

БИОСОВМЕСТИМЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ

ТЕНДЕНЦИИ В РАЗРАБОТКЕ КЕРАМИЧЕСКИХ И КОМПОЗИЦИОННЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ ДЛЯ МЕДИЦИНЫ: ПЕРЕХОД НА НАНОУРОВЕНЬ

Баринов С.М., Комлев В.С.

Учреждение Российской академии наук
Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН,
E-mail: komlev@mail.ru
Москва, Россия

В последнее время значительно активизировались исследования по разработке новых методов костной хирургии, в частности, для удаления злокачественных опухолей (остеосарком). Эти методы сопряжены с вмешательством в организм, приводящим, как правило, к обширным постоперационным дефектам. В связи с этим возникает проблема замещения дефекта для восстановления нарушенных функций органов и обеспечения комфортной жизни пациента. Использование для этой цели ауто- и аллогraftов (имплантатов из костной ткани собственной или донора, соответственно) связано с определенными сложностями (возможные иммунные реакции, необходимость вторичных операций). Применение имплантатов, изготовленных из синтетических материалов (пластмассы, металлы, керамика), как правило, не дает удовлетворительного результата из-за недостаточной биологической и механической совместимости материала имплантата с тканями организма.

Примерно десятилетие назад была разработана концепция не замещения, а восстановления удаленной части костной ткани. Процесс проводится на пористых резорбируемых (рассасывающихся) матриксах с культивируемыми в их поровом пространстве клетками, формирующими костную ткань. Ключевым моментом в данной технологии являются материал и архитектура матрикса, которые должны удовлетворять определенным требованиям, таким как, биологическая совместимость, остеокондуктивность, способность к резорбции с заданной скоростью, необходимый для поддержания физиологических нагрузок уровень механических свойств.

Для матриксов, используемых в таких технологиях регенерации поврежденных костных тканей, наиболее перспективными являются материалы на основе фосфатов кальция. Несмотря на относительно долгую историю исследований и разработок в области материалов на основе фосфатов кальция для медицины, остается еще много нерешенных задач, связанных с необходимостью достижения соответствия материала всем указанным выше требованиям.

В настоящем сообщении представлен краткий обзор результатов исследований, проведенных в ИМЕТ РАН, по созданию керамических и композиционных материалов, предназначенных в качестве матриксов для регенерации костной ткани. Основное внимание уделено вопросам синтеза ортофосфатов кальция, в том числе получению наночастиц; особенностям технологии изготовления наноструктурированной керамики и керамики из термически нестабильных ортофосфатов; композиционным материалам системы «биополимер – фосфаты кальция».

Работа выполнена при финансовой поддержке Роснауки, госконтракт № 02.513.12.3008 и гранта Президента РФ МК-4047.2008.3.

ИССЛЕДОВАНИЕ ОСТЕОГЕНЕЗА В ОБЛАСТИ ИМПЛАНТАЦИИ В КОСТНУЮ ТКАНЬ ТИТАНОВЫХ ОБРАЗЦОВ С НАНОСТРУКТУРНЫМ ГИДРОКСИЛАПАТИТОВЫМ ПОКРЫТИЕМ РАЗНОЙ ПРИРОДЫ

Зубарева Е.В.

Белгородский государственный университет,
E-mail: zubareva.ekaterina@gmail.com
Белгород, Россия

Для устранения различных дефектов кости в ортопедии все чаще используют имплантаты, представляющие собой биокомпозитный материал. Такой материал состоит из металлической основы, определяющей механическую прочность всей конструкции, и биологически активного покрытия – гидроксилатаптита (ГАП), со структурой, составом и свойствами, близкими к костной ткани.

Целью проведенного исследования была оценка остеоиндуктивных свойств покрытий на основе ГАП с разными физико-химическими характеристиками.

