

Карбонатгидроксиапатит как фактор структурно-функциональной организации минерализованных тканей в норме и при патологии. Перспективы применения в костнопластической хирургии

А.Н. ГУРИН¹, к.м.н. Н.А. ГУРИН², д.м.н., проф. Ю.А. ПЕТРОВИЧ²

Carbonated hydroxyapatite as a factor of structural-functional organization of mineralized tissues in norm and pathology. Perspectives of use in osteoplastic surgery

A.N. GURIN, N.A. GURIN, YU.A. PETROVICH

¹Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии; ²Московский государственный медико-стоматологический университет

Ключевые слова: тканевая инженерия, кость, остеопластические материалы, карбонатгидроксиапатит, несущие матрицы.

Key words: tissue engineering, bone, bone graft, carbonated hydroxyapatite scaffold.

Из материалов, обладающих способностью стимулировать процессы репаративного остеогенеза, наиболее детально и всесторонне изучен гидроксиапатит (ГАП) — $\text{Ca}_n(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Появление композитов из ГАП в форме порошков, гранул, гелей в сочетании с полисахаридами хитозаном, альгинатом [11], гиалуроновой кислотой, белком коллагеном, пептидами [36], эмбриональными стволовыми клетками [63], лекарственными и другими препаратами расширило возможности восстановления патологически измененных минерализованных тканей (МТ) [19, 34, 44]. Однако о карбонатгидроксиапатите (КГАП) — $\text{Ca}_n(\text{PO}_4)_5\text{CO}_3(\text{OH})_2$, схожем по составу и структуре с минеральными компонентами нативной кости, в большинстве отечественных руководств по стоматологии вообще не имеется сведений либо их недостаточно.

Целью нашего сообщения явилось освещение роли КГАП в обменных процессах в норме и при патологических состояниях в МТ и возможности его применения в качестве остеопластического материала для заполнения костных дефектов.

Содержание и роль КГАП в норме и при патологии МТ

Основным минеральным компонентом костной ткани является ГАП (содержание — более 75%). Молярное соотношение Са/Р колеблется от 1,33 до 2,0 [3]. Другой важный элемент МТ — КГАП (содержание — около 4%).

Биологическая целесообразность присутствия карбонат-групп в апатите определяется их способностью адаптироваться к постоянно меняющимся условиям внутренней среды. Карбонатные группы находятся в нестабильном положении, замещая либо OH^- -группы (А-тип замещения), либо $(\text{PO}_4)^{3-}$ -группы (В-тип замещения). Для костной ткани характерен смешанный АВ-тип замещения [1].

Большой радиус молекулы карбоната создает искажения, напряжение и нестабильность в структуре апатита, что приводит к повышению его растворимости [5]. Известно, что с возрастом в эмали карбонат может быть замещен фтором, что способствует устойчивости эмали к действию кислот. Это объясняют расположением всех 3 атомов кальция и атома фтора на одной плоскости в центре треугольника, образуемого атомами кальция [9]. При послыйном исследовании от поверхности эмали к эмалево-дентинному соединению содержание фтора уменьшается, а карбоната — увеличивается. Поверхностный слой более устойчив к кариозному процессу, чем подповерхностный. Снижение кристалличности поверхностных слоев эмали, наиболее подверженных кариесу, связано с уменьшением содержания фтора и увеличением содержания карбоната, а также с наличием микропористости. В здоровой эмали они находятся преимущественно в

межпризматическом веществе и линиях Ретциуса, занимая не более 0,5% объема эмали [8, 10].

Замещая те или иные ионы, карбонат-ион повышает либо снижает выраженность кристаллической структуры, влияя на растворимость апатита. Данное явление наблюдали при экспериментальном кариесе у крыс. Изучали обновление меченого карбоната в апатите зуба и включение карбоната в белок эмали [7, 12]. Карбонат, замещая фосфат *in vivo*, увеличивает в зубах фракцию КГАП и снижает резистентность к кариесу [22, 46].

