

**МАТЕРІАЛИ ДЛЯ ПЛАСТИКИ КІСТКОВИХ ДЕФЕКТІВ –
СУЧАСНИЙ СТАН ПРОБЛЕМИ
(ОГЛЯД ЛІТЕРАТУРИ ТА РЕЗУЛЬТАТИ ВЛАСНИХ ДОСЛІДЖЕНЬ)**

М.В. Погорелов, канд. мед. наук, доцент;
С.М. Данильченко*, канд. фіз.-мат. наук;
О.В. Калінкевич*, **О.М. Калінкевич***;
Г.Ф. Ткач, канд. мед. наук, доцент;
В.І. Бумейстер, д-р біол. наук, професор;
В.З. Сікора, д-р мед. наук, професор;
Л.Ф. Суходуб*, д-р фіз.-мат. наук, професор,
Медичний інститут Сумського державного університету, м. Суми;
*Інститут прикладної фізики НАН України, м. Суми

У цій статті проведений аналіз сучасних остеопластичних матеріалів, наведена класифікація та проаналізовані їх переваги і недоліки. Зроблений висновок про переваги композитних мінералорганічних матеріалів через наявність комбінації біоактивних, остеоіндуктивних, остеоінтеграційних, біодеградаційних та біомеханічних властивостей. В експериментальній частині роботи наведені дані про синтез та in vivo дослідження нового остеопластичного матеріалу на основі хітозану та гідроксіапатиту.

Ключові слова: остеопластика, кісткові імплантати, хітозан, гідроксіапатит.

В данной статье проведен анализ современных остеопластических материалов, приведена классификация и проанализированы их преимущества и недостатки. Сделан вывод о преимуществе композитных минералорганических материалов из-за наличия комбинации биоактивных, остеоиндуктивных, остеоинтеграционных, биодеграционных и биомеханических свойств. В экспериментальной части работы приведены данные о синтезе и in vivo исследованиях нового остеопластического материала на основе хитозана и гидроксиапатита.

Ключевые слова: остеопластика, костные имплантаты, хитозан, гидроксиапатит.

ВСТУП

Щорічно у світі виконується більше ніж 2 мільйони ортопедичних операцій, у ході яких виникає потреба в заміщенні втраченої кісткової тканини. Подібні втручання поширені в хірургії, травматології, онкології, при уроджених вадах розвитку тощо. Таким чином, розроблення нових імплантаційних матеріалів для ортопедії та травматології є сучасною та не до кінця вирішеною проблемою [1].

Історично найбільш вживаним методом є використання ало- чи аутокістки як замітника втрачених чи патологічно змінених ділянок кістяка. Незважаючи на вид тканини (губчаста чи кортикальна) дані імплантати містять остеопротекторні клітини, остеоіндуктивні фактори росту і є основою для формування нової кістки. Більше того, тривимірна структурна сітка ало- чи аутокістки виконує підтримуючу функцію для росту судин та проникнення остеопротекторних клітин всередину імплантата, тобто має виражені остеоіндуктивні властивості. Однак свіжий алогенний імплантат може викликати як локальну, так і системну імунну відповідь, що, у свою чергу, призводить до втрати як остеоіндуктивних, так і остеоіндуктивних властивостей матеріалу. Для запобігання даним ускладненням підготовка матеріалу передбачає ліофілізацію чи заморожування зразків кістки.

Незважаючи на багаторічний досвід використання ало- та аутокісткових імплантатів, безліч ускладнень обмежує їх використання в практиці:

- 1) цей метод неможливо використати при потребі у заміщенні значного за об'ємом дефекту;
- 2) відбувається втрата нормальної структури та функції органа донора;
- 3) необхідність забору матеріалу з декількох ділянок;
- 4) низький ризик інфекції та вторинної деформації органа донора;
- 5) використання алогенної кістки має ризик виникнення клітинно-опосередкованої імунної реакції.

Крім того, губчасті кісткові імплантати з часом повністю заміщаються кістковою тканиною шляхом субституції, в той час як кортикальні імплантати заміщуються на життєздатну кістку через стадію некрозу.

Таким чином, вищезазначені ускладнення обмежують використання як ало- так і аутокісткових імплантатів і спонукають до пошуку альтернативних матеріалів. Синтетичні імплантати не мають побічних ефектів біологічної кісткової тканини і не несуть в собі остеоіндуктивних чи остеокондуктивних елементів реципієнта. Одночасно переваги ало- та аутокістки обмежує використання багатьох композитних матеріалів у клінічних умовах. При цьому тканинна інженерія може стати альтернативним методом при кістковій регенерації.

Тканинна інженерія визначається як використання наукових інженерних принципів у розробленні, побудові, модифікації росту та підтримці живих тканин і органів з використанням натуральних або синтетичних джерел для відновлення втрачених чи пошкоджених частин тіла. Тканинна інженерія базується на принципах молекулярної біології, клітинної біології та наук про біоматеріали. На цей час проводяться розроблення щодо створення замінників шкіри, рогівки, печінкової тканини, нирок, сечового міхура, судин, м'язів тощо. Незважаючи на різноманітність тканин людського тіла, кістка має найбільшу регенераторну потенцію і є прототипом для більшості моделей тканинної інженерії. Крім того, кісткові імплантати є найбільш використовуваними у сучасній хірургічній практиці.

Матеріали, що використовуються у розробленні кісткових імплантатів, мають задовольняти такі властивості [2]:

- 1) біосумісність – можливість прикріплення клітин, їх проліферації та диференціювання;
- 2) біодеградацію з контрольованою деградацією та швидкістю резорбції, яка відповідає швидкості росту тканини. Матеріали, що утворюються при деградації, мають бути нетоксичними;
- 3) наявність пор відповідного розміру, що забезпечують остеокондуктивність;
- 4) наявність механічних властивостей, які відповідають таким для тканини в місці імплантації.

Імплантати-носії, які відіграють роль носія біологічноактивних речовин (кісткові морфогенетичні білки) чи прогенеторних клітин, повинні додатково мати такі властивості [3]:

- 1) провокувати адекватну запальну реакцію;
- 2) захищати інкорпорований агент та підтримувати його біологічну активність.

За даними Н.А. Корж та співавторів [4,] оптимізація остеорепарації при використанні біоматеріалів забезпечується в першу чергу їх остеокондуктивними властивостями. Такі матеріали не тільки займають простір втраченої кісткової тканини, але й інтегруються з розміщеною навколо неї кісткою, виконуючи функцію остова для проникнення судин, материнської кісткової тканини та міграції детермінованих остеогенних клітин-попередників реципієнта. Для проявів даними клітинами

остеогенних потенцій не потрібно додаткового впливу індуктивного сигналу, а напрям морфогенезу значною мірою залежить від стану реваскуляризації [5].

