

WARSZAWSKI UNIWERSYTET MEDYCZNY

WYDZIAŁ FARMACEUTYCZNY

Rozprawa na stopień doktora nauk medycznych i nauk o zdrowiu
w dyscyplinie nauki farmaceutyczne

**Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt
jako materiał kośćozastępczy**

mgr farm. **Barbara Kołodziejska**

Promotor: dr hab. n. farm. **Joanna Kolmas**

Katedra i Zakład Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów



Warszawa 2023

Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćozastępczy
Barbara Kołodziejska



Ministerstwo
Edukacji i Nauki

Badania były finansowane ze środków
Ministerstwa Edukacji i Nauki
w ramach działalności statutowej
Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego

Grant Młodego Badacza WUM

Tytuł projektu: Wielofunkcyjny dokostny kompozyt o składzie kolagen/modyfikowany nanoapatyt o potencjalnym działaniu hemostatycznym – synteza, właściwości fizykochemiczne i wstępna ocena cytotoksyczności

Numer projektu: MB/F/3

Źródło finansowania: FW23/F/MB1/N/20

Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćozastępczy
Barbara Kołodziejska

Pragnę złożyć serdeczne podziękowania Pani Promotor

dr hab. n. farm. Joannie Kolmas

za opiekę naukową, zaufanie, nieocenioną pomoc,

szczere zaangażowanie oraz ogromny wkład

w mój rozwój naukowy i intelektualny.

Serdeczne podziękowania składam wszystkim

Pracownikom i Doktorantom

Katedry i Zakładu Chemii Farmaceutycznej i Biomateriałów WUM

za życzliwość oraz okazaną pomoc.

Mojej Rodzinie i Bliskim dziękuję za wsparcie i cierpliwe towarzyszenie.

Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćozastępczy
Barbara Kołodziejska

Spis treści

Spis treści.....	6
Cykl publikacji będących podstawą rozprawy.....	7
Dodatkowa aktywność naukowa.....	8
Streszczenie	10
Abstract.....	13
Wykaz skrótów i akronimów:	16
1. Wstęp.....	17
1.1. Budowa tkanki kostnej	18
1.2. Wybrane schorzenia tkanki kostnej	20
1.3. Biomimetyczne materiały kośćcozastępcze	22
1.3.1. Bioceramika fosforanowo-wapniowa	22
1.3.2. Polimery naturalne	24
1.3.3. Kompozyty	26
1.4. Funkcjonalizacja i modyfikacja kompozytów kolagenowo/apatytowych	28
1.4.1. Podstawienia jonowe w sieci krystalicznej hydroksyapatytu	28
1.4.2. Dodatek substancji leczniczej	31
1.4.3. Wzbogacenie matrycy organicznej o inne polimery.....	32
2. Cele pracy.....	35
3. Materiały i metody.....	36
3.1. Synteza biomimetycznych wielopodstawionych apatytów	36
3.2. Charakterystyka fizykochemiczna proszków apatytowych	37
3.3. Wstępne badania biologiczne <i>in vitro</i>	38
3.4. Otrzymanie materiałów kompozytowych	40
3.4.1. Wprowadzenie substancji leczniczej do kompozytów	42
3.5. Charakterystyka kompozytów	43
4. Omówienie i dyskusja wyników badań	45
5. Podsumowanie i wnioski.....	58
6. Aspekty nowości w pracy.....	60
7. Bibliografia	61
Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej.....	68

Cykl publikacji będących podstawą rozprawy

Prace przeglądowe:

P1 B. Kołodziejska, A. Kaflak, J. Kolmas

Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review.

Materials **2020**, t. 13, 1748; <https://doi.org/10.3390/ma13071748>

Punkty IF₂₀₂₀: 3,623; punkty MEiN: 140.

Prace oryginalne:

P2 B. Kołodziejska, N. Sturaro, A. Zgadzaj, J. Kolmas

Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites.

Ceramics International **2023**;

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.10.035>

Punkty IF₂₀₂₃: 5,2; Punkty MEiN: 100.

P3 B. Kołodziejska, Ł. Pajchel, A. Zgadzaj, J. Kolmas

A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery.

Materials **2022**, t. 15, nr 24, 8888; <https://doi.org/10.3390/ma15248888>

Punkty IF₂₀₂₂: 3,400; Punkty MEiN: 140.

P4 B. Kołodziejska, R. Figat, J. Kolmas

Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material.

W recenzji. Złożono: 21.10.2023 w *International Journal of Molecular Sciences*.

Sumaryczny IF: 12,223; MEiN: 380

Dodatkowa aktywność naukowa

Pozostałe publikacje

- K. Pajor, L. Pajchel, **B. Kołodziejska**, J. Kolmas
Selenium-doped hydroxyapatite nanocrystals—synthesis, physicochemical properties and biological significance.
Crystals **2018**, t. 8, nr 5, s. 188; <https://doi.org/10.3390/cryst8050188>
Punkty IF₂₀₁₈: 2,061; Punkty MEiN: 20.
- **B. Kołodziejska**, N. Stępień, J. Kolmas
The Influence of Strontium on Bone Tissue Metabolism and Its Application in Osteoporosis Treatment.
Int. J. Mol. Sci. **2021**, t. 22, nr 12, s. 6564; <https://doi.org/10.3390/ijms22126564>
Punkty IF₂₀₂₁: 6,208; Punkty MEiN: 140.
- J. Urbaniak, **B. Kołodziejska**, A. Kaflak
Synthesis Of New Chitosan-Carbonate Hydroxyapatite Composites with Potential Application In Bone Tissue Engineering—Physicochemical Analysis.
Progress on Chemistry and Application of Chitin and its Derivatives **2022**, tom 27, str.: 217-227; <https://doi.org/10.15259/PCACD.27.017>
Punkty IF₂₀₂₂: 0,6; Punkty MEiN: 70.

Konferencje międzynarodowe

- 09.2019 - 30th Annual Conference Of The European Society For Biomaterials, Drezno - **B. Kołodziejska**, J. Kolmas, Synthesis of ion modified carbonate apatites that imitate biological apatite (*sesja plakatowa*)
- 06.2021 - The Scandinavian Society for Biomaterials 2021 Conference – **B. Kołodziejska**, A. Hodun, Ł. Pajchel, J. Kolmas, Synthesis of a novel bioinspired apatite/collagen composite with potential use as a drug carrier (*sesja plakatowa*) – online
- 05.2022 - Accord - Interdisciplinary Conference on Drug Sciences, Warsaw, Poland – **B. Kołodziejska**, Ł. Pajchel, J. Kolmas, Synthesis and characterization of multifunctional collagen-nanoapatite composite with a potential haemostatic effect (*sesja plakatowa*)

- 03.2023 - 16th Scandinavian Society for Biomaterials Conference in Røros, Norway - **B. Kołodziejska**, J. Chełmińska, J. Kolmas A Novel Multifunctional Apatite/Natural Polymer Composite as a Potential Drug Carrier for Ibuprofen (*sesja plakatowa*)

Konferencje krajowe

- 06.2019 - XVI Warszawskie Seminarium Doktorantów Chemików ChemSession'19 – **B. Kołodziejska**, J. Kolmas, Synteza modyfikowanych jonowo apatytów węglanowych inspirowanych apatylem biologicznym (*sesja plakatowa*)
- 09.2020 - III Ogólnopolska Konferencja "Fizyka Medyczna – Farmacja" - **B. Kołodziejska**, J. Kolmas, Wpływ warunków syntezy na skład chemiczny oraz właściwości fizykochemiczne apatytów biomimetycznych (*prezentacja ustna*)

Granty

- Kierownik grantu Młodego Badacza WUM (FW23/F/MB1/N/20) – Wielofunkcyjny dokostny kompozyt o składzie kolagen/modyfikowany nanoapatyt o potencjalnym działaniu hemostatycznym – synteza, właściwości fizykochemiczne i wstępna ocena cytotoksyczności, 2020-2021
- Kierownik grantu Młodego Badacza WUM (WF6/3/F/MB/N/23) - Nowe bio-szkła wzbogacone jonami cynku i selenu o potencjalnej aktywności osteogennej i przeciwnowotworowej, 2023 - obecnie

Nagrody

- 2. Miejsce w Konkursie Prac Magisterskich Wydziału Farmaceutycznego (WUM), 2018
- Nagroda zespołowa Rektora WUM za działalność naukową przyznana w roku 2021 i 2022

Sumaryczny IF: 21,092; MEiN: 610

Streszczenie

Tkanka kostna jest porowatą, hierarchiczną strukturą chemicznie zbudowaną z kolagenu typu I, apatytu biologicznego (nanokrystalicznego apatytu fosforanowo-wapniowego) oraz wody. Opisywana jest często jako naturalny kompozyt o specyficznej mikroarchitekturze determinującej jej unikatowe właściwości: lekkość przy jednoczesnym zapewnieniu odpowiedniej twardości i elastyczności. Wyjątkową cechą tkanki kostnej jest jej zdolność do ciągłej przebudowy (ang. *remodeling*) i samodzielnej naprawy mikrouszkodzeń. Zachwianie równowagi pomiędzy procesami resorpcji i kościotworzenia jest podstawą rozwoju chorób kostnych. Wiele schorzeń tkanki kostnej (nowotwory, przerzuty nowotworowe, infekcje kostne, osteoporoza czy skomplikowane złamania) wiąże się z koniecznością interwencji chirurgicznej.

We współczesnej implantologii poszukuje się sztucznych materiałów kośćcozastępczych mogących pełnić funkcję rusztowania dla nowopowstającej tkanki kostnej, a jednocześnie wysoce biozgodnych, bioaktywnych, bioresorbowalnych oraz niewywołujących odpowiedzi immunologicznej. Materiały tego typu muszą charakteryzować się odpowiednią porowatością, wytrzymałością mechaniczną oraz korzystnymi właściwościami fizykochemicznymi.

Materiały kośćcozastępcze obecne na rynku wytwarzane są często na bazie syntetycznego mikrokystalicznego, niepodstawionego apatytu fosforanowo-wapniowego, którego cechuje niska resorbowalność i bioaktywność. W ostatnim czasie wiele ośrodków naukowych prowadzi badania nad modyfikacją struktury syntetycznego hydroksyapatytu jonami, otrzymując materiały mono- i dwupodstawione. Analiza fizykochemiczna otrzymanych apatytów dowodzi, że zazwyczaj mają one charakter nanokrystaliczny i cechuje je znacznie lepsza rozpuszczalność niż czystego, niepodstawionego hydroksyapatytu. Ponadto, w ostatnim latach rośnie zainteresowanie materiałami kompozytowymi, które poza składnikiem mineralnym zawierają syntetyczny bądź naturalny polimer nadający większą elastyczność i wytrzymałość.

Głównym celem badawczym niniejszej rozprawy było otrzymanie wysoce biozgodnego i bioresorbowalnego kompozytu, który przypominałby składem chemicznym, morfologią oraz strukturą tkankę kostną. W niniejszej pracy skoncentrowałam się na otrzymaniu nanokrystalicznego apatytu fosforanowo-wapniowego imitującego apatyt

biologiczny. Zdecydowałam się na wprowadzenie do jego struktury najczęściej występujących „zanieczyszczeń” apatyty kostnego, czyli jonów Na^+ , Mg^{2+} oraz CO_3^{2-} . Ze względu na dobrze udokumentowaną aktywność antyresorpcyjną, osteogenną i antybakteryjną postanowiłam wbudować dodatkowo jony Zn^{2+} . Otrzymane materiały proszkowe zostały poddane szczegółowej analizie fizykochemicznej oraz wstępnej ocenie cytotoxycyzności *in vitro*.

Następnie wielopodstawiony apatyt wykorzystałam do otrzymania kompozytów na bazie polimeru pochodzenia naturalnego – kolagenu. Korzystałam z różnych rodzajów kolagenu, aby ostatecznie wybrać najkorzystniejszą formułację do otrzymania wielofunkcyjnych materiałów kompozytowych będących dodatkowo nośnikami leków. Konwencjonalna farmakoterapia schorzeń kostnych nie jest łatwa i skuteczna, między innymi z powodu słabego ukrwienia tkanki kostnej. Dokostne dostarczanie leków mogłoby zwiększyć efektywność terapii, przy jednoczesnym zniwelowaniu działań niepożądanych występujących przy podaniu ogólnoustrojowym.

Kolejnym krokiem było wzbogacenie kompozytów o dodatek różnych biopolimerów, co pozwoliło na stworzenie nowej formy biomateriału – trójwymiarowych granul. Badałam wpływ obecności dodatkowych składników organicznych na właściwości fizykochemiczne materiałów, ich biokompatybilność, a także na kinetykę uwalniania leku i jonów (Mg^{2+} oraz Zn^{2+}) ze struktury kompozytu.

Na podstawie uzyskanych wyników, stwierdziłam, że otrzymane materiały kompozytowe mogłyby pełnić rolę wielofunkcyjnych wypełnień kostnych i opatrunków, które uwalniałyby substancję leczniczą i jony bezpośrednio w docelowym miejscu działania, lecząc stany zapalne po zabiegach chirurgicznych czy hamując nadmierne krwawienia, przy jednoczesnej odbudowie i regeneracji tkanki kostnej.

Przedstawione w niniejszej rozprawie wyniki badań mają charakter podstawowy. Otrzymane biokompatybilne materiały zainspirowane budową tkanki kostnej wykazują pożądane właściwości fizykochemiczne i biologiczne. W dalszych etapach należałoby zaplanować badania *in vivo*, aby sprawdzić możliwości aplikacyjne otrzymanych biomateriałów szczególnie w chirurgii stomatologicznej oraz do regeneracji ubytków kostnych.

Prowadzone przez mnie badania mają charakter interdyscyplinarny. Łączą wiedzę z zakresu nowoczesnej farmacji, inżynierii biomateriałowej, chemii materiałów oraz analizy

fizykochemicznej. Niniejsza rozprawa składa się z cyklu opublikowanych prac dotyczących syntezy i badań fizykochemicznych proszkowych wielopodstawionych apatytów oraz materiałów kompozytowych. Poniższe rozdziały stanowią zwięzły opis podstaw teoretycznych, metodologii badań oraz uzyskanych wyników, których poszerzeniem i uzupełnieniem są monografie naukowe zamieszczone na końcu niniejszej rozprawy.

Słowa kluczowe: biokompozyt; kolagen; hydroksyapatyt; materiał biomimetyczny; regeneracja tkanki kostnej; wielopodstawiony apatyt; dostarczanie leków, cynk.

Abstract

Collagen/multi-substituted apatite composite as a bone substitute material

Bone tissue is a porous, hierarchical structure chemically composed of type I collagen, biological apatite (nanocrystalline calcium phosphate apatite) and water. It is often described as a natural composite with a specific microarchitecture that determines its unique properties: lightness while ensuring appropriate hardness and flexibility. A special feature of bone tissue is the ability to remodel and independently repair micro-damages. An imbalance between the processes of resorption and bone formation is responsible for the development of bone diseases. Many bone tissue diseases (cancer, cancer metastases, bone infections, osteoporosis or complicated fractures) require surgical intervention.

Modern implantology is looking for artificial bone substitute materials that can act as a scaffold for the newly formed bone tissue and, at the same time, are highly biocompatible, bioactive, bioresorbable and do not cause an immune response. Materials of this type must be characterized by appropriate porosity, mechanical strength and favorable physicochemical properties.

Commercially available bone substitute materials are often produced on the basis of synthetic, unsubstituted calcium phosphate apatite, which is characterized by low resorption and bioactivity. Recently, many research centers have been conducting research on modifying the structure of synthetic hydroxyapatite with ions, obtaining mono- and dual-doped materials. The physicochemical analysis of the obtained apatites proves that they are usually nanocrystalline and have much better solubility than pure, unsubstituted hydroxyapatite. Moreover, in recent years, there has been a growing interest in composite materials which, in addition to the mineral component, contain a synthetic or natural polymer that provides greater flexibility and durability.

The main research objective of this dissertation was to obtain a highly biocompatible and bioresorbable composite that resembled bone tissue in chemical composition, morphology and structure. In the present work, I focused on obtaining nanocrystalline calcium phosphate apatite that mimics biological apatite. I decided to introduce into its structure the most common "impurities" of bone apatite, namely Na^+ , Mg^{2+} and CO_3^{2-} ions. Due to its well-documented antiresorptive, osteogenic and antibacterial activity, I decided to

incorporate Zn^{2+} ions additionally. The obtained powder materials were subjected to detailed physicochemical analysis and preliminary *in vitro* cytotoxicity tests.

Then, I used multi-substituted apatite to obtain composites based on a polymer of natural origin - collagen. I used various types of collagen to finally choose the most favorable formulation for obtaining multifunctional composite materials that also serve as drug carriers. Conventional pharmacotherapy of bone disorders is not easy and effective, among other reasons due to poor blood supply to bone tissue. Intraosseous drug delivery could increase the effectiveness of therapy, while negating the side effects that occur with systemic administration.

The next step was to enrich the composites with various biopolymers, which allowed to obtain a new form of biomaterial - three-dimensional granules. I investigated the impact of the presence of additional organic ingredients on the physicochemical properties of the materials, their biocompatibility, as well as the kinetics of drug and ion (Mg^{2+} and Zn^{2+}) release from the composite structure.

Based on the results, I concluded that the obtained composite materials could act as multifunctional bone scaffolds and dressings that would release the therapeutic substance and ions directly at the target site of action, treating inflammation after surgical procedures or inhibiting excessive bleeding, while restoring and regenerating bone tissue.

The results presented in this dissertation are of a basic nature. The obtained biocompatible materials inspired by the structure of bone tissue exhibit the desired physicochemical and biological properties. In further stages, *in vivo* tests should be planned to check the application possibilities of the obtained biomaterials, especially in dental surgery and for the regeneration of bone defects.

The research I conduct is interdisciplinary. They combine knowledge of modern pharmaceuticals, biomaterials engineering, materials chemistry and physicochemical analysis. This dissertation consists of a series of published papers on the synthesis and physicochemical studies of powdered multi-substituted apatites and composite materials. The following chapters provide a concise description of the theoretical basis, research methodology and the results, which are extended and supplemented by the scientific monographs included at the end of this dissertation.

Keywords: biocomposite; collagen; hydroxyapatite; biomimetic material; bone tissue regeneration; multi-substituted apatite; drug delivery; zinc.

Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćozastępczy
Barbara Kołodziejka

Wykaz skrótów i akronimów:

Alg – alginian

Balb/c3T3 - ang. *murine fibroblastic cell line*, linia komórkowa mysich fibroblastów

BJH – ang. *Barrett-Joyner-Halenda*, model do określania objętości i rozkładu wielkości porów

CH - chitozan

DDS – ang. *Drug Delivery System*, system dostarczania leków

DMEM - ang. *Dulbecco's Modified Eagle Medium*, pożywka Dulbecco zmodyfikowana przez Eagle'a

EMEM – ang. *Eagle's minimal essential medium*, pożywka do hodowli komórek

F-AAS – ang. *Flame Atomic Absorption Spectrometry*, atomowa spektrometria absorpcyjna z atomizacją w płomieniu

FT-IR – ang. *Fourier-transform infrared spectroscopy*, spektroskopia w podczerwieni z transformacją Fouriera

HA – hydroksyapatyt (niedomieszkowany)

Ibu – ibuprofen

ICP-OES – ang. *Inductively Coupled Plasma Optical Emission Spectrometry*, optyczna spektroskopia emisyjna z plazmą indukcyjnie sprzężoną

ISO – ang. *International Organization for Standardization*, Międzynarodowa Organizacja Normalizacyjna

MG-63 - ang. *human osteoblastic cell line*, linia komórkowa ludzkich osteoblastów

mHA – biomimetyczny hydroksyapatyt

MTT - bromek 3-(4,5- dimetylotiazol-2-yl)- 2,5-difenyloctetrazoliowy

NRU – ang. *neutral red uptake assay*, test wychwytu czerwieni obojętnej

PBS - z ang. *phosphate buffered saline*, buforowany roztwór soli fizjologicznej

PXRD – ang. *powder X-Ray diffraction*, proszkowa dyfraktometria rentgenowska

SEM – ang. *Scanning Electron Microscopy*, skaningowa mikroskopia elektronowa

sHA – stechiometryczny hydroksyapatyt

TCP – trójfosforan wapnia

TEM – ang. *Transmission Electron Microscopy*, transmisyjna mikroskopia elektronowa

TXA – kwas traneksamowy

1. Wstęp

Koncepcja niniejszej rozprawy opiera się na cyklu opublikowanych prac dotyczących syntezy i badań fizykochemicznych biomateriałów kompozytowych. Poszczególne podrozdziały przedstawiają zwięzły opis zagadnień kluczowych dla podjętej tematyki badawczej.

Inżynieria tkankowa i medycyna regeneracyjna to intensywnie rozwijające się multidyscyplinarne obszary naukowe łączące chemię, biologię, farmację i nauki inżynierskie w kierunku wzrostu i regeneracji uszkodzonych tkanek. Tkanka kostna cieszy się szczególnym zainteresowaniem bioinżynierii ze względu na jej wysoki potencjał do regeneracji i odbudowy. Obecnie w implantologii złotym standardem w leczeniu skomplikowanych złamań i ubytków kostnych są autoprzeszczepy i alloprzeszczepy, ze względu na ich właściwości osteoindukcyjne i osteokondukcyjne [1,2]. Zastosowanie ich jest jednak mocno ograniczone i wiąże się z dużym ryzykiem przeniesienia chorób, infekcji, wystąpieniem przewlekłego bólu, możliwej immunogenności czy wydłużenia czasu i kosztów procedur medycznych [3].

Sztuczne materiały kośćcozastępcze stały się alternatywą dla autoprzeszczepów i możliwym rozwiązaniem problemów współczesnej medycyny regeneracyjnej czy stomatologii [4]. Dużą zaletą tego typu materiałów jest możliwość nadawania im odpowiednich właściwości fizykochemicznych i biologicznych. Jednym z wyzwań współczesnej inżynierii biomateriałowej jest poszukiwanie i tworzenie implantów zdolnych do naśladowania hierarchicznej struktury i morfologii naturalnej tkanki kostnej.

Dotychczas nie opracowano idealnego, biozgodnego materiału implantacyjnego imitującego strukturę, właściwości mechaniczne i biologiczne tkanki kostnej. Wymagania jakie są stawiane tego typu biomateriałom to: wysoka wytrzymałość mechaniczna, właściwości osteoindukcyjne, biokompatybilność, bioaktywność czy odpowiednia bioresorbowalność [2,5].

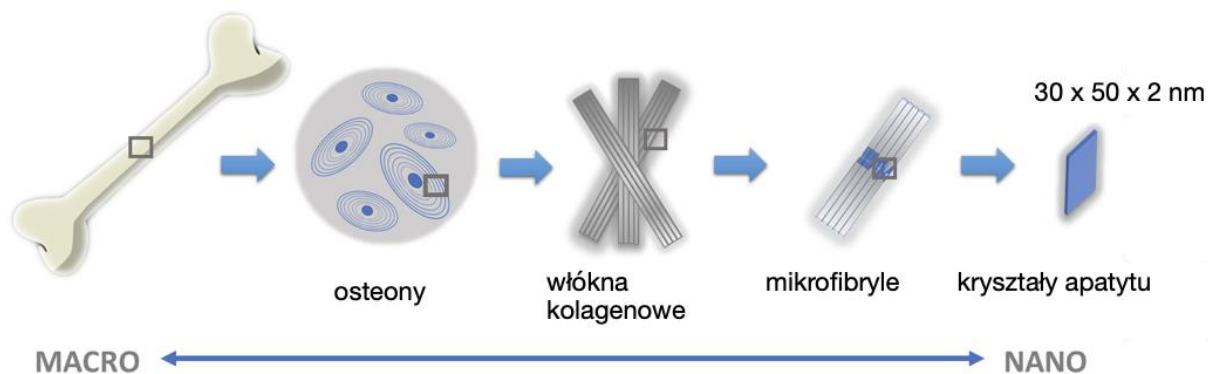
W niniejszej rozprawie doktorskiej podjęto próbę otrzymania wysoce biozgodnego materiału implantacyjnego, który ulegałby samoistnej resorpcji i stymulował odbudowę i wzrost nowej tkanki kostnej. Przedstawione badania mają charakter podstawowy i stanowią podwaliny do dalszych testów biologicznych i klinicznych, które w dalszej perspektywie mogą doprowadzić do praktycznego zastosowania otrzymanych biomateriałów.

1.1. Budowa tkanki kostnej

Tkanka kostna jest wysoce wyspecjalizowaną formą tkanki łącznej, stanowiącą podstawowy budulec kości i tkanek zmineralizowanych zębów. Pełni ona różnorodne funkcje w organizmie, m.in. podporową, chroni narządy wewnętrzne, stanowi ważny rezerwuár minerałów, a także wspomaga pracę mięśni szkieletowych powodując ruch [6]. Tkanka kostna charakteryzuje się wysoką aktywnością metaboliczną, niejednorodną i dynamiczną strukturą, a także dużą wytrzymałością mechaniczną [7]. Zdolność do ciągłej przebudowy (ang. *remodeling*) pozwala utrzymać odpowiednią masę kostną, a także zapewnić integralność i zdolność do samoistnego „gojenia” się mikrouszkodzeń w obrębie tkanki [8,9].

Wyjątkowe właściwości tkanki kostnej wynikają z jej hierarchicznej budowy, na którą składa się szereg poziomów organizacyjnych. Na poziomie makroskopowym można wyróżnić różnego rodzaju kości: długie, krótkie, płaskie, gąbczaste lub rurowate; mikroskopowym – komórki kostne oraz macierz pozakomórkową, natomiast w nanoskali rozróżnia się kryształy frakcji mineralnej i włókna kolagenowe.

Rysunek 1. Poziomy organizacji tkanki kostnej [P1].



Do komórek kostnych zaliczamy osteoblasty, osteocyty i osteoklasty, zaś istotę międzykomórkową tworzy frakcja organiczna (osteoid), frakcja nieorganiczna (mineralna) oraz woda. Komórki kostne stanowią ok. 1-5 %, matryca organiczna ok. 25 %, woda ok. 10 %, a część mineralna ok. 60-70 % masy kostnej [10].

Fracja organiczna to przede wszystkim włókna kolagenowe typu I, tworzące strukturę przestrzenną stabilizowaną przez białka niekolagenowe. Trzy łańcuchy polipeptydowe w kolagenie tworzą jedną potrójną helisę (tzw. superhelisę), zgrupowanie pięciu potrójnych helis tworzy mikrofibryle, które następnie organizują się w fibryle tworząc zwarte włókna o średnicy około 100-200 nm. Powstała matryca polimerowa jest odpowiedzialna za elastyczność i sprężystość kości [11].

Frację mineralną stanowi nanokrystaliczny apatyt fosforanowo-wapniowy, zawierający w swojej strukturze różnorodne domieszki jonów, np. węglanowych, magnezowych, sodowych, potasowych, krzemianowych, itd. Apatyt o tym specyficznym składzie chemicznym nazywany jest apatitem biologicznym (kostnym). Charakteryzuje się on niskim stopniem krystaliczności i nieuporządkowaną strukturą krystaliczną, co z kolei powoduje jego dużą aktywność biologiczną [12]. Matryca nieorganiczna nadaje tkankom zmineralizowanym sztywność i wytrzymałość mechaniczną.

Tabela 1. Skład chemiczny fazy mineralnej tkanki kostnej dorosłego człowieka na podstawie Pina i inni [2].

Skład (% wagowy)	Kość	Zębina
Wapń (Ca)	34,8	35,1
Fosfor (P)	15,2	16,9
Sód (Na)	0,9	0,6
Magnez (Mg)	0,72	1,23
Potas (K)	0,03	0,05
Cynk (Zn)	0,0126 – 0,0217	-
Fluor (F)	0,03	0,06
Chlor (Cl)	0,013	0,01
Węglany (CO ₃ ²⁻)	7,4	5,6

Tkanka kostna jest więc naturalnym, porowatym kompozytem o unikalnej mikroarchitekturze, zawierającym włókna kolagenowe z osadzonymi na nich nanocząstkami apatytu biologicznego. Należy podkreślić, że skład i proporcje poszczególnych składników tkanki kostnej mogą różnić się w zależności od miejsca jej występowania, a także od wieku organizmu.

Warto podkreślić, że podstawą prawidłowego funkcjonowania układu szkieletowego są procesy resorpcji i tworzenia nowej tkanki kostnej, które zachodzą nieustannie w ciągu całego życia w celu zachowania odpowiedniej wytrzymałości kości i zapewnienia homeostazy mineralnej organizmu [13]. Zachwianie równowagi pomiędzy tymi procesami jest podstawą rozwoju chorób tkanki kostnej.

1.2. Wybrane schorzenia tkanki kostnej

Osteoporoza jest jednym największych problemów i wyzwań zdrowia publicznego, który dotyka blisko 200 milionów ludzi na całym świecie [14]. Jest to jednostka chorobowa układu mięśniowo-szkieletowego, której przyczyną jest zwiększona resorpcja w stosunku do tworzenia się tkanki kostnej. Zaburzona równowaga kościotworzenia skutkuje obniżeniem gęstości mineralnej BMD, a tym samym zmieniona zostaje struktura przestrzenna tkanki kostnej. Pogorszenie jakości tkanki powoduje zmniejszenie wytrzymałości kości, co wiąże się z wzrostem ryzyka złamań. Rocznie notuje się około 1,6 miliona złamań biodra i 7,4 miliona innych złamań będących konsekwencją osteoporozy [15].

Przez długi czas choroba może pozostać bezobjawowa, jednak stopniowe obniżanie się masy kostnej może prowadzić do pojawienia się ubytków i złamań kości. U części pacjentów wprowadza się leczenie farmakologiczne. Rutynowo podawane są leki antyresorpcyjne oraz anaboliczne, aby zwiększyć wytrzymałość kości poprzez zmniejszenie obrotu kostnego [16]. Dodatkowo poza leczeniem farmakologicznym często konieczne jest wprowadzenie materiałów implantacyjnych, aby odbudować zdegenerowaną strukturę kości [17].

Inną, niezwykle niebezpieczną chorobą mogącą lokalizować się w tkance kostnej są nowotwory, które są główną przyczyną śmierci na całym świecie. Według danych WHO w 2020 roku choroba nowotworowa była przyczyną blisko 10 milionów zgonów na świecie. Najczęściej diagnozowane są nowotwory piersi, płuc, okrężnicy oraz prostaty. Pierwotne nowotwory złośliwe kości występują dość rzadko i stanowią zaledwie 0,2 % wszystkich nowotworów u osób dorosłych, u dzieci odsetek ten jest wyższy i wynosi 5-7 %. Jednak przerzuty kostne są najczęstszym i najwcześniej pojawiającym się miejscem przerzutów raka piersi i występują aż w 20 % przypadków [18]. Są one także najczęstszą przyczyną śmierci pacjentów z nowotworem piersi czy prostaty.

W terapii przerzutów nowotworowych do kości rutynowo stosuje się leki z grupy bisfosfonianów, czyli syntetyczne analogi naturalnie występujących pirofosforanów. Hamują one czynność osteoklastów, a w konsekwencji zmniejszają resorpcję kości [19]. Stosowane są u pacjentów onkologicznych w leczeniu hiperkalcemii, zapobieganiu utracie masy kostnej, a także zmniejszaniu ryzyka wystąpienia zdarzeń kostnych [20]. Podobnie jak w przypadku osteoporozy, struktura kości pacjentów onkologicznych bywa bardzo osłabiona i łatwo ulega urazom czy złamaniom. Często konieczne staje się zastosowanie leczenia chirurgicznego i wprowadzenie implantów dokostnych.

Rozpatrując różne schorzenia kostne warto wspomnieć o szczególnym rodzaju tkanki zmineralizowanej, jaką jest zębina, szkliwo czy kości szczęki i żuchwy. Utrata struktur zęba lub przyzębia wynikająca z próchnicy, wad rozwojowych zębów, urazów, chorób przyzębia i chorób ogólnoustrojowych jest bardzo częstym i istotnym problemem w praktyce klinicznej [21,22]. Leczenie protetyczne z wykorzystaniem tytanowych implantów stomatologicznych jest najczęściej stosowaną metodą odtworzenia brakujących zębów po ich ekstrakcji. Gęstość i objętość kości wyrostka zębodołowego szczęki oraz części zębodołowej żuchwy zmniejsza się podczas gojenia tkanki kostnej po ekstrakcji, co prowadzi do niewystarczającej szerokości i wysokości wyrostka zębodołowego, tym samym ograniczając możliwość wszczępienia implantu lub pogarszając warunki jego dobrego osadzenia [23–25]. Stąd też niesamowicie istotnym wyzwaniem w stomatologii stało się szukanie sposobów na regenerację i odbudowę utraconych struktur kostnych powstałych po ekstrakcji zębów. Zachowanie pełnowartościowej struktury kostnej wyrostka zębodołowego jest priorytetem przy dalszej rehabilitacji stomatologicznej [25]. Podobnie jak w ortopedii w przypadku sporych ubytków kostnych stosowane są autoprzeszczepy i alloprzeszczepy, jednak wiążą się one z wcześniej omówionymi poważnymi działaniami niepożądanymi [25–27]. Poszukuje się więc nowych biomateriałów wypełniających puste zębodoły po ekstrakcji zębów, które stanowiłyby dobry fundament kostny do zabiegu implantacji [25,28].

1.3. Biomimetyczne materiały kościozastępcze

W tym podrozdziale krótko przedstawię biomateriały naśladowujące swoją strukturą i składem chemicznym tkankę kostną, a mianowicie apatyty fosforanowo-wapniowe, kolagen oraz kompozyty kolagenowo/apatytowe.

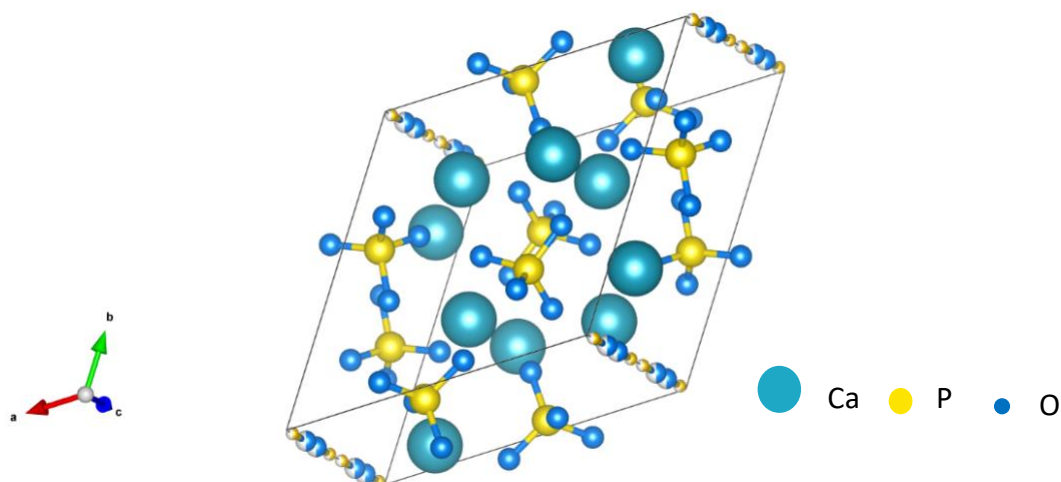
1.3.1. Bioceramika fosforanowo-wapniowa

Bioceramiką nazywamy grupę nieorganicznych materiałów stosowanych w inżynierii tkanek twardych [29,30]. Można wyróżnić ceramikę inertną, bioaktywną oraz bioresorbowalną. Materiały ceramiczne zajmują wiodącą pozycję wśród nowoczesnych substytutów kości [31]. W niniejszej pracy skupię się na apatytach fosforanowo-wapniowych, które utożsamiane są z frakcją mineralną tkanki kostnej.

Hydroksyapatyt (HA) o wzorze sumarycznym: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ jest najpopularniejszym przedstawicielem fosforanów wapnia. Zalicza się go do bioaktywnej i bioresorbowalnej ceramiki. Stechiometryczny HA (sHA) ma stały stosunek molowy Ca/P wynoszący 1,67 i krystalizuje w układzie jednoskośnym. Otrzymanie sHA jest niezwykle trudne. Najczęściej zsyntetyzowane hydroksyapatyty wykazują pewne odstępstwa od stechiometrii, co jest związane z obecnością wody sieciowej, podstawień jonowych lub wakancji. Utrata stechiometrii prowadzi do krystalizacji w układzie heksagonalnym [12]. Metoda syntezy oraz warunki w trakcie prowadzenia eksperymentu (pH, temperatura, czas starzenia, stężenie substratów) mają znaczący wpływ na skład, powierzchnię właściwą, wielkości kryształitów i inne właściwości apatytów [P2].

W strukturze komórki elementarnej HA jony fosforanowe w kształcie tetraedrów są „poprzeplatane” jonami wapnia. Kationy wapnia zajmują dwa nierównocenne położenia w strukturze krystalicznej. Jony Ca (II) tworzą trójkątne ugrupowania prostopadłe do osi c, zlokalizowane wokół strukturalnych grup OH. Z kolei Ca (I) umiejscowione są na krawędziach bocznych komórki elementarnej [32]. Należy jednak zauważyć, że HA typowy syntetyczny nie posiada w swojej sieci krystalicznej „zanieczyszczeń” obecnych w apatycie kostnym (Rysunek 2).

Rysunek 2. Schematyczna struktura krystaliczna HA.



HA charakteryzuje się dużą biokompatybilnością, osteokonduktywnością i wysoką aktywnością biologiczną [33]. Określa się go także mianem biomimetycznego, czyli podobnego do apatytu biologicznego. HA w warunkach *in vivo* dzięki wysokiej biokompatybilności nie powoduje niepożądanych reakcji cytotoksycznych i alergicznych, z kolei jego osteokonduktywność jest ściśle skorelowana z wysoką porowatością, która zapewnia łatwe przenikanie materiału przez komórki kostne oraz szybki wzrost kostny. Bioaktywność należy rozumieć jako łatwość łączenia się implantu z naturalną tkanką kostną poprzez szereg reakcji zachodzących na granicy implant-kość, co skutkuje szybkim wrastaniem tkanki kostnej w pory biomateriału [34]. Wadą czystej ceramiki hydroksyapatytowej jest kruchość i niska wytrzymałość na rozciąganie.

Materiały na bazie HA są komercyjnie dostępne i stosowane do powlekania implantów, rekonstrukcji twarzowo-szczękowej, w stomatologii jako dodatek do past i preparatów leczących nadwrażliwość zębiny [35,36]. Coraz częściej służą także jako nośniki leków w terapii celowanej tkanki kostnej [37,38].

Do niedawna HA był materiałem referencyjnym dla apatytu biologicznego. Jednak jak wspomniano wcześniej apatyt kostny to w rzeczywistości niestechiometryczny apatyt węglanowy o niskim stopniu krystaliczności zawierającej w swojej strukturze domieszki różnych jonów, głównie sodu i magnezu, ale także potasu, fluoru, cynku, seleniany, cytryniany, itd. [39,40].

Warto podkreślić, że obecność „zanieczyszczeń” jonowych apatyty biologicznego, nawet w niewielkiej ilości powoduje zmiany we właściwościach fizykochemicznych HA, takich jak szybkość resorpcji, wytrzymałość mechaniczna czy stabilność termiczna [41]. Biomimetyczne apatyty zyskują także wiele cennych właściwości biologicznych w stosunku do „czystego” HA, np. obecność jonów węglanowych w ilości podobnej do tej obecnej w apatycie kostnym (5-7 %) znacząco indukuje tworzenie się nowej tkanki kostnej [42]. Wpływ innych jonów przedstawiono krótko w poniższej tabeli.

Tabela 2. Wpływ obecności jonów „obcych” na właściwości apatyty fosforanowo-wapniowego [43, 44].

Jony	Rola biologiczna
$Mg^{2+}, Zn^{2+}, Sr^{2+}$	stymulacja aktywności osteoblastów, remodellingu kostnego
Na^+, CO_3^{2-}, Zn^{2+}	wzrost biodegradowalności poprzez wpływ na krystaliczność materiału
$Na^+, Mg^{2+}, CO_3^{2-}, K^+, Cl^-, F^-, HPO_4^{2-}$	poprawa biokompatybilności
$Sr^{2+}, Ga^{3+}, Zn^{2+}, Ga^{3+}$	aktywność antyresorpcyjna
$Ag^+, Cu^{2+}, Ga^{3+}, SeO_3^{2-}, Ce^{3+}, Zn^{2+}$	działanie antybakteryjne
$Fe^{2+}, Fe^{3+}, SeO_3^{2-}, SeO_4^{2-}$	aktywność antynowotworowa

W ostatnich latach prowadzono liczne badania dotyczące podstawionego jonowo HA inspirowanego apatytami biologicznymi. Najczęściej spotkać można prace na temat HA jednopodstawionego (głównie jonami CO_3^{2-} lub Mg^{2+}) [45–47], lub dwupodstawionego [48, 49]. Nie zajmowano się dotychczas syntezą wielopodstawionego HA, dlatego stanowiła ona jeden z głównych celów mojej pracy doktorskiej [P2].

1.3.2. Polimery naturalne

Materiały polimerowe są bardzo często stosowane w inżynierii tkankowej ze względu na ich plastyczność, biokompatybilność i korzystne właściwości mechaniczne. Polimerowe matryce cieszą się ogromnym zainteresowaniem w obszarze projektowania DDSs (ang. *Drug*

delivery systems) – systemów dostarczania leków. Kluczową właściwością polimeru do takiego zastosowania jest jego biodegradowalność. Dzięki kontrolowanej erozji lub dyfuzji (bądź kombinacji obu) substancja lecznicza może być uwolniona z matrycy w miejscu potencjalnego działania [50].

Ogólnie polimery można podzielić na syntetyczne i naturalne. W kontekście niniejszej rozprawy skupiono się na naturalnie występującym w tkankach mięśniowo-szkieletowych i skórze - kolagenie. Kolagen jest naturalnym polimerem białkowym o długości 300 nm i masie cząsteczkowej 300 000 Da. W organizmie człowieka wyróżnić można ponad dwadzieścia dwa różne typy kolagenu, z których najpowszechniej występującymi są typy od I do IV. Kolagen typu I występuje w największej ilości, tworzy strukturę kości i spośród wszystkich jest najdokładniej przebadany [51]. Ze względu na jego unikalne właściwości fizykochemiczne, łatwą biodegradowalność enzymatyczną, biokompatybilność, a także właściwości mechaniczne i biologiczne jest szeroko rozpowszechniony w zastosowaniach biomedycznych [25,52]. Kolagen zapewnia tkankom elastyczność, a także jest naturalnym substratem do adhezji, proliferacji oraz różnicowania się komórek [53]. Warto podkreślić, iż kolagen jest jednym z głównych inicjatorów kaskady krzepnięcia krwi i charakteryzuje się wysoką trombogennością [P3,54].

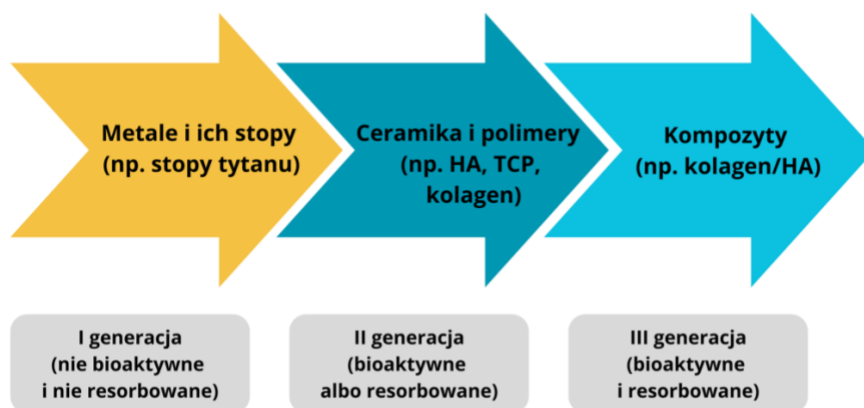
Kolagen jest często stosowany klinicznie w postaci gąbek o właściwościach absorbujących ze względu na wysoką biokompatybilność, biodegradowalność i strukturę porowatą tego materiału. Wykorzystuje się go, m.in. jako opatrunek hemostatyczny po ekstrakcji zębów, opatrunek trudno gojących się ran, nośnik antybiotyków czy jako materiał implantacyjny przyspieszający regenerację tkanki kostnej [54–58].

Kolagen używany w inżynierii biomateriałowej jest głównie pochodzenia zwierzęcego. Pozyskuje się go ze skóry bydlęcej lub wieprzowej oraz z bydlęcych lub końskich ścięgien Achillesa. Wadą biomateriałów na bazie kolagenu może być ich łagodna immunogenność. Odpowiedź immunologiczna zależy od gatunku, z którego wyizolowano kolagen oraz techniki przetwarzania. Innymi wadami o których należy wspomnieć są: wysoki koszt czystego kolagenu oraz zmienne właściwości fizykochemiczne i degradacyjne [59].

1.3.3. Kompozyty

Bioceramika pomimo dużej biogodności i bioaktywności charakteryzuje się słabą wytrzymałością i dużą kruchością, stąd nie może być stosowana w miejscach narażonych na duże obciążenia. Polimery charakteryzują się z kolei nadmierną elastycznością i małą wytrzymałością w stosunku do zmineralizowanej tkanki kostnej. Stąd też poszukuje się nowych rozwiązań, aby pozbyć się ograniczeń materiałów jednofazowych [P1]. Bioaktywne kompozyty zapoczątkowały 3. generację biomateriałów (Rysunek 3). Materiały kompozytowe powstają na skutek połączenia różnych polimerów (naturalnych lub syntetycznych), polimerów z frakcją nieorganiczną lub biomateriałów z czynnikami biologicznymi [60].

Rysunek 3. Rozwój biomateriałów do regeneracji tkanki kostnej na podstawie Murugan i inni [61].



Kompozyty łączą korzystne właściwości ceramiki z zaletami polimerów. Polimer stanowi matrycę do osadzania na nim proszku apatytowego, dzięki czemu uzyskuje się trójwymiarowe kształtki stanowiące prototyp implantu. W efekcie powstają biomateriały o dużej wytrzymałości, elastyczności, bioaktywności, biokompatybilności oraz korzystnych właściwościach mechanicznych. Dodatek polimeru polepsza możliwości aplikacyjne oraz umożliwia wprowadzenie do matrycy aktywnych biomolekuł lub substancji leczniczych oraz pozwala na kontrolowane ich uwalnianie.

Jak wspomniałam, tkanka kostna jest idealnym przykładem naturalnie występującego materiału kompozytowego polimerowo/apatytowego. Projektując biomateriały dużo uwagi poświęca się próbie odtworzenia składu chemicznego natywnej tkanki kostnej, a także jej mikrostruktury i porowatości, przez co zapewnia się odpowiednią biokompatybilność

wszczepu, a także osteokonduktywność [62,63]. W przeciągu ostatnich lat wiele ośrodków badawczych pracuje nad otrzymywaniem i badaniem właściwości kompozytów na bazie kolagenu typu I i HA.

Poszerzona charakterystyka, metody otrzymywania, a także nowe perspektywy zastosowań i modyfikacji kompozytów kolagenowo/apatytowych zostały ujęte w **P1** włączonej do cyklu będącego podstawą rozprawy.

Warto podkreślić, że biomateriały na bazie kolagenu i HA mają duży potencjał aplikacyjny w różnych schorzeniach kostnych, o czym świadczy obecność licznych preparatów komercyjnie dostępnych [64]. Poniżej przedstawiono przykłady materiałów obecnych na rynku i szeroko stosowanych w klinice.

Tabela 3. Przykłady komercyjnie dostępnych materiałów implantacyjnych zawierających kolagen i/lub bioceramikę (zestawione na podstawie wyszukiwania internetowego producentów).

Produkt	Frakcja mineralna	Frakcja polimerowa	Zastosowanie
ReFit®	Niskokrystaliczny HA (80wt%)	Kolagen typu I (20wt%)	Stomatologia, zachowanie kości wyrostka zębodołowego
Parasorb®, BoneProtect®, itd. (gąbki kolagenowe)	-	Kolagen pochodzenia zwierzęcego	Stomatologia, hemostaza po ekstrakcji zęba
Biocollagen® (membrana)	-	Kolagen pochodzenia zwierzęcego	Ostona przeszczepów kostnych
Collapat II®	sHA	Kolagen typu I	chirurgia ortopedyczna, wypełnianie mocno krwawiących ubytków kostnych
Collagraft®	HA + TCP	Kolagen typu I	leczenie skomplikowanych złamań kości
Bio-Oss® Collagen	Pozyskana z kości wołowych (materiał ksenogenny)	Kolagen wieprzowy (10%)	wypełnianie niewielkich ubytków kostnych, regeneracja przyzębia

Healos®	HA (29%)	Kolagen typu I - wołowy (71%)	Wypełnianie ubytków kostnych
Vitoss®, Mozaik™	β-TCP (80%)	Kolagen typu I - wołowy (20%)	Wypełnianie ubytków kostnych
Ossix® Bone	HA	Kolagen typu I	Stomatologia, regeneracja przyzębia, wypełnianie zębodołu
Osteon™ II Collagen	HA (30%) + β-TCP (70%)	Kolagen pochodzenia zwierzęcego	Stomatologia, wypełnianie ubytków kostnych

Na podstawie szerokiego studium literaturowego oraz przeglądu dostępnych komercyjnie preparatów zauważyć można, iż zaprojektowane kompozyty z powodzeniem służą jako rusztowania dla nowo powstającej tkanki kostnej stymulując jej powstawanie, łącząc się z nią i z czasem ulegając degradacji [P1].

1.4. Funkcjonalizacja i modyfikacja kompozytów kolagenowo/apatytowych

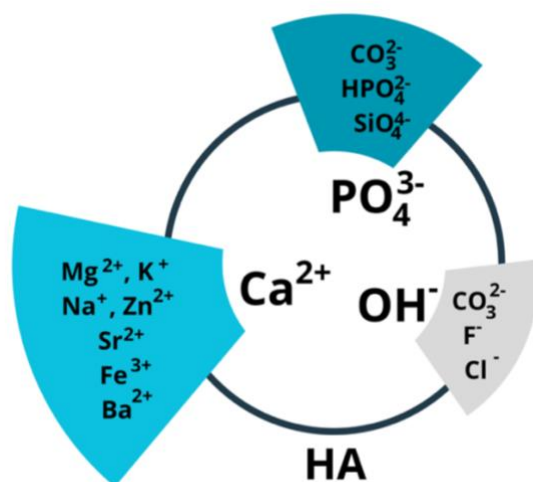
Przyglądając się nowym kierunkom rozwoju inżynierii biomateriałowej zauważyć można dążenie do uzyskania materiałów wielofunkcyjnych. Stosując odpowiednie modyfikacje metody otrzymywania kompozytów można im nadać szereg unikalnych i pożądanых cech. Funkcjonalizacja biomateriałów może następować na różnych poziomach, poprzez: dodatek jonów obcych do sieci krystalicznej frakcji mineralnej, dodatek innych polimerów do frakcji organicznej oraz wprowadzenie substancji leczniczej do matrycy biomateriału. Wszystkie przedstawione modyfikacje struktury kompozytu przyczyniają się do możliwości zastosowania ich nie tylko jako materiałów wypełniających puste przestrzenie kostne i stymulujących kościotworzenie, ale także jako materiały leczące tkankę kostną. Dostarczanie leku w bezpośrednie miejsce działania jest niezwykle korzystne w porównaniu do podania ogólnoustrojowego ze względu na słabe unaczynienie kości i problem z biodostępnością, a także możliwość uniknięcia szeregu działań niepożądanych [65].

1.4.1. Podstawienia jonowe w sieci krystalicznej hydroksyapatytu

Jedną z najciekawszych właściwości apatytów jest zdolność do substytucji jonowych. Zarówno jony wapnia, ortofosforany, jak i grupy hydroksylowe mogą być zastąpione innymi

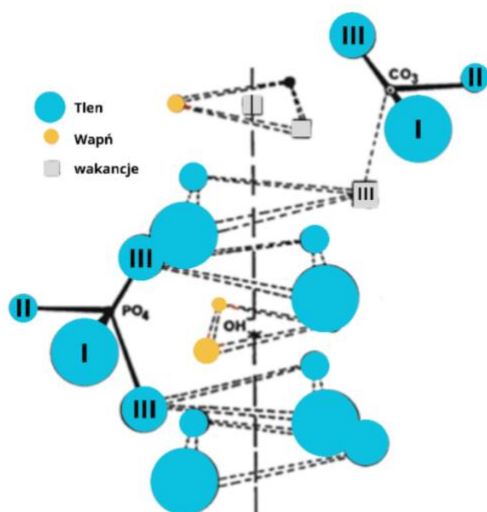
jonami (Rysunek 4). Istotne jest to, iż wymiana jonowa jest możliwa tylko w przypadku jonów o podobnych wymiarach i ładunkach w stosunku do jonów podstawianych. Jeśli nie jest spełniony warunek podobnych ładunków wciąż jest możliwe podstawienie jonowe, ale w sieci krystalicznej mogą pojawić się wakancje. Może także nastąpić uwolnienie niektórych jonów ze struktury apatyty celu zbilansowania ładunku [66]. Jony wapnia mogą być wymieniane na np. jony magnezu, sodu czy potasu, natomiast jony hydroksylowe czy fosforanowe mogą być zastąpione przez np. aniony węglanowe. Efektem takich podstawień jest powstanie niestechiometrycznego apatyty zubożonego w kationy wapnia czy aniony fosforanowe lub hydroksylowe, ale wzbogaconego o nowe, „obce” jony.

Rysunek 4. Przykładowe podstawienia jonowe w HA oraz miejsca ich występowania.



W przypadku apatyty biologicznego głównymi jonami obcymi są jony sodu, magnezu i węglany. Aniony węglanowe ze względu na swój mały rozmiar (178 nm) mogą wbudowywać się w strukturę apatyty w dwóch miejscach: zastępując aniony fosforanowe (substytucja typu B) lub grupy hydroksylowe (substytucja typu A). Na rysunku 5 przedstawiono substytucje typu B jonów węglanowych, która dominuje w apatytach syntetyzowanych mokrą metodą strąceniową. Kationy sodu i magnezu mimo nieco różnych promieni jonowych w stosunku do kationów wapnia (Na^+ 0,102 nm; Mg^{2+} 0,072 nm; Ca^{2+} 0,099 nm), z dużą łatwością wbudowują się w miejsce jonów Ca^{2+} [P2,67]. Różnica w wielkości wymienianych jonów jest „rekompensowana”, np. zmianą stopnia krystaliczności materiału.

Rysunek 5. Schemat podstawienia jonów fosforanowych jonami węglanowymi wg [68] – substytucja typu B.