При экспериментальном кариесе, рахите и переломах челюстей выявляется быстрое включение меченого радиоуглеродом [¹⁴С]карбоната в кости крыс уже через 5 мин после введения и быстрое выведение части метки из кости из-за улетучивания ¹⁴СО₂ с выдыхаемым воздухом и переходом в мочу. Неудаленная метка остается длительно связанной с костью [6, 13]. Как известно, метаболизм индикаторных количеств меченных радиоуглеродом [¹⁴С] соединений практически не отличается от метаболизма немеченных соединений.

При исследовании интенсивности и превалирующего направления транспорта карбоната между кровью и костями при правостороннем переломе нижней челюсти у крыс выявили с помощью новой, защищенной патентом [14], методики, что на ранней стадии клеточно-волоконистой мозоли из крови в кость переходит больше [¹⁴С]карбоната. В стадии хондронной и первичной костной мозоли скорость выхода [¹⁴С]карбоната больше, чем включения [15–17]. Эти данные об особенностях включения карбоната в костное и хрящевое вещество учитываются при разработке методов медикаментозного лечения перелома костей путем введения лекарственных субстратов на различных стадиях репаративного остеогенеза.

Резорбция гранул КГАП

Как известно, скорость резорбции имплантационного материала в значительной степени определяет эффективность его замещения регенерирующей костной тканью [41]. В связи с этим при разработке синтетических остеопластических материалов ставятся задачи достичь близости их химического и фазового состава к МТ и тем самым добиться оптимальных резорбционных характеристик. Остеопластические материалы из ГАП наиболее часто используются в челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии благодаря присущей им высокой биосовместимости и отсутствию иммуногенности. Имплантированный в костные дефекты ГАП выполняет роль опорной матрицы для образования костных структур, где гранулы ГАП, заключенный в костный регенерат, длительно не резорбируется. Для достижения оптимального баланса резорбции материала и течения репаративных процессов в костной ткани в ГАП добавляют в разных концентрациях карбонат.

Нерезорбирующийся ГАП при его имплантации в кость называется «замурованным» в новообразованную костную ткань. Образовавшийся костный минеральный конгломерат зачастую характеризуется низкой механической прочностью. Этому же способствует и образование в области имплантации ГАП несовершенной костной ткани, что определяет риск возникновения осложнений. С целью регулирования скорости резорбции ГАП в его кристаллическую решетку ввели карбонат-ионы [20]. Источником карбонат-ионов обычно служил карбонат аммония [1, 2, 9]. Полоса в области 1410–1460 см⁻¹ и пик при 870 см⁻¹ при ИК-спектроскопии свидетельствовали о наличии карбонат-групп. Для получения керамики из КГАП необходима температура спекания 1200–1300°C, при которой часть карбонат-ионов улетучивается. Проблему решили, добавляя 3–7% K₂CO₃ при спекании КГАП, что позволило при 700–850°C получить керамику смешанного АВс типа, по плотности близкую к нативной кости.

Ранее был разработан оригинальный способ получения пористых керамических гранул КГАП, основанный на эффекте сфероидизации частиц, формирующихся при смешении 2 несмешивающихся жидкостей, одной из которых является водная суспензия КГАП, а другой — желатин [1]. Полученные таким способом гранулы спекали при 750–800°C. Пористость в спеченных гранулах составляла 40–60% в зависимости от концентрации желатина. Полученные гранулы исследовали при заполнении костного дефекта мышелка крысы. Установлено, что гранулы КГАП обладает большей скоростью биорезорбции, чем синтетический ГАП [20]. Похожие результаты получили, помещая гранулы КГАП 3,2 масс.%, в раствор SBF¹, где кристаллическая «костеподобная» оболочка формировалась на 7-й день, тогда как у ГАП — на 24-й [28]. При 3,2 масс.% имплантированные под кожу гранулы КГАП растворялись в 5 раз быстрее, чем ГАП [21]. Керамические КГАП имплантаты при растворении выделяют в окружающую среду ионы Са и РО₄, которые, соединяясь с карбонат-ионами и белками и осажаясь на поверхности имплантата, формируют апатитоподобную оболочку [54]. По-видимому, остеобласты, осажаясь на этой оболочке, влияют на скорость растворения КГАП [57]. При нагревании геля кальция трифосфата с мочевиной в течение 24 ч готовили КГАП, более растворимый, чем ГАП. Приготовленный КГАП можно использовать как биорезорбируемый костный заменитель [46].