Остеокондуктивність біоматеріалів залежить в першу чергу від їх фізико-хімічних характеристик, біосумісності та структури поверхні (архітектоніки, розміру пор та об'єму пористості). [6; 7]. Найбільш ефективними остеокондукторами є кальцій-фосфатні кераміки завдяки наявності у них унікальних властивостей – біоактивності та остеотропізму, які забезпечують специфічні механізми остеокондукції [8]. Але композитні матеріали, які з'явилися останніми десятиліттями, мають більш високий ступінь спорідненості з кісткою завдяки наявності двох складових – гідроксіапатиту (чи фосфату кальцію) та органічної фракції, яка відіграє роль структурного остова [9; 10].

Окрім структурних особливостей матеріалів, важливу роль відіграє стан кісткової тканини в місці імплантації. Основного значення набувають наявність та можливість міграції в зону імплантата стовбурових клітин і клітин-попередників остеогенезу. За даними деяких досліджень, у осіб старечого віку біодеградація та остеointegraція уповільнені через низьку щільність ОБ окістя та значне зменшення кількості клітин-попередників у кістковому мозку. На швидкість біодеградації також впливає місце імплантації. Так, у працях Z. Zuman та співавт. доведено, що в ділянках кістки з більшим навантаженням (дистальний метафіз стегнової кістки) біодеградація відбувається з більш високою швидкістю, ніж у ділянці вертлюга, що має менше механічне навантаження [11]

За даними Талашової І.А. та співавт., швидкість резорбції імплантата залежить від складу матеріалу, а саме від вмісту в ньому кальцію та фосфору, а також від їх співвідношення в імплантаті [12]. За даними авторів, оптимальним співвідношенням даних елементів є 2,15, що дорівнює ваговому співвідношенню кальцію та фосфору в кістковій тканині ссавців.

Порівнюючи швидкість біодеградації та утворення нової кісткової тканини за умов застосування гідроксіапатитної кераміки, трикальційфосфату та композитного матеріалу на основі поліглюконової кислоти, Hong Cao довів, що композитний матеріал має більш виражені остеокондуктивні, остеointegraційні та остеопотентні властивості [13].

Таким чином, зважаючи на вимоги, що ставляться до кісткових імплантатів, найбільш оптимальними матеріалами є композити з органічною складовою та гідроксіапатитом чи аморфним фосфатом кальцію.

На сьогоднішній день немає єдиної класифікації матеріалів, що використовуються для заміщення кісткових дефектів. Hong Ven Deng та співавтори виділяють дві групи імплантатів – біосумісні та біоміметичні.

Біосумісні матеріали за хімічною будовою можна поділити на:

- 1) метали – нержавіюча сталь, імплантати на основі титанових сплавів;
- 2) кераміки - оксид алюмінію, кораловий гідроксіапатит, пористий фосфат кальцію, кальційфосфатні цементы, біоскло;
- 3) поліметилметакрилати.

Ці матеріали мають задовільну здатність до адгезії клітин на своїй поверхні, за наявності пор – мають остеокондуктивні властивості і є біоінертними. Незважаючи на це, подібні імплантати не мають остеoіндуктивних властивостей та мають низьку швидкість біодеградації. Хоча деякі автори пропонують навантажувати подібні матеріали остеoіндуктивними агентами. В експерименті доведений позитивний ефект введення BMP2 в суміш трикальційфосфатної кераміки і культури ОБ на репаративний остеогенез [14]. Виділяючись в перші години, BMP активує міграцію мезенхімальних клітин та їх диференціювання в ОБ, що

продукують кістковий матрикс [15]. Введення ВМР-2 в біодеградуєчий шар титанового імплантата також викликало нормалізацію остеогенезу травмованої кістки [16].

Крім того, кальційфосфатну кераміку та гідроксіапатит використовують як покриття на пластини для зовнішнього і внутрішнього металостеосинтезу [17; 18; 19]. Таке покриття може найбільш ефективно забезпечити їх остеointegraцію, максимально нівелювати небажаний вплив імплантата на біологічні тканини, забезпечити остеорепацію в оптимальні терміни і запобігти вірогідній втраті імплантатами їх фіксуючих властивостей [20; 21]. Лузін В.І. та співавт. пропонують вводити до складу кальційфосфатної кераміки марганець і мідь, які здатні підсилювати репаративний остеогенез, надаючи, таким чином, остеoіндуктивних властивостей зазначеним матеріалам [22].

Біоактивну кераміку вперше застосовано Hench та співавт. у 1991 році. Автори запропонували до використання біоскло з формулою $\text{Na}_2\text{O}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5$. Пізніше було запропоновано біоскло з гідроксіапатитом та кальційфосфатом. Але ця біокераміка мала низьку спорідненість з кістковою тканиною та високий модуль Юнга, що зменшувало галузі застосування даних матеріалів. На сьогодні створено декілька видів біокерамічних матеріалів, які можуть широко використовуватися в ортопедичній практиці:

1. Біоскло на основі системи $\text{MgO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2$. Дані матеріали показують високу реактивність та біоактивність, які реалізуються шляхом високої здатності до формування гідроксіапатиту кістки при реакції матеріалу з рідиною організму [23; 24]. Вивільнення при цьому іонів натрію та кальцію викликає підвищення рН та концентрацію іонів кальцію з формуванням кристалів. Так, біоскло з формулою $10\text{MgO}-40\text{CaO}-50\text{SiO}_2$ *invitro* викликає формування апатиту на 3-й день [24]. Крім того, марганець, який входить до складу матеріалів, відіграє ключову роль як у формуванні кристалів, так і в інших процесах загоєння травми. Для поліпшення остеокондуктивних властивостей створена кераміка з порами від 300 до 500 мкм, що покращує процеси інтеграції матеріалу в кістку [25, 26].

2. Склокераміка на основі системи $\text{ZnO}-\text{CaO}-\text{SiO}_2-\text{P}_2\text{O}_5-\text{CaF}_2$. Оксид цинку, що наявний в даних кераміках здатний контролювати взаємодію матеріалу з оточуючими тканинами та рідиною, крім того впливаючи на процеси формування кісткового матриксу [27]. Дані матеріали показали високу біологічну активність та задовільні біомеханічні властивості [28; 29].

3. Склокераміка на основі системи $3\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5-\text{CaO}-\text{MgO}-2\text{SiO}_2$. Комбінація трикальційфосфату ($3\text{CaO}-\text{P}_2\text{O}_5$) з біосклом забезпечує високу біоактивність та контрольовану біодеградацію. Таким чином, дані матеріали мають високі остеокондуктивні та біомеханічні властивості нарівні з контрольованою швидкістю біодеградації [30].

4. Біоактивні гібриди. Дані матеріали створені для довготривалої імплантації і мають як біоактивну складову, так і біоміметичні та біомеханічні властивості, що відповідають таким для здорової кістки. До таких імплантатів належать матеріали на основі полідиметилізоксану [31, 32; 33], метакрилоксипропілтриметоксилану і 2-гідроксіетилметакрилату [34; 35] з додаванням солей кальцію та SiO_2 .

Таким чином, біосумісні матеріали мають задовільні біомеханічні властивості, остеотропізм, але мають здебільшого незадовільні остеoіндуктивні та остеокондуктивні властивості, що обумовлює їх застосування більшою мірою при остеосинтезі та обмежує їх використання під час пластичних операцій.

