

УДК 615.453.3

## ИССЛЕДОВАНИЕ ДИНАМИКИ РЕЗОРБЦИИ В ТРИС-БУФЕРЕ ГРАНУЛ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА, ВОЛЛАСТОНИТА И ЖЕЛАТИНА

© 2023 г. А. П. Солоненко<sup>1</sup>\*, А. Е. Шевченко<sup>1</sup>, Д. А. Полонянкин<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Омский государственный медицинский университет, ул. Ленина, 12, Омск, 644099 Россия

<sup>2</sup>Омский государственный технический университет, пр. Мира, 11, Омск, 644050 Россия

\*e-mail: annsolonenko@gmail.com

Поступила в редакцию 16.09.2022 г.

После доработки 15.12.2022 г.

Принята к публикации 22.12.2022 г.

В ходе исследования *in vitro* установлено, что гранулы на основе желатина и синтетических керамических порошков с варьируемой пропорцией  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и  $\beta\text{-CaSiO}_3$  при контакте с трис-буфером быстро гидратируются и набухают, увеличиваясь в размерах до 1.2 раз. Далее они постепенно деградируют, выделяя в раствор ионы кальция, фосфатные и силикатные анионы. Близкие концентрации данных ионов обнаружены в системах с материалами, содержащими от 20 до 60 мас. % силиката кальция. Показано, что убыль массы композитов за счет растворения минеральных компонентов и желатина выше, чем у гранул только из апатита или волластонита.

**Ключевые слова:** биоматериалы, растворение, гранулированные материалы, фосфаты кальция, силикаты кальция

DOI: 10.31857/S0002337X23030144, EDN: YUHYSG

### ВВЕДЕНИЕ

Синтетический гидроксиапатит (ГА,  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) в определенной степени подобен минеральному веществу костных тканей человека. В этой связи он достаточно долгое время считался наиболее подходящим компонентом материалов для остеопластики. Однако необходимость корректировки малой скорости его растворения обуславливает перспективность создания композитов на основе апатита и более резорбируемых веществ. С этой точки зрения активно изучаются смеси ГА и волластонита (ВТ,  $\beta\text{-CaSiO}_3$ ). Разрабатываются подходы к синтезу названных композитов [1–7], исследуются их свойства, в т. ч. растворимость в модельных жидкостях [3, 7–11] как одна из важнейших характеристик, обеспечивающих возможность постепенной деградации имплантата и его замены нативной костной тканью.

Наиболее часто эксперименты по резорбции материалов проводят с использованием синтетической биологической жидкости [7–11] (simulated body fluid, SBF [12]) и трис-буфера с pH 7.4, близким к кислотности плазмы крови человека [3, 7]. В первом случае, как правило, совместно с растворением компонентов матриц быстро запускаются процессы осаждения на их поверхностях фосфатов кальция (ФК). Так, в статье [7] сообщается,

что керамики, содержащие более 30 мас. % ВТ (остальное – ГА), уже через 1 сут контакта с SBF полностью покрываются плотным слоем апатита, который экранирует основной объем материала от окружающей среды и тормозит растворение его компонентов. Таким образом, для изучения растворимости и динамики деградации материалов в качестве модельной жидкости предпочтительно использование трис-буфера, изначально не содержащего осадкообразующих ионов и веществ.

Также стоит отметить, что в экспериментах по резорбции композитов ГА и ВТ, как правило, используют плотные прессовки или пористые матриксы в виде дисков, пластин, блоков, цилиндров. Подобные объемные структуры не всегда удобны для клинического применения и имплантации в место костного дефекта. Гораздо более универсальны гранулированные материалы, которыми могут быть заполнены полости различных форм и размеров.

Ранее авторами настоящей статьи разработан одностадийный способ получения порошковых композитов с варьируемым содержанием ГА и ВТ (Патент РФ № 2657817) и установлены условия формования из них сферических гранул [13].

Цель данной работы – сравнительное исследование динамики резорбции в трис-буфере грану-

**Таблица 1.** Характеристики исследуемых материалов

| ГА/ВТ*, мас. % | $W_{\text{МС}}$ , мас. % | $W_{\text{жел}}$ , мас. % | $HV_{0.02}$ , МПа | П, %       |
|----------------|--------------------------|---------------------------|-------------------|------------|
| 100/0          | $91.5 \pm 0.2$           | $6.76 \pm 0.21$           | $17.6 \pm 0.5$    | $43 \pm 1$ |
| 80/20          | $77.6 \pm 1.1$           | $18.4 \pm 0.7$            | $17.0 \pm 0.4$    | $41 \pm 3$ |
| 60/40          | $77.1 \pm 4.3$           | $18.7 \pm 0.5$            | $22.2 \pm 0.4$    | $52 \pm 2$ |
| 40/60          | $76.6 \pm 5.3$           | $20.4 \pm 0.3$            | $24.1 \pm 0.3$    | $55 \pm 3$ |
| 20/80          | $79.9 \pm 2.9$           | $14.2 \pm 1.0$            | $22.7 \pm 0.4$    | $50 \pm 4$ |
| 0/100          | $82.8 \pm 0.8$           | $15.4 \pm 0.7$            | $16.9 \pm 0.4$    | $53 \pm 4$ |

Примечание.  $W_{\text{МС}}$  и  $W_{\text{жел}}$  – массовые доли минеральной составляющей (ГА и ВТ) и желатина в гранулах,  $HV$  – микротвердость по Виккерсу, П – открытая пористость.

