

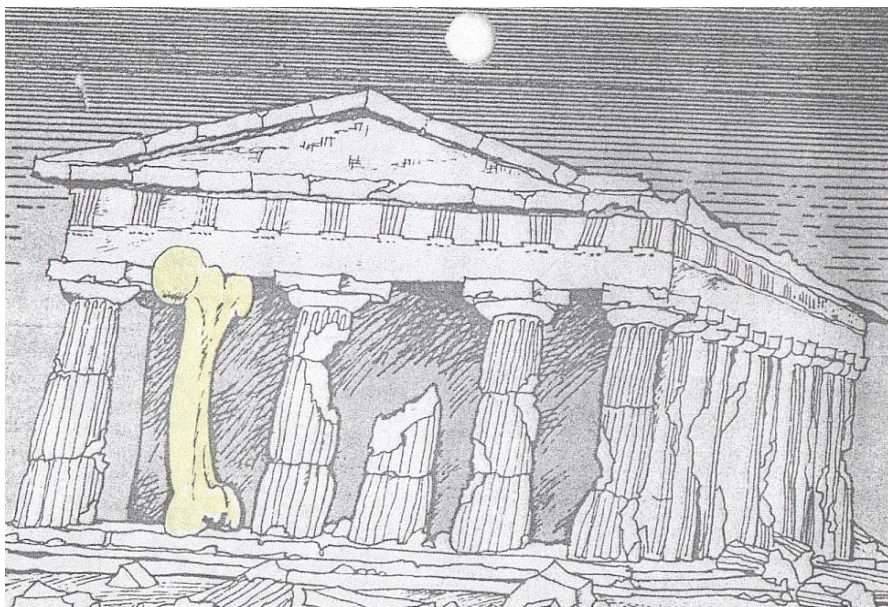
Апатит-біополімерні матеріали та покриття для біомедицини

(стан та перспективи досліджень
у лабораторії «Біонанокомпозит» СумДУ)

Монографія

За загальною редакцією

чл.-кор. НАНУ Л. Ф. Суходуба



*Міністерство освіти і науки України
Міністерство охорони здоров'я України
Сумський державний університет*

Апатит-біополімерні матеріали та покриття для біомедицини

(стан та перспективи досліджень
у лабораторії «Біонанокомпозит» СумДУ)

Монографія

За загальною редакцією

чл.-кор. НАНУ Л. Ф. Суходуба

Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету

*Суми
Сумський державний університет
2015*

УДК 577.3:615.32

ББК 28.071

A76

Авторський колектив:

Л. Ф. Суходуб, доктор фізико-математичних наук, професор,
член-кореспондент НАНУ;

Л. Б. Суходуб, кандидат хімічних наук,
старший науковий співробітник;

Г. О. Яновська, кандидат хімічних наук;

І. В. Чорна, кандидат біологічних наук, доцент

Рецензенти:

В. С. Токарев – доктор хімічних наук, старший науковий
співробітник, професор Національного університету «Львівська політехніка»;

О. В. Атаман – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри
фізіології і патофізіології з курсом медичної біології Медичного інституту
Сумського державного університету;

В. З. Сікора – доктор медичних наук, професор, завідувач кафедри
анатомії людини Медичного інституту Сумського державного університету

*Рекомендовано до видання вченою радою
Сумського державного університету
(протокол № 6 від 18 грудня 2014 року)*

76 **Апатит-біополімерні матеріали та покриття для біомедицини (стан
та перспективи досліджень у лабораторії «Біонанокомпозит» СумДУ) :**
монографія / *Л. Ф. Суходуб, Л. Б. Суходуб, Г. О. Яновська,
І. В. Чорна* ; за заг. ред. чл.-кор. НАНУ *Л. Ф. Суходуба*. – Суми :
Сумський державний університет, 2015. – 251 с.

ISBN 978-966-657-585-5

У монографії наведено результати досліджень у лабораторії СумДУ
«Біонанокомпозит» у напрямку створення новітніх апатит-біополімерних матеріалів та
покриттів для біомедичного застосування. Розглянуто методи синтезу та аналізу будови і
фізико-хімічних властивостей одержаних зразків композитних біоматеріалів.

Для студентів вищих медичних навчальних закладів III–IV рівнів акредитації,
аспірантів і науковців, які спеціалізуються в галузях біофізики, біохімії, фізики, фізіології,
ортопедії та стоматології.

УДК 577.3:615.32

ББК 28.071

© Суходуб Л. Ф., Суходуб Л. Б.,
Яновська Г. О., Чорна І. В., 2015

ISBN 978-966-657-585-5

© Сумський державний
університет, 2015

ЗМІСТ

С.

Перелік умовних позначень та скорочень.....	7
Поради студентам від редактора монографії.....	8
Мотивація.....	10
1. Біомінералізація кісткової тканини.....	15
1.1. Структура та фізико-хімічні аспекти кісткової тканини.....	15
1.2. Характеристика мінеральної фази кісткової тканини.....	20
1.3. Характеристика органічної фази кісткової тканини.....	21
1.4. Порівняльна характеристика структури біоapatиту та синтетичних кальцій-фосфатів.....	26
1.5. Синтетичний гідроксилапатит та його катіон-заміщені аналоги. Вплив іонів металів на основні характеристики ГА...	31
2. Біоміметичні технології синтезу кальцій-фосфатних біоматеріалів.....	34
2.1. Розроблення методики синтезу дрібнодисперсних форм нанокристалічного гідроксилапатиту.....	34
2.2. Розроблення методики синтезу наноструктурованого карбонат апатиту.....	36
2.3. Визначення кристалічної структури отриманих зразків методом рентгенівської дифракції.....	43
2.4. Визначення складу отриманих зразків методом мас-спектрометрії.....	46
2.5. Використання п'езографіметрії для отримання ізотерм гідратації.....	48
2.6. Аналіз отриманих зразків методом інфрачервоної спектроскопії.....	49
2.7. Використання растрової електронної мікроскопії для визначення морфології поверхні.....	49
3. Структура катіон-заміщених кальцій-фосфатів.....	50

3.1. Вплив іонів титану на формування кальцій-фосфатної фази.....	51
3.2. Вплив іонів кобальту на формування кальцій-фосфатної фази.....	56
3.3. Вплив іонів ванадію на формування кальцій-фосфатної фази.....	58
3.4. Вплив іонів хрому на формування кальцій-фосфатної фази.....	60
3.5. Вплив іонів алюмінію на формування кальцій-фосфатної фази.....	62
3.6. Ідентифікація кальцій-фосфатних біоматеріалів із використанням плазмово-десорбційної мас-спектрометрії.....	67
4. Розроблення методики синтезу композиту на основі кальцій-фосфатів та біополімерів (хітозан, альгінат).....	74
4.1. Хітозан (фізико-хімічні, спектральні властивості).....	81
4.2. Альгінат (фізико-хімічні, спектральні властивості).....	83
4.3. Хітозан та альгінат у кістковій тканинній інженерії.....	86
4.3.1. Хітозан-кальцій-фосфатні композити.....	87
4.3.2. Хітозан-альгінат-гідроксилапатитні (ХЗ-АЛ-ГА) композити.....	89
4.3.3. Антибактеріальні властивості ХЗ-АЛ-ГА композитів.....	91
4.3.4. Хітозан-металеві комплекси.....	92
5. In vivo дослідження.....	93
6. Кальцій-фосфатні покриття для медичних імплантатів.....	99
6.1. Матеріали для медичних імплантатів.....	99
6.2. Огляд існуючих методів нанесення покриттів на металеві субстрати.....	107
6.3. Внесення хітозану до складу покриттів.....	110
6.4. Осадження покриттів з додаванням срібла.....	113
6.5. Основні характеристики покриттів для медичних імплантатів.....	115

6.6. Поведінка імплантатів у модельних системах та організмі.....	118
6.7. Формування покриттів ГА методом термодепозиції (МТД) на титанових субстратах.....	122
6.7.1. Установка для осадження покриттів методом термодепозиції.....	122
6.7.2. Особливості формування покриттів ГА методом термодепозиції.....	124
6.7.3. Особливості морфології та структури покриттів ГА, отриманих у магнітному полі.....	134
6.8. Вплив фізичної та хімічної обробки субстратів на властивості та характеристики покриттів на основі ГА.....	137
6.8.1. Обробка субстратів методом іонної імплантації.....	137
6.8.2. Дослідження морфології та фазового складу покриттів, отриманих на хімічно оброблених субстратах.....	140
6.9. Оцінка властивостей покриттів ГА та їх розчинності в рідинах, що імітують мінеральний склад плазми крові.....	148
6.10. Оцінка адгезії покриттів, отриманих на попередньо оброблених субстратах.....	152
6.11. Формування покриттів ГА на магнієвих субстратах методом занурення.....	153
6.11.1. Модифікування поверхні магнієвих субстратів.....	153
6.11.2. Дослідження морфології та фазового складу покриттів, отриманих під впливом магнітного поля.....	154
6.11.3. Аналіз процесів кристалізації, що відбуваються у розчині під час осадження кальцій-фосфатних покриттів на магнієві субстрати.....	174
6.11.4. Оцінка адгезії кальцій-фосфатних покриттів та їх розчинності в SBF.....	179
6.12. Покриття на основі ГА та срібла з додаванням хітозану.....	184

6.12.1. Хітозан-ГА – покриття на титанових субстратах, отримані методом термодепозиції.....	184
6.12.2. Формування хітозан-ГА покриттів з додаванням Ag.....	199
6.12.3. Дослідження антибактеріальної активності отриманих покриттів.....	209
7. Стратегія формування імплантатів на основі ортофосфатів кальцію для біомедичного застосування.....	212
Висновки та перспективи подальших досліджень.....	213
Перелік власних (Scopus) публікацій із короткими анотаціями.....	214
Список літератури.....	220

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ ПОЗНАЧЕНЬ ТА СКОРОЧЕНЬ

БА	біологічний апатит
ГА	гідроксилапатит $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
сГА	стехіометричний гідроксилапатит з молярним співвідношенням $\text{Ca/P} = 1,67$
ІЧ-спектроскопія	інфрачервона спектроскопія
МСБХ	мас-спектрометр біохімічний
Са-Р	фосфат кальцію
α, β –ТКФ	α, β -модифікації ортофосфату кальцію $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$
ЯМР	ядерний магнітний резонанс
XRD	рентгенівська дифракція
JCPDS	(<u>J</u> oint <u>C</u> omitee of <u>P</u> owder <u>D</u> iffraction <u>S</u> tandards, Об'єднаний комітет зі стандартів порошкової дифракції)
Gly-X-Y	гліцин-пролін-гідроксипролін (фрагмент молекули колагену)
PDMS	плазмо-десорбційний мас-спектрометр

Поради студентам від редактора монографії

Матеріал, який ви знайдете в запропонованій монографії, належить до нової галузі науки – нанобіомедицини. Він створений за участі людей різних спеціальностей: біофізиків, хіміків, біологів, фізиків та медиків. У цьому переліку на першому місці стоїть біофізика і це не випадково. Поясню чому. Свої перші кроки в біофізику я зробив у знаменитому Фізико-технічному інституті низьких температур НАН України ім. Веркіна Б. І. у лабораторії академіка НАНУ Янсона І. К. за рекомендацією на той час заступника директора цього самого інституту, академіка НАНУ Єременко В. В. у м. Харкові. Об'єктами дослідження були макромолекули ДНК, РНК та їх компоненти, розміри яких знаходяться в нанометровому діапазоні. Зокрема, з використанням м'якоіонізаційної мас-спектрометрії були створені новітні методики отримання термодинамічних величин реакцій асоціації комплементарних пар ДНК: аденін-тимін та гуанін-цитозин, а також гідратних кластерів цих пар в умовах вакууму. Результати цих досліджень були опубліковані в журналі “Nature”. У подальшому технологія мас-спектрометрії з використанням джерела на основі радіоактивного елемента Cf-252 була застосована для ідентифікації апатитних та інших нанооб'єктів, про що йдеться в тексті монографії. Тому цілком логічним було намагання скористатися набутим досвідом для вивчення специфічних особливостей інших, близьких за природою нанооб'єктів, а саме – біоматеріалів на основі апатит-біополімерних структур. Цей напрямок досліджень було розпочато у тісному співробітництві зі вченими Мюнстерського університету (Німеччина) (виконано два двосторонні WTZ-проекти), Центром біоматеріалів Дрезденського технічного університету і наразі успішно тривають у науково-виробничій лабораторії «Біонанокомпозит» Сумського державного університету в тісному співробітництві з іншими науковими групами СумДУ.

Під час написання цієї монографії ставилися дві головні мети. Першочергова мета – це максимально сприяти розумінню особливостей структурних та фізико-хімічних характеристик

зазначених біосумісних наноматеріалів та покриттів, отриманих із використанням біоміметичних технологій. Інша мета – подати «зріз» деяких сьогоденних питань, якими займається нанобіомедицина, а саме питання практичного застосування апатит-біополімерних наноматеріалів у біології та медицині. Викладені факти та висновки рекомендую сприймати, як це роблять дослідники, тобто розглядати все, про що ви дізналися критично, відшуковуючи альтернативні пояснення, інші можливі експерименти, що можуть привести до нових гіпотез, нових подальших досліджень. Насамкінець хочу процитувати пораду студентам, яку зробив автор книги “Cell and Molecular Biology. Concepts and Experiments” Gerald Karp у своєму вступному слові: “Remain skeptical!”

Мотивація

У світі активно розробляється широкий спектр різних біоматеріалів для клінічного використання, зокрема в травматології, ортопедії та стоматології. Статистична оцінка хірургії нещасних випадків свідчить, що близько 9 % усіх хірургічних операцій після нещасних випадків спрямовані на відновлення втраченої кісткової тканини. Зростання поширеності пухлинних захворювань опорно-рухового апарату та вдосконалення хірургічної тактики також потребують значної кількості остеопластичного матеріалу. За попередніми оцінками, потреба в подібних ортопедичних матеріалах на національному ринку становить понад 100 кг на рік. Найважливішою проблемою в імплантології є біосумісність синтетичних імплантатів із кістковою тканиною. Значно підвищити біосумісність можна, використовуючи апатитні композити, що близькі за своїми структурними і складовими характеристиками до мінералізованих колагенових фібрил – другого ієрархічного рівня структури кісткової тканини. Композиційні апатит-біополімерні матеріали порівняно з іншими мають унікальні властивості. За своїм складом вони близькі до кісткової тканини людини й індукують біологічні реакції, подібні до таких, що проходять під час ремоделювання кісткової тканини. З іншого боку, для підвищення біосумісності матеріалів медичних імплантатів (Ti6Al4V, Ti-Ni, Mg) є підхід на основі створення біоактивних покриттів із відповідними механічними, структурними та морфологічними властивостями. У цьому напрямку дуже перспективними є покриття на основі ГА в комбінації з біополімерною матрицею (хітозан, альгінат натрію), отриманих у «м'яких» умовах синтезу.

Керівник авторського колективу проф. Суходуб Л. Ф. має певний науковий доробок щодо попередніх досліджень та напрацювань за напрямками композитних матеріалів та покриттів. Розпочалося все в 2002 р. в Мюнстеровському університеті (Німеччина) разом із групою доктора Сулкіо-Клеффа під час річного відрядження Л. Ф. Суходуба в рамках виграного Mercator-гранту Міністерства науки Німеччини.

Саме там був проведений перший синтез гідроксилапатиту та його металозаміщених похідних і проведені детальні структурно-фазові дослідження з використанням одного із найсучасніших приладів на той час – рентгенівського дифрактометра Siemens D 5000 [207, 234, 236]. Результати цих досліджень ввійшли в дисертацію одного із аспірантів доктора Сулкіо-Клеффа – К. Мозеке (рис.1), який наразі успішно продовжує працювати в цьому самому напрямку, але в іншому місці – лабораторії функціональних матеріалів для медицини університету Вюрцбурга. Там, у лабораторії доктора Сулкіо-Клеффа, була сконструйована установка для отримання кальцій-фосфатних покриттів на титанових субстратах методом термодепозиції із системою охолодження розчину. В основу цієї розробки покладена праця професора Курода (Японія), в якій уперше використана ідея термодепозиції для отримання покриттів [157].

Після повернення із відрядження проф. Суходуб Л. Ф. намагався продовжити ці дуже цікаві дослідження у відділі біофізики та мас-спектрометрії Інституту прикладної фізики НАН України, тим паче, що зацікавленість німецьких й інших партнерів була надзвичайно високою. Але, на жаль, темпи робіт у рідних стінах виявилися дуже низькими, оскільки напрямок, на погляд директора ІПФ НАНУ, академіка Сторіжка В. Ю., не відповідав пріоритетним напрямкам досліджень цього закладу, що здавалося, меншою мірою, дивним, оскільки вся попередня наукова діяльність проходила в рамках підписаних офіційних угод між ІПФ НАНУ і Мюнстеровським університетом. Тому проф. Суходубу Л. Ф. нічого не залишалося, як виграти ще один Mercator-грант і відправитися на півроку, цього разу до Центру біоматеріалів Дрезденського технологічного університету як для подальших досліджень у галузі ортофосфатних матеріалів, так і читання лекцій студентам та аспірантам цього самого університету на тему використання сучасних інструментальних методів у характеристизації новітніх кальцій-фосфатних й інших біоматеріалів та покриттів. Як наслідок, разом із доктором Гелінські були проведені численні дослідження, здебільшого Са-Р покриттів із використанням арсеналу інструментальних

методів, а також здійснені перші кроки в напрямку використання природних біополімерів (альгінату) для формування композитних апатит-біополімерних покриттів. Але, знову ж таки, отримана інформація не була достатньою мірою оцінена керівництвом ІПФ НАНУ і тому виникла необхідність продовжити пріоритетні для держави дослідження в іншому місці. Таким місцем став Сумський державний університет (СумДУ), ректор якого, професор Васильєв А. В. (рис. 2), зрозумів важливість цих наукових досліджень для держави і тому запросив Суходуба Л. Ф. очолити кафедру біофізики, біохімії, фармакології та біомолекулярної інженерії Медичного інституту й одночасно очолити роботу зі створення нових біоматеріалів для медицини, опираючись і використовуючи відповідний досвід у цьому напрямі. Як наслідок, за дуже короткий термін була створена науково-практична лабораторія «Біонаноккомпозит» (рис. 3) із арсеналом необхідного обладнання й вирішене питання її початкового фінансування. На цей час «Біонаноккомпозит» уже виграв один міжнародний грант, а також дуже престижний грант національної Програми «Наука в університетах» з обсягом фінансування близько 4 млн гривень на 2 роки. На цей час групою лабораторії «Біонаноккомпозит» проведені стартові дослідження отриманих синтезом із водних розчинів та процедури ліофілізації композиційних апатит-біополімерних матеріалів. Зокрема, розроблена технологія одностадійного синтезу композитних матеріалів на основі хітозану (полімерна матриця) та нанокристалічного ГА за кімнатної температури без використання концентрованих кислот, лугів та інших токсичних речовин шляхом спільної преципітації хітозану в розчині розведеної оцтової кислоти та солей Ca^{2+} і HPO_4^{2-} . М'які умови синтезу дозволяють інкорпорувати в отриману наносистему органічні біологічно активні сполуки шляхом зв'язування їх із хітозаном або адсорбцією на кристалах апатиту. Ліофільне висушування забезпечує необхідну пористість матеріалу. Попередні *in vivo* дослідження показали їх перспективність використання як остеоіндуктивного матеріалу з антибактеріальними властивостями для практичної медицини. Також проведені

попередні експериментальні дослідження процесів формування кальцій-фосфатних покриттів на титанових і магнієвих модельних субстратах. Зокрема, для формування покриттів з ГА на титанових субстратах застосована вдосконалена нашою групою технологія термодепозиції, що ґрунтується на явищі істотного зменшення розчинності ГА при підвищенні температури субстрату. В результаті підібрані умови (температура субстрату 75 год 115 °С, рН робочого розчину 6,5–6,7 тривалість експозиції 60 хвилин) утворення на поверхні титану однорідного покриття ГА необхідної товщини та морфології. При створенні ГА-покриттів на Mg-носіях використовували метод занурення субстратів у робочі розчини різного складу в ізотермічних умовах. Показано, що основними фазовими складовими покриття є брушит і ГА при температурах субстрату 22 °С та 37 °С відповідно, рН розчину 6,65 та тривалості осадження 72 години. Встановлено, що магнієва основа зменшує кристалічність ГА. Результати цих досліджень стали основою кандидатської дисертації аспірантки проф. Суходуба Л. Ф. – Яновської Г. О.

У монографії наведені результати і стан досліджень лабораторії СумДУ «Біонаноккомпозит» у напрямку створення новітніх апатит-біополімерних матеріалів та покриттів для біомедичного застосування з акцентом на результати, опубліковані останніми роками як у міжнародних, так і вітчизняних виданнях з метою узагальнення отриманих даних, методів дослідження, пошуку потенційних сфер упровадження отриманих результатів шляхом створення відповідного виробництва більш доступних й ефективних для населення України біоматеріалів для ортопедії, травматології та стоматології в недалекій перспективі.



Рис. 1. К. Мозеке



Рис. 2. А. В. Васильєв



Рис. 3. Ділянка синтезу біоматеріалів лабораторії
«Біонаноккомпозит» СумДУ

1. Біомінералізація кісткової тканини

1.1. Структура та фізико-хімічні аспекти кісткової тканини

Термін «кістка» можна приписати кістці як органу (наприклад, стегно), або кістці як тканині, а саме губчатій (трабекулярній) та щільній [110]. Як бачимо з рис. 4, зовнішній шар кістки утворює періост, або окістя, середній шар – щільний, а внутрішній – губчатий.

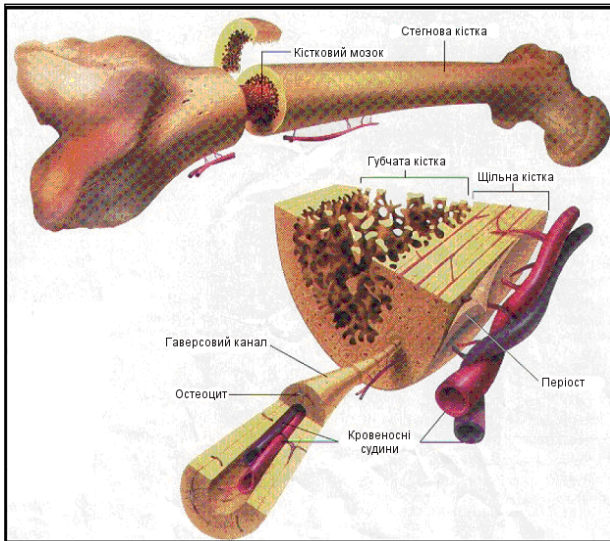


Рис. 4. Ієрархічна структура кістки [110]

Щільна кістка знаходиться в діяфізі (diaphyses) зрілої кістки і складається із щільно упакованих остеонів (рис. 5). Останні містять Гаверсові (Haversian) канали з кровеносними судинами, оточеними пластинами (lamellae) кісткової речовини. Гаверсові канали організовані із концентричних кілець, через які проходять кров'яні, лімфатичні та нервові судини.

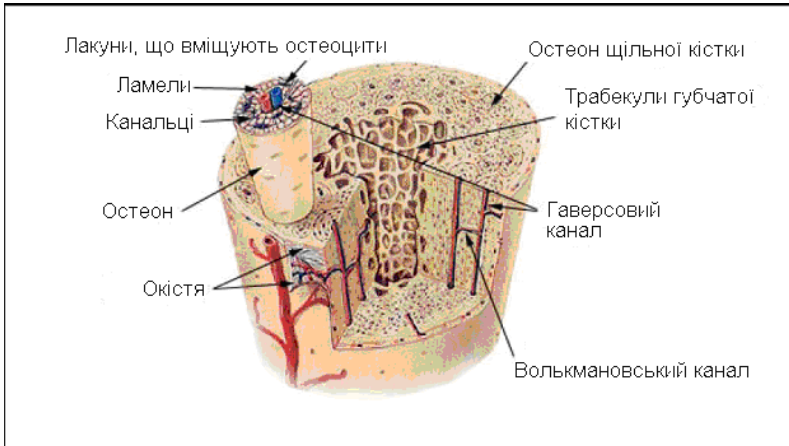


Рис. 5. Щільна кістка з пористістю 5–10 % і декількома каналами [110]

Губчата кісткова тканина складається із пористої тривимірної ґратки фібрил (трабекул) кісткової речовини з формою пластин або стрижнів (рис. 6 (А)). Вільні зони між трабекулами зайняті кровоносними судинами та різними клітинами. Остеобласти, що формують кістку, мають кубоподібну форму. Остеобласти належать до типу багатоядерних клітин і відповідають за резорбцію кістки в лакунах (рис. 6 (В)). Остеоцити виникають із остеобластів і є найбільш поширеними клітинами в кістці. Вони відповідають за організацію клітин як у просторі, так і в часі, в процесах формування та резорбції кісткової тканини.

Таким чином, кістки забезпечують міцність скелета, захист внутрішніх органів, а також підтримку балансу кальцію в організмі.

Термін «осифікація» (ossification) приписують процесу спеціального клітинного синтезу органічної матриці остеобластами. Кальцифікація (мінералізація) кісткової речовини означає депозицію кальцій-фосфатних (Ca-P) кристалів в органічній матриці, створеній остеобластами.

