

Октакальций фосфат — прекурсор биологической минерализации, перспективный остеопластический материал

К.м.н. А.Н. ГУРИН¹, к.т.н. В.С. КОМЛЕВ², к.х.н. И.В. ФАДЕЕВА², член-корр. РАН С.М. БАРИНОВ²

Octacalcium phosphate — precursor of biomineralization, novel bone scaffold

A.N. GURIN, V.S. KOMLEV, I.V. FADEEVA, S.M. BARINOV

¹Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, ²Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН, Москва

Обзор литературы и собственные исследования структуры, синтеза и гидролиза, участия в процессах минерализации костной ткани и твердых тканей зуба октакальций фосфата. Обсуждается возможность применения октакальций фосфата в качестве остеопластического материала для ускорения регенерации костных тканей.

Ключевые слова: октакальций фосфат, остеопластический материал, прекурсор, минерализация, фосфат кальция.

Review of the literature and our own investigations describes structure, synthesis, hydrolysis, participation in biomineralisation of bone and teeth of octacalcium phosphate, a new synthetic bone scaffold.

Key words: octacalcium phosphate, hydroxyapatite precursor, bone scaffold, biomineralization, calcium phosphate.

Решение проблемы восстановления костной ткани после хирургических вмешательств, особенно в стоматологии, является одним из быстро развивающихся направлений современной науки. Выделяют 5 основных направлений костной пластики — аутотрансплантация, аллоимплантация, ксеноимплантация, аллопластическая имплантация (использование синтетических материалов) и тканевая инженерия. Аутотрансплантация — самый экономически востребованный вид костной пластики. Однако дополнительная травма, риск неконтролируемой резорбции, увеличение времени операции, невозможность заготовления материала заблаговременно несколько ограничивают применение аутотрансплантатов [22]. Аллогенные имплантаты (трупного происхождения) не находят широкого применения из-за риска иммунного ответа, который встречается в значительном числе случаев — от 6 до 35% [5]. Ксеногенные имплантаты (животного происхождения) не исключают возможности переноса прионов — носителей болезни Крейтцфельда—Якоба [80], кроме того, депротеинизированная ксеногенная кость обладает медленной кинетикой резорбции [12, 77].

Большие перспективы экспериментального и клинического применения имеют синтетические материалы на основе фосфатов кальция, которые могут вести себя как остеокондукторы, так и проявлять остеоиндуктивные свойства благодаря их использованию в качестве несущей матрицы для клеток и лекарственных препаратов. Остеоиндукция — способность остеопластических материалов инициировать митогенез стволовых клеток костного мозга, хемотаксис клеток-предшественников и их дифферен-

цировку в остеобластном направлении в силу наличия в составе материалов факторов роста. Остеокондукция — способность материалов в силу своей инертности выполнять роль матрицы, вдоль которой происходит новообразование костных структур [2, 3].

Аллопластические материалы на основе гидроксиапатита (ГА) — $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ — характеризуются удовлетворительной биосовместимостью, отсутствием токсичности, но низкой кинетикой резорбции. По своим свойствам практически все остеопластические материалы на основе ГА являются остеокондукторами. Для ускорения резорбции ГА часть гидроксильных и ортофосфатных групп замещают на карбонат-ион, магний или цинк, что приближает его по минеральному составу к нативной костной ткани. Однако и этот материал ввиду уже сформированной апатитовой структуры не отвечает современным требованиям.

В настоящее время особый интерес как за рубежом [74], так и в нашей стране [1] вызывают предшественники (прекурсоры) биологических апатитов фосфатов кальция (ФК). Прекурсорами называют соединения фосфатов кальция, которые участвуют в ранней стадии минерализации, т.е. являются центрами кристаллизации в кости и зубной эмали с последующим формированием осажденного ГА и далее в ГА с высокой степенью кристалличности.

Данный обзор посвящен физико-химическим и биологическим свойствам прекурсора октакальций фосфата (ОКФ) как одного из наиболее перспективных остеопластических материалов для заполнения костных дефектов.

Структура октакальций фосфата

Стехиометрический состав ОКФ соответствует формуле $\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ с атомарным соотношением $\text{Ca}/\text{P}=1,33$. Кристаллическая структура ОКФ относится к триклинной сингонии с пространственной группой P1 [17]. Параметры ячейки ОКФ: $a=90,1^\circ$; $b=9,523^\circ$; $c=6,835^\circ$; $\alpha=90,1^\circ$; $\beta=92,54^\circ$; $\gamma=108,05^\circ$. По своей структуре ОКФ имеет слои, схожие со слоями ГА (слой А), разделенные гидратированными слоями (слой В), содержащими молекулы воды [17].

Х. Лу и соавт. (2005) полагают, что ОКФ представляет собой термодинамически метастабильную полиморфную модификацию ГА [49]. А. Nakahira и соавт. (2001) определили, что слои В содержат 2 типа групп $(\text{HPO}_4)^{2-}$, одна из которых соединена со слоем А, а другая расположена между слоями А в конфигурации $(\text{CaHPO}_4)\text{Ca}$ [60]. Это позволяет предположить вхождение в ОКФ других ионов путем ионного обмена с группами $(\text{HPO}_4)^{2-}$.

Особенностью ОКФ является его способность обратимо менять содержание ионов $(\text{HPO}_4)^{2-}$ в гидратированных слоях В, на что может влиять изменение рН среды от щелочной до нейтральной [74]. Структура порошка ОКФ имеет вид плоских кристаллов (рис. 1), ориентированных по плоскостям $\{100\}$ вдоль оси, симметричной «а» триклинной структуры, находящейся между плоскими кристаллами апатита (рис. 2).

Синтез октакальций фосфата

ОКФ синтезируют в основном 2 способами — осаждением из водных растворов и гидролизом ортофосфатов брушита — $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ или $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\alpha\text{-ТКФ}$) [58, 78].

Частицы порошка ОКФ имеют характерную морфологию «розеток», состоящих из пластинчатых кристаллов (см. рис. 1). 100% пик ОКФ наблюдается при $4,8^\circ$ по шкале 2θ (рис. 3). В ИК-спектрах присутствуют полосы поглощения на 861 и 1421 см^{-1} , что соответствует полосам колебаний ν_2 и ν_3 карбонат-групп, источником которых является диоксид углерода (рис. 4). Определяются характерные полосы поглощения для фосфатных групп, что согласуется с данными В. Fowler и соавт. [30]. При исследовании изотермического растворения в зависимости от рН показано, что ОКФ занимает промежуточное положение между ГА, $\beta\text{-ТКФ}$, дикальций-фосфат-дигидратом (ДКФД) и дикальций фосфатом (ДКФ) (рис. 5).