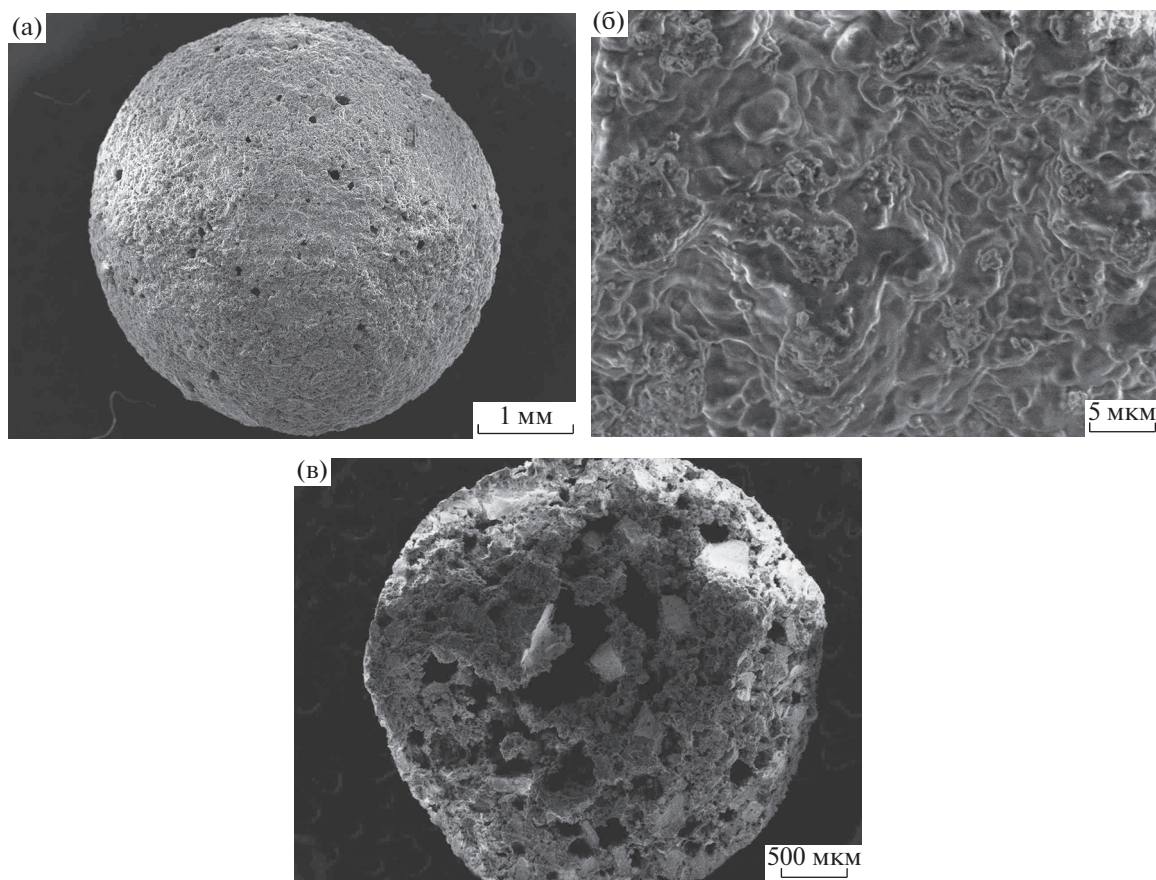
\* В керамическом порошке, взятом для синтеза гранул.

лированных материалов с различным соотношением  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  и  $\beta\text{-CaSiO}_3$ , со связующим биополимером желатином.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Гранулы для исследования получали по суспензионной технологии [13, 14] из синтетических керамических порошков, содержащих от 0 до 100 мас. % ГА в смеси с ВТ, и водного раствора

желатина (марка П-11, РусХим). Макроскопически опытные образцы представляли собой набор сфер белого цвета с диаметром до 5 мм (преобладающая фракция с размерами 1–2 мм) и микротвердостью не менее 17 МПа (табл. 1). Они содержали до 20 мас. % желатина. Остальное приходится на минеральные компоненты (ГА и ВТ), смешанные в различных пропорциях. Гранулы имели шероховатую поверхность и пористость около 50% (рис. 1, табл. 1).



**Рис. 1.** Микрофотографии внешней поверхности (а, б) и внутренней структуры (в) гранул с пропорцией ГА/ВТ 40/60.

Набухание гранул оценивали при выдерживании 0.2 г образца заданного состава в 3 мл трис-буфера при комнатной температуре в статичных условиях. После истечения заданного времени (от 5 мин до 3 сут) и удаления жидкой фазы измеряли массу образцов. Степень набухания ( $S$ ) рассчитывали по формуле:  $S = [(S_\tau - S_0)/S_0] \times 100\%$ , где  $S_0$  и  $S_\tau$  – масса гранул до начала эксперимента и через время  $\tau$  соответственно [15]. Изменение формы и размеров частиц в результате набухания контролировали на микроскопе “Микромед 3 (вар. 3-20М)” (Наблюдательные приборы), используя программу TourView для обработки изображений.