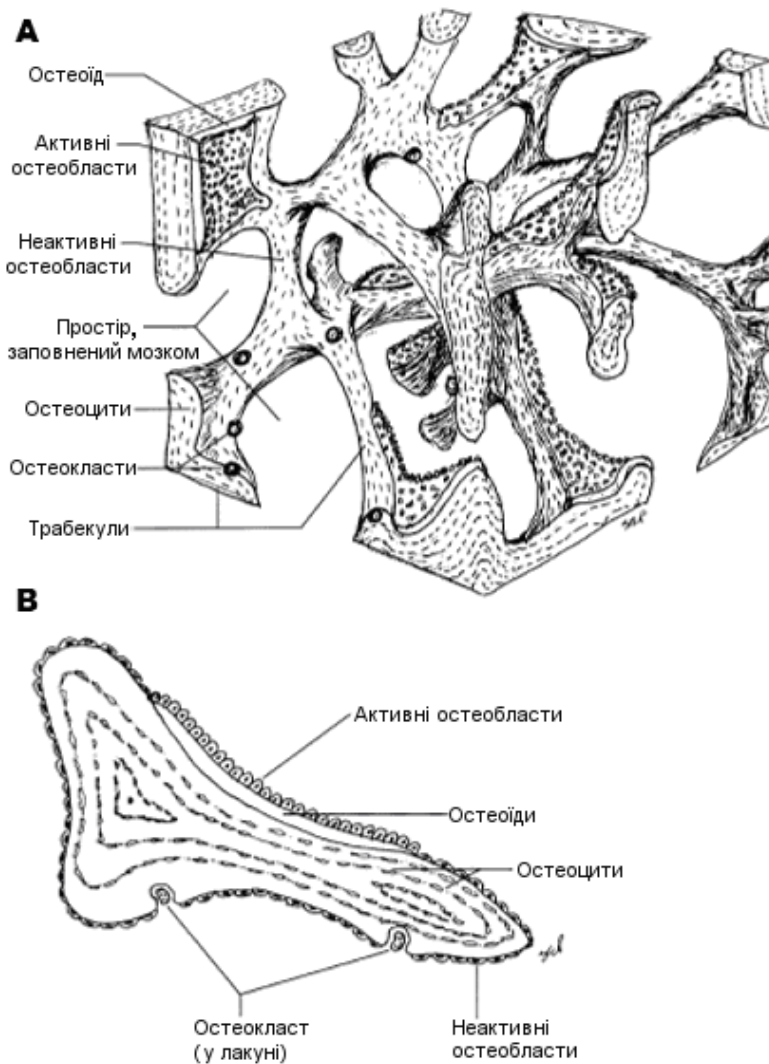


Рис. 6. Губчата кістка (А) та лакуна (В) [110]

Головною компонентою органічної матриці є структурний протеїн – колаген, молекули якого самоорганізовані в специфічну тривимірну (3D) упаковку (рис. 7 а, б). Агрегати колагенових молекул мають назву колагенових фібрил.

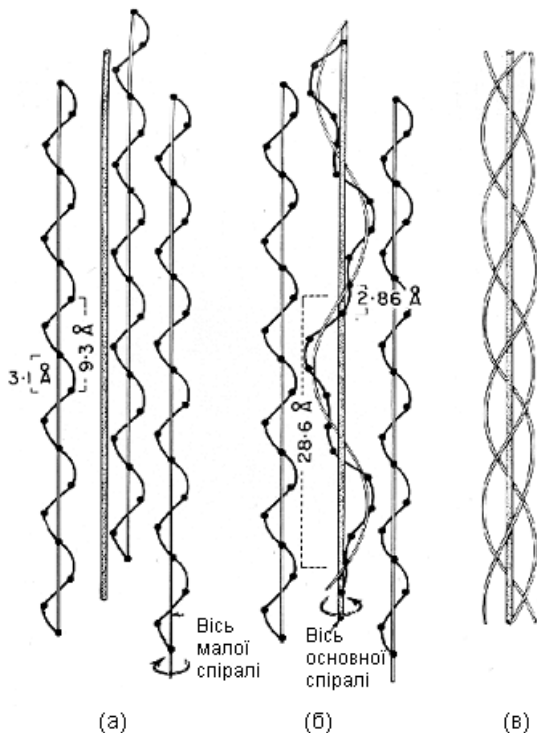


Рис. 7. – Кожний поліпептидний ланцюг колагенової макромолекули складається із гліцину, проліну та гідроксипроліну (чорні сфери) і є закрученим навколо своєї осі у вигляді лівої спіралі з періодом 9.3 Å (а); індивідуальні малі спіралі, закручені навколо центральної осі в довгу праву спіраль (б, в) [110, 126]

Кальцифікація починається одразу ж після синтезу і виділення колагенових фібрил: іони кальцію та фосфору приходять із екстраклітинної рідини, що пронизує кісткову речовину [110, 159]. Остеобласти мають кубоподібну форму з характерною чіткою фіксацією в кістковій тканині. В організмі людини тривалість життя цих клітин вимірюється 8 тижнями, після чого вони змінюють свій фенотип і перетворюються в остецити або поглинаються власною мінералізованою матрицею. Вони є найбільш поширеними клітинами в кістці

(рис. 6 В). Незважаючи на природу їх виникнення, ці клітини мають менший розмір, а також більше співвідношення між ядром та цитоплазмою. Вони мають також певну кількість клітинних органел. Збільшена цитоплазматична протяжність у цих клітинах забезпечує просторові сполучення в кістковій тканині. Вони також відповідальні за координацію як у просторі, так і часі активності клітин, що беруть участь у формуванні та резорбції кісткової тканини.

Кожний остеобласт упродовж свого життєвого циклу виробляє щоденно до 1,5 мкм остеоїда [110]. Органічна матриця разом із Са-Р мінеральною фазою підлягає резорбції клітинами-остеокластами (рис. 6 А). Остекласти – це дуже мобільні мультіядерні клітини, до складу яких входять лізосомальні ензими. Їх головною функцією є резорбція кісткової тканини в лакунах (рис. 6 В). До складу остекластів входить багато мітохондрій, а також численні лізоцими. Їх життєвий цикл становить 15–20 днів, протягом якого близько 200,000 мкм³ кісткової тканини підлягає резорбції за 1 день.

Конформація колагенових фібрил та природа Са-Р-мінеральної фази змінюється за час від початку формування до резорбції (кістковий колообіг), що відбивається на їх хімічних та фізичних властивостях. У якийсь момент часу нові недиференційовані стовбурні клітини активізуються в місцях, створених завдяки резорбції кісткової речовини. Ці клітини диференціюються в остеобласти і, таким чином, цикл реакцій повторюється. Оцінки показують, що за період активних років життя зрілої людини сумарна маса кісткової речовини скелета синтезується і, відповідно, підлягає резорбції один раз на 5–6 років. Зрозуміло, що кістковий колообіг має характерну кінетику для кожної тканини того чи іншого органа. Швидкості колообігу можуть відрізнятися в декілька разів. Кісткова речовина людини має найвищу швидкість кісткового колообігу серед усіх хребетних. З віком колообіг знижується, що приводить до остеопорозу з подальшою появою ризику пошкодження кістки [110].

1.2. Характеристика мінеральної фази кісткової тканини

Незважаючи на те, що мінеральна фаза була відома як кальцій-фосфат уже 200 років й ідентифікована як апатит у 1926 році, деталі її структури та хімічного складу залишаються невизначеними завдяки здебільшого процесам постійної перебудови кістки. Розмір, форма, особливості поверхні, рівень кристалічності кісткових нанокристалів істотно відрізняються від значно більших, практично бездефектних синтетичних та геологічних апатитів [13, 110]. Унікальність фізико-хімічних властивостей кісткових нанокристалів обумовлюють головні біологічні функції, а саме збереження гомеостазу головних іонів, таких як Ca і Mg, в екстраклітинній рідині, а також специфічних мінеральних властивостей кісткової речовини. Кількість мінералу в кістці виражається, як правило, у вагових відсотках. Це є вага повністю мінералізованої тканини після спалення кістки відносно повної ваги кісткового зразка. Об'ємний відсоток мінеральної фази в кістці – це маса мінералу на одиницю об'єму кістки, від якого залежать її біологічні та механічні властивості. Зріла, повністю мінералізована кістка має ваговий відсоток мінералу на рівні 66 %, а об'ємний – 52–53 % [110]. Кількість мінералу в кістковій тканині залежить як від віку, так і часу після початку депозиції Ca-P кристалів в органічній матриці, тому «кристалічний» вік теж потрібно брати до уваги при визначенні кісткової густини.

Із уширення піків перших рентгенівських спектрів апатитних кристалів кістки було знайдено, що їх діаметр змінюється в інтервалі 3–29 нм [13, 110]. Подальші вивчення з використанням електронної мікроскопії показали, що середній розмір кісткових кристалів має довжину 50 нм, ширину – 25 нм і товщину 10 нм із орієнтацією довгої осі кристалів пластинчатої форми паралельно довгій осі колагенових фібрил. Дослідження розміру та форми кісткових апатитних кристалів із використанням малокутової рентгенівської дифракції показали, що кристали є не пластинами, а скоріше голками. В роботі [13] були визначені морфологічні та кристалографічні характеристики біоapatиту

(БА), що належав зрілій кістковій тканині бичка, був термічно оброблений для видалення органічної компоненти та покращання механічних характеристик. Показано, що середній розмір кристалів БА становить 300 нм.

У серії подальших експериментів використовували різні методики з вилучення органічної матриці з подальшим виділенням окремих кристалів для отримання як мінімум двох розмірів та структури нанокристала за допомогою електронної дифракції, ширококутової рентгенівської дифракції та інфрачервоної спектроскопії з Фур'є-перетворенням [13, 145]. У результаті було показано, що одиночні апатитні нанокристали кістки є дуже тонкими пластинами для всіх досліджених тварин (бичок, курча, миша, риба) з характерними розмірами довжини 25–50 нм та ширини 12–20 нм. Голчасті або стрижневі форми кристалів не були знайдені в цих дослідженнях. Кристали були ідентифіковані як апатитні [145]. Але, незважаючи на це, теоретичні термодинамічні дослідження вказують на утворення октакальцій-фосфату (ОКФ), або «аморфного» кальцій-фосфату в «молодих» кристалах, які надалі перетворюються в апатитні кристали кальцій-дефіцитного гідроксилапатиту. Ці дані потребують подальших детальних досліджень.

1.3. Характеристика органічної фази кісткової тканини

На початку досліджень необхідно було визначити, чи є нуклеація апатитних кристалів усередині колагенових фібрил *in vitro* функцією нативних колагенових молекул (рис. 7) самих по собі чи функцією їх специфічної просторової упаковки (конформації). Для вирішення цієї проблеми вивчалися різноманітні системи (денатурований колаген та колагенові фібрили, реконструйовані колагенові фібрили, зокрема нативні фібрили, з періодом уздовж осі $c \sim 67$ нм, а також декальційовані кісткові колагенові фібрили (рис. 8) в умовах метастабільних кальцій-фосфатних розчинів з метою оцінки ефективності нуклеації апатитних нанокристалів [110, 159].

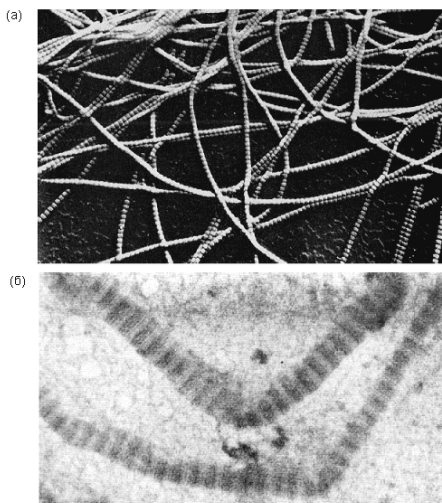


Рис. 8. Просвічувальне електронно-мікроскопічне (ПЕМ) зображення з низькою роздільністю колагенових фібрил, що демонструє повторювальні осьові затемнення з періодом $\sim 67\text{--}70$ нм (а); б – ПЕМ зображення з високою роздільністю з більш упевненою демонстрацією згаданої періодичності (б) [110, 127]

Проведені численні експерименти показали, що гетерогенна нуклеація кальцій-фосфатних нанокристалів на колагенових фібрилах цілком залежить від специфічної просторової (3D) упаковки колагенових молекул як уздовж осі c , так і в перпендикулярному напрямку [13, 110, 159]. Ці результати продемонстрували, що специфічні сайти всередині колагенових фібрил є найвигіднішими з точки зору об'єму, структури, хімічного складу та зарядового розподілу бокових груп амінокислот. Структура сайтів уперше була запропонована в знаменитих дослідженнях Hodge, Petruska [126, 127] на основі досліджень різних колагенових агрегатів з використанням ПЕМ (рис. 7). Було показано, що в нативній фібрилярній структурі тропоколаген утворює агрегати вздовж довгої осі, в яких

спостерігаються порожні („дірки”) між С-кінцем однієї молекули та N-кінцем наступної.

Крім того, колагенові молекули зміщені вздовж осі приблизно на $\frac{1}{4}$ довжини по відношенню до молекул у сусідніх шарах, тобто спостерігається перекриття (o) (рис. 9, 10 a). Hodge і Petruska констатували, що значна маса нанокристалів біоapatиту знаходиться якраз у цих порожнечках [126, 127].

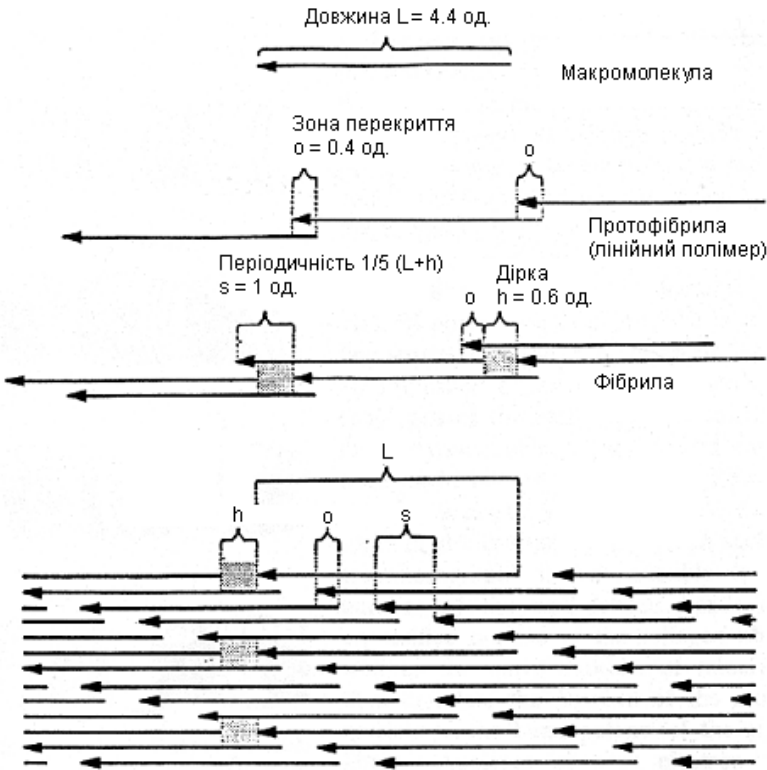


Рис. 9. Схематичне зображення того, як упаковка тропоколагенових макромолекул у колагенову фібрилу утворює „дірку” всередині фібрили. Бачимо також, що зона перекриття (o) в сумі із зоною „дірки” (h) дорівнює приблизно 67 нм, періодичність уздовж осі c [110]

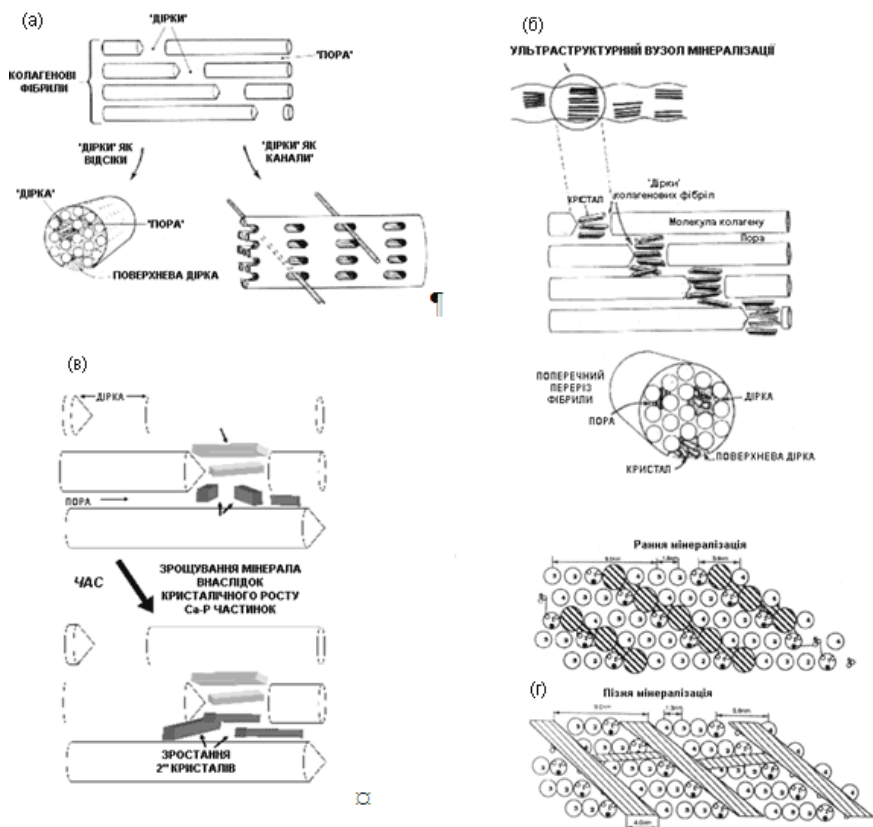


Рис. 10. Схематичне зображення 3D-організації колагенових молекул у колагенову фібрилу кістки. Колагенові фібрили мають «діркові зони», а також канали вздовж діаметра колагенової фібрили. Міжмолекулярні об'єми є порами (а); схема організації Са-Р-нанокристалів кістки на ранній стадії мінералізації. Декілька нанокристалів знаходяться також у порах (б); схема пізньої кальцифікації з депозицією кісткових нанокристалів у міжмакромолекулярних порах (в); схематичне зображення каналів, запропонованих Hodge і Petruska [126, 127] і локалізації в них мінералів біоапатиту в процесі ранньої та пізньої мінералізації кістки (г). Колагенові молекули показані у вигляді сфер 1, 2, 3, 4; три поліпептидні ланцюги, що входять до кожної молекули, показані у вигляді маленьких кружечків у молекулі 1

Більше того, на думку цих авторів, зазначені пустотні зони з'єднані поперечно, створюючи «канали» впродовж діаметра фібрил, де також можуть бути наявні кальцій-фосфатні нанокристали (рис. 10 г).

Наступні дослідження колагенових фібрил із сухожилля індика з використанням ПЕМ разом із малокутовою рентгенівською дифракцією та нейтронною дифракцією підтвердили початкову локацію кальцій-фосфатних кристалів у діркових зонах (рис. 10 б), а можливо, і в каналах [110, 159]. Із розрахунків [110], що базуються на середній густині Са-Р-кристалів, впливало, що для розміщення всієї маси кристалів при повній кальцифікації лише так званих діркових зон недостатньо і тому були констатовані додаткові зони розміщення кристалів, а саме пори між колагеновими молекулами (рис. 10 б, в). Можна було очікувати, що подібна депозиція збільшить відстань між колагеновими макромолекулами, однак вийшло навпаки. Цей парадокс пояснили заміщенням міжмакромолекулярних молекул води (густина ~ 1) нанокристалами апатиту (густина $\sim 3,0$). Це обумовило зменшення міжмакромолекулярного простору, що пізніше було підтверджено експериментально з використанням рентгенівської дифракції та мікроскопа атомних сил [100, 244]. Але дійсний об'єм для кальцій-фосфатних нанокристалів ніколи не отримувався прямим вимірюванням. Характерно те, що модель Hodge і Petruska для 3D-організації колагенових молекул у колагенових фібрилах з каналами вздовж діаметра фібрил використовується для інтерпретації як структурних, так і біологічних властивостей, незважаючи на той факт, що 3D-організація колагенових фібрил кістки ще остаточно не встановлена. Дослідження екваторіальних рефлексів кісткового колагену з використанням малокутової рентгенівської дифракції [13, 110, 159] не підтверджують гексагональну упаковку колагенових молекул у колагеновій фібрилі, яку теоретично запропонували Hodge і Petruska. Це означає, що кісткові колагенові молекули в кістковій колагеновій фібрилі мають іншу 3D-організацію, а також інше просторове співвідношення

між цією 3D-структурою і мінеральною фазою порівняно з моделлю Hodge і Petruska.

1.4. Порівняльна характеристика структури біоapatиту та синтетичних кальцій-фосфатів

Із багатьох досліджень методом рентгенівської дифракції відповідних зразків випливає, що головним неорганічним компонентом природної кісткової тканини і тканини зубів є мінерал, який належить до групи апатитів [2, 22, 212]. Структурно цей мінерал – біоapatит (БА) – є найбільш наближеним до ГА. Апатити утворюють групу мінералів із загальною формулою



де ME означає 1–3-валентні катіони, XO_4 – 1–3-валентні аніони, а Y – 1–2-валентні аніони, наприклад:

$ME = Ca^{2+}, K^+, Na^+, Mn^{2+}, Mg^{2+}, Sr^{2+}, Ba^{2+}, Pb^{2+}, Th^{3+}, Ni^{2+}$ та ін.;

$XO_4 = PO_4^{3-}, SiO_4^{3-}, CO_3^{2-}, AsO_4^{3-}, SO_4^{2-}, VO_4^{3-}$ та ін.;

де $X = P^{5+}, Si^{4+}, C^{4+}, As^{6+}, V^{5+}$ та ін.;

$Y = F^-, Cl^-, OH^-, O^{2-}, CO_3^{2-}$ та ін. [22, 61].

Найбільш поширеним у природі представником цієї групи є фторапатит. Він має гексагональну структуру (група $P6_3/m$). Симетрія ГА завдяки зміщенню гідроксильного іона вздовж гексагональної осі знижується до моноклінної структури (група $P6_3$ або $P2_1/b$). Але різниця між a- та b/2-параметрами моноклінної ґратки є дуже незначною і тому в більшості випадків ГА приписують гексагональну структуру (рис. 11). Так, у довідкових таблицях JCPDS (International Centre for Diffraction Data) під номером 09-0432 знаходиться гідроксилапатит $Ca_5(PO_4)_3OH$ гексагональної сингонії ($P6_3/m$) із параметрами ґратки $a = b = 9,418 \text{ \AA}$ та $c = 6,884 \text{ \AA}$, а під номером 76-0694 – ГА $Ca_5(PO_4)_3OH$, але вже моноклінної сингонії ($P2_1/b$) з параметрами ґратки $a = 9,4214(8) \text{ \AA}$, $b = 18,8428(1)$ та

$c = 6,8814(7) \text{ \AA}$. Як бачимо з рис. 11, у структурі ГА іони Ca^{2+} мають два різні положення: Ca_1 – з оточенням 9 іонів кисню (6 близьких і 3 більш віддалених) і Ca_2 – з оточенням 7 іонів кисню (трикутники навколо ОН-каналу).

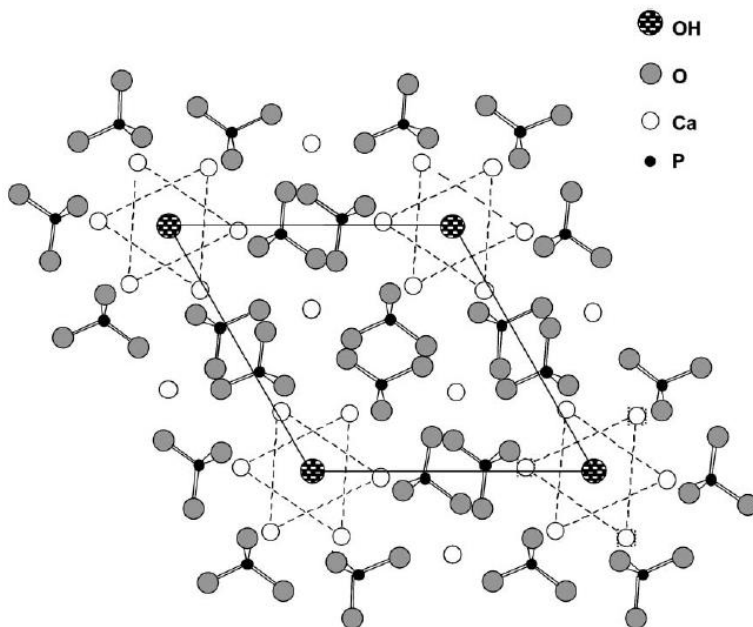
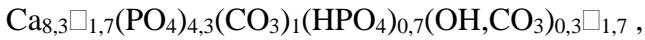


Рис. 11. Проекція структури ГА на площину (001). Два трикутники із іонів Ca^{2+} утворюють тунелі в положеннях $z \frac{1}{4}$ і $\frac{3}{4}$. Іони OH^- знаходяться над або під трикутниками [142]

Фосфатні тетраедри формують жорсткий структурний каркас з осьовими каналами вздовж кристалографічного напрямку [001]. Параметри ґраток БА та синтетичного стехіометричного гідроксилапатиту (сГА) подібні.