Wbudowywanie się jonów obcych do struktury HA może zachodzić spontanicznie – poprzez „wychyt” jonów ze środowiska reakcyjnego, albo też w sposób zamierzony, poprzez dodatek wybranych jonów do mieszaniny reakcyjnej. Podstawienia jonowe są bardzo korzystne ze względu na możliwość kontrolowanej modyfikacji właściwości fizykochemicznych, mechanicznych i biologicznych apatytów. Przykładowo domieszkowanie jonami magnezu zmniejsza krystaliczność apatytu, co powoduje jego szybszą resorpcję i wzmacnia bioaktywność materiału. Z kolei uwolnione jony magnezu stymulują metabolizm tkanki kostnej poprzez wzrost proliferacji osteoblastów [69,70].

Poza jonami fizjologicznie obecnymi w natywnej tkance kostnej, można dodawać inne jony obce lub zwiększać ilość jonów obecnych w apatycie biologicznym, aby wzbogacić biomateriał o nowe funkcje biologiczne i korzystne właściwości fizykochemiczne. W niniejszej pracy zdecydowano się na dodatkową substytucję apatytu biomimetycznego jonami cynku.

Cynk jest kluczowy do wzrostu i rozwoju zdrowej tkanki kostnej. Cechuje się aktywnością osteogenną: stymuluje różnicowanie i proliferację osteoblastów, równocześnie hamując aktywność osteoklastów. Dodatkowo wykazuje działanie antybakteryjne, a także jest kofaktorem wielu enzymów [69–71]. HA podstawiony jonami cynku, nawet w małej ilości (<1 % wagowo) charakteryzuje się dużą bioaktywnością i aktywnością przeciwdrobnoustrojową [74]. Poszerzona charakterystyka jonów cynku, sodu, magnezu oraz węglanów, którymi wzbogacono apatyt biomimetyczny znajduje się w publikacjach **P2-P4** włączonych do cyklu będącego podstawą rozprawy.

1.4.2. Dodatek substancji leczniczej

Wiele schorzeń kostnych wymaga złożonego leczenia farmakologicznego. W przypadku wcześniej omówionej osteoporozy, nowotworów kości czy zabiegów stomatologicznych stosuje się substancje lecznicze różnego typu: leki antyresorpcyjne, przeciwzapalne, przeciwbólowe, hemostatyczne, cytostatyki, hormony czy antybiotyki. Problemem jest jednak słabe unaczynienie tkanki kostnej, co prowadzi do niskiej biodostępności leku i wymusza zastosowanie większych dawek przy podaniu ogólnoustrojowym. Skutkuje to oczywiście większym prawdopodobieństwem wystąpienia poważnych działań niepożądanych. Z tego względu rozpoczęły się intensywne poszukiwania metody dostarczenia leku dokładnie w miejsce objęte stanem chorobowym, aby znacząco zmniejszyć aplikowane dawki. Jedną z propozycji jest opracowywanie nowych systemów dostarczania leków (DDS). DDS możemy zdefiniować jako unikalny system (w tym przypadku biomateriał) umożliwiający transport środka leczniczego do miejsca docelowego w organizmie, uwalniający lek z kontrolowaną szybkością i w odpowiednim czasie [75]. DDS dzieli się na dwa rodzaje: dostarczające lek w sposób ciągły, z kontrolowaną kinetyką uwalniania oraz dostarczające lek w konkretne, zamierzone miejsce [76].

Substancja lecznicza może zostać osadzona na powierzchni kompozytu, ale także może zostać zamknięta w macierzy polimerowej, czemu sprzyja obecność porów. Bardzo ważnym parametrem, który ma kluczowe znaczenie dla kinetyki uwalniania substancji leczniczej jest wielkość, ilość i wzajemne połączenie porów w materiale kompozytowym. Porowatość materiału implantacyjnego jest kluczowa dla trwałego połączenia wszczepu z tkanką kostną natywną, ułatwia migrację komórek, a także wspiera unaczynienie. Pory powinny być ze sobą połączone, a ich wielkość zróżnicowana, aby ułatwić różne procesy biochemiczne i wzmocnić funkcje, które ma spełniać implant [77]. Z założenia wielkość porów w DDS powinna odpowiadać wielkości cząsteczki leku lub innych bioaktywnych molekuł, aby uzyskać powolne uwalnianie leku [78]. Z kolei małe (<10 μm), wzajemnie połączone pory są uważane za najlepsze do wbudowania się substancji leczniczej w strukturę kompozytu i później stosunkowo wolnego jej uwalniania w miejscu docelowym. Należy podkreślić, że istotna jest także obecność większych porów (>100 μm), które umożliwiają wrastanie i proliferację komórek kostnych odpowiedzialnych za tworzenie nowej tkanki kostnej, chociaż mogą powodować większe początkowe uwalnianie leku (tzw. *burst release effect*) [79,80].

Podczas zabiegów ortopedycznych czy stomatologicznych często dochodzi do trudnych do opanowania krwawień. Szybkim i prostym rozwiązaniem w takich sytuacjach mogłoby być użycie materiałów implantacyjnych zawierających lek ograniczający utratę krwi. Biomateriał pełniłby wtedy funkcje specjalnego opatrunku wywołującego efekt antyfibrynolityczny. Substancją, która mogłaby być dostarczana wraz z implantem jest lek hemostatyczny - kwas traneksamowy. Jego mechanizm działania polega na odwracalnym blokowaniu miejsca wiązania lizyny w plazminogenu, co blokuje konwersję plazminogenu do plazminy, nie dopuszczając w ten sposób do rozpuszczenia się skrzepu fibrynowego. Działanie to jest w synergii z kolagenem, który jest inicjatorem kaskady krzepnięcia. W tym przypadku bardzo korzystne wydaje się szybkie uwolnienie leku w bezpośrednim miejscu działania, aby skutecznie i szybko zahamować krwawienie [53,81,82].

Innymi lekami w przypadku których korzystna jest natychmiastowa, wysoka dawka, ale dokładnie w miejscu wszczepionego implantu jest grupa niesteroidowych leków przeciwzapalnych. W przypadku zbyt dużych dawek podawanych ogólnoustrojowo występują poważne powikłania żołądkowo-jelitowe, czasami dochodzi do niewydolności nerek czy układu krążenia. Przykładem leku z tej grupy może być Ibuprofen – kwas 2-(4-izobutylofenylo) propionowy. Podając go miejscowo ryzyko działań niepożądanych zostaje zminimalizowane, przy równoczesnym lepszym efekcie terapeutycznym. Jego użycie może być uzasadnione przy wystąpieniu ostrej infekcji lub stanu zapalnego w okolicach tkanki kostnej, a także w leczeniu bólu będącego następstwem procedur chirurgicznych. Mechanizm działania polega na hamowaniu aktywności cyklooksygenaz (zarówno COX-1 jak i COX-2), powodując obniżenie poziomu prostaglandyn, które wywołują stan zapalny. W ostatnich latach udokumentowano skuteczność miejscowego podawania ibuprofenu w stanach zapalnych zębów [83,84].

1.4.3. Wzbogacenie matrycy organicznej o inne polimery

Rozważając możliwość zastosowania biomimetycznego kompozytu kolagenowo/apatytowego jako DDS, a także jako materiał o potencjalnym działaniu przeciwzapalnym czy hemostatycznym zauważyłam, że korzystną modyfikacją struktury kompozytu może być wprowadzenie innych polimerów. Chcąc zachować naturalny charakter kompozytu postanowiłam zastosować polimery naturalne.

Biopolimery takie jak kolagen mają szereg korzystnych właściwości, o których wspomniałam wcześniej, jednak użyte samodzielnie mogą mieć zbyt małą wytrzymałość mechaniczną, przez co uwalnianie leku w systemach DDS może zachodzić bardzo gwałtownie [85,86]. Celem polepszenia ich właściwości, można zastosować kilka biopolimerów równocześnie w odpowiednich proporcjach i stosując właściwą metodę sieciowania [P4].

Dobrze poznanym biopolimerem, często stosowanym w produkcji biomateriałów ze względu na jego biokompatybilność, biodegradowalność, nietoksyczność i niski koszt jest alginian (Alg). Jest to naturalnie występujący polisacharyd, który pozyskuje się z brunatnych alg morskich. Składa się z 1→4 sprzężonego kwasu β-D-mannuronowego i jego C-5 epimeru – kwasu α-L-guluronowego w różnych sekwencjach i blokach. W roztworze wodnym staje się polianionowym związkiem, który z łatwością może zostać usieciowany przez kationy dwuwartościowe – w tym celu głównie stosowane są kationy Ca²⁺ [85,87,88]. Alg wykazuje duże strukturalne podobieństwo do macierzy zewnątrzkomórkowej, co czyni go wysoce biokompatybilnym [89]. W niniejszej pracy utworzono m.in. granule apatytowo/kolagenowe bazujące na rdzeniu alginianowym [P4]. Dodatek tego polisacharydu ułatwia nadanie odpowiedniego kształtu biomateriałom, co jest kluczowe dla praktycznego zastosowania w przyszłości i potencjalnie umożliwia wypełnienie nieregularnych ubytków kości.

Połączenie alginianu z kolagenem zazwyczaj charakteryzuje się dość dużą porowatością, co nie zawsze jest korzystne szczególnie w kontekście systemów dostarczania leków [87]. Jeśli pożądane jest przedłużone uwalnianie substancji leczniczej, obecność rozległych porów uniemożliwi ten proces, a lek zostanie uwolniony natychmiastowo. Najbardziej powszechną metodą uzyskania przedłużonego profilu uwalniania jest pokrycie kształtki (granul) dodatkową warstwą polimeru. Chitozan (CH) jest polisacharydem używanym między innymi do tworzenia polikationowych powłok, a także do zmniejszania porowatości materiału. CH jest deacetylowaną formą chityny, która jest syntetyzowana przez skorupiaki, owady i grzyby. Wraz z celulozą są najpowszechniej występującymi biopolimerami w przyrodzie [90]. Podobnie jak Alg, chitozan jest biokompatybilny, biodegradowalny i nie powoduje odpowiedzi immunologicznej [91,92]. Wykazuje dodatkowo działanie antybakteryjne i przeciwzapalne. Dotychczas znalazł wiele zastosowań biomedycznych zarówno sam, jak i jako składnik kompozytów, m.in. jako opatrunek na rany, nośnik leków i innych biomolekuł w medycynie oraz w stomatologii [93]. Trudnością w stosowaniu

chitozanu jest dostępność na rynku różnych serii chitozanu, o różnej masie cząsteczkowej i lepkości, co może mieć wpływ na niską powtarzalność w procesie wytwarzania biomateriałów [94].

Na przestrzeni ostatnich lat w zastosowaniach biomedycznych coraz częściej pojawia się serycyna. Jest to jedno z głównych białek ekstrahowanych z kokonów jedwabników różnych gatunków (głównie *Bombyx mori*) [95,96]. Serycyna jest białkiem globularnym o masie cząsteczkowej w zakresie 10 – 400 kDa. Ma wysoką zawartość hydrofilowych aminokwasów, co powoduje łatwe wchłanianie i utrzymywanie wilgoci [87,97]. Serycyna posiada silne właściwości adhezyjne, przeciwbakteryjne, przeciwutleniające i przeciwnowotworowe. Biomateriały wzbogacone o serycynę są biodegradowalne i nie wykazują immunogenności [98–100]. Dodatek tej substancji w kompozycie może posłużyć jako swego rodzaju spoiwo i odpowiednio połączyć różne frakcje organiczne, jednocześnie pełniąc funkcję przeciwzapalną i przeciwdrobnoustrojową.

2. Cele pracy

Głównym celem badawczym niniejszej rozprawy jest opracowanie i otrzymanie nowych, wielofunkcyjnych kompozytów apatytowo/kolagenowych przypominających składem oraz strukturą tkankę kostną do potencjalnych zastosowań w medycynie regeneracyjnej.

W obrębie powyższego, głównego celu badawczego wyróżniono następujące cele szczegółowe:

- przegląd literatury dotyczący aktualnego stanu wiedzy na temat biologicznie inspirowanych kompozytów apatytowo/kolagenowych oraz najnowszych trendów w badaniach nad wykorzystaniem tego typu kompozytów w medycynie i farmacji;
- opracowanie syntezy apatytu domieszkowanego jonami sodu, magnezu oraz węglanami, imitującego apatyt biologiczny;
- charakterystyka fizykochemiczna i wstępne badania biologiczne *in vitro* uzyskanych proszków apatytowych;
- określenie wpływu warunków syntezy na morfologię, krystaliczność i skład chemiczny domieszkowanych apatytów oraz selekcja materiałów o parametrach najbardziej zbliżonych do apatytu biologicznego;
- opracowanie metod otrzymywania materiałów kompozytowych zawierających kolagen typu I i wybrany biomimetyczny apatyt (dodatkowo wzbogacony jonami Zn^{2+});
- nadanie kompozytom różnych, trójwymiarowych kształtów przy jednoczesnym wzbogacaniu frakcji organicznej o nowe polimery naturalne;
- wprowadzenie modelowych substancji leczniczych do różnych matryc kolagenowo/apatytowych i analiza kinetyki ich uwalniania w warunkach *in vitro*;
- analiza wpływu składu i metody otrzymywania kompozytu na kinetykę uwalniania substancji leczniczej i jonów;
- charakterystyka fizykochemiczna otrzymanych kompozytów oraz wstępna ocena cytotoksyczności *in vitro*.

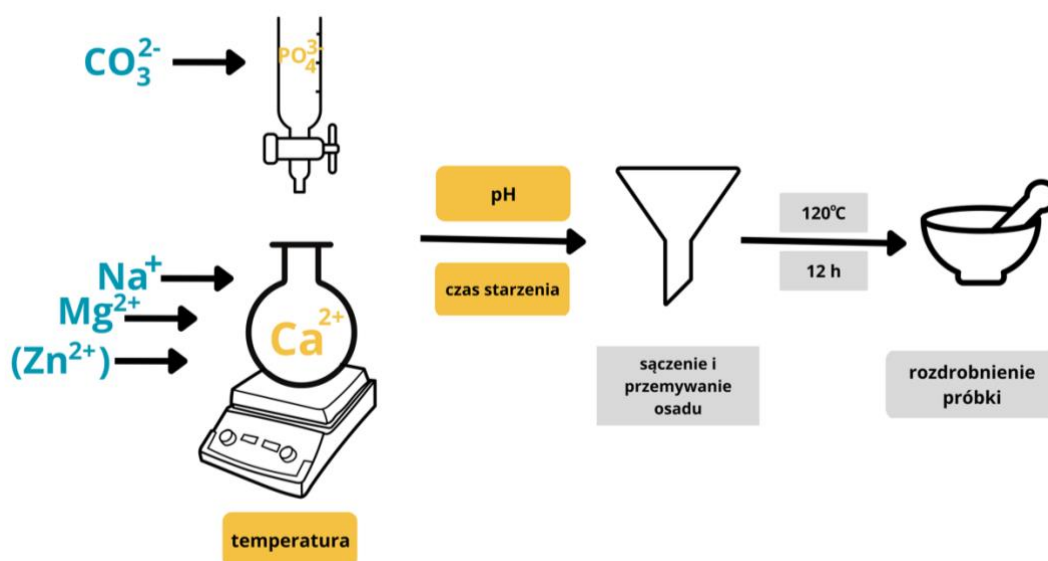
3. Materiały i metody

3.1. Synteza biomimetycznych wielopodstawionych apatytów

Wszystkie syntezy przeprowadziłam z zastosowaniem odczynników o wysokiej czystości chemicznej firmy Sigma-Aldrich (Merck) oraz Chempur.

Syntezę apatytu domieszkowanego jonami sodu, magnezu oraz węglanami przeprowadziłam mokrą metodą strąceniową, zgodnie z metodyką przedstawioną w publikacji **P2**. Metoda ta polega na wkraplaniu wodnego roztworu zawierającego źródło jonów fosforanowych (V) do wodnego roztworu zawierającego kationy wapnia. Istotne jest zachowanie odpowiedniego stosunku molowego reagentów oraz zapewnienie konkretnego pH i temperatury reakcji. Jony obce wprowadziłam do mieszaniny reakcyjnej – kationy (Mg^{2+} i Na^+) do roztworu z jonami wapnia, natomiast aniony (CO_3^{2-}) do roztworu zawierającego jony fosforanowe. Po całkowitym wkropleniu reagentów doprowadziłam pH roztworu do odpowiedniej wartości przy pomocy stężonego amoniaku. Bardzo istotnym etapem syntezy jest pozostawienie roztworu na określony czas bez mieszania, celem starzenia (dojrzewania) osadu. Otrzymany osad po odsączeniu i dokładnym przepłukaniu, wysuszyłam w temperaturze $120^{\circ}C$ w czasie 12 godzin. Otrzymaną substancję rozdrobniłam w moździerzu agatowym. Poniżej przedstawiono schemat syntezy (Rysunek 6).

Rysunek 6. Synteza wielopodstawionego apatytu. Żółtym kolorem zaznaczono zmieniające się warunki syntezy.



Ilości wprowadzonych jonów CO_3^{2-} , Mg^{2+} i Na^+ wybrałam bazując na przeglądzie literaturowym tak, by odpowiadały składowi apatyty biologicznego występującego w natywnej tkance kostnej [39,101]. Wartości te wynosiły odpowiednio 5,0, 0,5 i 0,5 %, a zakładany stosunek molowy $(\text{Ca}+\text{Mg}+\text{Na})/(\text{P}+\text{C})$ miał wynieść 1,7.

Syntezy prowadziłam w różnych warunkach modyfikując cztery parametry: temperaturę (temperatura pokojowa – 25 °C oraz temperatura podwyższona – 80°C), czas starzenia osadu (1 dzień oraz 7 dni), pH (9 oraz 11), a także stężenia fosforanów i wapnia (niskie – 5 % / 3 % oraz wysokie – 20 % / 12 % odpowiednio). W sumie otrzymałam 16 różnych próbek apatytów.

Zsyntetyzowałam także wielopodstawiony apatyt o zakładanym wzorze sumarycznym: $\text{Ca}_{8,25}\text{Zn}_{0,5}\text{Mg}_{0,25}(\text{PO}_4)_5\text{CO}_3\text{OH}$ stosując wyżej opisaną metodę syntezy, ale w warunkach, które zostały określone za najkorzystniejsze do otrzymania biomimetycznego apatyty. Tym razem zamiast jonów Na^+ , wprowadziłam jony Zn^{2+} celem wzbogacenia materiału apatytowego o nowe właściwości biologiczne. Dokładny opis syntezy znajduje się w publikacjach **P3-P4**. W powyższych publikacjach otrzymany biomimetyczny apatyt określałam skrótem mHA.

3.2. Charakterystyka fizykochemiczna proszków apatytowych

Wszystkie otrzymane materiały proszkowe zostały poddane analizie fizykochemicznej składającej się z badań jakościowych i ilościowych, zgodnie z metodyką opisaną w publikacjach **P2-P4**.

Do określenia tożsamości i wstępnej oceny krystaliczności próbek użyłam spektroskopii w średniej podczerwieni FT-IR przy użyciu spektrometru Perkin Elmer Spectrum 1000. Zastosowałam technikę transmisyjną w tabletkce KBr w zakresie 4000-400 cm^{-1} oraz rozdzielczości 2 cm^{-1} . Metoda ta pozwoliła mi także na określenia zawartości i rozmieszczenia węglanów w strukturze krystalicznej apatyty.

Dyfraktometria proszkowa (PXRD) posłużyła mi do określenia składu fazowego próbek, stopnia krystaliczności oraz wyznaczenia parametrów komórki elementarnej. Pomiaru zostały wykonane przy użyciu dyfraktometru Bruker DX8 Discover, z anodą miedzianą o długości fali $\lambda=1,54 \text{ \AA}$, w zakresie pomiarowym 2θ od 20° do 70°. Do wyznaczenia parametrów komórek elementarnych użyto oprogramowania TOPAS Bruker.

Widma FTIR, jak i dyfraktogramy PXRD zostały przeze mnie graficznie opracowane w programach GRAMS AI 8.0 (Thermo Fisher) oraz KaleidaGraph (Synergy Software).

Metodę elektronowej mikroskopii transmisyjnej (TEM) użyłam w celu obserwacji mikrostruktury otrzymanych proszków apatytowych i za jej pomocą określiłam morfologię otrzymanych kryształów. Badania mikroskopowe przeprowadziłam przy użyciu mikroskopu TEM JEOL JEM-1400, przy napięciu przyspieszającym 80 kV. Pomiary przeprowadziłam w Pracowni Mikroskopii Elektronowej w Instytucie Biologii Doświadczalnej im. M. Nenckiego PAN w Warszawie. Próbki odpowiednio przygotowałam przed analizą, zawieszając je w bezwodnym etanolu, a następnie nanosząc na miedzianą siatkę pokrytą Formvarem.

Do wykonania analizy elementarnej wykorzystałam dwie metody. Większość pomiarów wykonałam metodą spektroskopii emisyjnej ze wzbudzeniem w plazmie indukcyjnej sprzężonej (ICP-OES) przy użyciu spektrometru PerkinElmer Optima 3100XL. Przed pomiarem odpowiednio przygotowałam próbki apatytowe. Odważkę materiału proszkowego rozpuściłam w 65 % kwasie azotowym (Suprapur, Merck) oraz rozcieńczyłam wodą dejonizowaną do odpowiedniej objętości (Mili-Q, Merck Millipore). W publikacji **P4** do analizy elementarnej wykorzystałam metodę absorpcyjnej spektrometrii atomowej z atomizacją w płomieniu (F-AAS) przy użyciu spektrometru Perkin Elmer AAnalyst 400 AA. Próbki przygotowałam w analogiczny sposób jak do metody ICP-OES. Zawartość pierwiastków w obu metodach wyliczyłam na podstawie pomiarów przygotowanych wcześniej krzywych wzorcowych.

3.3. Wstępne badania biologiczne *in vitro*

Podstawowe badania cytotoksyczności *in vitro* przeprowadzono na dwóch liniach komórkowych: mysich fibroblastach BALB/c 3T3 oraz ludzkich komórkach kostniakomięsaka MG-63 (obie linie pochodzą z American Type Culture Collection). Pierwsza linia jest jedną ze standardowo zalecanych do ogólnej oceny cytotoksyczności zgodnie z wytycznymi ISO 10993-5:2009 [102] dla materiałów medycznych, natomiast druga jest powszechnie stosowanym ludzkim modelem osteoblastycznym w badaniach substytutów kości. Badania przeprowadzono we współpracy z dr n. farm. Anną Zgadzaj z Warszawskiego Uniwersytetu Medycznego. Zastosowano dwie metody oceny żywotności komórek po narażeniu. Pierwszą z nich był test wychwytu czerwieni obojętnej (NRU), który pozwala zweryfikować

przeżywalność hodowli na podstawie zdolności komórek do magazynowania barwnika w lizosomach. Drugą zastosowaną techniką oceny cytotoksyczności był test aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (MTT), który pozwala zweryfikować kondycję hodowli na podstawie aktywności enzymatycznej komórek. W badaniach stosowano dwa modele ekspozycji: metodę kontaktu bezpośredniego (posiew na powierzchni próbki) oraz pośredniego (test na ekstraktach). Ocenę cytotoksyczności metodą na ekstraktach (po uprzedniej inkubacji materiału w pożywce hodowlanej) przeprowadzano zarówno w połączeniu z techniką NRU [P2, P3], jak i MTT [P4]. Natomiast ocenę wzrostu komórek bezpośrednio na próbkach wykonano z wykorzystaniem testu MTT [P2]. W obu wariantach testów próbki poddawano uprzedniej sterylizacji za pomocą światła UVC, dodatkowo w teście na ekstraktach pożywka hodowlana po inkubacji z materiałami była poddawana filtracji na sączku strzykawkowym o wielkości porów 200 nm.

Test NRU wykonywano każdorazowo [P2, P3] w wariancie mikropłytkowym na linii BALB/c 3T3. W pierwszym etapie testu komórki zawieszono w pożywce hodowlanej umieszczano w płytkach 96-dołkowych. Po 24 h inkubacji oraz kontroli uzyskanej monowarstwy pod mikroskopem, pożywka była zastępowana badanymi ekstraktami w szeregu dwukrotnych rozcieńczeń. Ekstrakty przygotowywano poprzez uprzednią inkubację próbek w pożywce hodowlanej zgodnie ze schematem opracowanym na podstawie ISO 10993 [102]. Etap ekspozycji trwał 24 h. Kolejno usuwano medium, komórki przemywano, traktowano roztworem czerwieni obojętnej, przemywano ponownie, a następnie poddawano lizie roztworem kwasu octowego w etanolu i wodzie dejonizowanej. Ilość zgromadzonego barwnika przez lizosomy komórek w poszczególnych dołkach oceniono kolorymetrycznie przy długości fali 540 nm. Dla każdego testu stosowano kontrolę hodowli (komórki eksponowane jedynie na medium) oraz próbki przygotowane z dwóch materiałów referencyjnych: folii polietylenowej (materiał niecytotoksyczny) oraz lateksu (materiał cytotoxyczny).

Również w formie mikropłytkowej oraz z zastosowaniem schematu narażenia komórek na ekstrakty, w publikacji P4 wykonano ocenę cytotoksyczności na nowotworowej linii komórek kostnych MG-63 z zastosowaniem techniki odczytu opartej na aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (MTT). Etapy przygotowania płytek oraz ekspozycji komórek wykonano analogicznie do powyższego opisu. Kolejno usuwano medium, komórki przemywano, traktowano roztworem MTT, przemywano ponownie, a następnie poddawano

lizie za pomocą izopropanolu. Ilość formazanu zgromadzonego w poszczególnych dołkach oceniono kolorymetrycznie przy długości fali 570 nm. Dla każdego testu stosowano kontrolę hodowli (komórki eksponowane jedynie na medium) oraz próbki przygotowane z dwóch materiałów referencyjnych: folii polietylenowej (materiał niecytotoksyczny) oraz lateksu (materiał cytotoxyczny).

Test kontaktu bezpośredniego z zastosowaniem techniki MTT wykonano zarówno na linii komórkowej BALB/c 3T3, jak i MG-63 [P2]. Pozwalał on na określenie ilości żywych komórek na powierzchni danej próbki w porównaniu do hodowli kontrolnej prowadzonej na takiej samej powierzchni typowego naczynia hodowlanego przeznaczonego do wzrostu komórek adherentnych. Do wykonania testu konieczne było przeprowadzenie prószków apatytowych w postaci tabletek o średnicy 13 mm. Krążki przygotowałam przy pomocy prasy hydraulicznej i umieściłam w 24-dołkowej płytce. Na powierzchnię każdego krążka nanoszono zawiesinę komórek w pożywce hodowlanej o określonej gęstości, a następnie inkubowano 3 dni (dla komórek BALB/c 3T3) lub 7 dni (dla komórek MG-63). Po tym czasie pożywkę usunięto i zastąpiono ją roztworem MTT. Po inkubacji krążki ostrożnie przeniesiono na nową płytkę, wysuszono, uzupełniono izopropanolem i mieszano delikatnie do uzyskania jednolitej, fioletowej barwy odczynnika. Intensywność koloru została oceniona kolorymetrycznie przy długości fali 570 nm. Materiałem kontrolnym były krążki z komercyjnie dostępnego niepodstawionego HA.

3.4. Otrzymanie materiałów kompozytowych

W ramach pracy doktorskiej otrzymałam szereg różnych, trójwymiarowych materiałów kompozytowych, zawierających biomimetyczny apatyt (wybrany spośród wcześniej otrzymanych) oraz kolagen. W pierwszym etapie pracy wykorzystywałam stechiometryczny hydroksyapatyt (Sigma-Aldrich), celem opracowania powtarzalnej metody otrzymywania kompozytów, by w dalszym etapie zastąpić go docelowym apatytem biomimetycznym.

Dużą trudnością okazało się uzyskanie klarownego i jednorodnego roztworu kolagenu typu I. W literaturze spotkać się można z metodą rozpuszczania kolagenu pochodzenia zwierzęcego w 0,5 % kwasie octowym [103,104]. Mając na uwadze, iż kolagen jest polimerem naturalnym i jego pewnym ograniczeniem są zmienne właściwości fizykochemiczne, proces

rozpuszczania nie zawsze był skuteczny. Stosowałam różne metody mieszania zawiesiny kolagenowej, a także różne kwasy o różnych stężeniach. Ostatecznie za najlepszą metodę uznałam mieszanie przy pomocy mieszadła mechanicznego i z zastosowaniem 1 % kwasu octowego. Ustaliłam odpowiednią prędkość mieszania i czas. Wartości te były zmienne dla konkretnych serii kolagenu, z którymi pracowałam.

Następnym krokiem było połączenie zawiesiny kolagenowej z proszkiem HA. Podobnie jak wcześniej wyzwaniem było otrzymanie homogennej zawiesiny. Moim celem było zachowanie proporcji frakcji organicznej do mineralnej, identycznej jak w tkance kostnej, tj. odpowiednio 30/70 wagowo. Zdecydowałam się na użycie nowej formy kolagenu typu I – atelokolagenu (CosmoBio Co., Tokyo, Japan). Jest to bardziej rozpuszczalna i jednorodna forma kolagenu, która powstaje na skutek obróbki enzymatycznej [105]. Opracowałam metodę tworzenia kompozytów z użyciem zarówno kolagenu typu I, jak i atelokolagenu. W obu przypadkach proszek apatytowy i roztwór/ zawiesinę kolagenu mieszałam przy użyciu mieszadła magnetycznego do satysfakcjonującego poziomu homogenności. Przygotowane zawiesiny wylewałam do odpowiednich foremek, zamrażałam w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ i poddawałam je liofilizacji.

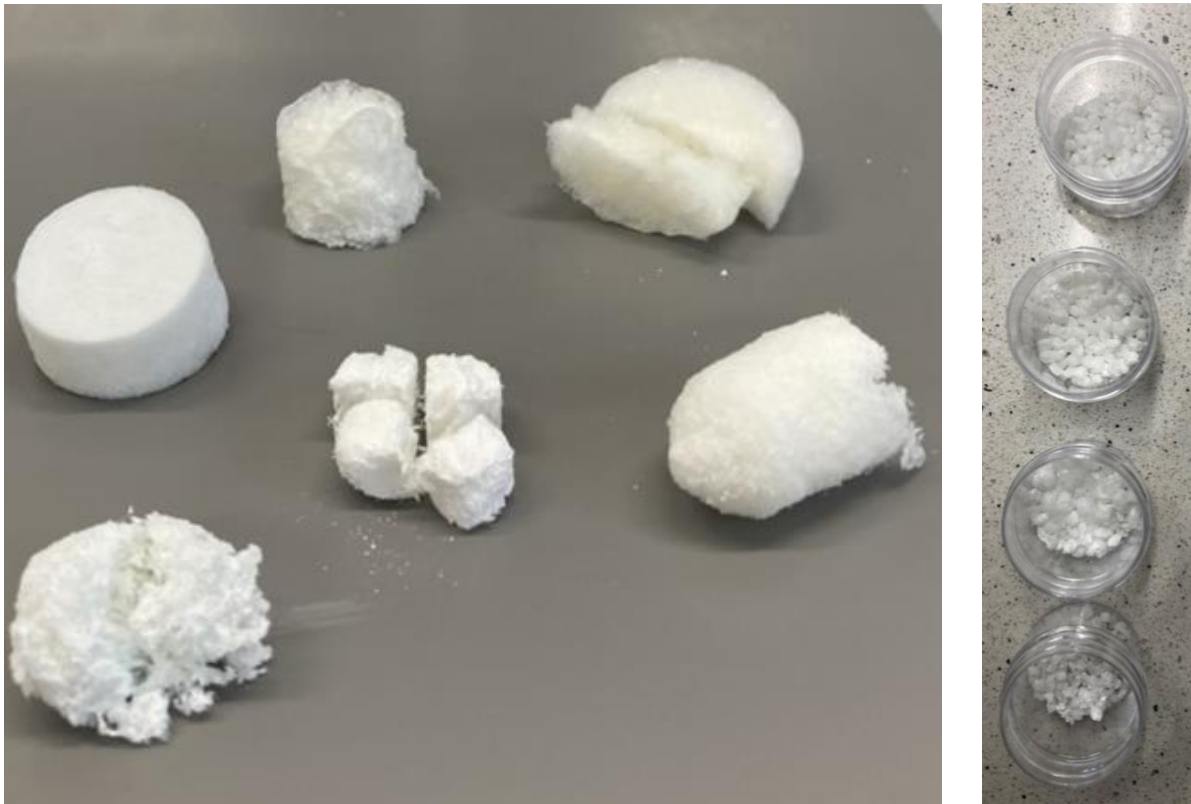
Postanowiłam otrzymać kompozyty w jeszcze inny sposób, licząc na poprawę homogenności. Próbowałam strącić HA *in situ* w roztworze kolagenu. Metoda wydawała się bardzo obiecująca – kompozyty były jednorodne. Jednak w trakcie analizy fizykochemicznej okazało się, że strącona substancja nie jest jednorodna fazowo (zawiera m.in. bruzyt $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$), a więc nie odwzorowuje frakcji mineralnej tkanki kostnej. Przyczyną mogło być prawdopodobnie zbyt niskie pH w trakcie syntezy HA.

Ostatecznie zastosowałam metodę bezpośredniego łączenia proszku apatytowego z zawiesiną kolagenu typu I lub atelokolagenem. Metoda ta szerzej została opisana w **P3**.

Tworząc materiały kompozytowe zależało mi na nadaniu im różnorodnych kształtów, aby z łatwością mogły się dopasowywać do nieregularnych ubytków tkanki kostnej (Rysunek 7). Myśląc o potencjalnym zastosowaniu materiałów w stomatologii i o konieczności wypełnienia przestrzeni poekstrakcyjnej, optymalnym rozwiązaniem byłyby kompozyty w postaci kolagenowo/apatytowych granul. Z tego powodu postanowiłam otrzymać granule kompozytowe na bazie alginianu sodu, który jest powszechnie stosowany do tworzenia rdzenia granul ze względu na szybkie i łatwe sieciowanie jonami Ca^{2+} [87]. Zastosowałam

różne modyfikacje frakcji organicznej kompozytu celem jego funkcjonalizacji. W trakcie syntezy dodawałam różne biopolimery (chitozan oraz serycynę) zachowując proporcje polimer/mHA, tak jak wyżej – 30/70 wagowo. Zawiesinę polimerowo/apatytową wkraplałam powoli przy pomocy strzykawki do roztworu sieciującego z jonami wapnia, gdzie natychmiastowo dochodziło do żelowania i tworzenia granул. Granule odsączałam i dokładnie wypłukałam wodą destylowaną. Niektóre zostały pokryte warstwą chitozanu. Wszystkie poddałam procesowi liofilizacji. Dokładny opis przygotowania granул omówiłam w publikacji **P4**.

Rysunek 7. Przykładowe kształty otrzymanych materiałów kompozytowych.



3.4.1. Wprowadzenie substancji leczniczej do kompozytów

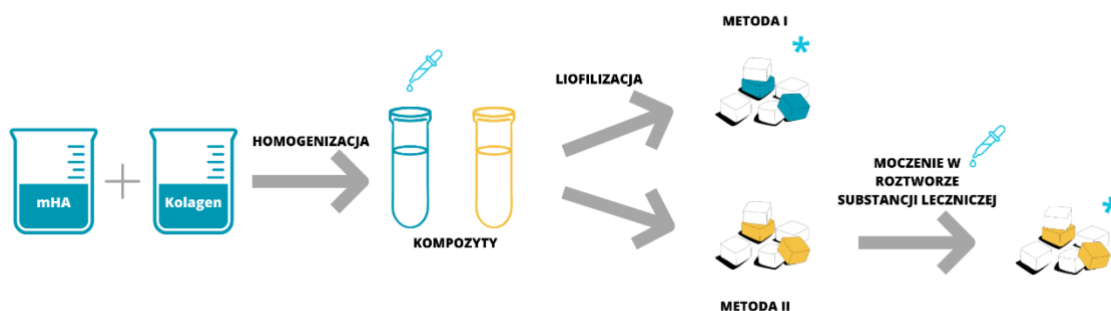
Jednym z celów mojej pracy było wprowadzenie modelowej substancji leczniczej do materiału kompozytowego i zbadanie jej kinetyki uwalniania. Jako substancje lecznicze wybrałam kwas traneksamowy (TXA) oraz ibuprofen (Ibu).

Sześciennie kształtki stanowiły nośnik dla TXA, natomiast granule zawierały Ibu. Kwas traneksamowy wprowadzałam do kompozytu dwiema metodami. Obrazuje je poniższy

schemat (Rysunek 8). W pierwszym przypadku substancję leczniczą dodano bezpośrednio do zawiesiny (przed zamrożeniem i liofilizacją). Druga metoda polegała na zanurzeniu liofilizowanej kształtki w roztworze substancji leczniczej, moczeniu jej przez godzinę w przygotowanym roztworze i następnie po raz kolejny poddaniu jej liofilizacji.

W przypadku granul zastosowałam metodę polegającą na bezpośrednim dodatku ibuprofenu do zawiesiny kolagenowo/apatytowej, ponieważ zgodnie z wynikami przedstawionymi w publikacji **P3**, metoda wprowadzania substancji leczniczej nie wykazała znaczącego wpływu na kinetykę uwalniania leku. Metoda pierwsza jest znacznie prostsza, jeżeli chodzi o ocenę ilości wprowadzonej substancji do struktury kompozytu.

Rysunek 8. Schemat wprowadzania kwasu traneksamowego do kształtek (gwiazdka symbolizuje obecność substancji leczniczej w kompozycie).



3.5. Charakterystyka kompozytów

Kolejnym etapem pracy była ocena właściwości fizykochemicznych kompozytów. Do podstawowej oceny tożsamości zastosowano wyżej wymienione metody: FT-IR oraz PXRD.

Morfologię próbek, ich mikrostrukturę oceniono za pomocą skaningowego mikroskopu elektronowego SEM JSM 6390 LV JEOL z zastosowaniem napięcia przyspieszającego 20 kV i 30 kV. Zbadano zarówno powierzchnię kompozytów, jak i wewnątrz po wykonaniu przekroju poprzecznego. Pomiary SEM wykonano w Pracowni Badań Mikroskopowo-Elektronowych w Instytucie Medycyny Doświadczalnej i Klinicznej im. M. Mossakowskiego PAN w Warszawie.

Oceniłam także stopień pęcznienia materiałów. Badanie polegało na inkubacji kompozytów w ultraczystej wodzie destylowanej w temperaturze 37 °C. Następnie próbki

ostrożnie wyjmowałam w ściśle określonych interwałach czasowych i natychmiast ważyłam na wadze analitycznej. Współczynnik pęcznienia wyrażono jako procent zwiększonej masy ($W-W_0$) do masy początkowej (W_0). Każda próbka została przetestowana w trzech powtórzeniach.

Do oceny powierzchni właściwej, całkowitej objętości porów oraz rozkładu ich średnicy zastosowano metodę Brunauer-Emmett-Teller (BET) z adsorpcją azotu przy użyciu ASAP 2050 Micromeritics. Pomiary przeprowadzono w Instytucie Nowych Syntez Chemicznych Sieć Badawcza Łukasiewicz w Puławach.

Kluczowym etapem badań było sprawdzenie kinetyki uwalniania substancji leczniczej z kompozytów. Szczegółowy opis metodologii badania uwalniania został zamieszczony w publikacjach **P3** i **P4**. Próbki umieszczałam w buforze fosforanowym ($\text{pH} = 7,4$) w łaźni wodnej. Następnie w regularnych odstępach czasowych pobierałam medium, za każdym razem uzupełniając pobraną ilość świeżą porcją buforu. Każdy roztwór filtrowałam i określałam zawartość substancji leczniczej metodą wysokosprawnej chromatografii cieczowej (HPLC - pompa izokratyczna Varian Prostar 210 oraz autosampler Rheodyne 7725i) z detekcją UV (detektor Varian Prostar 325). Dla każdej z badanych substancji przygotowałam krzywą wzorcową.

Poza zbadaniem kinetyki uwalniania leku zależało mi na równoczesnym określeniu ilości uwalnianych jonów (magnezu i cynku). Roztwory pobrane z uwalniania substancji leczniczej zostały wykorzystane także do określenia zawartości powyższych jonów metodą ICP-OES oraz F-AAS opisaną w podrozdziale 3.2.

Próbki zostały także poddane podstawowym badaniom cytotoksyczności *in vitro* na linii komórkowej mysich fibroblastów BALB/c 3T3 [**P3**] oraz ludzkich komórkach kostniakomięsaka MG-63 [**P4**]. Zastosowano test neutralnego wychwytu czerwieni obojętnej (NRU) oraz test aktywności dehydrogenazy bursztynianowej (MTT) opisane w podrozdziale 3.3.

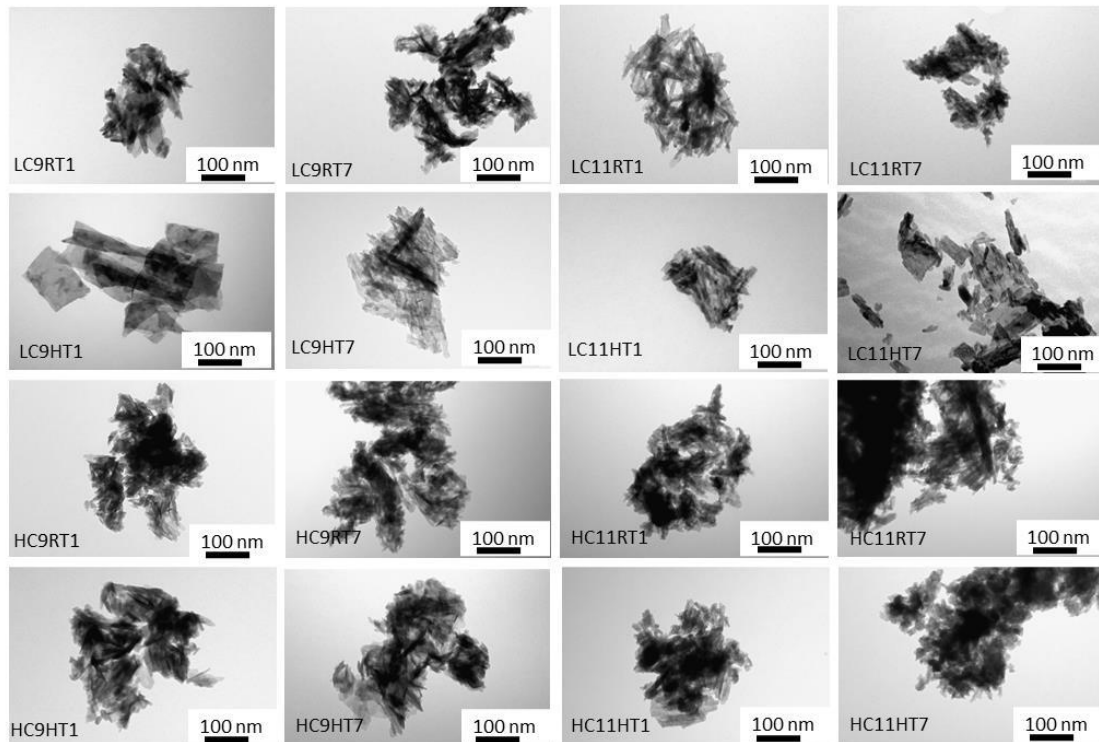
4. Omówienie i dyskusja wyników badań

Pierwszym etapem mojej pracy badawczej było wyznaczenie optymalnych parametrów syntezy apatytów wzbogaconych w jony CO_3^{2-} , Mg^{2+} oraz Na^+ , celem otrzymania materiałów jak najbardziej zbliżonych pod względem składu i struktury chemicznej do apatytu biologicznego. Zoptymalizowanie warunków syntezy miało posłużyć zaplanowaniu syntezy bioinspirowanego apatytu, ale dodatkowo domieszkowanego jonami Zn^{2+} , które mają bardzo korzystne właściwości biologiczne, szczególnie przydatne w materiałach kośćcozastępczych [106].

Dokonując przeglądu literaturowego zdecydowałam się na syntezę proszków apatytowych mokrą metodą strąceniową, która zakłada otrzymanie nanokrystalicznych materiałów o dużej powierzchni właściwej korzystnie wpływającej na bioaktywność, a także adhezję, proliferację i różnicowanie komórek osteogennych [107]. Co więcej, metoda ta pozwala na liczne podstawienia jonowe w strukturze krystalicznej HA. Modyfikując różne parametry syntezy chciałam sprawdzić ich wpływ na morfologię kryształów i ich właściwości fizykochemiczne, a także otrzymać apatyt imitujący apatyt kostny. Efektem mojej pracy było otrzymanie 16 różnych próbek apatytów podstawionych jonami CO_3^{2-} , Na^+ oraz Mg^{2+} . Wyniki badań zostały przedstawione w publikacji **P2**.

Analizę fizykochemiczną rozpoczęłam od badań jakościowych wszystkich zsyntetyzowanych próbek, które potwierdziły obecność apatytu jako jedynej fazy krystalicznej. Badania TEM oraz PXRD potwierdziły otrzymanie materiałów o charakterze nanokrystalicznym. Próbki różniły się między sobą kształtem kryształów (patrz Rysunek 9) oraz nieznacznie parametrami a i c komórki elementarnej. Wartości parametrów a i c wynosiły odpowiednio 9,421 – 9,451 Å oraz 6,867 – 6,881 Å, a więc były bardzo zbliżone do parametrów komórki apatytu biologicznego dorosłego człowieka (9,460 i 6,880 Å) [108]. Analiza wyników TEM oraz PXRD pozwoliła na stwierdzenie, że w materiałach zsyntetyzowanych w wyższym stężeniu jonów fosforanowych i wapniowych występują kryształy *plate-like* – bardzo charakterystyczne dla apatytu kostnego [109]. Przypuszczam, że może być to związane z większą ilością zarodków krystalizacji w bardziej stężonych roztworach. Dokładna analiza krystaliczności próbek wraz z obliczonymi indeksami krystaliczności znajduje się w publikacji **P2**.

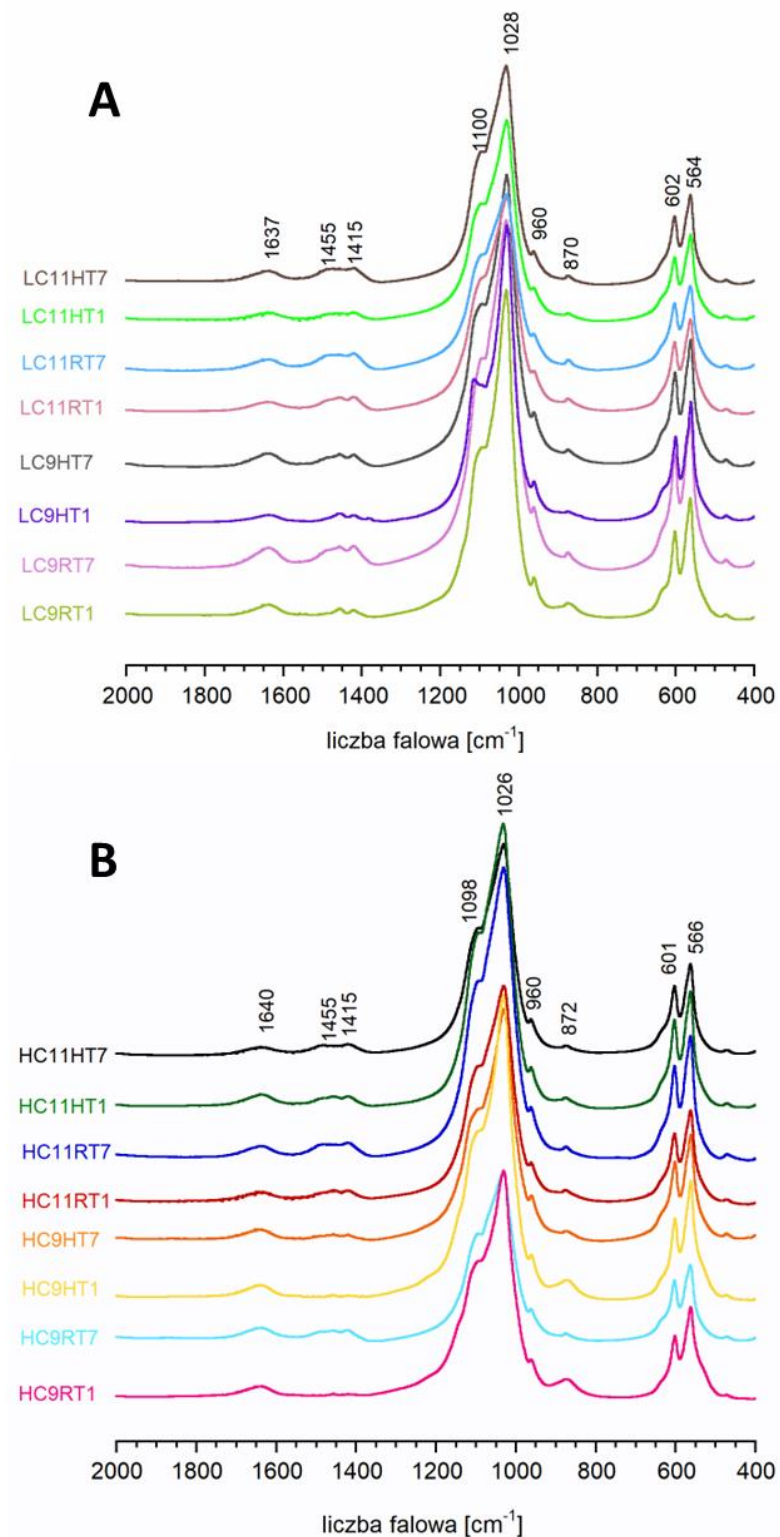
Rysunek 9. Zdjęcia TEM wszystkich otrzymanych biomimetycznych apatytów.



Kolejną badaną zależnością był wpływ warunków syntezy na efektywność podstawień jonowych. Analiza kopodstawień była dość skomplikowana, gdyż symultanicznie wprowadzane były, aż trzy jony obce. W dotychczasowej literaturze najczęściej badane są pojedyncze lub podwójne podstawienia [45-49].

Substytucja jonowa zachodziła z bardzo różną wydajnością, co określiłam na podstawie wyników analizy elementarnej ICP-OES. W przypadku jonów magnezu mieściła się w przedziale 20-100 %, sodu 24-86 %, natomiast węglanów 22-66 %. Zarówno zawartość Mg^{2+} , jak i Na^+ była największa w materiałach otrzymanych przy pH=11 oraz z czasem dojrzewania równym 7 dni. Co ciekawe, wyróżnić można próbki z wysoką zawartością obydwu jonów (np. próbki LC11HT7, LC11RT7). Daje to podstawy do wnioskowania, że kationy magnezu i sodu nie konkurują ze sobą o miejsce w sieci krystalicznej apatytu, a niższa zawartość sodu może wynikać z różnicy w wartościowości względem kationu wapnia, a także większego promienia jonowego (Na^+ 0,102 nm; Mg^{2+} 0,072 nm; Ca^{2+} 0,099 nm).

Rysunek 10. Widma FT-IR wszystkich zsyntetyzowanych próbek. Rysunek A przedstawia próbki otrzymane w niskich stężeniach reagentów, a rysunek B w wysokich.

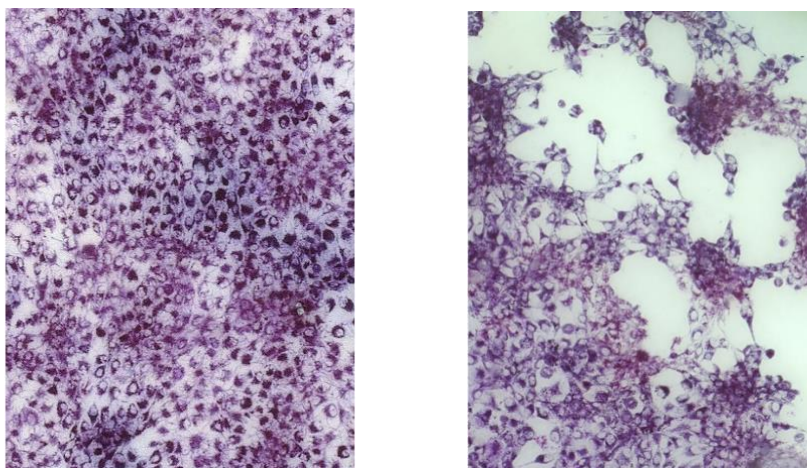


Na powyższych rycinach przedstawiłam widma FT-IR, które posłużyły mi przede wszystkim do potwierdzenia tożsamości otrzymanych próbek, poprzez zaobserwowanie charakterystycznych pasm dla HA (patrz – przypisanie w **P2**). Wykorzystałam je także do stwierdzenia obecności węglanów i obliczenia ich zawartości na podstawie obecności pasm przy ok. 1420 cm^{-1} , 1480 cm^{-1} oraz 1450 cm^{-1} . Najmniej intensywne pasmo z trzech wymieniony przypisać można węglanom typu A (położone w miejscu grup OH^-). Pasma w zakresie $1570\text{--}1370\text{ cm}^{-1}$ charakteryzują się niską intensywnością, co sugeruje niską wydajność wprowadzania jonów węglanowych do struktury HA. Postanowiłam oszacować całkowitą zawartość węglanów (typu A i B) używając metody dopasowania krzywej opisanej w literaturze [110–112]. Na podstawie uzyskanych wyników wyciągnęłam wnioski, iż na zawartość CO_3^{2-} w strukturze apatytowej znacząco wpływa czas dojrzewania osadu. Im dłuższy czas tym bardziej efektywna substytucja jonami węglanowymi. Podobną zależność zauważyłam dla próbek otrzymanych przy $\text{pH}=11$ w porównaniu do tych zsyntetyzowanych przy $\text{pH}=9$. W trakcie pracy badawczej prowadziłam także syntezę z czasem starzenia znacznie dłuższym, tj. 1, 3, 6 miesięcy. We wszystkich syntezach wydajność wprowadzania jonów węglanowych była wysoka, ale porównywalna z czasem starzenia wynoszącym 7 dni (wyniki nie zawarte w publikacjach). Warto wspomnieć, iż zależność czas-zawartość węglanów jest analogiczna do tego, co dzieje się w apatycie biologicznej. Im starsza tkanka kostna, tym wyższa zawartość jonów CO_3^{2-} [110].

Wartościowych wniosków dostarczyły mi podstawowe badania biologiczne *in vitro*. W badaniach cytotoxycznosci testem NRU na komórkach BALB/c 3T3, wszystkie próbki zostały zakwalifikowane jako niecytotoksyczne. Jednak w teście MTT przeprowadzonym na komórkach BALB/c 3T3, a także na modelu osteoblastycznym (komórki MG-63) można zauważyć dużą zmienność wyników (rysunek 11). Na powierzchni niektórych próbek zauważono znacznie większą ilość żywych komórek w porównaniu do próby kontrolnej (czystego HA). W przypadku trzech próbek: LC9RT1, HC9RT1 and HC9HT1 przeżywalność komórek była niższa niż 70 % (zaklasyfikowane jako cytotoxyczne). Szczegółowa analiza podstawowych badań biologicznych znajduje się w publikacji **P2**. Czynniki, które miały największy wpływ na biokompatybilność w warunkach *in vitro* był dłuższy czas starzenia oraz wyższe pH. Warto wspomnieć, że w $\text{pH}=11$ (wysokie stężenie jonów OH^-), rozpuszczalność osadu jest mniejsza, a więc proces strącania zachodzi szybciej, co skutkuje tworzeniem się

aglomeratów (widoczne na zdjęciu TEM, rysunek 10) [113]. Przypuszczam, że silnie rozwinięta powierzchnia materiałów zsyntetyzowanych w wyższym pH i z długim czasem starzenia sprzyja lepszej adhezji i wzrostowi komórek na powierzchni apatytów.

