Vugt, T.A.; Geurts, J.A.P.; Arts, J.J.; Lindfors, N.C. Biomaterials in treatment of orthopedic infections. In *Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIS)*, 1st ed.; Chris Arts, J.J., Jan, G., Eds.; Woodhead Publishing Series in Biomaterials; Woodhead publishing: Amsterdam, The Netherlands, 2017; pp. 41–68.
162. Xynos, I.D.; Edgar, A.J.; Buttery, L.D.; Hench, L.L.; Polak, J.M. Gene-expression profiling of human osteoblasts following treatment with the ionic products of Bioglass 45S5 dissolution. *J. Biomed. Mater. Res.* 2001, 55, 151–157. [https://doi.org/10.1002/1097-4636\(200105\)55:2<151::aid-jbm1001>3.0.co;2-d](https://doi.org/10.1002/1097-4636(200105)55:2<151::aid-jbm1001>3.0.co;2-d).
163. Ojansivu, M.; Mishra, A.; Vanhatupa, S.; Juntunen, M.; Larionova, A.; Massera, J.; Miettinen, S. The effect of S53P4-based borosilicate glasses and glass dissolution products on the osteogenic commitment of human adipose stem cells. *PLoS ONE* 2018, 13, e0202740. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0202740>.
164. Gorustovich, A.A.; Roether, J.A.; Boccaccini, A.R. Effect of Bioactive Glasses on Angiogenesis: A Review of In Vitro and In Vivo Evidences. *Tissue Eng. Part B Rev.* 2010, 16, 199–207.
165. Zhang, D.; Leppäranta, O.; Munukka, E.; Ylänen, H.; Viljanen, M.K.; Eerola, E.; Hupa, M.; Hupa, L. Antibacterial effects and dissolution behavior of six bioactive glasses. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2001, 9999A, 475–483. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.32564>.

166. Day, R.M.; Boccaccini, A.R. Effect of particulate bioactive glasses on human macrophages and monocytes in vitro. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2005, 73A, 73–79. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.30262>.
167. Thomas, M.V.; Puleo, D.A.; Al-Sabbagh, M. Bioactive Glass Three Decades On. *J. Long Term Eff. Med. Implants.* 2005, 15, 585–597. <https://doi.org/10.1615/jlongtermeffmedimplants.v15.i6.20>.
168. Rahaman, M.N.; Day, D.E.; Bal, B.S.; Fu, Q.; Jung, S.B.; Bonewald, L.F.; Tomsia, A.P. Bioactive glass in tissue engineering. *Acta Biomater.* 2011, 7, 2355–2373. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2011.03.016>.
169. Nielsen, F.H. New Essential Trace Elements for the Life Sciences. *Biol. Trace Elem. Res.* 1990, 599–611. https://doi.org/10.1007/978-1-4612-0473-2_65.
170. Pemmer, B.; Roschger, A.; Wastl, A.; Hofstaetter, J.; Wobrauschek, P.; Simon, R.; Thaler, H.; Roschger, P.; Klaushofer, K.; Strelci, C. Spatial distribution of the trace elements zinc, strontium and lead in human bone tissue. *Bone* 2013, 57, 184–193. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2013.07.038>.
171. Bellucci, D.; Sola, A.; Cannillo, V. Hydroxyapatite and tricalcium phosphate composites with bioactive glass as second phase: State of the art and current applications. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* 2016, 104, 1030–1056. <https://doi.org/10.1002/jbm.a.35619>.
172. Karadjian, M.; Essers, C.; Tsitlakidis, S.; Reible, B.; Moghaddam, A.; Boccaccini, A.R.; Westhauser, F. Biological Properties of Calcium Phosphate Bioactive Glass Composite Bone Substitutes: Current Experimental Evidence. *Int. J. Mol. Sci.* 2019, 20, 305. <https://doi.org/10.3390/ijms20020305>.
173. Liu, C.; He, H. *Developments and Applications of Calcium Phosphate Bone Cement*; Springer: Berlin, Germany, 2018. <https://doi.org/10.1007/978-981-10-5975-9>.
174. Wu, C.-C.; Yang, K.-C.; Yang, S.-H.; Lin, M.-H.; Kuo, T.-F.; Lin, F.-H. In Vitro Studies of Composite Bone Filler Based on Poly(Propylene Fumarate) and Biphasic α -Tricalcium Phosphate/Hydroxyapatite Ceramic Powder. *Artif. Organs* 2012, 36, 418–428. <https://doi.org/10.1111/j.1525-1594.2011.01372.x>.

