

Л.Ф. Суходуб, Л.Б. Суходуб, М.О. Кумеда

ФІЗИЧНІ ТА ХІМІЧНІ ЧИННИКИ ВПЛИВУ НА ПОРИСТІСТЬ АПАТИТ-БІОПОЛІМЕРНИХ КОМПОЗИТІВ

Сумський державний університет, Медичний інститут
вул. Римського-Корсакова, 2, Суми, Україна, E-mail: l.sukhodub@med.sumdu.edu.ua

Неушкоджена структура та функціональність скелету є передумовою забезпечення якості життя людини. Впровадження новітніх методів лікування та протезування в травматичну хірургію, онкологію, черепно-щелепну хірургію, стоматологію формують запит на біоматеріали з функціоналізованими властивостями. Ріст нової кісткової тканини - це клітинно-регульований процес, що ґрунтується на утворенні певної кісткової морфології, яка поєднує органічну матрицю та її неорганічне наповнення. Неорганічною компонентою кісток і зубів людини є кальцій дефіцитний гідроксиапатит (cdГА) з молярним співвідношення Ca/P в межах від 1.5 до 1.67. Поєднання в матеріалі cdГА та природних полімерів уможлиблює інкорпорування білків та факторів росту в полімерну матрицю, сприяє біосумісності та росту нової кісткової тканини. В цьому огляді розглянута важлива роль параметра пористості біоматеріалів (БМ) при їх використанні для кісткової регенерації. Пористість є важливою характеристикою БМ та запорукою взаємодії матеріалу з клітинами в процесі кісткоутворення, сприяє васкуляризації та процесу біорезорбції синтетичного трансплантату при його заміщенні новоутвореною нативною кісткою. В той же час ступінь пористості має корелювати з механічною стабільністю з метою підтримки структурної цілісності БМ в процесі регенерації твердої тканини. Розглянуті процеси за участі клітин та протеїнів при імплантації БМ як з високим (70–80 %), так і низьким (≤ 45 %) ступенем пористості. Наведені дані про існуючі методи отримання БМ у вигляді пористих скафолдів. Заданий ступінь пористості забезпечується хімічними (зшивання) та фізичними (сублімація) методами. Розглянуті ефекти впливу пор різного розміру та форм на кісткоутворення та васкуляризацію. Показано, що пористість є ефективним фактором впливу на механічні властивості скафолдів, зокрема, на жорсткість БМ – параметр, який впливає на проліферацію остеобластів завдяки регулюванню адгезії клітин в структурі скафолда. Детально проаналізовано питання впливу біополімерної складової (альгінат натрію - АН) на пористість та набрякання гібридних апатит-біополімерних (ГА/АН) композитів, в яких ГА представлений нанометричними голковими кристалітами.

Ключові слова: пористість, кісткова тканина, гідроксиапатит, біополімери, біокомпозиції

ВСТУП

Параметр пористості є необхідною важливою характеристикою будь-якого БМ, яка є запорукою взаємодії матеріалу з клітинами в процесі кісткоутворення, а також необхідної васкуляризації. Ступінь пористості має корелювати з механічною стабільністю з метою підтримки структурної цілісності БМ в процесі регенерації твердої тканини [1].

Встановлено, що біоматеріали як з високою пористістю (70–80 %), так і з відносно низькою (~ 45 %) сприяють утворенню нової кістки [2]. Це пояснюється пористістю нативної кортикальної і губчастої кісток, яка лежить в інтервалі між 3–12 і 50–90 %, відповідно [3]. Рис. 1 демонструє пористу структуру кортикальної та губчастої ділянок кістки. Високий рівень пористості БМ забезпечує ефективне вrostання клітин, а

відносно низький рівень пористості – його механічну міцність. Таким чином, пористість біоматеріалу має бути оптимальною для конкретної ділянки кісткового заміщення. В той же час, існує консенсус серед дослідників щодо мінімального розміру пор (50–100 мкм) в БМ для сприяння клітинному і іонному транспортуванню та ініціації остеогенезу [4]. При цьому важливу роль відіграють макропори (≤ 20 мкм) у забезпеченні життєдіяльності кісткового органу завдяки потоку крові, адсорбції протеїнів, приєднанню остеобластів [5]. Нанопористі біоматеріали мають велику питому поверхню (відношення площі до об'єму). Саме цей фактор впливає на властивості таких матеріалів і їхня поведінка визначається, в основному, поверхневими атомами. В роботі [6] наданий аналіз ролі розміру пор у випадку повної кісткової регенерації (Таблиця 1).

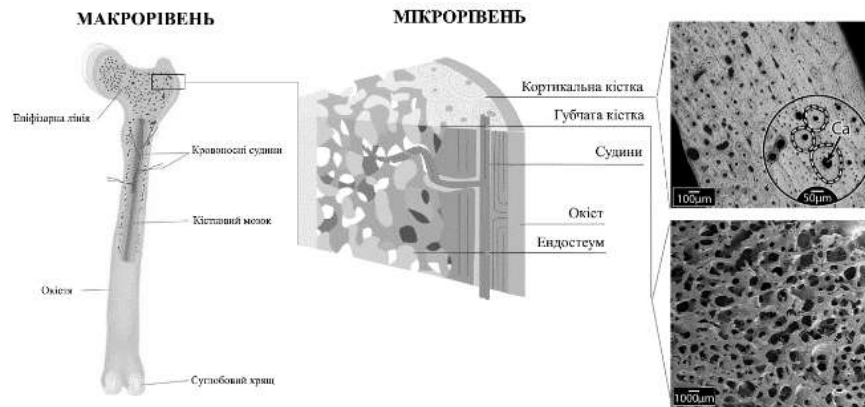


Рис. 1. Зображення структури кістки та пористість різних її ділянок (кортикальна, губчаста)[28]