До імплантатів з біоміметичними властивостями належать композитні матеріали на основі природних та синтетичних полімерів.

Найпоширенішим природним полімером є колаген, який використовується в практичній медицині більш ніж півстоліття. Використання колагену, еластину, хітозану як основа для апатиту та клітин дозволяють відтворити тривимірну будову кісткового матриксу та надати композиту всіх необхідних властивостей. До синтетичних біоміметичних матеріалів відносять полілактанову та полігліколеву кислоти, полідіоксанон та їх сополімери, які вже використовуються в багатьох країнах світу як біодеградуєчі біоміметичні матеріали.

Peter X. Ma та співавтори виділяють три групи композитних матеріалів: [36]

- 1) полімер/керамічні композитні матеріали;
- 2) полімер/кальційфосфатні матеріали;
- 3) гідроксіапатит/колагенові матеріали.

До першої групи відносять полімер/гідроксіапатитні композитні матеріали, полімер/гідроксіапатитні нанокompозитні матеріали та полімер/апатитні композитні матеріали з біоміметичними властивостями.

Полімер/гідроксіапатитні композитні матеріали мають високу тривкість, пористість та задовольняють більшість вимог до кісткових імплантатів. Так, поліальфагідроксилова кислота в композиті з гідроксіапатитом має високу пористість, що досягає 95%, та механічні властивості здорової кісткової тканини [36; 37]. При цьому під час синтезу матеріалу можлива модифікація мікроархітектоніки імплантата шляхом контролю концентрації полімеру та гідроксіапатиту, температури процесу та використання різних розчинників. Задовільні біологічні властивості отримані також для полілактатглюконової кислоти/гідроксіапатитних композитів [38]. Але при цьому задовільні біомеханічні властивості спостерігалися тільки при пористості 47%. Зростання відсотка пор різко зменшувало механічну здатність імплантатів.

У дослідженнях Laurencin та співавт. [39; 40] проведено вивчення можливості використання полілактатглюконової кислоти/гідроксіапатитних композитних матеріалів з культурою ОБ. Але в зазначених публікаціях використовувався матеріал з низькою пористістю (близько 35%), що не є ідеальним для довготривалого життя клітин, їх проліферації та формування тканин. У більш пізніх дослідженнях Ma та співавт. [36], використовуючи метод фазової сепарації, змогли створити композитні матеріали на основі полілактатглюконової кислоти з високими біомеханічними властивостями та пористістю до 81% і показали проникнення клітин та формування кісткової тканини навіть у глибині імплантата. Woo K. та співавт. довели, що додавання гідроксіапатиту до органічних полімерів збільшує абсорбцію сироваткових білків та остеоіндуктивних факторів на поверхні композита, що відіграє важливу роль в біодеградації та остеоіндуктивних властивостях імплантатів [2]. Додавання гідроксіапатиту до аліфатичних поліестерів здатне зв'язувати кислі продукти деградації полімерів та створювати оптимальне середовище для проліферації прогенеторних клітин [37; 41; 42].

Таким чином, полімер/гідроксіапатитні композитні матеріали мають високу пористість та задовільні біомеханічні властивості, хоча мають низьку швидкість біодеградації.

Полімер/гідроксіапатитні нанокompозитні матеріали намагаються відтворити нанорозмірні кристали апатиту, характерні для кісткової тканини, які забезпечують унікальні біомеханічні властивості кістяка [43]. Так, Webster та співавт. показали зростання абсорбції сироваткових білків та адгезії ОБ на поверхні нанорозмірних кристалів апатиту в порівняно з мікророзмірним гідроксіапатитом. Автори пояснюють цей феномен збільшенням ефективної поверхні матеріалів та підвищенням їх гідрофільності [44; 45]. Wei та Ma показали, що використання нанокристалічного апатиту в полімерних композитних матеріалах значно

покращує морфологію зразків, яка наближається до тривимірної структури кісткового композита [46]. Пізніші дослідження колаген/гідроксіапатитних нанокompозитних матеріалів показали зростання ступеня адгезії та міграції клітин-попередників ОБ та покращання остеоіндуктивних властивостей матеріалів [47; 48]. Таким чином, використання нанорозмірних апатитних частинок у композитних матеріалах дозволяє покращити морфологію імплантатів, їх біомеханічні та остеоіндуктивні властивості.

Кістковий мінерал є нестехіометричним апатитом, який вміщує у своєму складі іони, такі, як карбонат, і є менш кристалізованим, ніж синтетичний стехіометричний гідроксіапатит. Особливості будови кісткового апатиту відіграють ключову роль в життєдіяльності кістки, і тому багато праць присвячено створенню біоміметичних полімерних композитних матеріалів [49]. Останніми роками ведуться спроби створити біоапатит шляхом додавання до розчину фосфату кальцію метафізарного фактору росту, який ініціює утворення карбонатних груп на поверхні кристалів [37]. Утворення біоапатитного покриття відтворено на колагеновій, желатиновій та хітиновій матрицях і може стати одним із найперспективніших напрямків створення кісткових імплантатів [50; 51].

Використання остеоіндуктивних агентів, таких як кісткові морфогенетичні білки, в ортопедичній практиці обумовлює створення матеріалів, що здатні переносити дані речовини. Уперше як переносник морфогенетичних білків було використано полілактат [52]. Але даний матеріал був малоефективний через його кислотну деградацію. На цей час матеріали-носії можна поділити на: 1) синтетичні; 2) колаген; 3) натуральні полімери; 4) нано- та мікророзмірні носії.

Синтетичні біодеградуючі полімери, такі, як полілактат-р-діоксанон-поліетиленгліколь, виявили високий ступінь біодеградації та задовільні властивості носіїв морфогенетичних білків [563]. Крім того, цей матеріал можна вводити ін'єкційно в місце травми, не завдаючи додаткового ушкодження тканин [54]. Даний носій був тестований на багатьох тваринних моделях – собаках, кролях та свинях - і в усіх дослідженнях виявив стимуляцію утворення нової кісткової тканини [55; 56; 57; 58]. Полілактатгліколеві матеріали також виявили себе як можливі носії біологічно активних агентів та стимулятори формування кісткової тканини на багатьох тваринних моделях [59; 60; 61]. Використання поліетиленгліколю у вигляді гідрогелю як носія остеоіндуктивних агентів виявило їх високу спорідненість з екстрацелюлярним матриксом і високі остеоіндуктивні та остеоіндуктивні властивості [62; 63]. Але при використанні синтетичних матеріалів є ризик запальної відповіді на кислі продукти деградації полімерів, що може знизити ефективність остеоіндуктивних агентів, які інкорпоровані в полімер.