Гидролиз октакальций фосфата

Исследования ряда авторов показали, что формирование биологического апатита происходит через метастабильную фазу ОКФ [27, 37, 75]. Переход ОКФ→ГА в организме может происходить в результате непрерывного гидролиза *in situ*, либо по механизму растворения ОКФ и осаждения ГА из перенасыщенного раствора, причем превращение ОКФ в ГА — необратимое [70, 74]. Гидролиз сопровождается присоединением к молекуле ОКФ ионов кальция из раствора и переходом части фосфат-ионов в раствор [18]. Экспериментально обнаружено, что при гидролизе нестехиометрического ОКФ с соотношением $\text{Ca}/\text{P}=1,26$ происходит образование кальций-дефицитного ГА с соотношением $\text{Ca}/\text{P}=1,49$ [51].

Поскольку костный матрикс содержит различные ионы, то вполне возможно их влияние на гидролиз ОКФ. В эксперименте *in vitro* при высоких концентрациях Мп

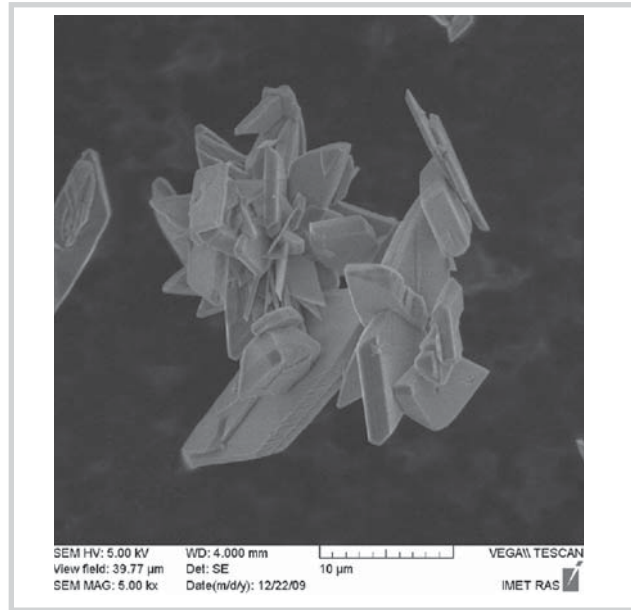


Рис. 1. Морфология частиц ОКФ представлена в виде скопления плоских пластин, которые накладываются друг на друга, формируя своеобразные «розетки».

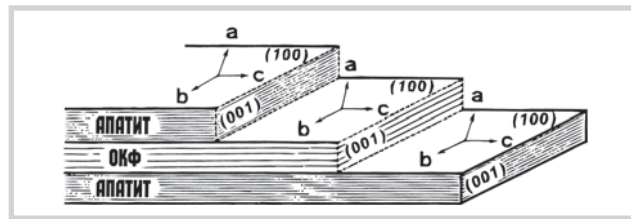


Рис. 2. Схематическая связь между кристаллами ОКФ и апатитом в структуре ОКФ/апатит; ОКФ и апатит ориентированы по плоскостям $\{100\}$ [37].

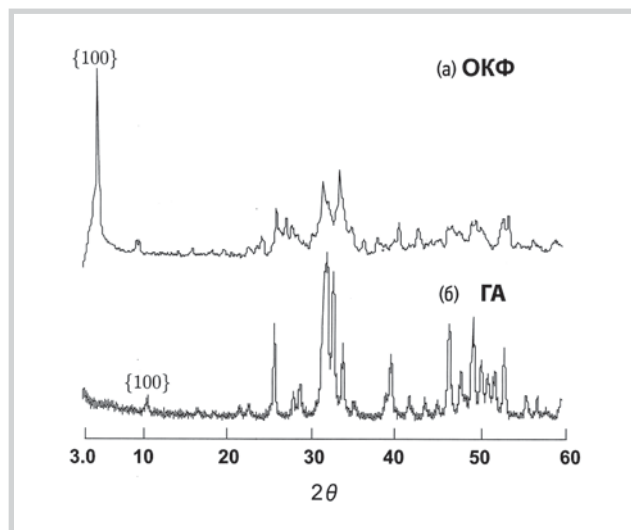


Рис. 3. Диффрактограмма (а) ОКФ и (б) ГА.

($>10^4$ мкМ) продуктом гидролиза брушита может быть не ОКФ и ГА, а $\beta\text{-ТКФ}$ [50]. Было изучено влияние 5 и 10 мкМ ионов различных металлов на гидролиз брушита до ОКФ и ГА в растворе ортофосфорной кислоты с добавлением нитрата металла. Наиболее сильное ингибирующее

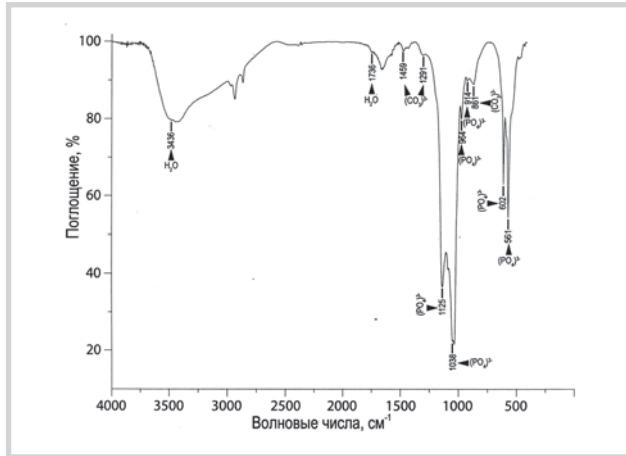


Рис. 4. ИК-спектры поглощения ОКФ.

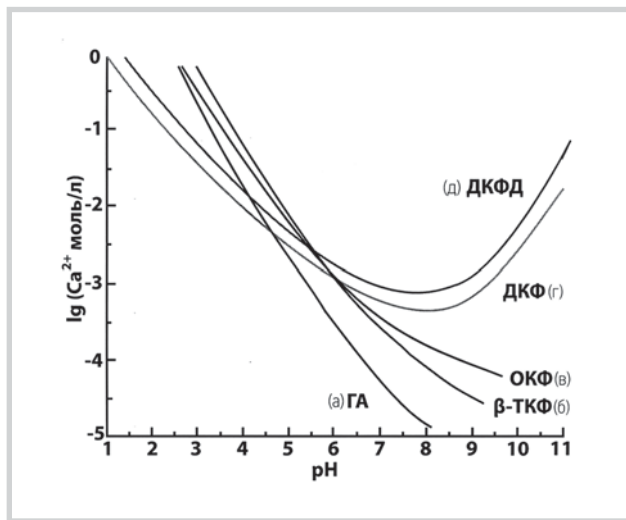


Рис. 5. Изотермы растворимости некоторых фосфатов кальция.

(а) ГА — гидроксиапатит, (б) β-ТКФ — β-трикальций фосфат, (в) ОКФ — октакальций фосфат, (г) ДКФ — дикальций фосфат, (д) ДКФД — дикальций фосфат-дигидрат [1].