175. Persson, C.; Berg, S. Strategies towards injectable, load-bearing materials for the intervertebral disc: A review and outlook. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013, 24, 1–10. <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4776-2>.
176. Liu, H.; Zhang, Z.; Gao, C.; Bai, Y.; Liu, B.; Wang, W.; Ma, Y.; Saijilafu; Yang, H.; Li, Y.; et al. Enhancing effects of radiopaque agent BaSO₄ on mechanical and biocompatibility properties of injectable calcium phosphate composite cement. *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2020, 116, 110904. <https://doi.org/10.1016/j.msec.2020.110904>.
177. Di Filippo, M.F.; Dolci, L.S.; Albertini, B.; Passerini, N.; Torricelli, P.; Parrilli, A.; Fini, M.; Bonvicini, F.; Gentilomi, G.A.; Panzavolta, S.; et al. A radiopaque calcium phosphate bone cement with long-lasting antibacterial effect: From paste to injectable formulation. *Ceram. Int.* 2020, 46, 10048–10057. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2019.12.272>.
178. Charrière, E.; Terrazzoni, S.; Pittet, C.; Mordasini, P.; Dutoit, M.; Lemaître, J.; Zysset, P. Mechanical characterization of brushite and hydroxyapatite cements. *Biomaterials* 2001, 22, 2937–2945. [https://doi.org/10.1016/s0142-9612\(01\)00041-2](https://doi.org/10.1016/s0142-9612(01)00041-2).
179. Perrelli G, Piolatto G. Tentative reference values for gold, silver and platinum: literature data analysis. *Sci Total Environ.* 1992 Jun 9;120(1-2):93-6.
180. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., Husak E., M. Pogorielov, V. Starikov, S. Bolshanina, S. Danilchenko. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application. *Materials Chemistry and Physics*, vol. 183, pp. 93-100, 2016.
181. Kędziora A., Speruda M., Krzyżewska E., Rybka J., Łukowiak A, Bugla-Płoskońska G. Similarities and Differences between Silver Ions and Silver in Nanoforms as Antibacterial Agents. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 19, no. 2, p. 444, Feb. 2018.
182. Xiu Z.-M., Ma J., Alvarez P.J.J. Differential effect of common ligands and molecular oxygen on antimicrobial activity of silver nanoparticles versus silver ions. *Environ. Sci. Technol.*, vol. 45, pp. 9003-9008, 2011.