Колаген є ідеальним біологічним агентом як носій остеоіндуктивних факторів завдяки цілому ряду властивостей, таких, як біосумісність, біодеградація та здатність активувати міжклітинну взаємодію. У наш час розроблені та впроваджені в клініку колагенові губки, які здатні до перенесення молекул кісткових морфогенетичних білків [64; 65; 66]. Однак використання колагену має ризик розвитку імунної відповіді на чужорідний протеїн. Крім того, отримання колагену з тваринних продуктів може призвести до інфекційних ускладнень та перенесення хвороб (пріони). Тому є необхідність до його заміни натуральними полімерами, які мають подібні біологічні властивості та вільні від побічних ефектів, притаманних колагену.

У наш час досліджено безліч натуральних полімерів, які можуть бути використані як носії остеоіндуктивних агентів. Серед них хітин та хітозан, гіалуронова кислота, альгінат, шовковий фіброїн, фібрин, желатин, декстрини та ін. [67; 68]. Більшість з даних полімерів

наявні в кістці, хрящі чи міжклітинній рідині, тому вони мають такі властивості, як біодеградація, біосумісність та остеокондукція, що дозволяє їх використовувати як носій остеоіндуктивних агентів [69]. Крім того проводяться розроблення носіїв на основі рослинної сировини, продуктів життєдіяльності мікроорганізмів та за допомогою рекомбінантної генної інженерії [70].

Таким чином, сучасна медицина має достатній арсенал матеріалів, які використовуються в остеопластиці та остеоінтеграції. До них відносять ауто- та ксенокістку, біоінертні метали, склокераміка та керамічні матеріали на основі фосфату кальцію, полімерні біологічні та синтетичні матеріали, композитні матеріали на основі синтетичних і натуральних волокон. Останні є найбільш перспективними через наявність комбінації біоактивних, остеоіндуктивних, остеоінтеграційних, біодеградуємих та біомеханічних властивостей. Композитні матеріали є біоміметичними через наявність полімерної синтетичної чи натуральної складової та інкорпорованого фосфату кальцію (кристалічного чи аморфного). Покращання якості даних матеріалів здійснюється трьома шляхами. По-перше, – через модифікацію неорганічної складової (нанорозміри кристалів, біоміметичний гідроксіапатит), по-друге, – через включення до їх складу остеоіндуктивних та інших агентів (антибіотики, фактори росту) та по-третє, – через модифікацію матриці, а саме: пошуку оптимального полімерного матеріалу для утворення полімерної складової. Одним із перспективних матеріалів для використання як основи композитних матеріалів є хітозан.

Хітин і хітозан - аналоги целюлози, що містять біля 2-го атома вуглецю замість гідроксилу ацетамідну або аміногрупу. Хітозан являє собою полімер D-глюкозаміну -1,4-(2-ацетиламіно -2-дезоксид -D-) n, що містить від 3 до 50% ацетамідних груп і відповідно від 50 до 97% аміногруп. Молекулярна маса нативного полімеру хітину більше 1000 кДа. Молекулярна маса хітозану коливається від половини кДа (хітобіози) до сотень кДа залежно від розміру деполімеризованих продуктів. У результаті біодеградації хітозану вивільнюються аміноцукри, які можуть включатися в обмінні перетворення глікозаміногліканів і глікопротеїдів. Хітозан може бути попередником ряду глікозаміногліканів, зокрема хондроїтин-4-сульфату, хондроїтин-6-сульфату, кератин-сульфату, гіалуронової кислоти, які беруть участь в утворенні і метаболізмі тканин, у тому числі кістки, хряща і пародонта. Хітозановий полімер має різноманітні біологічні властивості. Він проявляє антибактеріальну та антигрибкову активність. Здатен стимулювати імунну систему через активацію макрофагів, фібробластів, системи комплементу, активацію міграції поліморфноядерних лейкоцитів. Крім того, хітоолігополімери залучені до біосинтезу гіалуронової кислоти та мають морфогенетичну активність у хребетних.

Фармакологічні дослідження виявили можливість застосування хітозану як носія лікарських субстанцій та остеоіндуктивних факторів з контрольованим вивільненням [2; 71; 72]. Хітозан використовується для виробництва гідрогелевих носіїв, пористих кісткових та хрящових імплантатів, імплантатів-носіїв остеоіндуктивних факторів [73; 74; 75]. Перевагами даного полімеру є можливість формувати пори різного діаметра та виготовляти імплантати з різною консистенцією та формою [76; 77]. Разом з тим додавання апатитної складової дозволяє виготовляти імплантати з високими біомеханічними властивостями.

МЕТА

На жаль, більшість досліджень хітозановмісних полімерних композитних матеріалів для використання як заміника кісткової тканини проведено *in vitro* без урахування стану макроорганізму. Тому

розроблення подібних матеріалів є актуальною медико-біологічною проблемою. Метою даної роботи є дослідження фізико-хімічних та остеокондуктивних властивостей нового нанокompозитного матеріалу на основі хітозану та апатиту кальцію.

МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

У нашій роботі використовували низькомолекулярний хітозан (Aldrich). Для синтезу готували 0,2% розчин хітозану в 1% оцтовій кислоті. Хітозан розчиняли протягом 24 год. при кімнатній температурі. Одержаний розчин фільтрували через скляний фільтр із середнім розміром пор. До розчину хітозану в оцтовій кислоті додавали в певних співвідношеннях свіжоприготовані 1М розчини солей хлориду кальцію та дигідрофосфату натрію, витримуючи мольне співвідношення Ca/P 1,67. Використовували солі кваліфікації хч.

Перемішували суміш впродовж 10-15 хв за допомогою магнітної мішалки. Потім, продовжуючи перемішування, додавали до прозорої суміші розчинів краплями 1,25 М розчин гідроксиду натрію до досягнення значення рН 11. При підвищенні рН до 6,8-7 відбуваються осадження хітозану і формування полімерної матриці, в якій при подальшому підвищенні значення рН осаджуються кальцій-фосфати. Утворену суспензію залишали на 24 год. при кімнатній температурі для старіння осаду, що є необхідною умовою для утворення гідроксіапатиту. Потім осад відфільтровували з використанням скляного фільтра, ретельно промивали дистильованою водою, перевіряючи наявність іонів натрію та хлору в промивних водах за допомогою якісних реакцій. Висушували при кімнатній температурі впродовж 3 діб. Для отримання пористого матеріалу висушені протягом 24 год. ліофілізували в лабораторній установці для ліофільної сушки.

Слід відмітити, що в синтезі використовуються порівняно дешеві реагенти. Окрім вищезазначеного промислового хітозану використовували також зразки, одержані з різних джерел (річковий рак, колорадський жук, бджоли, гриби) в лабораторних умовах. Синтез відбувається в м'яких умовах, в одну стадію, поступове, а не різке підвищення рН сприяє формуванню однорідного матеріалу з рівномірним розподілом неорганічної компоненти в полімерній матриці. У синтезі не використовуються токсичні та небезпечні для навколишнього середовища речовини. До композитних матеріалів можуть бути включені інші органічні або неорганічні компоненти для підвищення їх біологічної активності та більш ефективного застосування в лікарській практиці.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Дослідження концентраційних рядів ChAr методами інфрачервоної спектроскопії, рентгенівської дифракції і растрової електронної мікроскопії з мікроаналізом показали:

1. Усі смуги поглинання інфрачервоних спектрів відповідають гідроксіапатиту, хоча їх ширина значно збільшується при збільшенні частки хітозану (рис. 1).