действие оказывали ионы Zn^{2+} и Cu^{2+} , ионы Pb^{2+} усиливали гидролиз; ионы Mg^{2+} оказывали слабое ингибирующее действие, а ионы переходных металлов Cr^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} являлись соответственно ингибитором, слабым ингибитором и слабым активатором. Двухвалентные ионы железа и цинка полностью подавляли превращение брусита в ГА. Механизм ингибирующего действия связывают с адсорбцией ионов, препятствующих распространению участков минерализации.

V. Sharma и соавт. (1992) изучали ингибирующее действие цитрата и фосфоцитрата на рост кристаллов ОКФ [67]. Авторы определили, что ингибирование образования кристаллов ОКФ (на 99%) возникало при очень низких концентрациях фосфоцитрата. При аналогичной концентрации цитрата блокировка роста кристаллов ОКФ доходила до 40%. При одновременном действии цитрата и фосфоцитрата в перенасыщенном растворе ингибирование роста кристаллов ОКФ выявлено не было.

M. Iijima и соавт. (1992) исследовали действие различных концентраций фтора на морфологию кристаллов

ОКФ и переход ОКФ в апатит на модельной мембранной системе факторов роста кристаллов зубной эмали [37]. Установлено, что без фтора образуются широкие ленточные кристаллы размером около 100 мкм. При добавлении 0,1 мг/л F^- характер кристаллов меняется и начинает проявляться структура апатита, преимущественно ОКФ. При концентрации 1 мг/л F^- , по данным фазового анализа, преобладающей фазой являлся апатит с небольшим количеством ОКФ. При концентрации фторид-ионов 2 мг/л формируются апатитовые структуры, преобладают кристаллы игольчатой формы размером около 1 мкм. Как полагают авторы, фтор стимулирует переход ОКФ в ГА.

Влияние октакальций фосфата на процессы минерализации

В табл. 1 представлена группа фосфатов кальция, которые участвуют в биоминерализации. Молярное отношение кальция к фосфору используется как один из критериев определения конкретной химической формы фосфата кальция. Молярные отношения кальция к фосфору, представленные в табл. 1, отражают стехиометрические композиции указанных фосфатов кальция. Ранее было показано, что молярное отношение кальция к фосфору в аморфном фосфате кальция приближается к величине, равной 1,5 [26]. Тем не менее более поздний анализ показал, что в зависимости от условий синтеза этот показатель может колебаться от 1,15 до 1,5 [82]. Чтобы объяснить отсутствие стехиометрии биоминералов, было высказано предположение, что фосфаты кальция с меньшим молярным отношением кальция к фосфору, чем у ГА, образуются раньше последнего и затем лишь трансформируются в ГА. В качестве таких предполагаемых предшественников рассматриваются ДКФД, аморфный фосфат кальция и ОКФ [27, 70]. Тем не менее утверждать, что ДКФД, аморфный фосфат и ОКФ являются предшественниками в процессе биоминерализации невозможно по следующим причинам: 1) эти фосфаты кальция не стабильны и в физиологических условиях могут подвергаться гидролизу с образованием ГА, содержащего основной фосфат кальция [19, 28, 52]; 2) ОКФ проявляет высокое подобие ГА, и дифференцировать его с последним в составе кристалла затруднительно [52]. Известно, что везикулы внеклеточного матрикса представляют собой центры, в которых берут начало процессы кальцификации в костной ткани [6, 15]. Исследования с использованием метода дифракции рентгеновских лучей показали, что изолированные везикулы матрикса содержат аморфные компоненты, однако аморфный фосфат кальция обнаружен в них не был, он присутствует в аморфном компоненте фосфолипидных комплексов, содержащих неорганический кальций и кислые фосфаты [81]. Таким образом, вопросы существования предшественников биоминералов продолжают обсуждаться. В настоящее время ОКФ считается биологически важным предшественником по следующим причинам:

— центральный дефект, называемый центральной темной полосой, который с помощью электронной микроскопии можно наблюдать в центральной части кристаллов эмали, рассматривается как 1 или 2 структурные единицы исходно формирующихся кристаллов ОКФ [37, 54, 62, 70];

— амелогенин, представляющий собой белок матрикса зубной эмали, определяет морфологию кристалла путем адсорбции на поверхности ОКФ в процессе удлине-

Таблица 1. Изменение химического состава костей и эмали в процессе минерализации [8, 32]

Кость и эмаль	Са/Р (весовые проценты)		НРО ₄ /Р	Са/Р (молярное соотношение)	Плотность, г/см ³
<i>Кость цыпленка</i>					
16 дней (эмбрион)	17,8	9,6	—	1,43	1,85
10 недель	24,6	12,5	—	1,52	2,11
1 год	26,2	12,5	—	1,61	2,14
<i>Эмаль свины</i>					
Внутренняя поверхность эмали	31,1	15,7	0,15	1,53	—
Срединная	32,2	15,9	0,11	1,57	—
Наружная	36,5	17,6	0,04	1,61	—

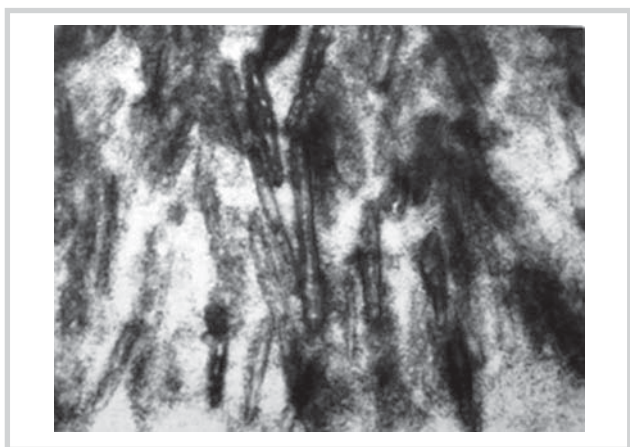


Рис. 6. Органический матрикс развивающейся эмали с формирующимися кристаллами в различной стадии минерализации; на белковых цепочках эмали видны участки преципитатов минеральных компонентов; в центре формирующихся кристаллов видна светлая центральная полоска; это указывает на то, что осаждаются предположительно аморфные фосфаты [4].

ния кристаллической структуры и придает ей в высокой степени упорядоченный вид [59]. На ранней стадии минерализации эмали человека (27 нед) в органическом матриксе можно наблюдать 2 белковые цепочки, на которых происходит осаждение минералов.

— по мере созревания кристаллов их размеры увеличиваются, в центре появляется светлая полоска (рис. 6), которая исчезает при полностью сформированном кристалле; возможно, первичная минерализация и представлена одним из прекурсоров фосфатов кальция [4];

— тщательное исследование с использованием метода инфракрасной спектроскопии показало, что исходным минералом, образующимся в изолированных везикулах матрикса, является ОКФ [66, 82];

— исследования кинетики показали, что ультрафильтрат сыворотки человека имеет состав, вполне допускающий трансформацию ОКФ в ГА [28].