Проте дані, отримані в різних дослідженнях, мають розходження, навіть по відношенню до сГА. Так, наприклад, із праці *Kau et al.*, [142] випливає, що елементарна комірка має розміри: $a = 9,432 \text{ \AA}$, $c = 6,881 \text{ \AA}$, в той час як у фундаментальній

монографії Elliott J. С. наведені такі дані: $a = 9,4176 \text{ \AA}$, $c = 6,8814 \text{ \AA}$ [99]. Бачимо, що параметри дещо відрізняються від величин для ГА, наведених у довідкових таблицях JCPDS. Тому, описуючи нові синтетичні матеріали, часто порівнюють дані з тим чи іншим уже охарактеризованим стандартом. Біоapatити мають ще більші відмінності порівняно з синтетичними аналогами. Так, із згаданої вже монографії Elliott J. С. [99] випливає, що параметри ґратки можуть змінюватися в інтервалах: $a = 9,48 - 9,35 \text{ \AA}$ та $c = 6,88 - 6,84 \text{ \AA}$. Реальна структура та склад БА до кінця не вивчені через принципові труднощі рентгенографічного аналізу. Значна ширина дифракційних ліній, обумовлена малими розмірами кристалів БА, знижує точність порівняльного аналізу дифрактограм. Ускладнює однозначну інтерпретацію і те, що різні мінерали, відомі як «apatити», дають практично ті самі дифрактограми [61]. Крім того, в БА кістки молярне співвідношення кальцію до фосфору не завжди дорівнює 1,67, як у сГА, а може коливатися в інтервалі 1.37–1.77 [168]. Причини коливань пов'язані як із дуже малими розмірами кристалів БА (вплив складу поверхонь), так і різними заміщеннями іонів кристалічної ґратки. Як на поверхні, так і в об'ємі кристалів можуть бути наявні такі іони, як K^+ , Na^+ , Mg^{2+} , Si^{2+} , Cl^- , F^- , CO_3^{2-} , цитрат-іон [168], а також іони перехідних металів-компонентів біологічних імплантатів, про що детальніше буде викладено нижче. Особливого значення набуває питання про місцезнаходження карбонатного іона CO_3^{2-} , концентрація якого в кістці дуже значна і в той же час структурна роль досі невідома. Відомо, що цей іон може заміщувати як PO_4^{3-} , так і OH^- в об'ємі і бути наявним у поверхневому шарі БА [167, 168]. На наявність у кістковому мінералі іона HPO_4^{2-} вказують результати інфрачервоних (ІЧ) досліджень [63, 64]. Декілька лабораторій протягом декількох декад вирішували проблему точного елементного складу БА. У табл. 1 зібрані дані декількох робіт про концентраційні особливості БА різних тканин порівняно з сГА. Беручи до уваги лише основні елементи із табл. 1, склад кісткового мінералу, в якому карбонат частково заміщує фосфатні групи та іони гідроксилу, був поданий як [89]:



де \square – вакансії.

Зрозуміло, що подібне подання не є остаточним. Про це, наприклад, свідчать дослідження з використанням ІЧ, Раман-спектроскопії, які вказують на дуже малу кількість іонів гідроксилу в молекулах БА [70, 179, 202, 213]. Із протонних спектрів твердотілого ЯМР кісткових кристалів впливають дані про кількість іонів OH^- у БА, що становить усього 20 % від кількості цих іонів у сГА [70]. Отримані результати є дуже важливими для глибокого розуміння біохімічних процесів, що покладені в основу нормального і патологічного метаболізму кістки.

Таблиця 1

Склад мінеральної компоненти в зубній емалі, дентині та кістковій тканині * порівняно зі сГА ,(ваг.%) ^{1,2} [2, 99, 168]

	Емаль	Дентин	Кісткова тканина	сГА
Ca^{2+}	37,6	40,3	36,6	39,6
P^{5+}	18,3	18,6	17,1	18,5
Ca/P (мол.)	1,63	1,61	1,65	1,67
CO_3^{2-}	3,5	5,6	7,4	-
Na^+	0,7	0,1	1,0	-
Mg^{2+}	0,2	1,1	0,6	-
Cl^-	0,4	0,27	0,1	-
K^+	0,05	0,07	0,07	-
F^-	0,01	0,06	0,03	-
Мінерал	97	70	65	100
Органіка	1,5	20	25	-
Sr^{2+}	0,03	0,04	0,05	
Ba^{2+}	0,02	0,005	0,1	
Pb^{2+}	0,1	0,004	0,08	
Fe^{3+}	0,08	0,01	0,1	
Zn^{2+}	0,12	0,07	0,04	

	Емаль	Дентин	Кісткова тканина	сГА
Cu^{2+}	0,008	0,005	0,1	
Al^{3+}	0,04	0,015		
Si^{4+}	0,14	0,01	0,05	
Mn^{2+}	0.006	Сліди	Сліди	
Se^{2+}	0,002	Сліди		
Sn^{2+}	0,009	Сліди		
Li^{+}	0,001	Сліди		
Ni^{2+}	0,001	Сліди		
Ag^{+}	0,004	0,07		
S	0,005			
Cd^{2+}	0,007			

Примітки:

1. Не всі дані різних авторів задовільно збігаються.
2. Для слідових елементів (починаючи із Sr) зведені максимальні величини концентрацій.

Виявлені коливання стехіометричного співвідношення Ca/P, а також розмитість дифракційних картин від кісткових зразків ініціювали ідеї багатьох дослідників про наявність інших кальцій-фосфатних фаз. Особливу популярність отримала ідея аморфного кальцій-фосфату ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) як передвісника БА [2, 22, 61]. Про наявність у біомінералах кістки та зубів домішкових фаз, таких як CaCO_3 , $(\text{Mg,Ca})\text{CO}_3$, MgCO_3 , CaO і MgO , свідчать результати, отримані з використанням радіоспектроскопічних методів – електронного парамагнітного резонансу та протонного магнітного резонансу [3, 4, 55]. Із цих даних виходить, що переважна локація домішкових карбонатних фаз спостерігається між кристалами та органічними прошарками.

Таким чином, можна зробити висновок, що на сьогодні пріоритетною є точка зору на біомінерал кістки як такий, основу якого становить карбонатний ГА з різними структурними й ультраструктурними варіаціями, що залежать як від віку, так і навколишнього середовища [50, 51, 160, 272].

1.5. Синтетичний гідроксилапатит та його катіон-заміщені аналоги. Вплив іонів металів на основні характеристики ГА

Синтетичний гідроксилапатит у вигляді порошку можна отримати, використовуючи різні хімічні методи, як безводні «сухі», так і «мокрі» [17]. Безводні методи використовуються у твердотільних реакціях між сполуками кальцію і фосфору для отримання стехіометричних порошків ($\text{Ca/P} = 1,67$). У «мокрим» хімічних методах використовують або осадження в змішаних водних розчинах, або гідроліз фосфатів кальцію. Отримані порошки ГА характеризуються значною площею поверхні та малим розміром частинок. Кристалічність та Ca/P -відношення залежить від рН, температури, типу та концентрації реагуючих компонентів. Для синтезу осадженням джерелом кальцію є CaCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$, $\text{Ca}(\text{OH})_2$, CaCO_3 , а джерелом фосфору відповідно $\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$, $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, H_3PO_4 та її натрієві або калієві солі. Синтез проходить при $\text{pH} > 7$ з використанням водного розчину аміаку або розчину їдкого натрію з подальшим пропусканням газоподібного азоту для видалення карбонат-іонів.

Титан та його сплави широко використовуються як матеріали для імплантатів в ортопедії та стоматології завдяки їх високій біосумісності, корозійній стійкості та відмінним механічним властивостям. Найкращі властивості поєднані у сплаві $\text{Ti}_6\text{Al}_4\text{V}$. Узагалі титан характеризується як інертний матеріал, але фактично швидко окиснюється до TiO_2 і тому під час клінічних застосувань завжди в міжфазовому просторі «імплантат-кісткова тканина» існує тонкий шар із оксиду титану. Незважаючи на термодинамічну стабільність бар'єра із TiO_2 , внаслідок біологічної корозії в живому організмі частинки титану з імплантата проникають у кісткову тканину, що приводить до локального їх накопичення в тканині. Так, наприклад, концентрація іонів Ti в кістковій тканині, що межує з імплантатом, досягає 2100 мкг/г після 12-місячної імплантації [101], що значно перевищує допустимі концентрації. За умови існування на поверхні імплантата покриття з гідроксилапатиту,

швидкість переходу іонів титану в нативну тканину зменшується пропорційно товщині покриття. У зв'язку з наведеними фактами виникає декілька питань про характер міжмолекулярної взаємодії та хімічних реакцій у системі «Ti-ГА». Одним із підходів у цій проблемі може бути створення штучної модельної системи на основі ГА, отриманого із водного розчину за наявності титану. Подібний підхід був реалізований у роботі [101], в якій була отримана і вивчена така модельна система, а саме «ГА+Ti⁴⁺+CO₃²⁻». Результати рентгенівської дифракції та ІЧ-спектроскопії показали, що структура отриманих «ГА+Ti⁴⁺+CO₃²⁻»-зразків відповідала ГА з відношенням Ca/P = 1,67 (для зразків із низьким вмістом карбонату). Термогравіметричний аналіз (20–900 °C) показав, що спостерігається декомпозиція карбонату, яка підсилюється наявністю іонів титану, але в той же час структура ГА залишається незмінною. Спостерігався також вихід адсорбованої та кристалогідратної води при термічній обробці зразків. Зразки з високим вмістом карбонату та титану мали нерегулярну форму. Виходячи із отриманих даних, автори роблять висновок, що формування і подальший ріст кристалів ГА за наявності титану не змінюється, що є важливим для біологічних систем. Питання можливого заміщення іонів Ca²⁺ іонами Ti⁴⁺ у ґратці ГА, що було поставлене авторами [101] і обговорювалося на основі отриманих і літературних даних, залишилося відкритим. Можливість хімічних реакцій у системі „ГА+Ti” вивчали в [45]. Шляхом вивчення концентраційного профілю з використанням електронного мікроскопа показана наявність взаємної дифузії ГА і Ti в інтерфейсі. Одним із продуктів термічної реакції між плівкою оксиду титану, утвореною із парової фази на поверхні ГА, є перовскіт (perovskite) (CaTiO₃). Нагрівання іншої системи, що складалася з порошку гідроксилапатиту та двоокису титану, до 1100 °C давав той самий продукт, а також β-Ca₃(PO₄)₂, що утворювався внаслідок декомпозиції гідроксилапатиту. Таким чином, при термічній обробці системи «ГА+Ti» спостерігається хімічна взаємодія між компонентами інтерфейсу. Наявність тріщин в інтерфейсі «ГА+Ti» обумовлена різними коефіцієнтами

термічного розширення цих матеріалів, що необхідно враховувати під час створення нових покриттів імплантатів на основі ГА і металевих сплавів.

Ванадій, як і титан, може проникати в нативну кісткову тканину внаслідок біологічної корозії імплантатів на основі сплаву Ti_6Al_4V , взаємодіяти з ГА кістки, що поновлюється і, таким чином, впливати на формування та ріст кристалів останнього та призводити до негативних біологічних наслідків. Дослідження *in vitro* тест-систем [235] демонструють, що швидкість утворення ГА із розчину за наявності іонів V^{3+} помітно зменшується, але при цьому, на відміну від іонів Al^{3+} , іони ванадію не адсорбуються поверхнею ГА. Механізм впливу передбачає формування в розчині комплексів $V-PO_4$, які гальмують утворення кристалів ГА. В той же час іони титану, як і алюмінію, зв'язуються з поверхнею кристала ГА, що приводить до блокування активних центрів росту кристалів. Наведені дані вказують на необхідність більш детальних структурно-фізичних досліджень взаємодій іонів титану, ванадію, алюмінію та ін. з ГА та їх вплив на процеси біомінералізації. Таким чином, на основі вищевикладеного можна зробити висновок про те, що на даний момент пріоритетною є точка зору на біомінерал кістки як такий, що має у своєму складі карбонат-іони та домішки інших іонів, є низькокристалічним із нестехіометричною фазою апатиту та має ультраструктурні варіації, які залежать як від віку, так і навколишнього середовища [50, 51, 160, 272]. Таким чином, із огляду літератури стає очевидним, що однією з найважливіших проблем в імплантології є біосумісність синтетичних матеріалів (імплантатів) з кістковою тканиною, яка, у свою чергу, має дуже складну структуру. Значно підвищити біосумісність можна шляхом використання апатитних композитів, близьких за своїми структурними характеристиками до неорганічної складової кістки (біоapatиту). Одним із можливих шляхів отримання подібних структур може бути утворення біоapatиту в полімерних гідрогелевих нанореакторах – порових комірках синтетичних полімерів, подібних до тих, що спостерігаються в нативних колагенових фібрилах.

2. Біоміметичні технології синтезу кальцій-фосфатних біоматеріалів

Одним із важливих завдань сучасного медичного матеріалознавства є створення біосумісних матеріалів для тканинної інженерії з метою заміщення кісткових дефектів та дефектів м'яких тканин у практиці хірургічної та пластичної медицини.

Основною мінеральною складовою кісткової тканини є біоактивний гідроксиапатит (ГА) у вигляді нанодисперсних (10–35 нм) частинок. Упродовж усього життя людини в кістковій тканині відбуваються два основні процеси: мінералізація фосфатно-кальцієвими комплексами органічного матриксу, що продукується клітинами-остеобластами та резорбція за допомогою клітин-остеокластів. Наноструктуровані матеріали на основі ГА та інших фосфатів кальцію зарекомендували себе як нетоксичні, біосумісні з нативною кістковою тканиною та здатні до резорбції.

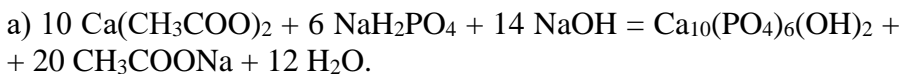
Біоміметичні технології синтезу дозволяють отримувати новітні нанокompatитні апатит-полімерні матеріали за кімнатної температури без використання концентрованих кислот, лугів та інших токсичних матеріалів.

2.1. Розроблення методики синтезу дрібнодисперсних форм нанокристалічного гідроксиапатиту

Отримання нових керамічних наноматеріалів на основі ГА та вивчення їх будови і властивостей є одним з актуальних завдань сучасного медичного матеріалознавства. Наноструктуровані матеріали мають унікальні властивості: за своїм складом вони близькі до кісткової тканини людини та індукують біологічні реакції подібні до тих, що проходять при ремодельованні кісткової тканини.

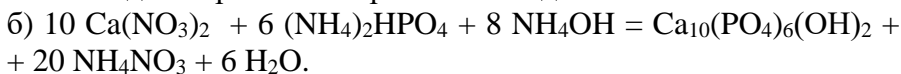
У ході виконання поставленого завдання була відпрацьована методика синтезу дрібнодисперсних форм нанокристалічного ГА $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$.

ГА був отриманий унаслідок таких хімічних реакцій:



Технологічний режим:

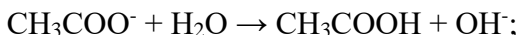
- рН = 11–12 з додаванням 10 М водного розчину NaOH;
- прогрів при $T = 80^\circ\text{C}$ протягом 10 хв;
- зістарювання протягом 12–24 год;
- промивання деіонізованою водою;
- відпал при 900°C протягом 1 год.

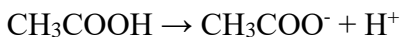


Технологічний режим:

- рН = 11–12 з додаванням 25 % водного розчину NH_4OH ;
- прогрівання при $T=80^\circ\text{C}$ протягом 10 хв;
- зістарювання протягом 12–24 год;
- промивання деіонізованою водою;
- відпал при 900°C протягом 1 год.

Необхідно відзначити, що у разі реакції б), коли метою є отримання чистого продукту ГА, побічні продукти реакції видаляються шляхом відмивання їх деіонізованою водою. Але в подальшому при використанні цих реакцій для синхронного утворення ГА в складі композитного матеріалу (гелі, покриття, та ін.) видалення побічних продуктів реакції буде ускладненим. Тому як альтернатива була обрана реакція а), що проходить за участі органічної речовини $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, внаслідок чого, крім ГА, утворюється розчинна та нетоксична сіль ацетату натрію, що легко виводиться з організму. Порівнюючи два наведені склади вихідного розчину, потрібно відзначити, що нітратний аніон NO_3^- належить до немодифікуючих, тобто він не вбудовується в структуру ГА та не бере активної участі в іонних рівновагах. На відміну від нього ацетатний іон $(\text{CH}_3\text{COO})^-$ гідролізується, зменшує кислотність середовища за рахунок буферної дії:





Унаслідок гідролізу ацетатного іона утворюються гідроксильні групи, що є джерелом OH^- груп під час утворення ГА:



Ацетатні іони зв'язують іони Ca^{2+} , утворюючи іонний комплекс $\text{CH}_3\text{COOCa}^+$, впливаючи таким чином на концентрацію вільних іонів кальцію в розчині і створюючи умови для утворення кальційдефіцитного гідроксиапатиту (КДГА). З літературних джерел відомо, що ацетатний іон сприяє утворенню октакальцієвого фосфату при температурі 40°C у майже нейтральному середовищі. КДГА має склад, наближений до природного кісткового мінералу. Він є прекурсором для отримання біфазної кальцій-фосфатної кераміки, що демонструє хороші результати при заміщенні нативної кістки.

Запропоновані методики синтезу на основі недорогих реагентів за м'яких умов дозволяють одержувати мультифункціональні наноматеріали для біомедичного призначення.

2.2. Розроблення методики синтезу наноструктурованого карбонатапатиту

Відомо, що ГА має низьку розчинність ($\text{DR} = 3 \cdot 10^{-116}$). З метою підвищення розчинності та покращання резорбції кальцій-фосфатних матеріалів були створені кальційдефіцитний гідроксиапатит (КДГА), карбонатапатит, а також біфазні композити, що містять ГА і трикальцій фосфат (ТСП) $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ ($\text{DR} = 0,2 \cdot 10^{-29}$). КДГА має склад, наближений до природного кісткового мінералу. Він є прекурсором для отримання біфазної кальцій-фосфатної кераміки, що демонструє хороші результати при заміщенні нативної кістки. Крім того, КДГА може використовуватися як адсорбент протеїнів, як біоміметичне покриття для ендопротезів, як складова цементів, зокрема в композитах з полімерами. При цьому подібне застосування КДГА є ефективним за умови його наявності в нанокристалічній

формі, за якої внаслідок великої питомої поверхні забезпечується високий ступінь активності частинок КДГА.

Вихідними речовинами для синтезу біфазних композитів були кальцію ацетат $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$ (0,167 мМ), натрію дигідрофосфат NaH_2PO_4 (0,1 мМ), натрію гідрокарбонат NaHCO_3 (0,02 мМ). Рівні умови для одночасної взаємодії іонів PO_4^{3-} та CO_3^{2-} з іонами Ca^{2+} і OH^- забезпечувалися додаванням суміші розчинів NaH_2PO_4 та NaHCO_3 .

Технологічний режим:

- рН = 11 з додаванням 10 М водного розчину NaOH ;
- прогрівання при $T = 80^\circ\text{C}$ протягом 10 хв;
- зістарювання протягом 24 год;
- промивання деіонізованою водою;
- відпал при 900°C протягом 1 год.

Були синтезовані зразки карбонатапатиту з додаванням та без додавання NaHCO_3 у ході базових реакцій а) та б) при додаванні до материнського розчину солі NaHCO_3 (0,2 мМ).

Результати синтезу продемонстровані на зразках № 5, 7, отримані згідно з реакцією а) та № 4, 6, згідно з реакцією б) (рис. 12).

Дифрактограми всіх досліджених зразків (№ 4–7), отриманих за реакціями а) та б) і прогрітих при 600°C , показує, що додавання до реакційної суміші солі гідрокарбонату натрію зменшує кристалічність продукту (для порівняння: зразки № 1, 2, 600°C на рис. 13).

Після прогрівання протягом 1 год при 900°C з'являється додаткова невелика фаза кальциту в обох типах зразків, а також значна частка ТСР (35 %) у зразках № 5, 7, отриманих з розчину з органічною компонентою. При цьому співвідношення Са/Р залишається в діапазоні ГА (1,67–1,64). Значна частка ТСР у зразках № 5, 7 свідчить про кристалізацію нестехіометричного ($\text{Ca}/\text{P} = 1,5$) ГА, а також про наявність дефектів кристалічної ґратки, спричинених частковим заміщенням іонів Ca^{2+} іонами Na^+ , наявними у розчині в момент утворення, та розміри яких близькі ($0,99 \text{ \AA}$ Ca^{2+} та $0,98 \text{ \AA}$ Na^+) або утворення карбонатапатиту за типом Б-заміщення групи ОН.

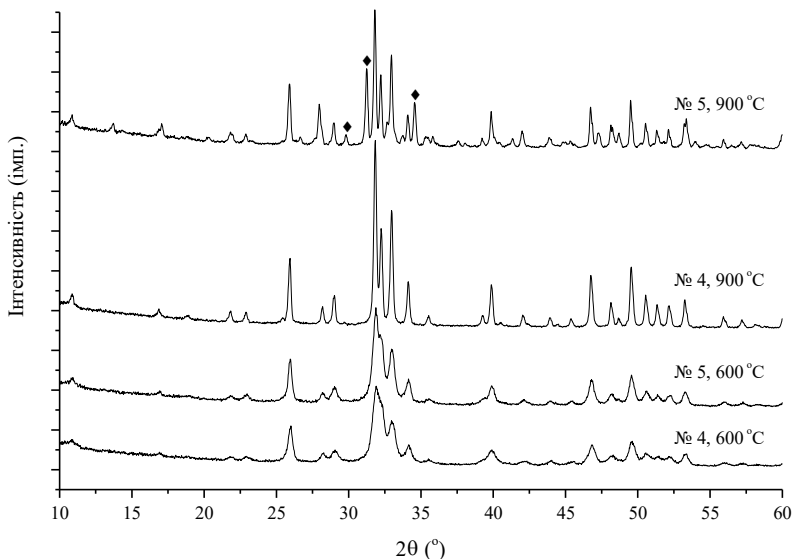


Рис. 12. Дифрактограми зразків № 5, реакція а), та № 4, реакція б). Символом \blacklozenge позначений основний пік фази ТСР

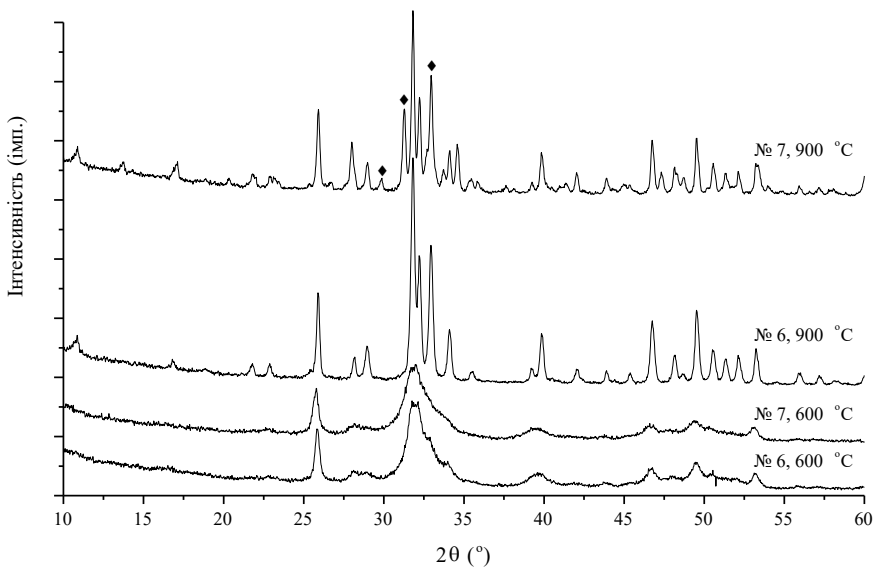


Рис. 13. Дифрактограми зразків № 7, реакція а), та № 6, реакція б). Символом \blacklozenge позначений основний пік фази ТСР

Концентрація фаз зразків № 4–7, прогрітих до 900 °С, та співвідношення Са/Р наведені в табл. 2.

Таблиця 2

Концентрація фаз та співвідношення Са/Р

Зразок	ГА		ТСР		Са/Р, ат. %
	Картка	Кон- цент- рація, %	Картка	Кон- цент- рація, %	
№ 4, Т = 900 °С	84–1998	100	–	–	1,667
№ 5, Т = 900 °С	84–1998	65	51–422	35	1,641
№ 6, Т = 900 °С	84–1998	100	–	–	1,667
№ 7, Т = 900 °С	84–1998	67	51–422	33	1,643

Вплив варіантів синтезу на розмір кристалітів наведений у табл. 3.

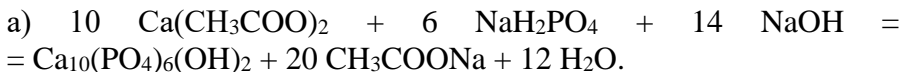
Результати свідчать, що в зразках, синтезованих за різними технологіями, та прогрітих при Т = 900°С протягом 1 години розмір кристалітів для відповідних площин є дещо меншим при синтезі б). Так, для ГА (площина 121) при синтезі а) розмір кристалітів 48–53 нм, а для синтезу б) в цій самій площині 36–46 нм; для ТСР (площина 104) при синтезі а) розмір кристалітів становить 29–43, при синтезі б) ця фаза відсутня.