Таблиця 1. Аналіз ролі розміру пор у процесі регенерації кісткової тканини [6]

| Розмір пор в скафолді, мкм | Спостереження |
|----------------------------|-------------------------|
| 5 | Неоваскуляризація |
| 15–40 | Вростання фіброblastів |
| 40–100 | Вростання остеоїдів |
| 200–350 | Значне вростання кісток |
| >500 | Швидка васкуляризація |

МЕТОДИ ВИГОТОВЛЕННЯ ПОРИСТИХ БМ (СКАФОЛДІВ)

На рис. 2 приведено декілька методів отримання БМ з контрольованою пористістю. Так, поєднання технології сублімації з вилуговуванням пороутворювача надає можливість отримувати пористі скафолди. Розмір пор можна регулювати, змінюючи параметри вилуговування, а також умови синтезу полімер-кальцій фосфатних композицій в поєднанні з процесом їхнього заморожування-сушіння. Надкритичне спінювання в присутності гідрокарбонатів та обробка розплаву є іншим методом отримання пористих матриць з різними розмірами пор [7].

Значна роль при утворенні пористої кальцій-фосфатної кераміки відводиться температурним умовам синтезу. Так, при спіканні біфазної кальцій фосфатної біокераміки (КФБ), яка складається з ГА та β -трикальцій фосфату (β -ТКФ) можливі фазові переходи, які супроводжуються тепловим розширенням кожної з фаз та утворенням небажаних тріщин всередині зразка. Для уникнення подібних небажаних ефектів був застосований синтез окремих

компонентів КФБ за спиртовою золь-гель технологією. Після цього порошки піддавалися холодному пресуванню при 300 МПа та повітряному спіканню при 1070 та 1130 °С. Такі параметри спікання були придатними для сприяння задовільній консолідації частинок. Результати довели, що перетворення нестехіометричного ГА в β -ТКФ відбувалося одночасно з ростом кристалів та ущільненням матеріалу. Механічні випробування показали, що зразки, відпалені за приведених температур, відрізняються мікро- та наноструктурно. Але швидкість нагріву (10 °С/хв), поєднана з температурою спікання (1070 °С), дозволяє отримати зразки з меншим розміром кристалітів і макропористістю, яка є важливою властивістю для застосування біокераміки [8].

Синтетичні кальцій фосфатні кісткові трансплантати потребують подальшого вдосконалення з метою повної заміни ауто трансплантатів (власна кістка, часто з гребеня клубової кістки) або алотрансплантатів (трупна кістка, зазвичай отримують з банку кісток). Застосування вказаних нативних трансплантатів потребує додаткової

операції у першому випадку та може викликати алергічне відторгнення у другому випадку. При проектуванні та розробці БМ проходять низку трудомістких і вартісних етапів випробувань *in vitro* та *in vivo*. Розроблені підходи до синтезу та виробництва КФБ, які забезпечують точний контроль їхніх хімічних та фізичних властивостей. Перспективною технологією в цьому

контексті є мікрофлюїдика – процес масового високомонодисперсного утворення емульсійних крапель, які можуть служити мікрореакторами для контрольованого синтезу біоматеріалів. Так, в одній із перших робіт [9] синтез мезопористого ГА проводили з використанням подвійних емульсійних крапель як мікрореакторів (рис. 3).