Rysunek 11. Komórki MG-63 na powierzchni wybranych materiałów po 7 dniach inkubacji, wybarwione techniką MTT, zdjęcie wykonane mikroskopem cyfrowym Kayence VHX-7000. Z lewej strony przykład intensywnego wzrostu (niemodyfikowany hydroksyapatyt), z prawej wzrost mało intensywny (próbka HC9RT1).

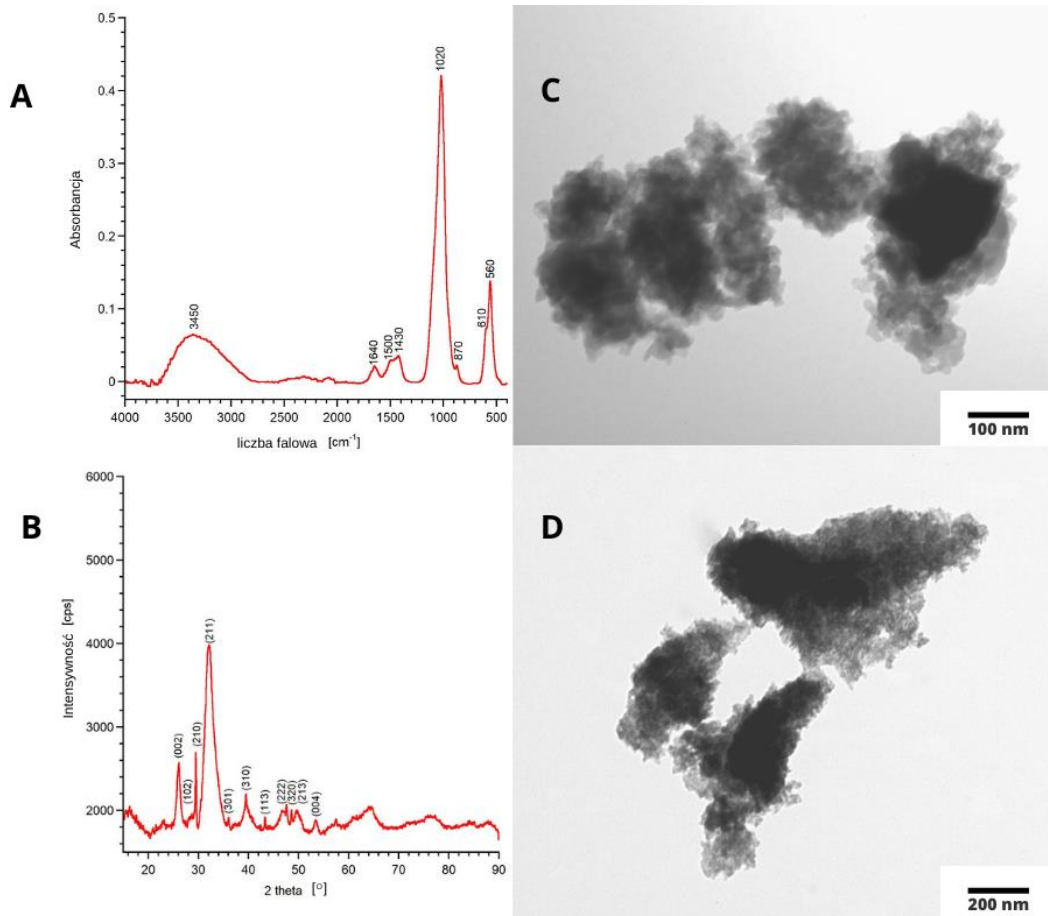


Zebranie i analiza wszystkich wyników badań w publikacji **P2** doprowadziła do jednoznacznego wniosku, iż warunki syntezy mają znaczący wpływ na właściwości apatytu imitującego apatyt biologiczny. Ustaliłam, że do otrzymania materiału o dużym stopniu biomimetyczności i biokompatybilności z tkanką kostną, należy zastosować mokrą syntezę stężeniową w temperaturze pokojowej, pH=11, niskim stężeniem reagentów oraz czasem starzenia wynoszącym 7 dni. Wybierając parametry syntezy kierowałam się w pierwszej kolejności wydajnością wprowadzania jonów obcych, wynikami testów cytotoksyczności (biokompatybilność materiałów), a następnie morfologią kryształów. Otrzymane wyniki stanowią obszerny wkład w badania dotyczące opracowania wydajnej metody syntezy apatytów biomimetycznych.

Powyższe warunki syntezy zastosowałam do otrzymania apatytu domieszkowanego jonami Mg^{2+} , Zn^{2+} oraz CO_3^{2-} , który stanowił część mineralną przy tworzeniu kompozytów kolagenowych przedstawionych w publikacjach **P3** oraz **P4**. Z powodzeniem otrzymałam czysto fazowo wielopodstawiony apatyt, posiadający właściwości charakterystyczne dla apatytu biomimetycznego. Widmo FT-IR zawiera charakterystyczne pasma dla

hydroksyapatytu. Badania PXRD oraz TEM potwierdziły nanokrystaliczny charakter proszku i niski stopień krystaliczności. Na zdjęciach TEM (Rysunek 12) stwierdzono obecność charakterystycznych dla apatytu biologicznego kryształów *plate-like*. Zawartość węglanów była wysoka i wynosiła $6,4 \pm 0,3$ % wagowo (wydajność podstawienia - 95 %). Planowana ilość wprowadzanego cynku wynosiła 3,5 % - jest to wartość literaturowa, która zapewnia aktywność osteogenną i właściwości antybakteryjne [114]. Zgodnie z wynikami ICP-OES jony magnezu i cynku udało się wprowadzić w następujących ilościach: $0,33 \pm 0,02$ % dla magnezu oraz $3,21 \pm 0,03$ % dla cynku. W świetle literatury, niższa wydajność wprowadzania jonów magnezu może wynikać ze zjawiska konkurencji w substytucji jonów Ca^{2+} i na tej podstawie można założyć, że jony cynku są łatwiej wprowadzane do kryształu HA niż jony Mg^{2+} [115, 116]. W badaniach biologicznych *in vitro* otrzymany proszek apatytowy nie wykazywał cytotoksyczności wobec komórek fibroblastów.

Rysunek 12. Charakterystyka apatytu wzbogaconego w jony cynku, magnezu oraz węglany. A – widmo FT-IR, B – dyfraktogram PXRD, C i D – zdjęcia TEM przedstawiające charakterystyczne kryształy *plate-like*.

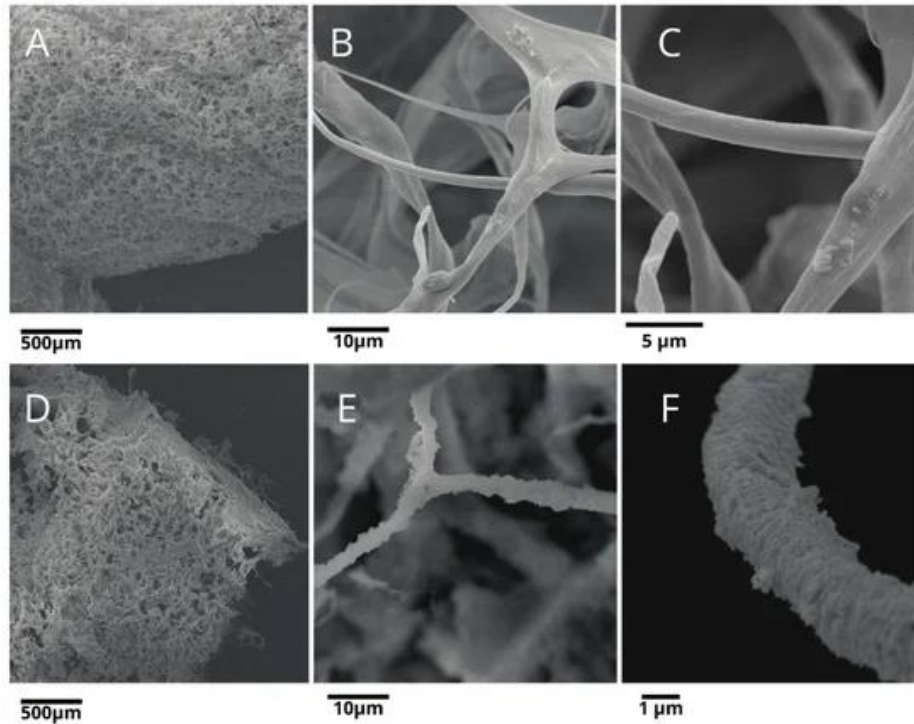


Kolejnym etapem badań było otrzymanie kompozytowych kształtek zainspirowanych mikrostrukturą tkanki kostnej, co opisałam w publikacji **P3**. Kompozyty kolagenowo-apatytowe są tematem mocno zaznaczonym w piśmiennictwie. Jednak podczas szerokiego przeglądu literatury zainteresowała mnie możliwość jeszcze lepszego odwzorowania składu kości, poprzez utworzenie kompozytu zawierającego jonowo modyfikowaną frakcję mineralną. W związku z tym swoją pracę badawczą skupiłam na opracowaniu efektywnej metody otrzymania kompozytu na bazie kolagenu oraz wielopodstawionego apatytu.

Poważną napotkaną trudnością podczas syntez było zapewnienie homogenności: najpierw samemu roztworowi kolagenu, następnie zawiesinie kolagenowo/apatytowej o czym wspomniałam w rozdziale 3.4. Stosowałam różne sposoby i prędkości mieszania, różne rodzaje kwasów (octowy oraz fosforanowy), a także różne temperatury (4 °C oraz temperatura pokojowa). Ostatecznie w pierwszym kroku prac badawczych nad kompozytami postanowiłam otrzymać dwa rodzaje materiałów z różnymi typami kolagenu (kolagen typu I rozpuszczony w roztworze 1 % kwasu octowego oraz atelokolagen) i porównać ich właściwości fizykochemiczne. Przy użyciu metody FT-IR potwierdziłam obecność i tożsamość frakcji mineralnej w kompozytach, a także obecność pasm charakterystycznych dla kolagenu. W niskim pH zachodziła obawa utraty przestrzennej struktury potrójnej helisy białka oraz krystalicznej struktury apatytu. Widma FT-IR potwierdziły, iż zastosowane przeze mnie warunki otrzymywania kompozytów są optymalne i nie wpływają na zmiany w strukturze składników.

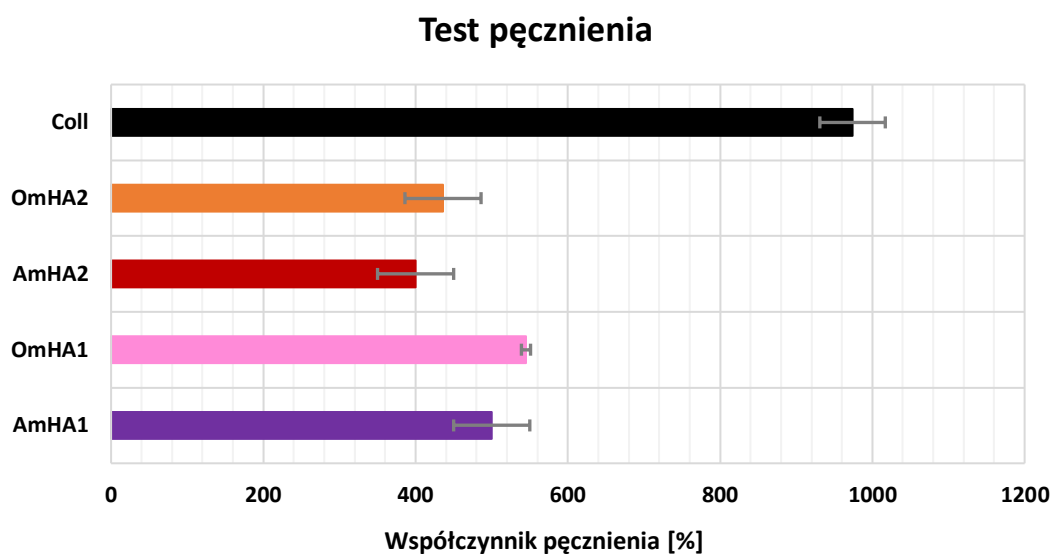
Celem sprawdzenia równomiernego osadzenia się kryształów apatytu na włóknach kolagenowych posłużono się skaningową mikroskopią elektronową. Obydwa rodzaje kompozytów wykazały silnie porowatą strukturę o morfologii przypominającej gąbkę. Zauważyłam wyraźną różnicę w ilości osadzonej frakcji mineralnej na polimerowym rusztowaniu (Rysunek 13). Włókna kolagenowe w kompozytach zawierających kolagen typu I (OmHA) były pokryte całkowicie i równomiernie mHA, podczas gdy w kompozytach atelokolagenowych (AmHA) apatyt był widoczny w niewielkich ilościach i tylko w pewnych obszarach. Widma FT-IR potwierdzają moją obserwację wskazując na niższą zawartość i słabsze osadzenie kryształów apatytowych w kompozytach na bazie atelokolagenu. Pasma pochodzące od frakcji mineralnej w kompozytach AmHA mają niższą intensywność w porównaniu do pasm OmHA.

Rysunek 13. Zdjęcia SEM kompozytów AmHA (A-C) oraz OmHA (D-F).



Obserwując silnie porowatą strukturę kompozytów spodziewałam się dużej zdolności pęcznienia i pochłaniania wody. Celem sprawdzenia moich przypuszczeń przeprowadziłam test pęcznienia. Badanie potwierdziło dużą zdolność pochłaniania wody przez kształtki kompozytowe. Już w ciągu 30-60 minut stopień pęcznienia wynosił 400 – 550 % (Rysunek 14). Zaobserwowałam, iż dodatek mHA skutkuje ograniczeniem pęcznienia, jednak absorpcja wody wciąż utrzymuje się na bardzo wysokim poziomie. Jest to bardzo korzystna właściwość, szczególnie ze względu na możliwości aplikacyjne jako materiał hamujący krwawienie czy absorbujący substancję leczniczą, osocze bogatopłytkowe, itp..

Rysunek 14. Wyniki testu pęcznienia. Stopień pęcznienia zmierzony po 60 minutach. Coll – materiał odniesienia, gąbeczka kolagenowa.



Interesującym etapem badań było określenie profilu uwalniania jonów cynku i magnezu z materiału kompozytowego. Jak wspomniałam w podrozdziale 1.4.1 jony te mogą przynieść wiele korzyści nowopowstającej tkance kostnej, jeśli zostaną uwolnione ze struktury apatytu w odpowiednim czasie i ilości. Zarówno jony magnezu, jak i cynku dużo łatwiej uwalniały się z kompozytów atelokolagenowych, co wynikać może z dużo słabszych połączeń pomiędzy mHA a włóknami kolagenowymi, niż w kompozytach OmHA. Jest to zgodne z wcześniejszymi obserwacjami zdjęć SEM oraz widm FT-IR. Z apatytu luźno upakowanego w matrycy polimerowej dużo łatwiej uwalniają się jony, szczególnie te zlokalizowane na powierzchni nanokryształów mHA. We wszystkich otrzymanych kompozytach zauważalny był dużo wyższy stopień uwalniania magnezu w porównaniu do jonów cynku. W kompozytach AmHA około 35 % magnezu zostało uwolnione w ciągu 7 dni, natomiast w OmHA około 11 %. Ilość uwolnionego cynku w badanym czasie była znikoma i osiągnęłam maksymalnie 2,4 % dla kompozytów AmHA i 1,5 % dla OmHA [P3]. Przypuszczam, że dysproporcja w uwalnianiu poszczególnych jonów wynika z ich umiejscowienia w sieci krystalicznej apatytu. Jony magnezu, zgodnie z danymi literaturowymi, wbudowują się w strukturę apatytową w małej ilości, a ich limit podstawieniowy wynosi około 0,5 %. Jony cynku z kolei wprowadzane są z dużą łatwością, z czego można wnioskować, że dodatkowo mogą utrudniać zastępowanie jonów wapnia kationami magnezu. Przypuszczam, iż jony magnezu w otrzymanym przeze mnie materiale zlokalizowały się głównie na powierzchni

nanokryształów apatytowych, w tak zwanej uwodnionej warstwie powierzchniowej, co skutkuje ich bardzo łatwym i stosunkowo szybkim uwalnianiem z kompozytu. Krzywe uwalniania jonów przedstawione w **P3** nie osiągnęły plateau, co jest związane z długą resorpcją apatytu, trwającą co najmniej kilka tygodni. Ciągłe uwalnianie się jonów magnezu i cynku mogłoby być korzystne jako stały impuls stymulujący kościotworzenie.

Otrzymane kompozyty wzbogaciłam także w substancję leczniczą – kwas traneksamowy. Wyboru leku dokonałam myśląc o potencjale aplikacyjnym otrzymanych materiałów, które mogłyby służyć jako hemostatyczne opatrunki, np. w chirurgii stomatologicznej. W przypadku tego leku kluczowe jest szybkie uwalnianie i osiągnięcie wysokiego stężenia w krótkim czasie, aby efektywnie zahamować nadmierne krwawienia. TXA uwalniał się bardzo szybko z wszystkich otrzymanych kompozytów z charakterystycznym nagłym wyrzutem leku (ang. *burst release*). W ciągu pierwszych 15 minut uwolniło się od 57 % wprowadzonej substancji leczniczej (dla AmHA1) do nawet 86 % (OmHA1). Profile uwalniania dla wszystkich próbek są dość zbliżone, a całkowita ilość uwolnionego TXA mieści się w granicach 81 % – 97 %. Analiza kinetyki uwalniania leku z poszczególnych materiałów znajduje się w **P3**. Należy zauważyć, że różnice w profilach uwalniania nie są na tyle znaczące, by potwierdzić wpływ sposobu wprowadzania leku na jego uwalnianie.

Co istotne w badaniach cytotoksyczności testem NRU na komórkach BALB/c 3T3 wszystkie próbki zostały zakwalifikowane jako niecytotoksyczne.

Po otrzymaniu satysfakcjonujących wyników badań kompozytów kolagen/wielopodstawiony apatyt, postanowiłam nieco zmodyfikować skład i strukturę biomateriałów poprzez dodatek różnych, naturalnych polimerów. Łącząc wcześniej otrzymany kompozyt z innymi polimerami miałam na celu zmodyfikowanie porowatości, otrzymanie nowej trójwymiarowej formy (granul), a także sprawdzenie wpływu nowej frakcji polimerowej na kinetykę uwalniania substancji leczniczej i jonów, a także właściwości fizykochemiczne [117]. Z powodzeniem otrzymałam kompozyty w postaci granul o średnicy $3,5 \pm 0,5$ mm, których forma może być szczególnie korzystna przy wypełnianiu nieregularnych, pustych przestrzeni kostnych (np. po ekstrakcji zębów). Otrzymane materiały szczegółowo opisałam w publikacji **P4**. W poniższej tabeli przedstawiłam skład otrzymanych granul.

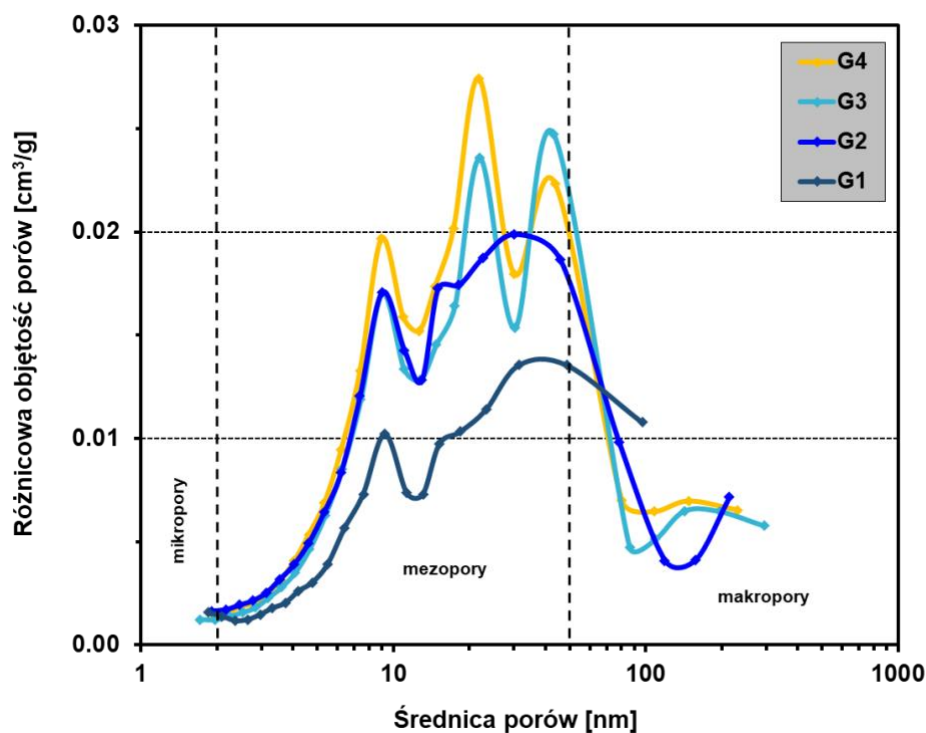
Tabela 4. Skład otrzymanych granul.

Symbol	Atelokolagen	Alginian sodu	mHA	Serycyna	Chitozan	Ibuprofen
G1	+	+	+	-	-	+
G2	+	+	+	-	+	+
G3	+	+	+	+	-	+
G4	+	+	+	+	+	+

Przy użyciu mikroskopii elektronowej SEM oceniono morfologię uzyskanych granul. Powierzchnia wszystkich granul jest silnie chropowata oraz posiada głębokie, nieregularne wgłębienia, co może sprzyjać potencjalnej adhezji komórek kostnych biorących udział w odbudowie uszkodzonej tkanki. Dwa rodzaje granul (G2 oraz G4) posiadają nieco gładszą i jednorodną powierzchnię, co może być efektem obecności cienkiej warstwy chitozanu. W przypadku granul G1 oraz G3 zaobserwować można widoczne skupiska kryształów mHA w strukturze kompozytu.

W kolejnym etapie wyznaczono izotermy adsorpcji-desorpcji metodą sorpcji azotu, a na ich podstawie objętość i rozkład wielkości porów w zakresie średnic 2 - 300 nm bazując na modelu BJH (ang. *Barrett-Joyner-Halenda*). Próbki cechują się dość zbliżoną strukturą porowatą, w której dominują mezopory (Rysunek 15). Wszystkie materiały wykazują dość dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą w zakresie od 76 do 94 m²/g. Ciekawym wnioskiem z analizy struktury porowatej było stwierdzenie, że dodatek serycyny lub chitozanu powoduje znaczny wzrost objętości porów, w tym mezoporów. Warto wspomnieć, iż stopień porowatości oraz rozkład wielkości porów są kluczowymi parametrami dla systemów dostarczania leków. Struktura mezoporowata jest niezbędna i pożądana do skutecznego załadowania i uwalniania substancji leczniczej [118]. Analizę struktury porowatej szerzej opisałam w publikacji **P4**.

Rysunek 15. Dystrybucja porów w granulach G1-G4.



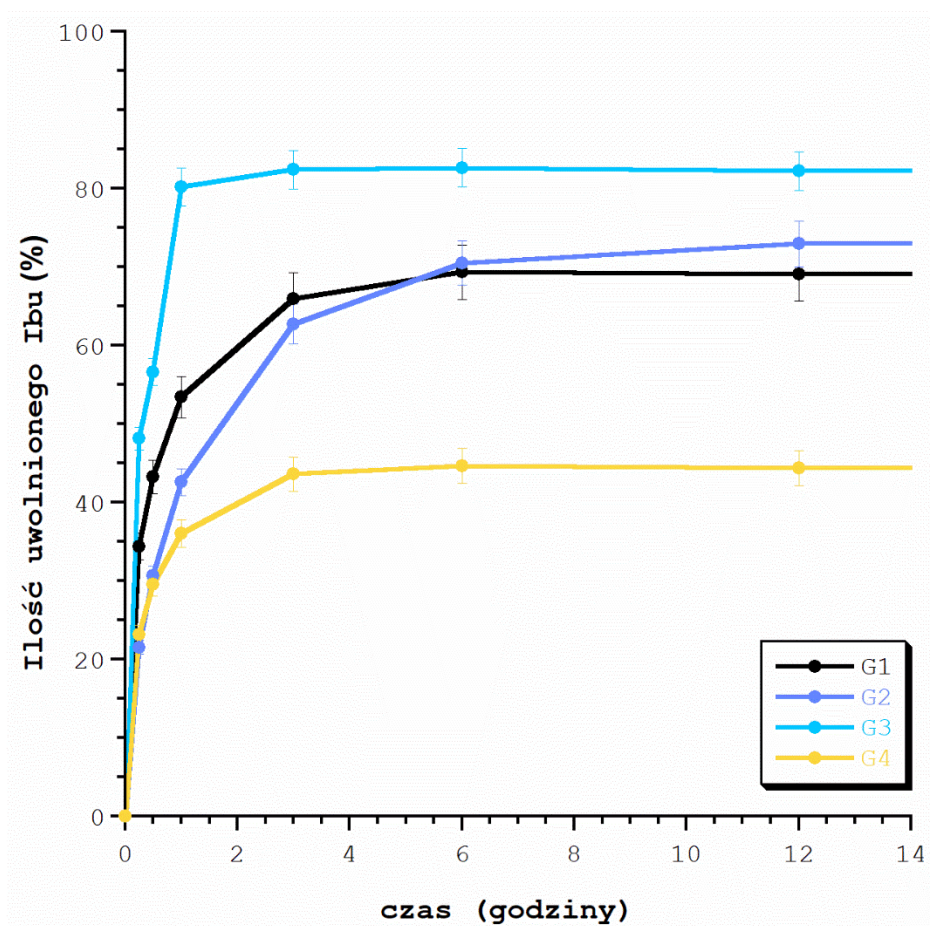
Test pęcznienia wskazał na dużą zdolność absorpcji wody przez kompozytowe granule. Stopień pęcznienia intensywnie rósł w trakcie pierwszej godziny i osiągnął maksimum w trzeciej godzinie testu. Najniższy stopień pęcznienia wykazały granule G1, choć wciąż był on wysoki i wynosił 500 %. Granule G2 i G4 wykazały najwyższy stopień absorpcji wody sięgający 700-800 %, jednak pęcznienie zachodziło z pewnym opóźnieniem, co może być wynikiem obecności membrany chitozanej.

Wyniki uwalniania jonów magnezu i cynku potwierdzają wnioski z wcześniej omówionej publikacji **P3**. Jony magnezu uwalniają się w znacznie większym stopniu, niż jony cynku. W ciągu 12 godzin uwolniło się nawet do 60 % kationów Mg^{2+} , podczas gdy kationów Zn^{2+} jedynie do 7 %, co stanowi wyższy wynik niż w przypadku kształtek kolagenowo/apatytowych opisanych w publikacji **P3**. Potwierdza to także hipotezę o lokalizacji jonów magnezu na powierzchni apatytu, a jonów cynku w krystalicznym rdzeniu apatytu, co przekłada się na wyniki uwalniania kationów ze struktury kompozytów. Podobnie jak wcześniej uważam, że warto by było kontynuować eksperyment dłużej, by sprawdzić możliwość dalszego uwalniania jonów cynku.

Potwierdziłam także skuteczne uwalnianie się ibuprofenu ze struktury granul. Zależało mi na szybkim osiągnięciu wysokich stężeń substancji leczniczej, aby efektywnie i w krótkim

czasie zahamować proces zapalny. Zaobserwowałam szybkie uwalnianie substancji leczniczej ze wszystkich badanych próbek w ciągu pierwszych 3 godzin. W zależności od składu profile uwalniania nieznacznie się różniły co opisałam w publikacji **P4** i przedstawiłam na poniższym wykresie (Rysunek 16). Szczególnie ciekawa okazała się analiza profilu uwalniania ibuprofenu w pierwszej godzinie, gdzie widać znaczącą różnicę pomiędzy granulami z chitozanowym pokryciem i bez niego. Przypuszczam, że grubsza powłoka chitozanowa o większym stopniu usieciowania mogłaby spowolnić uwalnianie leku, co byłoby korzystne np. przy podawaniu antybiotyków.

Rysunek 16. Profile uwalniania ibuprofenu z otrzymanych granul.



Na podstawie badań biologicznych w warunkach *in vitro* na nowotworowej linii komórek kostnych MG-63 z zastosowaniem techniki odczytu opartej na aktywności dehydrogenazy bursztynianowej nie stwierdzono cytotoksyczności otrzymanych próbek.

5. Podsumowanie i wnioski

Podsumowując, w ramach pracy badawczej zrealizowałam wszystkie zamierzone cele, przedstawione w rozdziale drugim niniejszej rozprawy. Otrzymałam kompozyt zawierający kolagen oraz wielopodstawiony, biomimetyczny apatyt o potencjale aplikacyjnym w medycynie regeneracyjnej.

Otrzymałam szereg podstawionych jonowo apatytów inspirowanych apatytem biologicznym. Materiały o takim składzie i właściwościach nie były dotychczas opisane w literaturze. Wszystkie materiały zostały poddane szczegółowej analizie fizykochemicznej i wstępnym testom cytotoksyczności w warunkach *in vitro*.

Opracowałam również metodę otrzymywania porowatych kształtek kompozytowych na bazie wcześniej otrzymanego proszku apatytowego oraz dwóch rodzajów kolagenu. Materiały kompozytowe zostały zaprojektowane z myślą o jak najdokładniejszym odwzorowaniu tkanki kostnej, biorąc pod uwagę jej skład chemiczny oraz właściwości fizykochemiczne. Dodatkowo sprawdziłam możliwość zastosowania otrzymanych kompozytów jako nośników substancji leczniczej i zbadałam profil uwalniania modelowej substancji leczniczej – kwasu traneksamowego.

Dalsze badania przeprowadziłam modyfikując skład wcześniej otrzymanych kompozytów, poprzez dodatek naturalnych polimerów: alginianu sodu, serycyny oraz chitozanu i nadając im nową formę – granul. Ponownie wprowadziłam modelową substancję leczniczą, tym razem ibuprofen sodu, mając na uwadze pożądany efekt terapeutyczny w miejscu potencjalnego zastosowania. Wszystkie otrzymane kompozyty poddałam licznym badaniom strukturalnym i fizykochemicznym, oceniłam kinetykę uwalniania substancji leczniczej i jonów w warunkach *in vitro* oraz dokonałam oceny cytotoksyczności.

Najważniejsze wnioski z pracy:

1. Otrzymałam nanokrystaliczny apatyt domieszkowany jednocześnie trzema jonami: Na^+ , Mg^{2+} oraz CO_3^{2-} , a także Zn^{2+} , Mg^{2+} oraz CO_3^{2-} .
2. Szereg właściwości fizykochemicznych otrzymanych proszków apatytowych zależy od warunków syntezy:
 - a. Wielkość i kształt kryształów zależą od stężenia reagentów i temperatury,
 - b. Temperatura syntezy wpływa na stopień krystaliczności apatytu,

- c. Wydajność wprowadzania jonów obcych do struktury apatytu zależy od czasu dojrzewania osadu oraz wartości pH,
 - d. Czas starzenia oraz pH mają wpływ na biokompatybilność materiału.
3. Ustaliłam parametry syntezy, które sprzyjają powstaniu apatytów wysoce biomimetycznych i biokompatybilnych: temperatura pokojowa, wysokie pH (wartość ok. 11), niskie stężenia reagentów (dla jonów fosforanowych (V) - 5 % oraz dla jonów wapnia - 3 %) oraz dłuższy czas starzenia (równy 7 dni).
4. Uzyskane proszki apatytowe zaklasyfikowałam jako materiały o niskiej krystaliczności.
5. W otrzymanych apatytach obecne są kryształy *plate-like* charakterystyczne dla apatytu biologicznego.
6. Jony cynku wbudowują się łatwiej, z większą wydajnością w strukturę apatytu niż jony magnezu.
7. Kompozyty kolagenowo/apatytowe utworzone z użyciem roztworu kolagenu typu I charakteryzują się dużym stopniem homogenności oraz równomiernym pokryciem włókien kolagenowych biomimetycznym apatytem.
8. Kształtki kompozytowe (zarówno granule, jak i inne formy) charakteryzują się wysokim stopniem pęcznienia i dużą podatnością absorpcji wody.
9. Kompozyty kolagen/wielopodstawiony apatyt zawierające kwas traneksamowy uwalniają substancję leczniczą bardzo szybko. W krótkim czasie (15min) osiągnięto wysokie stężenie leku, co jest cechą pożądaną w kontekście potencjalnego zastosowania.
10. Jony Zn^{2+} i Mg^{2+} uwalniały się znacznie wolniej i w mniejszym stopniu niż substancje lecznicze (zarówno kwas traneksamowy, jak i ibuprofen).
11. Istnieje zależność pomiędzy ilością uwolnionych jonów, a ich lokalizacją w strukturze apatytu.
12. W kompozytach uzyskanych z zastosowaniem alginianu sodu jako rdzeniem granul oraz dodatkiem polimerów naturalnych dominuje struktura mezoporowata. Wszystkie granule posiadają dobrze rozwiniętą powierzchnię właściwą.
13. Powłoka chitozanowa na powierzchni granul spowalnia proces pęcznienia i uwalniania modelowej substancji leczniczej oraz jonów ze struktury kompozytów.

6. Aspekty nowości w pracy

Do najważniejszych elementów nowości naukowej zawartych w niniejszej rozprawie można zaliczyć:

1. Opracowanie efektywnej syntezy HA domieszkowanego jednocześnie trzema jonami: Mg^{2+} , Na^+ oraz CO_3^{2-} , a także Mg^{2+} , Zn^{2+} oraz CO_3^{2-} .
2. Określenie wpływu warunków syntezy (pH, stężenia reagentów, temperatury i czasu starzenia) na właściwości fizykochemiczne syntetyzowanych wielopodstawionych apatytów. Otrzymanie biomimetycznych apatytów o morfologii, krystaliczności i składzie chemicznym odwzorowującym apatyt biologiczny znajdujący się w tkance kostnej.
3. Opracowanie nowych, wielofunkcyjnych kompozytów o unikalnym składzie, naśladujących budowę tkanki kostnej i jednocześnie wzbogaconych o dodatek substancji leczniczej o właściwościach hemostatycznych.
4. Analiza profilu uwalniania jonów Mg^{2+} oraz Zn^{2+} z materiałów kompozytowych kolagen/wielopodstawiony apatyt. Pogłębienie wiedzy dotyczącej równoczesnego wprowadzania jonów magnezu oraz cynku do sieci krystalicznej apatytu oraz ukazanie zależności między ich lokalizacją w strukturze apatytu, a ich uwalnianiem.
5. Uzyskanie nowych kompozytów w formie granul o korzystnym profilu uwalniania substancji leczniczej (Ibu) i dużym potencjale aplikacyjnym w chirurgii stomatologicznej, jako materiały wykazujące działanie przeciwzapalne.

7. Bibliografia

- [1] C. Myeroff and M. Archdeacon, „Autogenous bone graft: donor sites and techniques”, *JBJS*, t. 93, nr 23, s. 2227–2236, 2011.
- [2] S. Pina, J. M. Oliveira and R. L. Reis, „Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review”, *Adv. Mater.*, t. 27, nr 7, s. 1143–1169, 2015.
- [3] C. G. Finkemeier, „Bone-grafting and bone-graft substitutes”, *JBJS*, t. 84, nr 3, s. 454–464, 2002.
- [4] W. R. Moore, S. E. Graves and G. I. Bain, „Synthetic bone graft substitutes”, *ANZ J. Surg.*, t. 71, nr 6, s. 354–361, 2001.
- [5] S. Bose, M. Roy and A. Bandyopadhyay, „Recent advances in bone tissue engineering scaffolds”, *Trends Biotechnol.*, t. 30, nr 10, s. 546–554, 2012.
- [6] D. Sommerfeldt and C. Rubin, „Biology of bone and how it orchestrates the form and function of the skeleton”, *Eur. Spine J.*, t. 10, s. S86–S95, 2001.
- [7] B. Kołodziejska, A. Kafalak and J. Kolmas, „Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review”, *Materials*, t. 13, nr 7, Art. nr 7, 2020.
- [8] P. Pogoda, M. Priemel, J. M. Rueger and M. Amling, „Bone remodeling: new aspects of a key process that controls skeletal maintenance and repair”, *Osteoporos. Int.*, t. 16, s. S18–S24, 2005.
- [9] A. J. Salgado, O. P. Coutinho and R. L. Reis, „Bone tissue engineering: state of the art and future trends”, *Macromol. Biosci.*, t. 4, nr 8, s. 743–765, 2004.
- [10] M. J. Olszta, „Bone structure and formation: A new perspective”, *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, t. 58, nr 3–5, s. 77–116, 2007.
- [11] S. Viguet-Carrin, P. Garnero and P. D. Delmas, „The role of collagen in bone strength”, *Osteoporos. Int.*, t. 17, nr 3, s. 319–336, 2006.
- [12] S. V. Dorozhkin, „Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine”, *Materials*, t. 2, nr 2, s. 399–498, 2009.
- [13] B. Clarke, „Normal bone anatomy and physiology”, *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN*, t. 3, nr Suppl 3, s. S131, 2008.
- [14] J. S. Chen and P. N. Sambrook, „Antiresorptive therapies for osteoporosis: a clinical overview”, *Nat. Rev. Endocrinol.*, t. 8, nr 2, Art. nr 2, 2012.
- [15] O. Johnell and J. A. Kanis, „An estimate of the worldwide prevalence and disability associated with osteoporotic fractures”, *Osteoporos. Int.*, t. 17, nr 12, s. 1726–1733, 2006.
- [16] C. J. Rosen, „Postmenopausal Osteoporosis”, *N. Engl. J. Med.*, t. 353, nr 6, s. 595–603, 2005.
- [17] D. Arcos, „The relevance of biomaterials to the prevention and treatment of osteoporosis”, *Acta Biomater.*, t. 10, nr 5, s. 1793–1805, 2014.
- [18] J. Ferlay, „Global cancer observatory: cancer today. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2020”. 2021.
- [19] A. Lluch, J. Cueva, M. Ruiz-Borrego, J. Ponce, and J.-A. Pérez-Fidalgo, „Zoledronic acid in the treatment of metastatic breast cancer”, *Anticancer. Drugs*, t. 25, nr 1, s. 1–7, 2014.
- [20] R. Czyżykowski, M. Krakowska i P. Potemski, „Zastosowanie bisfosfonianów u pacjentów z nowotworami narządowymi”, *Onkol. W Prakt. Klin.-Eduk.*, t. 3, nr 6, s. 295–302, 2017.

- [21] T. M. Hamdy, „Dental Biomaterial Scaffolds in Tooth Tissue Engineering: a Review”, *Curr. Oral Health Rep.*, t. 10, nr 1, s. 14–21, 2023.
- [22] M. E. Grawish, L. M. Grawish, H. M. Grawish, M. M. Grawish and S. A. El-Negoly, „Challenges of engineering biomimetic dental and paradental tissues”, *Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 17, s. 403–421, 2020.
- [23] S. Allegrini Jr, „Alveolar ridge sockets preservation with bone grafting–review.”, *Annales Academiae Medicae Stetinensis*, s. 70–81, 2008.
- [24] M. C. Goiato, D. M. Dos Santos, J. J. Santiago, A. Moreno and E. P. Pellizzer, „Longevity of dental implants in type IV bone: a systematic review”, *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, t. 43, nr 9, s. 1108–1116, 2014.
- [25] S. Ohba, Y. Sumita, Y. Nakatani, S. Noda and I. Asahina, „Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction”, *Clin. Oral Investig.*, t. 23, nr 5, s. 2413–2419, 2019.
- [26] A. Barone, N. N. Aldini, M. Fini, R. Giardino, J. L. Calvo Guirado and U. Covani, „Xenograft versus extraction alone for ridge preservation after tooth removal: a clinical and histomorphometric study”, *J. Periodontol.*, t. 79, nr 8, s. 1370–1377, 2008.
- [27] A. Barone, M. Ricci, P. Tonelli, S. Santini and U. Covani, „Tissue changes of extraction sockets in humans: a comparison of spontaneous healing vs. ridge preservation with secondary soft tissue healing”, *Clin. Oral Implants Res.*, t. 24, nr 11, s. 1231–1237, 2013.
- [28] B. Beig, U. Liaqat, M. F. K. Niazi, I. Douna, M. Zahoor and M. B. K. Niazi, „Current Challenges and Innovative Developments in Hydroxyapatite-Based Coatings on Metallic Materials for Bone Implantation: A Review”, *Coatings*, t. 10, nr 12, Art. nr 12, 2020.
- [29] M. Navarro, A. Michiardi, O. Castano and J. A. Planell, „Biomaterials in orthopaedics”, *J. R. Soc. Interface*, t. 5, nr 27, s. 1137–1158, 2008.
- [30] M. Nasr Azadani, A. Zahedi, O. K. Bowoto and B. I. Oladapo, „A review of current challenges and prospects of magnesium and its alloy for bone implant applications”, *Prog. Biomater.*, t. 11, nr 1, s. 1–26, 2022.
- [31] A. Zima. "Wpływ dodatków modyfikujących na właściwości hydroksyapatytowych wielofunkcyjnych tworzyw implantacyjnych przeznaczonych na nośniki leków - PDF Free Download". Dostęp: 3 wrzesień 2023. [Online]. Dostępne na: <https://docplayer.pl/8738052-Aneta-zima-wplyw-dodatkow-modyfikujacych-na-wlasciwosci-hydroksyapatytowych-wielofunkcyjnych-tworzyw-implantacyjnych-przeznaczonych-na-nosniki-lekow.html>
- [32] A. Zima, „Wpływ dodatków modyfikujących na właściwości hydroksyapatytowych wielofunkcyjnych tworzyw implantacyjnych przeznaczonych na nośniki leków”, *Pr. Doktorska AGH Kraków*, 2007.
- [33] M. H. Fathi, A. Hanifi and V. Mortazavi, „Preparation and bioactivity evaluation of bone-like hydroxyapatite nanopowder”, *J. Mater. Process. Technol.*, t. 202, nr 1–3, s. 536–542, 2008.
- [34] S. Bertazzo, W. F. Zambuzzi, D. D. Campos, T. L. Ogeda, C. V. Ferreira and C. A. Bertran, „Hydroxyapatite surface solubility and effect on cell adhesion”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, t. 78, nr 2, s. 177–184, 2010.
- [35] A. J. Festas, A. Ramos and J. P. Davim, „Medical devices biomaterials–A review”, *Proc. Inst. Mech. Eng. Part J. Mater. Des. Appl.*, t. 234, nr 1, s. 218–228, 2020.

- [36] J. Czechowska, Z. Paszkiewicz, D. Siek i A. Ślósarczyk, „Makroporowata bioceramika oparta na ortofosforanach wapnia do zastosowań medycznych”, *Inż. Mater.*, t. 32, nr 6, s. 923–928, 2011.
- [37] D. Arcos and M. Vallet-Regí, „Bioceramics for drug delivery”, *Acta Mater.*, t. 61, nr 3, s. 890–911, 2013.
- [38] M. Vallet-Regí, F. Balas and D. Arcos, „Mesoporous materials for drug delivery”, *Angew. Chem. Int. Ed.*, t. 46, nr 40, s. 7548–7558, 2007.
- [39] B. Wang, Z. Zhang and H. Pan, „Bone Apatite Nanocrystal: Crystalline Structure, Chemical Composition, and Architecture”, *Biomimetics*, t. 8, nr 1, s. 90, 2023.
- [40] C. Combes, S. Cazalbou and C. Rey, „Apatite Biominerals”, *Minerals*, t. 6, nr 2, Art. nr 2, 2016.
- [41] A. Bigi, E. Boanini and M. Gazzano, „7 - Ion substitution in biological and synthetic apatites”, w *Biomineralization and Biomaterials*, C. Aparicio i M.-P. Ginebra, Red., Boston: Woodhead Publishing, s. 235–266, 2016.
- [42] A. Matsuura, „Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents”, *Dent. Mater. J.*, t. 28, nr 2, s. 234–242, 2009.
- [43] J. Kolmas, S. Krukowski, A. Laskus and M. Jurkitewicz, „Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications”, *Ceram. Int.*, t. 42, nr 2, s. 2472–2487, 2016.
- [44] M. Šupová, „Substituted hydroxyapatites for biomedical applications: A review”, *Ceram. Int.*, t. 41, nr 8, s. 9203–9231, 2015.
- [45] K. Ishikawa and K. Hayashi, „Carbonate apatite artificial bone”, *Sci. Technol. Adv. Mater.*, t. 22, nr BioJ, s. 683–694, 2021.
- [46] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi and M. Sandri, „Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite”, *Biomaterials*, t. 25, nr 10, s. 1763–1770, 2004.
- [47] D. Laurencin, „Magnesium incorporation into hydroxyapatite”, *Biomaterials*, t. 32, nr 7, s. 1826–1837, 2011.
- [48] M. S. Sader, K. Lewis, G. A. Soares and R. Z. LeGeros, „Simultaneous incorporation of magnesium and carbonate in apatite: effect on physico-chemical properties”, *Mater. Res.*, t. 16, s. 779–784, 2013.
- [49] I. R. Gibson and W. Bonfield, „Preparation and characterization of magnesium/carbonate co-substituted hydroxyapatites”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 13, nr 7, s. 685–693, 2002.
- [50] L. S. Nair and C. T. Laurencin, „Biodegradable polymers as biomaterials”, *Prog. Polym. Sci.*, t. 32, nr 8, s. 762–798, 2007.
- [51] K. Gelse, E. Pöschl and T. Aigner, „Collagens—structure, function, and biosynthesis”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, t. 55, nr 12, s. 1531–1546, 2003.
- [52] C. H. Lee, A. Singla and Y. Lee, „Biomedical applications of collagen”, *Int. J. Pharm.*, t. 221, nr 1, s. 1–22, 2001.
- [53] S. S. Mathew-Steiner, S. Roy and C. K. Sen, „Collagen in wound healing”, *Bioengineering*, t. 8, nr 5, s. 63, 2021.
- [54] D. J. Cziperle, „Avitene™ Microfibrillar Collagen Hemostat for Adjunctive Hemostasis in Surgical Procedures: A Systematic Literature Review”, *Med. Devices Evid. Res.*, t. 14, s. 155–163, 2021.
- [55] F. Vin, L. Teot and S. Meaume, „The healing properties of Promogran in venous leg ulcers”, *J. Wound Care*, t. 11, nr 9, s. 335–341, 2002.
- [56] M. Babu, „Collagen based dressings—a review”, *Burns*, t. 26, nr 1, s. 54–62, 2000.

- [57] U. Gruessner, M. Clemens, P. V. Pahlplatz, P. Sperling, J. Witte and H. R. Rosen, „Improvement of perineal wound healing by local administration of gentamicin-impregnated collagen fleeces after abdominoperineal excision of rectal cancer”, *Am. J. Surg.*, t. 182, nr 5, s. 502–509, 2001.
- [58] P. K. Narotam, S. José, N. Nathoo, C. Taylon and Y. Vora, „Collagen Matrix (DuraGen) in Dural Repair: Analysis of a New Modified Technique”, *Spine*, t. 29, nr 24, s. 2861, 2004.
- [59] D. Olsen, „Recombinant collagen and gelatin for drug delivery”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, t. 55, nr 12, s. 1547–1567, 2003.
- [60] R. A. Pérez, J.-E. Won, J. C. Knowles and H.-W. Kim, „Naturally and synthetic smart composite biomaterials for tissue regeneration”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, t. 65, nr 4, s. 471–496, 2013.
- [61] R. Murugan and S. Ramakrishna, „Development of nanocomposites for bone grafting”, *Compos. Sci. Technol.*, t. 65, nr 15–16, s. 2385–2406, 2005.
- [62] D. A. Wahl and J. T. Czernuszka, „Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair”, *Eur Cell Mater*, t. 11, s. 43–56, 2006.
- [63] P. Habibovic and K. de Groot, „Osteoinductive biomaterials—properties and relevance in bone repair”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, t. 1, nr 1, s. 25–32, 2007.
- [64] G. Jain, D. Blaauw and S. Chang, „A Comparative Study of Two Bone Graft Substitutes—InterOss® Collagen and OCS-B Collagen®”, *J. Funct. Biomater.*, t. 13, nr 1, s. 28, 2022.
- [65] M.-P. Ginebra, C. Canal, M. Espanol, D. Pastorino and E. B. Montufar, „Calcium phosphate cements as drug delivery materials”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, t. 64, nr 12, s. 1090–1110, 2012.
- [66] S. Cazalbou, „Ion exchanges in apatites for biomedical application”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 16, nr 5, s. 405–409, 2005.
- [67] J. Kolmas, A. Jaklewicz, A. Zima, M. Bućko, Z. Paszkiewicz, J. Lis, A. Ślósarczyk, W. Kołodziejski, „Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: the effect on physicochemical properties”, *J. Mol. Struct.*, t. 987, nr 1–3, s. 40–50, 2011.
- [68] J. Kolmas, „Badania apatytów syntetycznych i apatytu biologicznego tkanek twardych zęba metodami spektroskopii NMR i IR w ciele stałym”. Praca doktorska, Warszawski Uniwersytet Medyczny, 2006.
- [69] K. Szurkowska, A. Zgadzaj, M. Kuras and J. Kolmas, „Novel hybrid material based on Mg²⁺ and SiO₄⁴⁻ co-substituted nano-hydroxyapatite, alginate and chondroitin sulphate for potential use in biomaterials engineering”, *Ceram. Int.*, t. 44, nr 15, s. 18551–18559, 2018.
- [70] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, A. Ripamonti, M. Gazzano and N. Roveri, „Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization”, *J. Inorg. Biochem.*, t. 49, nr 1, s. 69–78, 1993.
- [71] J. Kolmas, E. Groszyk and D. Kwiatkowska-Różycka, „Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties”, *BioMed Res. Int.*, t. 2014, 2014.
- [72] I. R. de Lima, „Understanding the impact of divalent cation substitution on hydroxyapatite: An in vitro multiparametric study on biocompatibility”, *J. Biomed. Mater. Res. A*, t. 98A, nr 3, s. 351–358, 2011.
- [73] J. H. Shepherd, D. V. Shepherd and S. M. Best, „Substituted hydroxyapatites for bone repair”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 23, nr 10, s. 2335–2347, 2012.
- [74] V. Stanić, „Synthesis, characterization and antimicrobial activity of copper and zinc-doped hydroxyapatite nanopowders”, *Appl. Surf. Sci.*, t. 256, nr 20, s. 6083–6089, 2010.

- [75] S. Gopi, A. Amalraj, N. P. Sukumaran, J. T. Haponiuk and S. Thomas, „Biopolymers and their composites for drug delivery: a brief review”, w *Macromolecular Symposia*, Wiley Online Library, s. 1800114, 2018.
- [76] J. Chen, A. Ashames, M. A. Buabeid, K. M. Fehelbom, M. Ijaz and G. Murtaza, „Nanocomposites drug delivery systems for the healing of bone fractures”, *Int. J. Pharm.*, t. 585, s. 119477, 2020.
- [77] S. V. Dorozhkin, „Biocomposites and hybrid biomaterials based on calcium orthophosphates”, *Biomatter*, t. 1, nr 1, s. 3–56, 2011.
- [78] N. H. Maniya, S. R. Patel and Z. V. P. Murthy, „Electrochemical preparation of microstructured porous silicon layers for drug delivery applications”, *Superlattices Microstruct.*, t. 55, s. 144–150, 2013.
- [79] B. Palazzo, „Controlled drug delivery from porous hydroxyapatite grafts: An experimental and theoretical approach”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 25, nr 2, s. 207–213, 2005.
- [80] D. Loca, J. Locs, A. Dubnika, V. Zalite and L. Berzina-Cimdina, „Porous hydroxyapatite for drug delivery”, *Hydroxyapatite (Hap) for biomedical applications*, s. 189–209, 2015.
- [81] K. Wellington and A. J. Wagstaff, „Tranexamic acid”, *Drugs*, t. 63, nr 13, s. 1417–1433, 2003.
- [82] P. L. McCormack, „Tranexamic acid”, *Drugs*, t. 72, nr 5, s. 585–617, 2012.
- [83] G. T. Tihan, I. Rău, R. G. Zgârian and M. V. Ghica, „Collagen-based biomaterials for ibuprofen delivery”, *Comptes Rendus Chim.*, t. 19, nr 3, s. 390–394, 2016.
- [84] S. R. Ianiro, B. G. Jeansonne, S. F. McNeal and P. D. Eleazer, „The effect of preoperative acetaminophen or a combination of acetaminophen and Ibuprofen on the success of inferior alveolar nerve block for teeth with irreversible pulpitis”, *J. Endod.*, t. 33, nr 1, s. 11–14, 2007.
- [85] S. M. H. Dabiri, A. Lagazzo, F. Barberis, M. Farokhi, E. Finocchio and L. Pastorino, „Characterization of alginate-brushite in-situ hydrogel composites”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 67, s. 502–510, 2016.
- [86] J. Zhang, Q. Wang and A. Wang, „In situ generation of sodium alginate/hydroxyapatite nanocomposite beads as drug-controlled release matrices”, *Acta Biomater.*, t. 6, nr 2, s. 445–454, 2010.
- [87] S. Nayak, S. Dey and S. C. Kundu, „Silk sericin–alginate–chitosan microcapsules: Hepatocytes encapsulation for enhanced cellular functions”, *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 65, s. 258–266, 2014.
- [88] W. Zhang, „A novel core–shell microcapsule for encapsulation and 3D culture of embryonic stem cells”, *J. Mater. Chem. B*, t. 1, nr 7, s. 1002–1009, 2013.
- [89] S. N. Pawar and K. J. Edgar, „Alginate derivatization: A review of chemistry, properties and applications”, *Biomaterials*, t. 33, nr 11, s. 3279–3305, 2012.
- [90] S. (Gabriel) Kou, L. M. Peters and M. R. Mucalo, „Chitosan: A review of sources and preparation methods”, *Int. J. Biol. Macromol.*, t. 169, s. 85–94, 2021.
- [91] P. de Vos, M. M. Faas, B. Strand and R. Calafiore, „Alginate-based microcapsules for immunisolation of pancreatic islets”, *Biomaterials*, t. 27, nr 32, s. 5603–5617, 2006.
- [92] J. Urbaniak, B. Kołodziejska and A. Kafłak, „Synthesis of new chitosan-carbonate hydroxyapatite composites with potential application in bone tissue engineering–physicochemical analysis”, *PCACD*, t. 27, s. 217–227, 2022.
- [93] G. Kravanja, M. Primožič, Ž. Knez and M. Leitgeb, „Chitosan-Based (Nano)Materials for Novel Biomedical Applications”, *Molecules*, t. 24, nr 10, Art. nr 10, 2019.