При растворении гранул КГАП с 8,2 и 11,3% замещения с ГАП в SBF жидкости, по составу соответствующей плазме крови, на КГАП через 2 дня формировалась кристаллическая «костеподобная» апатитная оболочка, на ГАП — через 21 день [37, 43]. Исследовали растворимость гранул КГАП с разной степенью замещения карбонат-групп (0,6, 6 и 9%). Большой растворимостью обладали гранулы (9%), меньшей — ГАП [4].

Поры гранул КГАП и их значение

КГАП хорошо поддается порообразованию. Пористость зависит от характера выгорающих добавок, используемых при спекании. В зависимости от цели использования гранул получают микропористую и макропористую структуру. Поры необходимы для пролиферации, дифференцировки клеток, инфильтрации тканевой жидкостью. Резорбция гранул и объем костной ткани возрастают с увеличением размера пор [27, 31, 51]. Условно классифицируют поры по их диаметру: макропоры (>100 мкм), мезопоры (10–100 мкм), микропоры (<10 мкм). Оптимальными для интеграции костной ткани считаются поры размером 200–300 мкм, так как они создают своеобразные внутренние замки «интерлоки» для прикрепления клеток кости [25, 35, 62]. Через микропоры, связанные с макропорами, циркулирует межклеточная жидкость, облегчая прорастание сосудов и новообразованной ткани внутрь гранул ГАП [26]. Для лучшей резорбции и адгезии клеточных элементов с помощью выгорающих добавок получили в пределах 30% взаимопроницающие поры поверхности КГАП [1, 35]. Аналогичные результаты были достигнуты при исследовании ре-

зорбции гранул КГАП в диапазоне 0,6, 6 и 9% замещения CO₃²⁻, содержащих микропоры (<10 мкм) и макропоры (200–250 мкм) и имеющих различную структурную организацию поверхности. При имплантации в мышелок бедренной кости крысы происходило образование различного костного матрикса новообразованного костного вещества [4].

Если при синтезе гранул спекающая добавка закрывает поры, можно использовать различные протравливающие агенты. Так, после 3-минутной протравки 50% раствором метилхлорида в синтезированных полых сферах диаметром 1,2 мм и длиной 50–150 мкм из лактата и карбоната кальция при разложении минерала ватерита открылись поры с диаметром 800 мкм [40]. В сферы вводили коммитированные клетки МС3Т3-Е1, затем их инкубировали в сыворотке телят и фиксировали. Изучение полых сфер с помощью сканирующей электронной микроскопии показало, что к наружной поверхности прикреплялось значительно меньше клеток, чем к внутренней. Сферы с микро- и макропорами, наполненные клетками, могут быть использованы для замещения костных дефектов [1, 53].

Применение нанопорошков из КГАП

Особый интерес представляют гранулы КГАП из наноструктурированных порошков с размером частиц от 50 до 500 нм. Гранулы КГАП из нанопорошков характеризует высокая скорость резорбции, что способствует увеличению скорости репаративного остеогенеза. Проводилось изучение синтезированных из нанопорошка гранул КГАП В-типа (9%) с общей пористостью 45%. Через 1 мес после имплантации в костные дефекты кроликов выявилась их большая биорезорбция, чем у гранул ГАП [37]. При образовании кости на гранулах КГАП формировались толстые костные трабекулы, гаверсовы каналы, пластинчатые структуры, типичные для зрелой кости. На гранулах ГАП эти процессы были выражены слабее.