В табл. 2 представлено соотношение кальция и фосфора, входящих в состав костной ткани и эмали зубов, в зависимости от возраста [9, 32]. С возрастом содержание кальция увеличивается, а содержание фосфора уменьшается, что ведет к изменению их молярного соотношения. Кислый фосфат НРО₄ рассматривается как индикатор кислых предшественников ГА, и по мере минерализации его содержание уменьшается [19]. Это хорошо просматри-

вается на эмбриональной эмали. На вестибулярной поверхности различают: развивающуюся эмаль, что соответствует краевой эмали; созревающую эмаль; среднюю и зрелую эмаль около режущего края [4]. Т. Аоба и соавт. (1992) показали, что молодые кристаллы эмали, формирующиеся в процессе амелогенеза у поросят, содержат наиболее высокие концентрации кислых фосфатов — 20% и более от общего содержания фосфатов, а 50—60% кислых фосфатов, обнаруженных в этих кристаллах, присутствуют в аморфной форме [9]. Более того, проведенный авторами анализ показал, что общее изменение концентрации кислых фосфатов может рассматриваться как результат 2 процессов, протекающих с различной скоростью — первоначальное быстрое снижение концентрации кислых фосфатов происходит во внешних слоях (на глубине до 200 мкм), сопровождаясь дальнейшим постоянным, но постепенным уменьшением их концентрации. Экстраполяция этих аналитических данных применительно к процессам, происходящим на поверхности эмали в непосредственной близости к амелобластам, позволяет предположить, что содержание кислых фосфатов на начальной стадии минерализации эмали составляет приблизительно 30% от общего содержания фосфора, что очень близко к значениям, получаемым исходя из стехиометрии ОКФ. Предложенная авторами двухступенчатая модель изменения концентрации кислых фосфатов может быть интерпретирована как первоначальное быстрое уменьшение их концентрации, возможно, связанное с гидролизом ОКФ, а следующая за этим вторая медленная фаза отражает процесс роста апатита в дискретных условиях вдали от амелобластов.

В соответствии со структурой ОКФ, предложенной М. Mathew и соавт. (1988), существуют 2 различающиеся кислородсодержащие группы: одна находится в пределах водного слоя, другая — на границе слоев апатита и воды [51]. Проведенный авторами анализ нестехиометрических, дефицитных по кальцию кристаллов ОКФ, содержащих 40% общего содержания фосфата в виде кислых фосфатов, показал, что кислые фосфаты, входящие в состав ОКФ, делятся на 3 категории: 1) стабильные фосфаты, составляющие приблизительно 50—60% от общего их содержания и, возможно, представляющие собой преимущественно кислородсодержащие ионы, расположенные на границе слоев апатита и воды; 2) обратимо изменяющиеся фосфаты, на 25—30% состоящие из кислых фосфатов, которые могут находиться либо в водном слое, либо на поверхности кристалла; 3) нестабильные (необратимо отщепляющиеся) фосфаты, на 15—20% состоящие из кислых фосфатов.

Таблица 2. Химический состав ортофосфатов кальция [25]

Соотношение Са/Р	Вещество	Химическая формула
0,5	монокальций фосфат моногидрат	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4) \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
0,5	монокальций фосфат безводный	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$
1,0	дикальций фосфат дигидрат (брушит)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
1,0	дикальций фосфат ангидрат (монетит)	CaHPO_4
1,33	октакальций фосфат	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
1,5	альфа-трикальций фосфат	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,5	бета-трикальций фосфат	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
1,2—2,2	аморфный кальций фосфат	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ $n=3-4,5; 15-20\%$
1,67	гидроксиапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$
1,67	фторапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6 \cdot 4\text{F}_2$
2,0	тетракальций фосфат	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{O}$

Кислые фосфаты, относящиеся к категориям стабильных и обратимо изменяющихся фосфатов, составляют около 33% от общего содержания фосфора, что приближается к значению, ожидаемому исходя из стехиометрии ОКФ. Результаты рентгеновского дифракционного анализа свидетельствуют о том, что большая часть обратимо изменяющихся кислых фосфатов содержится внутри кристаллов, поскольку уменьшение концентрации кислых фосфатов приводит к сжатию кристаллической решетки. Полученные авторами данные указывают на возможность обратимых изменений внутренней структуры ОКФ непосредственно перед началом гидролиза, который сопровождается значительным снижением содержания кислых фосфатов.

Подобные возрастные изменения обычно наблюдаются в развивающихся биоминералах и могут включать в себя образование предшественников еще до непосредственного осаждения ГА [10, 20, 27]. W. Brown и соавт. (1962) описали кристаллическую структуру ОКФ, которая представляет собой чередование слоев апатита и водных прослоек [17]. Таким образом, переход ОКФ в ГА может происходить следующим образом: 1) *in situ* путем гидролиза при участии слоев апатита; 2) *de novo* путем осаждения кристаллов апатита на кристаллах ОКФ, в результате чего ОКФ растворяется [19]. Отмечено, что переход ОКФ в ГА является термодинамически выгодным процессом и, однажды начавшись, в дальнейшем протекает спонтанно и необратимо. Гидролиз сопровождается захватом кальция из окружающей среды и выбросом в раствор фосфат-ионов. Исследования, имитирующие процесс гидролиза *in vitro*, показали, что ионы HPO_4^{2-} могут мигрировать как внутрь, так и за пределы кристаллической решетки ОКФ в процессе образования ГА [73]. Известно, что карбонат-ионы входят в состав биоминералов, при этом замещение фосфатной группы на карбонат-ион обозначается как В-тип замещения [21, 30], замещение гидроксильных групп — как А-тип замещения [16]. Анализ данных ИК-спектроскопии минеральных компонентов подвздошной кости человека показывает, что с возрастом В-тип замещения начинает преобладать над А-типом [55]. Эта информация получена при сравнении ИК-спектров синтетических минералов и минеральных компонентов подвздошной кости человека в областях, отнесенных к полосам валентных колебаний $\nu_2(\text{CO}_3)^{2-}$, $\nu_1(\text{PO}_4)^{3-}$ и $\nu_3(\text{PO}_4)^{3-}$ [63]. С другой стороны, В-тип замещения, как сообща-

лось, доминирует на ранних стадиях минерализации эмали [8].

H. Fleisch и соавт. (1966) и J. Meyer и соавт. (1978) отмечают, что некоторые неорганические ионы, такие как пирофосфат, оказывают ингибирующее действие на процесс минерализации и предполагают их роль в регуляции этого процесса [29, 52]. I. Hessel и соавт. (2002) привели доказательства того, что циркулирующий в плазме гликопротеин-1 клеточных мембран, продуцирующий пирофосфат, взаимодействует с тканенеспецифичной щелочной фосфатазой, которая гидролизует пирофосфат и, таким образом, принимает участие в процессе регуляции биоминерализации [34].