2. Картини рентгенівської дифракції свідчать про наявність нанокристалічного апатиту, і його кристалічність зменшується при збільшенні частки хітозану (рис. 2).

3. Співвідношення Ca/P у зразках ChAr приблизно дорівнює апатитному (1,67), матеріали після ліофільної сушки мають пори мікронного та субмікронного діапазонів (рис. 3).

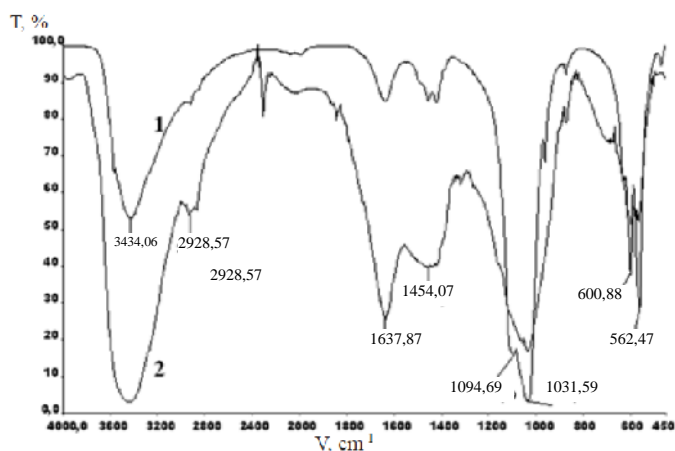


Рисунок 1 - Інфрачервоні спектри гідроксіапатиту (1) і хітозанапатиту ChAp(2)

Із фізичної ширини ліній рентгенівської дифракції (прилад ДРОН4-07), яка обернено пропорційна розмірам кристалітів, можна зробити висновок, що збільшення частки хітозану в композитах приводить до зменшення розмірів кристалів апатиту. Якісні оцінки ширини профілю основних дифракційних ліній свідчать про те, що при співвідношенні хітозан/апатит, яке дорівнює 50/50, розміри кристалітів у композиті відповідають розмірам біоапатиту кісткової тканини (~20 нм). Деяко завищена інтенсивність піків (002) і (004) порівняно з довідковими даними (JCPDS №9-432) свідчить про витягнутість кристалітів апатиту вздовж кристалографічної осі с, що є характерним і для біоапатиту кісткової тканини. Використання ліофільної сушки безпосередньо після промивання і старіння зразків дозволило отримувати пористі матеріали, на мікроскопічних зображеннях яких (рис. 3) морфологічно можна розрізнити дві системи пор. Вимірювання і статистична обробка показали, що «малі» пори мають середній розмір 29,9 мкм, «великі» - 51,0 мкм. Такий розмір пор є задовільним для наявності у матеріалу остеокондуктивних властивостей.

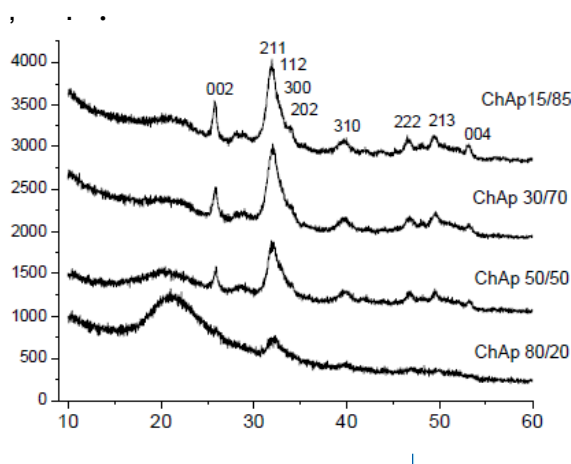


Рисунок 2 - Картини рентгенівської дифракції зразків хітозанапатиту ChAp з різним вихідним співвідношенням компонентів

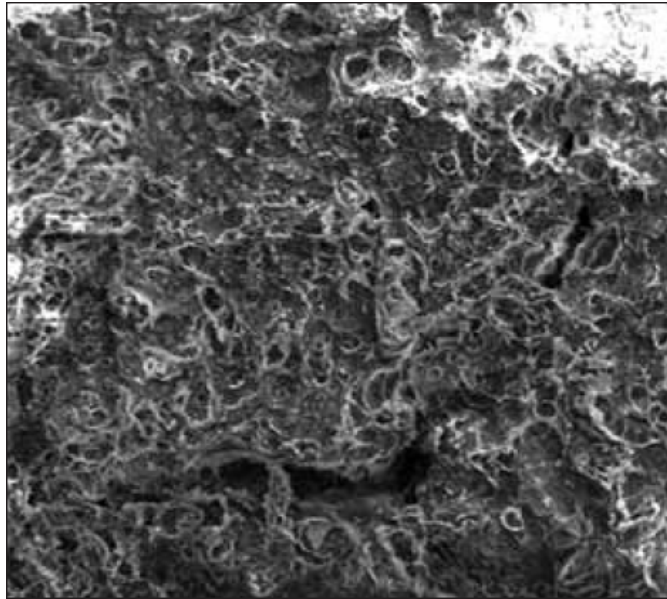
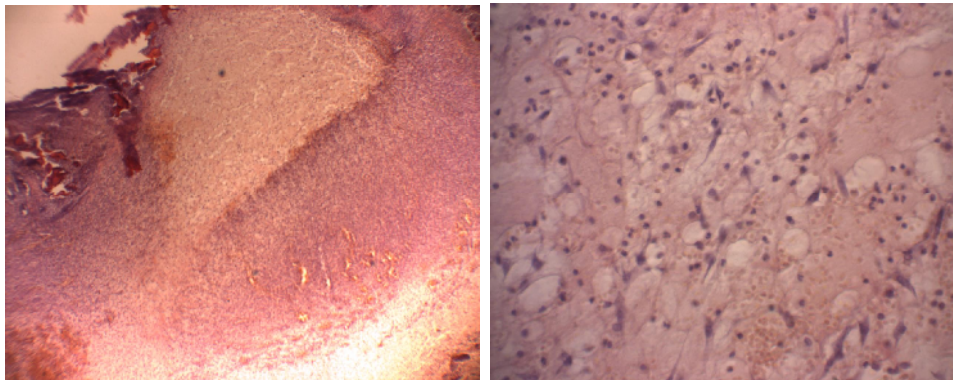


Рисунок 3 - Електронно-мікроскопічне зображення мікроструктури пористого хітозанопатиту, отриманого з використанням ліофілізації (збільш.× 200)

Підшкірне імплантування ChAp лабораторним щурам показало відсутність запальної реакції. По периферії імплантата спостерігається незначна лейкоцитарна інфільтрація, яка виникає внаслідок введення чужорідного тіла. Макропори імплантата через 1 тиждень після введення заповнені клітинами лейкоцитарного диферону (рис. 4). Звертає на себе увагу поява гістіоцитів, що свідчить про остеоіндуктивні та виражені остеокондуктивні властивості матеріалу.