183. Liao S., Zhang Y., Pan X., Zhu F., Jiang C., Liu Q., Cheng Z., Dai G., Wu G., Wang L., Chen L. Antibacterial activity and mechanism of silver nanoparticles against multidrug-resistant *Pseudomonas aeruginosa*. *International Journal of Nanomedicine*, vol. 14, pp. 1469-1487, 2019.
184. González-Fernández S., Lozano-Iturbe V., García B. et al. Antibacterial effect of silver nanorings. *BMC Microbiol.*, vol. 20, no. 1, 2020.
185. Myakinin A., Turlybekuly A., Pogrebnyak A. et al. In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C.*, vol. 121, 2021.
186. A.W. Jatoi, I.S. Kim, H. Ogasawara, Q.Q. Ni, "Characterizations and application of CA/ZnO/AgNP composite nanofibers for sustained antibacterial properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, 2019.
187. A.W. Jatoi, I.S. Kim, H. Ogasawara, Q.Q. Ni, "Characterizations and application of CA/ZnO/AgNP composite nanofibers for sustained antibacterial properties," *Mater. Sci. Eng. C*, vol. 105, p. 110077, 2019.
188. G.C. Porter, D.R. Schwass, G.R. Tompkins, S.K.R. Bobbala, N.J. Medlicott, C.J. Meledandri, "AgNP/Alginate Nanocomposite hydrogel for antimicrobial and antibiofilm applications," *Carbohydr. Polym.*, vol. 251, p. 117017, 2021.
189. Y.M. Long, L.G. Hu, X.T. Yan, et al., "Surface ligand controls silver ion release of nanosilver and its antibacterial activity against *Escherichia coli*," *International Journal Nanomedicine*, vol. 12, pp. 3193-3206, 2017.
190. Sheng Y, Narayanan M, Basha S, Elfasakhany A, Brindhadevi K, Xia C, Pugazhendhi A. In vitro and in vivo efficacy of green synthesized AgPs against Gram-negative and Gram-positive bacterial pathogens. *Process Biochemistry*. vol. 112, pp. 241–247, 2022.
191. Andrade F. A. C., Vercik L. C. de Oliveira, Monteiro F. J., Rigo E. C. da Silva. Preparation, characterization and antibacterial properties of silver nanoparticles hydroxyapatite composites by a simple and eco friendly method. *Ceramics International*. vol. 42, pp. 2271–2280, 2016.

192. Qing Y, Cheng L, Li R, et al. Potential antibacterial mechanism of silver nanoparticles and the optimization of orthopedic implants by advanced modification technologies. *Int. J. Nanomedicine*. vol. 13, pp. 3311-3327, 2018.
193. Talapko J, Matijević T, Juzbašić M, c-Požgain A, and Škrlec I. Antibacterial Activity of Silver and Its Application in Dentistry. *Cardiology and Dermatology Microorganisms*. vol. 8, pp. 1400, 2020.
194. Poon TKC, Iyengar KP, Jain VK. Silver Nanoparticle (AgNP) Technology applications in trauma and orthopaedics. *Journal of Clinical Orthopaedics and Trauma*. vol. 21, pp. 101536, 2021.
195. Bee S-L, Bustami Y, Ul-Hamid A, Lim K, Hamid ZAA. Synthesis of silver nanoparticle-decorated hydroxyapatite nanocomposite with combined bioactivity and antibacterial properties. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. vol. 32, pp. 106, 2021.
196. Bolshanina S, Radchenko O, Yanovska A, Varava J, Diedkova K, Zaitseva K. The Kinetic of Silver Ions Release from Nanoparticles and Influence of Ultrasound Treatment. 2021 IEEE 11th International Conference Nanomaterials: Applications & Properties (NAP). 2021.
197. Nasrallah DA, Ibrahim MA. Enhancement of physico-chemical, optical, dielectric and antimicrobial properties of polyvinyl alcohol/carboxymethyl cellulose blend films by addition of silver doped hydroxyapatite nanoparticles. *J. Polym. Res*. vol. 29, pp. 86, 2022.
198. Myronov P, Bugaiov V, Holubnycha V. Low-frequency ultrasound increase effectiveness of silver nanoparticles in a purulent wound model. *Biomedical Engineering Letters*. vol. 10, no. 4, pp. 621 – 631, 2020.
199. Sánchez B et al. Prevalence of an intestinal st40 enterococcus faecalis over other E. Faecalis strains in the gut environment of mice fed different high fat diets. *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 21, no. 12, pp. 1–13, 2020.
200. Gök ŞM, Türk Dağı H, Kara F, Arslan U, and Findik D. Investigation of antibiotic resistance and virulence factors of enterococcus faecium and enterococcus faecalis strains isolated from clinical samples. *Mikrobiyol. Bul.*, vol. 54, no. 1, pp. 26–39, 2020.