Ионы магния, как известно, подавляют рост кристаллов группы фосфатов кальция [48, 78]. Образование фосфатов кальция ускоряется в основном 2 факторами: 1) степенью перенасыщения раствора, которая определяется концентрациями кальция и фосфата, а также значением pH раствора; 2) концентрацией ионов фтора, являющихся специфическими индукторами минерализации [7, 83]. Наиболее вероятно, что процессы биоминерализации осуществляются при участии не только механизмов торможения, но и одновременной индукции. Механизм, лежащий в основе образования твердых тканей, должен быть исследован с учетом всего комплекса воздействующих факторов.

Восстановление костной ткани при использовании октакальций фосфата

Различные исследования показали возможность использования материалов на основе ОКФ для заполнения костных дефектов [13, 39, 41—45, 71, 72]. С помощью микроручевой методики рентгеновской дифракции было показано, что имплантированный ОКФ трансформируется в апатит [71, 73]. При имплантации синтетического ОКФ в крупные дефекты костной ткани крыс регенерация кости начиналась как у краевой зоны дефекта, так и на части имплантата, удаленной от краевой зоны, что свидетельствовало о том, что ОКФ представляет собой центр, вокруг которого происходит инициация репаративного процесса [43]. Новообразованный костный матрикс вокруг имплантированного ОКФ содержит коллаген I-типа [65], а также остеокальцин [44], каждый из которых является специфическим белком костной ткани [42, 76].

Рядом авторов было показано, что имплантированный ОКФ резорбируется многоядерными гигантскими клетками [41, 40]. При имплантации в костный мозг крыс ОКФ и ГА окружались такими клетками. На имплантированном ОКФ цитоплазма многоядерных гигантских клеток в зоне контакта формировала ребристую область в виде «щеточной каемки», а также светлую зону, проявляя ультраструктурные характеристики, свойственные остеокластам, что способствовало активной резорбции материала. На имплантированном ГА многоядерные гигантские клетки формировали светлую зону, при этом «щеточной каемки» в приграничной области не обнаруживалось. Поверхность имплантированного ГА в зоне контакта с полинуклеарными клетками оставалась гладкой и резорбции не подвергалась. Было показано, что остеокласты трубчатых костей кроликов способны резорбировать синтетический карбонат-апатит, но не способны резорбировать синтетический ГА [23, 24]. Поскольку содержание карбоната в апатите, трансформировавшемся из имплантированного ОКФ, не определялось, истинная природа апатита, формируемого из имплантированного ОКФ, неясна. Тем не менее с тех пор как стало ясно, что введение в кристалл таких примесей, как карбонат-ион, происходит на стадии гидролиза ОКФ [21], выглядит вполне вероятным, что апатит, формирующийся на основе имплантированного ОКФ, представляет собой карбонат-апатит. Для оценки истинного состава кристалла необходим химический анализ имплантированного ОКФ. В эксперименте с созданием краниального костного дефекта у крыс оценивались процессы регенерации костной ткани, а также резорбции ОКФ, β -ТКФ и ГА после имплантации через 6 мес [44]. Статистический анализ показал, что процент оставшегося в имплантированном материале ОКФ достоверно меньше, чем ГА и подверженного биологической резорбции β -ТКФ. При этом объем новообразованной кости в дефекте, заполненном ОКФ, был достоверно больше, чем при имплантации ГА или β -ТКФ. Аналогичные исследования проводили О. Suzuki и соавт. (2009) [69], Н. Imaizumi и соавт. (2006) [38] и Т. Kikawa и соавт. (2009) [47].

Т. Нопта и соавт. (2008) исследовали формирование костной ткани у крыс с краниальными дефектами диаметром 3,8 и 8,8 мм при имплантации [35]. Количественный радиографический анализ показал полное заживление дефекта диаметром 3,8 мм к 24-й неделе. Тот же анализ определил, что прирост кости в неделю максимально выражен на 4-й неделе с последующим снижением. При диаметре дефекта 8,8 мм заполнение его костной тканью наблюдается к 24-й неделе, а 25% дефекта остаются не восстановленными при наблюдении в течение 36 нед. Экспрессия остеобластами коллагена I-типа и остеокальцина выражена к 3-й неделе и отсутствует на 24-й неделе. Новообразование кости идет как со стороны периоста, так и от краниальной кости, но не с краев дефекта. В этих участках не определяется ни коллаген I-типа, ни остеокальцин. Авторы отмечают, что активный синтез остеобластами остеокальцина и коллагена I-типа, возможно, связан с усиленной дифференцировкой остеобластов из клеток-предшественников именно в первые 2—3 нед с последующим снижением к 24-й неделе. На дифференцировку остеобластов может оказывать влияние воспалительная реакция прямо или косвенно, на что указывают В. Gortz и соавт. (2004) и F. Shen и соавт. (2005) [31, 68].

N. Miyaotake и соавт. (2009) изучали реакцию костной ткани на дырчатые дефекты бедренной кости крыс диаметром 3 мм в области проксимального метафиза при заполнении их гранулами ОКФ, частичным гидролизатом ОКФ с низкой кристалличностью ($Ca/P=1,37$), полным гидролизатом ОКФ и керамическими гранулами β -ТКФ [56]. Все образцы были микропористыми. Авторы показали, что неполный гидролизат ОКФ низкой кристалличности активнее стимулирует образование новообразованной костной ткани по сравнению с полным гидролизатом ОКФ. Неполный гидролизат ОКФ подавляет активность остеокластов, окрашенных на кислую фосфатазу и катепсин-К, а также подавляет маркеры воспаления $IL-\beta 1$ и $TNF-\alpha$. Авторы отмечают, что ОКФ позволяет разрабатывать на его основе материалы, приближающиеся к аутокости. О. Suzuki и соавт. (2006) на краниальных дефектах черепа у крыс исследовали действие ОКФ и его гидролизата со сроками наблюдения 4 и 12 нед [74]. Процент прироста новообразованной костной ткани для ОКФ был статистически достоверно выражен через 12 нед по сравнению с его гидролизатом. Проведение рентгенофазового анализа имплантированного ОКФ в критический дефект крыс через 10 и 21 день показало, что характерный для обычного ОКФ пик отражения при $4,8^\circ (2\theta)$, относящийся к плоскости $\{100\}$ постепенно уменьшается к 21-му дню, что указывает на конверсию ОКФ в апатит *in vivo*.