Таблиця 3

Залежність розмірів кристалітів продукту від варіантів синтезу

Зразок	Фаза	Індекси Міллера	L, нм
Синтез б), зразок № 4, T = 900 °C	ГА	(0 0 2)	45,5
	ГА	(1 2 1)	46,6
	ГА	(0 0 4)	62
Синтез а), зразок № 5, T = 900 °C	ТСР	(1 0 4)	43,4
	ТСР	(3 0 0)	48
	ТСР	(0 2 10)	53,4
	ГА	(1 2 1)	53,2
	ТСР	(2 2 0)	56,3
Синтез б), зразок № 6, T = 900 °C	ГА	(0 0 2)	43
	ГА	(1 2 1)	36
	ГА	(0 0 4)	54,7
Синтез а), зразок № 7, T = 900 °C	ТСР	(1 0 4)	29
	ТСР	(3 0 0)	47
	ТСР	(0 2 10)	42,5
	ГА	(1 2 1)	48,2
	ТСР	(2 2 0)	46,4

На рис. 14 показане зображення морфології кристалів ГА, отриманого за хімічною реакцією



Одержаний осад має форму дрібнодисперсного порошку після сушіння у муфельній печі за температури 600 °С. Розмір кристалітів 23 нм у площині (002) та 28,5 нм у площині (004).

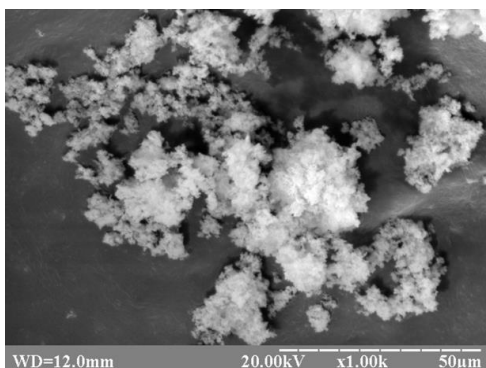


Рис. 14. Морфологія кристалів зразка № 5

На рис. 15 показаний ІЧ-спектр карбонатапатиту (нижній спектр). Асиметричні коливання в області 873 cm^{-1} та 1454 cm^{-1} належать карбонатним групам. Спектр, розміщений вгорі, належить стехіометричному ГА, вищевказані коливання в ньому відсутні. Аналіз спектра показав утворення карбонатапатиту змішаного А–В-типу.

Структурні дослідження вказують на те, що всі досліджувані частинки мають ниткоподібну структуру (рис. 16), їх середня довжина становить 80 нм. За даними електронної дифракції було встановлено наявність лише однієї фази – гідроксиapatиту.

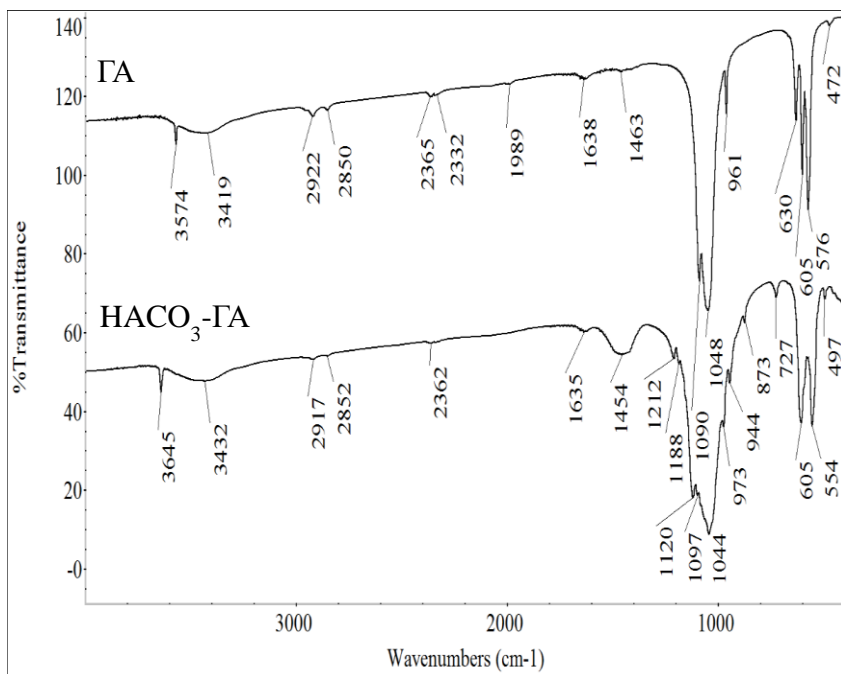


Рис. 15. ІЧ-спектри ГА (верхній) та карбонатапатиту (нижній)

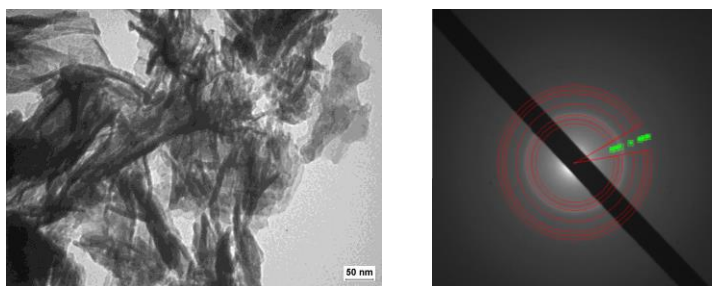


Рис. 16. Дослідження морфології кристалів та фазового складу карбонатапатиту методом електронної просвічувальної мікроскопії

2.3. Визначення кристалічної структури отриманих зразків методом рентгенівської дифракції

Для визначення кристалічної структури отриманих порошкових зразків використовували метод рентгенівської дифракції (XRD) – один із найбільш точних методів аналізу кристалічної структури. Він дозволяє знаходити декілька кристалічних параметрів полікристалічних зразків, а саме параметри ґратки, розмір кристалітів, напруження ґратки, домінуючу орієнтацію та текстуру. В комбінації з базою дифракційних даних JCPDS (Joint Comitee of Powder Diffraction Standards) XRD є досить швидкою і прецизійною технологією ідентифікації нових полікристалічних матеріалів.

Феномен рентгенівської дифракції на кристалах полягає в розсіюванні рентгенівського опромінення електронами атомів кристала без зміни довжини хвилі (когерентне, або бреггівське, розсіювання). Дифракційний пучок утворюється в цьому процесі лише за певних геометричних умов, що виражаються формулою Бреґга:

$$n \cdot \lambda = 2 \cdot d_{hkl} \cdot \sin(\Theta_{hkl}),$$

де d_{hkl} – відстань між площинами ґратки;

Θ – кут Бреґга;

λ – довжина хвилі рентгенівського випромінювання.

Відстань між площинами ґратки d_{hkl} (h, k, l – індекси Міллера розсіювальної площини ґратки) знаходять із положення рефлексу на дифрактограмі. Цей параметр прямо зв'язаний з параметрами ґратки (a, b, c). Всього існує сім кристалічних систем (триклинна, моноклінна, ромбічна, тетрагональна, тригональна, гексагональна і кубічна). Функції $f(d_{hkl}) = (a, b, c, h, k, l)$ для кожної із них можна знайти із відповідних формул. Наприклад, для кубічної і гексагональної систем існують такі формули:

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{\frac{4}{3}(h^2 + hk + k^2) + \left(\frac{a}{c}\right)^2 \cdot l^2}} ;$$

$$d_{hkl} = \frac{a}{\sqrt{h^2 + k^2 + l^2}} .$$

Інтенсивність рефлексів також несе певну інформацію [148]. Але мати справу з абсолютними інтенсивностями дуже важко, тому що багато фізичних факторів (поляризаційний, температурний, структурний та ін.) потрібно розрахувати або заміряти. В той же час, коли абсолютна інтенсивність є також функцією дифракційного об'єму (розмір зразка) і рентгенівського опромінення (інструментальні параметри), відносні інтенсивності залежать головним чином від «фізики» зразка. Тому є стандартом подавати дифракційні піки відносно найінтенсивнішого піку, отриманого від полікристалічного зразка з різними орієнтаціями кристалів у матеріалі.

Для отримання інформації про розміри кристалітів використовують формулу Селякова – Шеррера, що відбиває ефект збільшення ширини лінії рефлексу від розміру кристаліту (L):

$$L = \frac{K\lambda}{\beta_m \cdot \cos \Theta} ,$$

де λ – довжина хвилі;

Θ – кут дифракції;

β_m – фізичне уширення лінії;

K – константа ~ 1 .

Обробку та аналіз результатів, отриманих у ході основних експериментів у межах цієї роботи, було проведено з використанням дифрактометра Siemens D5000 в Інституті ядерної фізики Університету Мюнстера, Німеччина (рис. 17).

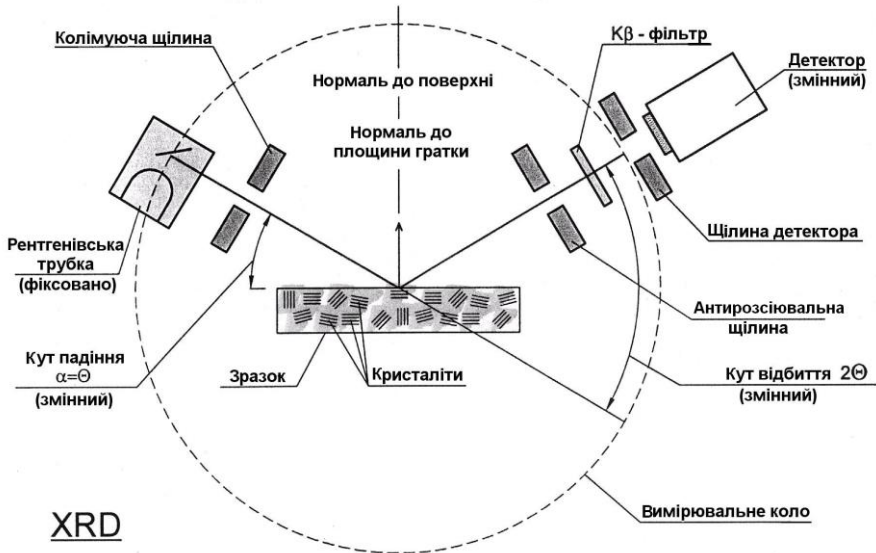


Рис. 17. Схематичне зображення дифрактометра Siemens D5000

На вимірювальному колі знаходяться нерухомо вмонтована рентгенівська трубка та детектор, що може вільно рухатися. В центрі вимірювального кола знаходиться поворотний відносно кола тримач проб, що фіксує поверхню проби в ортогональній до кола площині.

Технічна специфікація дифрактометра: рентгенівська трубка з мідним анодом виробляє рентгенівські хвилі такої довжини: $\text{Cu-K}\alpha_1 (\lambda = 1,541 \text{ \AA})$; $\text{Cu-K}\alpha_2 (\lambda = 1,544 \text{ \AA})$; $\text{Cu-K}\beta (\lambda = 1,392 \text{ \AA})$. $\text{Cu-K}\alpha$ -випромінювання відбувається при максимальній напрузі трубки 22 кВт, електричному струмі 30 мА, прискорювальній напрузі 40 кВ. $\text{Cu-K}\beta$ -випромінювання, що призводить до появи зайвих рефлексів, пригнічується нікелевим фільтром. Усі вимірювання були проведені методом стандартної рентгенівської дифракції, при якому кут падіння первинного рентгенівського променя завжди дорівнював куту виходу вторинного рентгенівського променя. При цьому проба рухалася відносно вимірювального кола з кутовою швидкістю Θ , а детектор – з кутовою швидкістю 2Θ , де Θ – кут Брегга. При

такій кутовій геометрії умова Брегга виконується лише для площин, що лежать паралельно поверхні проби. Внаслідок високого кута падіння з XRD-методом досягають відносно великих глибин, що дає більш глибоку інформацію про зразок.

У ході підготовки зразків до проведення рентгеноструктурного аналізу останні подрібнювалися до тонких порошків і пресувалися в таблетки діаметром 20 мм. Таблетки у спеціальних утримувачах поміщали в дифрактометр з фіксацією поверхні зразка у вимірювальній площині. Кут вимірювання 2Θ варіювався від 5 до 90° з розміром кроку $0,02^\circ$ і часом виміру 1 с/крок. Ідентифікація кристалічних фаз проводилася шляхом порівняння отриманих дифрактограм із довідковою базою даних JCPDS [136].

2.4. Визначення складу отриманих зразків методом мас-спектрометрії

У мас-спектрометричних дослідженнях використовували метод з іонізацією уламками поділу ^{252}Cf (PDMS), технічно реалізований на приладі МСБХ («Селмі», Суми, Україна) з параметрами: діапазон мас – 25000 а.о.м, розрізнявальна здатність 1000 за кластерами йодиту цезія, гранична чутливість – 1 пмоль за граміцидином S, точність визначення молекулярної маси $\pm 0,8$ а.о.м. у діапазоні до 5500 а.о.м. Джерелом первинних іонів, що десорбують та іонізують молекули досліджуваних зразків у МСБХ, є радіоактивний елемент ^{252}Cf , час напіврозпаду якого дорівнює 2,6 року. Основний відсоток спонтанного поділу ядер каліфорнію припадає на α -розклад (97 %), унаслідок якого утворюється кюрій-248, який не використовується з аналітичною метою у зв'язку з низькою десорбційною здатністю. Для іонізації проби застосовують високоенергетичні частки поділу ^{252}Cf (3 % загального поділу) ^{106}Tc та ^{142}Ba з кінетичною енергією 100 та 89 МеВ відповідно. Фрагментні ядра вилітають колінеарно у протилежних напрямках зі швидкістю 14 мм/нс для ^{106}Tc та 10 мм/нс для ^{142}Ba . Ця властивість використовується у

конструкції джерела іонізації через нанесення ^{252}Cf на тонку фольгу (від 1 до 5 мкм завтовшки). При цьому один уламок бомбардує зразок, а інший летить у протилежному напрямку і запускає стартовий детектор (рис. 18).

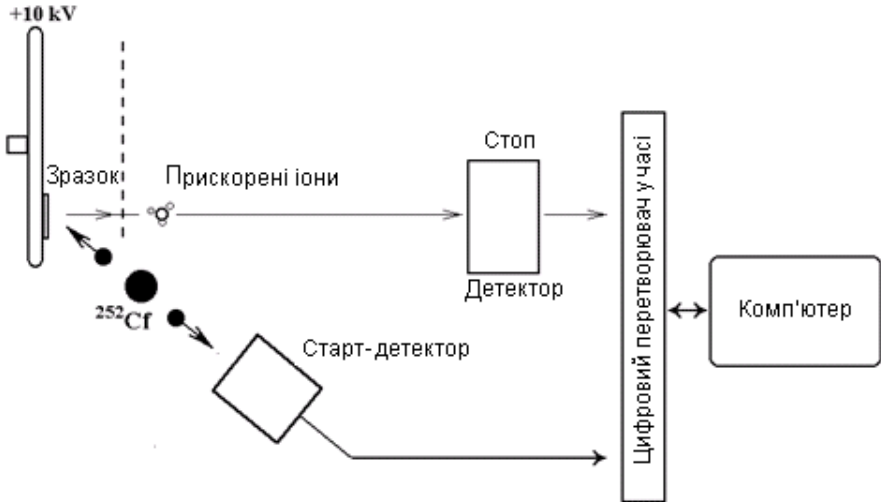


Рис. 18. Принципова схема побудови мас-спектрометра МСБХ

Джерело іонізації в МСБХ розташовується таким чином, що бомбардування зразків відбувається з боку нанесення зразка під кутом до поверхні зразка. Для нанесення зразків застосовувалися позолочені диски діаметром 60 мм, де одночасно можна розташувати 12 зразків. Зміна дослідного зразка відбувається внаслідок обертання диска навколо своєї осі. Позолочений пробоносний диск попередньо промивали у концентрованому розчині гідроксиду натрію протягом 24 годин, потім декілька разів промивали дистильованою водою, протирали безворсовою ватою, змоченою послідовно н-бутанолом та етанолом, промивали ацетоном класу “о. с. ч.”. Крапля розчину зразка для аналізу об’ємом 10–20 мкл наносилася на позолочений пробоносний диск таким чином, щоб розчин утворив пляму рівномірної товщини загальною

площею не більш ніж 1–1,5 см². Потім диск просушували у струмі теплого повітря до утворення на ньому сухого осаду й аналізували за допомогою МСБХ.

2.5. Використання п'єзогравіметрії для отримання ізотерм гідратації

Методика п'єзогравіметрії, що базується на залежності резонансної частоти кварцового кристала від маси матеріалу на його поверхні, була використана для отримання ізотерм гідратації. Зразки у вигляді плівок були отримані з використанням повільного випаровування води при 4 °С як щодо крапель чистого колагену, так й у разі колагенового розчину з НА, що наносилися прямо на кварцові пластини. Отримані плівки зволожнювали дозованою кількістю води з використанням спеціальної камери. Ізотерми гідратації, тобто залежності кількості сорбованої води (*n*) при відносній вологості (ВВ) у грамах на грам сорбенту або мольв води на моль сорбенту Gly-X-Y знаходили за допомогою формули [49]:

$$n = (M_{\text{Gly-X-Y}}/M_{\text{H}_2\text{O}}) \times (\delta f/\Delta f_m);$$

$$\delta f = \Delta f_i - \Delta f_m,$$

де Δf_i – різниця між базовою частотою коливання кварцового резонатора й отриманою при *i*-му значенні вологості; Δf_m – різниця в частоті коливання, що обумовлена сухим зразком порівняно із чистою пластиною; $M_{\text{Gly-X-Y}}$ і $M_{\text{H}_2\text{O}}$ – молекулярні маси трипептиду Gly-X-Y і молекули води. Точність вимірювань була на рівні +/- 0,01 г води на грам зразка або +/- 0,1 моль води на 1 моль Gly-X-Y.

Примітка. Gly-X-Y – основний фрагмент колагенової молекули, взятий для розрахунку.

2.6. Аналіз отриманих зразків методом інфрачервоної спектроскопії

Для отримання ІЧ-спектрів в інтервалі 900–3700 cm^{-1} використовували двопроменевий прилад (Karl Zeiss, Jena, Germany) з використанням призми із NaCl при кімнатній температурі, ІЧ-Фур'є-спектрометр VERTEX 70 та FT-Raman-приставки RAM II виробництва фірми BRUKER (Німеччина).

Плівки зразків чистого та мінералізованого колагену отримували прямо із крапель відповідних розчинів на кюветних вікнах із CaF_2 . Також таблетки із HA (0,8–1,2 мг + 500 мг KBr) використовували як зразки для отримання відповідних спектрів. В експериментах з гідратації плівки висушували у вакуумі (10^{-2} тор), а потім зволожували до фіксованої вологості в інтервалі ВВ 0–86 % завдяки їх інкубації в атмосфері пару насичених сольових розчинів в умовах термодинамічної рівноваги з використанням як H_2O , так і D_2O .

2.7. Використання растрової електронної мікроскопії для визначення морфології поверхні

Растрова електронна мікроскопія (РЕМ) з рентгенівським мікроаналізом була реалізована на приладі REMMA102 (SELMI, Україна). Прилад дозволяє візуалізувати поверхню зразка в широкому діапазоні збільшень з дозволом порядку 10 нм і одержувати дані про елементний склад з аналізу характеристичних рентгенівських спектрів, що збуджуються електронним зондом. Зображення зі збільшеннями 20, 120, 500, 2000 і 2500 були отримані в режимі вторинних електронів (рис. 19).

Вони характеризуються дуже малою енергією до 50 еВ і тому виходять з ділянок зразка, близьких до поверхні. Глибина шару, що дає вторинні електрони, становить 1–10 нм. Розсіювання електронів у межах цього шару невелике і ним можна знехтувати. Тому при одержанні зображень у вторинних електронах роздільна здатність визначається насамперед діаметром первинного зонда. Вторинні електрони забезпечують

максимальну, порівняно з іншими сигналами, роздільну здатність порядку 5–10 нм. Тому в РЕМ вони є головним джерелом інформації для одержання зображення поверхні об'єкта.

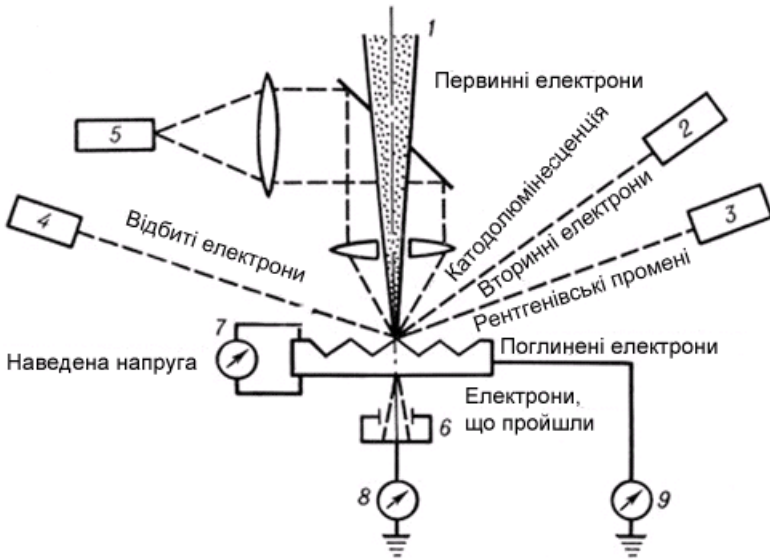


Рис. 19. Види випромінювань, що збуджуються електронним зондом

Кількість вторинних електронів, що утворюються, мало залежить від атомного номера елемента. Вимірювання проводилися при прискорювальній напрузі для електронного зонда 10 і 20 кВ, струм зонда дорівнював 20 нА.

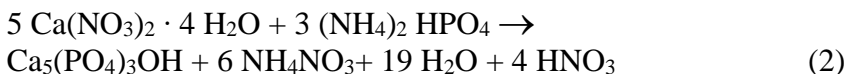
3. Структура катіонзаміщених кальцій-фосфатів

Під час розроблення нових матеріалів для хірургічних імплантатів максимальна увага приділяється поверхні, яка повинна бути мінімально реакційною, з одного боку, а з іншого – максимально біосумісною. На сьогодні існує великий спектр різних матеріалів від чистих металів та їх сплавів на основі титану (Ti), ванадію (V), алюмінію (Al), нікелю (Ni),

хрому (Cr) та ін., до полімерів, керамік та різних композитів [40, 139, 230].

3.1. Вплив іонів титану на формування кальцій-фосфатної фази

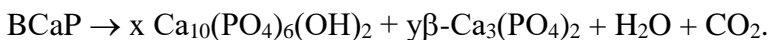
Титан завдяки своїм фізико-хімічним властивостям порівняно з іншими металами є найбільш популярним у практичній медицині. Але, як уже зазначалося вище, незважаючи на відносну інертність плівки з TiO_2 , внаслідок біологічної корозії під впливом ферментів живого організму іони титану все ж проникають до кісткової тканини, що призводить до ряду негативних наслідків у системі «імплантат – кісткова тканина». Більше того, завдяки дифузії вони проникають також до плазми крові й, таким чином, впливають на метаболізм організму в цілому [259]. Іони титану, ванадію, алюмінію також можуть гальмувати формування та ріст кристалів гідроксилапатиту [101, 235]. Зазначені факти стимулювали інтенсивні дослідження впливу іонів ряду металів на їх взаємодію з різними складовими кісткової тканини і насамперед з мінеральною компонентою – гідроксилапатитом [45, 101, 115, 162, 235, 259]. Тому одним із завдань наших досліджень було дослідження впливу іонів титану на формування ГА *in vitro* в модельній хімічній системі в широкому діапазоні концентрацій Ti^{3+} [207]. Дві базові реакції, які є найбільш типовими під час синтезу ГА [75, 259], були використані в роботі:



Реакції проводили при лужних рН і незначному (80 °С) нагріві. В результаті реакції (1) отримували ГА з домішками інших кальцій-фосфатних фаз. У той же час унаслідок реакції (2) отримували чистий ГА і тому ця реакція використовувалася як базова в подальших експериментах з вивчення впливу іонів

титану на синтез гідроксилапатиту з можливим заміщенням іонів Ca^{2+} іонами Ti^{4+} в його кристалічній ґратці. Для отриманих зразків були проведені рентгеноструктурні (XRD) дослідження, на основі яких був знайдений їх фазовий склад з використанням бази даних ASTM (American Society for Testing Materials). Дифрактограми ГА, синтезованого за відсутності іонів металів, відповідали стехіометричному ГА (сГА) (ASTM-9-0432). Потрібно зазначити, що у всіх не прогрітих або прогрітих до $600\text{ }^\circ\text{C}$ зразках спостерігалось перекриття основних піків спектра внаслідок малих розмірів кристалітів досліджуваних зразків. Достатнє розділення піків отримували після прогрівання зразка при $900\text{ }^\circ\text{C}$, а прогрівання при $1000\text{ }^\circ\text{C}$ не лише збільшувало розмір кристалітів, а й приводило до появи в спектрі ще одного піку, який відповідав α -трикальційфосфату (α -ТКФ). Поява цієї фази обумовлена термічною декомпозицією незначної залишкової кількості аморфної фази (АКФ), наявної в порошку досліджуваного гідроксилапатиту. Додавання іонів металів призводило до структурних змін у зразках, що відбивалось в дифрактограмах, знятих після їх термічної обробки. В непрогрітих зразках спостерігалось зменшення кристалічності (що приводило до зниження інтегральної інтенсивності піків) та розміру кристалітів (що приводило до збільшення ширини піків). Прогрівання отриманих порошоків до $600\text{ }^\circ\text{C}$ не приводило до утворення нових фаз, за винятком випадків при додаванні малих концентрацій солей ванадію та хрому. Подальше прогрівання до 900 і $1000\text{ }^\circ\text{C}$ спричиняло появу нових фаз, що містили ортофосфати кальцію з $\text{Ca/P} = 1,5$, переважно α -ТКФ (ASTM-9-0348) і β -ТКФ (ASTM-9-0169) (рис. 20).