Для изучения динамики резорбции в трис-буфере отбирали фракцию гранул с диаметрами 1–2 мм. Исследования выполняли при соотношении твердое : жидкое = 1 : 50 г/мл, при комнатной температуре в статичных условиях, в трехкратной повторности. В заданные периоды времени (от 1 до 28 сут) отбирали аликвоты жидкой фазы для определения концентраций ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $\text{SiO}_3^{2-}$ . С целью обеспечения постоянства объема в изучаемую систему добавляли порцию свежего трис-буфера, по объему равную его части, взятой на анализ. По окончании эксперимента гранулы отфильтровывали, промывали дистиллированной водой и высушивали на воздухе. Нерастворившуюся часть образцов взвешивали, рассчитывали потерю массы и исследовали физико-химическими методами.

Концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $\text{SiO}_3^{2-}$  в изучаемых растворах определяли по спектрофотометрическим методикам: кальций – по реакции с Арсеназо III в щелочной среде, фосфаты – УФ-методом по образованию в кислой среде фосфорно-молибденового комплекса, силикаты – по желтой форме молибдохремниевой кислоты [16]. Результаты анализов статистически обрабатывали с применением критерия Стьюдента.

Рентгенофазовый анализ (РФА) выполняли на дифрактометре XRD-7000 (Shimadzu). Расшифровку дифрактограмм проводили в программном комплексе Slevе+ с использованием базы данных ICDD PDF-4+ 2022 г. ИК-спектры поглощения гранул регистрировали на ИК-Фурье-спектрометре ФТ-801 (Simex) с помощью программы Zair 3.5 (Simex). Образцы готовили прессованием в таблетки с КВг. ИК-спектры записывали в области от 4000 до 500  $\text{см}^{-1}$ . Термогравиметрический анализ (ТГА) проводили на синхронном термическом анализаторе STA-449C (NETZSCH). Образцы прокаливали на воздухе со скоростью нагрева 10°С/мин. По данным ТГА рассчитывали содержа-

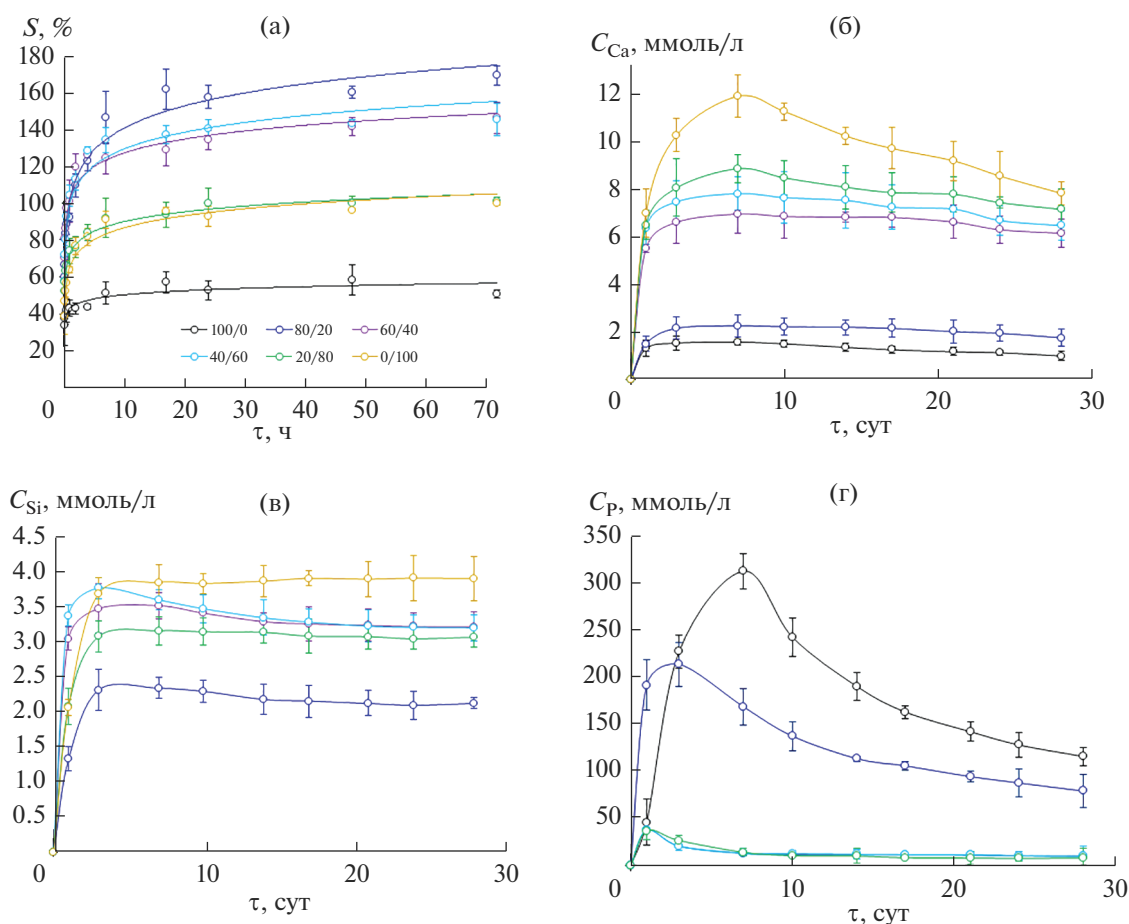
ние желатина в исходных образцах и нерастворившейся части материалов. Морфологию гранул изучали методом сканирующей электронной микроскопии на электронном микроскопе JCM-5700 (JEOL).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При выдерживании гранул в трис-буфере происходит их набухание, масса материалов увеличивается во времени (рис. 2а). Наибольший прирост происходит в первый час контакта частей системы. Очевидно, это связано с заполнением жидкой фазой пор во внутренней структуре частиц и набуханием желатина. Подтверждением этому служат образование воздушных пузырьков на поверхности сфер, а также наблюдаемое при микроскопическом исследовании увеличение их размеров (до 20%). Степень набухания ( $S$ ) коррелирует с содержанием желатина в материалах (табл. 1) и для всех образцов через 7 ч слабо изменяется. Вероятно, в данный период завершается формирование на поверхности гранул гидратированного слоя и запускаются процессы ионного обмена между твердой фазой и раствором. Об этом свидетельствует появление в системах ионов  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{PO}_4^{3-}$  и  $\text{SiO}_3^{2-}$  (рис. 2б–2г). Их концентрации увеличиваются в течение первых 3–7 сут контакта образцов со средой. Далее измеряемая величина либо выходит на плато, либо монотонно уменьшается.