Т. Kawai и соавт. (2009) изучали влияние на регенераторные процессы костной ткани крыс при имплантации ОКФ и композита ОКФ-коллаген с различной концентрацией ОКФ и коллагена [46]. Моделью служили критические дефекты черепа крыс диаметром 9 мм. Исследуемый материал прессовали в таблетки диаметром 9 мм и помещали в дефект со сроками наблюдения 4 и 12 нед. Радиографический анализ показал, что максимальная плотность костной ткани наблюдается на композите ОКФ-коллаген в соотношении 83/17. Это подтвердил морфометрический анализ гистологических срезов. Оценка клеточной адгезии на ОКФ и композит ОКФ-коллаген

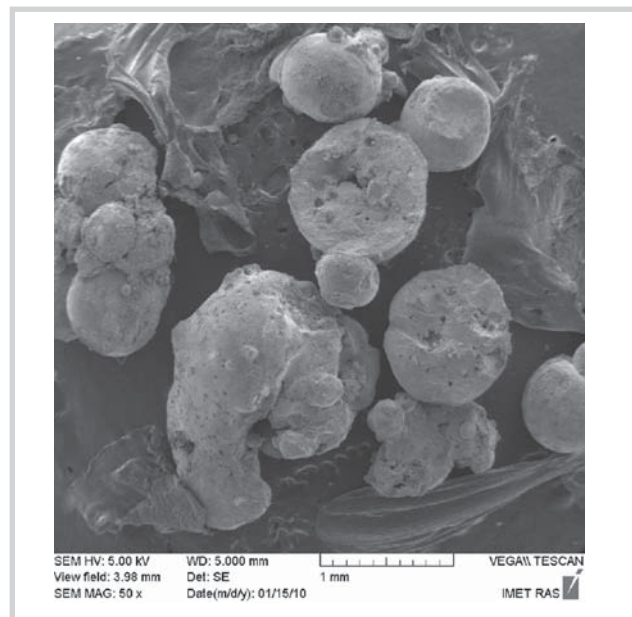


Рис. 7. Сканирующая электронная микроскопия гранул системы ОКФ/ α ТКФ; видна пористая структура гранул.

выявила, что чем меньше концентрация ОКФ, тем клеточная адгезия выше. Такая же зависимость наблюдается при изучении пролиферации стромальных клеток костного мозга мышей ST-2 на изучаемых дисках: при уменьшении концентрации ОКФ пролиферация клеток ST-2 возрастала. Авторы отмечают, что композит ОКФ-коллаген в соотношении 83/17 — оптимальный материал для восстановления костной ткани.

Ф. Ваггере и соавт. (2003), изучая остеоиндуктивные свойства ОКФ, показали, что пористый танталовый имплантат, покрытый биомиметическим ОКФ, индуцировал кость в мышце козы, тогда как кость не формировалась, когда имплантат был покрыт карбонатгидроксиапатитом [14]. Как отмечает автор, кость образовывалась внутри пор и никогда — на ровной поверхности имплантата. Аналогичные результаты на титановых имплантатах (Ti6Al4V), обработанных ОКФ, были получены Р. Хабивович и соавт. (2004) [33].

Коллективом авторов данного обзора были созданы материалы по технологии реакционно-связанных фосфатов кальция в системе ОКФ— α -ТКФ. Изготовлены экс-

периментальные образцы в виде гранул, содержащие основную фазу — аморфный апатит, α -ТКФ и ОКФ (рис. 7). Предполагаемое биологическое поведение данного материала можно представить следующей схемой: на 1-м этапе происходят активация остеогенеза через ОКФ и растворение аморфной фазы, приводящее к увеличению пористости для инфильтрации тканевой жидкости и клеточных элементов; далее происходит постепенное растворение кристаллической фазы α -ТКФ, согласующееся с процессами остеогенеза.

Заключение

Таким образом, анализ данных литературы показал, что материалы на основе ОКФ обладают скорее остеоиндуктивными свойствами, что дает возможность создавать новые перспективные остеопластические материалы с уникальными свойствами.