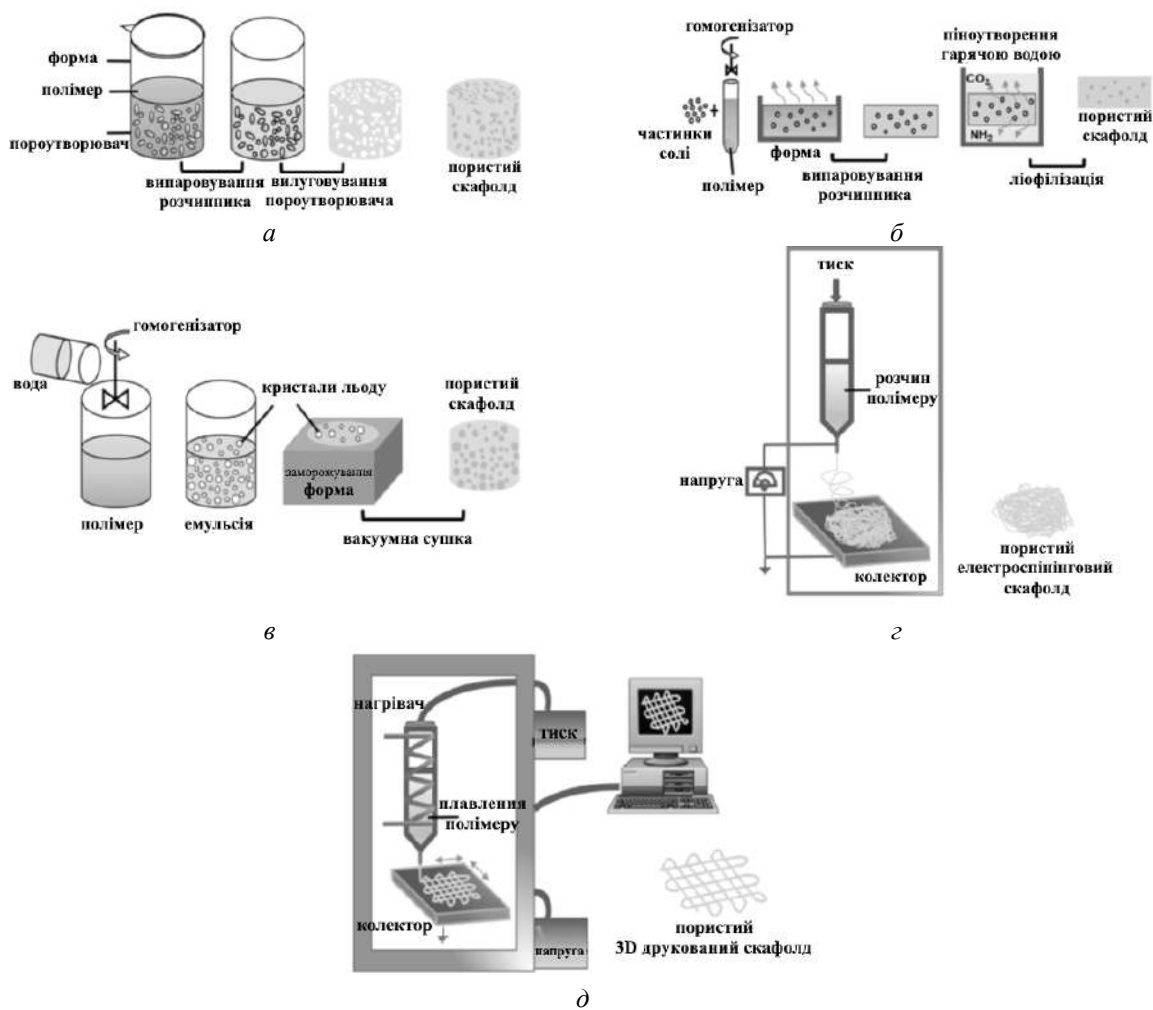


Рис. 2. Існуючі методи отримання БМ у вигляді пористих скафолдів: *a* – випаровування порогену, *б* – газове піноутворення, *в* – сублімація, *г* – електроспінінг розчину, *д* – електронапис та 3-D друк [7]

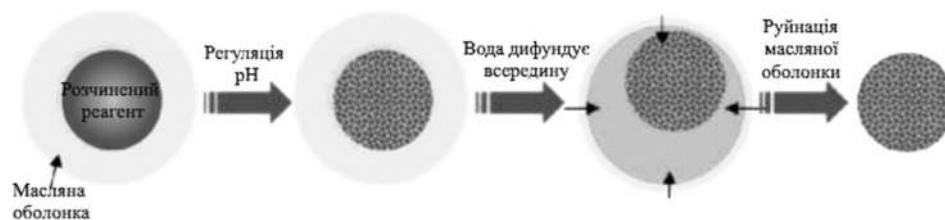


Рис. 3. Схематична ілюстрація синтезу гідроксиapatиту з подвійною емульсією [9]

Внутрішні краплі подвійної емульсії складаються з водного розчину нітрату кальцію та фосфорної кислоти – прекурсорів ГА. Масляні оболонки, що оточують внутрішні краплі, складаються з інертної масляної фази. При підвищенні рН у внутрішніх краплях емульсії утворюється ГА. За рахунок осмотичного тиску молекули води дифундують у внутрішні краплі, що призводить до їхнього збільшення, і як результат, вивільнення гідроксиапатитного ядра з масляної оболонки. Подібна технологія краплинних реакторів дозволяє отримувати різні кальцій фосфатні фази, а зміною концентрації розчинів прекурсорів отримувати мікрочастинки різної пористості. Вказана методика вимагає невеликих обсягів реагентів і підходить для моніторингу окремих крапель за допомогою простих методів, таких як світлопольна мікроскопія [9]. Повідомляється про розробку нової мікрофлюїдної платформи для виробництва кальцій фосфатних мікрочастинок різного розміру, складу та пористості, отриманих з монодисперсних крапель. Показано, що мікрочастинки кальцій фосфатів, вироблені з використанням цієї платформи, підтримували ріст і диференціацію клітин мезенхімальної строми людини [10]. Повідомляється про гідротермальний метод отримання пористого біфазного (ГА, ТКФ) кальцій фосфатного продукту, який дозволяє підвищити пористість щонайменше на 60–80 % в порівнянні до такого, отриманого класичним методом. Остеоіндуктивний кальцій фосфатний продукт, отриманий даним способом, має голчасту форму, діаметр 10–1500 нм та заздалегідь визначений ступінь пористості [11].

ПОРИСТІСТЬ І ОСТЕОБЛАСТИ

Остеобласти, розмір яких становить 15–50 мкм ефективніше функціонують при мінералізації кісткової тканини (КТ) в порах більшого розміру (100–200 мкм), тоді як менший розмір пор (< 100 мкм) веде до утворення фіброзної тканини [12]. Подібний висновок було зроблено раніше [13] при дослідженні магнієвих скафолдів з розмірами пор 250 та 400 мкм, які сприяли утворенню зрілої КТ з необхідною васкуляризацією, яка забезпечує доставку кисню та поживних речовин для активізації остеобластів. Пори

більшого розміру підвищують рівень остеопонтину (міжклітинний структурний білок) та колагену типу I, які міцно зв'язуються з гідроксиапатитом і, відповідно, сприяють інтенсивнішому кісткоутворенню [13]. Пори розміру > 500 мкм не впливають на клітинну адгезію [14]. На відміну від макропористості, мікропористість завдяки більшій площі поверхні сприяє адгезії білків і зв'язуванню клітин з поверхнею скафолдів [15].