А

В

Рисунок 4 – ChAp- матеріал при підшкірній імплантації лабораторним щурам через 7 днів після операції. А (збільш. × 40) – помітна лейкоцитарна реакція по периферії імплантата. В (збільш. × 400) – проникнення в пори матеріалу фібробластів

ВИСНОВКИ

Таким чином, незважаючи на наявність великої кількості матеріалів для остеопластики, більшість з них не відповідають характеристикам «ідеального» імплантата через низку фізичних, хімічних чи фармако-

економічних показників. Композитні матеріали на основі хітозану та нанорозмірного апатиту кальцію є перспективними кандидатами для використання в клінічній практиці.

ПЕРСПЕКТИВИ ПОДАЛЬШИХ ДОСЛІДЖЕНЬ

Наступним етапом роботи буде проведення комплексу досліджень згідно з "Національним стандартом України ДСТУ ISO 10993-1:2004" для отримання дозволу на клінічні випробування матеріалу.

SUMMARY

OSTEOPLASTIC MATERIALS - PROBLEM CURRENT STATE (THE LITERATURE REVIEW AND RESULTS OF OWN RESEARCHES)

M.V. Pogorelov, S.N. Danilchko¹, O.V. Kalinkevich, A.N. Kalinkevich*, G.F. Tkach, V.I. Bumeyster, V.Z. Sikora, L.F. Sukhodub*,*

Medical Institute of Sumy State University, Sumy;

**Institute for Applied Physics, Sumy*

In this article the analysis of modern osteoplastic materials is carried out, classification is reviewed and analysed from point of view of their advantages and disadvantages. The conclusion is drawn on advantage of composite mineral-organic materials because of combination of their bioactive, osteoconductive, osteointegrative, biodegradational and biomechanical properties. In an experimental part of work the data about synthesis and in vivo researches of a new osteoplastic material on a basis of chitosan and hydroxyapatite is cited.

Key words: *osteoplastic materials, bioactive, osteoconductive, osteointegrative, biodegradational, biomechanical properties.*

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Ефективність лікування хворих із діафізарними переломами кісток нижньої кінцівки за допомогою сучасних технологій остеосинтезу /А.В. Калашнікова, К.В. Вдовіченко, Т.П. Чалайдюк [та ін.] // Український морфологічний альманах. – 2010. – Том 8, №1. – С. 39-42.
2. Protein-mediated osteoblast survival and migration on biodegradable polymer/hydroxyapatite scaffolds / К.М. Woo, R.Y. Zhang, H.Y. Deng et al. / Trans. Soc. Biomater. - 2002. - Vol.25/ - P. 605.
3. Bessa P.S. Bone morphogenetic proteins in tissue engineering: the road from laboratory to clinic, part II (BMP delivery) / P.C. Bessa, M. Casal, R.L. Reis / Journal of tissue engineering and regenerative medicine. – 2008. – Vol.2. – P. 81-96.
4. Корж Н.А. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль оптимизации и стимуляции в реконструкции кости / Н.А. Корж, Л.А. Кладченко, С.В. Малышкина // Ортопедия, травматология и протезирование. – 2008. - №4. – С. 5-14.
5. Baksh D. Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation and application in cell and gene therapy / D. Baksh, L. Song, R.S. Tuan // J. Cell. Mol. Med. – 2004. – Vol.8, №3. – P. 301 – 316.
6. Малишкіна С.В. Цитологічні особливості гідроксіапатитної кераміки при імплантації у кістку / С.В. Малишкіна // Вісник Білоцерківського державного аграрного університету. – 2000. – Вип. 14. – С. 119-125.
7. Albrektsson T. Osteoinduction, osteoconduction and osteointegration / T. Albrektsson, C. Johansson // Eur. Spine J. – 2001. - №10. – P. 96-101.
8. Al Ruhaimi Kh. A. Bone graft substitutes comparative qualitative histologic review of current osteoconductive grafting materials / Kh. A. Al Ruhaimi // Intern. J. Oral Maxillofacial Implants/ - 2001. – Vol.16, №1. – P. 105-114.
9. Hilborn J. Scaffolds for tissue engineering / J. Hilborn // Nano Med. 5-th Intern. Workshop on Biomed. Appl. Nanotech. – Berlin, Germany, Febr. 16-17, 2006. – P. 29-30.
10. Alvis M. Osteoinduction by a collagen/mineral composite combined with isologous bone marrow in a subcutaneous rat model / M. Alvis, P. Lalor, M.K.C. Brown et al //Orthopedics. – 2003. – Vol.26, N1. – P. 77-80.
11. Zyman Z. Porous calcium phosphate ceramic granules and their behaviour in differently loaded areas of skeleton / Z. Zyman, V Glushko, N. Dedukh, S. Malyshkina et al. // J. Mater. Sci. – 2007. – Vol. 15. – P. 210-218.
12. Талашова И.А. Качественный и количественный состав имплантационных кальцийфосфатных материалов / И.А. Талашова, Т.А. Силантьева // Успехи современного естествознания. – 2007. - №11. – С. 15-19.
13. Hong Cao. A biodegradable porous composite scaffold of PGA/ -TCP for bone tissue engineering / Cao Hong, N. Kuboyama // Bone. – 2009. – Vol. 46. – P. 386-395.
14. Mixing conditions for cell scaffolds affect the bone formation induced by bone engineering with human bone marrow stromal cells, beta-tricalcium phosphate granules, and