В качестве имплантатов использовали образцы, изготовленные из титана марки «ВТ – 6.0» с двумя видами покрытий (образцы созданы в центре наноструктурных материалов и нанотехнологий Белгородского государственного университета). Первый вид покрытия (комбинированное кальций-фосфатное покрытие) был получен путем нанесения наноструктурного ГАП из раствора электролита параллельно с микродуговым оксидированием (толщина слоя 8-10 мкм, диаметр пор 1-3 мкм). Второй вид покрытия (двухслойное композитное покрытие) создавался последовательно. На сформированный способом микродугового оксидирования пористый слой TiO₂ методом золь-гель наносили коллоидный нанодисперсный ГАП (толщина слоя 5-6 мкм, поры отсутствуют). Используемый ГАП в качестве компонента для формирования покрытия имеет наноструктурные размеры кристаллов в электролите и коллоидном растворе: ширина 10-20 нм, длина 100-150 нм.

Для изучения репаративного остеогенеза в области имплантации титановых образцов с ГАП-покрытием применяли методику прямой инокуляции имплантатов в большеберцовую кость лабораторных белых крыс. По истечении 30 дней у животных производили забор кости с вырезом области имплантации. Исследование извлеченных образцов проводили на сканирующем электронном микроскопе (СЭМ) Quanta 200 3D. Из фрагментов костей, оставшихся после извлечения имплантатов изготавливали гистологические препараты, которые изучали при помощи аппаратно-программного комплекса Видео-Тест-Размер (Санкт-Петербург). Для оценки воспалительных и иммунных реакций на внедрение имплантатов проводили определение концентрации С – реактивного белка (СРБ) и интерлейкина-1β (ИЛ-1β) в плазме крови подопытных животных, используя иммуноферментный метод. Достоверность различий оценивали по критерию Стьюдента.

В результате проведенного методом СЭМ исследования установлены различия по соединительнотканной структуре, образовавшимся на поверхности имплантатов в зависимости от способа формирования покрытия. Изучение области контакта имплантат-ткань у образцов с двухслойным композитным покрытием показало наличие новообразованных костных трабекул без «свободных» волокнистых соединительнотканых структур. На имплантатах с комбинированным кальций-фосфатным покрытием выявлены хаотично расположенные фибриллярные структуры,

проникающие в поры, а в местах контакта поверхности имплантата с костью — тонковолокнистые образования и костные трабекулы.

На гистологических препаратах имплантатов с двухслойным композиционным покрытием преобладает новообразованная пластинчатая костная ткань с тонковолокнистыми структурами, тогда как в зоне контакта имплантата с комбинированным кальций-фосфатным покрытием выявлено наличие тонкого слоя рыхлой волокнистой соединительной ткани. Вокруг стенки капсулы за тязом из рыхлой волокнистой соединительной ткани следует слой грубоволокнистой соединительной ткани с полями хрящевой и новообразованной ретикулофиброзной костной ткани. По концентрации СРБ и ИЛ-1 β в плазме крови у крыс контрольной и опытной групп различий не установлено, что свидетельствует об отсутствии воспалительных и иммунных реакций на имплантат.

Проведенное исследование показало, что на изученных типах покрытий имплантатов новообразование костной ткани отличается по типу и скорости формирования структурных элементов кости. На комбинированном кальций-фосфатном покрытии отчетливо прослеживается фазный характер остеогенеза: интенсивное образование волокнистого межклеточного вещества, обусловленное ячеистой структурой ГАП, и замедленное созревание клеточных элементов. Двухслойное композиционное покрытие в те же сроки обеспечивает формирование более зрелой соединительной ткани. Причиной данного феномена является лучшая биодоступность материала покрытия. Свойства комбинированного кальций-фосфатного покрытия можно оценить как преимущественно остеокондуктивные, а двухслойного композиционного — как остеиндуктивные.

ПЕРВЫЕ ДАННЫЕ КЛИНИЧЕСКОГО ПРИМЕНЕНИЯ МАТЕРИАЛА НА ОСНОВЕ СКЕЛЕТА НАТУРАЛЬНОГО КОРАЛЛА СЕМЕЙСТВА АСРОПОРА (НК) ДЛЯ ЗАМЕЩЕНИЯ КОСТНЫХ ДЕФЕКТОВ У БОЛЬНЫХ С ДОБРОКАЧЕСТВЕННЫМИ ПРОЦЕССАМИ КОСТЕЙ

Чиссов В.И., Тепляков В.В., Сергеева Н.С., Мыслевцев И.В., Свиридова И.К., Франк Г.А., Ахмерова Е.Б., Кирсанова В.А., Ахмедова С.А.

ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А.Герцена Росмедтехнологий»,
E-mail: igor@itkm.ru
Москва, Россия

Материалы, используемые для замещения костных дефектов при реконструктивно-пластических операциях в онкологии, имеют ряд признанных недостатков. Так использование аллотрансплантатов чревато переносом инфекционных агентов, а также возможностью их отторжения, применение аутотрансплантатов — требует дополнительного оперативного вмешательства для забора костной ткани. Применяемые синтетические и металлические материалы обладают недостаточной биосовместимостью, а покрытия, увеличивающие их совместимость, как правило, недолговечны.

Цель. Исследование способности НК замещать костный дефект.

Материалы и методы. Перед имплантацией НК выполнялась подготовка: грубая механическая очистка НК; измельчение (планетарная шаровая мельница РМ 200) до микрочастиц (0,2-2,0мм); γ — стерилизация (25 кГр) с последующим бактериологическим контролем. В исследование включено 8 пациентов с доброкачественными (энхондрома — 3, остеобластокластома — 1) и опухолеподобными (костная киста — 4) образованиями костей. У 4 пациентов процесс локализовался в области фаланг пальцев; у 2 — в крыле подвздошной кости и у 2 — в плечевой кости. Всем пациентам произведена внутрикостная резекция образования с замещением дефекта гранулами НК (от 1см³ до 5см³). Рентгенологический контроль производили интраоперационно и далее ежемесячно на протяжении полугода. Результаты и обсуждение. По результатам интраоперационной рентгеноскопии, у всех больных достигнуто равно-

мерное заполнение дефекта гранулами НК. Инфекционные осложнения в послеоперационном периоде зарегистрированы у 1 больной и были купированы консервативно. Через 1 месяц после операции по данным рентгенологического исследования у всех пациентов отмечены признаки резорбции НК по краям дефекта. У 3 пациентов выявлен частичный выход материала в мягкие ткани, с признаками резорбции через 3 месяца. При рентгенологическом исследовании у 1 пациента через 12 мес после операции отмечается практически полное замещение НК костной тканью (сроки наблюдения: 1-12 месяцев). Заключение. Проведенное ограниченное клиническое испытание позволяет рассматривать НК как перспективный биоматериал для замещения костных дефектов при различных патологиях, в том числе в онкологии.

КОМПОЗИЦИОННЫЕ НАНОКЕРАМИЧЕСКИЕ БИОМАТЕРИАЛЫ НА ОСНОВЕ СИСТЕМЫ КАРБОНАТ КАЛЬЦИЯ–ГИДРОКСИАПАТИТ

Смирнов В.В.¹, Гольдберг М.А.¹, Куцев С.В.¹, Сергеева Н.С.², Свиридова И.К.², Кирсанова В.А.², Ахмедова С.А.², Шворнева Л.И.¹, Шибалева Т.В.¹, Гурин А.Н.³, Баринов С.М.¹

¹ Учреждение Российской академии наук
Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН,
² ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»,
³ ФГУ «Центральный научно-исследовательский институт стоматологии и челюстно-лицевой хирургии Росмедтехнологий»,
E-mail: smirnov2007@mail.ru
E-mail: prognos.06@mail.ru
Москва, Россия

Наиболее применяемые на сегодняшний день в инженерии костной ткани гидроксиапатит (ГА) и карбонат-замещенный гидроксиапатит обладают недостаточно высокой скоростью резорбции. Полученные керамические бифазные материалы на основе ГА и более растворимого карбоната кальция (КК) позволят увеличить скорость резорбции биоматериала. Целью данной работы был синтез ряда композиционных порошков на основе системы КК–ГА, определение их фазового состава и морфологии, а также исследование микроструктуры спеченной керамики и проведение эксперимента *in vitro* на модели фибробластов человека (МТТ-тест).

Порошки синтезировали методом осаждения из водных растворов при контролируемом уровне pH 10 с постепенным введением в водный раствор гидроксида кальция растворов фосфата и карбоната аммония. Концентрации растворов определяли из расчета образования конечных соединений системы КК–ГА, содержащих 20, 40, 50, 70 и 80 масс.% КК, что соответствует 12, 24, 30, 42 и 48 масс.% карбонатных групп.