Из рис. 2 видно, что текущие концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  значительно превышают количества анионов. Это может быть связано с тем, что, согласно представлениям о химизме деградации фосфатов и силикатов кальция в водных средах [17, 18], ионы кальция первыми выделяются в раствор при гидратации поверхности солей. Кроме того, растворяясь,  $\beta\text{-CaSiO}_3$  и  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  одновременно выступают в качестве источника кальция. На большую скорость резорбции ВТ указывают более высокие концентрации ионов  $\text{SiO}_3^{2-}$  в системах по сравнению с  $\text{PO}_4^{3-}$  (рис. 2в, 2г). Это в свою очередь обусловлено большей растворимостью фазы  $\beta\text{-CaSiO}_3$  ( $\text{ПР} = 2.5 \times 10^{-8}$  [19],  $s = 1.6 \times 10^{-4}$  моль/л) относительно апатита ( $\text{ПР} = 1.58 \times 10^{-117}$  [20],  $s = 4.6 \times 10^{-8}$  моль/л).

Текущие концентрации кальция в растворах возрастают по мере повышения содержания ВТ в образцах (рис. 2б). Минимальные количества  $\text{Ca}^{2+}$  зафиксированы в системе с гранулами из ГА, максимальные – с материалами из ВТ. В растворах с композитами обнаруживаются промежуточные количества ионов металла, однако они увеличиваются неравномерно. Наибольший рост кон-



**Рис. 2.** Зависимости степени набухания (а), концентраций ионов кальция (б), силикат-ионов (в) и фосфат-ионов (г) от времени выдерживания в трис-буфере гранул с различной пропорцией ГА/ВТ.

центрации кальция в системах наблюдается при повышении доли ВТ с 20 до 40 мас. % ( $\Delta C_{Ca} \approx 4$  мМ). Чуть меньший разрыв ( $\Delta C_{Ca} \approx 3$  мМ) отмечается между кривыми  $C(Ca^{2+}) = f(\tau)$ , полученными для гранул с пропорцией ГА/ВТ 20/80 и 0/100, при  $\tau = 7$  сут. Далее он сокращается за счет снижения концентрации ионов металла в системе с образцом из  $\beta\text{-CaSiO}_3$ , что может происходить в результате обратной сорбции  $Ca^{2+}$  поверхностным гидратированным слоем.

В случае силикатов наименьшие концентрации ионов обнаруживаются в растворах, контактировавших с гранулами с пропорцией ГА/ВТ 80/20, наибольшие – с материалами из ВТ (рис. 2в). При повышении доли  $\beta\text{-CaSiO}_3$  в образце количества анионов в системах изменяются немонотонно. Так, в средах с композитом ГА/ВТ 20/80 силикат-ионов меньше, чем в случае соотношений 60/40 и 40/60. Вероятно, это связано с быстрым ионным обменом и гидратацией богатого ВТ материала с образованием на его поверхности слоя силикаге-

ля [18], который затрудняет дальнейшее активное растворение минеральных компонентов гранул.

Фосфат-ионы в количестве до 313 и 214 мкМ обнаруживаются в системах с гранулами из ГА и его композитом с 20 мас. % ВТ соответственно (рис. 2г). При достижении данных значений концентрация  $PO_4^{3-}$  снижается, очевидно, в результате начала осаждения аморфного ФК. Данное предположение подтверждается слабым ниспадающим трендом зависимостей  $C(Ca^{2+}) = f(\tau)$ , полученных для растворов, контактировавших с апатит-содержащими образцами, при  $\tau > 7$  суток (рис. 2б). По-видимому, значительного уменьшения содержания катионов в системах не происходит из-за продолжающейся резорбции ВТ. Зависимости  $C(PO_4^{3-}) = f(\tau)$ , полученные для композитов с пропорциями ГА/ВТ 60/40, 40/60 и 20/80, фактически идентичны. Они также проходят через максимум, не превышающий 40 мкМ  $PO_4^{3-}$ , и к 10 сут выходят на плато при  $C(PO_4^{3-}) = 10$  мкМ.