α -ТСП та β -ТКФ є кристалографічними модифікаціями трикальційфосфату, останній з них характеризується меншою стабільністю при високих температурах. Появу цієї фази можна пояснити термічною декомпозицією нестехіометричного ГА ($\text{Ca/P} < 1,67$) із карбонатними іонами (так званого basic apatite - ВСаР). Декомпозиція ВСаР починається при $900\text{ }^\circ\text{C}$ згідно з реакцією [168]:



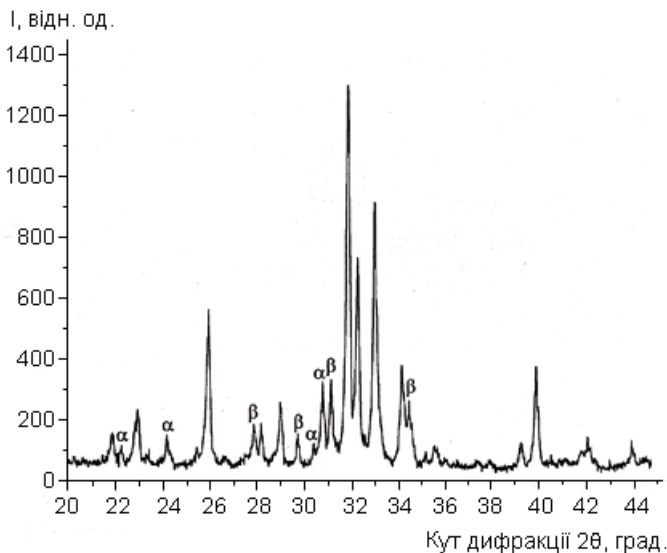


Рис. 20. Дифрактограма зразка ГА, синтезованого за наявності 4 % Ti^{3+} , після одногодинного прогрівання при 1000 °С. Невідмічені піки відповідають сГА (ASTM-9-0432), α відповідає α -ТКФ, β - β -ТКФ

Із рис. 20 бачимо, що цей зразок характеризується великим вмістом α -ТКФ та β -ТКФ. Ці дві модифікації ТСП спостерігалися в усіх прогрітих зразках, синтезованих за наявності іонів металів, за винятком кобальту, для якого чиста фаза β -ТКФ була заміщена на іншу з такою самою дифрактограмою, як і β -ТКФ, але з помітним зсувом позицій дифракційних піків. Цей результат свідчить про формування фази та β -ТКФ з можливим частковим заміщенням іонів кальцію іонами кобальту. Таким чином, поява цих двох кальцій-фосфатних фаз відображає порушення процесів кристалізації сГА внаслідок додавання іонів металів.

На рис. 21 для порівняння наведені дифрактограми зразків, в яких частка іонів титану становила від 1 до 20 % від кількості іонів кальцію в продукті реакції, а в табл. 4 наведений

фазовий склад зразків після їх термічної обробки при 900 та 1000 °С.

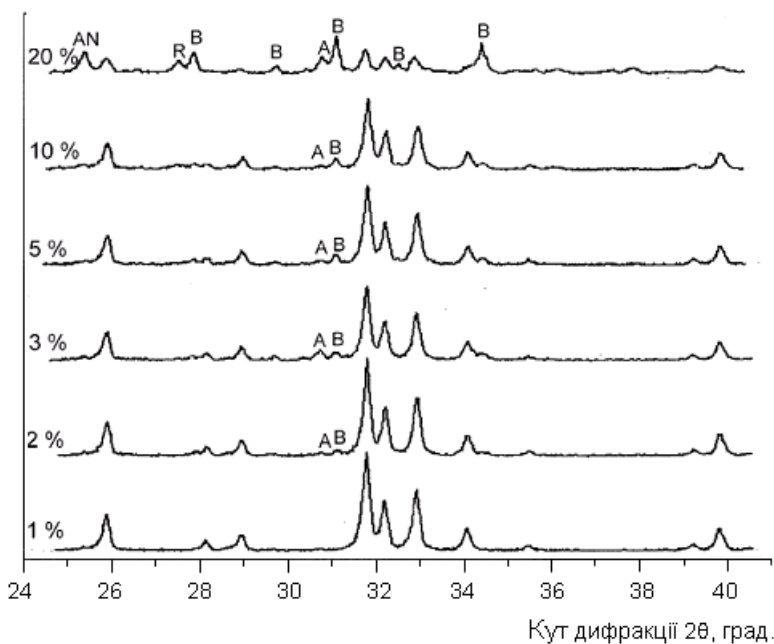


Рис. 21. Дифрактограми зразків ГА, синтезованих за наявності іонів Ti^{3+} з концентраціями від 1 до 20 % (щодо вмісту Ca^{2+}), і прогрітих при 950 °С протягом 1 години. Головні піки відповідають сГА, а позначені символами А, В, R та AN – відповідно α -ТКФ, β -ТКФ, рутил, анатаз

Як бачимо з рис. 20, зі збільшенням вмісту катіона, що, ймовірно, заміщує іони кальцію (в цьому випадку іона титану) в гідроксилапатиті, кількість додаткових фаз та інтенсивність їх впливу в продукті збільшується пропорційно відсотку концентрації доданого іона металу.

Таблиця 4

Фазовий склад ГА, отриманого за наявності іонів титану кількістю від 1 до 20 % після їх термічної обробки

№	Зразок	Фазовий склад при t:		Хімічна формула	ASTM-шифр
		900 °С	1000 °С		
1	ГА	ГА	ГА	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	9-0432
			α	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348
2	ГА + (1–5) % Ti	ГА	ГА		
		α	α		
			β	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0169
3	ГА + 6 % Ti	ГА	ГА		
		α	α		
		β	β		
4	ГА + (7–10) % Ti	ГА	ГА		
		α	α		
		R	β	TiO_2	21-1276
			P	CaTiO_3	22-0153
5	ГА = (11–19) % Ti	ГА	ГА		
		α	α		
		β	β		
		R	R		
		P	P		

Примітки: α – α -ТСП; β – β -ТСП; R – рутил; P – перовскіт ; А – анатаз

Поява додаткових фаз – оксидів металів (TiO_2 – рутил, анатаз) та кальцієвих оксидів металів (CaTiO_3 – перовскіт) при високих концентраціях і температурах (рис. 20, 21) свідчить про те, що іони металів не лише порушують процеси кристалізації сГА, а й мають властивість до включення у кристалічну ґратку основної фази (ГА), що приводить до виникнення нестехіометричного ГА.

3.2. Вплив іонів кобальту на формування кальцій-фосфатної фази

Додавання розчину солі кобальту під час реакції синтезу гідроксилапатиту до материнського розчину кальційнітрату супроводжувалося появою інтенсивного червоного забарвлення. Осад, що утворився після додавання розчину діамонійгідрофосфату, на відміну від експериментів із титаном, мав пухку (бавовноподібну) консистенцію. Після завершення реакції (включаючи додавання аміаку та прогрівання) осад набував фіолетового забарвлення. Після фільтрування та висушування непрогріті проби з підвищенням вмісту кобальту набували порошкоподібної консистенції. Наявність іонів кобальту в готовому продукті індукувала зменшення кристалічності кальцій-фосфатної фази, про що свідчать відповідні рентгенівські дослідження непрогрітих проб. Прогріті при 900 °С проби з малою часткою кобальту (0,5 та 1 %) відповідали ГА без наявних рефлексів α -ТКФ фази (рис. 22) [206].

Про наявність іонів кобальту в зразках свідчила поява фонові флюоресценції, що стрімко зростала зі збільшенням кількості кобальту.

У пробах з високим вмістом кобальту та прогрітих при 1000 °С траплялися фази, що мали велику подібність до β -ТКФ (табл. 5). При великих відсотках доданих іонів кобальту піки фаз були зміщені на $\Delta 2\Theta \approx 0,25^\circ$.

Точний аналіз за допомогою бази даних JCPDS привів до припущення існування кальцій-кобальт-фосфатної фази ($\text{Ca}_{19}\text{Co}_2(\text{PO}_4)_{14}$). Ця фіолетова сіль, як і β -ТКФ, має ромбодричну кристалічну структуру, а також подібні параметри кристалічної ґратки. Хімічна формула відповідає злиттю 7 формул β -ТКФ, причому 2 атоми кальцію заміщені атомами кобальту.

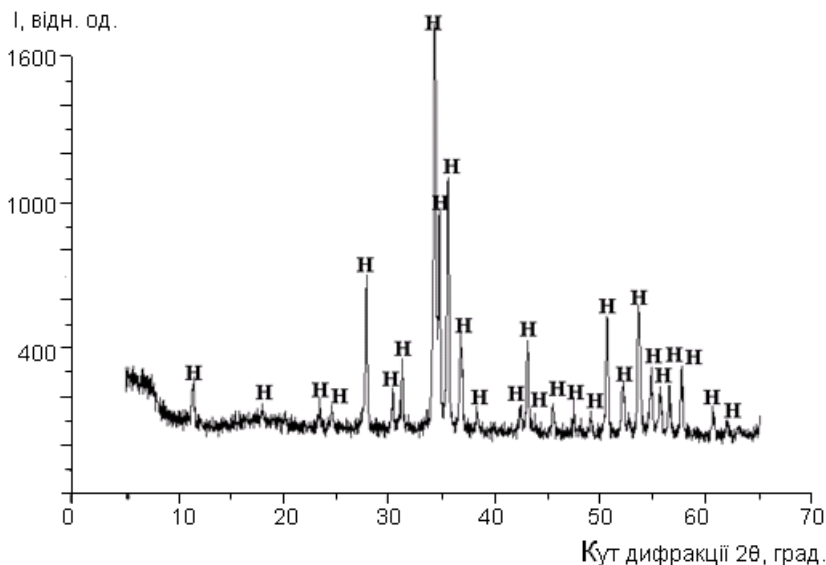
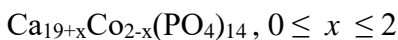


Рис. 22. Дифрактограма зразка ГА, синтезованого за наявності іонів Co^{2+} з концентрацією 1 % і прогрітого при $900\text{ }^\circ\text{C}$ протягом 1 години. Всі піки (H) відповідають сГА

Оскільки дифрактограми кальцій-кобальт-фосфату (ККФ) та β -ТКФ практично ідентичні за винятком відносного зсуву піку на $0,25^\circ$, неможливо за не точно визначеного положення піку з упевненістю сказати, яка із двох фаз є в наявності. Виходячи з того, що іонний радіус Co^{2+} ($0,745\text{ \AA}$) менший від іонного радіуса Ca^{2+} ($1,0\text{ \AA}$), параметри кристалічної ґратки ККФ зменшені на 0,6 % порівняно з β -ТКФ. Фаза, пік якої є зміщеним, повинна, таким чином, пояснюватися зміною частки кобальту в зразку. В більшості випадків положення піків вище згаданих додаткових фаз знаходяться між β -ТКФ та ККФ згідно з даними JCPDS. Цей факт породжує припущення, що жодна із двох фаз існує не в чистій формі, а, ймовірніше, як змішана фаза, що може бути описана такою формулою:



Ця сполука перетворюється при $x = 2$ в β -ТСП, а при $x = 0$ – в чистий ККФ. У зразках із високим вмістом кобальту щоразу був

наявним пік, який відповідав оксиду кобальту (Co_3O_4), що утворився, ймовірніше за все, при нагріванні внаслідок реакції близьких до поверхні ґратки атомів кобальту та кисню.

Таблиця 5

Фазовий склад ГА, отриманого за наявності іонів кобальту кількістю від 1 до 20 %, після їх термічної обробки

№	Зразок	Фазовий склад при t:		Хімічна формула	ASTM-шифр
		900 °C	1000 °C		
1	ГА	ГА	ГА	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	9-0432
			α	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348
2	ГА + (0,5) % Со	ГА	ГА		
		α	β	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0169
3	ГА + 1 % Со	ГА	ГА		
		α	С		
4	ГА + (1,5–4,5) % Со	ГА	ГА		
		С	С	$\text{Ca}_{19+x}\text{Co}_{2-x}(\text{PO}_4)_{14}$	
5	ГА + (8,10) % Со	ГА	ГА		
		С	С		
		СО	СО	Co_3O_4	78-1970

Примітки:

α – α -ТКФ; β – β -ТКФ; С – $\text{Ca}_{19+x}\text{Co}_{2-x}(\text{PO}_4)_{14}$; СО – Co_3O_4

3.3. Вплив іонів ванадію на формування кальцій-фосфатної фази

Дія хлориду ванадію на базовий синтез ГА помітна уже під час реакції. Реакційна суміш демонструє чітке коричневе забарвлення. Крім того, нерозчинні дисперсні фази з вищим вмістом ванадію були менш об'ємними, ніж фази з малою часткою ванадію. Повне забарвлення дисперсійної системи під час реакції, як і знебарвлення, отриманого після фільтрації та промивання проби фільтрату, свідчать про те, що іони ванадію

повністю взяли участь у реакції отримання нерозчинного продукту. Після висихання всі порошкові проби мали світло-сірий колір, який після прогрівання проби вже при 900 °С при відсотковому вмісті ванадію приблизно 4,5 % перетворювався в жовтий. Як і у разі з титаном, експериментальні дослідження з дифракції показали, що кристалічність непрогрітих проб падає з підвищенням вмісту ванадію. Дифрактограми проб із високим вмістом ванадію (6 та 10 %) вже при 600 °С чітко показали наявність додаткової фази, яку можна було ідентифікувати як фазу β -ТКФ.

Таблиця 6

Фазовий склад ГА, отриманого за наявності іонів ванадію кількістю від 1 до 10 % після їх термічної обробки

№	Зразок	Фазовий склад			Хімічна формула	ASTM
		600 °С	900 °С	1000 °С		
1	ГА		ГА	ГА	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	9-0432
				α	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348
2	ГА + 0,5 % V	ГА	ГА	ГА		
			α	α		
				β	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0169
3	ГА + (1–2,5) % V	ГА	ГА	ГА		
			α	α		
			β	β		
4	ГА + (3–4,5) % V	ГА	ГА	ГА		
			β	β		
5	ГА + 5 % V	ГА	β	β		
6	ГА + 6 % V	ГА	β	β		
		β				
7	ГА + 10 % V	ГА	β	β		
		β		CV	$\text{Ca}(\text{VO}_3)_2$	73-0971

Примітки: α – α -ТСП; β – β -ТСП; CV – $\text{Ca}(\text{VO}_3)_2$.

Як бачимо з табл. 6, прогрівання порошку до 900 °С призводить до утворення додаткових фаз уже в пробах, які вміщують лише 0,5 % ванадію. Прогрівання при 1000 °С підсилювало цей ефект. При значному (10 %) вмісті ванадію об'єм порошкової проби в процесі нагрівання стрімко зменшувався. Крім того, забарвлення порошку ставало темно-жовтим із червоно-коричневими крапинами, що свідчило про утворення додаткової фази, яка була ідентифікована як кальцій-ванадій-оксид ($\text{Ca}(\text{VO}_3)_2$) (табл. 6). Ми припускаємо, що однією із причин виникнення фази $\text{Ca}(\text{VO}_3)_2$ у прогрітих до 1000 °С пробах зі вмістом ванадію 10 % є те, що вбудовані іони ванадію частково мігрують на поверхню кристалів ГА, де вступають у реакцію з атомами кисню.

3.4. Вплив іонів хрому на формування кальцій-фосфатної фази

У процесі синтезу гідроксилапатиту за наявності іонів хрому (III), доданих у формі солі $\text{Cr}(\text{NO}_3)_3 \cdot 9\text{H}_2\text{O}$, утворювався негомогенний осад, що мав зелено-блакитне забарвлення. Відфільтрована після осідання осаду рідка фаза не мала кольору. Забарвлення ж осаду після промивання та висушування залишалось. Структурні дослідження непрогрітих порошкових проб показують, що кристалічність отриманих кальцій-фосфатів із підвищенням частки хрому значно знижується. Після одногодинного нагрівання вже при 600 °С у дифрактограмі проби з 20 % іонів хрому поряд із піками ГА з'явилися нові рефлекси, що відповідали додатковим кристалічним фазам, а саме β -ТКФ та оксиду хрому (Cr_2O_3) (табл. 7). Утворення β -ТКФ при температурі 600 °С може пояснюватися декомпозицією нестехіометричного гідроксилапатиту. Одночасна поява β -ТКФ та оксиду хрому дає можливість припустити, що обидві субстанції в непрогрітих пробах уже наявні в аморфній або слабокристалічній формі. В процесі нагрівання при 600 °С їх кристалічність настільки підвищується, що їх наявність, меншою мірою, в пробі з 20 % хрому, може бути підтверджена рентгенодифракційними дослідженнями. Нагрівання проб при

900 °С та при 1000 °С призводило вже за малих відсотків доданих іонів хрому до утворення додаткової фази – α -ТКФ (табл. 7).

Таблиця 7

Фазовий склад ГА, отриманого за наявності іонів хрому кількістю від 0,25 до 20 % після їх термічної обробки

№	Зразок	Фазовий склад			Хімічна формула	ASTM-шифр
		600 °С	900 °С	1000 °С		
1	ГА	ГА	ГА	ГА	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	9-0432
				α	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0348
2	ГА + + 0,25 % Cr	ГА	ГА	ГА		
			α	α		
				β	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	9-0169
3	ГА + 1 % Cr	ГА	ГА	ГА		
			α	α		
			β	β		
4	ГА + + 1,5 % Cr	ГА	ГА	ГА		
			α	β		
			β			
5	ГА + (2– 3,5) % Cr	ГА	ГА	ГА		
			β	β		
6	ГА + (4– 5) % Cr	ГА	ГА	ГА		
			β	β		
			CR		Cr_2O_3	
7	ГА + 8 % Cr	ГА	ГА	β		
			β	β		
			CR	CR		

Примітки: α – α -ТСП; β – β -ТСП; CR - Cr_2O_3 .

Молярне співвідношення Са/Р в утвореному апатиті зменшилося. При нагріванні, ймовірно, одна частина аморфної

фази перетворилася в α -ТКФ, а інша у збагачену іонами хрому фазу β -ТКФ. Іони хрому, що ввійшли у кристалічну ґратку β -ТКФ, взаємодіючи з киснем, перетворювалися в Cr_2O_3 .

3.5. Вплив іонів алюмінію на формування кальцій-фосфатної фази

Непрогріті проби з малим вмістом алюмінію (менше 5 %) не мали практично ніякої різниці в ширині піків та інтегральних інтенсивностях в отриманих дифрактограмах. Починаючи з додавання іонів алюмінію кількістю 5 %, спостерігалася зниження ступеня кристалічності досліджуваних зразків. При доданій кількості іонів алюмінію, що дорівнювала 10 %, кристалічність різко знижувалася. Під час прогрівання проб до 600 °С, хоча кристалічність та розмір кристалів апатиту зростали, все ж інтегральна інтенсивність рефлексів була нижчою порівняно з чистим ГА. Подальше нагрівання призводило до утворення фаз α -ТКФ та β -ТКФ. При збільшених кількостях доданих іонів алюмінію в дифрактограмах з'явилися лінії, які відповідали кальцій-алюміній-фосфату $Ca_9Al(PO_4)_7$ (табл. 8).

Таблиця 8

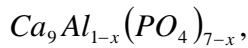
Фазовий склад ГА, отриманого за наявності іонів алюмінію кількістю від 0,25 до 20 % після їх термічної обробки

№	Зразок	Фазовий склад		Хімічна формула	ASTM-шифр
		900 °С	1000 °С		
1	ГА	ГА	ГА	$Ca_5(PO_4)_3OH$	9-0432
			α	$Ca_3(PO_4)_2$	9-0348
2	ГА + + 0,25 % Al	ГА	ГА		
		α	α		
			β	$Ca_3(PO_4)_2$	9-0169

№	Зразок	Фазовий склад		Хімічна формула	ASTM-шифр
		900 °C	1000 °C		
3	ГА + 1,0–4,5 % Al	ГА	ГА		
		α	α		
		β	β		
4	ГА + 10–20 % Al	AP	AP	Ca ₉ Al(PO ₄) ₇	48-1192

Примітки: α – α -ТСП; β – β -ТСП; AP – Ca₉Al(PO₄)₇

Ця сполука за своєю кристалічною структурою до певної міри збігається зі структурою β -ТКФ, щоправда, має дещо менші параметри кристалічної ґратки. Оскільки рефлекси в дифрактограмах не можуть бути однозначно віднесені до жодної із двох фаз, то з цього виходить, що в цьому разі також мова може йти про змішану фазу, яка може бути трактована як фаза β -ТКФ із частковим заміщенням атомів кальцію на атоми алюмінію:



де $0 \leq x \leq 1$.

Ця формула перетворюється в чистий β -ТСП при $x = 1$, а при $x = 0$ – у чистий кальцій-алюміній-фосфат.

Рис. 23 демонструє модель шляхів трансформації АКФ залежно від температури прогрівання зразків, отриманих за участі іонів металів [21].

Вплив іонів металів на процес формування ГА проявляється у порушенні трансформації аморфного кальцій-фосфату в стехіометричний гідроксилапатит (біла стрілка) у бік формування нестехіометричного апатиту (показаний у вигляді підкресленого ВСаР). Стрілки, що проходять через межі температурних зон, демонструють викликані термічним впливом трансформації або порушення у модельних системах зі вмістом доданих іонів металів. Чорні стрілки відповідають шляхам трансформації, що закономірні для модельних систем

без домішок металів. Сірі стрілки демонструють шляхи трансформації, можливі для систем лише під впливом металів.

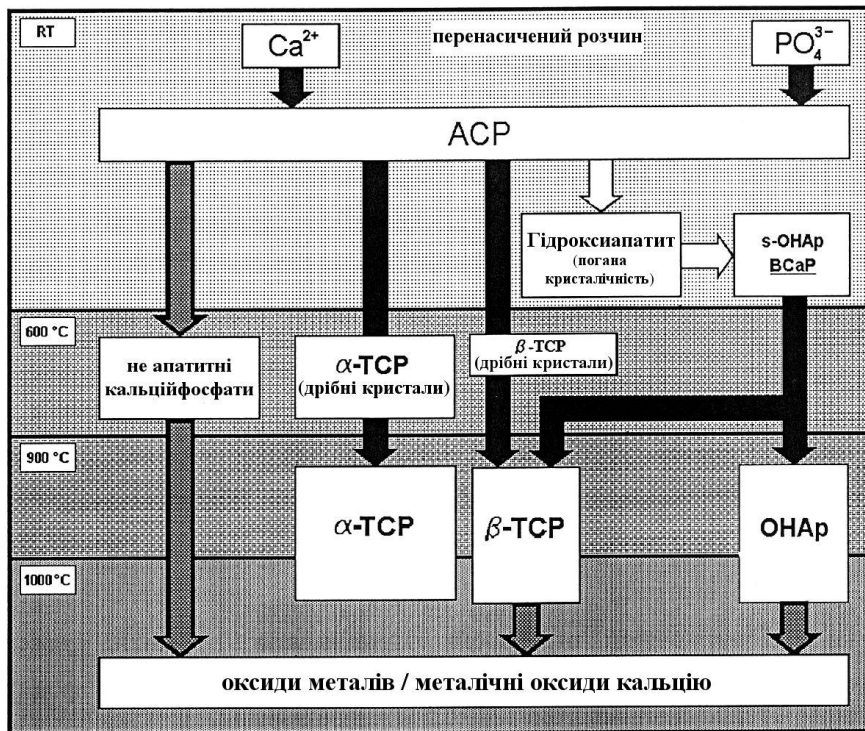


Рис. 23. Схематична діаграма впливу іонів металів на утворення ГА

При оцінюванні можливих пошкоджень кісткової тканини внаслідок виявлених ефектів необхідно враховувати складність впливу біологічного оточення на фізико-хімічні аспекти кальцифікації. Але, незважаючи на те, що хімічна модель для вивчення мінералізації гідроксилапатитом *in vitro*, викладена в цьому розділі монографії, виглядає досить простою порівняно з реальною біологічною системою, знайдені ефекти, ймовірно, також повинні бути взяті до уваги під час розгляду процесу остеointegraції *in vivo* та створення нових біологічних матеріалів зі вмістом кальцій-фосфатів.

При імплантації суглобного протеза спостерігається істотна зміна еластичних характеристик суглоба, що може бути компенсовано завдяки безперервному процесу утворення нової кісткової тканини. Цей процес реконструкції (remodeling) кісткової тканини можна контролювати експериментально шляхом вимірювання щільності кісткового матеріалу (bone mineral density – BMD). Параметр BMD може зменшитися більш ніж на 20 % через втрату навантаження при появі імплантата [203]. Цей параметр корелює з механічними (жорсткість, міцність) характеристиками кісткового матеріалу. В свою чергу, механічні характеристики мають сильну залежність від кристалографічних характеристик мінералізованої тканини. Тому вплив іонів металів на процес кальцифікації можна розглядати як ще один важливий фактор у процесі остеointegraції імплантата.