- [94] S. Husain, „Chitosan Biomaterials for Current and Potential Dental Applications”, *Materials*, t. 10, nr 6, Art. nr 6, 2017.
- [95] J. Liu, „Silk sericin-based materials for biomedical applications”, *Biomaterials*, s. 121638, 2022.
- [96] J.-B. FAN, L.-P. WU, L.-S. CHEN, X.-Y. MAO and F.-Z. REN, „Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*”, *J. Food Biochem.*, t. 33, nr 1, s. 74–88, 2009.
- [97] S. C. Kundu, B. C. Dash, R. Dash and D. L. Kaplan, „Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications”, *Prog. Polym. Sci.*, t. 33, nr 10, s. 998–1012, 2008.
- [98] Y.-Q. Zhang, „Applications of natural silk protein sericin in biomaterials”, *Biotechnol. Adv.*, t. 20, nr 2, s. 91–100, 2002.
- [99] S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe and N. Kato, „Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse”, *J. Photochem. Photobiol. B*, t. 71, nr 1–3, s. 11–17, 2003.
- [100] P. Aramwit, S. Kanokpanont, P. Punyarit and T. Srichana, „Effectiveness of inflammatory cytokines induced by sericin compared to sericin in combination with silver sulfadiazine cream on wound healing”, *Wounds Compend. Clin. Res. Pract.*, t. 21, nr 8, s. 198–206, 2009.
- [101] R. G. Handschin and W. B. Stern, „Crystallographic and chemical analysis of human bone apatite (Crista Iliaca)”, *Clin. Rheumatol.*, t. 13, s. 75–90, 1994.
- [102] I. O. for Standardization, „ISO 10993-5: 2009-Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”. ISO Geneva, 2009.
- [103] G. M. Cunniffe, G. R. Dickson, S. Partap, K. T. Stanton and F. J. O’Brien, „Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 21, nr 8, s. 2293–2298, 2010.
- [104] R. Cholas, „Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix”, *Mater. Sci. Eng. C*, t. 63, s. 499–505, 2016.
- [105] M. Kikuchi, S. Itoh, S. Ichinose, K. Shinomiya and J. Tanaka, „Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction in vivo”, *Biomaterials*, t. 22, nr 13, s. 1705–1711, 2001.
- [106] A. Laskus, A. Zgadzaj and J. Kolmas, „Zn²⁺ and SeO₃²⁻ co-substituted hydroxyapatite: Physicochemical properties and biological usefulness”, *Ceram. Int.*, t. 45, nr 17, Part B, s. 22707–22715, 2019.
- [107] N. Vandecandelaere, C. Rey and C. Drouet, „Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters”, *J. Mater. Sci. Mater. Med.*, t. 23, nr 11, s. 2593–2606, 2012.
- [108] X. Li, Q. Zou, H. Chen and W. Li, „In vivo changes of nanoapatite crystals during bone reconstruction and the differences with native bone apatite”, *Sci. Adv.*, t. 5, nr 11, s. eaay6484, 2019.
- [109] Y. Fan, Z. Sun and J. Moradian-Oldak, „Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride”, *Biomaterials*, t. 30, nr 4, s. 478–483, 2009.
- [110] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, M. Shimizu, B. Collins and M. J. Glimcher, „A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation”, *Calcif. Tissue Int.*, t. 49, s. 259–268, 1991.

- [111] A. Kaflak, A. Ślósarczyk and W. Kolodziejski, „A comparative study of carbonate bands from nanocrystalline carbonated hydroxyapatites using FT-IR spectroscopy in the transmission and photoacoustic modes”, *J. Mol. Struct.*, t. 997, nr 1, s. 7–14, 2011.
- [112] J. Kolmas, M. Szwaja and W. Kolodziejski, „Solid-state NMR and IR characterization of commercial xenogeneic biomaterials used as bone substitutes”, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, t. 61, s. 136–141, 2012.
- [113] V. Rodríguez-Lugo, „Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: Effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties”, *R. Soc. Open Sci.*, t. 5, nr 8, s. 180962, 2018.
- [114] G. Jin, H. Cao, Y. Qiao, F. Meng, H. Zhu and X. Liu, „Osteogenic activity and antibacterial effect of zinc ion implanted titanium”, *Colloids Surf. B Biointerfaces*, t. 117, s. 158–165, 2014.
- [115] K. Matsunaga, „First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate”, *J. Chem. Phys.*, t. 128, nr 24, s. 245101, 2008.
- [116] A. Ressler, A. Žužić, I. Ivanišević, N. Kamboj and H. Ivanković, „Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review”, *Open Ceram.*, t. 6, s. 100122, 2021.
- [117] T. Matsumoto, M. Okazaki, A. Nakahira, J. Sasaki, H. Egusa and T. Sohmura, „Modification of apatite materials for bone tissue engineering and drug delivery carriers”, *Curr. Med. Chem.*, t. 14, nr 25, s. 2726–2733, 2007.
- [118] A. Tsuchiya, „Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model”, *J. Med. Dent. Sci.*, t. 55, nr 1, s. 91–99, 2008.

Publikacje wchodzące w skład rozprawy doktorskiej

Kompozyt kolagen/wielopodstawiony apatyt jako materiał kośćozastępczy
Barbara Kołodziejka

Review

Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review

Barbara Kołodziejska, Agnieszka Kaflak and Joanna Kolmas * 

Chair of Analytical Chemistry and Biomaterials, Department of Analytical Chemistry, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland; barbara.kolodziejska@wum.edu.pl (B.K.); agnieszka.kaflak@wum.edu.pl (A.K.)

* Correspondence: joanna.kolmas@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-5720755

Received: 7 March 2020; Accepted: 7 April 2020; Published: 9 April 2020



Abstract: Type I collagen and nanocrystalline-substituted hydroxyapatite are the major components of a natural composite—bone tissue. Both of these materials also play a significant role in orthopedic surgery and implantology; however, their separate uses are limited; apatite is quite fragile, while collagen’s mechanical strength is very poor. Therefore, in biomaterial engineering, a combination of collagen and hydroxyapatite is used, which provides good mechanical properties with high biocompatibility and osteoinduction. In addition, the porous structure of the composites enables their use not only as bone defect fillers, but also as a drug release system providing controlled release of drugs directly to the bone. This feature makes biomimetic collagen–apatite composites a subject of research in many scientific centers. The review focuses on summarizing studies on biological activity, tested *in vitro* and *in vivo*.

Keywords: collagen; hydroxyapatite; biomimetic material; scaffold; bone regeneration; biocomposite

1. Introduction

Bone grafting, which is performed to regenerate bone tissue and to treat bone defects with various origins, remains one of the most commonly performed surgical procedures. Every year, around two million bone grafts are carried out worldwide, which shows the great need to develop this branch of medicine [1,2]. The start of the development of bone implantology dates back to 1913, when an attempt was made to implant a fragment of a cat bone and a human bone into a dog’s body. The overgrowth of implants with newly created bone tissue was considered a great success; therefore, research on xenografts, allografts and autografts intensified. Xenografts involve transplanting an organ, tissue or cells to an individual of another species. An allograft is a bone or tissue that is transplanted from one person to another. [3]. Today, due to the absence of autoimmune reactions, high osteoinduction (the ability to induce the osteogenesis process) and osteoconductivity (the bone growth), the “gold standard” is the autologous graft (transplant comprised of an individual’s own tissue). However, it should be emphasized that its use is highly limited [3–7]. Allografts and xenografts are not only associated with the risk of autoimmune reaction and consequently rejection of the implant, they are also unable to meet the demands of the treatment of bone tissue defects. Artificial bone substitutes have become a solution to these restrictions. The great advantages of these materials are their unlimited production and control of their physicochemical and biological properties [4].

A variety of implant materials are used in bone restorative surgery, both biodegradable and non-degradable. These materials can be a permanent filling or a tissue connector. The primary requirements for biomaterials used as implants are: non-toxicity, durability, biocompatibility (blood

compatibility), resistance to platelet and thrombus deposition and being non-irritating to tissue. Moreover, they should be chemically stable and bio-inert. The most commonly used materials are metallic, ceramic and polymer materials [8,9]. Unfortunately, none of these materials meet all the requirements for implant biomaterials. Metals are often too stiff relative to bone tissue and unfavorably corrode in the body. Ceramic materials, despite their high biocompatibility and bioactivity, are characterized by poor strength and high fragility, and cannot be used in places subject to high stress. Polymers are often characterized by over-flexibility and low strength in relation to mineralized bone tissue. To maintain appropriate mechanical properties, a variety of composite materials are created, usually containing a polymer phase (providing flexibility) and a ceramic phase (providing hardness and strength) [9,10].

It is worth emphasizing that in creating synthetic bone substitutes, the key requirements for a good scaffold are the biocompatibility of the material, its osteoconductivity and its osteoinduction [11]. The way to achieve the appropriate biological, physicochemical and mechanical parameters is to create biomimetic materials, inspired by the chemical composition and the micro and ultra-structure of bone tissue [11,12]. Collagen–hydroxyapatite (HA/Col) composites are this type of material. Type I collagen and calcium phosphate in the form of apatite are the main components of bone and can be used in the production of bone tissue replacements. Research shows that such biomaterials have good biological and mechanical properties [13,14]. HA/Col composites can serve not only as a scaffold for newly formed bone, but also as a carrier of drugs, delivering them directly to the bone [15]. What is more, the development of 3D printing techniques makes it possible to create implants for the patient’s individual needs (printing scaffolds with a specific shape and porosity) [16,17].

In the present paper the state of knowledge about HA/Col composites was studied. The work is both a review of the basic methods of obtaining these biomaterials and the state of knowledge about biological properties (in vitro and *in vivo*). This review focuses on composites containing hydroxyapatite and collagen (bone tissue components). Further work is planned to summarize the current literature on HA/Col composites with the addition of other synthetic components.

2. Bone Tissue

Bone tissue is a diverse form of connective tissue with high metabolic activity, heterogeneous and dynamic structure and high mechanical strength [18,19]. It is made of extracellular substances and bone cells: osteoblasts, osteoclasts, osteocytes and osteogenic cells. Bone tissue co-creates the locomotor system, protects internal organs and bone marrow and stores mineral salts (99% calcium, 88% phosphorus, 50% magnesium and 35% sodium are located in bone tissue) [19]. Adaptation of bone structure to perform such important functions includes a number of organizational levels. These include: the molecular structure and distribution of crystals and organic components (nanoscale); the structure of bone plates; the structure and arrangement of spongy bone tissue and osteons of compact bone tissue; and macroscopic structure (macroscale) (Figure 1) [20,21].

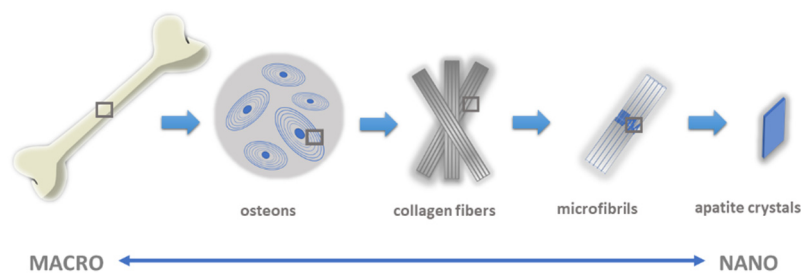


Figure 1. The multi-scale structure of natural bone.

The bone has a hierarchical structure: from the level of the whole tissue, i.e., the occurrence of various types of long and short bones, flat or tubular, to the level of the tissues which are arranged in

cortical and spongy structures, through to the microscopic level (images of cells, matrices and minerals) to the level of nanometers from single bone apatite crystals and collagen fibers [20,22].

The osteon is the main structural and functional unit of compact bone. Its structure is made of 6–15 cylindrical bone plates arranged concentrically around the central channel (Haversian canal). The interior of the canal is filled with individual osteogenic cells, osteoblasts and osteoclasts. The diameter of the channels is 20–100 μm . Bone plates are made of parallel fibers, mainly built with collagen type I mineralized with nanocrystalline multisubstituted carbonate hydroxyapatite (so-called bone apatite). Bone tissue also includes other non-collagen proteins and water. In general, apatite ensures bone hardness, while the organic fraction forms the scaffold for the biomineral and regulates the biomineralization process [21].

Bone apatite, i.e., biological apatite, is a mineral with a specific chemical composition that determines the biological, physicochemical and mechanical properties of the entire tissue. It is a nanocrystalline carbonate hydroxyapatite, additionally containing a variety of different ions (e.g., Mg^{2+} , K^+ , Na^+ , Mn^{2+} , HPO_4^{2-} and SiO_4^{4-}) [23–26]. The organic fraction of bone tissue is mainly made up of type I collagen [27]. The latter consists of three polypeptide chains entwined to form a triple helix. This structure is a so-called superhelix, with the occurrence of characteristic fragments containing repeating sequences: Gly–Pro–Hyp. Five triple helices assemble with each other, creating a microfibril. The microfibrils then organize into fibrils, forming compact fibers with diameters of about 100–200 nm. Collagen fibers also crosslink via lysine residues. The ordered fibrillar system is stabilized by other non-collagen proteins [27]. In the free spaces of collagen fibers, apatite crystals with a width of 15–30 nm, a length of 30–50 nm and a thickness of 2–10 nm are settled. They are composed of a crystalline core and a hydrated surface layer. The hydrated surface layer is about 1–2 nm thick and contains various ions. Recent studies show that the components of the hydrated surface layer are responsible for apatite reactivity, adsorption properties and the process of crystal maturation and growth. It is noteworthy that this is also the border region between crystalline apatite and the organic matrix of bones [28–31]. The small sizes of the crystals and the presence of such ions as CO_3^{2-} , Na^+ and Mg^{2+} (in amounts of approximately 4–6%, 0.9% and 0.5%, respectively) means that particles of natural hydroxyapatite are easily absorbed [32].

Among non-collagen proteins of extracellular bone tissue (constituting about 5% of the organic matrix and synthesized by osteoblasts or other cells, or reaching bone tissue with blood), we distinguish proteoglycans (mainly chondroitin sulphate), which can affect the formation, thickness and orientation of collagen fibers, and are also for the binding of hydroxyapatite, osteonectin and osteocalcin, and fixing proteins such as fibronectin, osteopontin and bone sialoprotein (BSP) [18,19].

In addition to the organic matrix (approximately 20–30% by weight) and the mineral fraction (representing 60–70% of bone mass and consisting primarily of nanocrystalline apatite), the third equally important component of bone tissue is water. It constitutes about 10% of bone mass. It facilitates fluid transport, contributes to elastic properties and plays a key role in the mineralization process. Water is on the surface of mineral crystals, inside the crystals and between collagen fibers. Most of the water is located in the pore spaces (so-called associated water), whose content decreases with bone age. Apart from water associated with bone tissue, there is also bound water, located in the organic matrix; i.e., in type I collagen fibers and in bone mineral.

It is also worth noting that bone tissue is a dynamic structure whose composition is not constant. The content of water in bone tissue is also variable. This can affect the properties of collagen (its elasticity); the coherence of the connections of bone composite components; and the ion exchange and balance between bone formation and bone resorption. This is why the formation of new biomimetic HA/Col biocomposites which imitate biological bone tissue is so important [23,27].

3. Synthesis of Collagen–Apatite Composites

When producing HA/Col composites, one should aim to produce a material that closely resembles the chemical composition, micro and macro-structure and porosity of the natural composite, i.e.,

bone tissue. Thanks to these biomimetic properties, materials with high compatibility as well as osteoinduction and osteoconductivity can be obtained [4,33]. There are several methods for obtaining HA/Col composites [34].

Among them, the most basic method is the simple mixing of previously obtained apatite powder with a collagen solution. Apatite can be synthesized in many ways. There are many reviews on the preparation and properties of hydroxyapatite and hydroxyapatite enriched with various ions [35–38]. Usually, wet methods are used, which involve the precipitation of calcium phosphate from appropriate reagents (e.g., calcium nitrate and ammonium phosphate, as sources of calcium and phosphorus, respectively) added in the appropriate ratio (Ca/P molar ratio = 1.67) and at the appropriate pH (usually $\text{pH} > 8$). The precipitate, after an appropriate aging time, is subjected to filtration, drying and heating at a suitable temperature. It is worth noting that the concentrations of reagents, temperature, pH and aging time influence the size of the crystals obtained and their morphology [35,36].

Type I collagen is often used to make composite materials (this is the organic matrix of bone tissue). Collagen can be obtained from pig skin, bovine or horse tendons, rat tails, etc. [39]. In some works, atelo-collagen was used, which was obtained after the enzymatic treatment of collagen and removal of telopeptides (to minimize antigenicity) [40,41]. Atelo-collagen is often more soluble and forms a collagen solution, whereas type I collagen forms a suspension. It is also worth mentioning that collagen used as an individual material does not have osteoinductive properties, but acquires them in combination with calcium phosphate (apatite) [3,4]. After mixing the gel/collagen solution with apatite powder, a suspension is formed, which is then subjected to drying at a critical point, or lyophilization. Of course, many authors have applied modifications of this method [42–55].

An interesting comparison of two methods for the preparation of HA/Col composites was presented by Cuniffe et al. [42]. In the first method, nanohydroxyapatite particles were added to the collagen suspension (slurry-suspension method) and then lyophilized, while in the second method, the lyophilized collagen in the form of a porous scaffold was soaked in nHA suspension and then lyophilized (immersion method). In both cases, composite scaffolds with highly porous, interconnected structures were obtained. It was found that the suspension method was more repeatable and easier to perform. In a paper by Uskoković et al. [43], hydroxyapatite was obtained by the reaction of ammonium phosphate and calcium nitrate and then calcinated at $1100\text{ }^{\circ}\text{C}$ during 6 h. The hydroxyapatite was mixed with type II collagen in a mortar and then pressed into pellets at room temperature and $60\text{ }^{\circ}\text{C}$. The resultant composite material was subjected to physicochemical analysis. SEM analysis showed that the material pressed at a higher temperature is characterized by more intimate contact between collagen type I and apatite phases.

In a paper by Cholas et al. [44], hydroxyapatite microspheres obtained by spray drying were used to produce the HA/Col hybrid composite. The paper suggests the possibility of using such a composite as a carrier for a drug substance that would be placed in the mesoporous structure of the microspheric HA (Figure 2).

Since 3D porous materials are characterized by a spongy structure, an interesting solution was proposed by Teng et al. [45]. Type I collagen dissolved in 1,1,1,3,3,3-hexafluoro-2-propanol (HFP) was added to the aqueous suspension of hydroxyapatite. Titanium discs after previous cleaning were coated with a homogeneous mass of a composite in a spinner, followed by drying the coated Ti substrates in a desiccator under vacuum overnight. Subsequently, the coatings were chemically cross-linked in two solutions: N-(3-dimethylaminopropyl)-N0-ethylcarbodiimide (EDC) hydrochloride and N-hydroxysuccinimide (NHS). The composite coatings obtained were characterized by high homogeneity, while the sample containing 20% hydroxyapatite turned out to be the most hydrophilic.

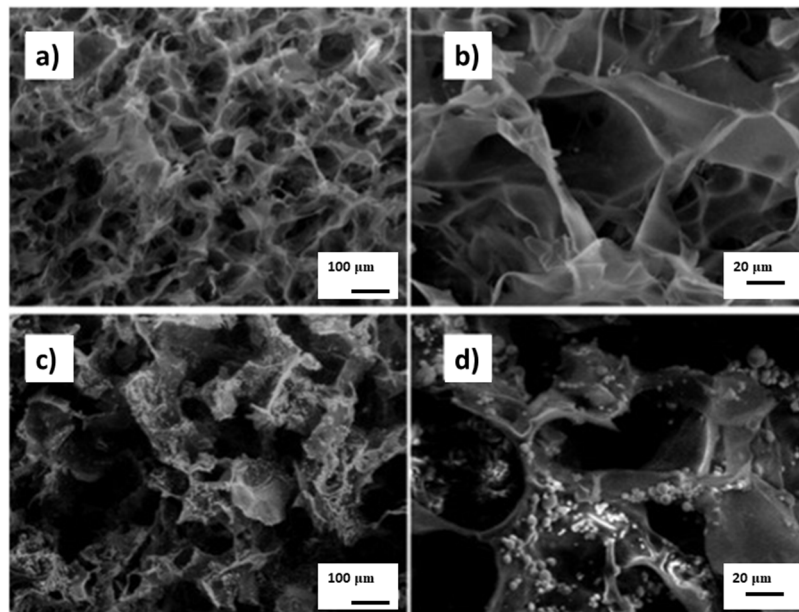


Figure 2. SEM of scaffolds. (a,b) Pure collagen. (c,d) Col/mHA (collagen/hydroxyapatite-microsphere). Scale bars: 100 μm (a,c), 20 μm (b,d). Reprinted from [44] with permission from Elsevier.

Tampieri et al. obtained (HA/Col) composites by two methods. In the first, a collagen suspension was mixed with hydroxyapatite previously obtained by precipitation from $\text{Ca}(\text{OH})_2$ solution with H_3PO_4 solution [46]. In the second method, the precipitation of hydroxyapatite from the reagents used in method I was carried out in the presence of collagen. From the results, it can be concluded that the method based on the direct precipitation of apatite in collagen solution is best. The resultant material has much greater similarity to bone tissue, and the collagen fibers are in close connection with apatite crystals. The material obtained by simply mixing the components is characterized by properties similar to those of collagen. In addition, it is worth noting that according to the SEM results, the composite obtained by the standard method (simple mixing hydroxyapatite with collagen) has a less homogeneous structure with apatite crystals distributed unevenly on the surface of collagen fibers.

The method with the precipitation of hydroxyapatite in the presence of collagen has been repeated by many researchers [30,56–60].

An interesting modification was developed by Yunoki et al. [56]. Synthesized under standard conditions (phosphoric acid and $\text{Ca}(\text{OH})_2$ as reagents for HA and atelo-collagen type I mixed together at pH 8–9 and temperature around 40 $^\circ\text{C}$), self-organized nanocomposite HA/Col (after initial lyophilization) was placed in distilled water or in PBS buffer (standard PBS, pH = 7,4) and then re-frozen and placed under vacuum at 140 $^\circ\text{C}$. In the presence of PBS, more effective crosslinking of collagen fibers occurred and porous composites with very good mechanical properties were obtained. According to Krishnakumar et al. [57], ribose can be used to successfully crosslink the HA/Col composite structure (Figure 3). In this work, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ was used as a source of magnesium ions introduced into the structure of synthesized apatite in order to obtain a highly compatible material with bone tissue. In research by Calabrese et al. [58], magnesium ions were also used in the production of the composite, but crosslinking was carried out using bis-epoxy (1,4-butanediol diglycidyl ether, BDDGE). Glutaraldehyde was another reagent that was used to crosslink the obtained hybrid composites [30,49].

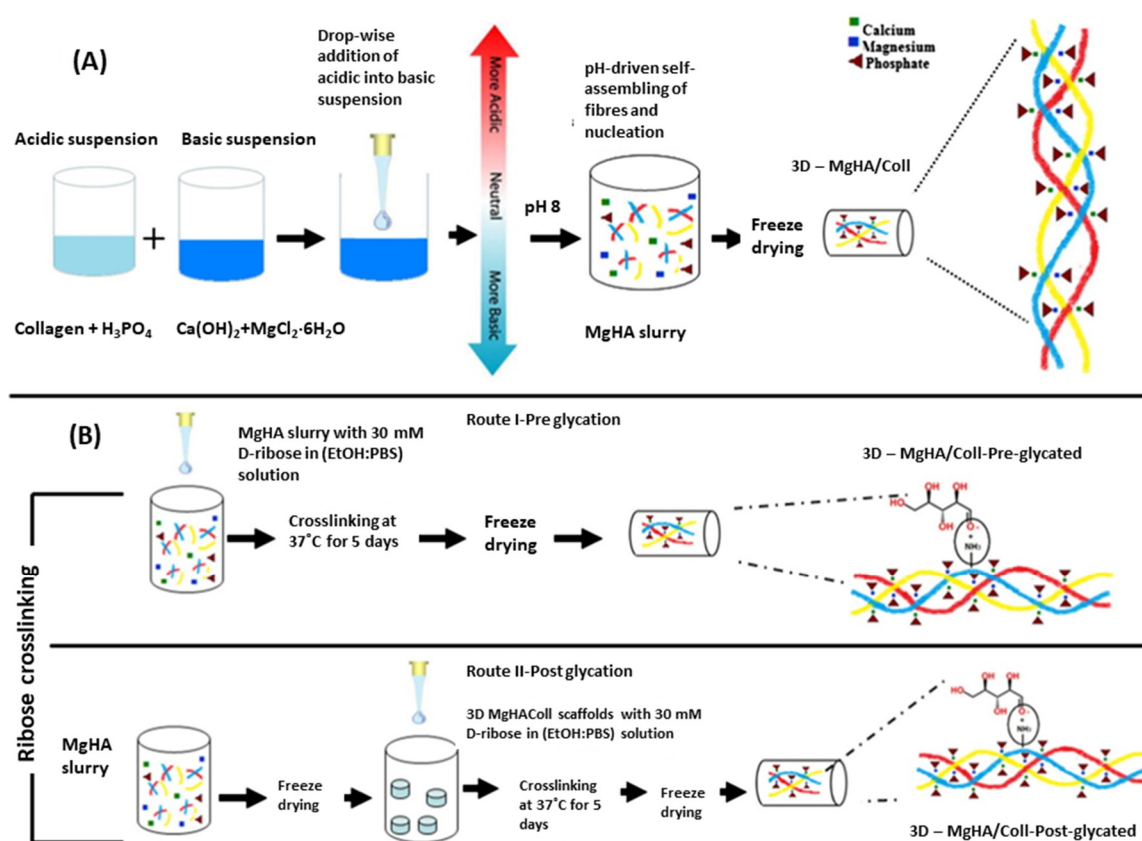


Figure 3. Detailed schematic illustration of the MgHA/Coll (type I collagen matrix with magnesium-doped-hydroxyapatite nanophase) hybrid scaffold's development: (A) pH-driven, bioinspired biomineralization process; (B) MgHA/Coll crosslinking with ribose scaffolds in pre and post-glycation processes. Reprinted from [57] with permission from Elsevier.

A completely different approach to creating a composite 3D structure was presented by Zhou et al. [59]. To improve the mechanical properties of the composite, a porous ceramic matrix of hydroxyapatite and beta-tricalcium phosphate (beta-TCP) was first formed. Then the ceramic 3D material was soaked in a collagen and SBF suspension at pH 4–6 and then completely immersed in a collagen solution and closed under high pressure. A vacuum infusion was carried out at a pressure of 10 Pa and held for 2 h to allow complete saturation of the samples. The scaffolds were freeze-dried and then crosslinked with glutaraldehyde.

4. Biological Properties of Apatite–Collagen Composites

Of course, a key aspect of research on HA/Col composites is obtaining information on their biological properties and the potential uses of the resulting biomaterials. Recently, there have been more studies on this topic. Preclinical and clinical studies using various *in vitro* and *in vivo* models provide important information on bone tissue regenerative properties; bioresorbability; and the impacts of the elasticity and porosity of such bone substitutes in their micro and macro-environments.

4.1. Osteoconductivity, Osseointegration, Bioactivity and Biocompatibility

There are many studies confirming the ability of HA/Col composites to stimulate the formation of new bone tissue. In all biological tests for the production of HA/Col composites, type I collagen (atelo-collagen extracted from porcine dermis or bovine tendon) was used. In one study, Fukui et al. implanted composites consisting of nano-HA and collagen into the mandibles of rabbits [61]. Collagen sponge and collagen sponge/calcined hydroxyapatite composite were used as controls. Calcined HA was prepared by heating nano-HA at 900 °C for one hour. Histological examination

showed a greater amount of newly formed bone tissue in the nano-HA/Col composite environment than in controls, and faster implant replacement with host bone tissue, which also confirms the high bioresorbability of the material.

The purpose of the research by Kikuchi et al. [40], was to synthesize a composite material (based on hydroxyapatite and collagen) as similar as possible to bone tissue and to use it for testing on dog tibia bones. In the synthesis of composites, the optimal pH and temperature were selected to improve the mechanism of collagen fiber organization. The composite was introduced in place of a 20 mm defect. Bone condition was observed using X-ray techniques for 12 weeks. In the place of the composite, the newly formed bone tissue gradually penetrated, and the defect was completely filled after 8 weeks. After 12 weeks, the bone and the composite were removed and the material was observed with a microscope (Figure 4). Two types of cells near the composite were observed—osteoblasts and osteoclasts. The composite was included in the bone remodeling process, which so far has mainly been observed for autografts. Such high bioactivity of the material may be the result of high similarity to bone tissue. The composite can be recognized as bone by the surrounding cells. Nishikawa conducted research on a similar group (dog tibia bones) [62]. The stimulating effect of such composites on the synthesis of new bone tissue has been proven. It is concluded from the results of the study that HA/Col may be a source of calcium ions that are incorporated into the newly formed bone tissue.

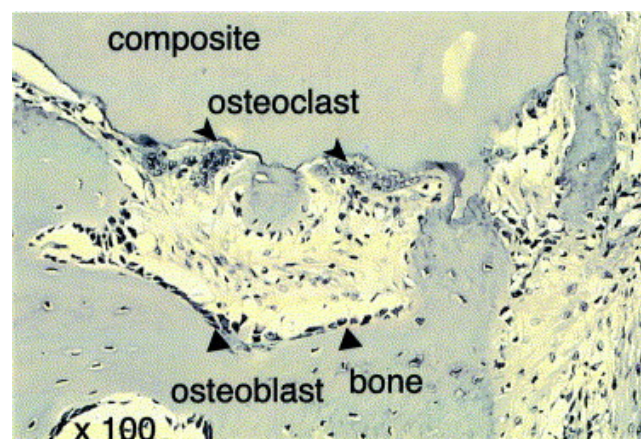


Figure 4. HE-stained histological section ($\times 100$) of HAp/Col composite implanted into a beagle's tibia for 12 weeks. Triangles indicate elongated cells, and arrowheads multinucleated giant cells. Reprinted from [40] with permission from Elsevier.

An important property when describing the biological functions of HA/Col composites, is their ability to support migration of cells from surrounding tissues. Yoshida et al. studied the adhesion, proliferation and osteogenic response of MG63 cells using 3D sponges, high porosity HA/Col and as a control, collagen sponge [63]. The cells with sponge were examined by histology, total DNA content and gene expression. The results suggest that materials based on hydroxyapatite and collagen have good osteogenic properties and can successfully serve as scaffolds in bone tissue reconstruction. The total DNA content in the HA/Col sponge was 1.8 times higher than in the control sample, and the osteogenic cells showed good and even adhesion over the entire surface of the sponge. HA/Col composites create a space that facilitates precursor cell migration, proliferation and differentiation. The results were confirmed by another study using a HA/Col membrane [64]. Similarly, bone marrow cells were cultured together with osteoblasts on the HA/Col composite and differentiation to osteoclasts was observed without the addition of other factors. That distinguishes this material from pure HA or TCP [65]. Wu et al. prepared the HA/Col composite in the form of microspheres, and with this model also proved that osteoblasts are capable of proliferation, differentiation and mineralization in the matrix of microspheres (Figure 5) [47].

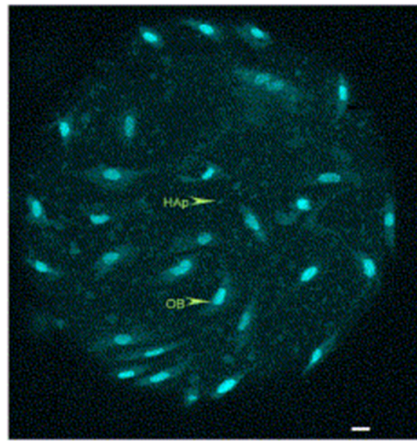


Figure 5. Confocal microscopy of osteoblast cells cultured on microsphere staining with DNA dye YOYO-1 (HAp: hydroxyapatite, OB: osteoblast; 4 days after seeding). Reprinted from [47] with permission from Elsevier.

Calabrese et al. implanted HA/Col composites in mice. Hydroxyapatite was additionally enriched with magnesium ions [58]. The results indicate the ability of this material to recruit host cells and promote ectopic bone growth *in vivo*. Correct angiogenesis was also confirmed by FMT analysis. The authors emphasize that the materials are characterized by a high degree of safety, due to the lack of the addition of growth factors or cells subjected to *in vitro* manipulation, and they can be a safe and promising solution in the treatment of bone diseases [66].

There is a special, commercially available bone substitute biomaterial (Biostat) with the composition: hydroxyapatite, collagen and chondroitin sulphate. In a clinical trial, two groups were followed: group A—filling the defect with Biostat; group B—no defect fill [67]. After 4–6 months, the group treated with Biostat implants showed a higher percentage of new bone tissue coverage (67%) compared to group B (34%). Another study confirms that Biostat material affects bone tissue reconstruction [68].

Materials with the best biocompatibility are still being sought. Certainly, the greater the similarity to physiological bone tissue, the more likely it is that tissue compatibility will be achieved. It is presumed that the carbonate content of apatite affects the formation of new bone tissue by affecting the solubility and crystallinity of apatite [69]. Biological apatite contains about 4–6 wt% of carbonates [24]. Matssura et al. proved that among the HA/Col composites with different carbonate contents, the one with the content of 4.8% could be distinguished from the others [48]. Composites containing this apatite had the greatest ability to form new bone tissue after implantation in the femurs of rabbits. This was observed on the X-rays and examined using histology. It was also concluded that bone metabolism is strongly associated with the physicochemical properties of apatites, especially with the carbonate content.

Mazzoni et al. assessed the biocompatibility, osteoconductive and osteoinductive properties of HA (Pro Osteon 200) and collagen (Avitene) composites using a cell model—mesenchymal stem cells (hMSC) [70]. Expression of osteogenic genes was analyzed in cells located on the composite. The results showed that such biomaterial has the ability to induce osteogenic differentiation of hMSC, because it induces osteogenic genes and increases matrix mineralization without toxic effects. Other studies also conducted on the cell line have confirmed that the HA/Col composite has osteoinductive properties and is a good tool to accelerate the migration, proliferation and differentiation of bone tissue cells [71]. The above material was also used in maxillofacial surgery as a kind of scaffolding for the zygomatic bone. The high biocompatibility and the osteoconductive properties of the composite have been confirmed and the low number of postoperative infections has been noted [72].

Initial tests have been carried out to check the bone density change after using various defect replacement materials. One study used computer tomography (CT) to evaluate extraction site

dimensions and density changes after a tooth extraction. Different graft materials were tested [73]. Patients were divided into three groups. The first group was treated with a demineralized bone matrix with the addition of collagen membrane and the second with hydroxyapatite with the addition of collagen membrane; in the third group the extraction site remained empty. A CT scan was performed 10 and 120 days after surgery. It was shown that the use of HA/Col gives the highest bone density in CT compared to the use of demineralized bone matrix and group III. However, no changes in vertical socket dimension were observed. Still, the authors of the study say that HA and collagen-based material could be recommended to improve bone quality and could prepare the extraction site properly for proper implant placement.

Clinical studies have also compared HA/Col and β -TCP as implants in patients after a history of bone cancer or fractures [74]. The effectiveness of the materials was evaluated by using X-rays to assess bone regeneration. This study proved the superiority of porous HA/Col over β -TCP by presenting the results of bone regeneration and implant resorption (Figure 6). In contrast to β -TCP, the material containing collagen adapted to the shape of the bone defect, leaving no gaps or free spaces, and connected continuously with the bone. There were more side effects for HA/Col than for β -TCP, but they were not serious.

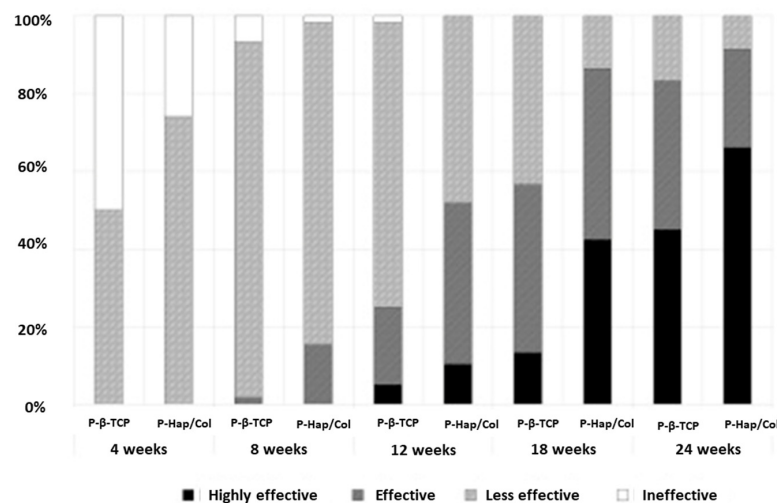


Figure 6. Results of X-ray evaluation. The scores improved over time during the follow-up period in both groups. At each time point, the score in the HAp/Col group was higher than that in the β -TCP group. Reprinted from [74] with permission from Elsevier.

4.2. Bioresorbability of Composites

Biodegradation or bioresorbability are very desirable processes when designing implant biomaterials. Due to such properties, the implanted material quickly disappears and is replaced by newly forming host bone tissue. Biodegradation has been studied using composite membrane carbonate apatite–collagen, in vivo and in vitro [75]. With the in vitro method, the membranes were immersed in collagenase solution and the degradation time of the composite was analyzed. The results showed a gradual increase in the concentration of calcium ions, which is related to and dependent on the dissolution of the collagen membrane. The membrane was also implanted in rat bone tissue and histological changes were analyzed. Studies have shown good membrane biocompatibility and the biodegradation time has been reduced due to the presence of carbonate apatite. The biodegradation time can therefore be controlled by the carbonate apatite contained in the membrane.

Another study compared the properties of pure hydroxyapatite with a carbonate apatite–collagen composite [76]. Rabbit tibia bone fragments were removed and appropriate materials were implanted. Composites gradually degraded, and the newly formed bone filled the defect within 6 weeks, while

the implanted hydroxyapatite was not replaced by bone tissue. There are also other animal studies that confirm the successful osseointegration of HA/Col materials [61,77].

4.3. Porosity and Biological Properties

The porosity of HA/Col composites also has a significant impact on biological properties. This was tested on an animal model by implanting porous scaffolds into the tibias of rabbits. Implants with higher porosity were characterized by faster formation of new bone tissue and its penetration into composite structures. The porous structure ensures better osteoconductivity. It allows better cell migration and facilitates the formation of blood vessels that ensure the proper nutrition of newly formed bone tissue [78–80]. Porous composites in contact with water become elastic. This property means that they are easy to use in surgery and adapt to the difficult shapes of cavities. However, it is believed that these materials are less mechanically strong due to their porous structures. In the study using HA/Col and TCP, the above materials were implanted in the tibia bones of rabbits to test their biomechanical properties. It was found that although the HA/Col composite is less mechanically durable than TCP, after implantation in the place of defect it showed greater mechanical strength in a given place than the TCP material [81].

Despite the fact that high porosity reduces its mechanical strength, sponge-like elasticity provides easy “handling” during surgery [82]. After wetting, HA/Col porous composites become elastic, like a sponge, and are easily implanted in bone defects [78,83]. From a surgical point of view, the addition of collagen to hydroxyapatite provides many beneficial features during surgery: ease of fitting to the defect site (blocks can be cut), easy adaptation to the defect morphology, the ability to stick material to the transplant site and the ability to promote clot formation and stabilization thanks to the hemostatic properties of collagen [63,79].

4.4. Anticancer Properties

There have been reports of the effect of mineralization of collagen fibrils in bone tissue on the adhesion of cancer cells [84–86]. These studies are looking for the cause of bone metastases. One approach was to investigate the effect of extracellular matrix bone on metastasis. A study by Siyoung Choi et al. [87] demonstrated that the physiological mineralization of collagen fibrils reduces tumor cell adhesion with potential functional consequences for skeletal colonization of disseminated cancer cells in the early stages of breast cancer metastasis. Too little of the mineral part of the matrix may be associated with an increased risk of bone metastases. The study compared collagen-mineralized fibers and non-mineralized collagen for regulating the adhesion of metastatic breast cancer cells. Endothelial collagen mineralization can change the response of cancer cells first through integrin-mediated mechanotransduction.

5. New Trends

In bone diseases, pharmacotherapy is often used in addition to surgical treatment. It is usually associated with serious side effects, and due to weak bone vascularization, therapeutic drug concentration is not achieved [88]. For this reason, composite materials began to be used as drug delivery systems to achieve greater therapeutic effects. There are studies which describe the introduction of anti-resorptive drugs, anti-cancer drugs, antibiotics, proteins or genes [89–95]. It is worth mentioning that infections occurring in the implant area are a major problem in orthopedic surgery. These infections can lead to disabling or even life-threatening complications. In this situation, the introduction of antibiotics directly to the place of therapeutic effect seems a good solution. Simultaneously, bone defects are treated and infection is prevented. There are reports in the literature of the use of various materials to deliver these medicinal substances to bone tissue. The porous HA/polymer structure appears to be a suitable matrix for delivering antibiotics directly to the bone [96]. These composites have been found to be highly biocompatible and also prolong the release of the substance. As a result, such a composite was recognized as an effective carrier of antibiotics to control bone tissue infections,

while supporting bone regeneration [89,90]. Due to the types of infection found in bone tissue, the most commonly selected and tested antibiotics in combination with the composite are gentamicin and vancomycin [91,94,97].

Currently, intensive work is underway on the possibility of 3D printing composite materials. This technique involves the design of customized structures and enables effective filling of bone defects [98]. Additive manufacturing (AM) is another rapidly growing area, which includes 3D printing using computer technology (CAD). It enables the design of 3D structure composites at the micro and nano-scale, layer by layer, matching the size and number of pores, plus the shape to fit the implant to the bone defect [17,99]. For example, in [98], the 3D-printing and additive manufacturing technique was used to develop new poly-lactic scaffolds coated with Col/HA composite to give them biomimetic properties (Figure 7). Coatings were additionally enriched in an antibiotic, minocycline, to provide antibacterial protection. As a result, material with a high biocompatibility and good antibiotic release parameters was obtained. The literature reports that the best 3D printing method is the low-temperature additive manufacturing method (LTAM). The most advantageous crosslinking process for hybrid materials was taken into account, as was the possibility of introducing various bioactive molecules without destroying their structures. According to current knowledge, 3D printing seems to provide better material porosity and better control over this parameter. Comparing 3D printed materials with non-printed materials, the former was more conducive to the proliferation of bone marrow stromal cells and improved osteogenic results in vitro [100,101].

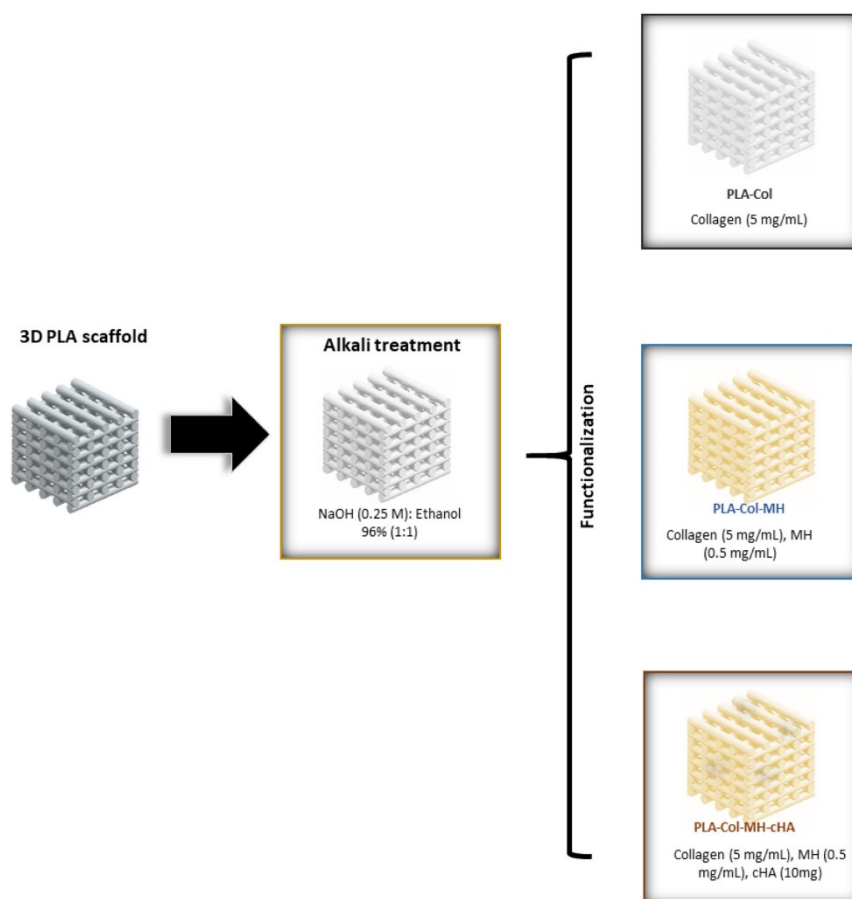


Figure 7. Schematic diagram of the experimental procedure for the multifunctionalization of the scaffolds after 3D-printing by using a simple coating process (PLA: polylactide; MH: minocycline hydrochloride; cHA: citrate-hydroxyapatite nanoparticles). Reprinted from [98] with permission from Elsevier.

6. Conclusions

Creating biomimetic implant materials is one of the challenges faced by modern chemistry and material engineering. Biologically inspired HA/Col composites seem very promising materials to replace autologous bone grafts. Analyzing their chemical, physicochemical, mechanical and biological properties, we observe that by modifying the methods of obtaining composites, and the composition of hydroxyapatite, the greatest similarity to physiological bone tissue is achieved. Among other composite materials used in orthopedic surgery, HA/Col composites are distinguished by good strength and flexibility, and above all else, high biocompatibility, bioactivity, osteoconductivity and bioresorbability. A review of previous studies, as well as visible new trends (3D printing, addition of medicinal substances) and a steady increase in interest in this topic, confirm that HA/Col composites have great potential in the treatment of bone defects and diseases.

Author Contributions: Surveyed the literature, prepared the original draft: B.K.; co-authored the review: A.K.; conceived the idea, managed the scope, organized the sections, co-authored and reviewed the manuscript: J.K. All authors discussed the results and commented on the manuscript. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research received no external funding.

Acknowledgments: This work was supported by Medical University of Warsaw (FW23/N/2019).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Wang, W.; Yeung, K.W. Bone grafts and biomaterials substitutes for bone defect repair: A review. *Bioact. Mater.* **2017**, *2*, 224–247.
2. Winkler, T.; Sass, F.A.; Duda, G.N.; Schmidt-Bleek, K. A review of biomaterials in bone defect healing, remaining shortcomings and future opportunities for bone tissue engineering: The unsolved challenge. *Bone Jt. Res.* **2018**, *7*, 232–243.
3. Fikai, A.; Andronescu, E.; Voicu, G.; Fikai, D. Advances in collagen-hydroxyapatite composite materials. In *Advances in Composite Materials for Medicine and Nanotechnology*; Attaf, B., Ed.; Intech: Rijeka, Croatia, 2011; pp. 3–32.
4. Wahl, D.A.; Czernuszka, J.T. Collagen-hydroxyapatite composites for hard tissue repair. *Eur. Cells Mater.* **2006**, *11*, 43–56.
5. Khoueir, P.; Oh, B.C.; DiRisio, D.J.; Wang, M.Y. Multilevel anterior cervical fusion using a collagen-hydroxyapatite matrix with iliac crest bone marrow aspirate: An 18-month follow-up study. *Neurosurgery* **2007**, *61*, 963–971.
6. Myeroff, C.; Archdeacon, M. Autogenous bone graft: Donor sites and techniques. *JBJS* **2011**, *93*, 2227–2236.
7. Ebraheim, N.A.; Elgafy, H.; Xu, R. Bone-graft harvesting from iliac and fibular donor sites: Techniques and complications. *JAAOS-J. Am. Acad. Orthop. Surg.* **2001**, *9*, 210–218.
8. Thirivikraman, G.; Athirasala, A.; Twohig, C.; Boda, S.K.; Bertassoni, L.E. Biomaterials for craniofacial bone regeneration. *Dent. Clin. N. Am.* **2017**, *61*, 835–856.
9. Campana, V.; Milano, G.; Pagano, E.; Barba, M.; Cicione, C.; Salonna, G.; Lattanzi, W.; Logroscino, G. Bone substitutes in orthopaedic surgery: From basic science to clinical practice. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2014**, *25*, 2445–2461.
10. De Grado, G.F.; 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*, 1–18.
11. Fratzl, P.; Gupta, H.S.; Paschalis, E.P.; Roschger, P. Structure and mechanical quality of the collagen–mineral nano-composite in bone. *J. Mater. Chem.* **2004**, *14*, 2115–2123.
12. Sailaja, G.S.; Ramesh, P.; Vellappally, S.; Anil, S.; Varma, H.K. Biomimetic approaches with smart interfaces for bone regeneration. *J. Biomed. Sci.* **2016**, *23*, 1–13. [[CrossRef](#)]
13. Zhang, D.; Wu, X.; Chen, J.; Lin, K. The development of collagen based composite scaffolds for bone regeneration. *Bioact. Mater.* **2018**, *3*, 129–138. [[CrossRef](#)]

14. Wang, M. Developing bioactive composite materials for tissue replacement. *Biomaterials* **2003**, *24*, 2133–2151. [[CrossRef](#)]
15. Holzapfel, B.M.; Reichert, J.C.; Schantz, J.-T.; Gbureck, U.; Rackwitz, L.; Nöth, U.; Jakob, F.; Rudert, M.; Groll, J.; Hutmacher, D.W. How smart do biomaterials need to be? a translational science and clinical point of view. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **2013**, *65*, 581–603. [[CrossRef](#)]
16. Li, Q.; Lei, X.; Wang, X.; Cai, Z.; Lyu, P.; Zhang, G. Hydroxyapatite/collagen three-dimensional printed scaffolds and their osteogenic effects on human bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Eng. Part A* **2019**, *25*, 1261–1271. [[CrossRef](#)]
17. Marques, C.F.; Diogo, G.S.; Pina, S.; Oliveira, J.M.; Silva, T.H.; Reis, R.L. Collagen-based bioinks for hard tissue engineering applications: A comprehensive review. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2019**, *30*, 32. [[CrossRef](#)]
18. Weiner, S.; Wagner, H.D. The material bone: Structure-mechanical function relations. *Annu. Rev. Mater. Sci.* **1998**, *28*, 271–298. [[CrossRef](#)]
19. Olszta, M.J.; Cheng, X.; Jee, S.S.; Kumar, R.; Kim, Y.-Y.; Kaufman, M.J.; Douglas, E.P.; Gower, L.B. Bone structure and formation: A new perspective. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2007**, *58*, 77–116. [[CrossRef](#)]
20. Gao, C.; Peng, S.; Feng, P.; Shuai, C. Bone biomaterials and interactions with stem cells. *Bone Res.* **2017**, *5*, 1–33. [[CrossRef](#)]
21. Robles-Linares, J.A.; Ramírez-Cedillo, E.; Siller, H.R.; Rodríguez, C.A.; Martínez-López, J.I. Parametric modeling of biomimetic cortical bone microstructure for additive manufacturing. *Materials* **2019**, *12*, 913. [[CrossRef](#)]
22. Tertuliano, O.A.; Greer, J.R. The nanocomposite nature of bone drives its strength and damage resistance. *Nat. Mater.* **2016**, *15*, 1195–1202. [[CrossRef](#)]
23. Vallet-Regí, M.; Navarrete, D.A. *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*; Royal Society of Chemistry: London, UK, 2015; pp. 1–29.
24. Pasteris, J.D.; Wopenka, B.; Freeman, J.J.; Rogers, K.; Valsami-Jones, E.; Van Der Houwen, J.A.; Silva, M.J. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: Implications for bone and biomaterials. *Biomaterials* **2004**, *25*, 229–238. [[CrossRef](#)]
25. Kolmas, J.; Kołodziejcki, W. Concentration of hydroxyl groups in dental apatites: A solid-state ^1H MAS NMR study using inverse $^{31}\text{P} \rightarrow ^1\text{H}$ cross-polarization. *Chem. Commun.* **2007**, *42*, 4390–4392. [[CrossRef](#)]
26. Cho, G.; Wu, Y.; Ackerman, J.L. Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy. *Science* **2003**, *300*, 1123–1127. [[CrossRef](#)]
27. Viguet-Carrin, S.; Garnero, P.; Delmas, P.D. The role of collagen in bone strength. *Osteoporos. Int.* **2006**, *17*, 319–336. [[CrossRef](#)]
28. Duer, M.J. The contribution of solid-state NMR spectroscopy to understanding biomineralization: Atomic and molecular structure of bone. *J. Magn. Reson.* **2015**, *253*, 98–110. [[CrossRef](#)]
29. Stock, S.R. The mineral-collagen interface in bone. *Calcif. Tissue Int.* **2015**, *97*, 262–280. [[CrossRef](#)]
30. Fikai, A.; Andronescu, E.; Voicu, G.; Ghitulica, C.; Fikai, D. The influence of collagen support and ionic species on the morphology of collagen/hydroxyapatite composite materials. *Mater. Charact.* **2010**, *61*, 402–407. [[CrossRef](#)]
31. Kis, V.K.; Czigány, Z.; Dallos, Z.; Nagy, D.; Dódon, I. HRTEM study of individual bone apatite nanocrystals reveals symmetry reduction with respect to P63/m apatite. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *104*, 109966. [[CrossRef](#)]
32. Pina, S.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 1143–1169. [[CrossRef](#)]
33. Habibovic, P.; de Groot, K. Osteoinductive biomaterials—Properties and relevance in bone repair. *J. Tissue Eng. Regen. Med.* **2007**, *1*, 25–32. [[CrossRef](#)]
34. Liu, C. Collagen–hydroxyapatite composite scaffolds for tissue engineering. In *Hydroxyapatite (HAp) for Biomedical Applications*; Elsevier: Amsterdam, The Netherlands, 2015; pp. 211–234.
35. Szczeń, A.; Hołysz, L.; Chibowski, E. Synthesis of hydroxyapatite for biomedical applications. *Adv. Colloid Interface Sci.* **2017**, *249*, 321–330. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
36. Rodríguez-Lugo, V.; Karthik, T.V.K.; Mendoza-Anaya, D.; Rubio-Rosas, E.; Villaseñor Cerón, L.S.; Reyes-Valderrama, M.I.; Salinas-Rodríguez, E. Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: Effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties. *R. Soc. Open Sci.* **2018**, *5*, 1–14. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