Нанопорошки КГАП применяли для армирования хитозановых губок, использующихся в качестве остеопластического материала [58]. С помощью оригинальной методики добились плотной связи КГАП и органического каркаса, равномерного распределения нанокристаллов в губке.

КГАП применяли для получения композита с полисахаридом хитозаном [49]. Авторы [52] отмечают, что хитозан, кроме характерных для него признаков бактерицидности и стимуляции пролиферации остеобластов, снижает кристалличность КГАП, что способствует лучшей его растворимости. В композите с коллагеном были получены структуры, похожие на костную ткань, что свидетельствует о возможности использования созданного композита для заполнения костных дефектов.

Имеются публикации [47, 48] об использовании нанокристаллов КГАП для транспортировки ДНК в клетки организма, поскольку мелкие частицы активнее фагоцитируются и быстрее перемещают связанную ДНК, чем более крупные. Критерием освобождения ДНК служила экспрессия соответствующих генов. При этом отмечалась необходимость кислой среды для растворения КГАП и освобождения связанного ДНК. Было отмечено, что метод транспортировки ДНК с преципитацией на КГАП оказался в 25–50 раз эффективнее использования для этой цели липосом и вирусов [23, 30, 33, 39, 64].

Интересные результаты [42, 50] были получены при исследовании адгезии эмбриональных стволовых клеток на дисках КГАП из нанопорошков с содержанием 2,5 и 5 масс.% карбонат-групп. Отмечалось, что синтез КГАП проходил при высокой температуре (1160°C), в результате чего появилась токсичная для клеточных элементов фаза СаО, что сказалось на результатах эксперимента. Авторы указывали, что достоверных различий между числом живых клеток, покрывающих поверхность КГАП, и числом живых клеток, выращенных на поверхности желатина, используемого в качестве контроля, обнаружено не было. Оценка числа погибших клеток при выращивании на дисках КГАП с замещением 2,5 и 5 масс.% карбонат-групп не выявила статистически достоверной разницы. Это свидетельствовало о том, что различная концентрация карбонат-иона в культуральной среде не оказывает влияния на отмирание клеток.

¹SBF (simulated body fluid) — среда, симулирующая тканевую жидкость.

С целью исследования клеточной адгезии на поверхности КГАП измеряли свободную поверхностную энергию и адгезию культуры остеобластов на полированных дисках ГАП, КГАП и карбоната кальция [56]. Наличие белка на поверхности дисков усиливало адгезию остеобластов. Показано, что поверхностная энергия остеобластов человека на прессованных дисках КГАП при смачивании водой меньше, чем на ГАП [55]. Соответственно через 7 ч контакта число адгезировавших на КГАП клеток было меньше, чем на ГАП. К 8-му дню их количество уравнивалось. Кроме того, показано, что на КГАП остеобласты синтезируют в 2 раза меньше коллагена, чем на ГАП. Отмечается, что КГАП был синтезирован при высокой температуре (1000°C), что приводило к появлению стабильной структуры А-типа. Не исключено, что в результате синтеза могли появиться промежуточные фазы типа СаО, отрицательно влияющие на адгезию клеток. На ГАП высокая температура спекания не оказывает подобного влияния, поэтому характер адгезии клеток оставался неизменным.

Ряд исследований ГАП и КГАП проведен с эмбриональными стволовыми клетками. При колонизации эмбриональных стволовых клеток отмечалось, что количество живых клеток, выращенных на поверхности КГАП, достоверно превышало их число при выращивании на ГАП [32, 33]. Можно предположить, что карбонат-ион способен выполнять функции промотора клеточной адгезии. Это в свою очередь увеличивает клеточную пролиферацию и/или оказывает стимулирующий эффект на рост клеток, создает перспективу для дальнейших исследований, имеющих важное значение для прикладных аспектов тканевой инженерии.