ГРАДІЄНТ ПОРИСТОСТІ КТ

Необхідність в кісткових імплантатах з градієнтом пористості для забезпечення повної регенерації КТ обумовлена зміною в щільності природної КТ в осьовому напрямку довгих кісток. Так, в роботі [16] показано, що скафолди з градієнтною пористістю покращували остеогенну диференціацію мезенхімальних стовбурових клітин людини *in vitro*. Наявність пор демонструвала високу ефективність висіву клітин, яка зростала з 35% (однорідні скафолди) до 70% (градієнтні скафолди) в статичних умовах росту культури [17]. Геометрія пор є також впливовим фактором в кінетиці регенерації КТ: пори з гексагональною формою показують найвищу швидкість росту клітин у порівнянні з прямокутними порами, а тим більше з трикутними порами [18].

ПОРИСТІСТЬ ТА МЕХАНІЧНІ ВЛАСТИВОСТІ СКАФОЛДІВ

Ієрархічна структура кісткової тканини в різних ділянках кістки є причиною коливань міцності на стиск та міцності на розтягування [19]. Як зазначалось раніше, кортикальна кістка має значно меншу пористість і тому витримує навантаження у 8–20 ГПа в напрямку, паралельному осі остеону, в той час як губчаста кістка з високою пористістю (> 90 %) і високою васкуляризацією має модуль Юнга біля 100 МПа, що значно нижче модуля Юнга кортикальної кістки. Таким чином, пористість є ефективним фактором впливу на механічні характеристики КТ: зв'язок між пористістю та механічними властивостями скафолдів має експоненціальний характер [20]. Деякі протиріччя результатів щодо механічних властивостей, отримані в ході *in vitro* та *in vivo* досліджень, обумовлені різним типом клітин,

локалізованих в поровому просторі скафолда після його імплантації: фібробласти раніше локалізуються в порах меншого розміру, тоді як кісткоутворюючі клітини остеобласти – в порах значно більшого розміру. Тому механічна стійкість скафолда з часом змінюється після повного входження кісткових клітин в свої пори [21]. Необхідно зазначити, що жорсткість біоматеріалу є одним із параметрів, який збільшує проліферацію остеобластів: наноструктурована поверхня стінок пор сприяє фіксації, диференціації та вrostанню клітин [22]. Неоднорідний розмір пор по об'єму скафолдів, на відміну від однорідних за пористістю скафолдів, сприяє відновленню та підтриманню пружного стану біоматеріалу після деформації, що є критичним моментом при біомедичному застосуванні. Подібний ефект, а саме демонстрація кращої міцності на стискання для зразків кальцій поліфосфатних скафолдів з неоднорідною пористістю (200–400 мкм) у порівнянні з подібними з однорідною пористістю розглянуто в [23]. Також, було показано, що полілактид-ко-гліколід (PLGA) скафолди зі сферичними порами мають кращі механічні властивості, ніж із кубічними [24]. Біокераміка на основі фосфату кальцію широко застосовується в біомедичній галузі завдяки біосумісності, біоактивності, остеопровідності та неімуногенності. Крім того, кальцій фосфати легко синтезуються, переробляються і стерилізуються [25, 26], а також можуть бути завантажені біологічно активними молекулами для лікування таких патологій, як інфекція кісток або рак. Однак, вони мають обмеження при застосуванні на ділянках кістки з великим механічним навантаженням, оскільки демонструють низьку стійкість до втоми, твердість і крихкість. Ці обмеження є серйозним недоліком для відновлення великих кісткових дефектів. Але у випадках застосування на ділянках без навантаження наявність властивих таким матеріалам мікро- та макропористості сприяє адгезії клітин і більш однорідній біорезорбції (біодеградації) матеріалу в фізіологічних умовах. Кінетика біодеградації скафолдів також залежить від розміру пор: більша площа поверхні в скафолдах з великими порами збільшує дифузю продуктів розпаду, причому серед морфологічно різних пор квадратні пори

забезпечують більш швидке розкладання та втрату маси скафолду [27].

ВПЛИВ ПОЛІМЕРНОЇ СКЛАДОВОЇ

Кісткова тканина – це складний метаболічний орган, який складається із кісткових клітин (остеобласти, остеокласти, остецити), екстраклітинної рідини разом з колагеновими фібрилами, збагаченими нанокристалом ГА, некалогенових протеїнів та молекул води. Апатит-біополімерні скафолди в певній мірі імітують другий рівень в структурній ієрархії кісткової тканини і тому знаходяться у фокусі багатьох досліджень у світі [28]. Зокрема, в роботі [29] синтезована серія апатит-біополімерних наноструктурованих композитних матеріалів для медичного використання з різним співвідношенням полімерної (альгінат натрію, АН) до неорганічної складової (ГА) та досліджені їхні властивості, включаючи вплив полімерної складової на пористість та набрякання. АН – природний аніонний полімер, який, маючи високу біосумісність та низьку токсичність, сприяє регенеративним процесам при загоюванні ран. При синтезі були використані водні розчини 0.167 М кальцій нітрату тетрагідрату (P1) та 0.1 М гідрофосфату амонію (P2). АН розчиняли в $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ в сушильній шафі при 37 °С протягом 1 доби (P3). Для утворення композиту розчин P1 додавали по краплях до суміші P3. Реакцію синтезу проводили при 80 °С, значення рН = 12 реакційної суміші досягали додаванням 25 % водного розчину NH_4OH . Було отримано 5 типів зразків з наступними масовими ГА/АН співвідношеннями: 4:1 (зразок № 1), 3:2 (зразок № 2), 1:1 (зразок № 3), 2:3 (зразок № 4), 1:4 (зразок № 5). Рентгенофазовий аналіз підтверджував формування кристалітів ГА в присутності АН, окрім зразку № 5, для якого характерна низька ступінь кристалічності в результаті значного впливу біополімера АН. Зсув та збільшення інтенсивності основних коливань в ІЧ-спектрі отриманих ГА-АН композитів свідчить про формування міжмолекулярних зв'язків між мінеральною фазою та органічною компонентою шляхом взаємодії між позитивно зарядженими іонами кальцію та негативно зарядженими карбоксильними групами АН [30]. Подібні взаємодії є критичними для забезпечення контрольованої