201. Chong KKL et al. Enterococcus faecalis Modulates Immune Activation and Slows Healing during Wound Infection. *J. Infect. Dis.* vol. 216, no. 12, pp. 1644–1654, 2017. 37.
202. Koch G. Medicinal Chemistry. *Chimia (Aarau).*, vol. 71, no. 10, p. 643, 2017.
203. Song W and Ge S. Application of antimicrobial nanoparticles in dentistry. *Molecules*, vol. 24, no. 6, pp. 1–15, 2019.
204. Alarcon EI and Ahumada M. Nanoengineering materials for biomedical uses. *Nanoeng. Mater. Biomed. Uses.* no. January 2020, pp. 1–208, 2019.
205. Lu H, Liu Y, Guo J, Wu H, Wang J, and Wu G. Biomaterials with antibacterial and osteoinductive properties to repair infected bone defects. *Int. J. Mol. Sci.* vol. 17, no. 3, pp. 1–18, 2016.
206. Baran J. Applications of Noble Metal-Based Nanoparticles in Medicine a. 2018.
207. Noronha VT et al. Silver nanoparticles in dentistry. *Dental Materials.* vol. 33, no. 10. Elsevier Inc., pp. 1110–1126, Oct. 01, 2017.
208. Markowska K, Grudniak AM, and Wolska KI. Silver nanoparticles as an alternative strategy against bacterial biofilms. *Acta Biochim. Pol.*, vol. 60, no. 4, pp. 523–530, 2013.
209. Swidan NS, Hashem YA, Elkhatib WF, and Yassien MA. Antibiofilm activity of green synthesized silver nanoparticles against biofilm associated enterococcal urinary pathogens. *Sci. Rep.*, vol. 12, no. 1, pp. 1–13, 2022.
210. Wu D, Fan W, Kishen A, Gutmann JL, and Fan B. Evaluation of the antibacterial efficacy of silver nanoparticles against *Enterococcus faecalis* biofilm. *J. Endod.*, vol. 40, no. 2, pp. 285–290, 2014.
211. Oleshko O et al. Ag nanoparticle-decorated oxide coatings formed via plasma electrolytic oxidation on ZrNb alloy. *Materials (Basel).* vol. 12, no. 22, pp. 1–9, 2019.
212. Holubnycha V et al. Effect of ultrasound treatment on chitosan silver nanoparticles antimicrobial activity. *Proc. 2018 IEEE 8th Int. Conf. Nanomater. Appl. Prop. N.* 2018. pp. 2–5, 2018.
213. ISO 20776-2:2021, “Clinical laboratory testing and in vitro diagnostic test systems — Susceptibility testing of infectious agents and evaluation of performance

of antimicrobial susceptibility test devices — Part 2: Evaluation of performance of antimicrobial susceptibility t.”

214. Lau CP, Abdul-Wahab MF, Jaafar J, Chan GF, and Abdul Rashid NA. Toxic effect of high concentration of sonochemically synthesized polyvinylpyrrolidone-coated silver nanoparticles on *Citrobacter* sp. A1 and *Enterococcus* sp. C1. *J. Microbiol. Immunol. Infect.* vol. 50, no. 4, pp. 427–434, 2017.

215. Gandhi, Y. Sinus Grafts: Science and Techniques—Then and Now. *J. Maxillofac. Oral Surg.* 2017, 16, 135–144. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

216. Miron, R.J.; Zucchelli, G.; Pikos, M.A.; Salama, M.; Lee, S.; Guillemette, V.; Fujioka-Kobayashi, M.; Bishara, M.; Zhang, Y.; Wang, H.-L.; et al. Use of platelet-rich fibrin in regenerative dentistry: A systematic review. *Clin. Oral Investig.* 2017, 21, 1913–1927. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

217. Chavda, S.; Levin, L. Human Studies of Vertical and Horizontal Alveolar Ridge Augmentation Comparing Different Types of Bone Graft Materials: A Systematic Review. *J. Oral Implant.* 2018, 44, 74–84. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

218. Baldwin, P.; Li, D.J.; Auston, D.A.; Mir, H.S.; Yoon, R.S.; Koval, K.J. Autograft, Allograft, and Bone Graft Substitutes: Clinical Evidence and Indications for Use in the Setting of Orthopaedic Trauma Surgery. *J. Orthop. Trauma* 2019, 33, 203–213. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