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ 09-03-00187а и гранта Президента РФ МК-2286.2009.3.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Баринов С.М., Комлев В.С.* Остеоиндуктивные керамические материалы для восстановления костных тканей: октакальциевый фосфат (обзор). *Материаловедение* 2009; 10: 34—41.
2. *Григорьян А.С., Топоркова А.К.* Проблемы интеграции имплантатов в костную ткань (теоретические аспекты). М: Техносфера 2007; 128.
3. *Гурин А.Н.* Сравнительная оценка влияния различных остеопластических материалов на основе фосфатов кальция на заживление костных дефектов: Дис. ... канд. мед. наук. М 2009.
4. *Гурин Н.А.* Изучение апатитов и белков эмали зуба в пре- и постна- тальном онтогенезе человека: Дис. ... канд. мед. наук. М 1986.
5. *Черешков Ю.И., Саожина Т.Г., Воложин А.И.* Иммунный статус больных, перенесших реконструктивные операции на челюсти с использованием разных типов трансплантатов. *Стоматология* 1995; 1: 46—47.
6. *Anderson H.C.* Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. *J Cell Biol* 1969; 41: 59—72.
7. *Aoba T., Moreno E.C.* The enamel fluid in the early secretory stage of porcine amelogenesis: Chemical composition and saturation with respect to enamel mineral. *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 86—94.
8. *Aoba T., Moreno E.C.* Changes in the nature and composition of enamel mineral during porcine amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 1990; 47: 356—364.
9. *Aoba T., Moreno E.C.* Changes in the solubility of enamel mineral at various stages of porcine amelogenesis. *Calcif Tissue Int* 1992; 50: 266—272.
10. *Aoba T., Komatsu H., Shimazu Y. et al.* Enamel mineralization and an initial crystalline phase. *Connect Tissue Res* 1998; 38: 129—137; Discussion 139—145.
11. *Arellano-Jimenez M.J., Garcia-Garcia R., Reyes-Gasga J.* Synthesis and hydrolysis of octacalcium phosphate and its characterization by electron microscopy and X-ray diffraction. *J Phys Chem Solids* 2009; 70: 2: 390—395.
12. *Artzi Z., Nemcovsky C.E., Tal H.* Efficacy of porous bovine bone mineral in various types of osseous deficiencies: Clinical observations and literature review. *Int J Periodontics Restorative Dent* 2001; 21: 4: 395—405.
13. *Aval F.S., Arab M.R., Sobhani A.G. et al.* Implantation of octacalcium phosphate stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the rat mandible. *J Dent Tehran Uni Med Sci* 2006; 3: 3: 122—128.
14. *Barrere F., Van Der Valk C.M., Dalmeijer R.A.J. et al.* In vitro and in vivo degradation of biomimetic octacalcium phosphate and carbonate apatite coatings on titanium implants. *J Biomed Mater Res Part A* 2003; 64: 2: 378—387.
15. *Bernard G.W., Pease D.C.* An electron microscopic study of initial intramembranous osteogenesis. *Am J Anat* 1969; 125: 271—290.
16. *Bonel B., Montel G.* Sur une nouvelle apatite carbonate fle synthetique. *CR Acad Sci* 1964; 258: 923—926.
17. *Brown W.E., Smith J.P., Lehr J.R. et al.* Octacalcium phosphate and hydroxyapatite. *Nature* 1962; 196: 1048—1055.
18. *Brown W.E., Mathew M., Tung M.S.* Crystal chemistry of octacalcium phosphate. *Progr Cryst Growth Char* 1981; 4: 59—87.
19. *Brown W.E., Eidelman N., Tomazic B.* Octacalcium phosphate as a precursor in biomineral formation. *Adv Dent Res* 1987; 1: 306—313.
20. *Brown W.E., Chow L., Siew C. et al.* Acidic calcium phosphate precursors in formation of enamel mineral. In: R. Fearnhead, S. Suga, editors. *Tooth Enamel IV*. Amsterdam: Elsevier 1984; 8—13.
21. *Chickerur N.S., Tung M.S., Brown W.E.* A mechanism for incorporation of carbonate into apatite. *Calcif Tissue Int* 1980; 32: 55—62.
22. *Coombes A.G., Meikle M.C.* Resorbable synthetic polymers as replacements for bone graft. *Clin Mater* 1994; 17: 1: 35—67.
23. *Doi Y., Iwanaga H., Shibutani T. et al.* Osteoclastic responses to various calcium phosphates in cell cultures. *J Biomed Mater Res* 1999; 47: 424—433.
24. *Doi Y., Shibutani T., Moriwaki Y. et al.* Sintered carbonate apatites as bioresorbable bone substitutes. *J Biomed Mater Res* 1998; 39: 603—610.
25. *Dorozhkin S.* Calcium orthophosphate-based biocomposites and hybrid biomaterials. *J Mater Sci* 2009; 44: 9: 2343—2387.
26. *Eanes E.D., Gillissen I.H., Posner A.S.* Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite. *Nature* 1965; 208: 365—367.
27. *Eanes E.D.* In: W.T. Butler, editor. *Chemistry and Biology of Mineralized Tissues*. Birmingham, AL: Ebsco Media 1985; 213—220.
28. *Eidelman N., Chow L.C., Brown W.E.* Calcium phosphate phase transformations in serum. *Calcif Tissue Int* 1987; 41: 18—26.
29. *Fleisch H., Russell R.G., Straumann F.* Effect of pyrophosphate on hydroxyapatite and its implications in calcium homeostasis. *Nature* 1966; 212: 901—903.
30. *Fowler B.O., Moreno E.C., Brown W.E.* Infra-red spectra of hydroxyapatite, octacalcium phosphate and pyrolysed octacalcium phosphate. *Arch Oral Biol* 1966; 11: 477—492.
31. *Gortz B., Hayer S., Redlich K. et al.* Arthritis induces lymphocytic bone marrow inflammation and endosteal bone formation. *J Bone Miner Res* 2004; 19: 990—998.
32. *Grynpas M.D., Bonar L.C., Glimcher M.J.* Failure to detect an amorphous calcium-phosphate solid phase in bone mineral: A radial distribution function study. *Calcif Tissue Int* 1984; 36: 291—301.
33. *Habibovic P., Van Der Valk C.M., Van Blitterswijk C.A. et al.* Influence of octacalcium phosphate coating on osteoinductive properties of biomaterials. *J Mater Sci: Mater Med* 2004; 15: 373—380.