нуклеації та росту кристалітів неорганічної фази [31]. ПЕМ дослідження демонструють голчасту структуру частинок ГА у складі композитного матеріалу у зразках № 1–4 (рис. 4), причому, зі збільшенням вмісту АН в реакційній суміші спостерігається зменшення розміру частинок ГА від 120 (№ 1) до 50 нм (№ 4). Ступінь пористості (СП) отриманих композитних матеріалів розраховували за формулою [32]:

$$\text{СП} = m_1 - m_0 / \rho_{\text{ет}} (V_2 - V_3),$$

де V_2 – об'єм етанолу з зануреним зразком, V_3 – об'єм етанолу, який залишився в мірному циліндрі після вилучення зразка, $\rho_{\text{ет}}$ – густина етанолу.

Розрахунок рівноважного ступеня набрякання Q проводили за формулою:

$$Q = m - m_0 / m,$$

де m_0 – маса сухого зразка, г; m – маса зразка, що набух до рівноважного стану.

Отримані результати дослідження пористості та набрякання для зразків № 1–4 приведені на рис. 4 [29].

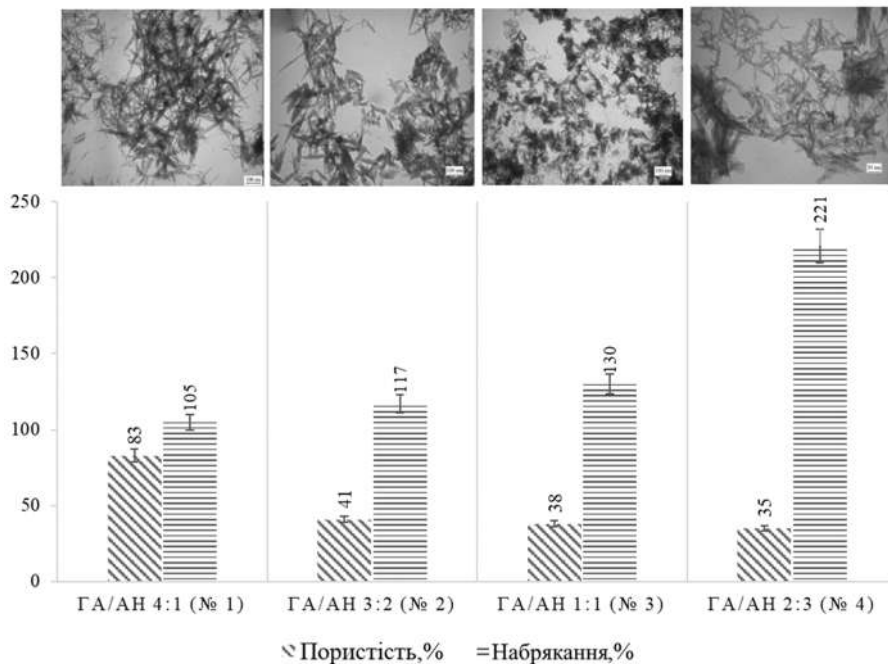


Рис. 4. Структура композитів ГА-АН з різним співвідношенням неорганічної і полімерної складових за даними ПЕМ та ступінь їхньої пористості і набрякання. Відмінності в результатах статистично значимі ($p \leq 0.05$)

Аналіз отриманих результатів вказує на те, що у випадку зразка ГА/АН 4:1, набрякання в більшій мірі відбувається завдяки його високій пористості. В той же час вагомий вклад у набрякання інших зразків вносить полімерна складова, оскільки пористість цих зразків невисока (рис. 4). Крім того, сам ГА відомий своєю здатністю до адсорбції. Максимальний ступінь набрякання демонструє зразок № 4 з ГА/АН 2:3 за рахунок найбільшого вмісту біополімера. Таким чином, результати досліджень нанокомпозитного ГА-АН матеріалу з різним співвідношенням ГА:АН показують, що зі

збільшенням вмісту полімерної складової пористість композитних матеріалів зменшується, а ступінь набрякання збільшується.

ВИСНОВКИ

В цьому огляді розглянута важлива роль параметра пористості при створенні біоматеріалів медичного призначення, які можуть бути використані як трансплантанти з метою регенерації ушкодженої кісткової тканини. Показано, що пористість є важливою характеристикою БМ та є запорукою взаємодії матеріалу з клітинами в процесі кісткоутворення, сприяє васкуляризації та процесу

біорезорбції синтетичного трансплантату при його заміщенні новоутвореною нативною кісткою. В той же час кореляція між ступенем пористості та механічною міцністю матеріалу забезпечує підтримку структурної цілісності БМ в процесі регенерації твердої тканини та впливає на проліферацію остеобластів завдяки регулюванню адгезії клітин в структурі скафолда. Наведені дані про існуючі методи отримання БМ у вигляді пористих скафолдів, в яких заданий ступінь пористості забезпечується хімічними (зшивання) та фізичними (сублімація) методами. Показаний вплив ступеня пористості на процеси за участі

клітин та протеїнів при імплантації БМ, а також ефекти впливу морфології пор на кісткоутворення та васкуляризацію. Детально проаналізовано питання впливу біополімерної складової (альгінат натрію - АН) на пористість та набрякання гібридних апатит-біополімерних (ГА/АН) композитів, в яких ГА представлений нанометричними голковими кристалітами.