Исследовали адсорбцию и выделение основного фактора роста фибробластов (bFGF) с поверхности гранул ГАП и КГАП. Установлено, что этот фактор адсорбируется и выделяется во внешнюю среду с поверхности КГАП в большем количестве, чем у ГАП [45]. Это показывает, что адсорбционные возможности у КГАП выше, чем у ГАП. По-видимому, это связано с топографией и рельефом поверхности исследованных образцов. При рентгенофотонном спектроскопическом изучении поверхности апатитов был выявлен энергетический пик, связанный с фосфором и ионом HPO_4^{2-} , у КГАП он выше, чем у ГАП.

И.В. Фадеева с соавт. [18] предполагают, что взаимодействие белка с поверхностью образцов может осуществляться за счет кислых остатков фосфатов, γ -карбоксиглутаминовой, аспарагиновой и глутаминовой кислот.

Практическое применение КГАП

С применением КГАП в составе мембраны для направленной регенерации костной ткани, была создана трехслойная мембрана на основе нанокристаллического КГАП и сополимера полилактата [38]. Первый пористый слой был представлен нанокристаллами КГАП, 8 масс.%, коллагеном и сополимером полилактата, второй — КГАП, 4 масс.%, коллагеном и полилактатом, третий, непористый, — полилактатом. Результаты использования такой мембраны на культуре клеток остеобластов были выше, чем у мембраны из чистого полилактата.

Изучая скорость высвобождения антибиотиков (цефалотин, амоксициллин, гентамицин, ванкомицин) из КГАП, покрывающего поверхность титанового имплантата с помощью тестовой культуры *S. aureus*, было показано, что цефалотин, содержащий карбоксильные группы и поэтому связанный с КГАП прочнее, чем другие антибиотики, высвобождался медленнее [60]. Использование КГАП в качестве несущей матрицы для антибиотиков с карбоксильной группой позволяет предотвратить постоперационные инфекции и добиться остеоинтеграции имплантатов без осложнений.

Особый интерес представляет использование остеопластического материала Bio-Oss (Geistlich), широко применяемого в хирургической стоматологии. Судя по структурным характеристикам данного препарата, полученного из костей новозеландских коров, он состоит из КГАП с примесью коллагена 0,05%. Это подтверждают рентгенофазовый анализ, определяющий фазу карбоната в структуре апатита, а также ИК-спектроскопия с частотными колебаниями, характерными для карбонат-групп [61].

КГАП входит в состав многих цементов, способствуя их лучшей растворимости [24]. Кальций-фосфатные цементы часто используются при восстановительных операциях в челюстно-лицевой хирургии. Существуют цементы на основе КГАП (Norian SRS), похожие по фазовому составу на минеральные компоненты костной ткани. Их с успехом применяют как в челюстно-лицевой хирургии [29], так и в пародонтологии при закрытии многоступенчатых и фуркационных костных дефектов [59].

Таким образом, использование КГАП как остеопластического материала перспективно для заполнения костных дефектов и в составе композитов, цементов, несущей матрицы для антибиотиков, ДНК, факторов роста и стромальных стволовых клеток.