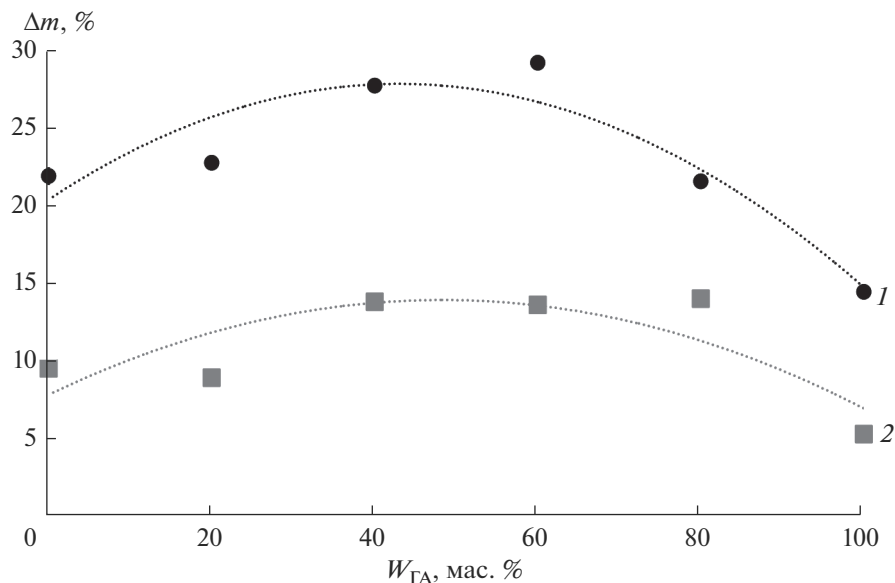


Рис. 3. Зависимости общей убыли массы гранул в процессе их выдерживания в трис-буфере (1) и содержания в них желатина (2) от доли ГА.

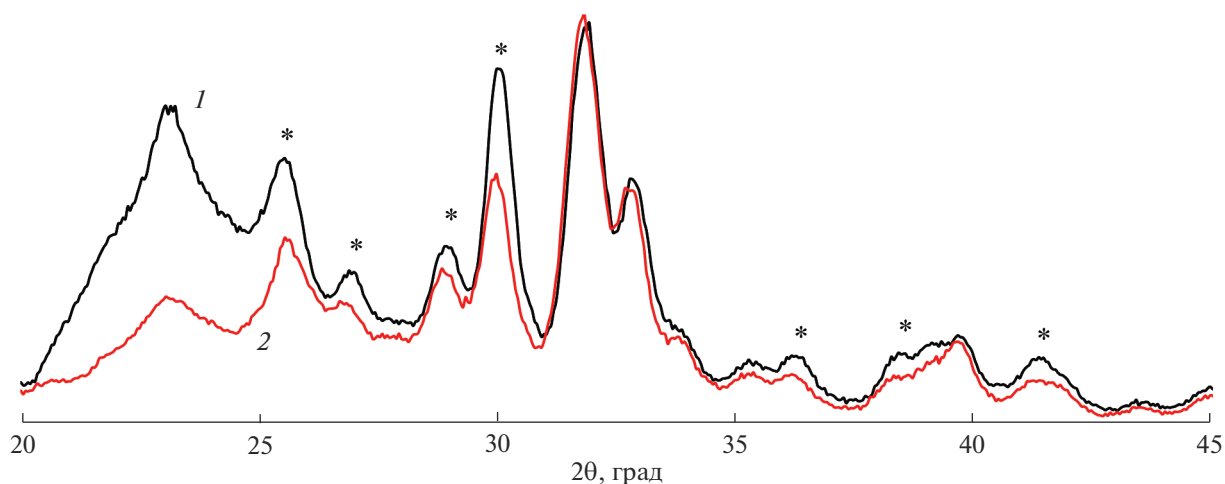


Рис. 4. Дифрактограммы гранул с пропорцией ГА/ВТ 40/60 до (1) и после выдерживания в трис-буфере (2); звездочками отмечены пики ВТ, снижение интенсивности которых наблюдается в эксперименте.

Таким образом, установленные изменения состава растворов указывают на то, что все исследуемые материалы при контакте с трис-буфером быстро гидратируются и постепенно растворяются, выделяя в раствор  $Ca^{2+}$ ,  $SiO_3^{2-}$  и  $PO_4^{3-}$ . Более высокие текущие концентрации силикат-ионов в системах (относительно фосфатов) свидетельствуют о большей скорости резорбции ВТ в сравнении с апатитом. Снижение количества  $PO_4^{3-}$  со временем происходит, вероятно, в результате осаждения аморфного ФК. Также отмечено, что ком-

позиты с пропорцией ГА/ВТ 60/40, 40/60 и 20/80 при выдерживании в трис-буфере ведут себя схожим образом, демонстрируя близкие значения текущих концентраций  $Ca^{2+}$ ,  $SiO_3^{2-}$  и  $PO_4^{3-}$ .