ПОДЯКА

Робота виконана за підтримки гранту Національного фонду фундаментальних досліджень України 0122U001154.

Physical and chemical factors influencing the porosity of apatite-biopolymer composites

Sukhodub L.F., Sukhodub L.B., Kumeda M.O.

Sumy State University
2 Rymskogo-Korsakova Str., Sumy, 40007, Ukraine, l.sukhodub@med.sumdu.edu.ua

The undamaged structure and functionality of the skeleton are a prerequisite for ensuring the quality of human life. The introduction of the latest treatment methods and prosthetics in traumatic surgery, oncology, cranial surgery, and dentistry form a demand for biomaterials with functionalized properties. The growth of new bone tissue is a cell-regulated process based on creating a specific bone morphology, which combines the organic matrix and its inorganic content. The inorganic component of human bones and teeth is calcium deficiency hydroxyapatite (cdHA), with a molar ratio of Ca/P ranging from 1.5 to 1.67. The combination of cdHA and natural polymers in the material allows the incorporation of proteins and growth factors into the polymer matrix. It promotes biocompatibility and the growth of new bone tissue. This review considers the critical role of the porosity parameter of biomaterials (BM) in their use for bone regeneration. Porosity is an essential characteristic of BM and guarantees the interaction of the material with cells in bone formation, promoting vascularization and the process of biosorption of synthetic graft when it is replaced by newly formed native bone. At the same time, the degree of porosity should correlate with mechanical stability to maintain the structural integrity of BM in the process of hard tissue regeneration. Processes involving cells and proteins during BM implantation with both high (70–80 %) and low (≤ 45 %) degrees of porosity are considered. Data on existing methods of obtaining BM in porous scaffolds are given. The specified degree of porosity is provided by chemical (cross-linking) and physical (sublimation) methods. The effects of pores of different sizes and shapes on bone formation and vascularization are considered. It is shown that porosity is an influential factor influencing the mechanical properties of scaffolds, in particular, the stiffness of BM - a parameter that affects the proliferation of osteoblasts by regulating cell adhesion in the scaffold structure. The influence of the biopolymer component (Sodium Alginate - AN) on the porosity and swelling of hybrid apatite-biopolymer (HA/AN) composites, in which nanometric needle crystallites represent HA, is analyzed in detail.

Keywords: porosity, bone tissue, Hydroxyapatite, biopolymers, biocomposites

ЛІТЕРАТУРА

1. Zhang R., Ma P.X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process // J. Biomed. Mater. Res. – 1999. – V. 45, N 4. – P. 285–293.
2. Best S.M., Porter A.E., Thian E.S., Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future // J. Eur. Ceram. Soc. – 2008. – V. 28, N 7. – P. 1319–1327.
3. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis // Biomaterials. – 2005. – V. 26, N 27. – P. 5474–5491.
4. Woodard J.R., Hilldore A.J., Lan S.K. et al. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity // Biomaterials. – 2007. – V. 28, N 1. – P. 45–54.
5. Woesz A., Rumpler M., Stampfl J. et al. Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting // Mater. Sci. Eng. C. – 2005. – V. 25, N 2. – P. 181–186.
6. Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors // Tissue Eng. – 2001. – V. 7, N 6. – P. 679–689.
7. Abbasi N., Hamlet S., Love R.M., Nguyen N.-T. Porous scaffolds for bone regeneration // J. Sci. Adv. Mater. Devices. – 2020. – V. 5, N 1. – P. 1–9.
8. Ferreiro Balbuena O.B., Santos Paiva L.F., Ribeiro A.A. et al. Sintering parameters study of a biphasic calcium phosphate bioceramic synthesized by alcoholic sol-gel technique // Ceram. Int. – 2021. – V. 47, N 23. – P. 32979–32987.
9. Shum H.C., Bandyopadhyay A., Bose S., Weitz D.A. Double Emulsion Droplets as Microreactors for Synthesis of Mesoporous Hydroxyapatite // Chem. Mater. – 2009. – V. 21, N 22. – P. 5548–5555.
10. Galván-Chacón V.P., Costa L., Barata D., Habibovic P. Droplet microfluidics as a tool for production of bioactive calcium phosphate microparticles with controllable physicochemical properties // Acta Biomater. – 2021. – V. 128. – P. 486–501.
11. U.S. Patent US10561683B2. Method for producing an osteoinductive calcium phosphate and products thus obtained / De Groot-Barrere F., Van Miegem V., Yuan H., De Bruijn J. – Опубл. 2021.
12. Ivglia G., Kargozar S., Baino F. Biomaterials, Current Strategies, and Novel Nano-Technological Approaches for Periodontal Regeneration // J. Funct. Biomater. – 2019. – V. 10, N 1. – P. 3.
13. Cheng M., Wahafu T., Jiang G. et al. A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, N 1. – P. 24134.
14. Lim T.C., Chian K.S., Leong K.F. Cryogenic prototyping of chitosan scaffolds with controlled micro and macro architecture and their effect on in vivo neo-vascularization and cellular infiltration // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2010. – V. 94, N 4. – P. 1303–1311.
15. Abbasi N., Abdal-hay A., Hamlet S. et al. Effects of Gradient and Offset Architectures on the Mechanical and Biological Properties of 3-D Melt Electrowritten (MEW) Scaffolds // ACS Biomater. Sci. Eng. – 2019. – V. 5, N 7. – P. 3448–3461.
16. di Luca A., Ostrowska B., Lorenzo-Moldero I. et al. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds // Sci. Rep. – 2016. – V. 6, N 1. – P. 22898.
17. Sobral J.M., Caridade S.G., Sousa R.A. et al. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency // Acta Biomater. – 2011. – V. 7, N 3. – P. 1009–1018.
18. van Bael S., Chai Y.C., Truscetto S. et al. The effect of pore geometry on the in vitro biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti₆Al₄V bone scaffolds // Acta Biomater. – 2012. – V. 8, N 7. – P. 2824–2834.
19. Morgan E.F., Unnikrisnan G.U., Hussein A.I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States // Annu. Rev. Biomed. Eng. – 2018. – V. 20, N 1. – P. 119–143.
20. Sengers B.G., Please C.P., Taylor M., Oreffo R.O.C. Experimental–Computational Evaluation of Human Bone Marrow Stromal Cell Spreading on Trabecular Bone Structures // Ann. Biomed. Eng. – 2009. – V. 37, N 6. – P. 1165–1176.
21. Roosa S.M.M., Kemppainen J.M., Moffitt E.N. et al. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an in vivo model // J. Biomed. Mater. Res. Part A. – 2010. – V. 92A, N 1. – P. 359–368.
22. Chen X., Fan H., Deng X. et al. Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue Regeneration in Bone Tissue Applications // Nanomaterials. – 2018. – V. 8, N 11. – P. 960.
23. Wang Q., Wang Q., Wan C. Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro // Anais da Academia Brasileira de Ciências. – 2012. – V. 84, N 1. – P. 9–16.
24. Ma P.X., Choi J.-W. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network // Tissue Eng. – 2001. – V. 7, N 1. – P. 23–33.