ЛИТЕРАТУРА

1. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция. М: Наука 2005;204.
2. Бибииков В.Ю., Смирнов В.В., Баринов С.М. Спекание карбонатгидроксиапатитовой керамики с добавкой K_2CO_3 . Всероссийское совещание «Биокерамика в медицине». Сборник тезисов РАН 2006;39—41.
3. Боровский Е.В., Леонтьев В.К. Биология полости рта. М: Медицина 1991;301.
4. Гурин А.Н., Федотов А.Ю. Синтетические гранулы карбонатгидроксиапатита, их влияние на регенерацию костной ткани. «Биотехнология-2008». Сборник тезисов конференции. М 2008;405.
5. Гурин Н.А. Изучение апатитов и белков эмали зуба в пре- и постнатальном онтогенезе человека: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. М 1986.
6. Дмитриев И.М. Радиоизотопное исследование включения ^{14}C карбоната в зубы и кости крыс разного возраста в условиях физиологии и патологии: Автореф. дис. ... канд. мед. наук. Одесса 1970;15.
7. Дмитриев И.М., Петрович Ю.А. Роль CO_2 в механизме репаративной регенерации костной ткани (радиоизотопное исследование). Пат физиол и эксп тер 1981;3:28—32.
8. Кисловский Л.Д., Кнубовец Р.Г. Об изоморфизме фтор-гидроксил в апатите по данным инфракрасной спектроскопии. Записки Всесоюзного минералогического общества. М 1970;2:99:609—614.
9. Кубарев О.Л. Формирование микроструктуры и свойств керамики на основе гидроксиапатита и трикальцийфосфата: Автореф. дис. ... канд. тех. наук. М 2007.
10. Пахов Г.Н. Кариез зубов и его профилактика. Рига 1976.
11. Петрович Ю.А., Гурин А.Н., Гурин Н.А., Киченко С.М. Перспективы применения в стоматологии полифункциональных биополимеров хитозана и альгината. Рос стоматол журн 2008;2:66—73.
12. Петрович Ю.А., Дмитриев И.М. Включение ^{14}C карбоната в зубы и кости белых крыс, содержащихся на обычной и кариезогенной диете. Стоматология 1968;5:9—12.
13. Петрович Ю.А., Дмитриев И.М., Колосовский В.М. О фазе быстрого поступления ^{14}C карбоната в слюну и обызвествленные ткани и о фазе быстрого выведения из них. Совещание по проблеме гистогематических барьеров, 3-е: Тезисы. М: Наука 1966;102—103.
14. Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., Киченко С.М. Способ определения направления транспорта и интенсивности обмена веществ между минерализованной тканью и контактирующей с ней биологической жидкостью. Патент на изобретение №2242007 от 24.12.2004. Бюлл изобр и откр 2004;34.
15. Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., Киченко С.М. Способ определения флюктуирующей превышения интенсивности транспорта веществ в превалярующем направлении между кровью и костями. Бюлл эксп биол 2006;142:11:585—590.

16. Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., Киченко С.М., Дмитриев И.М. Изучение меченого карбоната с помощью нового коэффициента кость/сыворотка крови в здоровом организме, при репаративном остеогенезе и нарушении иннервации. Бюлл эксп биол 2003;136:8:156—159.
17. Петрович Ю.А., Подорожная Р.П., Киченко С.М., Дмитриев И.М. Влияние перелома нижнечелюстной кости на интенсивность и преобладающее направление транспорта карбоната и цитрата между кровью и костями. Стоматология 2006;85:2:14—21.
18. Фадеева И.В., Григорьянц Л.А., Гурин А.Н. Пористые керамические гранулы карбонатгидроксиапатита как остеопластический материал для замещения костных дефектов. Ежегодный научный форум «Стоматология 2007», 9-й: Материалы. М 2007;361—363.
19. Balasubramani M., Kumar T.R., Babu M. Skin substitutes: a review. Burns 2001;27:534—544.
20. Barinov S.M., Gurin A.N., Komlev V.S. et al. Porous ceramic carbonate-hydroxyapatite granules for medical application. XVIII Mendeleev congress on general and applied chemistry 2007;4:490 (при поддержке гранта РФФИ №06-03-32192).
21. Barralet J., Akae M., Aoki H. et al. Dissolution of dense carbonate apatite subcutaneously implanted in Wistar rats. J Biomed Mat Res 2000;49:2:176—182.
22. Chickerur N.S., Tung M.S., Brown W.E. A mechanism for incorporation of carbonate into apatite. Calcif Tissue Int 1980;32:1:55—62.
23. Chowdhury E.H., Maruyama A., Kano A. et al. pH-sensing nano-crystals of carbonate apatite: Effects on intracellular delivery and release of DNA for efficient expression into mammalian cells. Gene 2006;376:87—94.
24. Combes C., Rey C. Calcium Carbonate Biphasic cement concept to control cement resorption. Eur Cells Mat 2006;11:Suppl 1:8.
25. Djedzic D.M., Savva I.H., Wilkinson D.S. et al. Osteoconduction on, and bonding to, calcium phosphate ceramic implants. Mat Res Soc Symp Proc 1996;414:147—156.
26. Egli P.S., Muler W., Schenk R.K. et al. Porous hydroxyapatite and tricalcium phosphate cylinders with two different pore size ranges implanted in the cancellous bone of rabbits. A comparative histomorphometric and histologic study of bony ingrowth and implant substitution. Clin Orthop 1988;232:127—138.
27. Frayssinet P., Rouquety N., Fages J. et al. The influence of sintering temperature on the proliferation of fibroblastic cells in contact with hydroxyapatite bioceramics. J Biomed Mat Res 1997;35:337—347.
28. Gibson I.R., Bonfield W. Novel synthesis and characterization of an AB-type carbonate-substituted hydroxyapatite. J Biomed Mat Res 2002;59:697—708.
29. Gomez E., Matrin M., Arias J. et al. Clinical Applications of Norian SRS (calcium phosphate cement) in craniofacial reconstruction in children: our experience at hospital La Paz since 2001. J Oral Maxillofac Surg 2005;63:8—14.
30. Graham F.L., van der Eb A.J. Transformation of rat cells by DNA of human adenovirus 5. Virology 1973;52:456—467.
31. Guillemain G., Meunier A., Dallant P. et al. Comparison of coral resorption and bone apposition with two natural corals of different porosities. J Biomed Mat Res 1989;23:765—779.
32. Harrison J., Melville A.J., Forsythe J.S. et al. Sintered hydroxylfluorapatites-IV: the effect of fluoride substitutions upon colonization of hydroxyapatites by mouse embryonic stem cells. Biomaterials 2004;25:4977—4986.
33. Jordan M., Schallhorn A., Wurm F.M. Transfecting mammalian cells: optimization of critical parameters affecting calcium-phosphate precipitate formation. Nucl Acids Res 1996;24:596—601.
34. Kim I.-Y., Seo S.-J., Moon H.-S. et al. Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications. Biotechnol Adv 2008;26:1—21.
35. Komlev V.S., Barinov S.M. Porous hydroxyapatite ceramics of bi-modal pore size distribution. J Mat Sci Mat Med 2002;13:295—299.
36. Kroese-Deutman H.C., van der Dolder J., Spauwen P.H. et al. Influence of RGD-loaded titanium implants on bone formation in vivo. Tiss Eng 2005;11:1867—1875.
37. Landy E., Celotti G., Logroscino G. et al. Carbonated hydroxyapatite as bone substitute. J Eur Cer Soc 2003;23:2931—2937.
38. Liaoa S., Wang W., Uo M. A three-layered nano-carbonated hydroxyapatite/collagen/PLGA composite membrane for guided tissue regeneration. Biomaterials 2005;26:36:7564—7571.
39. Lindell J., Girard P., Muller N. et al. Calfection: a novel gene transfer method for suspension cells. Biochim Biophys Acta 2004;1676:155—161.