Результати проведених досліджень демонструють, що іони металів загальмовують процес трансформації аморфного кальцій-фосфату в гідроксилапатит. Подібний ефект може приводити до появи іншої кальцій-фосфатної фази поряд або на поверхні імплантата, наслідком чого може бути довготривала нестабільність на поверхні розділу «кістка-імплантат» [176]. Особливий вплив можна очікувати в ситуації, коли іони металів виступають не лише в ролі інгібіторів кристалізації, а й впливають на фізико-хімічні властивості нових кісткових тканин на фундаментальному рівні. Так, наприклад, допускається, що більш слабка фіксація кісткою імплантата, виготовленого зі сплаву $TiAl_6V_4$, порівняно із чистим Ti обумовлена розчинністю іонів алюмінію, що приводить до погіршення механічних характеристик новоствореного кісткового матеріалу [37].

Найбільш імовірно, що кристалографічна модифікація мінералізованої тканини має пряме відношення до зміни пористості кістки, сформованої за наявності іонів металів. Дослідження біосумісності керамічних матеріалів показали, що пористість є важливим фактором для вrostання кровоносних судин у матеріал [224]. Брак системи судин не сприяє механічним навантаженням протягом тривалого часу. До того ж ефект впливу іонів металів посилює хірургічну травму, що

пов'язана з резекцією головки суглоба і вилученням кісткового мозку.

Кістка як жива тканина повинна адаптувати себе в разі перманентних змін механічних навантажень шляхом резорбції старої тканини і формування нової тканини. Цей процес кінетики критично залежить від розчинності матеріалу, що підлягає резорбції. Біологічний апатит існує в хімічних композиціях зі включенням поряд з Ca^{2+} та PO_4^{3-} інших іонів (CO_3^{2-} , F^- та ін.), проте співвідношення Ca/P знаходиться близько до 1,67, тобто відповідає сГА. Добре відомо, що розчинність ортофосфатів збільшується зі зниженням співвідношення Ca/P [152]. Крім того, випробування біологічних кальцій-фосфатних керамік з різними стехіометричними співвідношеннями на біосумісність демонструють значні зміни в поведінці резорбції [50, 181]. Результати наших модельних експериментів показують, що іони металів помітно зменшують параметр Ca/P у синтезованому за їх наявності ГА. На це вказують лінії на дифрактограмах, що відповідають появі β -ТКФ. Висока концентрація іонів металів знижує Ca/P до величини 1,5, що обумовлено появою фаз, таких як ТКФ, розчинність яких у 60 разів вища порівняно з сГА. Перенесення цих ефектів на ситуацію *in vivo* можливе, якщо припустити вихід із імплантанта в навколишнє середовище іонів металів, які сприяють підвищенню розчинності новоствореної кісткової тканини і, таким чином, впливають на прискорення резорбції під час формування нової фази. Але при цьому потрібно мати на увазі, що на реконструкцію як здорової, так і запальної кісткової тканини негативно впливає як низька, так і висока швидкість резорбції [98].

3.6. Ідентифікація кальцій-фосфатних біоматеріалів із використанням плазмово-десорбційної мас-спектрометрії

Існує ряд фізико-хімічних методів, що дозволяють визначити склад і структуру кальцинованих біологічних об'єктів. Найбільш простим є мокрий хімічний аналіз, однак він найбільш неточний. Широке застосування знаходить метод рентгенівської дифракції, проте його принциповим обмеженням є неможливість дослідження аморфних об'єктів (наприклад, карбонатний апатит). Інфрачервона спектроскопія нативних зразків дає складні спектри внаслідок взаємодії відомих біоматеріалів із невідомими речовинами. Таким чином, необхідно застосовувати різні взаємодоповнювальні методики дослідження. Одним із таких методів є десорбційна мас-спектрометрія. Для впевненої інтерпретації мас-спектрометричних даних складних зразків біологічного походження доцільно вивчити процеси іоноутворення і характер мас-спектрів «чистих» синтетичних аналогів біооб'єктів, зокрема біоapatиту. Ми провели мас-спектрометричні дослідження синтетичного гідроксиapatиту, що використовується для створення біоматеріалів, з використанням плазмово-десорбційної мас-спектрометрії (^{252}Cf PDMS). Гідроксиapatит був отриманий за стандартною методикою з вихідних розчинів $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ і $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$. Наявність гідроксиapatиту було підтверджено кристалографічно, методом рентгенівської дифракції. Мас-спектри записувалися на установці МСБХ-1 (виробництво SELMI, Україна), що є часопролітним (ToF) мас-спектрометром з іонізацією проби уламками поділу ядер ^{252}Cf . Зразки гідроксиapatиту розтирали в агатовій ступці до формування однорідного дрібнодисперсного порошку, змішували з бідистильованою водою і висушували безпосередньо на позолоченому диску, що несе проби без використання додаткових матриць або сполучних агентів. Мас-спектри були записані в діапазоні мас (m/z) до 1500 Да, прискорювальна напруга становила +10 і -10 кВ. Мас-спектри неорганічних солей, зокрема гідроксиapatиту та інших фосфатів кальцію, як правило, містять піки діагностичних іонів, масові числа та

співвідношення інтенсивностей яких дозволяють робити висновки про склад досліджуваної речовини. Рис. 24 демонструє мас-спектри гідроксиapatиту, отримані методом плазменно-десорбційної мас-спектрометрії (^{252}Cf PDMS). Усі мас-спектри, записані в режимі позитивних іонів, містять інтенсивні піки, що відповідають Ca^+ з m/z 40, $[\text{CaO}]^+$ з m/z 56, $[\text{CaOH}]^+$ з m/z 57, а також піки, що відповідають $[\text{CaPO}_2]^+$ з m/z 103, $[\text{Ca}_2\text{PO}_3]^+$ з m/z 159, і $[\text{Ca}_2\text{PO}_4]^+$ з m/z 175 (див. рис. 24). Мас-спектри, записані в режимі негативних іонів, містять інтенсивні піки, що відповідають іонам зі стехіометрією: $[\text{HPO}]^-$ з m/z 48, $[\text{H}_2\text{PO}]^-$ з m/z 49, $[\text{H}_3\text{PO}]^-$ з m/z 50, $[\text{PO}_2]^-$ з m/z 63 і $[\text{PO}_3]^-$ з m/z 79. Також у спектрах наявні піки $[\text{HPO}_4]^-$ з m/z 96 і $[\text{H}_2\text{PO}_4]^-$ з m/z 97. Необхідно зазначити, що всі спектри негативних іонів мають настільки ж інтенсивні і добре розділені піки, як і спектри позитивних іонів. Таким чином, були зафіксовані кластерні іони, що містять фосфатні групи та кальцій і які можуть служити діагностичними іонами для кальцій-фосфатних матеріалів. В області більш важких іонів у спектрі гідроксиapatиту наявні три виражені серії кластерних іонів, що відрізняються один від одного на 56 масових одиниць, які можна приписати фрагменту зі стехіометрією CaO . Перша серія таких піків (позначена як серія А) відома з літературних джерел [105], дві останні описані нами вперше. Кожна серія «зводиться» до найпростішого кластера – для серій А, В і С відповідно:

- А - m/z 175 $[\text{Ca}_2\text{PO}_4]^+$, $[\text{CaPO}_3 \cdot (\text{CaO})]^+$
- В - m/z 542 $[\text{Ca}_8\text{P}_2\text{O}_{10}]^+$, $[2(\text{Ca}_3\text{PO}_4) \cdot 2(\text{CaO})]^+$
- С - m/z 851 $[\text{Ca}_{11}\text{P}_5\text{O}_{16}]^+$, $[3(\text{Ca}_3\text{PO}_4) \cdot 2(\text{CaPO}_2)]^+$

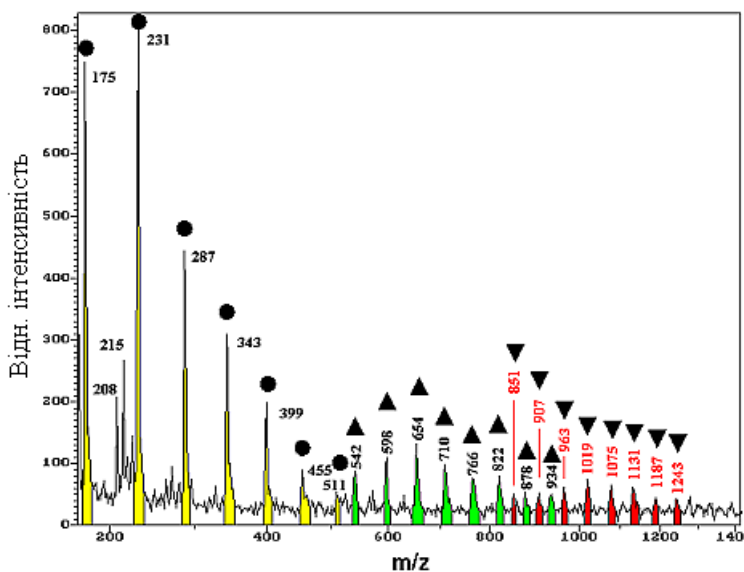
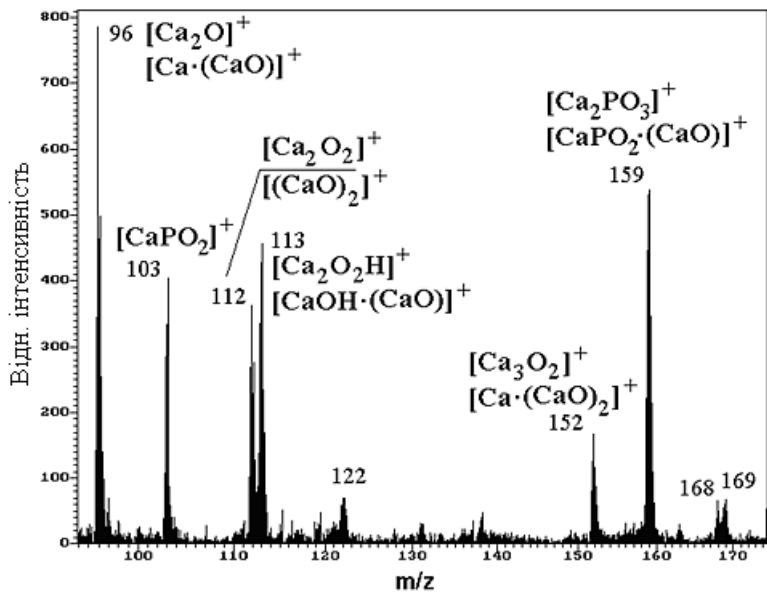


Рис. 24. ПДМС мас-спектри позитивних іонів гідроксиапатиту, середні маси (зліва) та великі маси (справа).

Позначені серії кластерних іонів: ● – серія «А», ▲ – серія «В», ▼ – серія «С» (див. табл. 9)

Таблиця 9

Характеристичні позитивні іони мас-спектрів ПДМС кальцій-фосфатних матеріалів (гідроксиапатит)

Масове число (m/z)	Ймовірна стехіометрія та структура	Примітка
40	[Ca] ⁺	
56	[CaO] ⁺	
57	[CaOH] ⁺	
96	[Ca ₂ O] ⁺ , [Ca·(CaO)] ⁺	
103	[CaPO ₂] ⁺	
112	[Ca ₂ O ₂] ⁺ , [2(CaO)] ⁺	
113	[Ca ₂ O ₂ H] ⁺ , [CaOH·(CaO)] ⁺	
122		
152	[Ca·2(CaO)] ⁺	
159	[Ca ₂ PO ₃] ⁺ , [CaPO ₂ ·(CaO)] ⁺	
168	[3(CaO)] ⁺	
169	[CaOH·2(CaO)] ⁺	
175	[Ca ₂ PO ₄] ⁺ , [CaPO ₃ ·(CaO)] ⁺	Початок серії, А
208	[Ca·3(CaO)] ⁺	
215	[Ca ₃ PO ₄] ⁺ (?)	
231	[A·(CaO)] ⁺	
287	[A·(CaO) ₂] ⁺	
343	[A·(CaO) ₃] ⁺	
399	[A·(CaO) ₄] ⁺	
455	[A·(CaO) ₅] ⁺	
511	[A·(CaO) ₆] ⁺	
542	[Ca ₈ P ₂ O ₁₀] ⁺ ,	Початок серії, В

	$[2(\text{Ca}_3\text{PO}_4) \cdot 2(\text{CaO})]^+$	
598	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})]^+$	

Продовження табл. 9

Масове число (m/z)	Ймовірна стехіометрія та структура	Примітка
654	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_2]^+$	
710	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_3]^+$	
766	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_4]^+$	
822	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_5]^+$	
851	$[\text{Ca}_{11}\text{P}_5\text{O}_{16}]^+$, $[3(\text{Ca}_3\text{PO}_4) \cdot 2(\text{CaPO}_2)]^+$	Початок серії, С
878	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_6]^+$	
907	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})]^+$	
934	$[\text{B} \cdot (\text{CaO})_7]^+$	
963	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_2]^+$	
1019	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_3]^+$	
1075	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_4]^+$	
1131	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_5]^+$	
1187	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_6]^+$	
1243	$[\text{C} \cdot (\text{CaO})_7]^+$	

Відносна інтенсивність піків у першій серії монотонно спадає зі зростанням маси, у другій і третій серіях максимальну інтенсивність мають піки іонів, що несуть (імовірно) 2 і 3 СаО. Згідно з літературними даними [60, 186, 251], для кластерів типу (СаО) *n* «магічні числа» відповідають *n* = 4, 6, 9, 12, хоча різниця в енергіях зв'язку порівняно невелика, що не відповідає нашим даним. Імовірно, ключову роль відіграє взаємодія СаО з «ядром» кластера або структура іона як цілого, що вимагає подальшого розрахункового підтвердження. Ці кластери можуть становити інтерес як найбільш стабільні кальцій-фосфатні структури, які виникають (або зберігаються) за взаємодії високоенергетичного первинного іона з поверхнею зразка гідроксиапатиту. Останніми роками з'явилися цікаві спроби використовувати вторинно-іонну мас-спектрометрію (ВІМС)

при аналізі кальцій-фосфатних біоматеріалів і біологічних кальцифікатів не лише як метод визначення розподілу елементів по поверхні (або зрізу) зразка, але також і для визначення (поки якісно) фазового складу і розподілу фаз, спираючись на різну інтенсивність характеристичних іонів. Так, у роботах [195, 245] досліджувалися розподілу різних фаз по поверхні, а в роботі [109] була зроблена спроба визначити фазовий склад ниркових каменів різної природи на підставі співвідношення інтенсивностей іонів у спектрах ВІМС із бомбардуванням іонами галію (рис. 25).

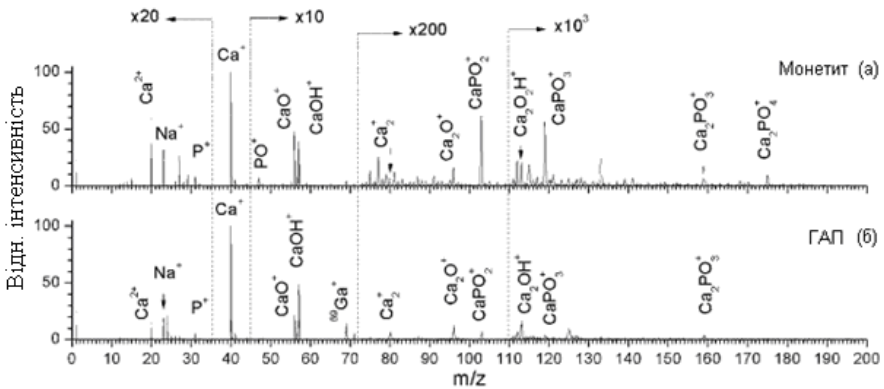


Рис. 25. ВІМС мас-спектри позитивних іонів монетиту (CaHPO_4) (а) і гідроксиапатиту (б) за даними роботи [109]

Рис. 25 відображає мас-спектри монетиту (CaHPO_4) і гідроксиапатиту, отримані під час бомбардування зразка іонами Ga^+ з енергією 14 кеВ. На думку авторів, для якісного розрізнення кальцій-фосфатних фаз досить визначити відношення інтенсивностей піків іонів $[\text{Ca}_2\text{O}]^+$ і $[\text{CaPO}_2]^+$. З порівняння наведених мас-спектрів ВІМС зі спектрами ПДМС бачимо, що співвідношення інтенсивностей цих іонів для гідроксиапатиту в мас-спектрах ПДМС також менше одиниці, незважаючи на різницю енергії первинної частки в кілька порядків (14 кеВ проти ~ 100 МеВ). Цікавим фактом є те, що як

у ПДМС, так і в ВІМС найлегшими діагностичними іонами можна вважати іони $[\text{Ca}_2\text{O}]^+$ і $[\text{CaPO}_2]^+$, що містять атоми як кальцію, так і фосфору, джерелом яких, очевидно, є фосфатні групи досліджуваного матеріалу. Наші попередні розрахунки [48] показують, що атоми кисню в тетраедрах фосфатних груп у фосфатах кальцію не є «рівноправними», і деякі з них пов'язані сильніше з кальцієм (Ca-O), ніж із фосфором. Це підтверджується даними й інших авторів, які досліджували зв'язування фосфорорганічних сполук з оксидами кальцію [186] і які показали, що ці сполуки міцно зв'язуються (хемісорбуються) з кластерами CaO через P=O групу, при цьому зв'язок між фосфором і киснем у такій групі частково втрачає характер подвійного. Систематичне спостереження та аналіз іонів, що є найбільш стабільними атомними кластерами (комплексами), може бути корисним і з точки зору такої фундаментальної проблеми, як біологічна кальцифікація – нормальна або патологічна. Хоча провести безпосередній зв'язок між іонами, що спостерігаються в мас-спектрометричному експерименті та зародками мінеральних фаз організму *in vivo*, не можна, в мас-спектрометричному експерименті можливе підтвердження найбільш енергетично вигідних конфігурацій, отриманих розрахунковими методами.

Таким чином, унаслідок мас-спектрометричного дослідження синтетичного гідроксиапатиту з використанням плазмово-десорбційної мас-спектрометрії (^{252}Cf ПДМС) були виявлені три виражені серії багатоатомних іонів, дві з яких не описані раніше в літературі, присвяченій мас-спектрометрії кальцій-фосфатних біоматеріалів. Дані серії можуть бути використані (на додаток до описаного методу порівняння інтенсивностей $[\text{Ca}_2\text{O}]^+$ і $[\text{CaPO}_2]^+$) як діагностичні «відбитки пальців» у мас-спектрометричному дослідженні біоапатиту для розрізнення фазового складу невеликих кількостей зразка. Крім того, комплексні іони великих мас можуть становити інтерес із точки зору дослідження зародкоутворення – «нульової» стадії біологічної кальцифікації. Зокрема, іонам з m/z 542 і 851, що відкривають серії В і С комплексних іонів, можуть бути приписані стехіометрії $[(2\text{Ca}_3\text{PO}_4)\cdot 2(\text{CaO})]^+$ і

$[3(\text{Ca}_3\text{PO}_4)\cdot 2(\text{CaPO}_2)]^+$, які відповідають комплексам структур типу Ca_3PO_4 , і «діагностичних» частинок CaO і CaPO_2 , характерних для мас-спектрів фосфатів кальцію в методиках ВІМС і ПДМС. Остання серія (С) наближається до так званого кластера Познера $\{3(\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2)\}$ [140], що є структурним ядром аморфних фосфатів кальцію. Комплекси-«зародки» подібної стехіометрії спостерігаються і під час дослідження початку утворення кальцій-фосфатної фази на специфічних Gla-білках, що регулюють кальцифікацію *in vivo*. Все це має стати предметом подальших досліджень.

4. Розроблення методики синтезу композиту на основі кальцій-фосфатів та біополімерів (хітозан, альгінат)

Композитні матеріали, що складаються з полімерної матриці та неорганічного наповнювача, моделюють кісткову тканину, що має органічну та неорганічну складові. Серед природних полімерів хітозан та альгінат є найбільш перспективними, оскільки мають ряд цінних властивостей, таких як біосумісність з нативною тканиною, низьку токсичність, здатність стимулювати регенеративні процеси під час загоювання ран, біодеградувати з утворенням сполук, що проявляють хемотаксичну активність до фібробластів та остеобластів і підсилюють неохондрогенез.

Використання хітозану як полімерної складової обумовлене його біосумісністю та здатністю до біодеградації, проявляє протимікробну та консервуючу дію. Хітозан, похідне хітину, є лінійним кристалічним полісахаридом, що складається з мономерів β -(1 \rightarrow 4) N-ацетил-D-глюкозаміну. Хітозан проявляє бактеріостатичну дію щодо більшості аеробних та анаеробних штамів мікроорганізмів.

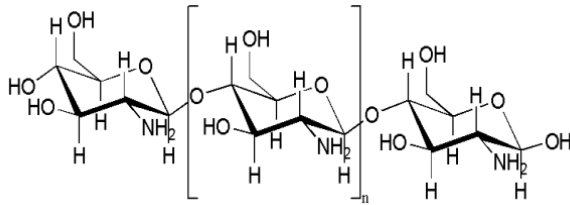


Рис. 26. Структурна формула фрагмента макромолекули хітозану

Натрієва сіль альгінової кислоти (альгінат натрію) широко використовується в промисловості та під час виготовлення лікарських засобів за рахунок своїх властивостей надавати структуру та в'язкість рідким розчинам, вона є стабілізатором емульсій. Альгінат натрію виробляють із червоних та бурих водоростей, що добувають на Філіппінах, в Індонезії, США, Франції, Китаї, Японії. Солі альгінової кислоти є хорошими ентеросорбентами, що зв'язують та виводять з організму радіонукліди та важкі метали, прискорюють заживлення ран. Крім того, альгінова кислота та її солі знижують рівень холестерину в крові. Альгінат натрію зареєстрований у харчовій промисловості як харчова добавка E 401.

Структурна формула альгінату наведена на рис. 27.

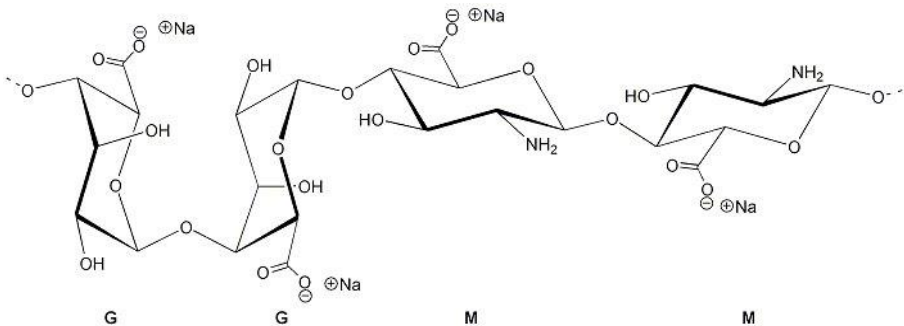


Рис. 27. Структурна формула фрагмента макромолекули альгінату натрію

У ході досліджень розроблена біоміметична технологія одностадійного синтезу композитних матеріалів на основі природних біополімерів (полімерна матриця) та нанокристалічного ГА. Запропонований нами матеріал містить полімерну гідрогелеву матрицю, що складається з хітозану та/або альгінату, в якій рівномірно розподілені наночастинки гідроксиапатиту. Біологічно активні наночастинки гідроксиапатиту, імобілізовані в гідрогелевій хітозановій матриці, стимулюють утворення нової кісткової тканини. Такий матеріал поєднує структурно-механічні та хімічні властивості, притаманні еластичній органічній матриці та твердій мінеральній компоненті, завдяки чому виявляється максимально наближеним до біогенної кісткової тканини.

Отримання композиту ГА/хітозан

Для створення композитного матеріалу на основі кальцій-фосфату та хітозану були використані такі реактиви: хітозан харчовий (молекулярна маса 500 кДа, ступінь деацетилювання 80,5 %, виробник «Біопрогрес», Москва), натрію альгінат (Е 401, харчова добавка, Китай), натрію гідрофосфат Na_2HPO_4 («чда», ГОСТ 11773-76), кальцію ацетат $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ («ч», Китай).

В основі утворення біополімерного комплексу з хітозану лежить взаємодія його позитивно заряджених протонуваних аміногруп з іонами PO_4^{3-} із подальшим утворенням фосфатів кальцію.

Для створення біополімерної матриці готували 500 мл розчину хітозану з концентрацією 2 г/л в 1 % оцтовій кислоті при перемішуванні в шейкері (ІКА® KS 4000 ic) грм 200, при температурі 37 °С протягом 2 год. Для нуклеації кальцій-фосфату (в т. ч. ГА) в структурі полімеру до розчину хітозану додавали 0,1 М водні розчини $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ та Na_2HPO_4 зі співвідношенням $\text{Ca/P} = 1,67$. Утворену суспензію перемішували в шейкері при температурі 37 °С протягом 4 год, коректували значення рН до 12,0 додаванням 18 мас % розчину їдкого натрію. Після цього суміш витримували протягом доби в сушильній шафі за температури 37 °С та «зістарювали» 7 діб при кімнатній температурі, після чого суспензію ретельно

промивали до значення рН промивних вод 7–7,4. Відділяли тверду фракцію та сушили при температурі 37–60 °С або ліофільно за допомогою ALPHA 1–2 LD plus за температури -50 °С та вакуумі протягом 6 годин. Висушений при температурі 37 °С продукт обробляли в паровому стерилізаторі. В ході цього технологічного процесу був отриманий композитний матеріал складу CaP : Хітозан = 50 : 50.