Оценку содержания анионов СО в порошках определяли методом окислительного плавления, который показал, что материалы, с расчетным содержанием КК 20, 40, 50, 70 и 80 масс.% содержали 12,65; 22,6; 29,15; 42,05 и 50,5 масс.% карбонатных групп, соответственно. По данным рентгенофазового анализа, материалы после синтеза характеризовались низкой степенью закристаллизованности, которая увеличивалась с ростом содержания КК, сопровождавшегося уменьшением содержания аморфного ГА. После кальцинации основными фазами были закристаллизованные КК и ГА. Для порошков с 50, 70 и 80 масс.% КК характерно содержание небольшого количества оксида кальция (менее 5%), образующегося в результате разложения КК в процессе кальцинации. Методом низкотемпературной адсорбции азота были определены площади удельной поверхности порошков. Установлено, что $S_{уд}$ резко снижается после прокалывания порошков, также все материалы характеризуются снижением величины площади удельной поверхности с увеличением содержания КК: с 149,1 до 32,81 м²/г для непрокаленных порошков и с 69,5 до 15,3 м²/г — для прокаленных. По данным сканирующей электронной микроскопии материалы состоят из агрегатов размером 3-5 мкм, которые были сформированы частицами размером менее 100 нм. При низком содержании КК (менее

70 масс. %) преобладают частицы округлой формы, а при большем – наблюдаются призматические и стержневидные кристаллы КК. Спекание проводилось с использованием модифицирующей добавки на основе карбоната калия при температуре 720°C в воздушной среде.

Структура спеченной керамики субмикронная, средний размер зерна составляет 50 нм для материалов содержащих 20 и 40 масс. %, при увеличении содержания КК наблюдается появление призматических кристаллов размером до 1 мкм.

Испытания *in vitro* позволили заключить, что все исследуемые образцы не токсичны для клеток, поддерживают адгезию, распластывание и пролиферацию фибробластов человека (рис.).



Рис. Заселение фибробластами человека гранул из материала, содержащего 20 масс. % КК в различные сроки культивирования. МПТ-тест, увеличение $\times 160$.

Таким образом, методом осаждения из растворов были получены новые нанодисперсные бифазные порошки на основе системы гидроксипатит-карбонат кальция, а также получены керамические биоматериалы, которые могут быть использованы в качестве костных имплантатов для восстановления поврежденной костной ткани.

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ грант №08-08-00224а и государственного контракта № 02.513.12.3008.

КОМПЛЕКСНОЕ ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ФАКТОРОВ РОСТА И УГЛЕРОД-УГЛЕРОДИСТЫХ ИМПЛАНТАТОВ В ХИРУРГИЧЕСКОМ ЛЕЧЕНИИ ДЕФЕКТОВ КОСТНОЙ ТКАНИ

Самодай В.Г., Брехов В.Л., Рыльков М.И., Кальчук Е.В.

Воронежская Государственная медицинская академия
им. Н. Н. Бурденко
Воронеж, Россия

Проблема пластики обширных дефектов костной ткани имеет большую историю. Предложенные в различное время разными авторами ксеноматериалы для восполнения дефектов костной ткани либо не «встраиваются» в живую ткань вообще, либо, имея слабую связь с окружающими тканями, не оказывают какого-либо остеоиндуктивного воздействия.

В 1965 г. Marshall R. Urist из Калифорнийского университета впервые применил для стимуляции остеогенеза богатую тромбоцитами аутоплазму (аутоБоТП), как вещество, способствующее увеличению количества остеоиндуктивного морфогенетического белка («BMP – bones morphogenetic protein») в остеогенном пуле. АутоБоТП после лизиса α - гранул тромбоцитов содержит, помимо всего прочего, так называемые факторы роста. Данные вещества («PDGF – platelet derivate growth factor», «VEGF – vessels endothelium growth factor», «TGF – transforming growth factor» и другие) имеют олигопептидную многомерную структуру и относительно продолжительное время первичного воздействия на рецепторы индуцируемых остеогенных клеток-предшественников (ИОКП).