219. Pesce, P.; Menini, M.; Canullo, L.; Khijmatgar, S.; Modenese, L.; Gallifante, G.; Del Fabbro, M. Radiographic and Histomorphometric Evaluation of Biomaterials Used for Lateral Sinus Augmentation: A Systematic Review on the Effect of Residual Bone Height and Vertical Graft Size on New Bone Formation and Graft Shrinkage. *J. Clin. Med.* 2021, 10, 4996. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

220. Zhao, R.; Yang, R.; Cooper, P.R.; Khurshid, Z.; Shavandi, A.; Ratnayake, J. Bone Grafts and Substitutes in Dentistry: A Review of Current Trends and Developments. *Molecules* 2021, 26, 3007. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

221. Jin, S.; Xia, X.; Huang, J.; Yuan, C.; Zuo, Y.; Li, Y.; Li, J. Recent advances in PLGA-based biomaterials for bone tissue regeneration. *Acta Biomater.* 2021, 127, 56–79. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

222. Fernandez De Grado, G.; Keller, L.; Idoux-Gillet, Y.; Wagner, Q.; Musset, A.-M.; Benkirane-Jessel, N.; Bornert, F.; Offner, D. Bone substitutes: A review of their characteristics, clinical use, and perspectives for large bone defects management. *J. Tissue Eng.* 2018, 9, 2041731418776819. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
223. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.* 2017, 3, 278–314. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
224. El-Rashidy, A.A.; Roether, J.A.; Harhaus, L.; Kneser, U.; Boccaccini, A.R. Regenerating bone with bioactive glass scaffolds: A review of in vivo studies in bone defect models. *Acta Biomater.* 2017, 62, 1–28. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
225. Yahav, A.; Kurtzman, G.M.; Katzap, M.; Dudek, D.; Baranes, D. Bone Regeneration. *Dent. Clin. North Am.* 2020, 64, 453–472. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
226. Cheah, C.W.; Al-Namnam, N.M.; Lau, M.N.; Lim, G.S.; Raman, R.; Fairbairn, P.; Ngeow, W.C. Synthetic Material for Bone, Periodontal, and Dental Tissue Regeneration: Where Are We Now, and Where Are We Heading Next? *Materials* 2021, 14, 6123. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
227. Yin, S.; Zhang, W.; Zhang, Z.; Jiang, X. Recent Advances in Scaffold Design and Material for Vascularized Tissue-Engineered Bone Regeneration. *Adv. Heal. Mater.* 2019, 8, e1801433. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
228. Solakoglu, O.; Götz, W.; Heydecke, G.; Schwarzenbach, H. Histological and immunohistochemical comparison of two different allogeneic bone grafting materials for alveolar ridge reconstruction: A prospective randomized trial in humans. *Clin. Implant. Dent. Relat. Res.* 2019, 21, 1002–1016. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
229. Florencio-Silva, R.; da Silva Sasso, G.R.; Sasso-Cerri, E.; Simões, M.J.; Cerri, P.S. Biology of Bone Tissue: Structure, Function, and Factors That Influence Bone Cells. *BioMed. Res. Int.* 2015, 2015, 421746. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
230. Fretwurst, T.; Gad, L.M.; Steinberg, T.; Schmal, H.; Zeiser, R.; Amler, A.-K.; Nelson, K.; Altmann, B. Detection of major histocompatibility complex molecules in processed allogeneic bone blocks for use in alveolar ridge reconstruction. *Oral*