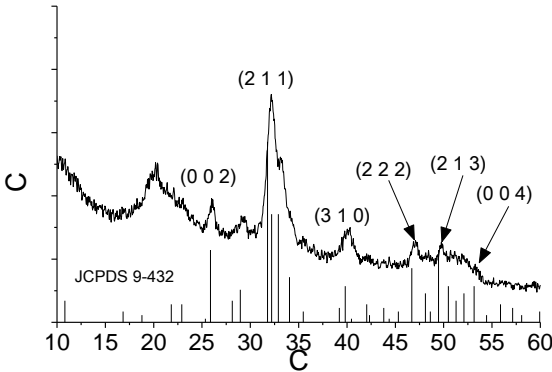
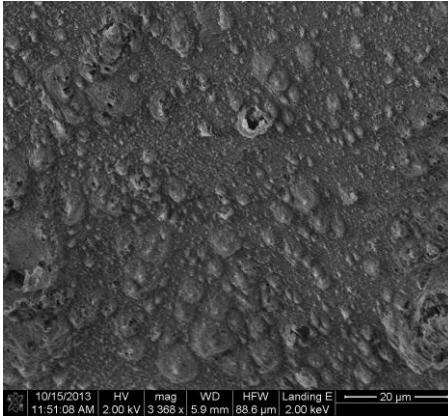


Рис. 28. Морфологія поверхні та фазовий склад композиту хітозан/гідроксиапатит (50:50). Символом \blacklozenge позначені основні піки аморфної складової

Змінюючи кількість взятих для реакції біополімерів та концентрації неорганічних реагентів, можна отримувати композитний матеріал зі співвідношенням органічної та неорганічної компонент в інтервалі від 1 до 99 %. Морфологія поверхні була досліджена методом атомно-силової мікроскопії на приладі Atomic Force Microscope Systems XE-100 (PARK).

Інфрачервоний спектр композиту CS/HA (50:50) порівняно зі спектрами гідроксиапатиту та хітозану наведений на рис. 29.

Коливання в області 1048 cm^{-1} та 1092 cm^{-1} , що належать PO_4^{3-} -групам гідроксиапатиту в спектрі хітозан-ГА, зміщені до 1028 cm^{-1} , що свідчить про взаємодію фосфатних груп із протонуваними аміногрупами хітозану. Спостерігаються також зміщення коливань в області $1320\text{--}1324\text{ cm}^{-1}$, що належать деформаціям по зв'язках OH- , -NH_3 , -CO .

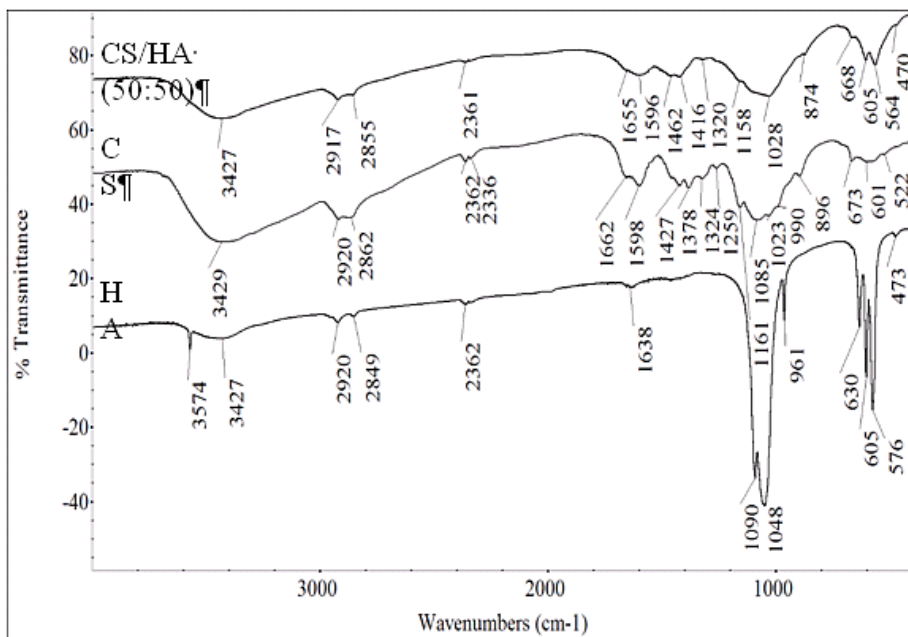


Рис. 29. ІЧ-спектр композита хітозан/гідроксиапатит (50:50)

Отримання композиту альгінат/ГА/хітозан

Для створення композитного матеріалу на основі кальцій-фосфату, альгінату натрію та хітозану були використані такі реактиви: хітозан харчовий (молекулярна маса 500 кДа, ступінь деацетилювання 80,5 %, виробник «Біопрогрес», Москва), натрію альгінат (Е 401, харчова добавка, Китай), натрію гідрофосфат Na_2HPO_4 («чда», ГОСТ 11773-76), кальцію ацетат $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}\cdot\text{H}_2\text{O}$ («ч», Китай).

На першому етапі був отриманий розчин хітозану з концентрацією 2 г/л в 1 % оцтовій кислоті при перемішуванні в шейкері за температури 37 °С до розчинення. Після цього до утвореної суспензії додавали порошок альгінату натрію в кількості, еквівалентній хітозану при одночасному перемішуванні в шейкері до повного розчинення та утворення однорідної суспензії. До утвореної суспензії додавали 0,1 М розчин Na_2HPO_4 та 0,1 М розчин $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$ при співвідношенні $\text{Ca/P} = 1,67$. Утворився рідкий та прозорий гель. Додаванням 18 % розчину NaOH , рН коректували до значення 12 при нагріванні до 60 °С. Після зістарювання впродовж 1 доби продукт був промитий деіонізованою водою до рН = 7,5 та ліофільно висушений за температури – 50°С протягом 5 годин.

Утворений композит був досліджений методом атомно-силової мікроскопії (рис. 30), ІЧ-спектроскопії та рентгенівської дифрактометрії.

Інфрачервоний спектр композита Alg/HA/CS порівняно зі спектрами гідроксилапатиту, хітозану та альгінату наведений на рис. 31. На верхньому спектрі для композиту Alg/HA/CS наявні симетричні та асиметричні коливання PO_4^{3-} груп ГА в області 507–602 cm^{-1} , але їх інтенсивності значно знизилися. Відсутня смуга коливань при 961–962 cm^{-1} , що притаманна PO_4^{3-} -групі гідроксилапатиту, очевидно за рахунок взаємодії з функціональними групами полімерів. Відбулося зміщення коливання в області 630 cm^{-1} , яке належить ОН- групі ГА, до 664 cm^{-1} , що обумовлено зв'язуванням цієї групи з полімером у композитному матеріалі. Той самий ефект спостерігається і для

коливань поверхневих ОН-груп ГА в області 3574 cm^{-1} , які відсутні в спектрі композита (рис. 31).

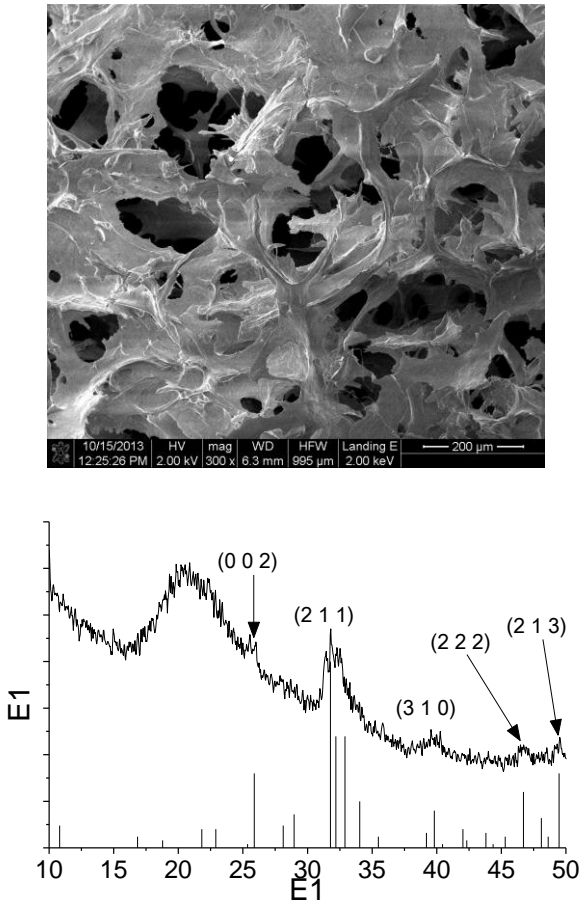


Рис. 30. Морфологія поверхні та фазовий склад ліофільно висушеного композита альгінат/гідроксиапатит/хітозан. Символом ◆ позначені основні піки аморфної складової

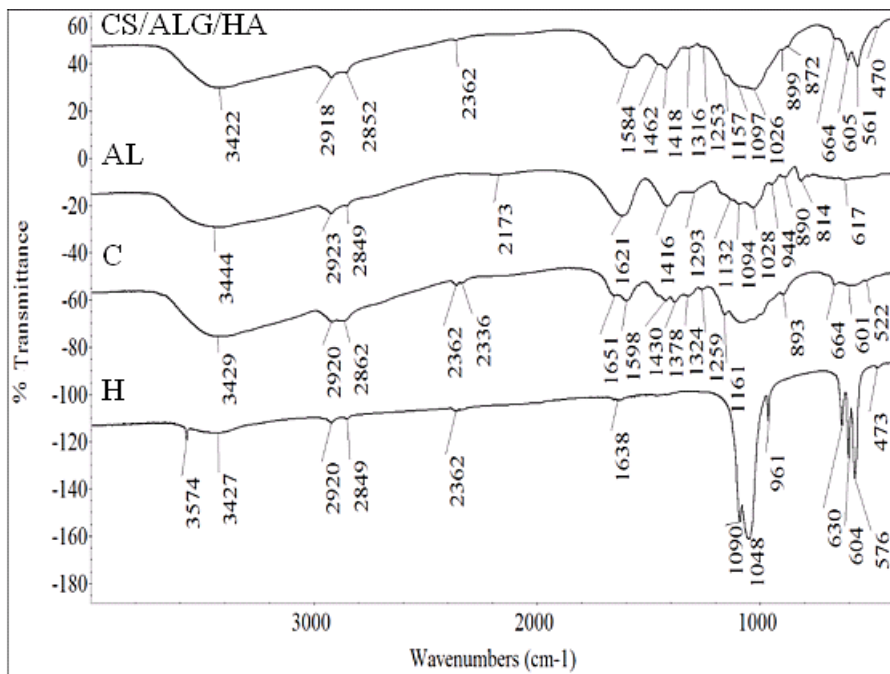


Рис. 31. ІЧ-спектр композита альгінат/гідроксилапатит/хітозан

4.1. Хітозан (фізико-хімічні, спектральні властивості)

Молекулярна вага CS залежно від джерела та процесу отримання лежить в інтервалі від 300 до 1000 кДа, ступінь деацетилювання (DD) (глюкозамін/N-ацетилглюкозамін) – від 30 до 95 %. Чим вищий ступінь DD, тим більше в полімері протонуваних аміногруп, і відповідно більша величина заряду на поверхні макромолекули. У кристалічній формі CS є нерозчинним у водних розчинах із $\text{pH} > 7$, тоді як у розбавлених кислотах ($\text{pH} < 6$), за рахунок протонування NH_2 -груп, стає розчинним [185]. Саме катіонна природа CS забезпечує електростатичні взаємодії з мультивалентними аніонними

лінійними полісахаридами (глікозаміноглікани (GAG), протеоглікани та ін.) клітини. Цей фактор є надзвичайно важливим, оскільки велика кількість ростових факторів та інших протеїнів зв'язана з GAG і тому саме утворення комплексів GAG-CS сприяє утриманню і накопиченню цих необхідних біополімерів [80]. CS у клітині під впливом ензимів насамперед лізоциму, деградує залежно від ступеня кристалічності та деацетилювання [183]. Відтак під час створення імплантатів на основі CS зазначені властивості необхідно обов'язково враховувати. Також необхідно зазначити здатність CS утворювати пористі структури з використанням, скажімо, технології ліофілізації («фріз-драїнг»), причому з контрольованим розміром пор, що, у свою чергу, залежить від швидкості заморожування, тобто розміру кристалів льоду. Ступінь пористості та їх орієнтація істотно впливає на механічні властивості імплантата. Ще одна властивість CS – це його внутрішня антибактеріальна властивість, про що буде детальніше викладено далі. Комбінація CS із різними матеріалами, наприклад гідроксилапатитом (НА), утворює матеріали, які є перспективними насамперед для ортопедії та травматології, про що йтиметься також окремо.

Рис. 32 демонструє базовий FTIR-спектр хітозану, отриманий на приладі «Thermo Nicolet Nexus 470 ESP» (Мінський технологічний університет). Надалі саме ця марка хітозану (М.м. 500 кДа, DD 80,5 %) буде використана нами для отримання апатит-біополімерних композитів та покриттів для біомедичного використання. Зразки для отримання спектрів готували традиційним способом: незначна кількість препарату (синтезованого композитного порошку) змішувалася з KBr у співвідношенні 1:200 в агатовій ступці під час подрібнення. Із отриманих сумішей готували відповідні таблетки у прес-формах із нержавіючої сталі під гідравлічним тиском. Спектри

пропускання отримували в частотному інтервалі 400–5000 cm^{-1} із роздільною здатністю 0,125 cm^{-1} .

У FTIR-спектрі хітозану широка смуга (3429 cm^{-1}) обумовлена амінними (NH) і гідроксильними (OH) групами, пік (2868 cm^{-1}) обумовлений валентними коливаннями OH груп, слаба смуга поглинання карбонільної (C = O) групи (1651 cm^{-1}) відповідає смузі амід I, а смуга 1598 cm^{-1} – амід II. Піки 1430 і 1378 cm^{-1} обумовлені N-H-валентними коливаннями (амід III).

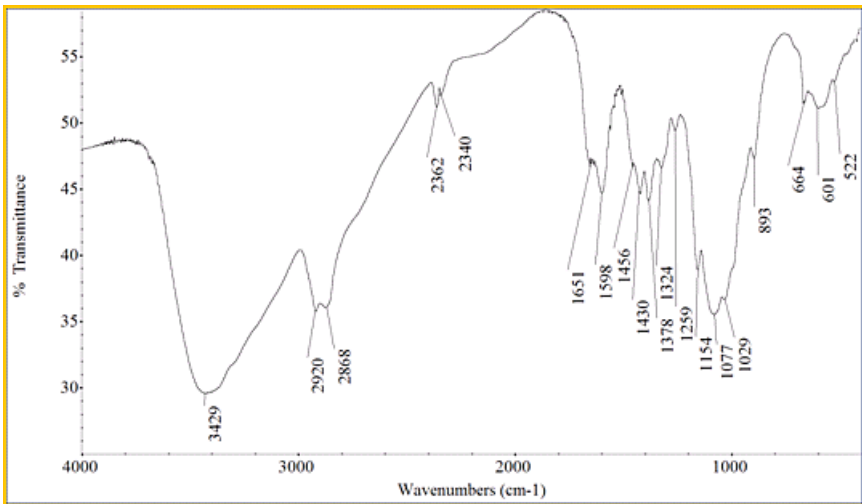


Рис. 32. FTIR-спектр хітозану

4.2. Альгінат (фізико-хімічні, спектральні властивості)

Альгінат (Алг) – природний гідрофільний полісахаридний кополімер, який отримують із різних видів морських бурих водоростей (рис. 33).



Рис. 33. Один із видів бурих водоростей

Молекули альгінату побудовані із залишків β -D-мануронової (M) і α -L-гіалуринової (G) кислот, що знаходяться в піранозній формі та пов'язані в довгі лінійні ланцюги 1 \rightarrow 4-глікозидними зв'язками (рис. 34).

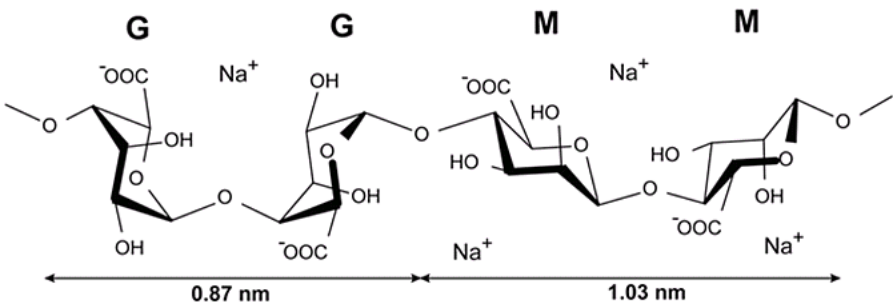


Рис. 34. Хімічна структура альгінату

Співвідношення між мономерами, що визначає фізико-хімічні властивості полімеру, змінюється від 1:1,04 до 1:1,9 залежно від джерела отримання. Розподіл мономерів у ланцюгу має блоковий характер трьох типів: однакових залишків β -D-мануронової або α -L-гіалуринової кислоти або певним чергуванням залишків цих кислот. Довгі ланцюги кислот

перехрещуються, зшиваються в тримірні ланцюги, які своїми карбоксильними групами з'єднуються з металами (найчастіше – із двовалентними). Типова молекулярна маса знаходиться в інтервалі від 10 кДа до 600 кДа. Альгінат є одним із популярних об'єктів клітинної інженерії як скафолди для регенерації шкіри, кісткових тканин тощо завдяки властивості утворювати желеподібні субстанції в м'яких умовах під впливом двовалентних катіонів (Ca^{2+} , Ba^{2+} , Sr^{2+}). Механізм містить кооперативне формування містків між катіонами і G мономерами різних полімерних ланцюгів (рис. 35). Але при цьому відсутня пряма взаємодія з клітинами та абсорбція протеїнів з негативно зарядженим гелем. Тому для ініціації адгезії та проліферації певних клітин у желеподібну структуру альгінату зазвичай додають специфічні молекули [185]. Структури альгінату з використанням кальцію як з'єднувального агента знайшли широке біомедичне використання, включаючи клітинну трансплантацію і доставку ліків [183, 221].

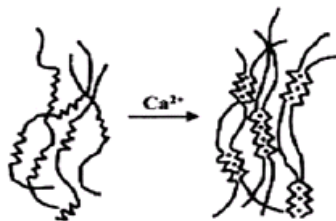


Рис. 35. Кооперативне формування містків між катіонами і G-мономерами різних полімерних ланцюгів

Спектральні характеристики альгінату. Рис. 36 демонструє базовий FTIR-спектр альгінату, отриманий на приладі «Thermo Nicolet Nexus 470 ESP» (Мінський технологічний університет). Надалі саме цю марку альгінату ми використаємо для отримання апатит-біополімерних композитів та покриттів для біомедичного використання. Характерними смугами спектра є піки 3444, 1621

і 1416 cm^{-1} , що відповідають гідроксильним (-OH), карбонільним (C = O) і карбоксильним (COOH) групам макромолекули [80]

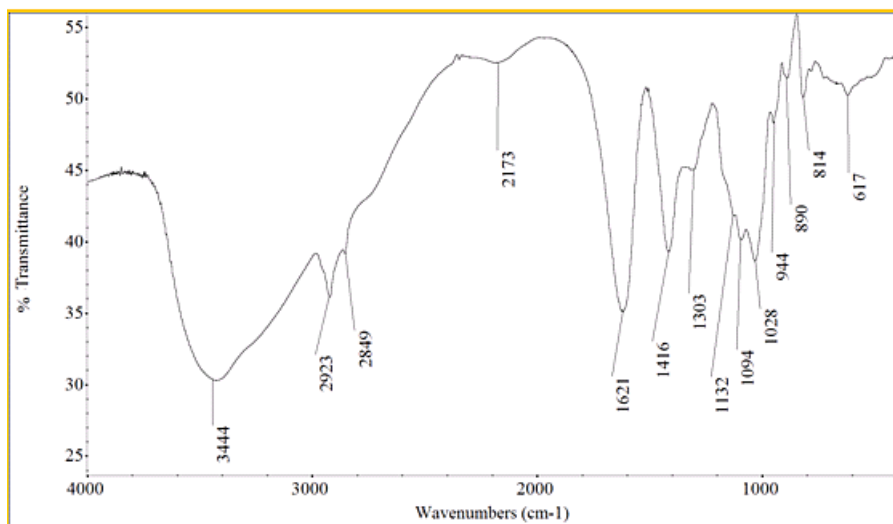


Рис. 36. FTIR-спектр альгінату

4.3. Хітозан та альгінат у кістковій тканинній інженерії

Тканинна інженерія (ТІ) – міждисциплінарна сфера, що містить як базові знання наук про життя, так й інженерію з метою створення біологічно сумісних, біодеградуючих скефолдів (матриць) у різних формах (порошки, мікрокапсули, гелі, плівки тощо) для широкого застосування в наномедицині. До цього ряду належать і системи для контрольованої доставки лікарських засобів на основі використання хітозану та його похідних [80]. Хітозан активно використовується в кістковій тканинній інженерії, оскільки сприяє росту клітин й утворенню мінеральних матриць остеобластами [221]. Біосумісність хітозану мінімізує локальне запалення, а переведення його в

пористу структуру сприяє остеокондуктивності [207]. Для цього створюють хітозан-СаР (CS-CP)-композити, що інтенсивно досліджуються у світі [175, 237, 292, 293]. Також ми досліджували композити на основі хітозану й трикальційфосфату (TCP) із використанням «фріз-драїнг»-технології для отримання макропористих структур, які відрізнялися покращеними механічними характеристиками, а саме: напруження стискання досягало рівня 11 МПа.

4.3.1. Хітозан-кальцій-фосфатні композити

Композиційні CS-CP-матеріали порівняно з іншими подібними структурами мають певні переваги. Так, під час резорбції продукти деградації хітозану та кальцію фосфату (іони кальцію, фосфати, глікозаміни тощо) природно метаболізуються і не індукують підвищення рівня кальцію та фосфору в сечі, сироватці крові чи внутрішніх органах. Матеріал містить як макро- так і мікропори, нанорозмірні кристали НА, що сприяє збільшенню реактивної поверхні й остеоіндукуючої активності матеріалу. Подібна 3D-макропориста кераміка, що пронизана хітозановою сіткою, має кращі механічні властивості [291, 294] і тому перспективна для практичної медицини. Серед синтетичних біоматеріалів на сьогодні здебільшого використовують такі: «Остім» – гідроксилапатит ультрависокої дисперсності у вигляді паст (Німеччина), «Хронос» – гранули β -трикальційфосфатної кераміки (Швеція), «Церасорб» – гранули трикальційфосфатної кераміки (Німеччина), «Колапан» – колаген-апатитний композит (Росія). Всі ці біоматеріали є біосумісними, здатними до резорбції з різними ступенями вираженості остеокондуктивних властивостей. Багато клініцистів вважають, що «Колапан» має порівняно з іншими матеріалами кращі властивості, що виявляється в більш

активному заміщенні кісткового дефекту новою кістковою тканиною. Проте колаген як білок тваринного походження може викликати імунну реакцію, потребує ретельного очищення, що відображається на ціні препарату (> 150 грн за 1 г). Основні переваги Хітозан-СР-біоматеріалів такі: структурна організація наближена до структури природної кістки (2-й рівень ієрархічної структури), біосумісність, біодеградація, макро- і мікропористість, регуляція швидкості резорбції, імобілізація лікарських засобів, антибактеріальна дія, простота технологічної схеми синтезу, низька ціна (на рівні 50 грн за 1 г). Зовнішній вигляд хітозан-гідроксилапатитного композита, отриманого в лабораторії «Біонаноккомпозит» СумДУ, та електронно-мікроскопічний знімок поверхні наведені на рис. 37.