Исходя из этих предпосылок, на кафедрах хирургического профиля ВГМА им. Н.Н. Бурденко нами было проведена работа, имевшая своей целью улучшение результатов хирургического лечения больных с дефектами костной ткани путем внедрения в практику метода стимуляции остео – и хондрогенеза богатой тромбоцитами аутоплазмой и углерод-углеродистых имплантатов «ГАРГО».

Материалы и метода исследования. В основу настоящего исследова-

новения положен анализ хирургического лечения более чем 90 больных с дефектами костной ткани, находившихся на лечении в хирургических отделениях Воронежской областной клинической больницы за период с 2005 по 2009 год, а также 4 случая применения углерод-углеродистых имплантатов «ГАРГО» у больных со значительными остеомиелитическими дефектами. Основную группу составили 50 пациентов с дефектами трубчатых костей и суставного хряща, которым были выполнены оперативные вмешательства с использованием в качестве стимулятора остео – и хондрогенеза аутоБоТП, (из них мужчин – 39 человек, средний возраст – 42 года). Результаты нашей работы оценивались клинически и рентгенологически через 1, 3, 6 и 12 месяцев. Четверым пациентам, у которых металлоконструкции выполняли стабилизирующую функцию, мы вводили аутоБоТП, не открывая места перелома, и получали консолидацию на фоне атрофического ложного сустава. Интегративным показателем результата лечения больных с применением БоТП являлась длительность срока нетрудоспособности, снизившаяся на 18%, а также снижение количества реостеосинтезов в семь раз. Учитывая вышеизложенное, мы пришли к предварительным выводам:

1. Используемая в хирургическом стационаре аутоБоТП, содержащая концентрированный комплекс факторов роста, имеет выраженные остеоиндуктивные и биоадгезивные свойства, позволяющие оптимизировать процессы репаративного остео – и хондрогенеза и сократить сроки лечения.

2. Применение аутоБоТП в комплексе с углерод-углеродистыми имплантатами «ГАРГО», имеющими определенную остеокондуктивность позволяет, в ряде случаев, отказаться от традиционных методов остеопластики.

ВЫСОКОПОРИСТЫЕ КОМПОЗИЦИОННЫЕ МИНЕРАЛ-ПОЛИМЕРНЫЕ НАНОМАТЕРИАЛЫ ДЛЯ ВОССТАНОВЛЕНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

**Федотов А.Ю.¹, Бакунова Н.В.¹, Комлев В.С.¹,
Фадеева И.В.¹, Фомин А.С.¹, Баринов С.М.¹,
Сергеева Н.С.², Свиридова И.К.²,
Кирсанова В.А.², Ахмедова С.А.²**

¹ Учреждение Российской академии наук Институт металлургии и материаловедения им. А.А. Байкова РАН,
² ФГУ «Московский научно-исследовательский онкологический институт им. П.А. Герцена Росмедтехнологий»,
E-mail: smirnov2007@mail.ru
E-mail: prognoz.06@mail.ru
Москва, Россия

Одним из наиболее актуальных направлений в области функциональных материалов является создание матриц, предназначенных для клеточных технологий регенерации костных тканей, поврежденных в результате патологических заболеваний, травм или хирургического вмешательства. Материалы на основе фосфатов кальция, такие как гидроксипатит (ГА), трикальцийфосфат (ТКФ) и карбонат-замещенный ГА (КГА) обладают благоприятными биологическими свойствами: высокой адсорбцией протеинов, повышенной функцией остеокластов и остеобластов – клеток, участвующих в процессе ремоделирования костной ткани, и пониженной функцией конкурирующих клеток, в частности фибробластов, ответственных за формирование соединительной ткани. Следовательно, такие материалы наилучшим образом подходят для создания высокопористой керамики для медицинского назначения. Поры должны быть размером от 100 мкм до 1 мм и взаимосвязанными, что обеспечивает наилучшее проникновение клеток и прорастание тканей и сосудов в имплантат. Однако естественная костная ткань представляет собой композиционный материал из неорганической составляющей (главным образом ГА) и органической компоненты (коллаген типа 1). Нанокристаллы биологического ГА придают кости твердость и жесткость, в то время как волокна коллагена обеспечивают эластичность и высокую трещиностойкость, а также необходимую скорость резорбции и обновления костной тка-