Установлено, что в ходе эксперимента гранулы теряют до 30% массы (рис. 3). В сравнении с материалами из чистых веществ композиты на основе ГА и ВТ растворяются в большей степени. Для них зафиксированы большие потери массы за счет как растворения желатина, так и резорбции минеральных компонентов.

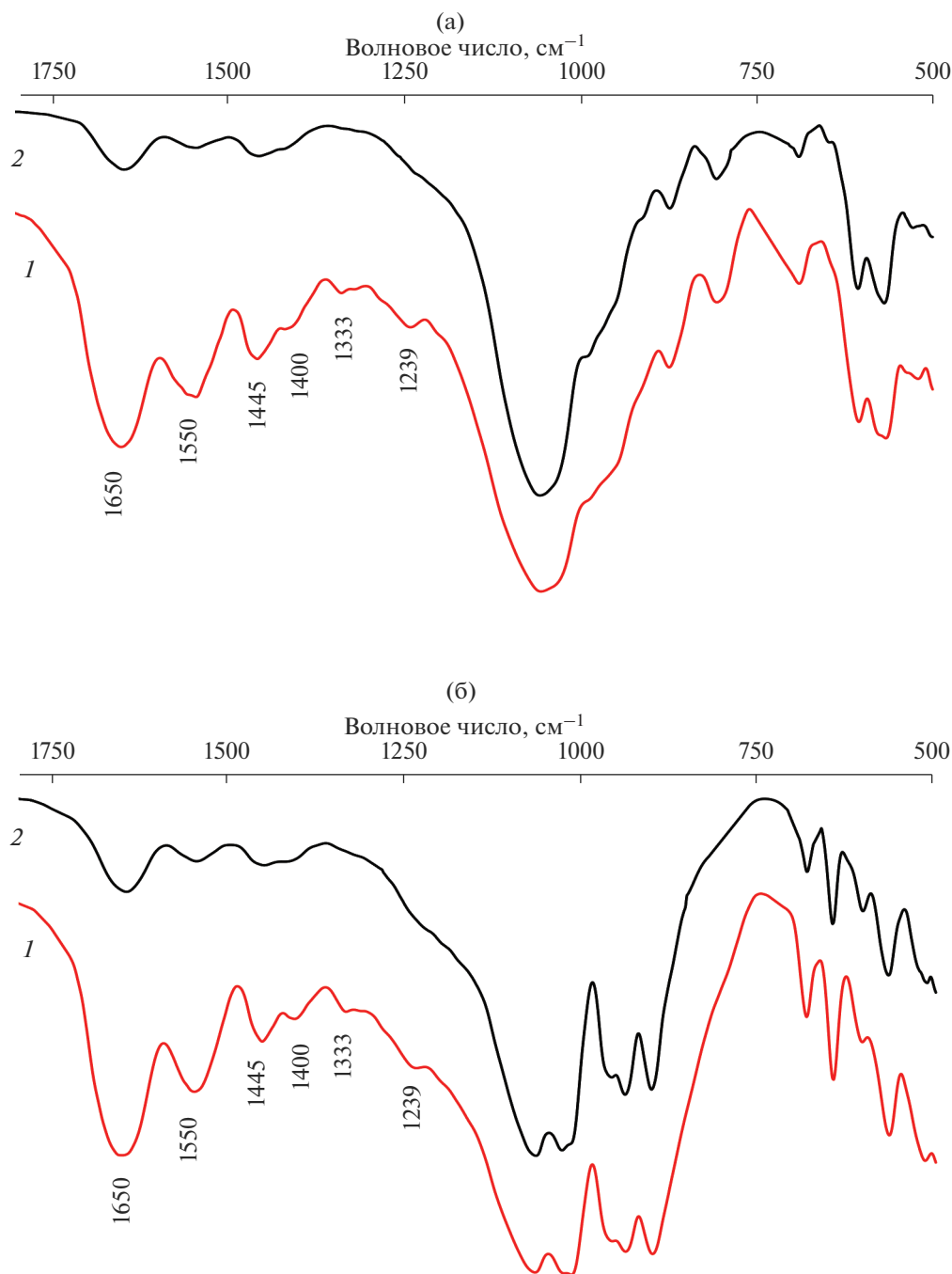


Рис. 5. ИК-спектры гранул с пропорцией ГА/ВТ 60/40 (а), 20/80 (б) до (1) и после (2) выдерживания в трис-буфере.

Сделанное ранее предположение о более активной резорбции ВТ подтверждается данными РФА. При сравнении дифрактограмм исходных гранул и извлеченных из трис-буфера через 28 сут заметно уменьшение интенсивности пиков  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub> (рис. 4), тогда как рефлексы ГА фактически не изменяются. Меньшую высоту имеет и пологий пик в области 20°–27°, вероятно,

указывающий на присутствие в составе материалов аморфной фазы желатина.