- rhBMP-2 / Uchida Moritoshi, Agata Hideki, Sagara Hiroshi et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A.* - 2009. - №91(1). - P. 84-91.
15. Groenevald E.H.J. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration. / E.H.J. Groenevald, E.H. Durger / *Eur. J. Endocrinol.* - 2000. - P. 9-21.
 16. Simvastatin locally applied from a biodegradable coating of osteosynthetic implants improves fracture healing comparable to BMP-2 application. / S. Pauly, F. Luttosch. M. Morawski et al. / *Bone.* - 2009. - №45(3). - P. 505-511.
 17. Pesskova V. The influence of implant surface properties on cell adhesion and proliferation / V. Pesskova, D. Kubiec, H. Hulejov, L. Himmlova // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2007. - Vol. 18, N 3. - P. 465-473.
 18. Sanden B. Improved extraction torque of hydroxyapatite-coated pedicle screws / B. Sanden, C. Olerud, C. Johansson, S. Larsson // *Eur. Spine J.* - 2000. - Vol. 9, №6. - P. 534-537.
 19. Spivak J.M. Use of hydroxyapatite in spine surgery / J.M. Spivak, A. Hasharony // *Eur. Spine J.* - 2001. - Vol. 10 (suppl.). - P. 197-204.
 20. Narayanan R. Calcium phosphate-based coating on titanium and its alloys / R. Narayanan, S.K. Seshadri, T.Y. Kwon, K.H. Kim // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Mater.* - 2008. - Vol. 85, N1. - P. 279-299.
 21. Имплантационные материалы и остеогенез. Роль биологической фиксации и остеоинтеграции в реконструкции кости / Н.А. Корж, Л.А. Кладченко, С.В. Мальшкينا и др./ *Ортопедия, травматология и протезирование.* - 2005. - №4. - С. 118-127.
 22. Петросянц С.В. Минеральная насыщенность большеберцовой кости при имплантации в нее биогенного гидроксилатапата, насыщенного медью в различных концентрациях / С.В. Петросянц, В.И. Лузин // *Матеріали наукового конгресу «IV Міжнародні Пироговські читання», м. Вінниця, 2-5 червня, 2010 р.* - С. 90-91.
 23. Compositional dependence of bioactivity of glasses in the system CaO-SiO₂-P₂O₅—its in vitro evaluation. / C. Ohtsuki, T. Kokubo, K. Takatsuka et al.// *J. Ceram. Soc. Jpn.* - 1991. - Vol. 99. - P.1-6.
 24. Tsuru K. Effect of MgO and BaO on bioactivity of CaO-SiO₂ glasses. In *Proc. XVII Int. Cong. on Glass*, vol. 5 (ed. G. Fangtian) / K. Tsuru, C. Ohtsuki, A. Osaka. - 1995, Beijing, China: Chinese Ceramic Society. - P. 85-90.
 25. Osteoconduction at porous hydroxyapatite with various pore configurations / B.-S. Chang, C.-K. Lee, K.S. Hong et. al // *Biomaterials.* - 2000. - Vol. 21. - P. 1291-1298.
 26. Miyazaki T. Synthesis of bioactive organic-inorganic nano-hybrid for bone repair through sol-gel processing. / T. Miyazaki, C. Ohtsuki, M. Tanihara // *J. Nanosci. Nanotechnol.* - 2003. - Vol.3. - P. 511-515.
 27. Preparation, solubility and cytocompatibility of zinc-releasing calcium phosphate ceramics / A. Ito, K. Ojima, H. Naito, et. al.// *J. Biomed. Mater. Res.* - 2000. - Vol.50. - P.178-183.
 28. Effect of ZnO addition on bioactive CaO-SiO₂-P₂O₅-CaF₂ glass-ceramics containing apatite and wollastonite / M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, H. Inada, et. al // *Acta Biomater.* - 2006. - Vol. 2. - P. 467-471.
 29. Kokubo T. How useful is SBF in predicting in vivo bone bioactivity? / T. Kokubo, H. Takadama / *Biomaterials.* - 2006. - V. 27. - P. 2907-2915.
 30. Preparation of porous glass-ceramics containing whitlockite and diopside for bone repair / M. Kamitakahara, C. Ohtsuki, Y. Kozaka, et. al.// *J. Ceram. Soc. Jpn.* - 2006. - Vol. 114. - P. 82-86.
 31. Bioactivity and mechanical properties of polydimethylsiloxane (PDMS)-CaO-SiO₂ hybrids with different PDMS contents / Kamitakahara, M., Kawashita, M., Miyata, N., et. al. // *J. Sol-Gel Sci. Technol.* - 2001. - Vol. 21. - P. 75-81.
 32. Bioactivity and mechanical properties of polydimethylsiloxane (PDMS)-CaO-SiO₂ hybrids with different calcium contents / M. Kamitakahara, M. Kawashita, Miyata, et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* - 2002. - Vol. 13. - P. 1015-1020.
 33. Rhee S. H. Preparation of a bioactive and degradable poly(3-caprolactone)/silica hybrid through a sol-gel method / S.H. Rhee, J.Y. Choi, H.M. Kim // *Biomaterials.* - 2002. - Vol. 23. - P. 4915-4921.
 34. Ohtsuki C. Development of bioactive organic-inorganic hybrid for bone substitutes / C. Ohtsuki, T. Miyazaki, M. Tanihara / *Mater. Sci. Eng.* - 2002. - Vol. 22. - P. 27-34.
 35. Ma. Peter X. Scaffolding in tissue engineering // Peter X. Ma., J. Elisseeff // *Taylor & Francis Group*, 2006. - 638 p.
 36. Zhang R.Y. Porous poly(L-lactic acid)/apatite composites created by biomimetic process / R.Y. Zhang, P.X. Ma // *J. Biomed. Mater. Res.* - 1999. - Vol. 45. - P. 285-293.
 37. Hydroxyapatite fiber reinforced poly(a-hydroxy ester) foams for bone regeneration / R.C. Thomson, M.J. Yaszemski, J.M. Power et al.// *Biomaterials.* -1998. -Vol.19. - P.1935-1943.
 38. Tissue engineered bone-regeneration using degradable polymers: the formation of mineralized matrices / C.T. Laurencin, M.A. Attawia, H.E. Elgendy et. al // *Bone.* - 1996. - Vol.19. - P. S93-S99.
 39. Attawia M. A. Osteoblast-like cell adherence and migration through 3-dimensional porous polymer matrices / M.A. Attawia, K.M. Herbert, C.T. Laurencin // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* - 1995. - Vol. 213. - P. 639-644.
 40. Vert M. Biodegradation of PLA/GA polymers: increasing complexity / M. Vert, J. Mauduit, S. Li // *Biomaterials.* - 1994. - Vol.15. - P.1209-1213.