40. Maeda H., Kasuga T., Hench L.L. Preparation of poly(L-lactic acid)-polysiloxane-calcium carbonate hybrid membranes for guided bone regeneration. Biomaterials 2006;27:1216—1222.
41. Mathur K.K., Tatum S.A., Kellman R.M. Carbonated apatite and hydroxyapatite reconstruction. Arch Facial Plast Surg 2003;5:5:379—383.
42. Melville A.J., Harrison J., Gross K.A. et al. Mouse embryonic stem cell colonization of carbonated apatite surfaces. Biomaterials 2006;27:615—622.
43. Merry J.C., Gibson I.R., Best S.M. et al. Synthesis and characterization of carbonate hydroxyapatite. J Mat Sci Mat Med 1998;9:12:779—783.
44. Metcalfe A.D., Ferguson M.W.J. Bioengineering skin using mechanisms of regeneration and repair. Biomaterials 2007;28:5100—5113.
45. Midy V., Rey C., Bres E. et al. Basic fibroblast growth factor adsorption and release properties of calcium phosphate. J Biomed Mat Res 1998;41:405—411.
46. Mizutani Y., Hattori M., Okuyama M. et al. Carbonate-containing hydroxyapatite derived from calcium tripolyphosphate gel with urea. J Mat Sci Mat Med 2005;16:8:709—712.
47. Murugan R., Ramakrishna S. Production of ultra-fine bioresorbable carbonates hydroxyapatite. Acta Biomater 2006;2:201—206.
48. Murugan R., Ramakrishna S., Panduranga R. Nanoporous hydroxy-carbonate apatite scaffolds made of natural bone. Mat Letters 2006;60:2844—2847.
49. Murugan R., Sampath Kumar T.S., Yang F. et al. Hydroxyl carbonateapatite hybrid bone composites using carbonylate polymer. J Comp Mat 2005;39:13:1159—1169.
50. Olsson L.-F., Sandin K., Odselius R. et al. In vitro formation of nanocrystalline carbonate apatite - A structural and morphological analogue of atherosclerotic plaques. Eur J Inorg Chem 2007;4123—4127.
51. Ong J.L., Hoppe C.A., Cardenas H.L. et al. Osteoblast precursor cell activity on HA surfaces of different treatments. J Biomed Mat Res 1998;29:389—401.
52. Park J.-C., Han D.-W., Suh H. A bone replaceable artificial bone substitute: morphological and physicochemical characterization. Yonsei Med J 2000;41:4:468—476.
53. Porter A., Patel N., Brooks R. et al. Effect of carbonate substitution on the ultrastructural characteristics of hydroxyapatite implants. J Mat Sci Mat Med 2005;16:899—907.
54. Radin S.R., Ducheyne P. The effect of calcium phosphate ceramic composition and structure on in vitro behavior. II. Precipitation. J Biomed Mat Res 1993;27:1:35—45. (Erratum in: J Biomed Mat Res 1993;27:11:1461).
55. Redey S.A., Nardin M., Benache-Assolant D. et al. Behavior of human osteoblastic cells on stoichiometric hydroxyapatite and type A carbonate apatite: role of surface energy. J Biomed Mat Res 2000;50:353—364.
56. Redey S.A., Razzouk S., Rey C. et al. Osteoclast adhesion and activity on synthetic hydroxyapatite, carbonated hydroxyapatite, and natural calcium carbonate: Relationship to surface energies. J Biomed Mat Res 1999;45:140—147.
57. Rosa A.L., Beloti M.M., van Noort R. Osteoblastic differentiation of cultured rat bone marrow cells on hydroxyapatite with different surface topography. Dental Mat 2003;19:768—772.
58. Shen X., Tong H., Jiang T. et al. Homogeneous chitosan/carbonate apatite/citric acid nanocomposites through a novel in situ precipitation method. Comp Sci Tech 2007;67:2238—2245.
59. Shirakata Y., Setoguchi T., Machigashira M. et al. Comparison of injectable calcium phosphate bone cement grafting and open flap debridement in periodontal intrabony defects: a randomized clinical trial. J Periodontol 2008;79:1:25—32.
60. Stigtera M., Bezemera J., de Groot K. et al. Incorporation of different antibiotics into carbonated hydroxyapatite coatings on titanium implants, release and antibiotic efficacy. J Control Rel 2004;99:1:127—137.
61. Tadic D., Epple M. A thorough physicochemical characterisation of 14 calcium phosphate-based bone substitution materials in comparison to natural bone. Biomaterials 2004;25:987—994.
62. Tsuruga E., Takita H., Itoh H. et al. Pore size of porous hydroxyapatite as the cell-substratum controls BMP-induced osteogenesis. J Biochem 1997;121:317—324.
63. Wobus A.M., Boheler K.R. Embryonic stem cells: prospects for developmental biology and cell therapy. Physiol Rev 2005;85:635—649.
64. Urabe M., Kume A., Kiyotake T. et al. DNA-calcium phosphate mixed with media are stable and maintain high transfection efficiency. Anal Biochem 2000;278:1:91—92.