37. Haider, A.; Haider, S.; Han, S.S.; Kang, I.K. Recent advances in the synthesis, functionalization and biomedical applications of hydroxyapatite: A review. *Rsc Adv.* **2017**, *7*, 7442–7458. [[CrossRef](#)]
38. Ferraz, M.P.; Monteiro, F.J.; Manuel, C.M. Hydroxyapatite nanoparticles: A review of preparation methodologies. *J. Appl. Biomater. Biomech.* **2004**, *2*, 74–80.
39. Cui, F.-Z.; Li, Y.; Ge, J. Self-assembly of mineralized collagen composites. *Mater. Sci. Eng. R Rep.* **2007**, *57*, 1–27. [[CrossRef](#)]
40. Kikuchi, M.; Itoh, S.; Ichinose, S.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Self-organization mechanism in a bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite synthesized in vitro and its biological reaction *in vivo*. *Biomaterials* **2001**, *22*, 1705–1711. [[CrossRef](#)]
41. Venugopal, J.; Prabhakaran, M.P.; Zhang, Y.; Low, S.; Choon, A.T.; Ramakrishna, S. Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering. *Philos. Trans. R. Soc. Math. Phys. Eng. Sci.* **2010**, *368*, 2065–2081. [[CrossRef](#)]
42. Cunniffe, G.M.; Dickson, G.R.; Partap, S.; Stanton, K.T.; O'Brien, F.J. Development and characterisation of a collagen nano-hydroxyapatite composite scaffold for bone tissue engineering. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 2293–2298. [[CrossRef](#)]
43. Uskokovića, V.; Ignjatovićb, N.; Petranovića, N. Synthesis and characterization of hydroxyapatite-collagen biocomposite materials. *Mater. Sci. Forum* **2003**, *413*, 269–270. [[CrossRef](#)]
44. Cholas, R.; Padmanabhan, S.K.; Gervaso, F.; Udayan, G.; Monaco, G.; Sannino, A.; Licciulli, A. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *63*, 499–505. [[CrossRef](#)]
45. Teng, S.-H.; Lee, E.-J.; Park, C.-S.; Choi, W.-Y.; Shin, D.-S.; Kim, H.-E. Bioactive nanocomposite coatings of collagen/hydroxyapatite on titanium substrates. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2008**, *19*, 2453–2461. [[CrossRef](#)]
46. Tampieri, A.; Celotti, G.; Landi, E.; Sandri, M.; Roveri, N.; Falini, G. Biologically inspired synthesis of bone-like composite: Self-assembled collagen fibers/hydroxyapatite nanocrystals. *J. Biomed. Mater. Res. A* **2003**, *67*, 618–625. [[CrossRef](#)]
47. Wu, T.-J.; Huang, H.-H.; Lan, C.-W.; Lin, C.-H.; Hsu, F.-Y.; Wang, Y.-J. Studies on the microspheres comprised of reconstituted collagen and hydroxyapatite. *Biomaterials* **2004**, *25*, 651–658. [[CrossRef](#)]
48. Matsuura, A.; Kubo, T.; Doi, K.; Hayashi, K.; Morita, K.; Yokota, R.; Hayashi, H.; Hirata, I.; Okazaki, M.; Akagawa, Y. Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents. *Dent. Mater. J.* **2009**, *28*, 234–242. [[CrossRef](#)]
49. Panda, N.N.; Jonnalagadda, S.; Pramanik, K. Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 2031–2044. [[CrossRef](#)]
50. Pek, Y.S.; Gao, S.; Arshad, M.M.; Leck, K.-J.; Ying, J.Y. Porous collagen-apatite nanocomposite foams as bone regeneration scaffolds. *Biomaterials* **2008**, *29*, 4300–4305. [[CrossRef](#)]
51. Sukhodub, L.F.; Moseke, C.; Sukhodub, L.B.; Sulkio-Cleff, B.; Maleev, V.Y.; Semenov, M.A.; Bereznyak, E.G.; Bolbukh, T.V. Collagen–hydroxyapatite–water interactions investigated by xrd, piezogravimetry, infrared and raman spectroscopy. *J. Mol. Struct.* **2004**, *704*, 53–58. [[CrossRef](#)]
52. Sionkowska, A.; Kozłowska, J. Characterization of collagen/hydroxyapatite composite sponges as a potential bone substitute. *Int. J. Biol. Macromol.* **2010**, *47*, 483–487. [[CrossRef](#)]
53. Chai, Y.; Okuda, M.; Otsuka, Y.; Ohnuma, K.; Tagaya, M. Comparison of two fabrication processes for biomimetic collagen/hydroxyapatite hybrids. *Adv. Powder Technol.* **2019**, *30*, 1419–1423. [[CrossRef](#)]
54. Zhang, Z.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Chen, F.; Zhou, Y.; An, Q. Dehydrothermally crosslinked collagen/hydroxyapatite composite for enhanced *in vivo* bone repair. *Colloids Surf. B Biointerfaces* **2018**, *163*, 394–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
55. Choi, J.-W.; Kim, J.-W.; Jo, I.-H.; Koh, Y.-H.; Kim, H.-E. Novel self-assembly-induced gelation for nanofibrous collagen/hydroxyapatite composite microspheres. *Materials* **2017**, *10*, 1110. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
56. Yunoki, S.; Ikoma, T.; Monkawa, A.; Marukawa, E.; Sotome, S.; Shinomiya, K.; Tanaka, J. Three-dimensional porous hydroxyapatite/collagen composite with rubber-like elasticity. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2007**, *18*, 393–409. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
57. Krishnakumar, G.S.; Gostynska, N.; Campodoni, E.; Dapporto, M.; Montesi, M.; Panseri, S.; Tampieri, A.; Kon, E.; Maccacci, M.; Sprio, S. Ribose mediated crosslinking of collagen-hydroxyapatite hybrid scaffolds for bone tissue regeneration using biomimetic strategies. *Mater. Sci. Eng. C* **2017**, *77*, 594–605. [[CrossRef](#)]

58. Calabrese, G.; Giuffrida, R.; Forte, S.; Salvatorelli, L.; Fabbi, C.; Figallo, E.; Gulisano, M.; Parenti, R.; Magro, G.; Colarossi, C. Bone augmentation after ectopic implantation of a cell-free collagen-hydroxyapatite scaffold in the mouse. *Sci. Rep.* **2016**, *6*, 36399. [[CrossRef](#)]
59. Zhou, C.; Ye, X.; Fan, Y.; Ma, L.; Tan, Y.; Qing, F.; Zhang, X. Biomimetic fabrication of a three-level hierarchical calcium phosphate/collagen/hydroxyapatite scaffold for bone tissue engineering. *Biofabrication* **2014**, *6*, 1–12. [[CrossRef](#)]
60. Fikai, A.; Andronescu, E.; Trandafir, V.; Ghitulica, C.; Voicu, G. Collagen/hydroxyapatite composite obtained by electric field orientation. *Mater. Lett.* **2010**, *64*, 541–544. [[CrossRef](#)]
61. Fukui, N.; Sato, T.; Kuboki, Y.; Aoki, H. Bone tissue reaction of nano-hydroxyapatite/collagen composite at the early stage of implantation. *Biomed. Mater. Eng.* **2008**, *18*, 25–33.
62. Nishikawa, T.; Masuno, K.; Tominaga, K.; Koyama, Y.; Yamada, T.; Takakuda, K.; Kikuchi, M.; Tanaka, J.; Tanaka, A. Bone repair analysis in a novel biodegradable hydroxyapatite/collagen composite implanted in bone. *Implant Dent.* **2005**, *14*, 252–260. [[CrossRef](#)]
63. Yoshida, T.; Kikuchi, M.; Koyama, Y.; Takakuda, K. Osteogenic activity of mg63 cells on bone-like hydroxyapatite/collagen nanocomposite sponges. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2010**, *21*, 1263–1272. [[CrossRef](#)]
64. Kikuchi, M. Osteogenic Activity of MG63 Cells on hydroxyapatite/collagen nanocomposite membrane. In *Key Engineering Materials*; Trans Tech Publications: Stäfa, Switzerland, 2007; Volume 330, pp. 313–316.
65. Kikuchi, M. Hydroxyapatite/collagen bone-like nanocomposite. *Biol. Pharm. Bull.* **2013**, *36*, 1666–1669. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
66. Iaquina, M.R.; Mazzoni, E.; Manfrini, M.; D’Agostino, A.; Trevisiol, L.; Nocini, R.; Trombelli, L.; Barbanti-Brodano, G.; Martini, F.; Tognon, M. Innovative biomaterials for bone regrowth. *Int. J. Mol. Sci.* **2019**, *20*, 618. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
67. Rebaudi, A.; Silvestrini, P.; Trisi, P. Use of a resorbable hydroxyapatite–collagen chondroitin sulfate material on immediate postextraction sites: A clinical and histologic study. *Int. J. Periodontics Restor. Dent.* **2003**, *23*, 370–379.
68. Scabbia, A.; Trombelli, L. A Comparative Study on the use of a ha/collagen/chondroitin sulphate biomaterial (Biosite®) and a bovine-derived HA xenograft (Bio-Oss®) in the treatment of deep intra-osseous defects. *J. Clin. Periodontol.* **2004**, *31*, 348–355. [[CrossRef](#)]
69. Okazaki, M.; Moriwaki, Y.; Aoba, T.; Doi, Y.; Takahashi, J. Solubility behavior of CO₃ apatites in relation to crystallinity. *Caries Res.* **1981**, *15*, 477–483. [[CrossRef](#)]
70. Mazzoni, E.; D’Agostino, A.; Manfrini, M.; Maniero, S.; Puozzo, A.; Bassi, E.; Marsico, S.; Fortini, C.; Trevisiol, L.; Patergnani, S. Human adipose stem cells induced to osteogenic differentiation by an innovative collagen/hydroxyapatite hybrid scaffold. *FASEB J.* **2017**, *31*, 4555–4565. [[CrossRef](#)]
71. Calabrese, G.; Giuffrida, R.; Fabbi, C.; Figallo, E.; Furno, D.L.; Gulino, R.; Colarossi, C.; Fullone, F.; Giuffrida, R.; Parenti, R. Collagen-hydroxyapatite scaffolds induce human adipose derived stem cells osteogenic differentiation *in vitro*. *PLoS ONE* **2016**, *11*, e0151181. [[CrossRef](#)]
72. D’Agostino, A.; Trevisiol, L.; Favero, V.; Gunson, M.J.; Pedica, F.; Nocini, P.F.; Arnett, G.W. Hydroxyapatite/collagen composite is a reliable material for malar augmentation. *J. Oral Maxillofac. Surg.* **2016**, *74*, 1238. [[CrossRef](#)]
73. Cavdar, F.H.; Keceli, H.G.; Hatipoglu, H.; Demiralp, B.; Caglayan, F. Evaluation of extraction site dimensions and density using computed tomography treated with different graft materials: A preliminary study. *Implant Dent.* **2017**, *26*, 270–274. [[CrossRef](#)]
74. Sotome, S.; Ae, K.; Okawa, A.; Ishizuki, M.; Morioka, H.; Matsumoto, S.; Nakamura, T.; Abe, S.; Beppu, Y.; Shinomiya, K. Efficacy and safety of porous hydroxyapatite/type 1 collagen composite implantation for bone regeneration: A randomized controlled study. *J. Orthop. Sci.* **2016**, *21*, 373–380. [[CrossRef](#)]
75. Matsumoto, T.; Okazaki, M.; Inoue, M.; Ode, S.; Chang-Chien, C.; Nakao, H.; Hamada, Y.; Takahashi, J. Biodegradation of carbonate apatite/collagen composite membrane and its controlled release of carbonate apatite. *J. Biomed. Mater. Res. Off. J. Soc. Biomater. Jpn. Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* **2002**, *60*, 651–656. [[CrossRef](#)]
76. Suh, H.; Lee, C. Biodegradable ceramic-collagen composite implanted in rabbit tibiae. *ASAIO J. Am. Soc. Artif. Intern. Organs* **1995**, *41*, M652–M656. [[CrossRef](#)]
77. Galbavý, S.; Lezovic, J.; Horecký, J.; Vanis, M.; Bakos, D. Atelocollagen/hydroxyapatite composite material as bone defect filler in an experiment on rats. *Bratisl. Lek. Listy* **1995**, *96*, 368–370. [[PubMed](#)]

78. Tsuchiya, A.; Sotome, S.; Asou, Y.; Kikuchi, M.; Koyama, Y.; Ogawa, T.; Tanaka, J.; Shinomiya, K. Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model. *J. Med. Dent. Sci.* **2008**, *55*, 91–99. [[PubMed](#)]
79. Kikuchi, M.; Ikoma, T.; Syoji, D.; Matsumoto, H.; Koyama, Y.; Itoh, S.; Takakuda, K.; Shinomiya, K.; Tanaka, M. Porous body preparation of hydroxyapatite/collagen nanocomposites for bone tissue regeneration. In *Key Engineering Materials*; Trans Tech Publications: Stäfa, Switzerland, 2004; Volume 254, pp. 561–564.
80. Sotome, S.; Orii, H.; Kikuchi, M.; Ikoma, T.; Ishida, A.; Tanaka, M.; Shinomiya, K. In vivo evaluation of porous hydroxyapatite/collagen composite as a carrier of op-1 in a rabbit PLF model. In *Key Engineering Materials*; Trans Tech Publications: Stäfa, Switzerland, 2006; Volume 309, pp. 977–980.
81. Masaoka, T.; Yamada, T.; Yuasa, M.; Yoshii, T.; Okawa, A.; Morita, S.; Kozaka, Y.; Hirano, M.; Sotome, S. Biomechanical evaluation of the rabbit tibia after implantation of porous hydroxyapatite/collagen in a rabbit model. *J. Orthop. Sci.* **2016**, *21*, 230–236. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
82. Kawasaki, Y.; Sotome, S.; Yoshii, T.; Torigoe, I.; Maehara, H.; Sugata, Y.; Hirano, M.; Mochizuki, N.; Shinomiya, K.; Okawa, A. Effects of gamma-ray irradiation on mechanical properties, osteoconductivity, and absorption of porous hydroxyapatite/collagen. *J. Biomed. Mater. Res. Part B Appl. Biomater. Off. J. Soc. Biomater. Jpn. Soc. Biomater. Aust. Soc. Biomater. Korean Soc. Biomater.* **2010**, *92*, 161–167. [[CrossRef](#)]
83. Maehara, H.; Sotome, S.; Yoshii, T.; Torigoe, I.; Kawasaki, Y.; Sugata, Y.; Yuasa, M.; Hirano, M.; Mochizuki, N.; Kikuchi, M. Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast Growth Factor-2 (FGF-2). *J. Orthop. Res.* **2010**, *28*, 677–686. [[CrossRef](#)]
84. Zhu, L.; Wang, G.; Shi, W.; Ma, X.; Yang, X.; Yang, H.; Yang, L. In situ generation of biocompatible amorphous calcium carbonate onto cell membrane to block membrane transport protein—A new strategy for cancer therapy via mimicking abnormal mineralization. *J. Colloid Interface Sci.* **2019**, *541*, 339–347. [[CrossRef](#)]
85. Zhu, W.; Wang, M.; Fu, Y.; Castro, N.J.; Fu, S.W.; Zhang, L.G. Engineering a biomimetic three-dimensional nanostructured bone model for breast cancer bone metastasis study. *Acta Biomater.* **2015**, *14*, 164–174. [[CrossRef](#)]
86. Pathi, S.P.; Lin, D.D.; Dorvee, J.R.; Estroff, L.A.; Fischbach, C. Hydroxyapatite nanoparticle-containing scaffolds for the study of breast cancer bone metastasis. *Biomaterials* **2011**, *32*, 5112–5122. [[CrossRef](#)]
87. Choi, S.; Friedrichs, J.; Song, Y.H.; Werner, C.; Estroff, L.A.; Fischbach, C. Intrafibrillar, bone-mimetic collagen mineralization regulates breast cancer cell adhesion and migration. *Biomaterials* **2019**, *198*, 95–106. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
88. Winkler, H.; Haiden, P. Treatment of chronic bone infection. *Oper. Tech. Orthop.* **2016**, *26*, 2–11. [[CrossRef](#)]
89. Amaro Martins, V.C.; Goissis, G. Nonstoichiometric hydroxyapatite-anionic collagen composite as support for the double sustained release of gentamicin and norfloxacin/ciprofloxacin. *Artif. Organs* **2000**, *24*, 224–230. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
90. Martins, V.C.; Goissis, G.; Ribeiro, A.C.; Marcantônio, E., Jr.; Bet, M.R. The controlled release of antibiotic by hydroxyapatite: Anionic collagen composites. *Artif. Organs* **1998**, *22*, 215–221. [[CrossRef](#)]
91. Kolmas, J.; Krukowski, S.; Laskus, A.; Jurkitewicz, M. Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 2472–2487. [[CrossRef](#)]
92. Murphy, C.M.; Schindeler, A.; Gleeson, J.P.; Nicole, Y.C.; Cantrill, L.C.; Mikulec, K.; Peacock, L.; O'Brien, F.J.; Little, D.G. A Collagen–hydroxyapatite scaffold allows for binding and co-delivery of recombinant bone morphogenetic proteins and bisphosphonates. *Acta Biomater.* **2014**, *10*, 2250–2258. [[CrossRef](#)]
93. Watanabe, K.; Nishio, Y.; Makiura, R.; Nakahira, A.; Kojima, C. Paclitaxel-loaded hydroxyapatite/collagen hybrid gels as drug delivery systems for metastatic cancer cells. *Int. J. Pharm.* **2013**, *446*, 81–86. [[CrossRef](#)]
94. Lian, X.; Liu, H.; Wang, X.; Xu, S.; Cui, F.; Bai, X. Antibacterial and biocompatible properties of vancomycin-loaded nano-hydroxyapatite/collagen/poly (lactic acid) bone substitute. *Prog. Nat. Sci. Mater. Int.* **2013**, *23*, 549–556. [[CrossRef](#)]
95. Semyari, H.; Salehi, M.; Taleghani, F.; Ehterami, A.; Bastami, F.; Jalayer, T.; Semyari, H.; Hamed Nabavi, M.; Semyari, H. Fabrication and characterization of collagen–hydroxyapatite-based composite scaffolds containing doxycycline via freeze-casting method for bone tissue engineering. *J. Biomater. Appl.* **2018**, *33*, 501–513. [[CrossRef](#)]
96. Szurkowska, K.; Laskus, A.; Kolmas, J. Hydroxyapatite-based materials for potential use in bone tissue infections. In *Hydroxyapatite—Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets*; IntechOpen: London, UK, 2018; pp. 109–135.

97. Suchý, T.; Šupová, M.; Sauerová, P.; Kalbáčová, M.H.; Klapková, E.; Pokorný, M.; Horný, L.; Závora, J.; Ballay, R.; Denk, F. Evaluation of collagen/hydroxyapatite electrospun layers loaded with vancomycin, gentamicin and their combination: Comparison of release kinetics, antimicrobial activity and cytocompatibility. *Eur. J. Pharm. Biopharm.* **2019**, *140*, 50–59. [[CrossRef](#)]
98. Martin, V.; Ribeiro, I.A.; Alves, M.M.; Gonçalves, L.; Claudio, R.A.; Grenho, L.; Fernandes, M.H.; Gomes, P.; Santos, C.F.; Bettencourt, A.F. Engineering a multifunctional 3d-printed pla-collagen-minocycline-nanohydroxyapatite scaffold with combined antimicrobial and osteogenic effects for bone regeneration. *Mater. Sci. Eng. C* **2019**, *101*, 15–26. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
99. Do, A.-V.; Khorsand, B.; Geary, S.M.; Salem, A.K. 3D Printing of scaffolds for tissue regeneration applications. *Adv. Healthc. Mater.* **2015**, *4*, 1742–1762. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
100. Lin, K.-F.; He, S.; Song, Y.; Wang, C.-M.; Gao, Y.; Li, J.-Q.; Tang, P.; Wang, Z.; Bi, L.; Pei, G.-X. Low-temperature additive manufacturing of biomimic three-dimensional hydroxyapatite/collagen scaffolds for bone regeneration. *ACS Appl. Mater. Interfaces* **2016**, *8*, 6905–6916. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
101. Rault, I.; Frei, V.; Herbage, D.; Abdul-Malak, N.; Huc, A. Evaluation of different chemical methods for cross-linking collagen gel, films and sponges. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **1996**, *7*, 215–221. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Warszawa, 26.10.2023

mgr farm. Barbara Kołodziejaska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, napisanie i przygotowanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 60 %.

Barbara Kołodziejaska

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr hab. n. farm. Joanna Kolmas

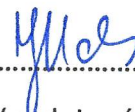
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
opracowanie koncepcji pracy i nadzór merytoryczny nad pisaniem, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 30 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.



.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 25.10.2023

dr n. farm. Agnieszka Kaflak

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: przegląd literatury oraz napisanie fragmentu manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.

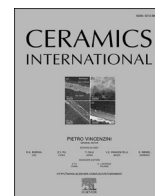
.....

(podpis oświadczającego)



Contents lists available at ScienceDirect

Ceramics International

journal homepage: www.elsevier.com/locate/ceramint

Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites

Barbara Kołodziejska^a, Niccolo Sturaro^b, Anna Zgadzaj^c, Joanna Kolmas^{a,*}

^a Department of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097, Warsaw, Poland

^b Faculty of Pharmacy, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131, Padova, Italy

^c Department of Toxicology and Bromatology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097, Warsaw, Poland

ARTICLE INFO

Handling Editor: Dr P. Vincenzini

Keywords:

Biomimetic apatite

Wet synthesis

Nanocrystals

Ionic substitutions

Powder X-ray diffractometry

ICP-OES

ABSTRACT

Nanocrystalline, ionically modified hydroxyapatites mimicking bone apatite were synthesized. The powders obtained by the wet method were enriched with the main “foreign ions” naturally occurring in bone tissue: carbonates, sodium and magnesium ions. Various parameters of the wet method synthesis were modified: pH, the concentration of reagents, the temperature during the precipitation, and ageing time. The materials were subjected to physicochemical analysis with the use of various analytical methods, such as powder X-ray diffraction (PXRD), transmission electron microscopy (TEM), inductively coupled plasma optical emission spectroscopy (ICP-OES) and Fourier transform infrared spectroscopy (FT-IR). All the obtained materials were also biologically tested *in vitro* for their potential cytotoxicity and biocompatibility. The morphology, crystallite sizes and crystallinity indices were investigated and the content of hydrogen phosphates, carbonates, magnesium and sodium were analysed. The concentration of reagents and temperature affect the size and shape of crystallites, while pH and ageing time affect the amount of doped ions and the biocompatibility of materials. Optimal conditions for the synthesis of highly biomimetic and biocompatible materials have been identified.

1. Introduction

Biological apatites are the main inorganic component of human mineralized tissues, constituting from 65 wt% (in the case of bone and dentine) to even 98 wt% (in enamel tissue) [1]. Their synthetic reference material is stoichiometric hydroxyapatite (HAp) with the formula $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. HAp is characterized by a high affinity to ionic substitution, which often makes it a compound with a more complex composition [2]. Both calcium cations (mainly by magnesium, sodium, potassium and zinc ions) and orthophosphate ions (by carbonates, hydrogen phosphates, and selenates) and hydroxyl ions (by fluorides, chlorides or carbonate ions) can be substituted. Thus, biological apatites are compounds of variable composition, depending on the tissue they build, the age of the organism, diet and environmental conditions [3,4]. Even heavy metal ions (such as lead or cadmium ions) are easily substituted in place of calcium cations in apatite [5].

With a large variety of compositions, however, one can talk about certain permanent “impurities” of biological apatite. These are primarily carbonate anions and magnesium and sodium cations, replacing mainly

phosphates, and calcium cations, respectively. In general, biological apatite is therefore multi-substituted carbonate hydroxyapatite deficient in calcium and hydroxyl ions [6]. This deficiency is due to substitution mechanisms and the need to preserve the neutral charge of the molecule. For example, a divalent carbonate ion substituting a trivalent phosphate ion simultaneously removes a calcium ion and a hydroxyl ion from the molecule. The number of OH groups in apatite is also affected by the size of the crystals and thus the degree of expansion of the crystal surface [7, 8].

Both Mg, Na and carbonate ions present in biological apatite enrich it with many valuable biological and physicochemical properties. Magnesium is involved in processes related to the strengthening and bone remodelling. It is closely related to the mineralization of calcified tissues and directly stimulates the growth of osteoblasts. Therefore, the loss of magnesium has a negative effect at all stages of bone metabolism [9,10]. Sodium ions are osteogenic factors and stimulate bone tissue mineralization. In biomaterials they improve biocompatibility [11]. Sodium and carbonate ions improve solubility of the materials and significantly affect apatite crystallinity [12,13]. Matsuura et al. suggested that apatite

* Corresponding author. Department of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, Banacha 1 str, 02-097, Warsaw, Poland.

E-mail address: joanna.kolmas@wum.edu.pl (J. Kolmas).

<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.10.035>

Received 10 June 2023; Received in revised form 1 October 2023; Accepted 5 October 2023

Available online 6 October 2023

0272-8842/© 2023 Published by Elsevier Ltd.

Table 1
Description of the samples.

Sample	Concentration of Ca and P solution (%)	pH	Temperature (°C)	Aging time (days)	Sample	Concentration of Ca and P solution (%)	pH	Temperature (°C)	Aging time (days)
LC9RT1	5/3	9.0	25	1	HC9RT1	20/12	9.0	25	1
LC9RT7	5/3	9.0	25	7	HC9RT7	20/12	9.0	25	7
LC9HT1	5/3	9.0	80	1	HC9HT1	20/12	9.0	80	1
LC9HT7	5/3	9.0	80	7	HC9HT7	20/12	9.0	80	7
LC11RT1	5/3	11.0	25	1	HC11RT1	20/12	11.0	25	1
LC11RT7	5/3	11.0	25	7	HC11RT7	20/12	11.0	25	7
LC11HT1	5/3	11.0	80	1	HC11HT1	20/12	11.0	80	1
LC11HT7	5/3	11.0	80	7	HC11HT7	20/12	11.0	80	7

with carbonate content similar to that of human bone may induce bone formation [13].

Bone apatite is a nanocrystalline material with plate-like crystals that have a size of approximately 50 nm × 20 nm × 10 nm and the average amount of OH groups is only about 20% in relation to the stoichiometric HAp. In turn, dental enamel apatite crystals are much larger; their length reaches up to 200 nm, and the width and thickness, respectively 50–70 and 20–25 nm [14]. At the same time, the content of hydroxyl groups is about 74% relative to stoichiometric HAp. Of course, both the presence of various ions in the structure and the size of the crystals affect the physicochemical properties of biological apatites, including resorption, mechanical strength, thermal stability, etc. [15].

In recent years, numerous studies have focused on the synthesis of ionically substituted hydroxyapatites capable of mimicking natural biological apatites [16–24]. The research mainly concerned hydroxyapatites enriched in carbonate or magnesium ions, much less work was devoted to co-substituted apatites containing both magnesium and carbonates [25–28]. To the best of our knowledge, there are no papers on multi-ionic co-substituted apatites containing magnesium, sodium and carbonates [28]. Several works have been devoted to the methods of biomimetic apatite synthesis, however, literature data indicate that nanocrystalline apatites can be effectively obtained by the wet (precipitation) method. Various conditions were used during the precipitation, with particular focus on the effect of pH on crystal morphology, or the limit of substitution of given ions and their location were examined [17,29–33].

In our work, we focused on the search for the most favourable conditions for the wet synthesis of biomimetic nanocrystalline apatites containing magnesium, sodium and carbonate ions. The values of Mg^{2+} , Na^+ and CO_3^{2-} in bone apatite differ depending on various factors such as individual characteristics, age and health, however, they usually

range between 0.2 and 0.6 wt %; 0.5–0.8 wt % and 4–9 wt %, respectively [4,34]. Therefore, we decided to synthesize apatites containing nominally about 0.5 wt % of both Mg^{2+} and Na^+ ions and 5% of CO_3^{2-} .

We tested the influence of several factors: pH, temperature, concentration of reagents and precipitate aging time. The obtained materials were characterized by physicochemical methods: mid-infrared spectroscopy (FT-IR), powder diffraction (PXRD), electron microscopy (TEM) and inductively coupled plasma atomic emission spectrometry (ICP-OES). The obtained powders were also tested for biological activity and cytotoxicity *in vitro*.

2. Materials and methods

2.1. Synthesis of apatite samples

The synthesis of hydroxyapatite mimicking bone apatite was carried out using a conventional wet method [35]. As initial reagents, the following were used: calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), ammonium hydrogen phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$), diammonium carbonate ($(NH_4)_2CO_3$), magnesium nitrate hexahydrate ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), sodium chloride (NaCl), which are sources of calcium, phosphates, carbonates, magnesium, and sodium, respectively.

Calcium nitrate tetrahydrate was purchased from Chempur, while the other reagents were obtained from Sigma Aldrich. The amounts of reagents were measured in such a way that the nominal contents of carbonate, magnesium and sodium ions were 5.0, 0.5 and 0.5%, respectively, and that the $(Ca + Mg + Na)/(P + C)$ molar ratio was approximately 1.7.

During the synthesis, four different parameters were modified: temperature (Room Temperature RT or High-Temperature HT), ageing time (1 day or 7 days), pH (9 or 11) and the concentrations of

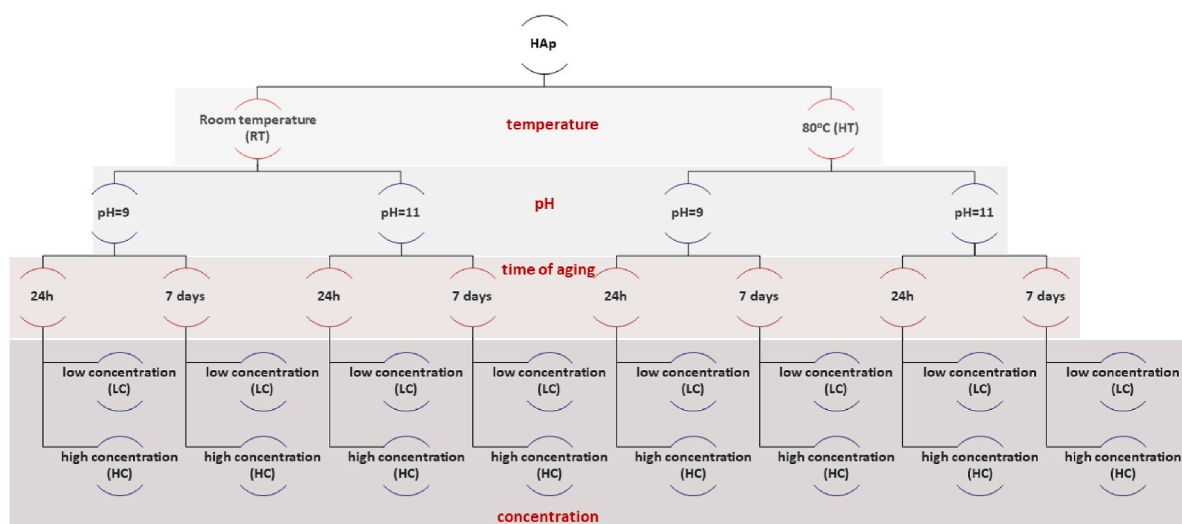


Fig. 1. A scheme presenting the parameters modified during the synthesis.

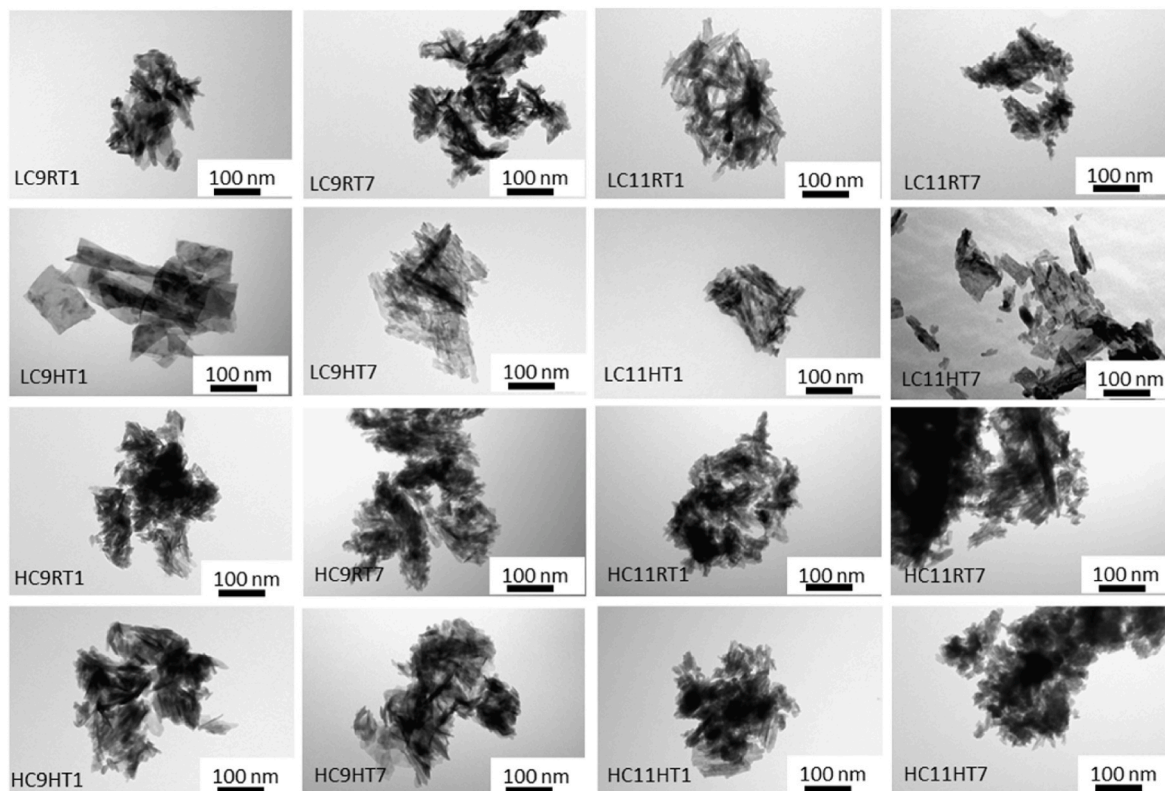


Fig. 2. TEM representative images of all the obtained powders.

phosphates and calcium (low concentrations 5%/3% or high concentrations 20%/12%, respectively) (see Table 1).

Briefly, we dissolved $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, and NaCl in deionized water in a 500 ml flask, kept under constant stirring (solution A); $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ and $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ (solution B) were solubilized in deionized water in a baker and quantitatively transferred in a dispenser. Pouring drop by drop the solution B in solution A a white suspension was obtained. The reaction was provided at room temperature (25°C) or high temperature (80°C) using a water bath and maintained for 3 h. The pH value of each sample was then adjusted to 9.0 or 11.0 using a concentrated NH_4OH solution. We obtained a total of 16 samples, summarized in the following Fig. 1.

After ageing, each sample was washed with deionized and centrifugated many times to eliminate ammonia residues and other soluble products and reach the desired pH of 7. The so-obtained apatite precipitates were dried for 12 h at 120°C .

2.2. Characterization

2.2.1. Physicochemical properties

After drying, the obtained samples were ground in a mortar and subjected to the following analytical tests.

In order to determine the morphology of the obtained crystals, transmission electron microscope (TEM, JEM 1400 Jeol Co. Japan) studies were carried out at an accelerating voltage of 80 kV. The samples were prepared by suspending the powders in ethanol and dropping the suspensions onto a copper grid covered with Formvar coating and then air-dried.

In order to assess the identity of the samples, all the powders were analysed using a Bruker DX8 Discover powder diffractometer with $\text{CuK}\alpha$ radiation ($\lambda=0.154$ nm), (Bruker, Madison, WI, US). The diffraction intensity data were scanned with a step size of 0.03° in the 2θ range from 15 to 55° and using the Bragg-Bentano geometry. The lattice parameters a and c of the unit cells and the size of the crystals were

determined with the Topaz software, using a basic Rietveld analysis based on analytical profile functions and least-squares algorithms in order to fit a theoretical diffractogram to experimental lines.

The chemical structure analysis of the obtained apatite materials was performed by mid-infrared FT-IR spectroscopy (Perkin Elmer Spectrum 1000 spectrometer Waltham, MA, US) using the KBr tablet technique with a spectral range of 4000 to 400 cm^{-1} (30 scans and a 2 cm^{-1} resolution). The FT-IR method was also used to assess the content of carbonate ions and their location.

Quantitative analysis of magnesium, sodium, calcium and phosphorus was performed using the ICP-OES technique (Optima 3100XL Perkin Elmer spectrometer). Powder samples were dissolved in concentrated HNO_3 (Suprapur, Sigma Aldrich, Germany), and then diluted properly to the appropriate volume with deionized water. All the measurements were performed in triplicate, according to the five-point standard curve for each element.

2.2.2. Biological characterization

In vitro tests in the scope of the biocompatibility evaluation of all materials were carried out with two mammalian cell lines: BALB/c 3T3 clone A31 mammalian cells (mouse embryonic fibroblasts, American Type Culture Collection) and MG-63 (human osteosarcoma, American Type Culture Collection). The first line is a standard recommended for a general *in vitro* cytotoxicity assessment according to the ISO 10993 guideline [36], while the second line is a commonly used human osteoblastic model in studies of bone substitutes. The influence of all the materials on mammalian cells was assessed with the neutral red uptake assay and with the MTT test (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide reduction assay), with two models of exposition: after an indirect contact (test on extracts according to the ISO 10993) and a direct contact (cells seeded onto the scaffolds).

As the first stage of the *in vitro* assays, the direct and indirect cytotoxicity of all samples was evaluated with BALB/c 3T3 cells.

For the tests on extracts cells were seeded in 96-well microplates (15

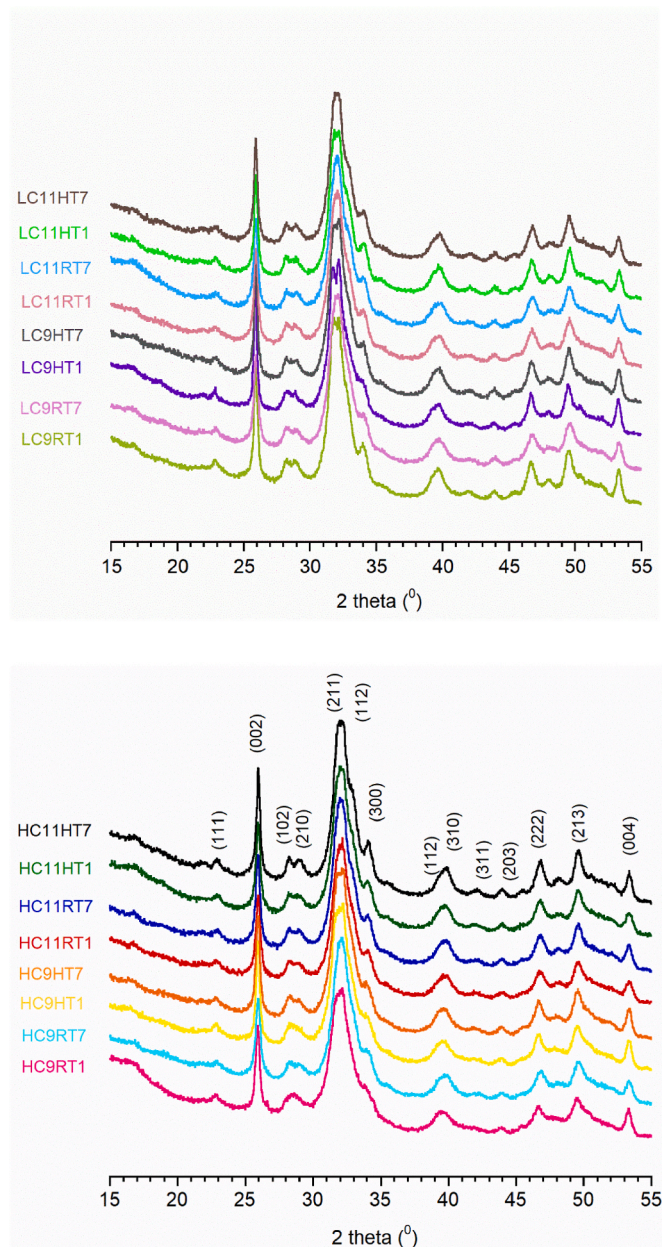


Fig. 3. Representative PXRD patterns of the samples synthesized using low (A) and high (B) concentrated reagents.

000 cells/100 μL) in DMEM (Lonza) culture medium (supplemented with 10% of calf bovine serum, 100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin) and incubated for 24 h (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, >90% humidity). At the end of the incubation, each well was examined under a microscope to ensure that cells form a confluent monolayer. After that culture medium was replaced by the tested extracts. Extracts were prepared by incubation of tested materials in the cell culture medium (100 mg/mL) with reduced serum concentration (5%) at 37 $^\circ\text{C}$ for 24 h with shaking and sterilized by filtration. Cells were treated with four dilutions of each extract in a twofold dilution series for 24 h. Subsequently, the treatment medium was removed. Cells were washed with PBS and treated with the neutral red medium for 2 h. Then the medium was discarded, and cells were washed with PBS and treated with desorbing fixative (ethanol and acetic acid water solution). The amount of neutral red accumulated by cells was evaluated spectrophotometrically at 540 nm. Polyethylene film and latex were used as the reference materials (with no cytotoxicity and highly cytotoxic, respectively).

The next test with the direct exposition protocol was performed with the same cell line: BALB/c 3T3. All samples formed as discs with 13 mm diameter were placed in the individual wells in 24-well plates. The discs were seeded with 250 000 cells in 1 mL of supplemented DMEM and placed in the incubator for the next 3 days. After that, the medium from all wells was replaced with the MTT solution in PBS (1 mg/mL) and incubated for 1.5 h. Subsequently, all discs were carefully transported to the new 24-well plate, dried, flooded with 500 μL of isopropanol and mixed gently with a microplate shaker for 15 min, until the reagent obtained a uniform purple colour. Finally, the colour intensity was determined spectrophotometrically at a wavelength of 570 nm. Obtained results were presented as a percentage of the living cells on the surface of the material compared to the effect calculated for the unmodified hydroxyapatite (HAp) and a control cell culture. As a control cell culture, an additional 48-well plate with a surface of each well equal to the surface of the discs was used.

The second stage of the cytotoxicity evaluation was an application of the MG-63 cells as a human osteoblastic model. The assay was performed similarly to the test with BALB/C 3T3 cells seeded onto the scaffolds. This time the materials were seeded with 250 000 MG-63 cells in 1 ml of EMEM (American Type Culture Collection, supplemented with 10% of fetal bovine serum, 100 IU/mL penicillin and 0.1 mg/mL streptomycin) and incubated for 7 days (5% CO_2 , 37 $^\circ\text{C}$, >90% humidity). The MTT assay was performed as described above. Obtained results were also presented as a percentage of the living cells on the surface of the material compared to the effect calculated for the unmodified hydroxyapatite (HAp) and a control cell culture.

3. Results

Fig. 2 shows representative TEM photos taken from all the powders. In general, the obtained materials are characterized by fine nanocrystals. The crystals tend to form larger clusters due to the agglomeration of fine particles. The presented photos show that the materials obtained by synthesis at high temperature (HT) are characterized by larger crystals compared to the crystals of samples synthesized at room temperature (RT). Particularly, large crystals are observed in the image of samples LC9HT24 and LC11HT7. In turn, the HC11RT7 sample seems to contain the finest crystals with the strongest tendency to form clusters. In addition, it can also be observed that finer crystals are present in samples precipitated from solutions with high concentrations of reagents. All obtained samples mostly contain crystals of a slightly elongated shape, however, it can be seen that the powders obtained at room temperature are composed of crystals with a more plate-like structure compared to samples from the synthesis at higher temperature, where needle-like crystals appear.

The diffractograms obtained from all the powders are presented in **Fig. 3** (A and B). The position of the reflections and their relative intensity confirm that the obtained materials have an apatite structure and are not contaminated with another crystalline phase. Reflections compared to the PXRD pattern of standard hydroxyapatite (JCPD 09-0432) are wide, and poorly separated, which confirms their nanocrystalline character.

The width of the PXRD reflections is used to estimate the size of the crystallites according to the Scherer formula:

$$d = \frac{0.94\lambda}{\beta \cos\theta} \quad (1)$$

where

- d – crystallite size (nm)
- λ – radiation wavelength (nm)
- β – the line full width at half maximum intensity (radians)
- θ – the diffraction angle of the corresponding reflex ($^\circ$).

Table 2

Various structural parameters determined from the PXRD diffractograms and the FT-IR spectra.

Sample	a^a	c^a	Crystal size along c-axis (nm) ^b	Crystal size along c-axis (nm) ^b	Crystallinity index ^c	Crystallinity index ^d
LC9RT1	9.448	6.874	27.5	9.5	0.264	0.131
LC9RT7	9.430	6.870	25.4	8.1	0.219	0.129
LC9HT1	9.449	6.881	32.9	8.3	0.786	0.181
LC9HT7	9.440	6.874	27.1	9.0	0.446	0.129
LC11RT1	9.434	6.872	24.3	8.4	0.223	0.125
LC11RT7	9.421	6.876	23.6	8.4	0.258	0.112
LC11HT1	9.434	6.872	27.0	9.3	0.446	0.137
LC11HT7	9.426	6.877	26.5	7.4	0.418	0.144
HC9RT1	9.473	6.874	22.7	6.2	0.262	0.124
HC9RT7	9.427	6.869	21.1	6.8	0.213	0.131
HC9HT1	9.463	6.872	23.5	6.5	0.367	0.141
HC9HT7	9.451	6.872	23.0	6.6	0.303	0.138
HC11RT1	9.433	6.868	20.7	6.7	0.201	0.131
HC11RT7	9.426	6.872	22.3	7.1	0.248	0.129
HC11HT1	9.432	6.867	24.8	8.9	0.386	0.148
HC11HT7	9.428	6.871	25.7	9.6	0.426	0.147

^a Error $\pm 0.3\%$.^b Error $\pm 3\%$.^c - CI measured from PXRD patterns.^d - CI measured from FT-IR spectra.

Calculations based on the reflex width (002) and (300) confirm that each material is built of slightly elongated nanocrystals, whose length and width range between 20.7–32.9 nm and 7.1–9.6 nm (see Table 2). Based on the diffractograms, the unit cell parameters (a and c) were calculated and also presented in Table 2. The same Table also includes the values of the crystallinity index (CI_1) calculated based on the obtained diffraction patterns according to the following formula:

$$CI_1 = (0.24/\beta(002))^3,$$

where

 CI_1 - crystallinity index β – the line full width at half maximum intensity (radians)

The obtained FT-IR spectra are shown in Fig. 4 (A and B). Each spectrum contains a set of bands typical for HAp. Phosphate bands can be observed in the range of 1200–900 cm^{-1} ($\nu_1+\nu_3$) and 620–540 cm^{-1} (ν_4). In turn, the band at 1630–1640 cm^{-1} corresponds to bending vibrations of water molecules adsorbed on the surface of the samples. Stretching vibrations give a wide band at about 3420 cm^{-1} (see the representative spectrum in Fig. 2S in Supplementary Materials). At about 3570 cm^{-1} there is a small band coming from structural vibrations of hydroxyl groups, not bound by hydrogen bonds (Figs. 2S and 3S). The librational vibrations of the OH groups are visible in the form of a small band at about 630 cm^{-1} - which is an extension of the left slope of the band at about 601 cm^{-1} (see Fig. 4). The obtained spectra at ca. 1550–1400 cm^{-1} and ca. 890–860 cm^{-1} show bands of different relative intensities coming from carbonates.

Table 3 presents the results of the quantitative analysis of magnesium, sodium, calcium and phosphorus obtained by the ICP-OES method. The contents of magnesium and sodium varied significantly: in the range of 0.10–0.51% and 0.10–0.43%, respectively. In turn, in the case of the content of calcium and phosphorus (basic elements), the differences were not so large: the content of calcium ranged from 34.89 to 37.08%, while the content of phosphorus - from 17.58 to 19.43%. Using the spectra obtained with the FTIR method, the content of carbonates and the relative content of HPO_4 groups (HPO_4^{2-} index) in the obtained samples were estimated (see Table 3). Carbonate ions accounted for from 1.08 to 3.32 wt%. apatites. In the case of HPO_4^{2-} ions, the index of their content was estimated, which was in the range of 0.090–0.259.

The percentage of viable cells in each well was calculated by comparing its OD_{540} result with the mean result obtained for untreated

cells (incubated in the same conditions with fresh culture medium). Samples were considered cytotoxic if they reduced cell survival below 70% compared to the untreated cells (a baseline cell viability). When the BALB/c 3T3 cell viability was not decreased under 70% in the whole range of tested dilutions of the samples, it was considered as non-cytotoxic in this range of concentrations. All tested samples were classified as non-cytotoxic (see Fig. 5).

4. Discussion

4.1. Physicochemical properties

The aim of our research was, firstly, to obtain powders with similar morphological characteristics and chemical composition to apatites present in bone tissue. We decided to use the wet method, in an aqueous solution. The available literature data and the results of our previous research have shown that the wet method is a proper way for obtaining powders with very fine crystals, similar in size and shape to biological apatite crystals [6,23,37–39]. The smaller crystal size and higher specific surface area can enhance bioactivity of the materials, promoting better cell adhesion, proliferation, and osteogenic differentiation. In comparison, the high-temperature solid-state method leads to the formation of microcrystalline materials [29]. Moreover, its disadvantage is often the presence of additional phases, e.g. CaO or β -TCP. In turn, the use of the hydrothermal method can also lead to the formation of monetite (dicalcium phosphate anhydrous, CaHPO_4) and, what is more, crystals exhibiting a characteristic elongated shape of rods with a length of more than 200 nm [40].

The wet method allows for a single or multiple ionic substitution of hydroxyapatite, and its efficiency depends on the synthesis conditions and the type of introduced ion. Ions can also be successfully introduced by other methods, including precipitation of hydroxyapatite from the SBF solution [41]. However, this method may lead to co-precipitation of other precipitates and contamination of the apatite with other "unwanted" ions.

In our synthesis, we used calcium nitrate and diammonium orthophosphate as sources of calcium and phosphorus, respectively. These are (together with calcium hydroxide and orthophosphoric acid) one of the most frequently used reagents for obtaining hydroxyapatite by the wet method. According to the available literature and our research [39,42], as a result of the reaction, apart from apatite, only products that are well soluble in water are obtained, which can be easily removed by washing the sediment multiple times with distilled water.

In the presented study, we successfully obtained hydroxyapatites

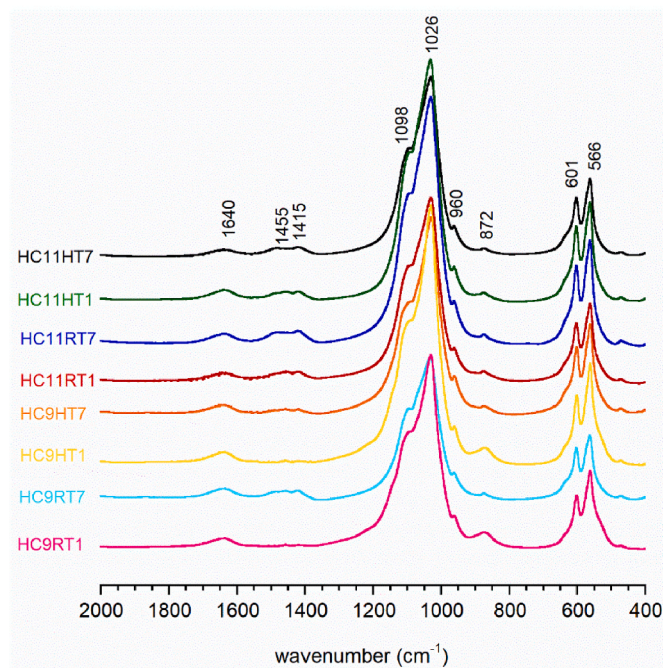
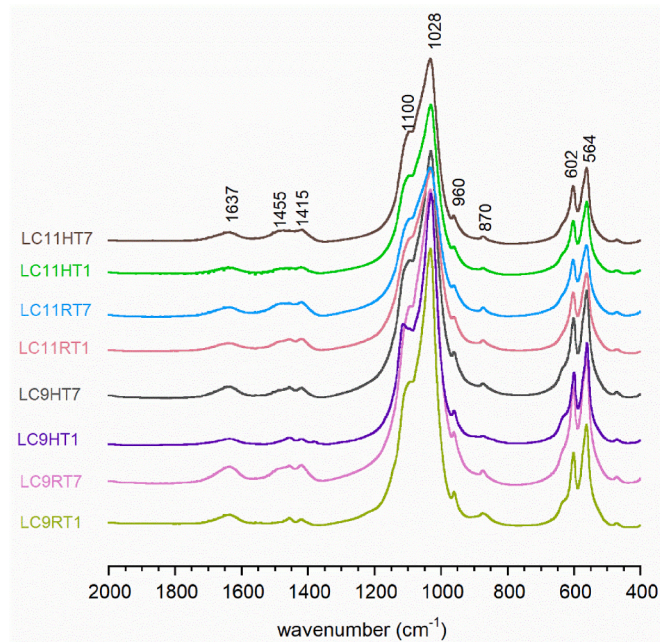


Fig. 4. Representative FT-IR spectra of the samples synthesized using low (A) and highly (B) concentrated reagents.

using various modifications of the synthesis conditions in the conventional wet method. Both TEM images and PXRD diffractograms of the obtained powders showed that the obtained materials have a nanocrystalline structure (see Figs. 2 and 3 A and B). From the calculated size of the crystals measured along the *c*-axis, it can be concluded that the synthesis from more concentrated solutions gives finer, slightly less elongated, more plate-like crystals. This size ranges from 20.7 to 25.7 nm. Most likely, this is due to the greater number of crystallization nuclei in more concentrated solutions.

Table 2 presents the unit cell parameters *a* and *c* of the obtained apatites. The values of parameters *a* and *c* change slightly and range from 9.421 to 9.451 Å and 6.867 to 6.881 Å. Comparing these values to the parameters of the unit cell of adult human bone apatite (9.460 and

Table 3

Various quantitative results determined from ICP-OES (Mg, Na, Ca and P content in wt.%) and FT-IR spectroscopy (carbonates content in (%)) and HPO_4^{2-} index.

Sample	Mg (%)	Na (%)	Ca (%)	P (%)	CO_3^{2-} (%)	HPO_4^{2-}
LC9RT1	0.16	0.16	35.97	18.88	1.08	0.168
LC9RT7	0.31	0.29	35.95	17.95	1.15	0.131
LC9HT1	0.10	0.26	34.92	17.58	2.06	0.160
LC9HT7	0.32	0.24	35.01	17.67	1.28	0.126
LC11RT1	0.31	0.32	35.39	18.03	1.33	0.148
LC11RT7	0.50	0.42	35.97	17.90	1.23	0.142
LC11HT1	0.51	0.29	35.65	18.01	1.09	0.174
LC11HT7	0.47	0.43	36.29	18.10	1.20	0.138
HC9RT1	0.16	0.12	35.40	19.43	1.25	0.259
HC9RT7	0.30	0.32	36.30	18.49	2.84	0.090
HC9HT1	0.37	0.10	34.89	19.88	1.10	0.240
HC9HT7	0.55	0.21	36.12	18.16	1.56	0.161
HC11RT1	0.36	0.25	37.08	19.16	1.36	0.153
HC11RT7	0.46	0.34	36.92	18.37	3.32	0.084
HC11HT1	0.39	0.27	35.48	18.47	1.89	0.122
HC11HT7	0.49	0.32	36.02	18.03	2.94	0.106

6.880 Å), it can be concluded that they are similar [43].