О снижении содержания органического компонента в гранулах в процессе их выдерживания в трис-буфере однозначно свидетельствуют результаты исследования методом ИК-Фурье-спектроскопии (рис. 5). Так, в спектрах исходных образцов проявляются интенсивные полосы в области

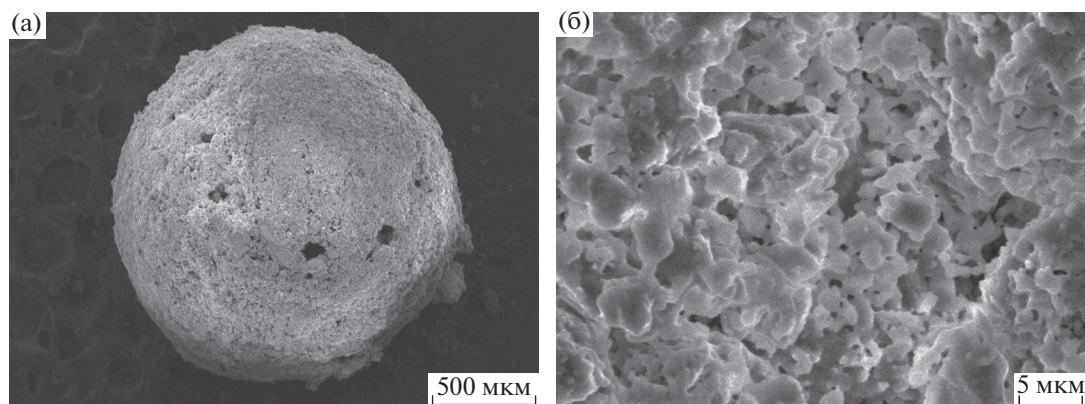


Рис. 6. Микрофотографии гранул (а) и их поверхности (б) после выдерживания в трис-буфере.

1240–1450  $\text{cm}^{-1}$ , вызванные колебаниями карбоксильных группировок в желатине I типа; максимум при 1550  $\text{cm}^{-1}$ , отвечающий деформационным колебаниям связей N–H в амиде II; и пик при 1650  $\text{cm}^{-1}$ , вызванный деформационными колебаниями связей N–H и валентными колебаниями связей C=O и O–H [21]. В спектрах нерастворившейся части гранул названные полосы поглощения значительно менее выражены.

В результате удаления желатина из состава материалов их микроструктура становится более пористой (рис. 6). На поверхности гранул появляется множество выступов, углублений и пор различных размеров. Просматриваются границы отдельных керамических частиц, которые в исходных образцах сглажены покрывающим их слоем полимера (рис. 16).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

По результатам исследования динамики резорбции в трис-буфере гранул на основе ГА, ВТ и желатина установлено, что в первые часы контакта твердой и жидкой фаз активно протекают гидратация поверхности материалов и набухание органической составляющей. В результате частицы увеличиваются в размерах до 20%. Далее запускаются процессы ионного обмена и в раствор переходят ионы кальция, фосфаты и силикаты из состава минеральных компонентов образцов. По данным химического анализа и РФА,  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub> деградирует активнее Ca<sub>10</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>6</sub>(OH)<sub>2</sub>. В период эксперимента все материалы теряют до 80% исходного количества желатина. Для композитов зафиксированы большие потери массы за счет как растворения органической составляющей, так и резорбции минеральных компонентов по сравнению с образцами из ГА или ВТ. При этом гранулы с пропорциями ГА/ВТ 60/40, 40/60 и 20/80 при выдержива-

нии в трис-буфере ведут себя схожим образом, демонстрируя близкие значения концентраций Ca<sup>2+</sup>, SiO<sub>3</sub><sup>2-</sup> и PO<sub>4</sub><sup>3-</sup>.

Полученные экспериментальные данные указывают на возможность постепенной деградации гранул на основе ГА, ВТ и желатина с последующей заменой нативной костной тканью и, следовательно, перспективность их применения в качестве остеопластических материалов.

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Morsy R., Abuelkhair R., Elnimr T. A Facile Route to the Synthesis of Hydroxyapatite/Wollastonite Composite Powders by a Two-Step Coprecipitation Method // *Silicon*. 2015. V. 9. P. 637–641. <https://doi.org/10.1007/s12633-015-9339-y>
2. Baştan F.E., Karaarslan O., Üstel F. Production and Characterization of Wollastonite Particles Reinforced Hydroxyapatite Composite Granules for Biomedical Applications // *DEU FMD*. 2021. V. 23(67). P. 1–9. <https://doi.org/10.21205/deufmd.2021236701>
3. Padmanabhann S.K., Gervaso F., Carozzo M., Scalera F., Sannino A., Licciulli A. Wollastonite/Hydroxyapatite Scaffolds with Improved Mechanical, Bioactive and Biodegradable Properties for Bone Tissue Engineering // *Ceram. Int.* 2013. V. 39. P. 619–627. <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2012.06.073>
4. Buriti J. da S., Barreto M.E.V., Santos K.O., Fook M.V.L. Thermal, Morphological, Spectroscopic and Biological Study of Chitosan, Hydroxyapatite and Wollastonite Biocomposites // *J. Therm. Anal. Calorim.* 2018. V. 134. P. 1521–1530. <https://doi.org/10.1007/s10973-018-7498-y>
5. Yu H., Ning C., Lin K., Chen L. Preparation and Characterization of PLLA/CaSiO<sub>3</sub>/Apatite Composite Films // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2012. V. 9. P. 133–142. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7402.2010.02606.x>
6. Encinas-Romero M.A., Aguayo-Salinas S., Castillo S.J., Castillon-Barraza F.F., Castano V.M. Synthesis and Characterization of Hydroxyapatite-Wollastonite Com-