ни. Следовательно, чтобы уменьшить хрупкость и увеличить скорость резорбции имплантата, необходимо создать композиционный материал биополимер – фосфаты кальция. Хитозан рассматривается как наиболее перспективный биополимер для создания таких матриц, так как он обладает такими свойствами как биосовместимость и биорезорбируемость. Также известно, что продукты распада хитозана N-ацетилглюкозамин и глюкозамин не токсичны и могут быть включены в метаболизм глюкозаминогликанов и гликопротеинов. В работе рассматриваются два варианта создания композиционных материалов хитозан – фосфаты кальция: 1) инфильтрацией высокопористого керамического материала суспензией хитозана и 2) вспениванием хитозана с наполнителем из нанопорошков и гранул фосфатов кальция. Так же как и в случае естественной костной ткани, фосфаты кальция придают твердость и жесткость конструкции и необходимые биологические свойства, а биополимер (хитозан) придает эластичность, повышает трещиностойкость и скорость резорбции материала.

Настоящая работа направлена на решение следующих задач: разработка технологии ячеистой керамики с пористостью до 90% на основе фосфатов кальция, изучение их микроструктуры и физико-химических свойств; разработка технологии композиционного материала на основе керамики, инфильтрированной хитозаном; изготовление пористых матриц на основе биополимеров; разработка технологии матриц, армированных наночастицами и гранулами фосфатов кальция; изучение физико-химических свойств композиционных материалов в зависимости от их состава и структуры; изучение биологического поведения композиционных материалов *in vitro* и *in vivo*.

Полученные основные научные результаты:

1) Разработана технология ячеистой керамики методом вакуумной пропитки керамическим шликером полиуретанового каркаса и последующим его выжиганием. Изучено влияние на пористость и механические показатели конечной керамики ряда таких характеристик как состав и концентрация жидкой основы шликера, дисперсность твердой фазы, количество суспензии, пористости полиуретанового каркаса.

2) Разработана технология вакуумной инфильтрации высокопористой суспензией биополимера (хитозан, хитозан-желатин).

3) Разработана технология высокопористых биополимерных матриц составов: хитозан/желатин в ряду 100/0; 90/10; 70/30; 50/50; 30/70; 10/90; 0/100. Технология основана на вспенивании

раствора полимера(ов), фиксации вспененной структуры с последующей сублимационной сушкой. Изучены влияние исходного состава и параметров технологии на структуру биополимера и физико-химические свойства.

4) Разработана технология высокопористых композиционных материалов с матрицей на основе биополимера(ов) армированных наночастицами и гранулами на основе фосфатов кальция. Полученные матрицы обладают взаимосвязанной пористой структурой с пористостью от 80 до 95%.

5) Изучено влияние состава композиционных матриц на физико-химические свойства. Установлено, что с увеличением содержания желатина увеличивается растворимость композиционных матриц, а с увеличением содержания фосфатов кальция падает эластичность материала. Так, например: для матриц без наполнителя эластичность составляет 90%, в случае армирования гранулами КГА (80 об.%) эластичность снижается до 20%.

6) Испытания *in vitro* показали отсутствие цитотоксичности, а также хорошую адсорбцию и пролиферацию фибробластов человека в пористых композиционных матрицах.

7) Испытания *in vivo* показали, что при вживлении композиционных матриц с гранулами КГА в цилиндрический дефект бедренной кости мышей происходит резорбция имплантата и формирование новой костной ткани *de novo*.

Выводы. В результате выполненных исследований развиты физико-химические аспекты технологий нанокристаллической ячеистой керамики и высокопористых композиционных матриц в системе фосфаты кальция – биополимер (хитозан, желатин) двух типов: с керамической матрицей, пропитанной биополимером, и с биополимерной матрицей, армированной наночастицами и гранулами фосфатов кальция. Получены высокопористые композиционные материалы с развитой пористой структурой, обладающие контролируемой скоростью резорбции. Установлено отсутствие цитотоксичности материалов. Показано, что разработанные матрицы обладают контролируемой резорбцией и способны замещаться новообразованной костной тканью.

Работа выполнена в рамках программы ОХИМ РАН «Разработка биологически совместимых материалов на основе продуктов переработки хитинового сырья и неорганических соединений кальция для медицины» и грант Президента РФ МК-4047.2008.3.