The crystallinity index was calculated by two different methods: using PXRD diffraction patterns according to Landi et al. [44–46] and FTIR spectra according to Rey et al. [47]. The results presented in Table 2 indicate that the crystallinity index (IC_1) is definitely higher for samples synthesized at elevated temperature - it ranges in a fairly wide range of 0.303–0.786, while for samples obtained at room temperature, it is more stable and amounts to the 0.201–0.264. From the obtained results, it can also be concluded that the concentration of reagents, aging time and pH do not affect the crystallinity of the sample. Changes in crystallinity indices based on FTIR spectra (IC_2) are consistent with those obtained from diffraction patterns (IC_1). However, it should be noted that IC_1 has a higher resolution and sensitivity than that calculated using FTIR spectra (IC_2). In Ref. [48] it was suggested that both methods are objective, effective and sensitive for hydroxyapatites with low crystallinity. In our work, the IC_1 method turns out to be much more appropriate to assess the crystallinity of the apatitic samples.

Vandecandelaere et al. point out that biomaterials based on nanocrystalline apatite are bound to lead to better osteointegration and controllable resorption, due to their high similarity to bone mineral and higher solubility, as compared to commercially available, less-bioactive products based on stoichiometric HAP or else to biphasic HAP/ β TCP scaffolds [29].

An important aspect of the synthesis of biomimetic apatites is the enrichment of HAP in basic ions naturally occurring in bone apatite, i.e. carbonates, sodium and magnesium, into the structure. Our goal was to introduce these ions simultaneously in amounts of 5, 0.5 and 0.5%, respectively. Single comparisons of stoichiometric and substituted HAPs can be found in the literature, e.g. Landi et al. developed Mg-substituted hydroxyapatite, which showed in *in vivo* tests enhanced osteoconductivity and resorption compared to commercial stoichiometric HAP granulate [49].

Magnesium ion substitution proceeds with different efficiency (from 20% for sample LC9HT1 to 100% for samples HC9HT7, LC11RT7 and LC11HT1). It is worth noting that magnesium ions were incorporated to a small extent into the samples synthesized at pH=9 and short ageing time in the mother solution (LC9RT1 and HC9RT1). The data presented in Table 3 show that the ageing time has the greatest influence on the Mg^{2+} substitution: precipitates that were left in solution longer (7 days) are characterized by a significantly higher content of magnesium ions compared to samples that were only aged for 24 h (1 day). It also seems that higher pH during synthesis and ageing favours the substitution of calcium ions with magnesium ions. Samples synthesized at pH 11 and an ageing time of 7 days are characterized by a high magnesium content (from 0.46 to 0.51%), which proves a very high efficiency of substitution under these conditions.

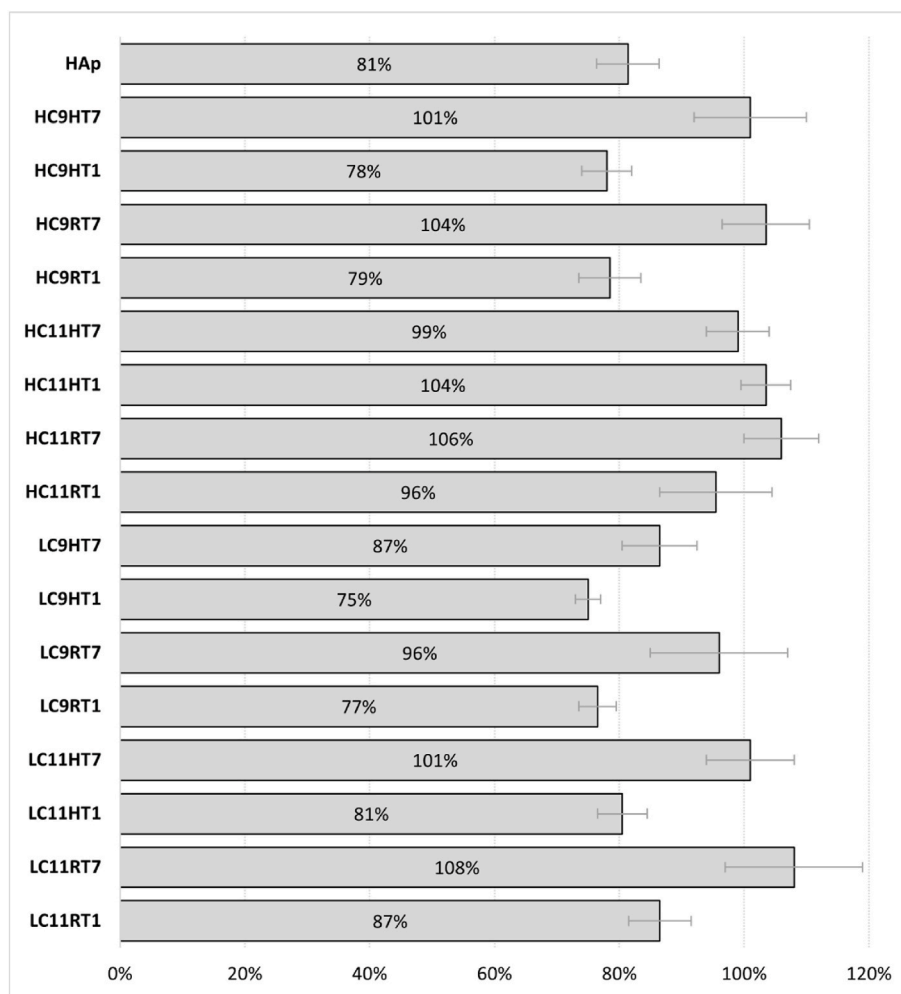


Fig. 5. The results of the neutral red uptake test on extracts with the BALB/c 3T3 cells for the highest concentrations of tested extracts (100 mg/mL) in comparison to the untreated control (a baseline cells viability). All samples were classified as non-cytotoxic (>70% of living cells). HAp is an unmodified hydroxyapatite.

The efficiency of incorporating sodium ions into the hydroxyapatite structure was on average lower than that of magnesium ions (from 24% for sample HC9RT1 to 86% for sample LC11HT7). The highest contents of sodium ions were found in samples synthesized at pH 11 and matured for 7 days. Interestingly, these were also samples with a high content of magnesium, hence it can be concluded that both ions do not compete with each other, and the lower efficiency of sodium introduction is due to differences in valences.

Carbonate ions can be located in the apatite crystal structure in two different places: due to their small size (178 nm), they can occupy the place of OH structural hydroxyl groups (type A substitution) and phosphate ions (type B substitution) [50]. According to the literature, bone apatite and hydroxyapatites synthesized by the wet method are dominated by the B-type substitution [51]. In order to analyse the location of carbonate ions in the obtained samples, the curve fitting procedure was performed according to the procedure described in the literature [52–54] (see Fig. 4S in Supplementary Materials). In the region of 1570–1370 cm^{-1} , three bands were distinguished: at 1420 cm^{-1} , 1480 cm^{-1} and 1450 cm^{-1} , among them, the least intense band can be attributed to type A carbonates. In the spectrum of each sample, the share of the band at 1450 cm^{-1} corresponding to type A vibrations of carbonates is small and constitutes 14–26% of the entire area of the carbonate band. In addition, the obtained spectra are characterized by low-intensity bands in this range, which proves the low efficiency of introducing carbonate ions into the apatite structure. Therefore, it was decided to estimate the total content of type A and type B carbonates. The data in

Table 3 indicate that indeed, the efficiency of introducing carbonate ions into apatite crystals is small and ranges from 21.6% for sample LC9RT1 to 66.4% for sample HC11RT7.

It seems that the content of carbonate ions in the samples was affected by the ageing time: as in the case of sodium and magnesium ions, a long time favoured the introduction of carbonates into apatites. A similar effect can be observed for pH 11 compared to pH 9. Carbonate ions were more easily incorporated into apatites synthesized using more concentrated solutions (HT). However, the amounts of carbonate ions are not very high. This may be due to too short a maturation time of precipitate: our research on the precipitate of carbonated hydroxyapatite matured six months exhibited high efficiency of CO_3^{2-} introduction (data not shown).

At the same time, it is worth emphasizing that the content of carbonate ions in biological apatite largely depends on the degree of tissue maturity: the older the tissue, the higher the content of carbonates in it. On the other hand, according to the available literature, in young bone apatite HPO_4^{2-} ions are present. Recent studies have shown that HPO_4^{2-} ions are contained in apatite, not in a separate brushite phase, as previously thought [52,55,56].

Separation of the FTIR bands in the range of 700–450 cm^{-1} allowed the detection of the band originating from the vibrations of the HPO_4^{2-} group at 540 cm^{-1} (see Fig. 5S and Table 1S in Supplementary Materials). Its relative contribution to the ν_4 area is presented as the HPO_4 content index in Table 3. It is worth noting that the index value is higher for samples aged for a shorter time, i.e. 1 day. It seems that the other

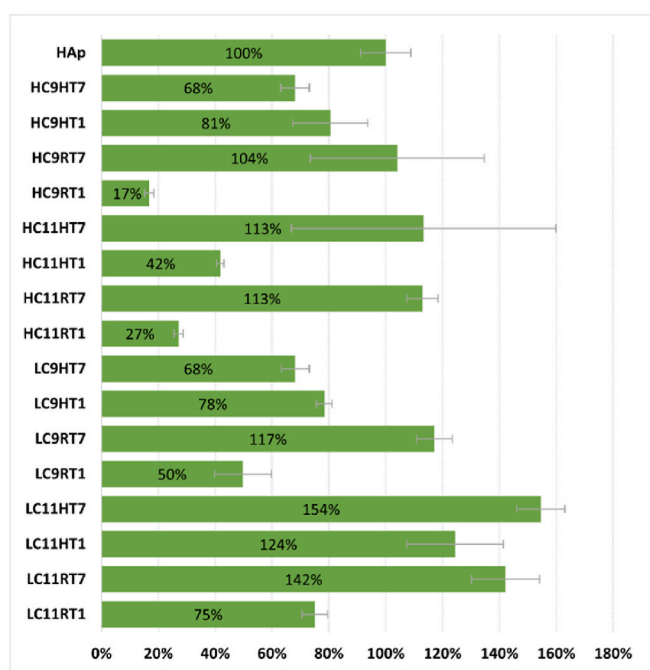
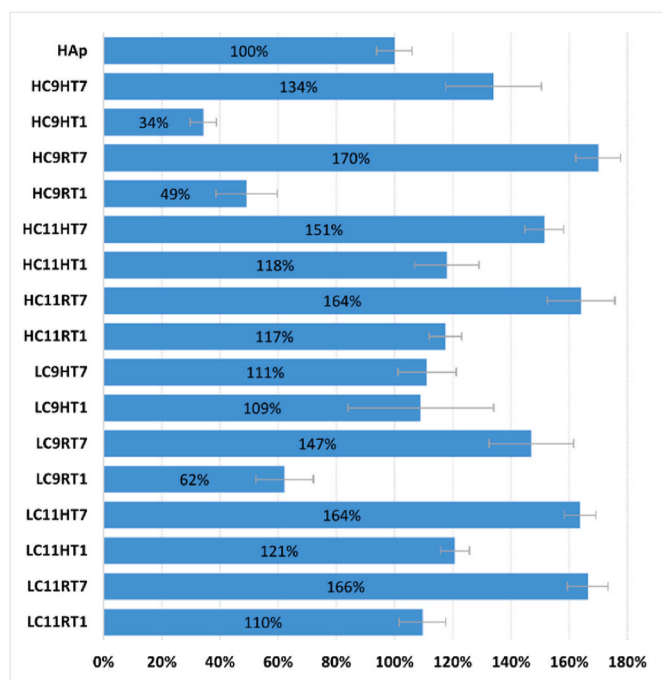


Fig. 6. The results of the MTT assay with the BALB/c 3T3 cells (A) and with the MG-63 cells (B) as a human osteoblastic model. The cells were seeded directly onto the samples. The results are presented as a percentage of the living cells on the surface of the material compared to the effect calculated for the unmodified hydroxyapatite (HAp).

parameters (pH, reagent concentration or temperature) had no significant effect on the content of these ions in the apatite samples.

4.2. Biological properties

In the test on extracts, the BALB/c 3T3 cell viability was not decreased under 70% in comparison to the untreated control by any of the tested materials. Therefore all tested samples were classified as non-cytotoxic in the neutral red uptake assay (Fig. 5). However, in the test

performed with the BALB/c 3T3 cells seeded directly on the discs a large variation in the results could be noticed (see Fig. 6A). Fibroblasts on the surface of most of the materials showed more than 70% survival compared to the control culture, excluding samples: LC9RT1, HC9RT1 and HC9HT1. Comparing the obtained results to HAp allowed for a clear differentiation of the samples (Fig. 6). A significantly higher percentage of living cells on the surface of the material than the effect calculated for the unmodified hydroxyapatite (HAp) was obtained for samples: LC11RT7, LC11HT1, LC11HT7, LC9RT7, HC11RT7, HC11HT7, HC9RT7 and HC9HT7. Corresponding results were observed with the application of the osteoblastic model on MG-63 cells (see Fig. 6B). The differentiation between all samples in this model was even more visible than with BALB/c 3T3 cells. For several materials (samples: LC11RT7, LC11HT1, LC11HT7, LC9RT7, HC11RT7, HC11HT7 and HC9RT7), the MG63 cells grew even more intensively on their surface than on the control plate (see Fig. 7). Summarizing all the observations, the factors with the greatest impact on the *in vitro* biocompatibility of the materials were: the longer ageing time of the reaction mixture and its higher pH. It is worth noting that at pH 11, with a high concentration of OH⁻ ions, the solubility of the precipitate is hindered and thus the precipitation is quite fast, which results in a strong tendency to agglomerate [57]. Therefore, we can assume that better adhesion and cell growth on the surface of materials synthesized at higher pH and with a long ageing time may result from the formation of the developed surface area of these materials.

The influence of the reagent concentration or the temperature of the reaction was not that significant in any of the assays.

5. Conclusions

In this work, we synthesized hydroxyapatites modified simultaneously with three different ions: Mg²⁺, Na⁺ and CO₃²⁻. We analysed the impact of various synthesis conditions on the physicochemical and biological properties of the materials. Therefore, TEM, PXRD, FT-IR and ICP-OES methods were used to study in detail the chemical structure and composition of the samples. Moreover, *in vitro* test NRU on extracts using the BALB/c 3T3 cells (fibroblasts) and MTT assays with the BALB/c 3T3 and MG-63 cells (osteosarcoma) seeded directly onto the samples were performed.

The results showed that the wet method of synthesis of such materials leads to phase-homogenous, nanocrystalline apatites. The size and shape of their crystallites depend on concentration and temperature. Temperature influences also the crystallinity of the apatites. In turn, the effectiveness of partial substitution of Ca by Mg and Na as well as biocompatibility strongly depends on pH and time of precipitate ageing. The time of leaving the precipitate in the mother liquor also has a large impact on the introduction of carbonates into the HA structure: in our research, we observed low efficiency of CO₃²⁻ substitution during the proposed time and simultaneously, high relative content of HPO₄²⁻.

The results of our work clearly indicate that synthesis conditions affect the properties of hydroxyapatites mimicking biological apatite. To obtain the material with high biomimetic properties and high biocompatibility, the synthesis should be provided under room temperature, high pH, low concentration of reagents, and long aging time.

The results may be useful in biomedical applications, because according to available literature, biomimetic apatite has better osteoconductivity over the time and higher material resorption *in vivo* compared to commercially available biomaterials based on stoichiometric hydroxyapatite.

Author contributions

All authors have approved the final version of the manuscript.

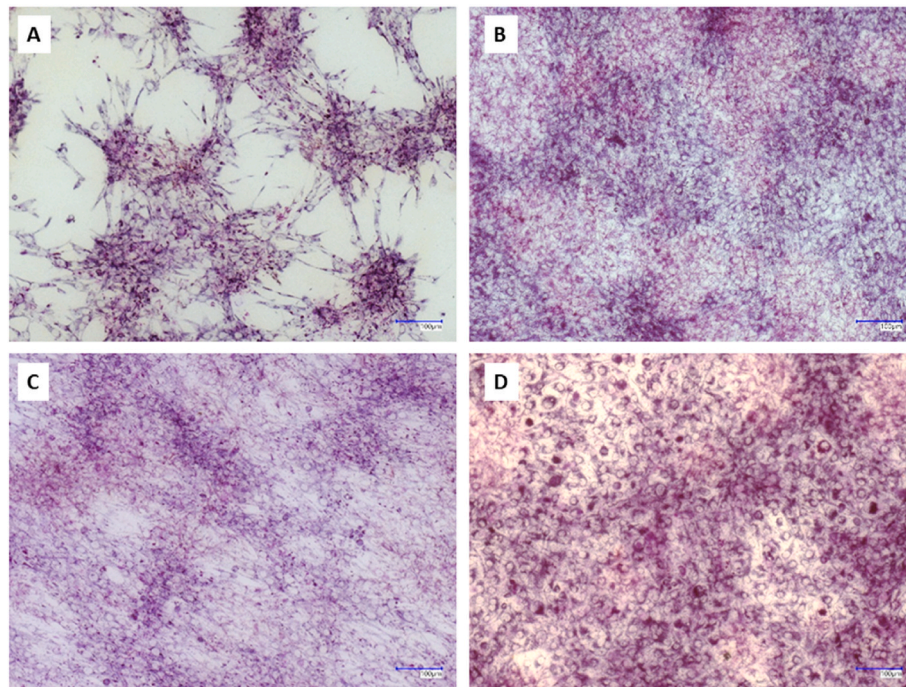


Fig. 7. Selected pictures of the MG-63 cells seeded on the tested materials after 7 days of incubation and treated with the MTT reagent (purple formazan crystals were present in living cells). A – an example of a not intensive growth, sample HC9RT1; B and C – examples of the samples LC11HT7 and HC11RT7 where the number of living cells were higher or similar to the results observed on the surface of the unmodified HAp; D – unmodified HAp. All pictures were taken with Keyence VHX-7000 digital microscope, length of 100 µm is marked on each photo (lower right corner). (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the Web version of this article.)

Declaration of competing interest

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

Acknowledgments

The authors acknowledge the Medical University of Warsaw for the financial support (FW23/N/21). Special thanks to Lukasz Pajchel (PhD) for help in physicochemical measurements.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online at <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2023.10.035>.

References

- [1] M.A. Meyers, P.Y. Chen, A.Y.M. Lin, Y. Seki, *Biological materials: structure and mechanical properties*, *Prog. Mater. Sci.* 53 (2008) 1–206.
- [2] H. Shi, Z. Zhou, W. Li, Y. Fan, Z. Li, J. Wei, Hydroxyapatite based materials for bone tissue engineering: a brief and comprehensive introduction, *Crystals* 11 (2) (Feb. 2021), <https://doi.org/10.3390/cryst11020149>. Art. no. 2.
- [3] C. Combes, S. Cazalbou, C. Rey, 'Apatite Biominerals', *Minerals* 6 (2) (2016), <https://doi.org/10.3390/min6020034>. Art. no. 2, Jun.
- [4] B. Wang, Z. Zhang, H. Pan, Bone apatite nanocrystal: crystalline structure, chemical composition, and architecture, *Biomimetics* 8 (1) (2023) 90.
- [5] I.L. Balasooriya, J. Chen, S.M. Korale Gedara, Y. Han, M.N. Wickramaratne, 'Applications of Nano Hydroxyapatite as Adsorbents: A Review', *Nanomaterials* 12 (14) (Jan. 2022), <https://doi.org/10.3390/nano12142324>. Art. no. 14.
- [6] B. Kolodziejska, L. Pajchel, A. Zgadzaj, J. Kolmas, A new, biomimetic collagen-apatite wound-healing composite with a potential regenerative and anti-hemorrhagic effect in dental surgery, *Materials* 15 (24) (2022) 8888.
- [7] G. Cho, Y. Wu, J.L. Ackerman, Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy, *Science* 300 (5622) (May 2003) 1123–1127, <https://doi.org/10.1126/science.1078470>.
- [8] J.D. Pasteris, et al., Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of the degree of atomic order: implications for bone and biomaterials, *Biomaterials* 25 (2) (Jan. 2004) 229–238, [https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(03\)00487-3](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(03)00487-3).
- [9] S. Castiglioni, A. Cazzaniga, W. Albisetti, J.A. Maier, Magnesium and osteoporosis: current state of knowledge and future research directions, *Nutrients* 5 (8) (2013) 3022–3033.
- [10] R. Ma, et al., Bacterial inhibition potential of 3D rapid-prototyped magnesium-based porous composite scaffolds—an in vitro efficacy study, *Sci. Rep.* 5 (1) (2015), 13775.
- [11] M.J. Hannon, J.G. Verbalis, Sodium homeostasis and bone, *Curr. Opin. Nephrol. Hypertens.* 23 (4) (Jul. 2014) 370–376.
- [12] J.S. Cho, et al., Enhanced osteoconductivity of sodium-substituted hydroxyapatite by system instability, *J. Biomed. Mater. Res. B Appl. Biomater.* 102 (5) (2014) 1046–1062.
- [13] A. Matsuura, et al., Bone formation ability of carbonate apatite-collagen scaffolds with different carbonate contents, *Dent. Mater. J.* 28 (2) (2009) 234–242.
- [14] Y. Fan, Z. Sun, J. Moradian-Oldak, Controlled remineralization of enamel in the presence of amelogenin and fluoride, *Biomaterials* 30 (4) (Feb. 2009) 478–483, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2008.10.019>.
- [15] A. Bigi, E. Boanini, M. Gazzano, 7 - ion substitution in biological and synthetic apatites, in: C. Aparicio, M.-P. Ginebra (Eds.), *Biomineralization and Biomaterials*, Woodhead Publishing, Boston, 2016, pp. 235–266, <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-338-6.00008-9>.
- [16] K. Ishikawa, K. Hayashi, Carbonate apatite artificial bone, *Sci. Technol. Adv. Mater.* 22 (Jan. 2021) 683–694, <https://doi.org/10.1080/14686996.2021.1947120>. BioJ.
- [17] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, L. Vichi, M. Sandri, Influence of synthesis and sintering parameters on the characteristics of carbonate apatite, *Biomaterials* 25 (10) (May 2004) 1763–1770, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2003.08.026>.
- [18] D.G. Nelson, J.D. Featherstone, Preparation, analysis, and characterization of carbonated apatites, *Calcif. Tissue Int.* 34 (Suppl 2) (Jan. 1982) S69–S81.
- [19] A. Tampieri, G.C. Celotti, E. Landi, M. Sandri, Magnesium doped hydroxyapatite: synthesis and characterization, *Key Eng. Mater.* 264–268 (2004) 2051–2054, <https://doi.org/10.4028/www.scientific.net/KEM.264-268.2051>.
- [20] D. Laurencin, et al., Magnesium incorporation into hydroxyapatite, *Biomaterials* 32 (7) (Mar. 2011) 1826–1837, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2010.11.017>.
- [21] K.A. Khalil, A.A. Almajid, Effect of high-frequency induction heat sintering conditions on the microstructure and mechanical properties of nanostructured magnesium/hydroxyapatite nanocomposites, *Mater. Des.* 36 (1980) (2015) 58–68, <https://doi.org/10.1016/j.matdes.2011.11.008>. Apr. 2012.
- [22] A. Bigi, G. Falini, E. Foresti, A. Ripamonti, M. Gazzano, i N. Roveri, Magnesium influence on hydroxyapatite crystallization, *J. Inorg. Biochem.* 49 (1) (1993) s. 69–78.

- [23] J.H. Shepherd, D.V. Shepherd, i S.M. Best, 'Substituted hydroxyapatites for bone repair', *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (10) (2012) 2335–2347.
- [24] J. Kolmas, S. Krukowski, A. Laskus, M. Jurkitewicz, Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications, *Ceram. Int.* 42 (2) (2016) 2472–2487.
- [25] M.S. Sader, K. Lewis, G.A. Soares, R.Z. LeGeros, Simultaneous incorporation of magnesium and carbonate in apatite: effect on physico-chemical properties, *Mater. Res.* 16 (Aug. 2013) 779–784, <https://doi.org/10.1590/S1516-14392013005000046>.
- [26] I.R. Gibson, W. Bonfield, Preparation and characterization of magnesium/carbonate co-substituted hydroxyapatites, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 13 (7) (2002) 685–693, <https://doi.org/10.1023/A:1015793927364>. Jul.
- [27] H. Damayanti, et al., Synthesis of carbonate hydroxyapatite contained magnesium cations by dry mechano-milling, *Mater. Lett.* 338 (May 2023), 133999, <https://doi.org/10.1016/j.matlet.2023.133999>.
- [28] Y. Jiang, Z. Yuan, J. Huang, Substituted hydroxyapatite: a recent development, *Mater. Technol.* 35 (11–12) (Oct. 2020) 785–796, <https://doi.org/10.1080/10667857.2019.1664096>.
- [29] N. Vandecandelaere, C. Rey, C. Drouet, Biomimetic apatite-based biomaterials: on the critical impact of synthesis and post-synthesis parameters, *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 23 (11) (2012) 2593–2606, <https://doi.org/10.1007/s10856-012-4719-y>. Nov.
- [30] L. Müller, F.A. Müller, Preparation of SBF with different HCO₃⁻ content and its influence on the composition of biomimetic apatites, *Acta Biomater.* 2 (2) (Mar. 2006) 181–189, <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2005.11.001>.
- [31] S.A. Hutchens, R.S. Benson, B.R. Evans, H.M. O'Neill, C.J. Rawn, Biomimetic synthesis of calcium-deficient hydroxyapatite in a natural hydrogel, *Biomaterials* 27 (26) (Sep. 2006) 4661–4670, <https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.04.032>.
- [32] N. Vargas-Becerril, et al., Structure of biomimetic apatite grown on hydroxyapatite (HA), *Ceram. Int.* 46 (18) (Dec. 2020) 28806–28813, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2020.08.044>. Part A.
- [33] P. Gentile, C.J. Wilcock, C.A. Miller, R. Moorehead, P.V. Hatton, Process optimisation to control the physico-chemical characteristics of biomimetic nanoscale hydroxyapatites prepared using wet chemical precipitation, *Materials* 8 (5) (May 2015), <https://doi.org/10.3390/ma8052297>. Art. no. 5.
- [34] R.G. Handschin i, W.B. Stern, „Crystallographic and chemical analysis of human bone apatite (Crista Iliaca).”, *Clin. Rheumatol.* 13 (1994), 75–90.
- [35] N.A.S. Mohd Pu'ad, R.H. Abdul Haq, H. Mohd Noh, H.Z. Abdullah, M.I. Idris, T. C. Lee, Synthesis method of hydroxyapatite: a review, *Mater. Today Proc.* 29 (Jan. 2020) 233–239, <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2020.05.536>.
- [36] I.O. for Standardization, ISO 10993-5: 2009-Biological Evaluation of Medical Devices-Part 5: Tests for in Vitro Cytotoxicity, ISO Geneva, 2009.
- [37] M.P. Ferraz, F.J. Monteiro, C.M. Manuel, Hydroxyapatite nanoparticles: a review of preparation methodologies, *J. Appl. Biomater. Biomech.* 2 (2) (2004) 74–80.
- [38] J. Kolmas, U. Piotrowska, M. Kuras, E. Kurek, Effect of carbonate substitution on physicochemical and biological properties of silver containing hydroxyapatites, *Mater. Sci. Eng. C* 74 (2017) 124–130.
- [39] F. Ren, R. Xin, X. Ge, et al., Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites, *Acta Biomater.* 5 (2009) 3141–3149.
- [40] B. Jokić, M. Mitrić, V. Radmilović, S. Drmanić, R. Petrović, D. Janačković, Synthesis and characterization of monelite and hydroxyapatite whiskers obtained by a hydrothermal method, *Ceram. Int.* 37 (1) (Jan. 2011) 167–173, <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2010.08.032>.
- [41] E. Nessler, S.C. Boyatzis, N. Boukos, i G. Panagiaris, Optimizing the biomimetic synthesis of hydroxyapatite for the consolidation of bone using diammonium phosphate, simulated body fluid, and gelatin", *SN Appl. Sci.* 2 (2020) 1–20.
- [42] M.H. Santos, M. de Oliveira, L.P. de F. Souza, H.S. Mansur, i W.L. Vasconcelos, Synthesis control and characterization of hydroxyapatite prepared by wet precipitation process", *Mater. Res.* 7 (2004) 625–630.
- [43] X. Li, Q. Zou, H. Chen, W. Li, In vivo changes of nanoapatite crystals during bone reconstruction and the differences with native bone apatite, *Sci. Adv.* 5 (11) (2019) eaay6484.
- [44] E. Landi, A. Tampieri, G. Celotti, S. Sprio, Sintering behaviour and mechanisms of synthetic hydroxyapatites, *J. Eur. Ceram. Soc.* 20 (14–15) (2000) 2377–2387.
- [45] G.M. Poralan, J.E. Gambe, E.M. Alcantara, R.M. Vequizo, X-ray diffraction and infrared spectroscopy analyses on the crystallinity of engineered biological hydroxyapatite for medical application, in: *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering*, IOP Publishing, 2015, 012028.
- [46] P.S. Prevéry, X-ray diffraction characterization of crystallinity and phase composition in plasma-sprayed hydroxyapatite coatings, *J. Therm. Spray Technol.* 9 (2000) 369–376.
- [47] C. Rey, H.-M. Kim, L. Gerstenfeld, M.J. Glimcher, Structural and chemical characteristics and maturation of the calcium-phosphate crystals formed during the calcification of the organic matrix synthesized by chicken osteoblasts in cell culture, *J. Bone Miner. Res.* 10 (10) (1995) 1577–1588.
- [48] Y. Sa, et al., Are different crystallinity-index-calculating methods of hydroxyapatite efficient and consistent? *New J. Chem.* 41 (13) (Jun. 2017) 5723–5731, <https://doi.org/10.1039/C7NJ00803A>.
- [49] E. Landi, G. Logroscino, L. Proietti, A. Tampieri, M. Sandri, i S. Sprio, Biomimetic Mg-substituted hydroxyapatite: from synthesis to in vivo behaviour", *J. Mater. Sci. Mater. Med.* 19 (nr 1) (2008) 239–247, <https://doi.org/10.1007/s10856-006-0032-y>, sty.
- [50] K. Ishikawa, 'Carbonate apatite bone replacement: learn from the bone', *J. Ceram. Soc. Jpn.* 127 (2019) 595–601, nr 9.
- [51] J. Kolmas, et al., Incorporation of carbonate and magnesium ions into synthetic hydroxyapatite: the effect on physicochemical properties, *J. Mol. Struct.* 987 (1–3) (2011) 40–50.
- [52] C. Rey, V. Renugopalakrishnan, M. Shimizu, B. Collins, M.J. Glimcher, A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃²⁻ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation, *Calcif. Tissue Int.* 49 (1991) 259–268.
- [53] A. Kafkaf, A. Ślósarczyk, W. Kolodziejski, A comparative study of carbonate bands from nanocrystalline carbonated hydroxyapatites using FT-IR spectroscopy in the transmission and photoacoustic modes, *J. Mol. Struct.* 997 (1) (2011) 7–14, <https://doi.org/10.1016/j.jmolstruc.2011.04.013>. Jun.
- [54] J. Kolmas, M. Szwaja, W. Kolodziejski, Solid-state NMR and IR characterization of commercial xenogeneic biomaterials used as bone substitutes, *J. Pharm. Biomed. Anal.* 61 (2012) 136–141.
- [55] D. Magne, P. Weiss, J.-M. Bouler, O. Laboux, G. Daculsi, Study of the maturation of the organic (type I collagen) and mineral (nonstoichiometric apatite) constituents of a calcified tissue (dentin) as a function of location: a Fourier transform infrared microspectroscopic investigation, *J. Bone Miner. Res.* 16 (4) (2001) 750–757.
- [56] J. Kolmas, E. Kalinowski, A. Wojtowicz, W. Kolodziejski, Mid-infrared reflectance microspectroscopy of human molars: chemical comparison of the dentin-enamel junction with the adjacent tissues, *J. Mol. Struct.* 966 (1–3) (2010) 113–121.
- [57] V. Rodríguez-Lugo, i in. Wet chemical synthesis of nanocrystalline hydroxyapatite flakes: effect of pH and sintering temperature on structural and morphological properties", *R. Soc. Open Sci.* 5 (2018), 180962 nr 8.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites

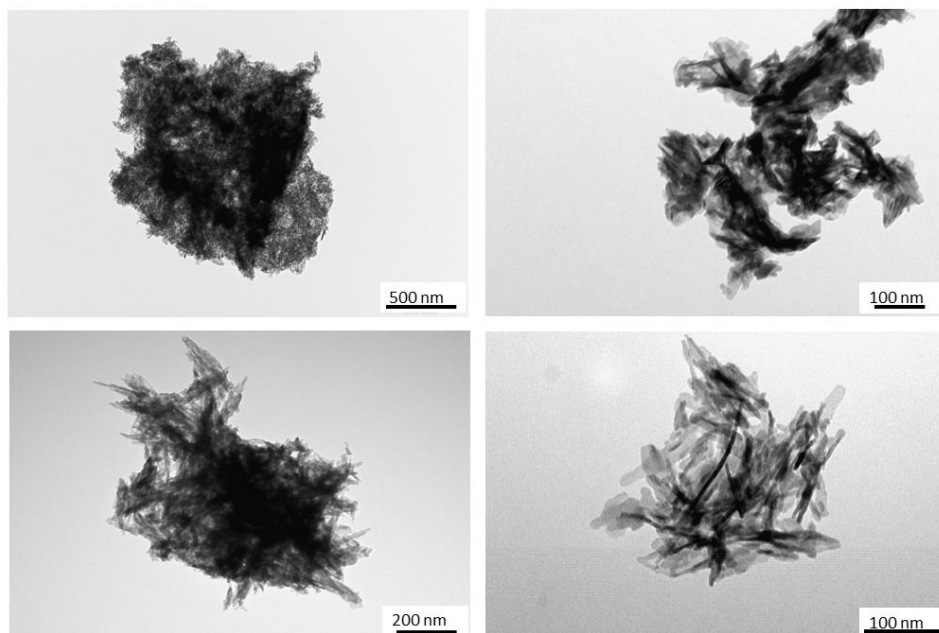
Barbara Kołodziejska¹, Niccolo Sturaro², Anna Zgadzaj³, Joanna Kolmas¹

¹ Department of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

² Faculty of Pharmacy, University of Padova, Via Marzolo 5, 35131 Padova

³ Department of Toxicology and Bromatology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

A



B

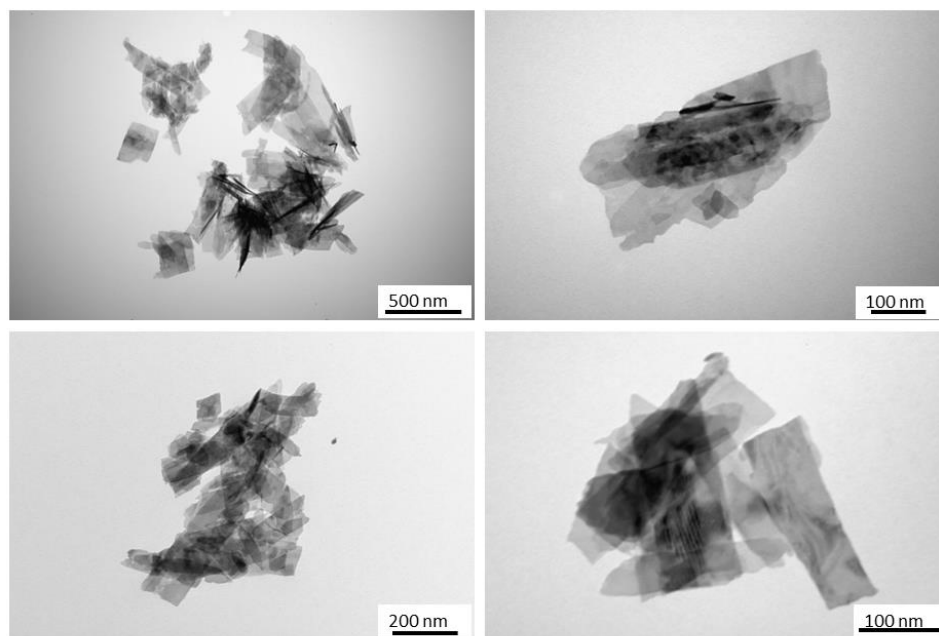


Figure 1S. Representative TEM images taken with different magnifications from LC9RT7 (A) and LC9HT1 (B) samples.

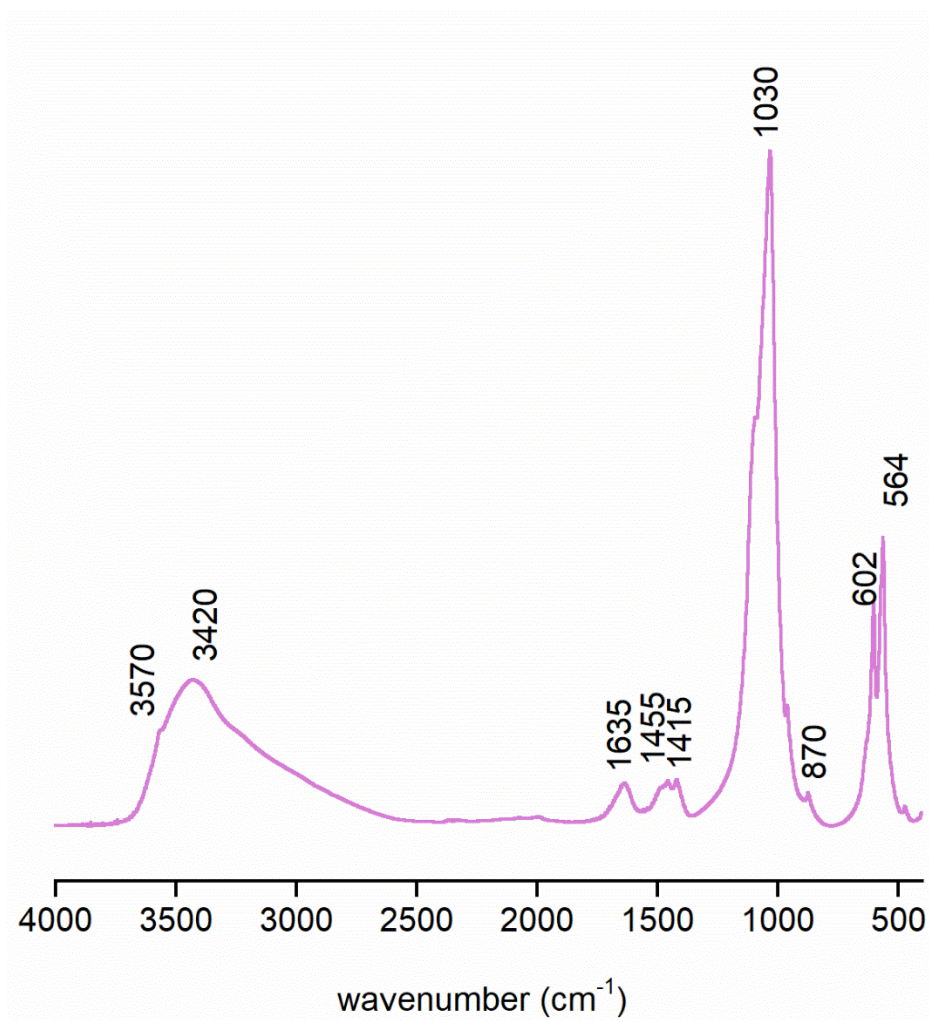


Figure 2S. Representative FT-IR spectrum of the modified hydroxyapatite (sample LC9RT7).

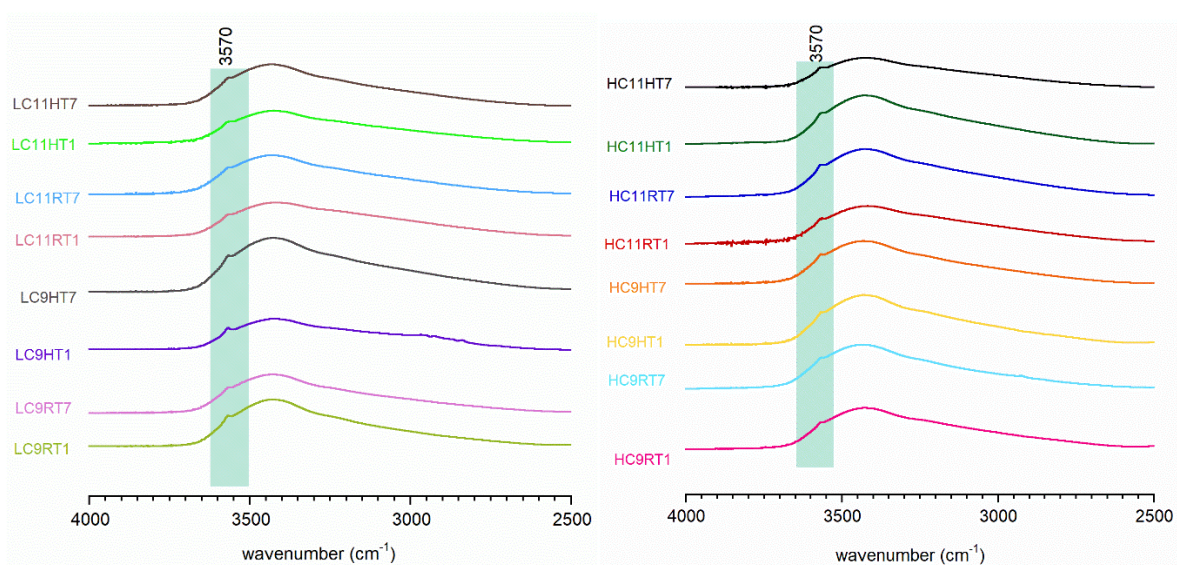


Figure 3S. FT-IR spectra in 4000-2000 cm^{-1} region.

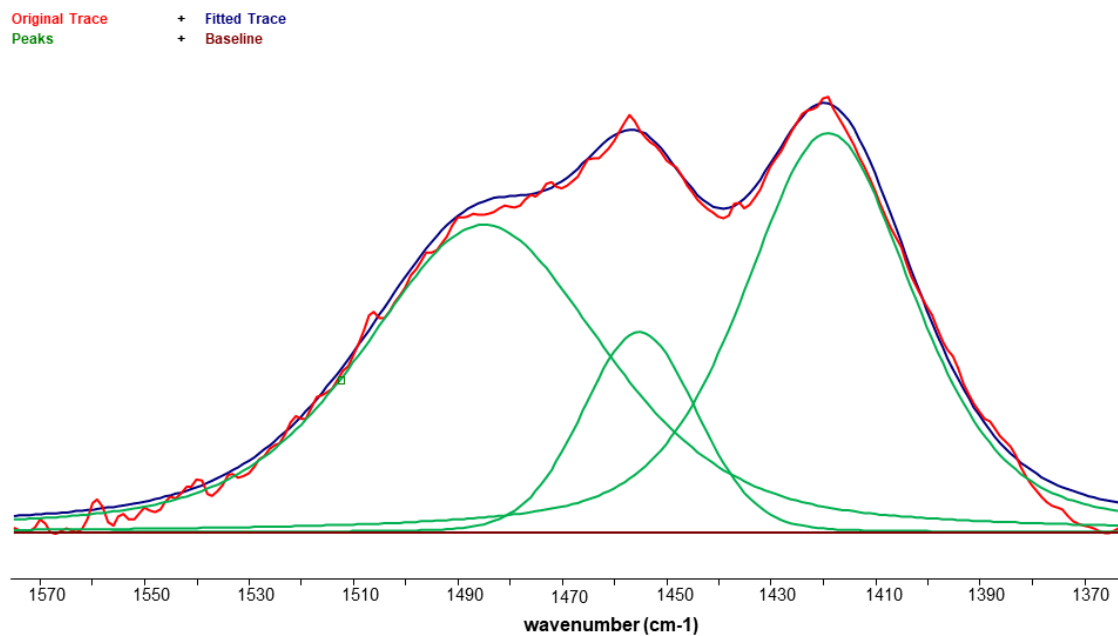


Figure 4S. Curve fitting of the carbonates bands (in 1570-1350 cm⁻¹ region).

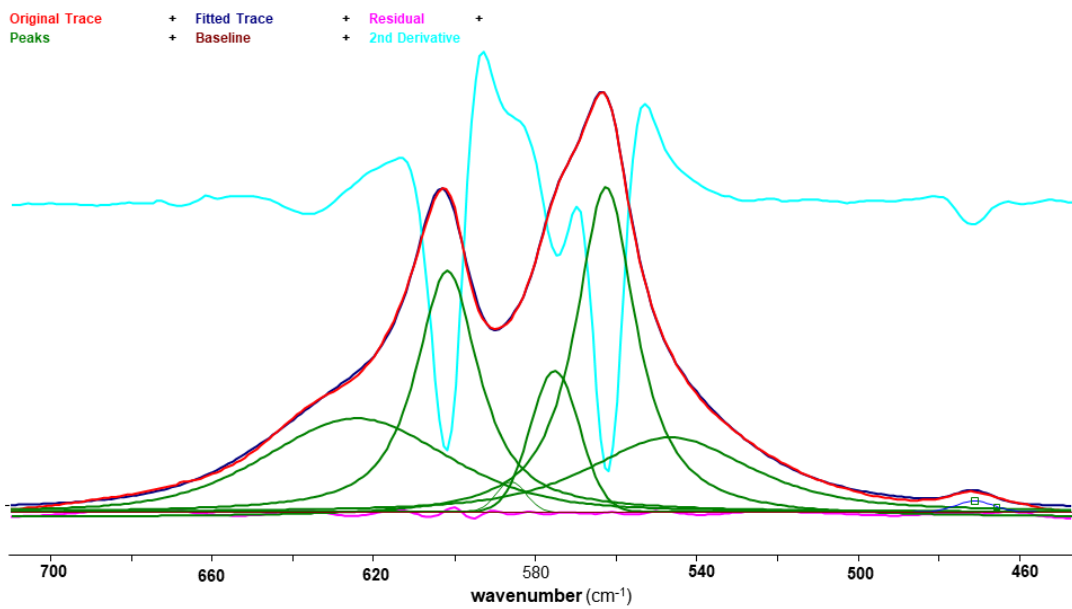


Figure 5S. Curve fitting of 700-450 cm⁻¹ region.

Table 1S. Curve fitting results for the ν_4 - PO_4^{3-} domain and the accompanying librational bands from hydroxyl groups.

Position (cm^{-1})	Assignment
627	OH ⁻ , librational mode
602	Regular apatitic PO_4^{3-} environment
586	Regular apatitic PO_4^{3-} environment
575	Regular apatitic PO_4^{3-} environment
563	Regular apatitic PO_4^{3-} environment
546	HPO_4^{2-} ions buried in the crystal lattice

Warszawa, 26.10.2023

mgr farm. Barbara Kołodziejka

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites.*

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:

opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, przeprowadzenie syntez wielopodstawionych apatytów, wykonanie badań fizykochemicznych, udział w interpretacji wyników, przygotowanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 60 %.

Barbara Kołodziejka

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr hab. n. farm. Joanna Kolmas

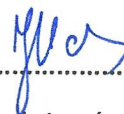
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. *Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites.*

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja i nadzór merytoryczny nad częścią eksperymentalną, interpretacja części wyników i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 20 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejskiej.



.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

MSc Niccolo Sturaro

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
przeprowadzenie syntez wielopodstawionych apatytów, wykonanie badań fizykochemicznych.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określám jako 10 %.

Jednocześnie wyrażám zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.

.....


(podpis oświadczającego)

Warszawa, 27.10.2023

dr n. farm. Anna Zgadzaj

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
ocena cytotoksyczności próbek na hodowlach komórkowych *in vitro*.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.

.....

(podpis oświadczającego)

Article

A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery

Barbara Kolodziejska ¹, Lukasz Pajchel ¹ , Anna Zgadzaj ²  and Joanna Kolmas ^{1,*} 

¹ Department of Analytical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

² Department of Environmental Health Science, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

* Correspondence: joanna.kolmas@wum.edu.pl; Tel.: +48-22-572-07-55

Abstract: The aim of this work was to obtain and characterize composite biomaterials containing two components, namely carbonated hydroxyapatite, which was substituted with Mg²⁺ and Zn²⁺ ions, and natural polymer–collagen protein. The following two different types of collagen were used: lyophilized powder of telocollagen from bovine Achilles tendon and atelocollagen solution from bovine dermis. The obtained 3D materials were used as potential matrices for the targeted delivery of tranexamic acid for potential use in wound healing after tooth extractions. Tranexamic acid (TXA) was introduced into composites by two different methods. The physicochemical analyses of the obtained composites included Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR), inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy (ICP-OES), transmission electron microscopy (TEM), scanning electron microscopy (SEM), powder X-ray diffraction (PXRD), release kinetics tests, swelling test, and cytotoxicity assays. The studies showed that the proposed synthetic methods yielded biomaterials with favorable physicochemical properties, as well as the expected release profile of the drug and ions from the matrices.

Keywords: composite biomaterials; carbonate hydroxyapatite; zinc; magnesium; tranexamic acid; drug delivery; wound healing



Citation: Kolodziejska, B.; Pajchel, L.; Zgadzaj, A.; Kolmas, J. A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery. *Materials* **2022**, *15*, 8888. <https://doi.org/10.3390/ma15248888>

Academic Editor: Iulian Vasile Antoniac

Received: 3 November 2022

Accepted: 11 December 2022

Published: 13 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

The extracellular matrix of bone is a composite material consisting primarily of calcium phosphate apatite, collagen type I, and water. The chemical composition of osseous tissue depends on hormonal, nutritional, and mechanical factors, as well as on the bone's location. It is assumed that 60–70 wt.% of bone tissue is in mineral phase, 20–30 wt.% is an organic matrix, and the rest is water [1,2]. Mineral fraction is formed by thin, plate-like nanocrystals of calcium- and hydroxyl-ion-deficient hydroxyapatite, enriched with a variety of different ions (e.g., Mg²⁺, K⁺, Na⁺, Mn²⁺, CO₃²⁻, SiO₄⁴⁻) [3,4]. The apatite nanocrystals are oriented with their *c*-axis parallel to each other and aligned with collagen molecules [5].

Bone tissue is known for its remodeling ability. However, in special cases of bone defects, such as trauma, osteomyelitis, osteosarcoma, or complicated tooth extraction, when natural bone regeneration fails, some clinical interventions are required [1].

Currently, biomaterial engineering is still looking for the ideal bone-substitute material, which should exhibit properties such as biocompatibility, durability, appropriate porous structure, osteoconduction, bioactivity, etc. [6]. Therefore, to achieve structural integrity and great tensile strength, selecting an ideal biomaterial is a challenge [7]. Collagen–apatite composites have attracted extensive attention from researchers due to their great similarity to bone tissue and very promising properties [4,8–11]. So far, the composites have been obtained primarily using stoichiometric hydroxyapatite with the general formula

$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. However, HA in its stoichiometric form is characterized by poor bioactivity and weak bioresorbability; therefore, it does not fully simulate the properties of osseous apatite [12]. The high ease of ionic substitution in HA crystals enables the introduction of ions present in natural apatite, but it also yields the modification of ions with additional favorable properties.

In our work, HA was substituted with two main “impurities” of bone apatite, magnesium, and carbonates, as well as with zinc ions. Magnesium is required to maintain homeostasis in mineralized tissues. It stimulates osteoblasts and influences the secretion of parathyroid hormone (PTH) and vitamin D. Magnesium deficiency increases the activity of osteoclasts, which contributes to bone loss [13,14]. Approximately 5–8 wt.% carbonates are present in bone apatite. Carbonates significantly affect the morphology and physico-chemical properties of apatite crystals: they increase the c-axial length, decrease the a-axial length, and improve bioresorbability and porosity [15,16].

In turn, zinc stimulates the process of osteoblastogenesis and the production of bone growth factors. It takes part in the mineralization of bone tissue and inhibits bone resorption [17–19].

It is worth noting that, during orthopedic surgery or several dental procedures, hemorrhages are a serious problem in surgery. Often in such situations, blood transfusions are performed, but it is known that they are associated with many complications, such as blood-borne infections, immune cross-reactions, or thromboembolic events [20,21]. A promising solution to this problem may be to offer a new function to the scaffold material—it can serve as a carrier for a hemostatic drug to shorten the bleeding and reduce blood loss. One of these drugs is tranexamic acid (TXA). Its mechanism of action is reversibly blocking lysine-binding sites of plasminogen, resulting in the conversion of plasminogen to plasmin being blocked, thereby preventing the dissolution of the fibrin clot. In this way, the antifibrinolytic effect is achieved [22,23]. The application of the drug directly at the site of action can significantly reduce both the therapeutic dose and the occurrence of unfavorable side effects [24]. It should not be forgotten that plasminogen is a very important factor in the wound-healing process. It leads to cytokine induction and intracellular-signaling events, resulting in an enhanced and early inflammatory response. TXA would be helpful in controlling the bleeding, but the inhibition of plasminogen results in poor angiogenesis in the healing area [25–27]. In our opinion, its use in minor procedures (e.g., dental) is justified because we want to quickly stop bleeding in a relatively small surgical area. Moreover, our goal is to quickly release TXA from the composite matrix. After the release of TXA, the material is supposed to act as a bone-substitute material, slowly releasing additional zinc and magnesium ions that have a positive effect on bone growth.

So far, there have been several studies on the local delivery of TXA by calcium-phosphate-based materials and there is scope for further development [28].

It should be mentioned that collagen (in the form of sponges) is also used as a topical hemostatic agent. It serves as a matrix of clot formation. Moreover, it plays the role of initiator of the coagulation cascade. The use of tranexamic acid in combination with collagen may be considered in the prevention of excessive blood loss [29–31].

The aim of this work is to develop a new, three-dimensional collagen/modified nanoapatite composite containing TXA. Due to the hemostatic effect of TXA and collagen, it could be potentially used as a wound dressing in dental surgery, i.e., socket grafting and alveolar bone preservation. The use of biomimetic apatite with zinc ions may induce a natural process of bone tissue regeneration, which is an important issue after tooth extraction [32].