- Surgery, Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.* 2018, 126, 16–21. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
231. Gu, Q.; Yang, H.; Shi, Q. Macrophages and bone inflammation. *J. Orthop. Transl.* 2017, 10, 86–93. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
232. Kohli, S.S.; Kohli, V.S. Role of RANKL-RANK/osteoprotegerin molecular complex in bone remodeling and its immunopathologic implications. *Indian J. Endocrinol. Metab.* 2011, 15, 175–181. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
233. Stout, R.D.; Suttles, J. Functional plasticity of macrophages: Reversible adaptation to changing microenvironments. *J. Leukoc. Biol.* 2004, 76, 509–513. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
234. Batoon, L.; Millard, S.; Raggatt, L.J.; Pettit, A.R. Osteomacs and Bone Regeneration. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2017, 15, 385–395. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
235. Lampiasi, N.; Russo, R.; Zito, F. The Alternative Faces of Macrophage Generate Osteoclasts. *BioMed Res. Int.* 2016, 2016, 9089610. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
236. Baht, G.S.; Vi, L.; Alman, B.A. The Role of the Immune Cells in Fracture Healing. *Curr. Osteoporos. Rep.* 2018, 16, 138–145. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
237. Yanovska, A.; Husak, Y.; Mishchenko, O.; Gudakov, A.; Oleshko, O.; Yusupova, A.; Vielikov, M.; Radwan-Pragłowska, J.; Piątkowski, M.; Janus, L.; et al. Cell viability and collagen deposition on hydroxyapatite coatings formed on pretreated substrates. *Mater. Chem. Phys.* 2020, 258, 123978. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
238. Oleshko, O.; Deineka, V.; Husak, Y.; Korniienko, V.; Mishchenko, O.; Holubnycha, V.; Pisarek, M.; Michalska, J.; Kazek-Kęsik, A.; Jakóbi-Kolon, A.; et al. Ag Nanoparticle-Decorated Oxide Coatings Formed via Plasma Electrolytic Oxidation on ZrNb Alloy. *Materials* 2019, 12, 3742. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
239. Myakinin, A.; Turlybekuly, A.; Pogrebnjak, A.; Mirek, A.; Bechelany, M.; Liubchak, I.; Oleshko, O.; Husak, Y.; Korniienko, V.; Leśniak-Ziółkowska, K.; et

- al. In vitro evaluation of electrochemically bioactivated Ti6Al4V 3D porous scaffolds. *Mater. Sci. Eng. C* 2021, *121*, 111870. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
240. La Monaca, G.; Iezzi, G.; Cristalli, M.P.; Pranno, N.; Sfasciotti, G.L.; Vozza, I. Comparative Histological and Histomorphometric Results of Six Biomaterials Used in Two-Stage Maxillary Sinus Augmentation Model after 6-Month Healing. *BioMed Res. Int.* 2018, *2018*, 1–11. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
241. Wälivaara, D.; Abrahamsson, P. Evaluation of 4 different bone graft substitutes and autogenous bone grafting in root-end resection osteotomies after retrograde root-filling with Intermediate Restorative Material (IRM): An experimental study in dogs. *Open J. Stomatol.* 2013, *3*, 203–208. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
242. Ratnayake, J.T.B.; Mucalo, M.; Dias, G.J. Substituted hydroxyapatites for bone regeneration: A review of current trends. *J. Biomed. Mater. Res. Part B: Appl. Biomater.* 2016, *105*, 1285–1299. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
243. Carrodeguas, R.G.; De Aza, S. α -Tricalcium phosphate: Synthesis, properties and biomedical applications. *Acta Biomater.* 2011, *7*, 3536–3546. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
244. Yanovska, A.; Kuznetsov, V.; Stanislavov, A.; Husak, E.; Pogorielov, M.; Starikov, V.; Bolshanina, S.; Danilchenko, S. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-gelatine composite materials for orthopaedic application. *Mater. Chem. Phys.* 2016, *183*, 93–100. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
245. Ślósarczyk, A.; Paszkiewicz, Z.; Paluszkiewicz, C. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods. *J. Mol. Struct.* 2005, *744–747*, 657–661. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
246. Kannan, S.; Ventura, J.; Ferreira, J. Synthesis and thermal stability of potassium substituted hydroxyapatites and hydroxyapatite/ β -tricalciumphosphate mixtures. *Ceram. Int.* 2007, *33*, 1489–1494. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
247. El Feki, H.; Ben Salah, A.; Daoud, A.; Lamure, A.; Lacabanne, C. Studies by thermally stimulated current (TSC) of hydroxy- and fluoro-carbonated apatites containing sodium ions. *J. Physics: Condens. Matter* 2000, *12*, 8331–8343. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