25. Xu S., Liu J., Zhang L. et al. Effects of HAp and TCP in constructing tissue engineering scaffolds for bone repair // *J. Mater. Chem. B.* – 2017. – V. 5, N 30. – P. 6110–6118.
26. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates in dentistry // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2013. – V. 24, N 6. – P. 1335–1363.
27. Xu M., Zhai D., Chang J., Wu C. In vitro assessment of three-dimensionally plotted nagelschmidite bioceramic scaffolds with varied macropore morphologies // *Acta Biomater.* – 2014. – V. 10, N 1. – P. 463–476.
28. Aparicio C., Ginebra M.P. *Biomaterialization and Biomaterials, Fundamentals and Applications.* – Elsevier, 2016. – 482 p.
29. Мартинюк О.О., Суходуб Л.Б., Суходуб Л.Ф. Нанокompозитні матеріали на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію: синтез і характеристика // *Біофізичний Вісник.* – 2015. – Т. 1, № 33. – С. 48–59.
30. Wang L., Li Y., Li C. In situ processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite // *J. Nanopart. Res.* – 2009. – V. 11, N 3. – P. 691–699.
31. Malkaj P., Pierri E., Dalas E. The crystallization of Hydroxyapatite in the presence of sodium alginate // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2005. – V. 16, N 8. – P. 733–737.
32. Pramanik N., Mohapatra S., Bhargava P., Pramanik P. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite (HAp)-poly (ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2009. – V. 29, N 1. – P. 228–236.

REFERENCES

1. Zhang R., Ma P.X. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process. *J. Biomed. Mater. Res.* 1999. **45**(4): 285.
2. Best S.M., Porter A.E., Thian E.S., Huang J. Bioceramics: Past, present and for the future. *J. Eur. Ceram. Soc.* 2008. **28**(7): 1319.
3. Karageorgiou V., Kaplan D. Porosity of 3D biomaterial scaffolds and osteogenesis. *Biomaterials.* 2005. **26**(27): 5474.
4. Woodard J.R., Hilldore A.J., Lan S.K., Park C.J., Morgan A.W., Eurell J.A.C., Clark S.G., Wheeler M.B., Jamison R.D., Wagoner Johnson A.J. The mechanical properties and osteoconductivity of hydroxyapatite bone scaffolds with multi-scale porosity. *Biomaterials.* 2007. **28**(1): 45.
5. Woesz A., Rumpler M., Stampfl J., Varga F., Fratzi-Zelman N., Roschger P., Klaushofer K., Fratzi P. Towards bone replacement materials from calcium phosphates via rapid prototyping and ceramic gelcasting. *Mater. Sci. Eng. C.* 2005. **25**(2): 181.
6. Yang S., Leong K.-F., Du Z., Chua C.-K. The Design of Scaffolds for Use in Tissue Engineering. Part I. Traditional Factors. *Tissue Eng.* 2001. **7**(6): 679.
7. Abbasi N., Hamlet S., Love R.M., Nguyen N.-T. Porous scaffolds for bone regeneration. *J. Sci. Adv. Mater. Devices.* 2020. **5**(1): 1.
8. Ferreira Balbuena O.B., Santos Paiva L.F., Ribeiro A.A., Monteiro M.M., Varella de Oliveira M., Pereira L.C. Sintering parameters study of a biphasic calcium phosphate bioceramic synthesized by alcoholic sol-gel technique. *Ceram. Int.* 2021. **47**(23): 32979.
9. Shum H.C., Bandyopadhyay A., Bose S., Weitz D.A. Double Emulsion Droplets as Microreactors for Synthesis of Mesoporous Hydroxyapatite. *Chem. Mater.* 2009. **21**(22): 5548.
10. Galván-Chacón V.P., Costa L., Barata D., Habibovic P. Droplet microfluidics as a tool for production of bioactive calcium phosphate microparticles with controllable physicochemical properties. *Acta Biomater.* 2021. **128**: 486.
11. Patent US 10561683B2. De Groot-Barrere F., Van Miegem V., Yuan H., De Bruijn J. Method for producing an osteoinductive calcium phosphate and products thus obtained. 2021.
12. Iviglia G., Kargozar S., Baino F. Biomaterials, Current Strategies, and Novel Nano-Technological Approaches for Periodontal Regeneration. *J. Funct. Biomater.* 2019. **10**(1): 3.
13. Cheng M., Wahafu T., Jiang G., Liu W., Qiao Y., Peng X., Cheng T., Zhang X., He G., Liu X. A novel open-porous magnesium scaffold with controllable microstructures and properties for bone regeneration. *Sci. Rep.* 2016. **6**(1): 24134.
14. Lim T.C., Chian K.S., Leong K.F. Cryogenic prototyping of chitosan scaffolds with controlled micro and macro architecture and their effect on in vivo neo-vascularization and cellular infiltration. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2010. **94**(4): 1303.
15. Abbasi N., Abdal-hay A., Hamlet S., Graham E., Ivanovski S. Effects of Gradient and Offset Architectures on the Mechanical and Biological Properties of 3-D Melt Electrowritten (MEW) Scaffolds. *ACS Biomater. Sci. Eng.* 2019. **5**(7): 3448.