2. Materials and Methods

2.1. Samples Preparation

The mineral fraction of the composite, consisting of carbonate hydroxyapatite containing magnesium and zinc ions, was synthesized using the wet precipitation method in an air atmosphere. Calcium nitrate (V) tetrahydrate ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$), diammonium car-

bonate ((NH₄)₂CO₃), purchased from Chempur (Piekary Śląskie, Poland), and ammonium phosphate dibasic ((NH₄)₂HPO₄), zinc nitrate hexahydrate (Zn(NO₃)₂·6H₂O), magnesium chloride anhydrous (MgCl₂), purchased from Sigma Aldrich (Bangalore, India), were used as the substrates for the synthesis. All the reagents were weighed out to obtain the compound with the nominal composition Ca_{8,25}Zn_{0,5}Mg_{0,25}(PO₄)₅CO₃OH and then dissolved separately in distilled water. The sources of phosphates and carbonates were slowly added to the sources of calcium, zinc, and magnesium, stirring constantly. The pH was adjusted to 11 using a concentrated ammonia solution, and the obtained suspensions were then mixed for two hours. The slurry was left to age for 7 days without being stirred. This process of aging is of great importance in ensuring biocompatibility and the mapping of the physicochemical properties of biological apatite. After that, the precipitate was washed several times with distilled water, filtered, and dried at a temperature of 100 °C for 24 h. Then, the material was crushed in an agate mortar to subject it to further tests and use in a composite synthesis. The powder was named mHA (mimetic hydroxyapatite).

mHA and two different types of collagen were used as starting materials to obtain the composites. As collagen proteins, collagen type I from bovine Achilles tendon (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and atelocollagen from bovine dermis (3 mg/mL) (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan), were used. Type I collagen was suspended in 1% acetic acid to obtain a 0.5% solution of collagen. Then, 10 mL of collagen slurry was mixed at 4 °C with 240 mg of the mHA powder using a mechanical stirrer until a satisfactory level of homogeneity was achieved. After that, the pH of the slurry was adjusted to 8 using a concentrated ammonia solution. The precipitate was washed several times with distilled water, frozen, and freeze-dried. Composites with atelocollagen were obtained identically, except for the preparation of the collagen suspension.

TXA (purchased from TCI Chemicals, Belgium) was added to both composites at two different stages of synthesis. The first way was to add 10 mg of TXA directly to the obtained suspension (before freezing). The other method consisted of soaking the obtained composites for one hour in a drug solution (0.3 mol/L) after lyophilization. Then, the composites were again frozen and lyophilized. All types of the obtained composites are presented in Table 1.

Table 1. Types of composites.

Sample	Collagen Type	TXA Addition Method
AmHA	atelocollagen from bovine dermis	-
OmHA	collagen type I from bovine Achilles tendon	-
AmHA1	atelocollagen from bovine dermis	direct addition of TXA powder before freeze-drying
AmHA2	atelocollagen from bovine dermis	soaking in a TXA solution
OmHA1	collagen type I from bovine Achilles tendon	direct addition of TXA powder before freeze-drying
OmHA2	collagen type I from bovine Achilles tendon	soaking in a TXA solution

2.2. Analytical Methods

To confirm the identity of the obtained powder and composites, Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) studies were performed using a PerkinElmer Spectrum 1000 (Waltham, MA, USA) spectrometer. Transmission spectra were acquired in the 4000–400 cm⁻¹ range at a spectral resolution of 2 cm⁻¹ from KBr pellets using 30 scans. All of the obtained spectra were processed using GRAMS/AI 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and KaleidaGraph 3.5 (Synergy Software, Reading, PA, USA) software.

The phase composition of the synthesized powder was analyzed by powder X-ray diffraction (PXRD). The patterns were collected using a Bruker DX8 Discover diffractometer

(Billerica, MA, USA) using (CuK α radiation $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$), in the 2 theta range from 20° to 70°. The crystallite size was determined using the Scherrer formula:

$$d = \frac{0.94\lambda}{\beta \cos \theta'}$$

where

d is the crystallite size (nm),

λ is the X-ray wavelength (nm),

β is the line broadening at half the maximum intensity (radians), and

θ is the Bragg angle for the corresponding reflection (°).

To estimate the crystallite size along the a and c axes, reflections at approximately 26.1° and 39.5°, respectively, were chosen.

The microstructural features of the powder sample were studied using the high-performance JEM 1400 transmission electron microscope (TEM-JEOL Co., Tokyo, Japan, 2008), equipped with an 11-megapixel MORADA G2 TEM camera (EMSIS GmbH, Germany) under an accelerating voltage of 80 kV. The analyzed material was prepared by suspending the powder sample in 96% ethanol, then dropping it onto a copper grid, followed by air-drying.

The concentration of calcium, phosphorus, magnesium, and zinc was measured via inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy (ICP-OES), using an Optima 3100 XL PerkinElmer spectrometer (Llantrisant, UK). The powder sample was dissolved in concentrated HNO₃ (Suprapur, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and diluted properly with deionized water. To calculate the carbonate content (types A + B), a method described previously by Clasen and Ruyter was used [33,34].

To determine the morphology of the composites, scanning electron microscopy (SEM-JSM-6390LV JEOL microscope, JEOL LTD., Tokyo, Japan) at a 20 or 30 kV accelerating voltage was chosen.

The *in vitro* cytotoxicity assessment was conducted. The neutral red uptake test was performed based on ISO 10993 guideline Annex A [35] with a BALB/c 3T3 clone A31 mammalian cell line (mouse embryonic fibroblasts from the American Type Culture Collection). The quantitative estimation of viable cells in the tested cultures was based on their neutral red uptake in comparison to the results obtained for the untreated cells. Dead cells had no ability to accumulate the dye in their lysosomes. The BALB/c 3T3 cells were seeded in 96-well microplates (15,000 cells/100 μ L) in a DMEM (Lonza, Walkersville, MD, USA) culture medium (supplemented with 10% calf bovine serum, 100 IU/mL penicillin, and 0.1 mg/mL streptomycin) and incubated for 24 h (5% CO₂, 37 °C, >90% humidity). At the end of the incubation, each well was examined under a microscope to ensure that the cells formed a confluent monolayer. Afterwards, the culture medium was replaced with the tested extracts. Extracts were prepared by incubating the tested materials in the cell culture medium (50 mg/mL) with a reduced serum concentration (5%) at 37 °C for 24 h with shaking and sterilization by filtration. Cells were treated with four dilutions of each extract in a two-fold dilution series for 24 h (three data points for each one). Subsequently, the treatment medium was removed. Cells were washed with PBS and treated with the neutral red medium for 2 h. Then, the medium was discarded, and cells were washed with PBS and treated with desorbing fixatives (ethanol and acetic acid in water solution). The amount of neutral red accumulated by cells was evaluated colorimetrically at 540 nm. Polyethylene film and latex were used as the reference materials (with no cytotoxicity and high cytotoxicity, respectively). The percentage of viable cells in each well was calculated by comparing its OD₅₄₀ result with the mean result obtained for the untreated cells (incubated in the same conditions as the fresh culture medium). Samples were considered cytotoxic if they reduced cell survival to below 70% compared to the untreated cells (baseline cell viability). When BALB/c 3T3 cell viability did not decrease to under 70% in the whole range of tested dilutions of the samples, it was considered non-cytotoxic in this range of concentrations.

The swelling ratio of the obtained composites (OmHA1, OmHA2, AmHA1, and AmHA2) and the pure collagen sponge (1 cm × 1 cm × 1 cm) was measured by incubation in ultrapure water at 37 °C. Subsequently, the samples were withdrawn from the solution after soaking for 15, 30, 60, 180, and 360 min, and the surface adsorbed water was removed by filter paper. The swelled samples were then weighed immediately. The swelling ratio was definite as the ratio of weight increased ($W-W_0$) to the initial weight (W_0). Each sample was tested in triplicate.

The *in vitro* release of TXA from the composites was evaluated in Falcon 50 mL tubes. The studies were performed in a phosphate buffer (pH = 7.4). Each tube contained 250 mg of a specific type of composite immersed in 50 mL of the release medium in the bath shaker and stirred at 100 rpm at 37 °C before being incubated for seven days. Sample aliquots of 5 mL were withdrawn at regular time intervals (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h). All the samples were filtered through a membrane syringe filter with a pore size of 0.8 µm. Each time, the volume of the medium taken for analysis was replaced with a new phosphate buffer portion. The samples were then analyzed by HPLC using chromatographic equipment, consisting of a Varian Prostar 210 isocratic pump (Palo Alto, CA, USA) and a Rheodyne 7725i injector (Cotati, CA, USA) with a 20 µL sample loop. Detection was performed by a Varian Prostar 325 UV detector using a detection wavelength of 220 nm. The chromatographic conditions and measurement procedures were previously described [36]. The LC column used was a 4.6 mm i.d. × 250 mm length XTerra RP 18 analytical column that was purchased from Waters (Milford, Ireland). The mobile phase consisted of anhydrous sodium dihydrogen phosphate, sodium lauryl sulfate, and triethyl amine (pH 2.5) mixed with methanol in a ratio (60:40, v/v). It was degassed by sonication before use. The flow rate of the mobile phase was maintained at 1 mL/min. HPLC analysis was conducted at 30 °C. Peak areas were measured for the quantitation of the TXA. Stock solutions of TXA 500 ppm were prepared by dissolving the appropriate amount in water. Calibration standards were prepared over a concentration range of 20, 50, 100, 250, and 500 ppm for TXA by the appropriate dilutions of the above-mentioned standard solution. Calibration standards were analyzed in triplicate for the calibration curve.

The *in vitro* release of zinc and magnesium ions was studied in the same manner as the TXA release test. However, a decision was made to extend the duration of the experiment, and the samples were withdrawn at the following intervals: 15 min; 30 min; 1 h; 3 h; 6 h; 12 h; 1 day; 2 days; and 7 days. The concentration of magnesium and zinc ions released into the PBS solution was determined by ICP-OES using an Optima 3100XL spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

3. Results

3.1. Physicochemical Properties of mHA Powder

The FT-IR spectrum of the obtained mHA powder is presented in Figure 1A. It exhibits the bands characteristic of orthophosphate ions at 1020 cm^{-1} and 560–610 cm^{-1} , assignable to $\nu_1 + \nu_3(\text{PO}_4)$ and $\nu_4(\text{PO}_4)$, respectively. The wide bands at approximately 3450 cm^{-1} and 1640 cm^{-1} can be assigned to the stretching and bending vibrations, respectively, of the OH groups from physically adsorbed water. The bands in the 1550–1400 cm^{-1} region and a small band at 870 cm^{-1} refer to the CO_3^{2-} groups. The curve-fitting process of the 1550–1400 cm^{-1} region (data not shown) depicts three main bands at 1510, 1450, and 1420 cm^{-1} . The band at 1510 cm^{-1} belongs to carbonate type A (the substituting structural hydroxyl groups) and constitutes about 15% of the integral intensity of this region. The most intensive band at 1420 cm^{-1} (60% of the integral intensity) is typical in carbonates substituted for orthophosphates (type B), while the band at 1450 cm^{-1} refers to both types of carbonates. Thus, it can be concluded that carbonate ions present in the apatite structure are mainly located in place of phosphates.

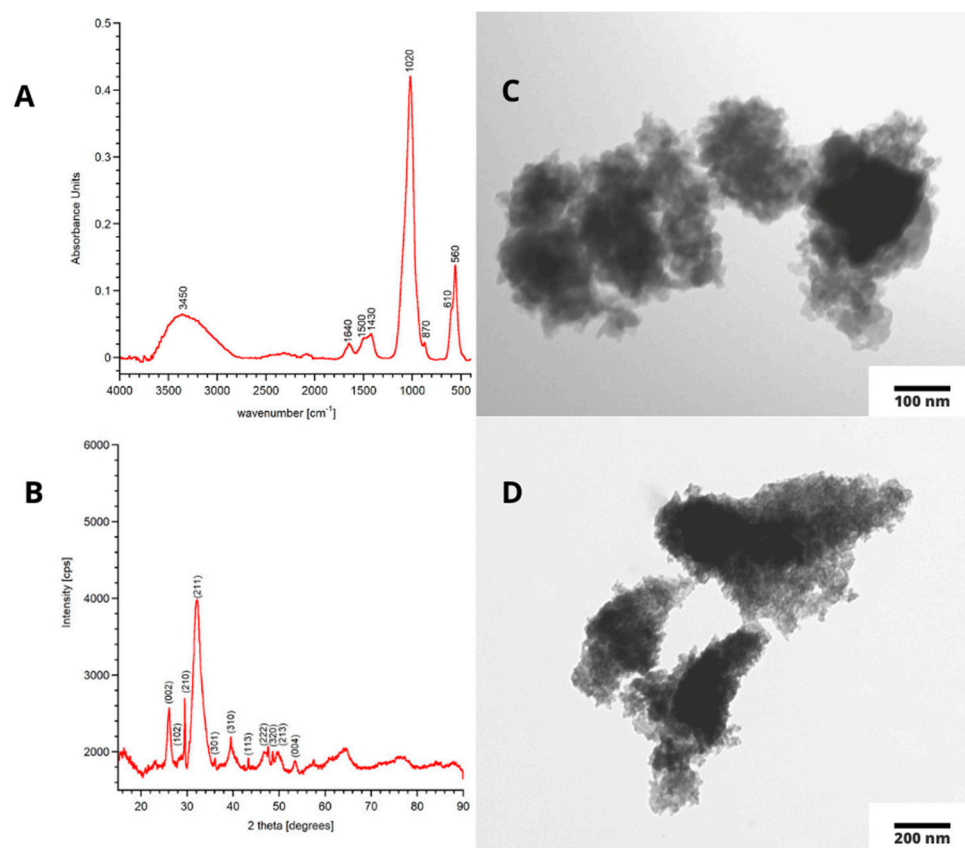


Figure 1. FT–IR spectrum of mHA-(A), PXRD diffractogram of mHA-(B), TEM images of mHA-(C,D).

The total content of carbonate ions calculated by the Clasen and Ruyter method was estimated to be 6.4 ± 0.3 wt.%, which is very close to the expected value (6.5%).

It is worth emphasizing that the large width of all bands present in the spectrum indicates the poorly crystalline nature of the material obtained. This is also evidenced by the weak separation of the phosphate bands, as well as the lack of a detectable band at 3570 cm^{-1} , corresponding to the stretching vibrations of the structural OH groups.

The PXRD diffractogram of the mHA sample is shown in Figure 1B. The pattern reveals the reflections originating from only one crystalline phase of hydroxyapatite (ICDD 09-0432).

As is clearly seen, the reflections are broad and poorly resolved, which is typical in poorly crystalline structures. The Scherrer formula was used to calculate crystallite sizes along the *a* and *c* axes, and the following result was obtained: the size of the crystallite along the *a* and *c* axes was 10.8 ± 0.5 and 6.5 ± 0.2 nm, respectively. It is worth mentioning that the crystal size of biological apatite had a great variety among reports (it is related to the age and location of bone tissue) from several nm to 100 nm [37].

The TEM images in Figure 1C,D indicate that the studied powder was nanosized with plate-like fine crystals. These results are in agreement with those from the FT-IR and PXRD methods described above. It is noteworthy that the needle-like or elongated crystals were not detected, which confirms the biomimetic morphology of the obtained powder [38]. A strong tendency for the crystals to form agglomerates can be observed; thus, it was impossible to use TEM images to measure crystal size.

In order to measure the zinc and magnesium content in the powder, the ICP-OES method was used. It is noteworthy that we aimed to synthesize a biomimetic HA that contained quantities of ions, similar to those found in biological apatite. Based on a literature review, the optimum value of Mg^{2+} was assumed to be approximately 0.5 wt.% [39]. It was also intended to introduce about 3.5% of the zinc ions to obtain additional osteogenic activity. The results provided from ICP-OES were as follows: $0.33 \pm 0.02\%$ and $3.21 \pm 0.03\%$ for magnesium and zinc ions, respectively. The zinc content is very similar to that assumed

during synthesis, while magnesium content is slightly lower. Both ions (Zn^{2+} and Mg^{2+}) feature smaller ion radii (0.074 and 0.072 nm, respectively) than Ca^{2+} (0.099 nm). According to the literature, magnesium substitution into hydroxyapatite is significantly limited (to approximately 0.5 wt.%) [40]. In turn, zinc ions may be introduced into hydroxyapatite crystals in two different ways, namely by either replacing calcium cations or by being inserted between two oxygen atoms in the columns of OH groups [41,42]. Nevertheless, it should be noted that these ions compete in the substitution of Ca^{2+} and, based on previous research, it can be assumed that zinc ions are more easily introduced into the HA crystal than Mg^{2+} ions [40,43].

The $(\text{Ca} + \text{Zn} + \text{Mg})/\text{P}$ molar ratio calculated using the ICP-OES results was 1.62 ± 0.02 , which is typical for calcium-deficient hydroxyapatite [43].

3.2. Physicochemical Properties of Composites

To prepare collagen–apatite composites, apart from mHA powder, the following two types of collagen were used: atelocollagen and freeze-dried type I collagen from bovine Achilles tendon.

FT-IR representative spectra of the obtained two types of composites, OmHA and AmHA, are shown in Figure 2. For comparison, mHA and collagen type I spectra are also presented in Figure 2. The spectra of OmHA and AmHA composites show the main characteristic bands of both mHA and collagen. The bands at 3300 cm^{-1} and 3080 cm^{-1} are typical for collagen protein and originate from N-H and C-H groups, respectively. The bands at 1650 cm^{-1} and at 1550 cm^{-1} can be assigned to C=O stretching for amide I and N-H deformation for amide II, respectively. The δ_{CH} bands are detectable in the $1450\text{--}1340\text{ cm}^{-1}$ region. The amide III band is observed at 1240 cm^{-1} . It can be concluded that the preparation of composites did not influence the triple-helical structure of the collagen protein.

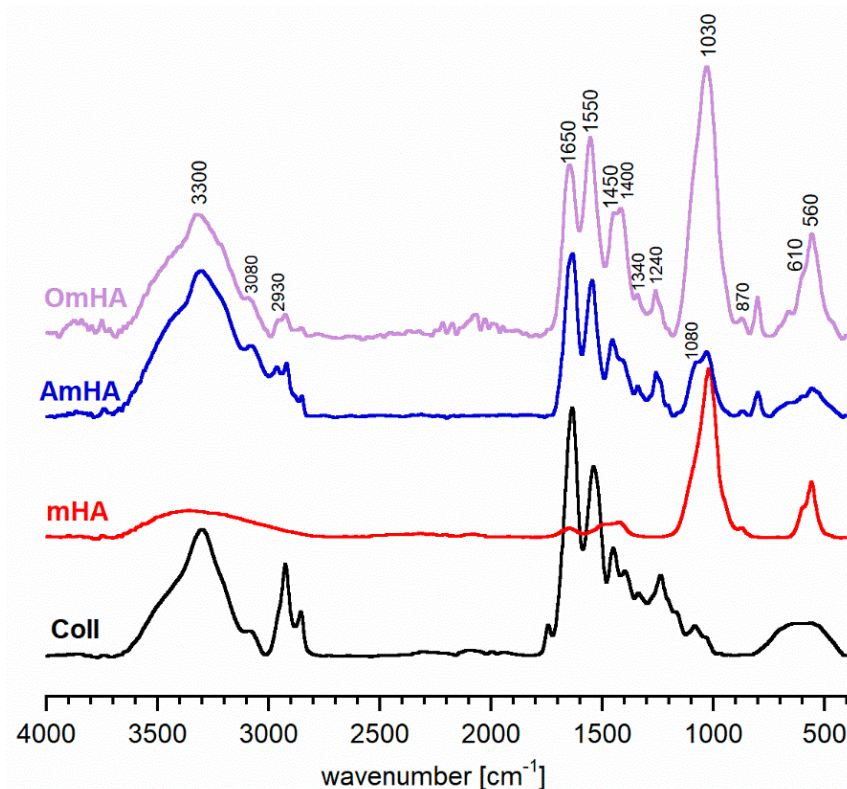


Figure 2. FT-IR spectra of the obtained composites (OmHA and AmHA), collagen type I (Coll), and hydroxyapatite (mHA).

In turn, the absorption bands at 1030 cm^{-1} , 610 cm^{-1} , and 560 cm^{-1} are attributed to the orthophosphate groups from the mHA fraction and are analyzed in detail in the Section 3.1.

Both OmHA and AmHA FT-IR spectra confirmed the inclusion of mHA in the collagen protein matrices. However, it can be clearly seen that the relative intensity of the mHA orthophosphate bands was significantly higher on the spectrum of the OmHA sample. It may be related to the more efficient adsorption of apatite nanocrystals on type I collagen than on atelocollagen fibers.

Figure 3 shows the SEM representative images of the OmHA and AmHA composites. Both samples exhibit a porous, sponge-like morphology (Figure 3A,D). There is a visible structure of irregular interconnected pores (Figure 3B,E). It can be observed that the pores are visible on the surface of the materials and in their internal structure. SEM results show that an interaction between the mHA nanocrystals and the collagen fibers occurred (Figure 3C,F). However, the scaffolds differed in the amount of mHA on the collagen matrix. Atelocollagen fibers were poorly embedded in mHA nanoparticles (AmHA), while collagen fibers (OmHA) were fully covered with small particles of mHA (see Figure 3C,F). SEM images indicate a better adsorption of mHA onto the collagen scaffolds with OmHA than with AmHA, which is in great accordance with the FT-IR results.

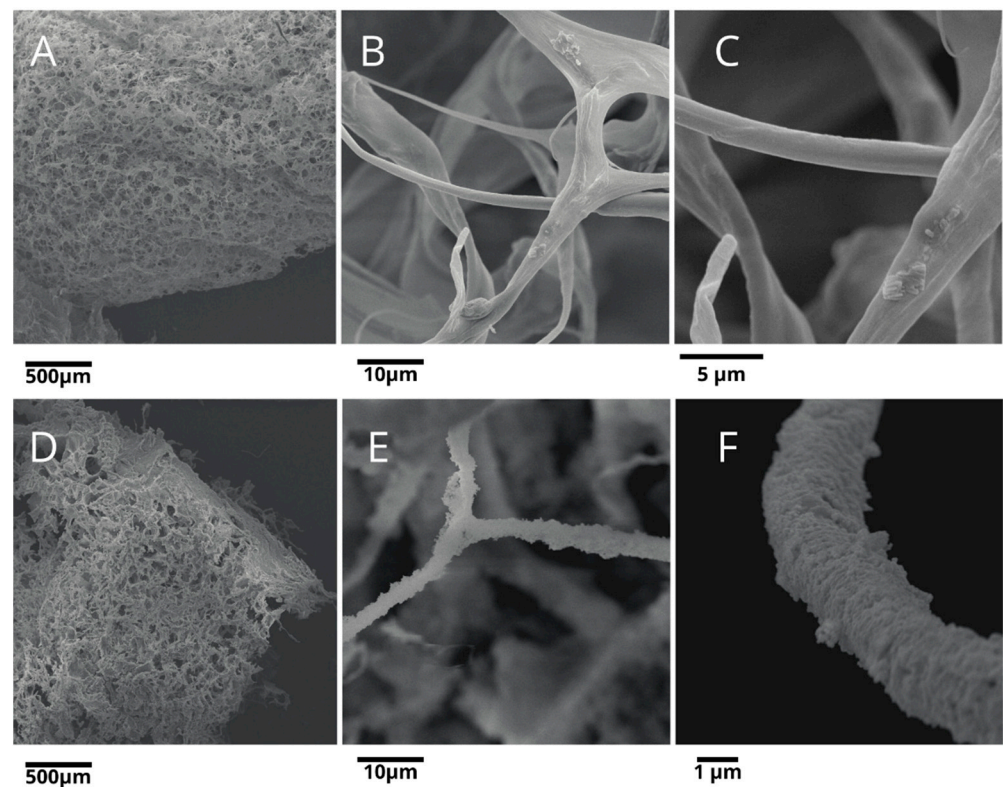


Figure 3. SEM images of the AmHA (A–C) and OmHA composites (D–F).

3.3. Cytotoxicity Assay

BALB/c 3T3 cell viability did not decrease to under 70% in comparison to the untreated control by any of the tested materials. Therefore, all samples were classified as not cytotoxic in the neutral red uptake assay (see Table 2). Moreover, none of the materials negatively affected the morphology of the culture. Fibroblasts after exposition of the tested samples did not differ from the control cultures incubated in a fresh medium.

Table 2. Results of the neutral red uptake test for the highest concentrations of tested extracts [50 mg/mL] in comparison to the untreated control. The test was conducted for up to 24 h.

Sample	Cell Viability \pm SD [%]
mHA	102 \pm 1
AmHA	107 \pm 5
OmHA	97 \pm 5
LT	0 \pm 0
PE	102 \pm 1

LT—latex, reference cytotoxic material. PE—polyethylene foil, reference non-cytotoxic material.

3.4. Drug and Ions Release

An anti-hemorrhagic drug, TXA, was introduced into the composite OmHA and AmHA structure by the following two different methods: directly into mHA and protein suspension (yielding the samples OmHA1 and AmHA1) before lyophilization, and by soaking the lyophilized composites in the TXA solution (yielding the samples OmHA2 and AmHA2). In Figure 4, the cumulative release of TXA curves for the four composites is presented. As shown, TXA was rapidly released from all obtained composites during the first hour and took the form of burst release profiles. More than 58% of the initially loaded drug was released in 15 min. The OmHA1 composite release profile exhibits the highest burst release effect: after 15 min, the release rate reached 86%. The AmHA1 and OmHA2 composites had similar drug release profiles: the maximum amount of cumulative release over the measured time occurred after 180 min and reached 97 and 81% for OmHA2 and AmHA1, respectively.

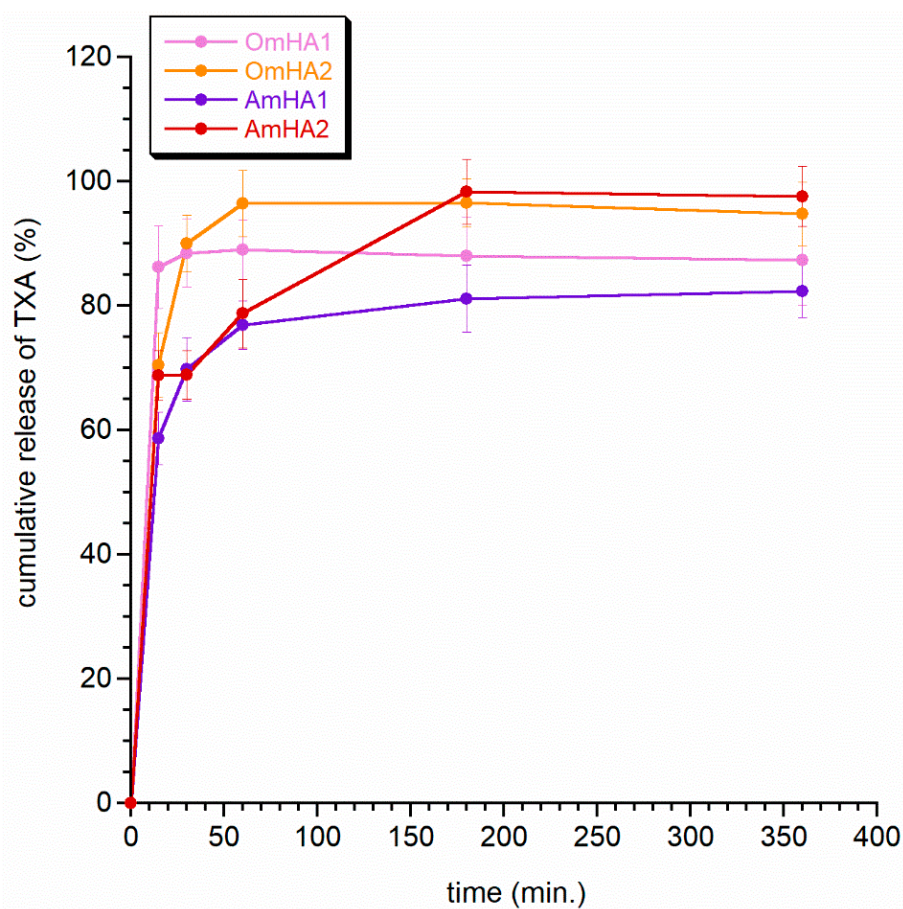


Figure 4. TXA release profiles from the obtained composites.

The sample AmHA2 is characterized by a slightly different release profile (see Figure 4). In the first stage of TXA release, the effect of burst release can be easily distinguished, followed by a slightly slower release of TXA after 30 min. The curve reached the plateau after 180 min, similar to the OmHA2 and AmHA1 curves.

The study shows that TXA released rapidly, intending to achieve a hemostatic effect as quickly as possible. Overall, the observed differences in the release period were not significant and were probably the result of both the preparation of the composites and the incorporation of the drug into them. This requires further in-depth research. The next step was to observe the release profile of zinc and magnesium from the mineral fraction of composites (see Figures 5 and 6). Both figures clearly show that the ions released easier from the AmHA1 and AmHA2 than from the OmHA1 and OmHA2 samples. This is most likely related to the structure of these composites and the significantly weaker bonds of mHA with atelocollagen fibers. mHA, being loosely packed in the AmHA fiber matrix, easily “escapes” from it, which facilitates the release of zinc and magnesium ions, especially those located on the surface of agglomerated mHA nanocrystals.

Interestingly, in the studied period, the release of zinc ions was negligible from each of the samples (in samples OmHA1 and OmHA2, it did not exceed 1.5%, while in samples AmHA1 and AmHA2, it did not exceed 2.4%).

It can therefore be assumed that Zn^{2+} ions are mainly located in the crystalline structure of apatite and that they are not released during this time as a result of apatite resorption. On the other hand, the release of Mg^{2+} is significantly higher. For samples AmHA1 and AmHA2, approximately 35% of magnesium was released within 7 days, while for samples OmHA1 and OmHA2, this value did not exceed 11%.

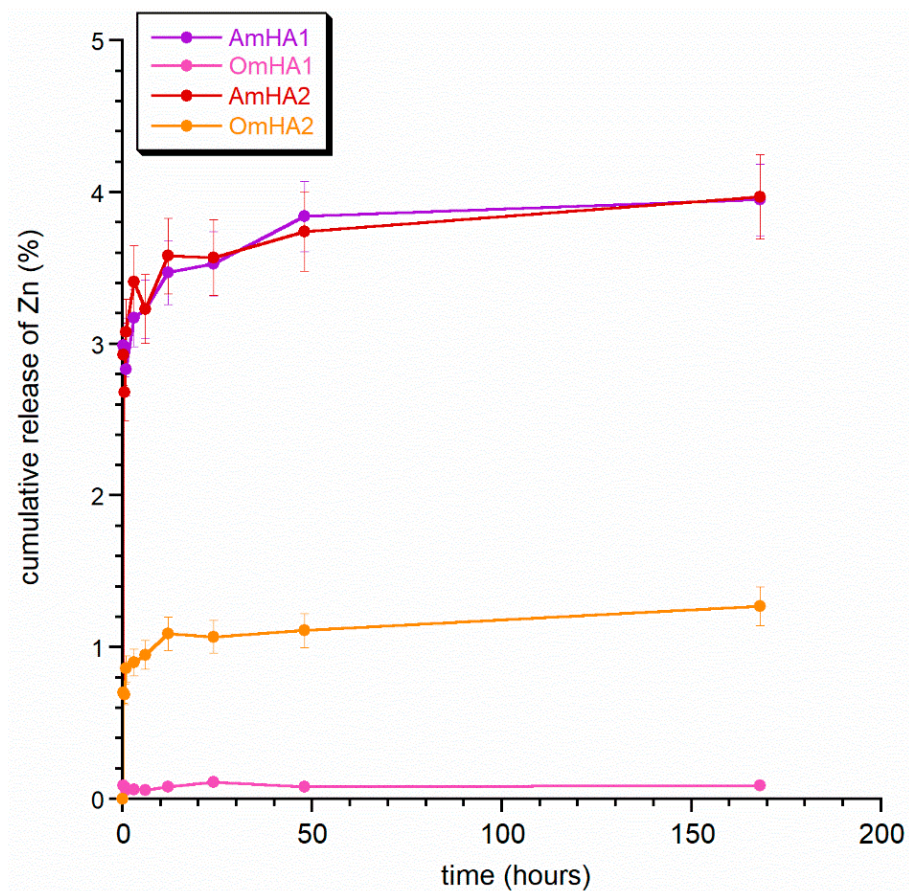


Figure 5. Release of zinc ions from the obtained composites.

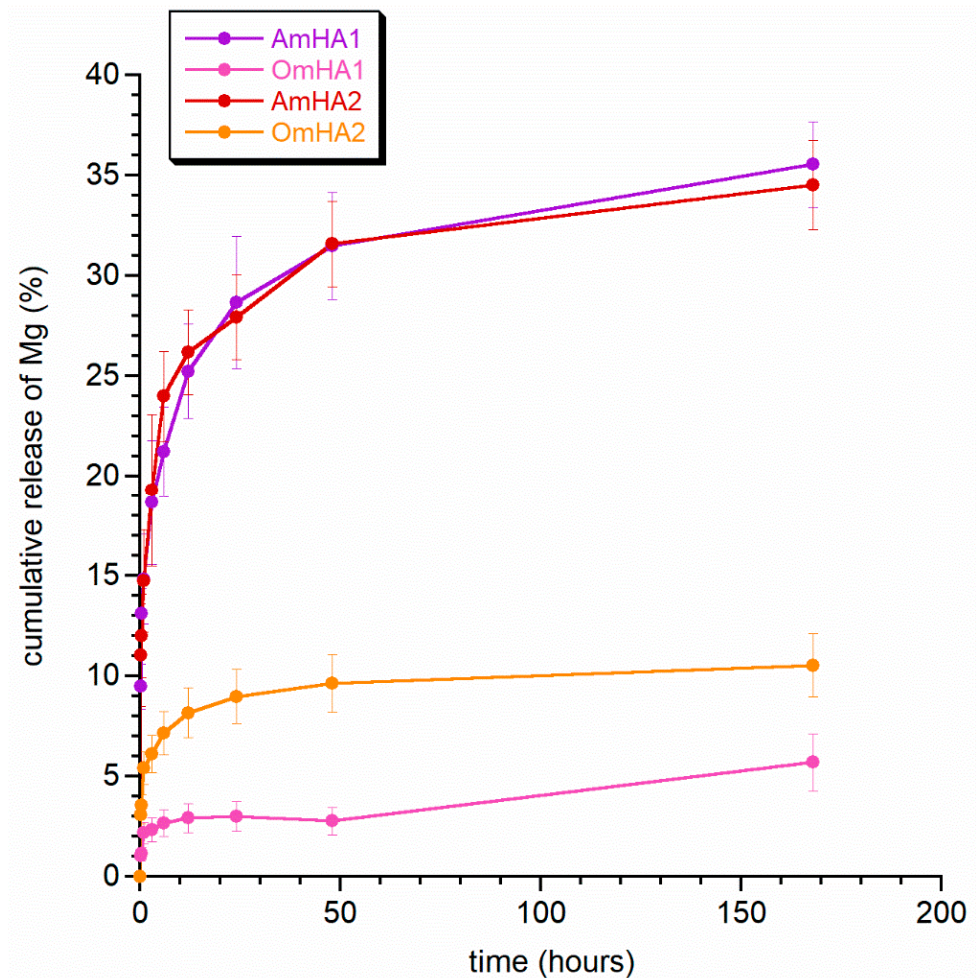


Figure 6. Release of magnesium ions from the obtained composites.

There is an observed higher degree of release of magnesium ions in all the composites compared to the % of released zinc. According to the literature, the incorporation of magnesium ions into the structure of hydroxyapatite by calcium substitution is much more difficult than that of zinc ions. What is more, the substitution limit of magnesium ions is quite low, amounting to approx. 0.5%, while zinc ions are incorporated in significant amounts and, at the same time reduce the crystallinity of apatite. It can therefore be assumed that zinc hinders the substitution of calcium by magnesium ions, which, consequently, are partially deposited on the surface of nanocrystals in the so-called hydrated surface layer. Thus, they are more easily released from mHA and its composites.

The ion release curves did not plateau, which is of course in line with the literature data on long apatite resorption over a period of at least a few weeks.

Figure 7 presents swelling studies of the obtained composites. The results indicate a very high ability in water absorption of all the samples. The water uptake ratio rapidly increased within the first 30–60 min and reached 400 to 1000%.

The addition of mineral phase (mHA) in the collagen (both atelocollagen and collagen type I) decreased the swelling degree of samples. This could be a result of the replacement of collagen with apatite that did not absorb as much water as collagen matrices [44]. It can be assumed that the addition of mHA to the composites led to the limitation of swelling, most likely due to collagen–mHA interactions [44,45]. However, it is worth emphasizing that, despite this, water absorption was still at a high level.

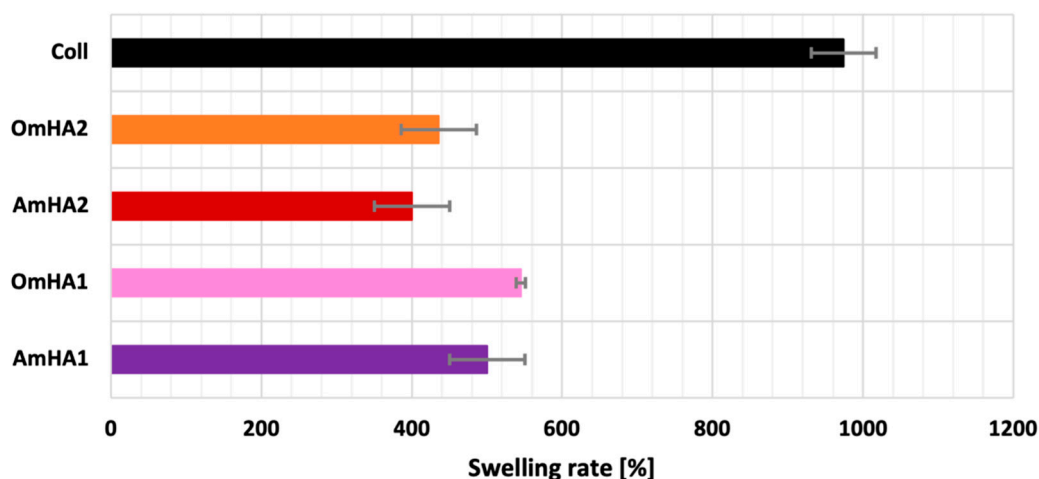


Figure 7. Results of swelling test for the obtained composites and collagen type I.

4. Conclusions

Herein, we described the fabrication of porous composites for their potential use in dental surgery. We successfully fabricated modified hydroxyapatite/collagen composites containing tranexamic acid as an antihemorrhagic drug. All formulated composites revealed substantial physicochemical and morphological features. The OmHA composites exhibited significant homogeneity, and the mHA nanocrystals almost completely covered collagenous fibers. Preliminary *in vitro* cytotoxicity tests classified all samples as not cytotoxic. Our studies showed that TXA was released very quickly from each type of composite, while Mg and Zn ions were characterized by a significantly slower release. It should be noted that the 3D porous composite design still requires improvement.

In our opinion, the research presented in this paper is preliminary but promising enough to be continued in an *in vivo* model.

In vivo studies would provide an opportunity to check whether tranexamic acid released rapidly from the composite matrices would have a beneficial effect, despite the inhibition of fibrinolysis. Of course, it will also be important to study wound healing and bone growth in both a basic animal model and in various conditions that affect wound healing, such as type 2 diabetes.

It would also be very interesting to check the effect of the release of zinc and magnesium ions on the process of new bone formation.

Therefore, mechanical properties tests, the optimization of ion release, and *in vivo* studies will be the focus of our future research.

Author Contributions: Conceptualization, J.K. and B.K.; methodology, B.K., L.P., A.Z., and J.K.; formal analysis, J.K.; investigation, B.K.; resources, J.K. and B.K.; data curation, L.P.; writing—original draft preparation, B.K., A.Z.; writing—review and editing, J.K.; visualization, B.K. and J.K.; supervision, J.K.; project administration, B.K.; funding acquisition, B.K. and J.K. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by the Medical University of Warsaw, grant numbers FW23/F/MB1/N and FW232/N/22.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: The authors would like to thank Ryszard Strzalkowski for his support in SEM microscopy.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Abbreviations

Coll	collagen type I
DMEM	Dulbecco's modified eagle medium
FT-IR	Fourier-transform infrared spectroscopy
HA	hydroxyapatite
HPLC	high-performance liquid chromatography
ICP-OES	inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy
mHA	mimetic hydroxyapatite
PBS	phosphate-buffered saline
PTX	parathyroid hormone
PXRD	powder X-Ray diffraction
SEM	scanning electron microscopy
TEM	transmission electron microscopy
TXA	tranexamic acid

References

1. Kuttappan, S.; Mathew, D.; Nair, M.B. Biomimetic composite scaffolds containing bioceramics and collagen/gelatin for bone tissue engineering—A mini-review. *Int. J. Biol. Macromol.* **2016**, *93*, 1390–1401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Havaladar, R.; Pilli, S.C.; Putti, B.B. Effects of aging on bone mineral composition and bone strength. *IOSR J. Dent. Med. Sci.* **2012**, *1*, 12–16. [[CrossRef](#)]
3. Vallet-Regí, M.; Navarrete, D.A. *Nanoceramics in Clinical Use: From Materials to Applications*; Royal Society of Chemistry: London, UK, 2015.
4. Kolodziejska, B.; Kafak, A.; Kolmas, J. Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review. *Materials* **2020**, *13*, 1748. [[CrossRef](#)]
5. Sachlos, E.; Gotor, D.; Czernuszka, J.T. Collagen Scaffolds Reinforced with Biomimetic Composite Nano-Sized Carbonate-Substituted Hydroxyapatite Crystals and Shaped by Rapid Prototyping to Contain Internal Microchannels. *Tissue Eng.* **2006**, *12*, 2479–2487. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
6. Dahiya, U.R.; Mishra, S.; Bano, S. Application of bone substitutes and its future prospective in regenerative medicine. In *Biomaterial-Supported Tissue Reconstruction or Regeneration*; IntechOpen: London, UK, 2019.
7. Xia, Z.; Villa, M.M.; Wei, M. A biomimetic collagen–apatite scaffold with a multi-level lamellar structure for bone tissue engineering. *J. Mater. Chem. B* **2014**, *2*, 1998–2007. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Cholas, R.; Padmanabhan, S.K.; Gervaso, F.; Udayan, G.; Monaco, G.; Sannino, A.; Licciulli, A. Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *63*, 499–505. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
9. Panda, N.N.; Jonnalagadda, S.; Pramanik, K. Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering. *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* **2013**, *24*, 2031–2044. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
10. Zhang, Z.; Ma, Z.; Zhang, Y.; Chen, F.; Zhou, Y.; An, Q. Dehydrothermally crosslinked collagen/hydroxyapatite composite for enhanced in vivo bone repair. *Coll. Surf. B* **2018**, *163*, 394–401. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Chai, Y.; Okuda, M.; Otsuka, Y.; Ohnuma, K.; Tagaya, M. Comparison of two fabrication processes for biomimetic collagen/hydroxyapatite hybrids. *Adv. Powder Technol.* **2019**, *30*, 1419–1423. [[CrossRef](#)]
12. Hu, C.; Zilm, M.; Wei, M. Fabrication of intrafibrillar and extrafibrillar mineralized collagen/apatite scaffolds with a hierarchical structure. *J. Biomed. Mater. Res. Part A* **2016**, *104*, 1153–1161. [[CrossRef](#)]
13. Ciosek, Z.; Kot, K.; Kosik-Bogacka, D.; Łanocha-Arendarczyk, N.; Rotter, I. The Effects of Calcium, Magnesium, Phosphorus, Fluoride, and Lead on Bone Tissue. *Biomolecules* **2021**, *11*, 506. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Uppal, G.; Thakur, A.; Chauhan, A.; Bala, S. Magnesium-based implants for functional bone tissue regeneration—A review. *J. Magnes. Alloy.* **2022**, *10*, 356–386. [[CrossRef](#)]
15. Vallet-Regí, M.; González-Calbet, J.M. Calcium phosphates as a substitution of bone tissues. *Prog. Solid-State Chem.* **2004**, *32*, 1–31. [[CrossRef](#)]
16. Nagai, H.; Kobayashi-Fujioka, M.; Fujisawa, K.; Ohe, G.; Takamaru, N.; Hara, K.; Uchida, D.; Tamatani, T.; Ishikawa, K.; Miyamoto, Y. Effects of low crystalline carbonate apatite on proliferation and osteoblastic differentiation of human bone marrow cells. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2015**, *26*, 99. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
17. Thian, E.S.; Konishi, T.; Kawanobe, Y.; Lim, P.N.; Choong, C.; Ho, B.; Aizawa, M. Zinc-substituted hydroxyapatite: A biomaterial with enhanced bioactivity and antibacterial properties. *J. Mater. Sci. Mater. Med.* **2013**, *24*, 437–445. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
18. Kolmas, J.; Krukowski, S.; Laskus, A.; Jurkitewicz, M. Synthetic hydroxyapatite in pharmaceutical applications. *Ceram. Int.* **2016**, *42*, 2472–2487. [[CrossRef](#)]
19. Kolmas, J.; Groszyk, E.; Kwiatkowska-Różycka, D. Substituted hydroxyapatites with antibacterial properties. *BioMed Res. Int.* **2014**, *2014*, 178123. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
20. Lerman, D.M.; Rapp, T.B. Minimizing Blood Loss in Orthopaedic Surgery. *Bull. Hosp. Jt. Dis.* **2015**, *73*, 83–89.

21. Mikhail, C.; Pennington, Z.; Arnold, P.M.; Brodke, D.S.; Chapman, J.R.; Chutkan, N.; Daubs, M.D.; DeVine, J.G.; Fehlings, M.G.; Gelb, D.E.; et al. Minimizing blood loss in spine surgery. *Glob. Spine J.* **2020**, *10* (Suppl. 1), 71S–83S. [[CrossRef](#)]
22. McCormack, P.L. Tranexamic acid: A review of its use in the treatment of hyperfibrinolysis. *Drugs* **2012**, *72*, 585–617. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
23. Wellington, K.; Wagstaff, A.J. Tranexamic acid: A review of its use in the management of menorrhagia. *Drugs* **2003**, *63*, 1417–1433. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. 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. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Cheng, T.-L.; Chen, P.-K.; Huang, W.-K.; Kuo, C.-H.; Cho, C.-F.; Wang, K.-C.; Shi, G.-Y.; Wu, H.-L.; Lai, C.-H. Plasminogen/thrombomodulin signaling enhances VEGF expression to promote cutaneous wound healing. *J. Mol. Med.* **2018**, *96*, 1333–1344. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Chen, P.-K.; Chang, B.-I.; Kuo, C.-H.; Chen, P.-S.; Cho, C.-F.; Chang, C.-F.; Shi, G.-Y.; Wu, H.-L. Thrombomodulin functions as a plasminogen receptor to modulate angiogenesis. *FASEB J.* **2013**, *27*, 4520–4531. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Shen, Y.; Guo, Y.; Mikus, P.; Sulniute, R.; Wilczynska, M.; Ny, T.; Li, J. Plasminogen is a key proinflammatory regulator that accelerates the healing of acute and diabetic wounds. *Blood J. Am. Soc. Hematol.* **2012**, *119*, 5879–5887. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
28. Sarda, S.; Errassifi, F.; Marsan, O.; Geffre, A.; Trumel, C.; Drouet, C. Adsorption of tranexamic acid on hydroxyapatite: Toward the development of biomaterials with local hemostatic activity. *Mater. Sci. Eng. C* **2016**, *66*, 1–7. [[CrossRef](#)]
29. Baik, S.H.; Kim, J.H.; Cho, H.H.; Park, S.N.; Kim, Y.S.; Suh, H. Development and analysis of a collagen-based hemostatic adhesive. *J. Surg. Res.* **2010**, *164*, e221–e228. [[CrossRef](#)]
30. Spotnitz, W.D.; Burks, S. Hemostats, sealants, and adhesives: Components of the surgical toolbox. *Transfusion* **2008**, *48*, 1502–1516. [[CrossRef](#)]
31. Mathew-Steiner, S.S.; Roy, S.; Sen, C.K. Collagen in wound healing. *Bioengineering* **2021**, *8*, 63. [[CrossRef](#)]
32. 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. [[CrossRef](#)]
33. Sønju Clasen, A.B.; Ruyter, I.E. Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry. *Adv. Dent. Res.* **1997**, *11*, 523–527. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Kflak, A.; Ślósarczyk, A.; Kolodziejski, W. A comparative study of carbonate bands from nanocrystalline carbonated hydroxyapatites using FT-IR spectroscopy in the transmission and photoacoustic modes. *J. Mol. Struct.* **2011**, *997*, 7–14. [[CrossRef](#)]
35. *ISO 10993-1:2009; Biological Evaluation of Medical Devices*. ISO: Geneva, Switzerland, 2009.
36. Karaman, R.; Ghareeb, H.; Dajani, K.K.; Scranio, L.; Hallak, H.; Abu-Lafi, S.; Mecca, G.; Bufo, S.A. Design, synthesis and in vitro kinetic study of tranexamic acid prodrugs for the treatment of bleeding conditions. *J. Comput. Mol. Des.* **2013**, *27*, 615–635. [[CrossRef](#)]
37. Liu, Q.; Huang, S.; Matinlinna, J.P.; Chen, Z.; Pan, H. Insight into Biological Apatite: Physicochemical Properties and Preparation Approaches. *BioMed Res. Int.* **2013**, *2013*, 929748. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Alrebaish, A.S.; Wilson, O.C., Jr. Mesocrystal aggregation of biological apatite nanocrystals. *Med. Devices Sens.* **2021**, *4*, e10155. [[CrossRef](#)]
39. Pina, S.; Oliveira, J.M.; Reis, R.L. Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review. *Adv. Mater.* **2015**, *27*, 1143–1169. [[CrossRef](#)]
40. Matsunaga, K. First-principles study of substitutional magnesium and zinc in hydroxyapatite and octacalcium phosphate. *J. Chem. Phys.* **2008**, *128*, 245101. [[CrossRef](#)]
41. Hu, W.; Ma, J.; Wang, J.; Zhang, S. Fine structure study on low concentration zinc substituted hydroxyapatite nanoparticles. *Mater. Sci. Eng. C* **2012**, *32*, 2404–2410. [[CrossRef](#)]
42. Ren, F.; Xin, R.; Ge, X.; Leng, Y. Characterization and structural analysis of zinc-substituted hydroxyapatites. *Acta Biomater.* **2009**, *5*, 3141–3149. [[CrossRef](#)]
43. Ressler, A.; Žužić, A.; Ivanišević, I.; Kamboj, N.; Ivanković, H. Ionic substituted hydroxyapatite for bone regeneration applications: A review. *Open Ceram.* **2021**, *6*, 100122. [[CrossRef](#)]
44. Ohba, S.; Sumita, Y.; Nakatani, Y.; Noda, S.; Asahina, I. Alveolar Bone Preservation by a Hydroxyapatite/Collagen Composite Material after Tooth Extraction. *Clin. Oral Investig.* **2019**, *23*, 2413–2419. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
45. Cao, X.; Wang, J.; Liu, M.; Chen, Y.; Cao, Y.; Yu, X. Chitosan-Collagen/Organomontmorillonite Scaffold for Bone Tissue Engineering. *Front. Mater. Sci.* **2015**, *9*, 405–412. [[CrossRef](#)]

Warszawa, 26.10.2023

mgr farm. Barbara Kołodziejka

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, otrzymanie kompozytów, wykonanie badań fizykochemicznych, udział w interpretacji wyników, przygotowanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 60 %.



(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr hab. n. farm. Joanna Kolmas

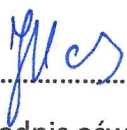
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja i nadzór merytoryczny nad częścią eksperymentalną, interpretacja części wyników i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 25 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.

.....

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr n. farm. Łukasz Pajchel

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja oznaczenia ilościowego uwolnionej substancji leczniczej oraz udział w wykonaniu oznaczenia metodą HPLC.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 10 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.


.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 27.10.2023

dr n. farm. Anna Zgadza

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery.***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
ocena cytotoksyczności próbek na hodowlach komórkowych *in vitro*.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.

.....

(podpis oświadczającego)



Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material

Barbara Kołodziejska ¹, Ramona Figat ² and Joanna Kolmas ^{1,*}

¹Department of Pharmaceutical Chemistry and Biomaterials, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland; barbara.kolodziejska@wum.edu.pl

²Department of Toxicology and Bromatology, Faculty of Pharmacy, Medical University of Warsaw, ul. Banacha 1, 02-097 Warsaw, Poland

* Correspondence: joanna.kolmas@wum.edu.pl

Abstract: This study presents a comprehensive evaluation of novel composite biomaterials designed for dental applications, aiming to potentially address the prevalent challenge of dental and periodontal tissue loss. The composites consisted of biomimetic hydroxyapatite (mHA) enriched with Mg²⁺, CO₃²⁻, and Zn²⁺ ions, type I collagen, alginate, and additionally chitosan and sericin. The granules were loaded with Ibuprofen sodium salt. The investigation encompasses morphology characterization, porosity analysis, chemical structure assessment, swelling behaviour, drug release kinetics (Ibuprofen), and release profiles of zinc and magnesium ions. The granules exhibited irregular surfaces with enhanced homogeneity in chitosan-coated materials and well-developed mesoporous structures. FT-IR spectra confirmed the presence of Ibuprofen sodium, despite overlapping bands for polymers. The granules demonstrated high water absorption capacity, with delayed swelling in chitosan-coated granules. Ibuprofen displayed burst release profiles, especially in G1 and G3 samples. In the case of chitosan-coated granules (G2 and G4), the amount of ibuprofen released was lower. In turn, there was a significant difference in the amount of release of magnesium and zinc ions from the granules, which is most likely caused by their different location in the hydroxyapatite crystals. Cytotoxicity assays confirmed the non-cytotoxic behaviour of the biomaterial. The findings suggest the potential applicability of these biomaterials in dental scenarios, emphasizing their multifunctional and biocompatible nature.

Citation: To be added by editorial staff during production.

Academic Editor: Firstname Last-name

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Keywords: Dental materials; type I collagen; biomimetic apatite; ibuprofen sodium; drug release; zinc



Copyright: © 2023 by the authors. Submitted for possible open access publication under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Loss of dental or periodontal structures resulting from dental caries, dental anomalies, traumatic injury, periodontal affection and systematic disease is a very frequent and significant problem in clinical practice. The most common everyday dentistry challenge is searching for solutions to regenerate lost tooth structures. Designing new bioactive and biocompatible scaffolds that may facilitate the formation of new tissue is one of the current

goals of dental tissue engineering. The involvement of biomaterials is essential in dentistry, as they provide a porous framework or a carrier for drug delivery to the pivotal target site [1]–[3].

Various natural and synthetic biomaterials, including polymers, ceramics, and their composites, could be used as scaffolds for tooth tissue engineering [4]–[6]. To enhance the biocompatibility of these materials, there is still a demand for scaffolds that mimic the structural, mechanical, and biological properties of natural tissues [7]. Bone tissue is a composite material whose main component is a type I collagen fibres mineralized with nanocrystalline multi-substituted carbonated hydroxyapatite. It also includes other non-collagen proteins and water [8]. Biomaterials imitating that composition could promote interactions and responses between scaffolds and the surrounding environment, thereby enhancing tissue regeneration and repair [9], [10].