41. Mainil-Varlet P. Long term in vivo degradation and bone reaction to various polylactides. 1. One-year results / P. Mainil-Varlet, B. Rahn, S. Gogolewski // *Biomaterials*. – 1997. – Vol.18. – P. 257-266.
42. Rho J.Y. Mechanical properties and the hierarchical structure of bone / J.Y. Rho, L. Kuhn-Spearing, P. Zioupos // *Med. Eng. Phys.* – 1998. – Vol.20. – P. 92-102.
43. Specific proteins mediate enhanced osteoblast adhesion on nanophase ceramics / T.J. Webster, C. Ergun, R.H. Dpremus et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2000. – Vol. 51. – P. 475-483.
44. Webster, T.J. Osteoblast adhesion on nanophase ceramics / T.J. Webster, R.W. Siegel, R. Bizios // *Biomaterials*. – 1999. – Vol. 20. – P. 1221-1227.
45. Wei G. Structure and properties of nano-hydroxyapatite/polymer composite scaffolds for bone tissue engineering / G. Wei, P. X. Ma // *Biomaterials*. – 2004. – Vol. 25. – P. 4749-4757.
46. Three-dimensional nano-HAP/collagen matrix loading with osteogenic cells in organ culture / C. Du, F.Z. Cui, Q.L. Feng et al. / *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – Vol. 44. – P. 407-415.
47. Tissue response to nano-hydroxyapatite/collagen composite implants in marrow cavity / C. Du, F.Z. Cui, Q.L. Feng et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – Vol. 42. – P. 540-548.
48. Hydroxyapatite coating of porous implants improves bone ingrowth and interface attachment strength / S.D. Cook, K.A. Thomas, J.E. Dalton et al.// *J. Biomed. Mater. Res.* – 1992. – Vol. 26. – P. 989-1001.
49. Bonelike apatite growth on hydroxyapatite-gelatin sponges from simulated body fluid / A. Bigi, E. Boanini, S. Panzavolta et al.// *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – Vol.59. – P.709-715.
50. Engineering new bone tissue in vitro on highly porous poly(a-hydroxyl acids)/hydroxyapatite composite scaffolds / P.X. Ma, R.Y. Zhang, G.Z. Xiao et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – Vol.54. – P. 284-293.
51. Evaluation of polylactic acid homopolymers as carriers for bone morphogenetic protein / S. Miyamoto, K. Takaoka, T. Okada, et al. // *Clin. Orthop. Relat. Res.* – 1992. – Vol.15. – P. 345-356.
52. Biodegradable poly-D,L-lactic acid-polyethylene glycol block copolymers as a BMP delivery system for inducing bone / N. Saito, T. Okada, H. Horiuchi, et al.// *J. Bone Joint Surg. Am.* – 2001. – Vol. 83A(suppl. 1). – P. S92-98.
53. Local bone formation by injection of recombinant human bone morphogenetic protein-2 contained in polymer carriers / N. Saito, T. Okada, H. Horiuchi, et al. // *Bone*. – 2003. – Vol. 32. – P. 381-386.
54. Synthetic biodegradable polymers as drug delivery systems for bone morphogenetic proteins / N. Saito, N. Murakami, J. Takahashi, et al.// *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2005. – Vol. 57. – P. 1037-1045.
55. Repair of an intercalated long bone defect with a synthetic biodegradable bone-inducing implant / M. Yoneda, H. Terai, Y. Imai, et al.// *Biomaterial*. – 2005. – Vol. 26. – P. 5145-5152.
56. Repair of a proximal femoral bone defect in dogs using a porous surfaced prosthesis in combination with recombinant BMP-2 and a synthetic polymer carrier / N. Murakami, N. Saito, J. Takahashi, et al.// *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P.2153-2159.
57. A biodegradable delivery system for antibiotics and recombinant human bone morphogenetic protein-2: a potential treatment for infected bone defects / A. Suzuki, H. Terai, H. Toyoda, et al.// *J. Orthop. Res.* – 2006. – Vol. 24. – P. 327-332.
58. Bone regeneration by recombinant human bone morphogenetic protein-2 and a novel biodegradable carrier in a rabbit ulnar defect model / S. Kokubo, R. Fujimoto, S. Yokota, et al. // *Biomaterials*. – 2003. – Vol. 24. – P. 1643-1651.
59. Experimental tooth movement into bone induced by recombinant human bone morphogenetic protein-2 / T. Kawamoto, N. Motohashi, A. Kitamura, et al.// *Cleft Palate Craniofac J.* – 2003. – Vol. 40. – P. 538-543.
60. The effect of rhBMP-2 around endosseous implants with and without membranes in the canine model / A.A. Jones, D. Buser, R. Schenk, et al. / *J. Periodontol.* – 2006. – V. 77. – P. 1184-1193.
61. Repair of bone defects using synthetic mimetics of collagenous extracellular matrices / M.P. Lutolf, F.E. Weber, H.G. Schmoekel, et al.// *Nat. Biotechnol.* – 2003. – Vol. 21. – P. 513-518.
62. Synthetic matrix metalloproteinase-sensitive hydrogels for the conduction of tissue regeneration: engineering cell-invasion characteristics / M.P. Lutolf, J.L. Lauer-Fields, H.G. Schmoekel, et al.// *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2003. – Vol. 100. –P. 5413-5418.
63. Kirker-Head CA. Potential applications and delivery strategies for bone morphogenetic proteins / C.A. Kirker-Head // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2000. – Vol. 43. – P. 65-92.
64. Geiger M Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2 / M. Geiger, R.H. Li, W. Friess // *Adv. Drug Deliv. Rev.* – 2003. – Vol. 55. – P. 1613-1629.
65. Gautschi OP Bone morphogenetic proteins in clinical applications / O.P. Gautschi, S.P. Frey, R. Zellweger // *A NZ J. Surg.* – 2007. – Vol. 77. – P. 626-631.
66. Mano J. Osteochondral defects: present situation and tissue engineering approaches / J. Mano, R.L. Reis // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* – 2007. –V. 1. – P. 261-273.

67. Prolonged ectopic calcification induced by BMP-2-derived synthetic peptide / A. Saito, Y. Suzuki, S. Ogata, et al. // J. Biomed. Mater. Res. A. – 2004. – Vol. 70. – P. 115-121.
68. Polymer based scaffolds and carriers for bioactive agents from different natural origin materials / P.B. Malafaya, M.E. Gomes, A.J. Salgado, et al./ Adv. Exp. Med. Biol. – 2003. – Vol. 534. – P. 201-233.
69. Natural origin biodegradable systems in tissue engineering and regenerative medicine: present status and some moving trends / J.F. Mano, G.A. Silva, H.S. Azevedo, et al.// J. R. Soc. Interface. – 2007. – Vol. 4. – P. 999-1030.
70. Characterization of biodegradable chitosan microspheres containing vancomycin and treatment of experimental osteomyelitis caused by methicillin-resistant Staphylococcus aureus with prepared microspheres / E. Cevher, Z. Orhan, L. Mulazimoglu, et al.// Int. J. Pharm. - 2006. – Vol. 317. – P. 127-135.
71. Phaechamud T. Antibacterial activity and drug release of chitosan sponge containing doxycycline hyclate / T. Phaechamud, J. Charoenteeraboon / AAPS Pharm. Sci. Tech. – 2008. – Vol.9. – P. 829-935.
72. Preparation and characterization of RGD-immobilized chitosan scaffolds / M.-H. Ho, D.-M. Wang, H.-J. Hsieh et al.// Biomaterials. – 2005. – Vol.26. – P. 3197-3206.
73. Zhao L. Preparation and characterization of macroporous chitosan/wollastonite composite scaffolds for tissue engineering / L. Zhao, J. Chang // J. Mater. Sci. Mater. Med. – 2004. – Vol. 15(5). – P. 625-629.
74. A material decoy of biological media based on chitosan physical hydrogels: application to cartilage tissue engineering / A. Montembault, K. Tahiri, C. Korwin-Zmijowska, et al/ Biochimie. – 2006. – Vol. 88(5). – P. 551-564.
75. Di Martino A. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino, M. Sittinger, M.V. Risbud // Biomaterials. – 2005. – Vol. 26. – P. 5983-5990.
76. Preparation and characterization of biodegradable chitosan/hydroxyapatite nanocomposite rods via in situ hybridization: a potential material as internal fixation of bone fracture / Q. Hu, B. Li, M. Wang, et al.// Biomaterials. – 2004. – Vol. 25(5). – P. 779-785.

Надійшла до редакції 6 грудня 2010 р.