- posite Powders by Sol–Gel Processing // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2008. V. 5. P. 401–411.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7402.2008.02212.x>
7. *Lin K., Zhang M., Zhai W., Qu H., Chang J.* Fabrication and Characterization of Hydroxyapatite/Wollastonite Composite Bioceramics with Controllable Properties for Hard Tissue Repair // *J. Am. Ceram. Soc.* 2011. V. 94. P. 99–105.  
<https://doi.org/10.1111/j.1551-2916.2010.04046.x>
  8. *Encinas-Romero M.A., Aguayo-Salinas S., Valenzuela-Garcia J.L., Payan S.R., Castillon-Barraza F.F.* Mechanical and Bioactive Behavior of Hydroxyapatite-Wollastonite Sintered Composites // *Int. J. Appl. Ceram. Technol.* 2010. V. 7. P. 164–177.  
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7402.2009.02377.x>
  9. *Ryu H.S., Lee J.K., Kim H., Hong K.S.* New Type of Bioactive Materials: Hydroxyapatite/ $\alpha$ -Wollastonite Composites // *J. Mater. Res.* 2005. V. 20. P. 1154–1162.  
<https://doi.org/10.1557/JMR.2005.0144>
  10. *Chen Z., Zhai J., Wang D., Chen C.* Bioactivity of Hydroxyapatite/Wollastonite Composite Films Deposited by Pulsed Laser // *Ceram. Int.* 2018. V. 44. № 9. P. 10204–10209.  
<https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2018.03.013>
  11. *Beheri H.H., Mohamed K.R., El-Bassouini G.T.* Mechanical and Microstructure of Reinforced Hydroxyapatite/Calcium Silicate Nano-composites Materials // *Mater. Design.* 2013. V. 44. P. 461–468.  
<https://doi.org/10.1016/j.matdes.2012.08.020>
  12. *Kokubo T., Takadama H.* How Useful is SBF in Predicting in vivo Bone Bioactivity? // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 2907–2915.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2006.01.017>
  13. *Shevchenko A.E., Solonenko A.P., Blesman A.I., Polonyankin D.A., Chikanova E.S.* Synthesis and Physicochemical Investigation of Hydroxyapatite and Wollastonite Composite Granules // *J. Phys.: Conf. Ser.* 2021. V. 1791. P. 012119.  
<https://doi.org/10.1088/1742-6596/1791/1/012119>
  14. *Komlev V.S., Barinov S.M., Koplík E.V.* A Method to Fabricate Porous Spherical Hydroxyapatite Granules Intended for Time-controlled Drug Release // *Biomaterials.* 2002. V. 23. P. 3449–3454.  
[https://doi.org/10.1016/S0142-9612\(02\)00049-2](https://doi.org/10.1016/S0142-9612(02)00049-2)
  15. *Hasan M.L., Padalhin A.R., Kim B., Lee B.-T.* Preparation and Evaluation of BCP-CSD-Agarose Composite Microsphere for Bone Tissue Engineering // *J. Biomed. Mater. Res. B.* 2019. V. 9999B. P. 1–10.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.b.34318>
  16. РД 52.24.433-2005. Массовая концентрация кремния в поверхностных водах суши. Методика выполнения измерений фотометрическим методом в виде желтой формы молибдодокремниевой кислоты. 2005.
  17. *Dorozhkin S.V.* Dissolution Mechanism of Calcium Apatites in Acids: A Review of Literature // *World J. Methodol.* 2012. V. 26. № 2(1). P. 1–17.  
<https://doi.org/10.5662/wjm.v2.i1.1>
  18. *Niu L., Jiao K., Wang T., Zhang W., Camilleri J., Bergeron B.E., Feng H., Mao J., Chen J., Pashley D.H., Tay F.R.* A Review of the Bioactivity of Hydraulic Calcium Silicate Cements // *J. Dent.* 2014. V. 42. № 5. P. 517–533.  
<https://doi.org/10.1016/j.jdent.2013.12.015>
  19. *Ni S., Lin K., Chang J., Chou L.*  $\beta$ -CaSiO<sub>3</sub>/ $\beta$ -Ca<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub> Composite Materials for Hard Tissue Repair: In vitro Studies // *J. Biomed. Mater. Res. A.* 2008. V. 85, № 1. P. 72–82.  
<https://doi.org/10.1002/jbm.a.31390>
  20. *Вересов А.Г., Путляев В.И., Третьяков Ю.Д.* Химия неорганических биоматериалов на основе фосфатов кальция // *РХЖ.* 2004. Т. 48. № 4. С. 52–64.
  21. *Hossana M.J., Gafurb M.A., Kadirb M.R., Karima M.M.* Preparation and Characterization of Gelatin-Hydroxyapatite Composite for Bone Tissue Engineering // *IJET-IJENS.* 2014. V. 14. № 1. P. 24–32.