The most common biomimetic composites consist of type I collagen and hydroxyapatite (Coll/HA). In our previous work, we focused on obtaining such a composite, with an emphasis on the ionic modification of apatite, so that its composition was as close as possible to biological apatite [11]. Many studies prove that this type of biomaterial is suitable as dental scaffolds, due to its effectiveness in preserving alveolar bone after tooth extraction [12]–[15]. When designing scaffolds, we focus not only on the function that fills the bone space but also on creating a bioactive matrix, e.g. with an additional function that delivers a drug substance [16], [17]. Combining Coll/HA with other polymers, modifying their porosity, and giving them the right 3D shape may strongly impact the drug and ion release profile and other physicochemical properties of biomaterial [18], [19].

The most commonly used natural polymer for preparing biomaterials in the form of granules is based on a biocompatible and non-toxic alginate core [20]. Alginate is a naturally occurring polysaccharide found in algae. In an aqueous solution, it becomes polyanionic and can be crosslinked by divalent cation e.g., Ca^{2+} . However, according to the literature, alginate combined with collagen may exhibit mechanical instability and excessive porosity [20]. The most common method to address this issue is to cover the granules with a polycation layer, such as chitosan (CH). CH is a deacetylated form of chitin, which is synthesized by different crustaceans, insects, algae, fungi, and yeasts. It's a biocompatible, biodegradable, and non-toxic material [21]. The presence of this complex should decrease the porosity of the membrane and improve its mechanical properties [22]. Sericin is one of the silk proteins extracted from the cocoons of silkworms of different species [23]. For the last few decades, it has been extensively utilized for biomedical applications due to its numerous beneficial biological and physicochemical properties [20], [24]. Sericin has a high hydrophilic amino acids content, which results in absorbing and releasing moisture easily [25]. The protein also possesses antibacterial, anti-inflammatory, antioxidant and antitumor properties [26]–[28]. It can be combined with other macromolecular materials to produce materials with improved properties. The biomaterials enriched with sericin are biodegradable and do not show immunogenicity [29].

In the present work, the new composite biomaterial, based on biomimetic HA modified with Zn^{2+} ions as anti-inflammatory and osteogenic agents and different natural polymers – collagen, alginate, chitosan and sericin, were prepared in the form of four types of spherical granules. The obtained materials were enriched with a drug substance having strong anti-inflammatory properties – Ibuprofen (Ibu) [30], [31]. This is to evaluate the feasibility of using this type of biomaterial as a local bone drug delivery system and the effect of individual macromolecules on the release profile. The matrices proposed by us could be a promising bifunctional material, releasing the drug and ions directly in the infected area for the treatment of inflammation following surgical procedures, especially in dentistry, and for regenerating bone defects. The obtained materials were subjected to physicochemical analysis to evaluate the chemical structure and physicochemical properties. In addition, preliminary *in vitro* studies were conducted.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Synthesis of Zn-substituted biomimetic apatite powder

Hydroxyapatite mimicking bone apatite and enriched with zinc, magnesium and carbonate ions, was synthesized using the conventional wet method (coprecipitation in an aqueous solution), which was described in detail in our previous work [11], [32]. Calcium nitrate tetrahydrate ($Ca(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$), ammonium hydrogen phosphate ($(NH_4)_2HPO_4$), diammonium carbonate ($(NH_4)_2CO_3$), magnesium nitrate hexahydrate ($Mg(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$) and zinc nitrate hexahydrate ($Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$), were used as the substrates for the synthesis. All the reagents were of analytical grade and purchased from Sigma Aldrich Chemicals, St. Louis, MO, USA.

An adequate amount of the reagents was weighed out to obtain the compound with a specific nominal composition: $Ca_{8.25}Zn_{0.5}Mg_{0.25}(PO_4)_5CO_3OH$. The sources of phosphates and carbonates were slowly dropped into the sources of calcium, zinc, and magnesium cations, stirring constantly. The pH was adjusted to about 11 using a concentrated ammonia solution. The slurry was left to age for 7 days without being stirred. After that, the precipitate was washed several times with distilled water, filtered, and dried at 100 °C for 24 h. Then, the obtained material was homogenized in an agate mortar. The powder was named mHA (mimetic hydroxyapatite).

2.2 Preparation of composite granules

In this work, four types of composite granules were obtained. The following reagents were used to fabricate granules: atelocollagen from bovine dermis (3 mg/mL) (Cosmo Bio Co., Tokyo, Japan), sodium alginate (Sigma Aldrich, Burlington, MO, USA), calcium chloride anhydrous $CaCl_2$ (Sigma-Aldrich, Shanghai, China), Ibuprofen sodium salt (Sigma Aldrich, Burlington, MO, USA) and the previously synthesized mHA powder. Some granules have been enriched with sericin silkworm (Sigma Aldrich, Burlington, MO, USA) and chitosan (50–190 kDa molecular weight, 75–85 % deacetylation degree, viscosity ≤ 300 cP, Sigma-Aldrich, Burlington, MO, USA).

Briefly, to prepare one matrix 20 ml of atelocollagen from bovine dermis was mixed with 10 ml of 3% alginate solution and 840 mg of mHA were used. The suspension was mixed with a mechanical stirrer thoroughly until dense, and a milky slurry was acquired. Approximately 0.1 g of Ibuprofen sodium (Sigma Aldrich, Burlington, MO, USA) was then added to each of the slurries. Four identical suspensions were obtained (G1-G4). Samples G3 and G4 were additionally enriched with 60 mg of sericin. At the same time, a cross-linking aqueous solution containing CaCl₂ (1.5%) was prepared. Each of the slurries was added dropwise to the cross-linking solution with magnetic stirring, and granules were formed. The obtained granules were washed several times with distilled water and dried in air at room temperature and lyophilized for 24 h. The granules type 2 and 4 (G2 and G4) were then coated for 30 min in a 0.5% chitosan solution. Chitosan was previously dissolved in 1% acetic acid. The chitosan-coated granules were quickly treated with 0.01 M NaOH and later they were rinsed carefully with deionized water. The G1 and G3 materials were lyophilized again for 24 h. All variants of the obtained scaffolds are presented in Table 1.

Table 1. Composition of the granules.

Type of granules	Atelocollagen	Sodium Alginate	mHA	Sericin	Chitosan	Ibuprofen
G1	+	+	+	-	-	+
G2	+	+	+	-	+	+
G3	+	+	+	+	-	+
G4	+	+	+	+	+	+

2.3 Analytical Methods

Physicochemical analysis of the mHA powder

To validate the identity of the obtained hydroxyapatite (mHA), a Fourier-transform infrared spectroscopy (FT-IR) was used with a PerkinElmer Spectrum 1000 spectrometer (Waltham, MA, USA). Transmission spectrum in the 4000–400 cm⁻¹ range was obtained with a spectral resolution of 2 cm⁻¹, employing KBr pellets and 30 scans. The phase composition analysis of the synthesized powder was performed using powder X-ray diffraction (PXRD). A Bruker DX8 Discover diffractometer (Billerica, MA, USA) with CuK α radiation ($\lambda = 1.54 \text{ \AA}$) within the 2 theta range from 20° to 70° was utilized. Microstructural features of the powder sample were scrutinized using the JEM 1400 transmission electron microscope (TEM-JEOL Co., Tokyo, Japan, 2008), equipped with an 11-megapixel MORADA G2 TEM camera (EMSIS GmbH, Germany) under an accelerating voltage of 80 kV. Preparation of the analyzed material involved suspending the powder sample in 96% ethanol, followed by deposition onto a copper grid and subsequent air-

drying. Measurements of calcium, phosphorus, magnesium, and zinc content were executed through inductively coupled plasma–optical emission spectroscopy (ICP-OES) using an Optima 3100 XL PerkinElmer spectrometer (Llantrisant, UK). The powder sample underwent dissolution in concentrated HNO₃ (Suprapur, Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) and appropriate dilution with deionized water. The carbonate content (types A + B) was calculated using a methodology previously elucidated by Clasen and Ruyter [33].

Physicochemical analysis of the composite granules

The surface morphology of the composite granules was analyzed using JEOL LTD. JSM-6390LV (Tokyo, Japan) scanning electron microscope (SEM) at an operating voltage of 20 or 30 kV. For the best contrast, the samples were sputter-coated with an Au.

Porosity and specific surface area (S_{BET}) of the G1, G2, G3 and G4 samples, total pore volume (V_c) and distribution of their diameters (in the range of 2 - 300 nm) were determined from the N₂ adsorption isotherm in the relative pressure range $p/p_0 = 0.02 - 0.99$ using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method with nitrogen adsorption (ASAP 2050 Micromeritics, GA, USA).

A Shimadzu IRAffinity-1S transform infrared spectrometer (Kyoto, Japan) was used to measure the chemical structure of the samples. The granules were directly measured with an attenuated total reflection (ATR) accessory. The ATR-FTIR spectra were recorded in the 4000 cm⁻¹ - 400 cm⁻¹ range, at a spectral resolution of 2 cm⁻¹ using 30 scans. All of the obtained spectra were processed using GRAMS/AI 8.0 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) and KaleidaGraph 3.5 (Synergy Software, Reading, PA, USA) software.

For determination of swelling behaviour, all of the obtained granules (G1, G2, G3 and G4) were incubated in ultrapure water at 37 °C. Subsequently, the samples were withdrawn from the solution after soaking for 15, 30, 60 and 180 min, and the surface adsorbed water was carefully removed by filter paper. The swelled samples were then weighed immediately. The swelling ratio is expressed as the percentage of weight increased ($W-W_0$) to the initial weight (W_0). Each sample was tested in triplicate.

The *in vitro* release of Ibuprofen from the granules was evaluated in Falcon 50 mL tubes. The studies were performed in a phosphate buffer (pH = 7.4). Each tube contained 300 mg of a specific type of granule immersed in 50 mL of the release medium. The samples were placed in the bath shaker and stirred at 100 rpm at 37 °C before being incubated for seven days. Sample aliquots of 5 mL were withdrawn at regular time intervals (15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h, 12 h, 24 h and 48h). All the samples were filtered through a membrane syringe filter with a pore size of 0.8 µm. Each time, the volume of the medium taken for analysis was replaced with a new phosphate buffer portion. The samples were then analyzed by HPLC using chromatographic equipment, consisting of a Varian Prostar 210 isocratic pump (Palo Alto, CA, USA) and a Rheodyne 7725i injector (Cotati, CA, USA) with a 20 µL sample loop. Detection was performed by a Varian Prostar 325 UV detector using a detection wavelength of 220 nm. The chromatographic conditions and measurement procedures were previously described [34]. The LC column used was a 4.6 mm i.d. × 250 mm length XTerra RP 18 analytical column that was purchased from Waters (Milford, Ireland). The mobile phase consisted of phosphate buffer (pH 7.0) mixed with acetonitrile

in a ratio (40:60, v/v). It was degassed by sonication before use. The flow rate of the mobile phase was maintained at 1 mL/min. HPLC analysis was conducted at 30 °C. Peak areas were measured for the quantitation of the Ibu. Stock solutions of Ibu 1 mg/ml were prepared by dissolving the appropriate amount in water. Calibration standards were prepared over a concentration range of 0.01, 0.025, 0.05, 0.1, 0.25 and 0.5 mg/ml for Ibu by the appropriate dilutions of the above-mentioned standard solution. Calibration standards were analyzed in triplicate for the calibration curve.

The *in vitro* release of zinc and magnesium ions was studied in the same manner as the Ibu release test. The concentration of magnesium and zinc ions released into the PBS solution was determined by AAS using an AAnalyst 400 AA Spectrometer (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA).

Cytotoxicity study

Cytotoxicity of the materials was evaluated according to the procedure in the ISO 10993-5:2009 guideline [35] by the MTT assay, using MG-63 human osteoblast-like cells (American Type Culture Collection). The test was performed using a cell exposure schedule to extracts with a readout technique based on reducing the tetrazolium dye MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) to its insoluble formazan, in a microplate format. According to the ISO protocol, the volume of extraction medium absorbed by each 100 mg of material was determined. This additional volume was then added to each 100 mg in the extraction mixture during the extraction of the material. The highest extract concentration tested was 50 mg/ml. The extracts were prepared by incubating the samples in MEM medium with 5% bovine serum for 24 h at 37 °C with stirring; the extracts were sterilized by filtration. The cells were treated with seven dilutions of each extract in a twofold dilution series for 24 h (50 mg/mL, 25 mg/mL, 20 mg/mL, 12.5 mg/mL, 10 mg/mL, 5 mg/mL and 2.5 mg/mL). Highly cytotoxic latex and non-cytotoxic polyethylene foil were used as reference materials. Samples were considered cytotoxic if they reduced cell survival below 70% when compared to the untreated cells.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Physicochemical parameters of mHA

The detailed physicochemical analysis of the mHA apatite powder was presented in our previous work [11]. According to TEM, FT-IR, and PXRD results, mHA was identified as nanocrystalline hydroxyapatite with crystal sizes not exceeding 20 nm, and devoid of other crystalline phases. The magnesium and zinc content, determined by ICP-OES, were $0.33 \pm 0.02\%$ and $3.21 \pm 0.03\%$, respectively. Additionally, the carbonate content was determined based on FT-IR spectra to be $6.4 \pm 0.3\%$.

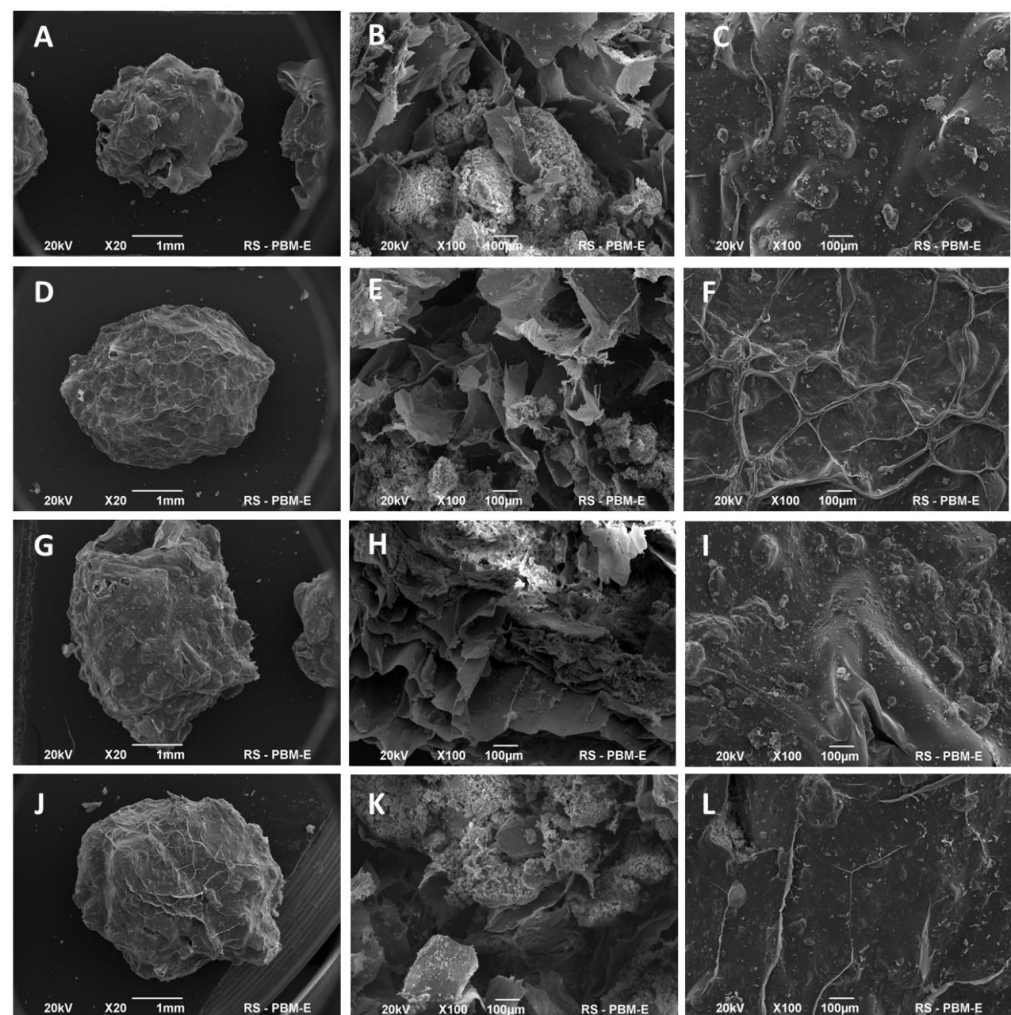
3.2 Morphology and porosity of the composite granules

The morphological characteristics of the acquired granules were investigated through Scanning Electron Microscopy (SEM), and the findings are presented in Figure 1. The spherical-shaped granules possessed an approximate diameter of 3.5 ± 0.5 mm. Notably, their surface features were observed to be conspicuously irregular, manifesting a pronounced roughness. These irregularities were observed as deep and intricately interconnected cavities, presumably attributable to the alginate through cross-linking

processes and the subsequent impact of the freeze-drying procedure. Specifically, the chitosan-coated granules, denoted as G2 and G4, displayed a more uniform and smoother outer surface compared to their uncoated counterparts. The enhanced homogeneity and diminished surface roughness of the chitosan-coated granules are indicative of the efficacy of the coating process. SEM images obtained from cross-sections clearly show the presence of an inorganic fraction (apatite) forming dense agglomerates, as well as a polymer (especially alginate) in the form of a porous structure.

The porosity and irregular structure of the obtained granules are significant in the context of their application as bone substitute material and drug carriers in dentistry. It is well-established that the porous nature of biomaterials facilitates cell adhesion, thereby fostering effective regeneration and reconstruction of mineralized tissue. Moreover, porous structures enable molecular diffusion, which is one of the mechanisms for releasing the drug substance from apatite/polymer composites [36]–[38].

Figure 1. SEM images of G1 (A-C), G2 (D-F), G3 (G-I) and G4 (J-L) granules. The first column: whole granules; the second column: an internal cross-section; the third column: an outer surface.



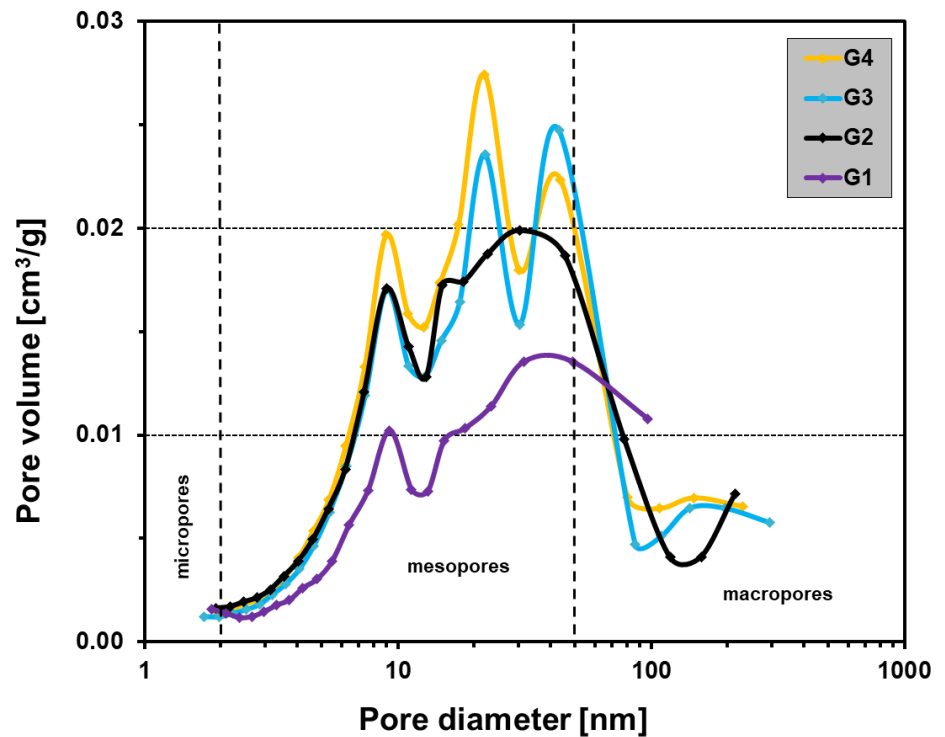
The results of porosity measurements using the Brunauer–Emmett–Teller (BET) method with nitrogen sorption are summarized in Table 2 and Figure 2. All samples exhibit a reasonably well-developed surface, with specific surface area values ranging from 76 to 94 m²/g. The findings suggest that the incorporation of sericin and chitosan has only a limited impact on the specific surface area (SSA) value. Notably, sample G1 demonstrates the most advanced surface development, reaching 94 m²/g. Furthermore, an examination of the porous structure of the samples reveals a similarity, with mesopores being the predominant feature. This is also confirmed by the shape of adsorption-desorption isotherms, although specific data is not presented here. The pore volume (V_c) falls within the range of 0.13–0.23 cm³/g. Of particular interest is the observation that sample G1 exhibits the smallest pore volume, indicating that the incorporation of sericin and chitosan contributes to the development of mesoporous structures on the surface. The data in the table show that the addition of sericin or chitosan causes a significant increase in pore volume, including mesopores.

These findings are particularly relevant in the context of multifunctional biomaterials potentially serving as drug delivery systems. The degree of porosity and pore size distribution are crucial parameters for drug delivery systems. The preservation of the original porosity and pore size present in the bone tissue (100–300 µm) leads to desired material for socket preservation, whereas smaller pores are also required for effective drug loading and its releasing [12], [39], [40].

Table 2. Porosity measurements of G1–G4 granules using the nitrogen adsorption technique.

Sample	Surface area S_{BET} [m ² /g]	Pore volume V_c [cm ³ /g]	Mesopores volume $V_{mez.}$ [cm ³ /g]
G1	94	0.13	0.12
G2	79	0.21	0.18
G3	76	0.21	0.18
G4	85	0.23	0.21

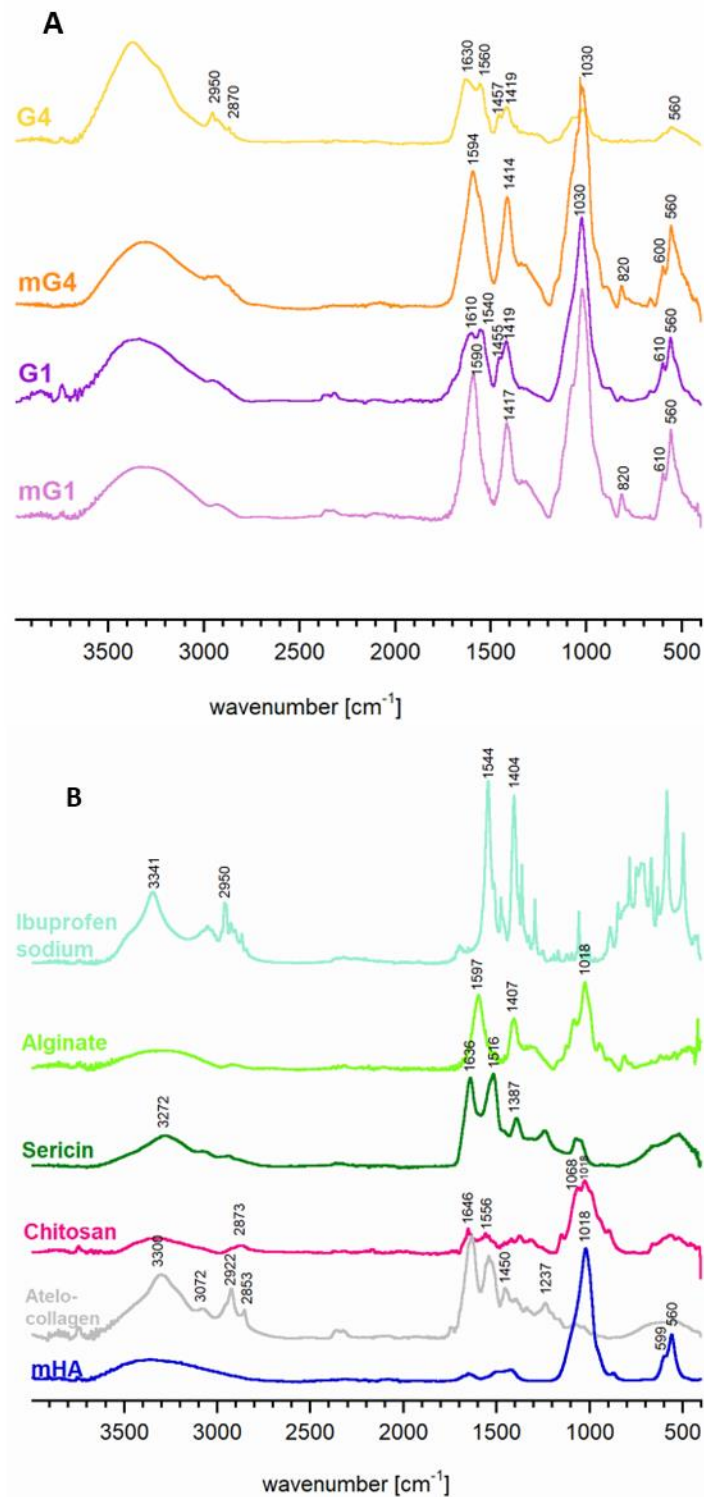
Figure 2. Barrett-Joyner-Halenda (BJH) pore size distribution from 1 to 300 nm based on the desorption isotherms of G1-G4.



3.3 Chemical structure of the granules

The FT-IR representative spectra of two distinct matrix types, denoted as mG1 and mG4, along with the corresponding granules (G1 and G4) incorporating the drug substance, are illustrated in Figure 3A. Additionally, Figure 3B displays the spectra of mHA, atelocollagen, alginate, chitosan, sericin and Ibuprofen sodium for comparative analysis.

Figure 3. Representative FT-IR spectra of the samples: 3A - spectra of selected matrix types: mG1 288 and mG4 and granules with Ibu: G1 and G4; 3B - spectra of individual granule components. 289



The interpretation of the acquired spectra encountered several challenges. Firstly, the 291 polymers within the granules, notably alginate and chitosan as polysaccharides, exhibited 292

closely resembling spectra, as well as a spectrum of sericin and type I collagen (proteinaceous materials). Secondly, the bands associated with organic components were broad and substantially overlapped, rendering a comprehensive analysis unattainable. An example of such band overlapping is discernible in the 1540-1630 cm^{-1} range of the spectra for samples G1, G4, G1m, and G4m, representing the bending vibrations of the -NH group. This phenomenon arises from the superimposition of the band at 1516 cm^{-1} and 1636 cm^{-1} originating from proteinaceous sources (sericin and collagen spectra) with a band at 1556 cm^{-1} , 1597 cm^{-1} and 1646 cm^{-1} characteristic of alginate and chitosan.

Bands observed in the range of 2870-2950 cm^{-1} originate from the stretching vibrations of -CH groups inherent to both polysaccharides and proteins. Notably, the relative intensity of these bands is more pronounced in the G4 sample, suggesting that their intensity is not solely attributable to the comparatively greater quantity of organic components in the sample but also to the -CH groups stemming from ibuprofen. In the spectra of G1 and G4, additional bands at approximately 1540 cm^{-1} – 1560 cm^{-1} , signify the presence of ibuprofen sodium in both materials.

The mHA spectrum is characterized by dominant bands at approximately 1030 cm^{-1} and 600-500 cm^{-1} , corresponding to the ν_3 and ν_4 vibrations of orthophosphate groups, respectively. In composite spectra, the ν_3 band may overlap with the vibrations originating from the C-O groups of the carbohydrate ring (1025 cm^{-1}). However, the presence of mHA in the composites is unequivocally confirmed by the 600-500 cm^{-1} bands evident in the G1 and G4 spectra.

3.4 Swelling test

Figure 4 presents the results of swelling tests conducted on the acquired granules. The outcomes reveal a notably high water absorption capacity for all examined samples, which, by literature references [41], [42], can be attributed to the hydration of hydrophilic groups present in chitosan and alginate within the dry granules. It is noteworthy that the water uptake rate exhibited a rapid increase within the initial hour, reaching its maximum in the third hour, consistent with findings reported by other researchers [42].

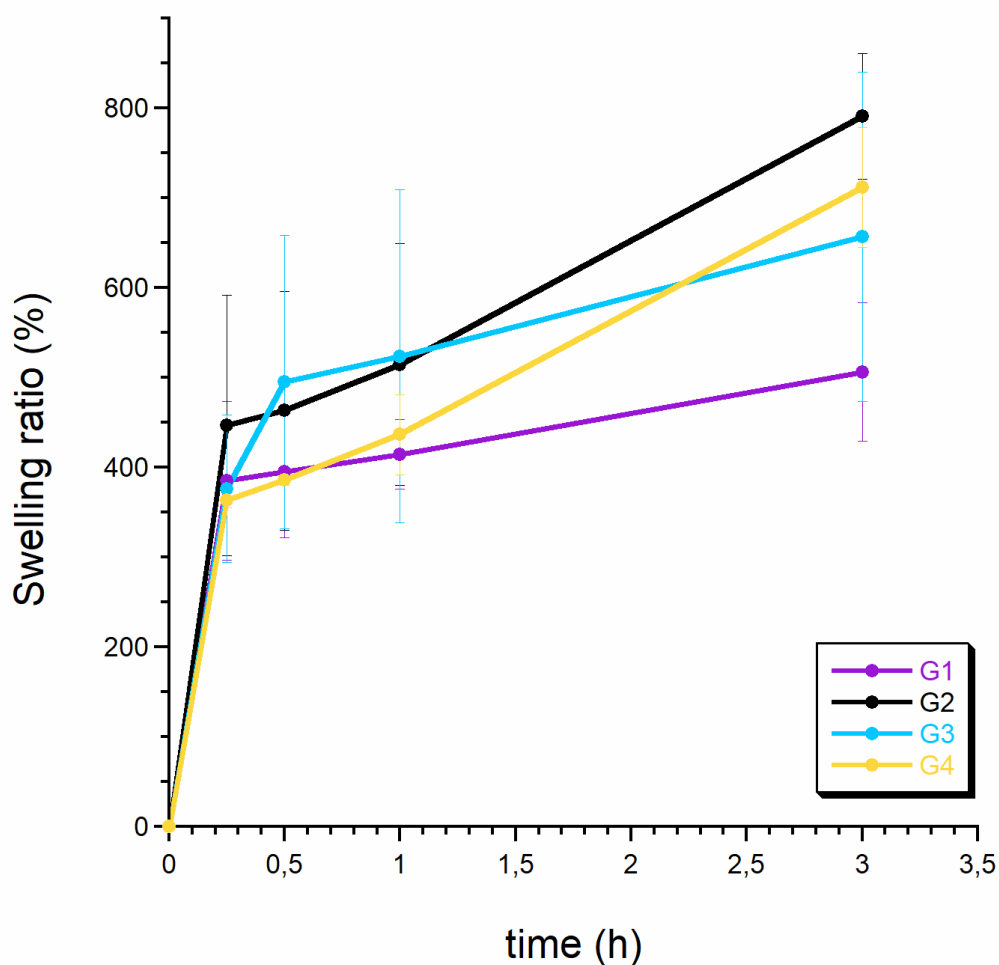
In general, it was observed that all materials swiftly achieved their maximum swelling ratio (SR). This phenomenon is likely attributable to the foamy and highly porous structure of the matrices, facilitating efficient water penetration. Sample G1 displayed the lowest water absorption, potentially linked to its reduced pore volume (refer to porosity results discussed earlier). This aligns with the established notion that denser materials tend to diminish water absorption capacity [39].

An intriguing comparison lies in assessing the swelling capacity between chitosan-coated granules (G2 and G4). As depicted in Figure 4, both G2 and G4 exhibited relatively modest SR values during the first hour (450% for G4 and 500% for G2). However, by the third hour, they achieved the highest SR values, reaching up to 800%.

As previously elucidated, the chitosan membrane may act to mitigate the permeability of the granules. Furthermore, certain hydrophilic groups on the surface of dry calcium alginate granules form a polyelectrolyte complex with the amino groups of chitosan,

resulting in a weakened absorption of water molecules within the polymer network. The subsequent augmentation in granule swelling may be attributed to the degradation of the chitosan coating.

Figure 4. Swelling test. The graph shows the swelling ratio (%) of the granules.

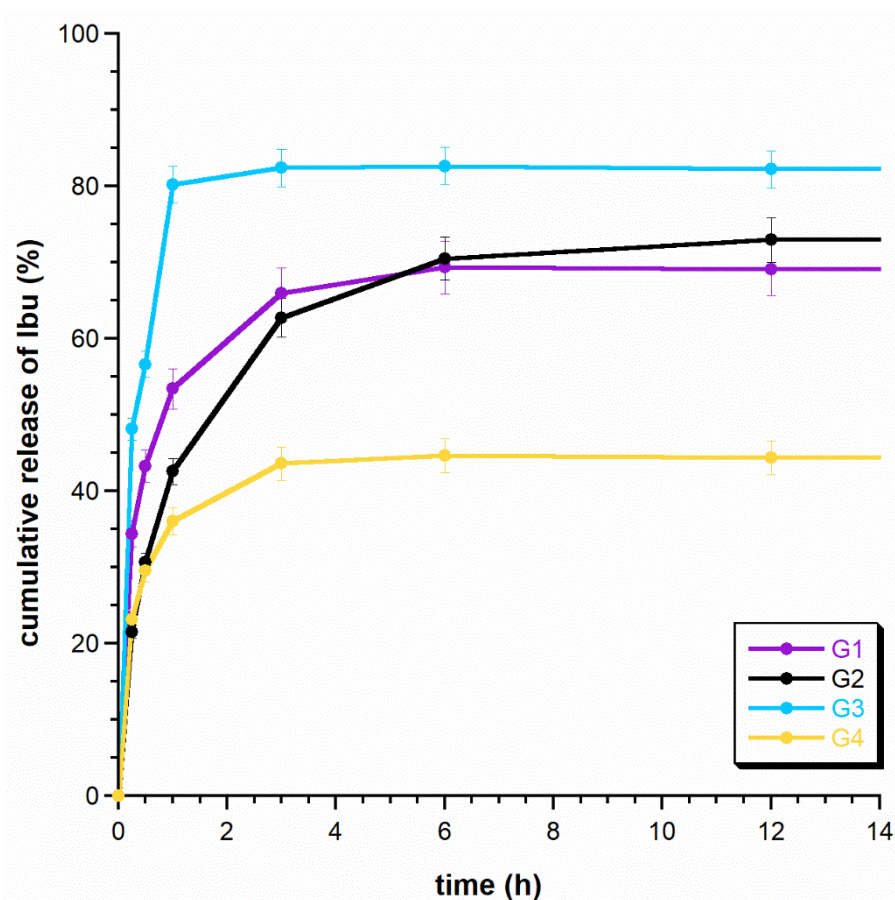


3.5 Drug and Ions Release

Figure 5 shows the cumulative release curves of Ibuprofen for the obtained granules. The graph shows release up to 12 hours because no significant changes in the amount of drug released were observed thereafter. As expected, Ibuprofen was rapidly released from all composite granules obtained within the first three hours and took the form of burst release profiles. Each sample released more than 40% of the initially loaded drug within 3 hours. It is worth paying attention to the G3 sample, where ibuprofen was released rapidly and in fact by over 80% within 3 hours. G1 and G3 have similar drug release profiles over the studied time range. They showed the highest release effect extremely quickly, because after 1 hour the release reached 54% and 66% for G1 and G3, respectively. Samples G2 and

G4 are characterized by slightly different curves. The release of Ibu is slightly slower - within 1 hour the release reached 43 and 36%, respectively. Interestingly, the maximum amount of drug released from the G4 sample during the tested 12 hours is only 45%. It can be assumed that the reason for the slower release of ibuprofen may be the covering of the granules with chitosan, which significantly reduces their permeability during this time. These types of ibuprofen release profiles could be useful when an immediate high dose is required, such as in acute infections or inflammation [40], [41]. We assume that a thicker chitosan coating with a greater degree of cross-linking could slow down the release of the drug, which would be beneficial, for example, when administering antibiotics.

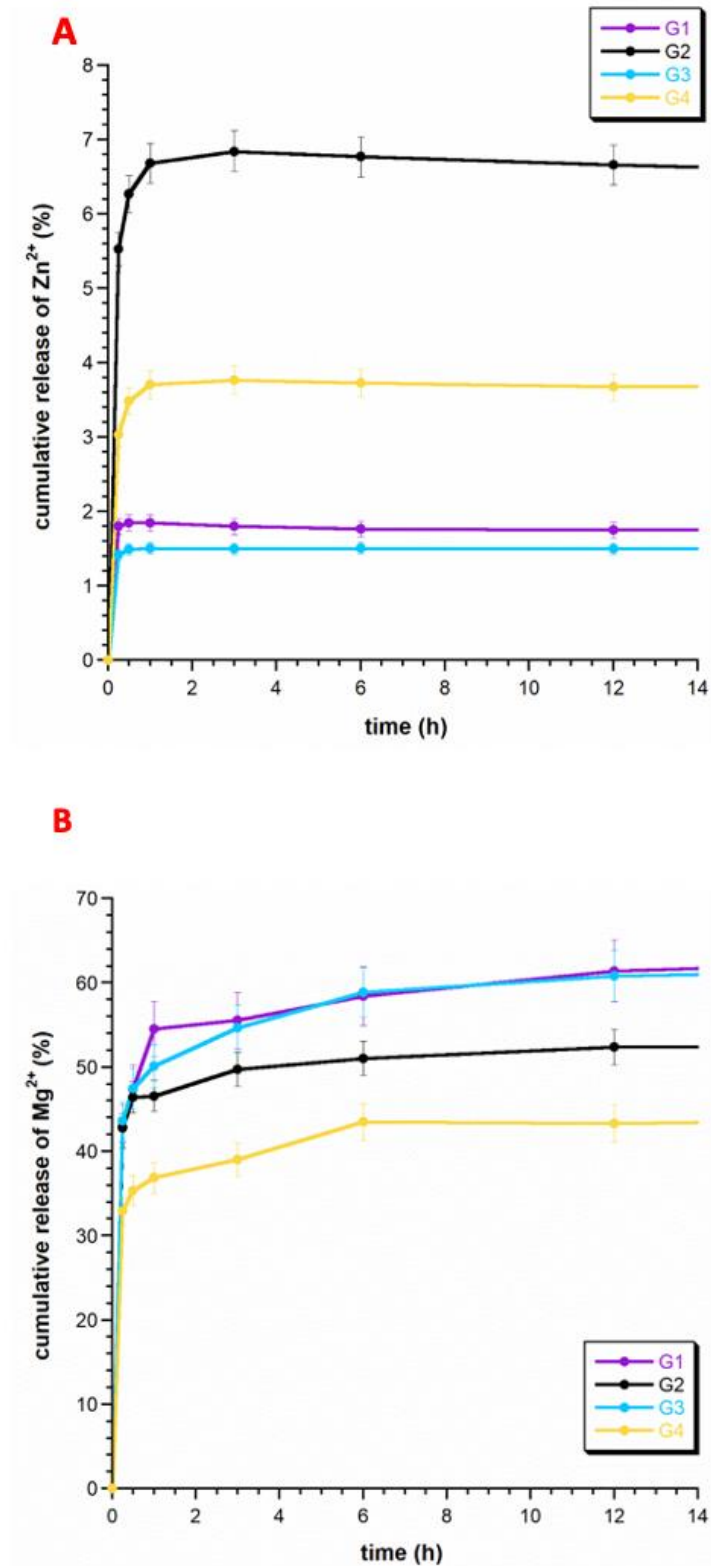
Figure 5. Results of the release of Ibuprofen from the granules.



In the next step, the release of zinc and magnesium ions, incorporated into the mineral phase of the granules (mHA), was executed. Cumulative release curves for the ions spanning a 12-hour duration are delineated in Figures 6A and 6B. After 12 hours, no significant changes in the release profile were observed. A pronounced disparity is evident in the release kinetics of magnesium and zinc ions across all granules, with magnesium exhibiting a notably higher degree of release in comparison to zinc.

Figure 6. The release profiles of zinc ions (A) and magnesium ions (B).

373



374

This observation substantiates our previous hypothesis that magnesium ions undergo partial deposition on the hydrated surface layer of apatite. Consequently, this

375

376

phenomenon facilitates their easier release from microcrystalline hydroxyapatite (mHA) and its composite materials [11]. For instances, G1 and G3, approximately 60% of magnesium ions were released within the 12-hour timeframe, while for instances G2 and G4, this value was comparatively lower at 52% and 43%, respectively. We posit that this discrepancy is associated with the presence of a chitosan coating.

Contrastingly, zinc ions predominantly reside within the crystalline apatitic structure, and cannot be completely released in such a limited time (12 hours). In samples G1 and G3, the cumulative release did not surpass 2%, whereas in G2, a slightly higher release was observed, albeit not exceeding 7% within the stipulated period. It can be assumed that zinc ions will be released to a greater extent from the granules only after their degradation and slow resorption of apatite.

3.6 Cytotoxicity Assay

Table 3 shows the results of the cytotoxicity assessment of the materials. No decrease in MG-63 cell viability was observed for all dilutions tested. The relative cell viability for the extracts was more than 70% of the untreated control and all tested materials were classified as non-cytotoxic.

Table 3. Results of the MTT assay for the highest concentrations of tested extracts (50 mg/mL) in comparison to the untreated control. LT—latex, reference cytotoxic material. PE—polyethylene foil, reference non-cytotoxic material.

Sample	Cells Viability \pm SD (%)	IC50 (mg/mL)	Classification
G1	92 \pm 15	N	Non-cytotoxic
G2	103 \pm 14	N	Non-cytotoxic
G3	92 \pm 12	N	Non-cytotoxic
G4	83 \pm 9	N	Non-cytotoxic
LT	1 \pm 1	6	Cytotoxic
PE	102 \pm 9	N	Non-cytotoxic

4 CONCLUSIONS

The main conclusions of this work can be summarized as follows:

- Nanocrystalline mHA with specified magnesium, carbonate, and zinc content (0.33 \pm 0.02%, 3.21 \pm 0.03%, and 6.4 \pm 0.3%, respectively) were successfully synthesized.
- SEM analysis revealed irregular granule surfaces with interconnected cavities. Chitosan-coated granules exhibited enhanced surface homogeneity. Porosity measurements indicated well-developed surfaces with mesopores.
- FT-IR spectra confirmed the presence of mHA and ibuprofen in the composite materials, despite challenges in distinguishing overlapping bands for polysaccharides (chitosan and alginate) and proteins (type I collagen and sericin).
- Granules exhibited high water absorption capacity, with chitosan-coated granules showing delayed swelling, possibly due to the chitosan membrane.

- Ibuprofen demonstrated burst release profiles, with G3 showing the highest release. Distinct release kinetics were observed for zinc and magnesium ions, supporting the hypothesis of magnesium ion location on the apatite surface and zinc ion in the crystalline core of hydroxyapatite. 411-414
- All tested materials demonstrated non-cytotoxic behavior. 415

The developed composite granules exhibited favourable physicochemical properties, fast drug release, and non-cytotoxic behaviour. These findings support the potential use of the developed biomaterials in dental applications for inflammation treatment and bone regeneration, showcasing their multifunctional and biocompatible nature. 416-419

Author Contributions

 420

Conceptualization, J.K. and B.K.; performed the experiments, B.K., R.F.; analyzed the data, J.K. and B.K.; writing—original draft preparation, B.K.; writing—review and editing, J.K., All authors have read and agreed to the published version of the manuscript. 421-423

Funding

 424

The authors acknowledge the Medical University of Warsaw for the financial support (FW23/N/23). 425-426

Institutional Review Board Statement

 427

Not applicable. 428

Informed Consent Statement

 429

Not applicable. 430

Data Availability Statement

 431

Not applicable. 432

Acknowledgements

 433

We are grateful to Łukasz Pajchel for the support in the HPLC experiments. 434

Conflicts of Interest

 435

The authors declare no conflict of interest 436

REFERENCES

- [1] T. M. Hamdy, „Dental Biomaterial Scaffolds in Tooth Tissue Engineering: a Review”, *Curr. Oral Health Rep.*, **2023**, 10, 1, 14–21.
- [2] M. E. Grawish, L. M. Grawish, H. M. Grawish, M. M. Grawish, S. A. El-Negoly, „Challenges of engineering biomimetic dental and paradental tissues”, *Tissue Eng. Regen. Med.*, **2020**, 17, 403–421.
- [3] H. Ananth, V. Kundapur, H. S. Mohammed, M. Anand, G. S. Amarnath, S. Mankar, „A review on biomaterials in dental implantology”, *Int. J. Biomed. Sci. IJBS*, **2015**, 11, 3, 113.
- [4] L. Hu, Y. Liu, S. Wang, „Stem cell-based tooth and periodontal regeneration”, *Oral Dis.*, **2018**, 24, 5, 696–705.
- [5] S. Sharma, D. Srivastava, S. Grover, V. Sharma, „Biomaterials in tooth tissue engineering: a review”, *J. Clin. Diagn. Res. JCDR*, **2014**, 8, 1, 309.
- [6] D. G. Moussa, C. Aparicio, „Present and future of tissue engineering scaffolds for dentin-pulp complex regeneration”, *J. Tissue Eng. Regen. Med.*, **2019**, 13, 1, 58–75.
- [7] S. Pina, J. M. Oliveira, R. L. Reis, „Natural-based nanocomposites for bone tissue engineering and regenerative medicine: A review”, *Adv. Mater.*, **2015**, 27,7, 1143–1169.
- [8] M. J. Olszta, „Bone structure and formation: A new perspective”, *Mater. Sci. Eng. R Rep.*, **2007**, 58, 3–5, 77–116.
- [9] S. Stratton, N. B. Shelke, K. Hoshino, S. Rudraiah, S. G. Kumbar, „Bioactive polymeric scaffolds for tissue engineering”, *Bioact. Mater.*, **2016**, 1, 2, 93–108.
- [10] H. D. Kim, S. Amirthalingam, S. L. Kim, S. S. Lee, J. Rangasamy, N. S. Hwang, „Bone tissue engineering: Biomimetic materials and fabrication approaches for bone tissue engineering”, *Adv. Healthc. Mater.*, **2017**, 6, 23, 1770120.
- [11] B. Kolodziejska, L. Pajchel, A. Zgadzaj, J. Kolmas, „A New, Biomimetic Collagen–Apatite Wound-Healing Composite with a Potential Regenerative and Anti-Hemorrhagic Effect in Dental Surgery”, *Materials*, **2022**, 15, 24, 8888.
- [12] S. Ohba, Y. Sumita, Y. Nakatani, S. Noda, I. Asahina, „Alveolar bone preservation by a hydroxyapatite/collagen composite material after tooth extraction”, *Clin. Oral Investig.*, **2019**, 23, 5, 2413–2419.
- [13] R. Cholas, „Scaffolds for bone regeneration made of hydroxyapatite microspheres in a collagen matrix”, *Mater. Sci. Eng. C*, **2016**, 63, 499–505.
- [14] N. N. Panda, S. Jonnalagadda, K. Pramanik, „Development and evaluation of cross-linked collagen-hydroxyapatite scaffolds for tissue engineering”, *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.*, **2013**, 24,18, 2031–2044.
- [15] D. Zhang, X. Wu, J. Chen, K. Lin, „The development of collagen-based composite scaffolds for bone regeneration”, *Bioact. Mater.*, **2018**, 3, 1, 129–138.
- [16] K. M. Galler, R. N. D’souza, J. D. Hartgerink, G. Schmalz, „Scaffolds for dental pulp tissue engineering”, *Adv. Dent. Res.*, **2011**, 23, 3, 333–339.
- [17] B. Kołodziejska, A. Kaflak, J. Kolmas, „Biologically Inspired Collagen/Apatite Composite Biomaterials for Potential Use in Bone Tissue Regeneration—A Review”, *Materials*, **2020**, 13, 7.

- [18] T. Matsumoto, M. Okazaki, A. Nakahira, J. Sasaki, H. Egusa, T. Sohmura, „Modification of Apatite Materials for Bone Tissue Engineering and Drug Delivery Carriers”, *Curr. Med. Chem.*, **2007**, 14, 25, 2726–2733.
- [19] M. Otsuka, H. Nakagawa, A. Ito, W. I. Higuchi, „Effect of geometrical structure on the drug release rate of a three-dimensionally perforated porous apatite/collagen composite cement”, *J. Pharm. Sci.*, **2010**, 99, 1, 286–292.
- [20] S. Nayak, S. Dey, S. C. Kundu, „Silk sericin–alginate–chitosan microcapsules: Hepatocytes encapsulation for enhanced cellular functions”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2014**, 65, 258–266.
- [21] J. Urbaniak, B. Kołodziejska, A. Kafłak, „Synthesis of new chitosan-carbonate hydroxyapatite composites with potential application in bone tissue engineering–physicochemical analysis”, *PCACD*, **2022**, 27, 217–227.
- [22] P. de Vos, M. M. Faas, B. Strand, R. Calafiore, „Alginate-based microcapsules for immunoisolation of pancreatic islets”, *Biomaterials*, **2006**, 27, 32, 5603–5617.
- [23] J. Liu, „Silk sericin-based materials for biomedical applications”, *Biomaterials*, **2022**, 121638.
- [24] S. C. Kundu, „Nonmulberry silk biopolymers”, *Biopolymers*, **2012**, 97, 6, 455–467.
- [25] S. C. Kundu, B. C. Dash, R. Dash, D. L. Kaplan, „Natural protective glue protein, sericin bioengineered by silkworms: Potential for biomedical and biotechnological applications”, *Prog. Polym. Sci.*, **2008**, 33, 10, 998–1012.
- [26] Y.-Q. Zhang, „Applications of natural silk protein sericin in biomaterials”, *Biotechnol. Adv.*, **2002**, 20, 2, 91–100.
- [27] S. Zhaorigetu, N. Yanaka, M. Sasaki, H. Watanabe, N. Kato, „Inhibitory effects of silk protein, sericin on UVB-induced acute damage and tumor promotion by reducing oxidative stress in the skin of hairless mouse”, *J. Photochem. Photobiol. B*, **2003**, 71, 1–3, 11–17.
- [28] J.-B. Fan, L.-P. Wu, L.-S. Chen, X.-Y. Mao, F.-Z. Ren, „Antioxidant activities of silk sericin from silkworm *Bombyx mori*”, *J. Food Biochem.*, **2009**, 33, 1, 74–88.
- [29] P. Aramwit, S. Kanokpanont, P. Punyarit, T. Srichana, „Effectiveness of inflammatory cytokines induced by sericin compared to sericin in combination with silver sulfadiazine cream on wound healing.”, *Wounds Compend. Clin. Res. Pract.*, **2009**, 21, 8, 198–206.
- [30] S. R. Ianiro, B. G. Jeansonne, S. F. McNeal, P. D. Eleazer, „The effect of preoperative acetaminophen or a combination of acetaminophen and Ibuprofen on the success of inferior alveolar nerve block for teeth with irreversible pulpitis”, *J. Endod.*, **2007**, 33, 1, 11–14.
- [31] G. T. Tihan, I. Rău, R. G. Zgârian, M. V. Ghica, „Collagen-based biomaterials for ibuprofen delivery”, *Comptes Rendus Chim.*, **2016**, 19, 3, 390–394.
- [32] B. Kołodziejska, N. Sturaro, A. Zgadżaj, J. Kolmas, „Effect of different synthesis conditions on physicochemical and biological properties of apatites”, *Ceram. Int.*, **2023**.

- [33] A. B. Sønju Clasen, I. E. Ruyter, „Quantitative determination of type A and type B carbonate in human deciduous and permanent enamel by means of Fourier transform infrared spectrometry”, *Adv. Dent. Res.*, **1997**, 11, 4, 523–527.
- [34] S. Zhang, M. S. Reddy, N. Kokalis-Burelle, L. W. Wells, S. P. Nightengale, J. W. Klopper, „Lack of Induced Systemic Resistance in Peanut to Late Leaf Spot Disease by Plant Growth-Promoting Rhizobacteria and Chemical Elicitors”, *Plant Dis.*, **2001**, 85, 8, 879–884.
- [35] I. O. for Standardization, „ISO 10993-5: 2009-Biological evaluation of medical devices-Part 5: Tests for in vitro cytotoxicity”. ISO Geneva, **2009**.
- [36] A. Nasrullah, A. H. Bhat, A. Naeem, M. H. Isa, M. Danish, „High surface area mesoporous activated carbon-alginate beads for efficient removal of methylene blue”, *Int. J. Biol. Macromol.*, **2018**, 107, 1792–1799.
- [37] J. Iqbal, „Synergistic effects of activated carbon and nano-zerovalent copper on the performance of hydroxyapatite-alginate beads for the removal of As³⁺ from aqueous solution”, *J. Clean. Prod.*, **2019**, 235, 875–886.
- [38] K. Szurkowska, P. Kazimierczak, J. Kolmas, „Mg, Si—Co-Substituted Hydroxyapatite/Alginate Composite Beads Loaded with Raloxifene for Potential Use in Bone Tissue Regeneration”, *Int. J. Mol. Sci.*, **2021**, 22, 6, 2933.
- [39] S. Sotome, „Synthesis and in vivo evaluation of a novel hydroxyapatite/collagen–alginate as a bone filler and a drug delivery carrier of bone morphogenetic protein”, *Mater. Sci. Eng. C*, **2004**, 24, 3, 341–347.
- [40] A. Tsuchiya, „Effects of pore size and implant volume of porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) on bone formation in a rabbit bone defect model”, *J. Med. Dent. Sci.*, **2008**, 55, 1, 91–99.
- [41] G. Pasparakis, N. Bouropoulos, „Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate–chitosan beads”, *Int. J. Pharm.*, **2006**, 323, 1, 34–42.
- [42] A. S. Hoffman, „Hydrogels for biomedical applications”, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, **2012**, 64, 18–23.



Warszawa, 26.10.2023

mgr farm. Barbara Kołodziejska

OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
opracowanie koncepcji pracy, przegląd literatury, otrzymanie kompozytów, wykonanie badań fizykochemicznych, udział w interpretacji wyników, przygotowanie manuskryptu.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 70 %.

Barbara Kołodziejska

(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr hab. n. farm. Joanna Kolmas

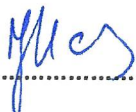
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi: koncepcja i nadzór merytoryczny nad częścią eksperymentalną, interpretacja części wyników i przygotowanie tekstu, autor korespondencyjny.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 25 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.


.....
(podpis oświadczającego)

Warszawa, 24.10.2023

dr n. farm. Ramona Figat

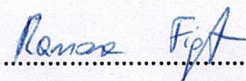
OŚWIADCZENIE

Jako współautor pracy pt. ***Biomimetic Apatite/Natural Polymers Composite Granules as Multifunctional Dental Tissue Regenerative Material***

Oświadczam, iż mój własny wkład merytoryczny w przygotowanie, przeprowadzenie i opracowanie badań oraz przedstawienie pracy w formie publikacji stanowi:
ocena cytotoksyczności próbek na hodowlach komórkowych *in vitro*.

Mój udział procentowy w przygotowaniu publikacji określam jako 5 %.

Jednocześnie wyrażam zgodę na wykorzystanie w/w pracy jako część rozprawy doktorskiej mgr Barbary Kołodziejkiej.



.....
(podpis oświadczającego)