34. Hesse L., Johnson K.A., Anderson H.C. Tissue-nonspecific alkaline phosphatase and plasma cell membrane glycoprotein-1 are central antagonistic regulators of bone mineralization. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99: 9445–9449.
35. Honma T., Itagaki T., Nakamura M. et al. Bone formation in rat calvaria ceases within a limited period regardless of completion of defect repair. *Oral Diseases* 2008; 14: 457–464.
36. Horvathova R., Muller L., Helebrant A. In vitro transformation of OCP into carbonated HA under physiological conditions. *Mat Sci Eng C* 2008; 28: 1414–1419.
37. Iijima M., Tohda H., Suzuki H. et al. Effects of F⁻ on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation. *Calcif Tissue Int* 1992; 50: 357–361.
38. Imaizumi H., Sakurai M., Kashimoto O. et al. Comparative study on osteoconductivity by synthetic octacalcium phosphate and sintered hydroxyapatite in rabbit bone marrow. *Calcif Tissue Int* 2006; 78: 45–54.
39. Kamakura S., Sasano Y., Suzuki O. Synthetic octacalcium phosphate (OCP) is an effective scaffold to regenerate bone. *Int Congress Series* 2005; 1284: 290–295.
40. Kamakura S., Nakajo S., Suzuki O. et al. New scaffold for recombinant human bone morphogenetic protein-2. *J Biomed Mater Res* 2004; 71: 299–307.
41. Kamakura S., Sasano Y., Homma-Ohki H. et al. Multinucleated giant cells recruited by implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat bone marrow share ultrastructural characteristics with osteoclasts. *J Electron Microsc* (Tokyo) 1997; 46: 397–403.
42. Kamakura S., Sasano Y., Homma H. et al. Implantation of octacalcium phosphate (OCP) in rat skull defects enhances bone repair. *J Dent Res* 1999; 78: 1682–1687.
43. Kamakura S., Sasano Y., Homma H. Implantation of octacalcium phosphate nucleates isolated bone formation in rat skull defects. *Oral Dis* 2001; 7: 259–265.
44. Kamakura S., Sasano Y., Shimizu T. et al. Implanted octacalcium phosphate is more resorbable than beta-tricalcium phosphate and hydroxyapatite. *J Biomed Mater Res* 2002; 59: 29–34.
45. Kamakura S., Sasano Y., Nakajo S. et al. Implantation of octacalcium phosphate combined with transforming growth factor-beta1 enhances bone repair as well as resorption of the implant in rat skull defects. *J Biomed Mater Res* 2001; 57: 175–182.
46. Kawai T., Anada T., Honda Y. et al. Synthetic octacalcium phosphate augments bone regeneration correlated with its content in collagen scaffold. *Tissue Eng Part A* 2009; 15: 1: 23–32.
47. Kikawa T., Kashimoto O., Imaizumi H. et al. Intramembranous bone tissue response to biodegradable octacalcium phosphate implant. *Acta Biomaterialia* 2009; 5: 5: 1756–1766.
48. Lowenstam H., Weiner S. *On Biomineralization*. New York: Oxford University Press 1989; 144–167.
49. Lu X., Leng Y. Theoretical analysis of calcium phosphate precipitation in simulated body fluid. *Biomaterials* 2005; 26: 10: 1097–1108.
50. Lundager Madsen H.E. Influence of foreign metal ions on crystal growth and morphology of brushite (CaHPO₄, 2H₂O) and its transformation to octacalcium phosphate and apatite. *J Crystal Growth* 2008; 310: 10: 2602–2612.
51. Mathew M., Takagi S. Structures of biological minerals in dental research. *J Res Natl Ins Stand Technol* 2001; 106: 6: 1035–1044.
52. Meyer J.L., Eanes E.D. A thermodynamic analysis of the secondary transition in the spontaneous precipitation of calcium phosphate. *Calcif Tissue Res* 1978; 25: 209–216.
53. Meyer J.L. Can biological calcification occur in the presence of pyrophosphate? *Arch Biochem Biophys* 1984; 231: 1–8.
54. Miake Y., Shimoda S., Fukae M. et al. Epitaxial overgrowth of apatite crystals on the thin-ribbon precursor at early stages of porcine enamel mineralization. *Calcif Tissue Int* 1993; 53: 249–256.
55. Miller L.M., Vairavamurthy V., Chance M.R. et al. In situ analysis of mineral content and crystallinity in bone using infrared microspectroscopy of the ν₄ (PO₄)₃-vibration. *Biochim Biophys Acta* 2001; 1527: 11–19.
56. Miyatake N., Kishimoto K.N., Anada T. et al. Effect of partial hydrolysis of octacalcium phosphate on its osteoconductive characteristics. *Biomaterials* 2009; 30: 1005–1014.
57. Mohan S., Baylink D.J. Bone growth factors. *Clin Orthop* 1991; 5: 30–48.
58. Monma H. Preparation of octacalcium phosphate by the hydrolysis of α-tricalcium phosphate. *J Mater Sci* 1980; 15: 10: 2428–2434.
59. Moradian-Oldak J., Iijima M., Bouropoulos N. et al. Assembly of amelogenin proteolytic products and control of octacalcium phosphate crystal morphology. *Connect Tissue Res* 2003; 44: Suppl 1: 58–64.
60. Nakahira A., Aoki S., Sakamoto K. et al. Synthesis and evaluation of various layered octacalcium phosphates by wet-chemical processing. *J Mater Sci: Mater Med* 2001; 12: 9: 793–800.
61. Neigel J.M., Ruzicka P.O. Use of demineralized bone implants in orbital and craniofacial reconstruction and a review of the literature. *Ophthal Plast Reconstr Surg* 1996; 12: 108–120.
62. Nelson D.G., Barry J.C. High resolution electron microscopy of nonstoichiometric apatite crystals. *Anat Rec* 1989; 224: 265–276.
63. Ou-Yang H., Paschalis E.P., Mayo W.E. et al. Infrared microscopic imaging of bone: Spatial distribution of (CO₃)₂-. *J Bone Miner Res* 2001; 16: 893–900.
64. Rudkin G.H., Miller T.A. Growth factors in surgery. *Plast Reconstr Surg* 1996; 97: 469–476.
65. Sasano Y., Kamakura S., Nakamura M. et al. Subperiosteal implantation of octacalcium phosphate (OCP) stimulates both chondrogenesis and osteogenesis in the tibia, but only osteogenesis in the parietal bone of a rat. *Anat Rec* 1995; 242: 40–46.
66. Sauer G.R., Wuthier R.E. Fourier transform infrared characterization of mineral phases formed during induction of mineralization by collagenase-released matrix vesicles in vitro. *J Biol Chem* 1988; 263: 13718–13724.
67. Sharma V.K., Johnson M., Sallis J.D. et al. Influence of citrate and phosphocitrate on the crystallization of octacalcium phosphate. *Langmuir* 1992; 8: 2: 676–679.
68. Shen F., Ruddy M.J., Plamondon P. et al. Cytokines link osteoblasts and interleukin-17- and TNF-alpha-induced genes in bone cells. *J Leukoc Biol* 2005; 77: 388–399.
69. Suzuki O. Transitory nature of octacalcium phosphate in physiological milieu and its osteoconductive property. *Phosphorus Research Bull* 2009; 23: 31–34.
70. Suzuki O., Imaizumi H., Kamakura S. et al. Bone regeneration by synthetic octacalcium phosphate and its role in biological mineralization. *Curr Med Chem* 2008; 15: 3: 305–313.
71. Suzuki O., Nakamura M., Miyasaka Y. Bone formation on synthetic precursors of hydroxyapatite. *Tohoku J Exp Med* 1991; 164: 37–50.
72. Suzuki O., Nakamura M., Miyasaka Y. Maclura pomifera agglutinin-binding glycoconjugates on converted apatite from synthetic octacalcium phosphate implanted into subperiosteal region of mouse calvaria. *Bone Miner* 1993; 20: 151–166.
73. Suzuki O., Yagishita H., Yamazaki M., Aoba T. Adsorption of bovine serum albumine onto octacalcium phosphate and its hydrolyzates. *Cells Mater* 1995; 5: 45–54.
74. Suzuki O., Kamakura S., Katagiri T. et al. Bone formation enhanced by implanted octacalcium phosphate involving conversion into Ca-deficient hydroxyapatite. *Biomaterials* 2006; 17: 2671–2678.
75. Taves D.R., Neuman W.F. Factors controlling calcification in vitro: Fluoride and magnesium. *Arch Biochem Biophys* 1964; 108: 3: 390–397.
76. Termine J.D., Robey P.G. Bone matrix proteins and the mineralization process. In: Favus M, editor. *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. Philadelphia: Lippincott-Raven 1996; 24–28.
77. Traini T., Valentini P., Iezzi G. et al. A histological and histomorphometric evaluation of inorganic bovine bone retrieved 9 years after sinus augmentation procedure. *J Periodontol* 2007; 78: 955–961.
78. Tung M.S., Tomazic B., Brown W.E. The effects of magnesium and fluoride on the hydrolysis of octacalcium phosphate. *Arch Oral Biol* 1992; 37: 585–591.
79. Uludag H., Gao T., Porter T.J. et al. Delivery systems for BMPs: Factors contributing to protein retention at an application site. *J Bone Jt Surg Am* 2001; 83: Suppl 1: Part 2: 128–135.
80. Wenz B., Oesch B., Horst M. Analysis of the risk of transmitting bovine spongiform encephalopathy through bone grafts derived from bovine bone. *Biomaterials* 2001; 22: 1599–1606.
81. Wuthier R.E. Electrolytes of isolated epiphyseal chondrocytes, matrix vesicles, and extracellular fluid. *Calcif Tissue Res* 1977; 23: 125–133.
82. Wuthier R.E., Rice G.S., Wallace J.E.B.J. et al. In vitro precipitation of calcium phosphate under intracellular conditions: Formation of brushite from amorphous precursor in the absence of ATP. *Calcif Tissue Int* 1985; 37: 401–410.
83. Varughese K., Moreno E.C. Crystal growth of calcium apatites in dilute solutions containing fluoride. *Calcif Tissue Int* 1981; 33: 431–439.