248. Khoshniat, S.; Bourguine, A.; Julien, M.; Petit, M.; Pilet, P.; Rouillon, T.; Masson, M.; Gatius, M.; Weiss, P.; Guicheux, J.; et al. Phosphate-dependent stimulation of MGP and OPN expression in osteoblasts via the ERK1/2 pathway is modulated by calcium. *Bone* 2011, *48*, 894–902. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
249. Harfenist, E.; Packham, M.; Kinlough-Rathbone, R.; Cattaneo, M.; Mustard, J. Effect of calcium ion concentration on the ability of fibrinogen and von Willebrand factor to support the ADP-induced aggregation of human platelets. *Blood* 1987, *70*, 827–831. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
250. Corbella, S.; Taschieri, S.; Weinstein, R.; Del Fabbro, M. Histomorphometric outcomes after lateral sinus floor elevation procedure: A systematic review of the literature and meta-analysis. *Clin. Oral Implant. Res.* 2015, *27*, 1106–1122. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
251. Danesh-Sani, S.A.; Wallace, S.S.; Movahed, A.; El Chaar, E.S.; Cho, S.-C.; Khouly, I.; Testori, T. Maxillary Sinus Grafting With Biphasic Bone Ceramic or Autogenous Bone. *Implant. Dent.* 2016, *25*, 588–593. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
252. Sakkas, A.; Wilde, F.; Heufelder, M.; Winter, K.; Schramm, A. Autogenous bone grafts in oral implantology—Is it still a “gold standard”? A consecutive review of 279 patients with 456 clinical procedures. *Int. J. Implant. Dent.* 2017, *3*, 1–17. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
253. Lorenz, J.; Kubesch, A.; Al-Maawi, S.; Schwarz, F.; Sader, R.A.; Schlee, M.; Ghanaati, S. Allogeneic bone block for challenging augmentation—A clinical, histological, and histomorphometrical investigation of tissue reaction and new bone formation. *Clin. Oral Investig.* 2018, *22*, 3159–3169. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
254. Stevanovic, M.; Selakovic, D.; Vasovic, M.; Lujic, B.; Zivanovic, S.; Papic, M.; Zivanovic, M.; Milivojevic, N.; Mijovic, M.; Tabakovic, S.Z.; et al. Comparison of Hydroxyapatite/Poly(lactide-co-glycolide) and Hydroxyapatite/Polyethyleneimine Composite Scaffolds in Bone Regeneration of Swine Mandibular Critical Size Defects: In Vivo Study. *Molecules* 2022, *27*, 1694. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]

255. Kalyan, S. It May Seem Inflammatory, but Some T Cells Are Innately Healing to the Bone. *J. Bone Miner. Res.* 2016, *31*, 1997–2000. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
256. McCauley, J.; Bitsaktsis, C.; Cottrell, J. Macrophage subtype and cytokine expression characterization during the acute inflammatory phase of mouse bone fracture repair. *J. Orthop. Res.* 2020, *38*, 1693–1702. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
257. Chow, S.K.-H.; Wong, C.H.-W.; Cui, C.; Li, M.M.-C.; Wong, R.M.Y.; Cheung, W.-H. Modulating macrophage polarization for the enhancement of fracture healing, a systematic review. *J. Orthop. Transl.* 2022, *36*, 83–90. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
258. Chen, K.; Jiao, Y.; Liu, L.; Huang, M.; He, C.; He, W.; Hou, J.; Yang, M.; Luo, X.; Li, C. Communications Between Bone Marrow Macrophages and Bone Cells in Bone Remodeling. *Front. Cell Dev. Biol.* 2020, *8*, 598263. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]
259. Murray, P.J.; Wynn, T.A. Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nat. Rev. Immunol.* 2011, *11*, 723–737. [[Google Scholar](#)] [[CrossRef](#)]