16. di Luca A., Ostrowska B., Lorenzo-Moldero I., Lepedda A., Swieszkowski W., van Blitterswijk C., Moroni L. Gradients in pore size enhance the osteogenic differentiation of human mesenchymal stromal cells in three-dimensional scaffolds. *Sci. Rep.* 2016. **6**: 22898.
17. Sobral J.M., Caridade S.G., Sousa R.A., Mano J.F., Reis R.L. Three-dimensional plotted scaffolds with controlled pore size gradients: Effect of scaffold geometry on mechanical performance and cell seeding efficiency. *Acta Biomater.* 2011. **7**(3): 1009.
18. van Bael S., Chai Y.C., Truscetto S., Moesen M., Kerckhofs G., van Oosterwyck H., Kruth J.-P., Schrooten J. The effect of pore geometry on the in vitro biological behavior of human periosteum-derived cells seeded on selective laser-melted Ti₆Al₄V bone scaffolds. *Acta Biomater.* 2012. **8**(7): 2824.
19. Morgan E.F., Unnikrisnan G.U., Hussein A.I. Bone Mechanical Properties in Healthy and Diseased States. *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2018. **20**(1): 119.
20. Sengers B.G., Please C.P., Taylor M., Oreffo R.O.C. Experimental–Computational Evaluation of Human Bone Marrow Stromal Cell Spreading on Trabecular Bone Structures. *Ann. Biomed. Eng.* 2009. **37**(6): 1165.
21. Roosa S.M.M., Kempainen J.M., Moffitt E.N., Krebsbach P.H., Hollister S.J. The pore size of polycaprolactone scaffolds has limited influence on bone regeneration in an *in vivo* model. *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2010. **92A**(1): 359.
22. Chen X., Fan H., Deng X., Wu L., Yi T., Gu L., Zhou C., Fan Y., Zhang X. Scaffold Structural Microenvironmental Cues to Guide Tissue Regeneration in Bone Tissue Applications. *Nanomaterials.* 2018. **8**(11): 960.
23. Wang Q., Wang Q., Wan C. Preparation and evaluation of a biomimetic scaffold with porosity gradients in vitro. *Anais da Academia Brasileira de Ciências.* 2012. **84**(1): 9.
24. Ma P.X., Choi J.-W. Biodegradable Polymer Scaffolds with Well-Defined Interconnected Spherical Pore Network. *Tissue Eng.* 2001. **7**(1): 23.
25. Xu S., Liu J., Zhang L., Yang F., Tang P., Wu D. Effects of HAp and TCP in constructing tissue engineering scaffolds for bone repair. *J. Mater. Chem. B.* 2017. **5**(30): 6110.
26. Dorozhkin S.V. Calcium orthophosphates in dentistry. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2013. **24**(6): 1335.
27. Xu M., Zhai D., Chang J., Wu C. *In vitro* assessment of three-dimensionally plotted nagelschmidite bioceramic scaffolds with varied macropore morphologies. *Acta Biomater.* 2014. **10**(1): 463.
28. Aparicio C., Pau Ginebra M. *Biomaterialization and Biomaterials, Fundamentals and Applications.* (Elsevier, 2016).
29. Martynyuk O.O., Sukhodub L.F., Sukhodub L.B. Nanocomposite materials based on hydroxyapatite and sodium alginate: synthesis and characteristics. *Biophysical Bulletin.* 2015. **1**(33): 48.
30. Wang L., Li Y., Li C. *In situ* processing and properties of nanostructured hydroxyapatite/alginate composite. *J. Nanopart. Res.* 2009. **11**(3): 691.
31. Malkaj P., Pierri E., Dalas E. The crystallization of Hydroxyapatite in the presence of sodium alginate. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 2005. **16**(8): 733.
32. Pramanik N., Mohapatra S., Bhargava P., Pramanik P. Chemical synthesis and characterization of hydroxyapatite (HAp)-poly (ethylene co vinyl alcohol) (EVA) nanocomposite using a phosphonic acid coupling agent for orthopedic applications. *Mater. Sci. Eng. C.* 2009. **29**(1): 228.

Надійшла 20.01.2022, прийнята 05.09.2022