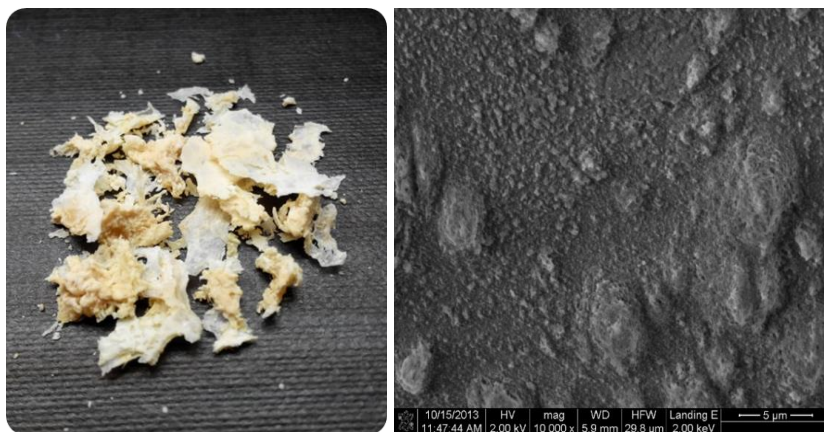


Рис. 37. Зовнішній вигляд та електронно-мікроскопічний знімок поверхні CS/HA-композита, отриманого в лабораторії «Біонаноккомпозит» СумДУ [237]

4.3.2. Хітозан-альгінат-гідроксилапатитні (ХЗ-АЛ-ГА) КОМПОЗИТИ

Хітозан-альгінатні (CS-AG) скефолди проявляють кращу механічну міцність і кращу термостабільність порівняно з AG (CS)-скефолдом, який має поперечні Ca^{2+} зшивки [116]. Їх отримують шляхом утворення поліелектролітного комплексу (PEC) із використанням «фріз-драйнг»-технології. AG-скефолд відіграє роль 3D-сітки із системою рівномірно розподілених і з'єднаних між собою пор, в які імплантується CS- або CS/HA-розчин для формування PEC-скефолда. Розглядаючи PEC за участі хітозану, потрібно відзначити серію досліджень подібних комплексів хітозану з ДНК, глікозаміногліканами, хондроїтинсульфатом, гіалуроновою кислотою, гепарином, карбоксиметилцелюлозою, пектином і білками, такими як желатин, альбумін, кератин і колаген [44, 46, 84, 133, 138, 183, 279]. Стабільність таких комплексів залежить від зарядової густини, розчинника, іонної сили, рН і температури [246]. Повертаючись до скефолдів на основі хітозану, альгінату і гідроксилапатиту зазначимо, що подібні структури у співвідношенні 1:1:1 були недавно синтезовані й у нашій лабораторії за іншою технологічною схемою (рис. 38). Для синтезу були використані такі прекурсори: хітозан (М.м. 500 кДа, DD 80 %, “Віорпрогресс”, Москва), альгінат натрію (E 401), аналітичний гідрофосфат натрію (Na_2HPO_4) та ацетат кальцію $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca} \cdot \text{H}_2\text{O}$ (Китай). Катіон-аніонна взаємодія між макромолекулами CS і ALG – головна рушійна сила у створенні біополімерного скефолда. Для його отримання готували хітозановий розчин (2 г/л в 1 % оцтовій кислоті), до якого додавали 1 г порошку альгінату і перемішували протягом 3 годин. Для нуклеації HA до отриманої суспензії додавали 0,1 М гідрофосфат натрію (60 мл) і 0,1 М ацетат кальцію

(100 мл) при рН 11. Розчин нагрівали до 80 °С для визрівання протягом 48 годин. Отриманий продукт промивали тричі деіонізованою водою до рН 7–7.4 із подальшим вакуумним сушінням («фріз-драйнг» при -50 °С) протягом 6 годин. У результаті отримували пористий CS/ALG/HA-скефолд зі співвідношенням компонентів 1:1:1.

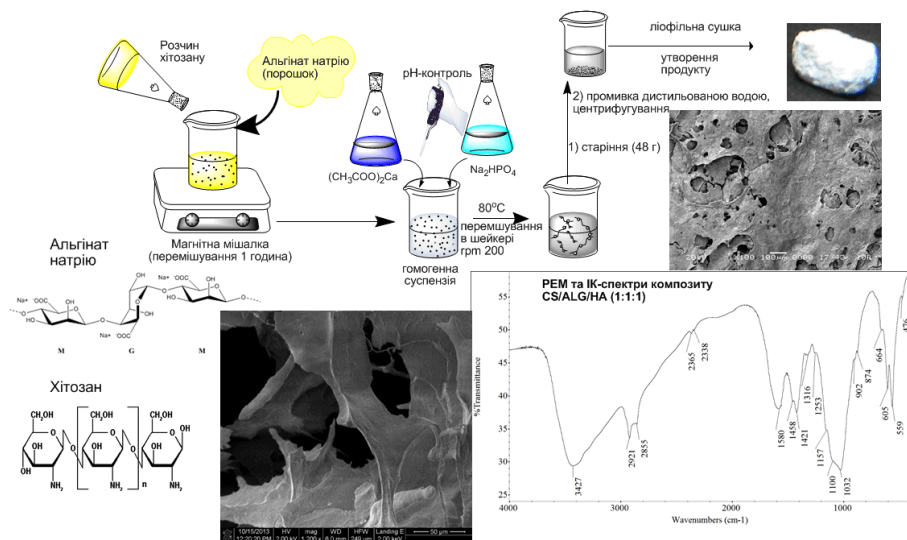


Рис. 38. Технологічна схема синтезу пористого біоматеріалу на основі біополімерів хітозану, альгінату натрію і гідроксилapatиту, розроблена в лабораторії «Біонаноккомпозит» Сумського державного університету [237]

Отриманий FTIR-спектр композита має характерну смугу амід II (1580 cm^{-1}) із височастотним зсувом ($\Delta = 18 \text{ cm}^{-1}$), а також малоінтенсивний пік аміногрупи (1157 cm^{-1}). Ці особливості вказують на міжмолекулярні взаємодії в скефолді між CS, Ca^{2+} HA з карбонільними групами ALG [237].

4.3.3. Антибактеріальні властивості ХЗ-АЛ-ГА композитів

Проблема бактеріальних інфекцій у біоматеріалах є однією із болючих для сучасної імплантології. Утворення запалення в оточенні імплантата призводить із часом до його втрати. Запобігти подібним інфекціям можна шляхом застосування антибактеріальних плівок або покриттів. Хітозан є одним із природних полісахаридів, який здатний утворювати плівки з антибактеріальними властивостями. Існує декілька механізмів антибактеріальної властивості хітозану [72]. По-перше, хітозан як полікатион утворює електростатичні зв'язки з аніонними молекулами на поверхні клітини і тим самим впливає на їх проникну здатність [137, 178]. По-друге, хітозан зв'язується з негативно зарядженими групами ДНК і тим самим інгібує синтез РНК [72, 189]. І нарешті, антибактеріальна дія хітозану може включати обидва механізми залежно від щільності зарядів у взаємодіючих компонентах [72, 73]. Хітозан завдяки великій кількості ОН- і NH₂-груп легко утворює хелатні комплекси з металами [114, 242]. Срібло має антибактеріальні властивості, затримуючи ріст грам-позитивних і грам-негативних бактерій [210]. Плівки на основі хітозану і срібла проявляють відмінну антибактеріальну дію проти *Escherichia coli* [242]. Тому в нещодавній роботі [278] наша група використала технологію термодепозиції [237] для отримання антибактеріальних покриттів на основі CS, HA, Ag у фізіологічних умовах із різними концентраціями срібла і відповідно різною антибактеріальною активністю. Акцент був зроблений на формуванні композитних HA-Ag- і CS-HA-Ag-покриттів на поверхні як модифікованої, так і не модифікованої хітозаном Ti-6Al-4V/субстрату. Антибактеріальну властивість вивчали шляхом вимірювання оптичної щільності клітинного розчину

E.coli. Знайдено, що включення Ag у покриття істотно зменшує кількість бактерій у зразку. Ще більший ефект спостерігався для HA-Ag покриттів, утворених на поверхні субстрату з шаром CS (рис. 39). Таким чином, запропонований у [278] підхід можна прийняти як перспективний шлях для створення антибактеріальних покриттів на титанових імплантатах.

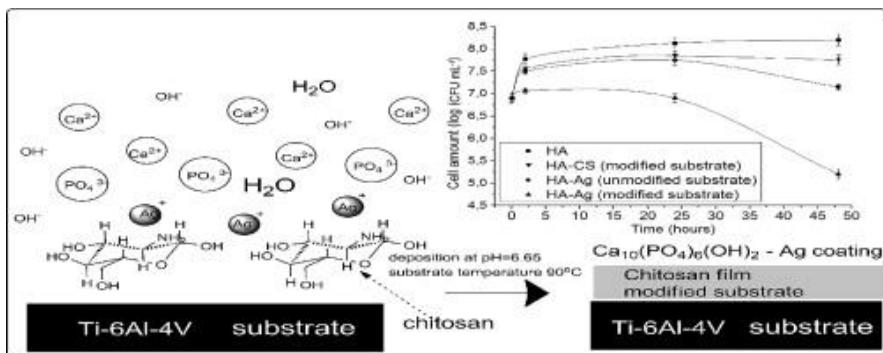


Рис. 39. Схема створення HA-Ag-покриття на Ti-6Al-4V-субстраті з шаром хітозану. На вставці – залежності росту *E.coli* від стану поверхні субстрату [278]

4.3.4. Хітозан-металеві комплекси

Як зазначалося раніше, однією із важливих властивостей хітозану є утворення хелатних комплексів з іонами металів. Подібні комплекси отримують у два етапи. Спочатку отримують наночастинки хітозану методом іонного гелеутворення між хітозаном і триполіфосфатом натрію ($\text{Na}_5\text{P}_3\text{O}_{10}$), після чого отримані наночастинки з'єднуються («завантажуються») з іонами металів (Ag^+ , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Mn^{2+} , Fe^{2+}) [94]. Антибактеріальні властивості подібних наноструктур були істотно поліпшені, за винятком Fe^{2+} . Так, наприклад, для Cs- Cu^{2+} наночастинок такі показники, як мінімальна інгібіторна

концентрація (MIC) і мінімальна бактерицидна концентрація, (MBC) проти *E.coli* 25922, *S.choleraesuis* ATCC 50020 і *S. aureus* 25923 були в 21–42 рази нижчими, ніж для Cu^{2+} [94]. У цій самій роботі знайдено, що антибактеріальна активність прямо пропорційна величині дзета-потенціалу. Також зазначено, що грам-негативні бактерії більш чутливі до хітозан-металевих наночастинок, що пов'язано, з одного боку, підвищеним негативним зарядом на поверхні відповідних клітин, а з іншого – підсиленням позитивним зарядом аміногруп макромолекули внаслідок взаємодії з іонами металів. Але цю гіпотезу підсилення необхідно ще підтвердити як новими експериментальними, так і теоретичними квантово-хімічними дослідженнями.

5. *In vivo* дослідження

Необхідним і обов'язковим етапом у процесі створення будь-якого нового матеріалу для медицини є *in vivo* дослідження, тобто розуміння відгуку організму на імплантований матеріал. Узагалі реакція з боку організму на синтетичний імплантат може бути як біотоксична, біоінертна, біоактивна і біорезорбуюча [91]. Матеріали, створені на основі ортофосфатів кальцію, як правило, повністю підлягають резорбції і не викликають негативних імунних реакцій [91]. Всі експерименти на тваринах повинні проводитися з дотриманням міжнародних принципів Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001), Хельсинської декларації Генеральної асамблеї Всесвітньої медичної асоціації (2000).

Хітозан-гідроксилапатитний композит (ХГК). Синтез композиту проводили з використанням розчину низькомолекулярного хітозану (Aldrich), до якого додавали 1М-розчин солей хлориду кальцію та дигідрофосфату натрію з мольним співвідношенням Ca/P 1,67. При рН 6,8–7 відбувалося формування полімерної сітки (scaffold), в якій при підвищеному значенні рН формувалися нанокристали ГА. Детальніше технологія отримання викладена в [23]. На першому етапі використовували зразки зі співвідношенням хітозан/апатит = 50:50, для яких, згідно з даними рентгенівської дифракції, розміри кристалітів ГА відповідали розмірам біоапатиту кісткової тканини (~ 20 нм). Пористість композиту забезпечувалася ліофільним сушінням безпосередньо після промивки і старіння зразків. При цьому спостерігалися як «малі» пори із середнім розміром ~ 30 мкм, так і «великі» пори із середнім розміром ~ 50 мкм (рис. 40). Саме подібний інтервал розмірів пор є необхідним для надання матеріалу остеокондуктивних властивостей.

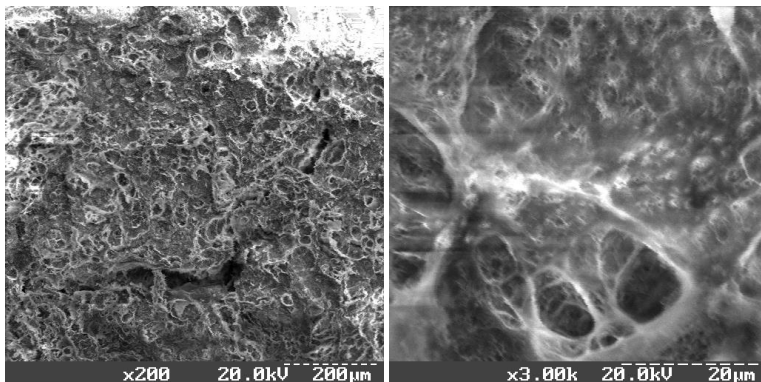


Рис. 40. Мікроструктура пористих хітозан/апатитних зразків

Підшкірне імплантування хітозан / апатитного матеріалу показало відсутність запальної реакції. Після 5 днів інкубації пори матеріалу заповнюються клітинами лейкоцитів, макрофагів і диферонів фібробластів, що є типовим при остеорепарації (рис. 41). На 24-й день нова кісткова тканина заповнює майже всю площу кісткового дефекту (рис. 42). Кількість остеобластів на поверхні трабекул зменшується, що свідчить про зупинення процесу інтенсивного формування кісткової тканини і початок процесу ремоделювання.

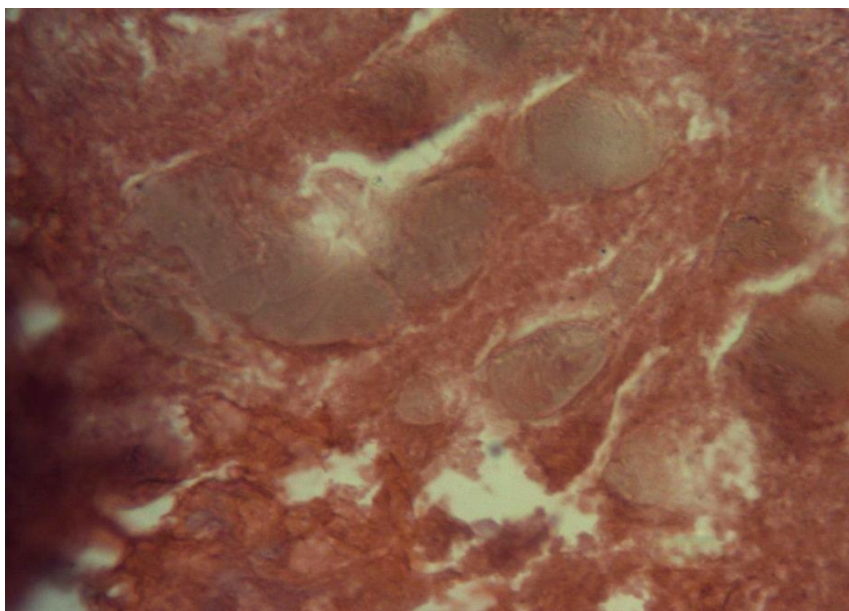


Рис. 41. Ділянка дефекту великогомілкової кістки через 5 днів після травми

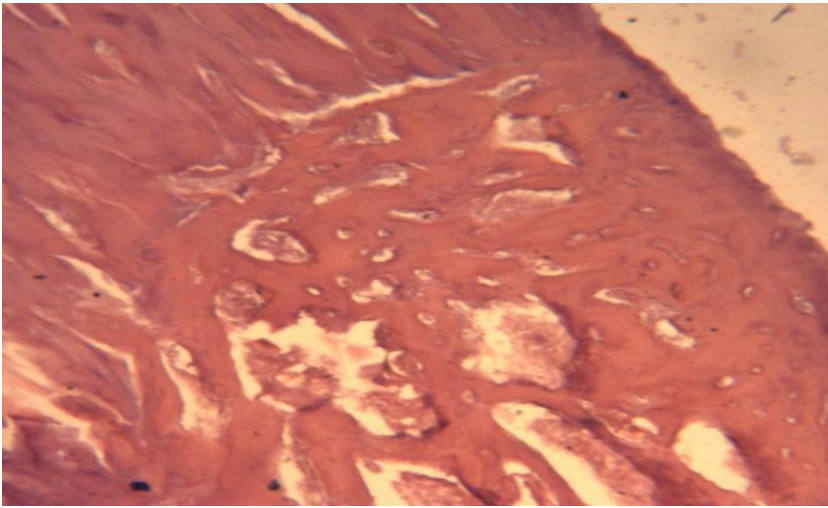


Рис. 42. Ділянка дефекту великогомілкової кістки через 24 дні після травми

Альгінат / гідроксилапатитний гідрогель (АГГ). Для вивчення особливостей реакції кісткової тканини на введення пастоподібного імплантата АГГ було проведено дослідження на 10 білих щурах-самцях 4-місячного віку, що знаходилися в стаціонарних умовах віварію [25]. Першій (контрольній) серії тварин (5 щурів) в умовах стерильної операційної наносився дірчастий дефект із медіальної поверхні тіла середньої третини великогомілкової кістки. Місце нанесення травми було відібране з урахуванням найменшого травматизму м'язів та магістральних судин, які відсутні в цій ділянці. Дефект наносився спіральним свердлом діаметром 1,2 мм під загальним внутрішньом'язовим кетаміновим наркозом. Операційну рану зашивали, тварин виводили з наркозу та утримували в стаціонарних умовах віварію. Другій серії тварин (5 щурів) також моделювався дірчастий дефект для введення імплантата. Операційну рану також зашивали, тварин виводили з наркозу та утримували в стаціонарних умовах віварію. Щурів виводили з експерименту

на 7, 14, 24-ту добу після перелому, що відповідає основним стадіям репаративного остеогенезу за Корж А. А. та Дєдх Н. В. Для приготування гістологічних препаратів виділену скелетовану кістку фіксували в 10 % розчині нейтрального формаліну, проводили декальцинацію в розчині Шморля протягом 8 годин, зневоднювали в спиртах зростаючої концентрації та заливали в парафін. Із одержаних раніше парафінових колодочок готували гістологічні зрізи товщиною 7–10 мкм та забарвлювали їх гематоксилін-еозином. Отримані препарати вивчали за допомогою світлового мікроскопа "OLIMPUS". Під час імплантації остеопластичного матеріалу АГГ у дефект великогомілкової кістки, внаслідок взаємодії з кров'ю і кістковим мозком утворювалась оптимальна консистенція для заповнення цього виду дефекту. Морфологічна картина була такою. Матеріал АГГ у ділянці дефекту був оточений сполучнотканинними клітинами витягнутої форми (рис. 43, 44), що оцінюється у "-1" бал (при можливих "-5" балів, а максимум може бути "+1" бал, якщо імплантат не оточений сполучнотканинним прошарком). Крім того, з остеопластичним матеріалом, через шар сполучнотканинних клітин (попередньо фібробластів) існує безпосередній контакт ретикулофіброзної кісткової і фіброретикулярної сполучної тканин, що, у свою чергу, оцінюється як позитивне явище.

Таким чином, досліджуваний остеопластичний матеріал АГГ проявляє певні позитивні властивості у вигляді безпосереднього формування на поверхні імплантата нової кісткової тканини, що вказує на перспективність подальших досліджень у цьому напрямку.

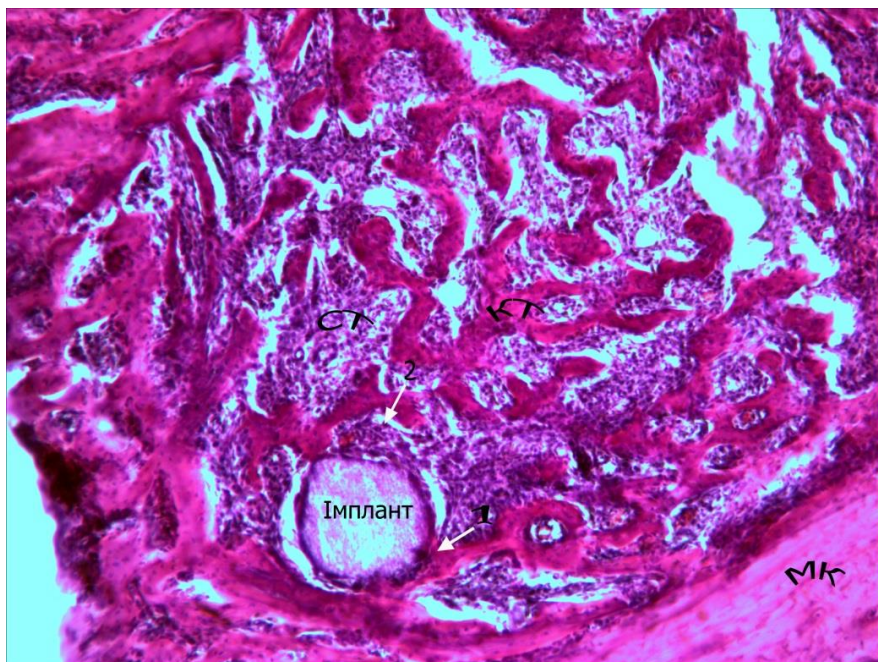


Рис. 43. Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура на 14-ту добу після імплантації остеопластичного матеріалу АГГ. Імплантат оточений сполучнотканинними клітинами, через які він безпосередньо взаємодіє зі сполучною тканиною (СТ, 2) і кістковою (КТ, 1), що росте від країв материнської кістки (МК)

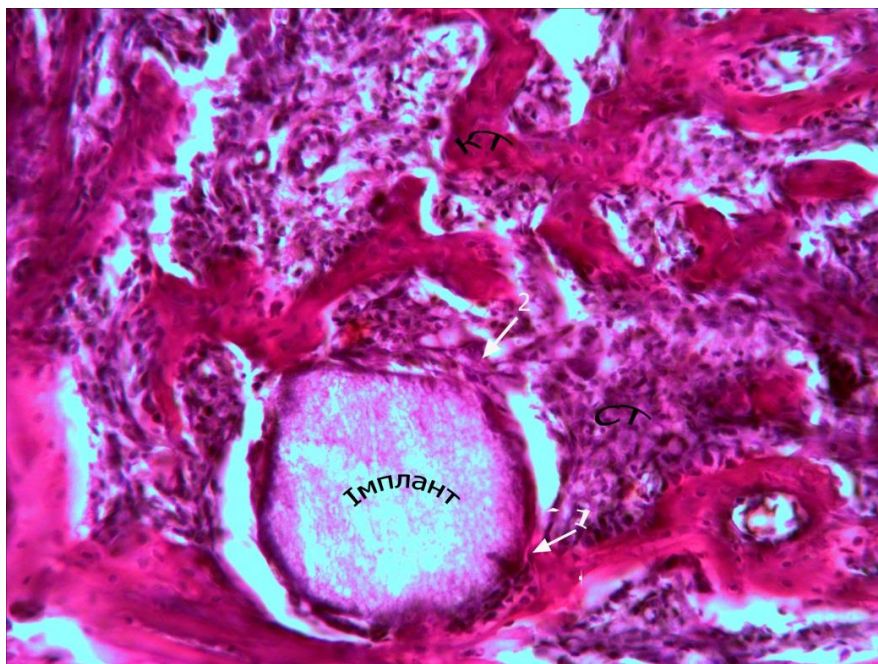


Рис. 44. Ділянка дефекту великогомілкової кістки щура на 14-ту добу після імплантації остеопластичного матеріалу АГГ. Імплантат оточений сполучнотканинними клітинами, через які він безпосередньо взаємодіє з кістковою (КТ, 1) і сполучною тканинами (СТ, 2)

6. Кальцій-фосфатні покриття для медичних імплантатів

6.1. Матеріали для медичних імплантатів

Пристрої, що імпантують в організм, повинні бути виготовлені з особливого класу матеріалів, так званих біоматеріалів. Загалом усі біоматеріали поділяють на чотири основні групи: біометали, біополімери, біокераміка і біокомпозити. Усі вони відіграють дуже важливу роль у заміні та регенерації тканин людини [92].

Перевагами використання імплантатів, виготовлених із металів, є такі: відносна дешевизна, технологічність виготовлення, міцність та хімічна інертність. Для виготовлення імплантатів використовують нержавіючу сталь, сплави типу Co-Cr, сталі марок 302 та 304, сплави на основі титану. Найбільш часто для виготовлення імплантатів використовується титановий сплав Ti-6Al-4V [193]. Додавання 6 % Al стабілізує шестигранну щільно упаковану (α -Ti) фазу, а внесення 4 % V стабілізує кубічну (β -Ti) фазу. Дрібнозерниста двофазна мікроструктура забезпечує високу механічну міцність сплаву Ti-6Al-4V. Значною перевагою сплавів титану є їх стійкість до корозії завдяки утворенню дуже стабільної фази оксиду титану (IV) TiO_2 на поверхні [27]. Саме наявністю TiO_2 автори в праці [118] пояснюють надзвичайну біосумісність титанових імплантатів. Кальцій та фосфати також зв'язуються з поверхнею, вкритою оксидом титану, утворюючи тонкий шар апатиту.

У дослідженні [209] показано, що *in vitro* клітини остеобластів швидше ростуть на субстраті з титанового сплаву (Ti-6Al-4V), ніж на субстратах із «Co-Cr»-сплаву, або нержавіючої сталі. Крім того, зношування Ti-6Al-4V-імплантата може бути менш токсичним, ніж для виготовленого зі сплаву Co-Cr [120]. Іони ванадію та титану негативно впливають на кристалізацію апатиту. Так, у праці [160] було показано, що іони титану, ванадію та алюмінію можуть входити до складу продуктів синтезу ГА, порушуючи кристалічність ГА та їх стехіометричність. Тому досліджуються нові титанові сплави з метою вилучення алюмінію та ванадію, зменшення корозії та цитотоксичності [134]. Недоліками металевих імплантатів є те, що з часом вони кородують під дією внутрішнього середовища організму: іони металів переходять у розчин і внаслідок цього знижується механічна міцність імплантата [121]. Крім того, метали є провідниками електрики, тому контакт двох різних імплантованих металів може утворювати всередині тіла людини гальванічні пари. Більшість металів щільніші й важчі за кістки людини і мають модуль пружності вищий, ніж у кістки, що викликає незручності у пацієнтів. Унаслідок цього металевий імплантат може екранувати механічні навантаження, що

необхідні для нормального функціонування кістки. Основні механічні властивості деяких металічних імплантатів порівняно з механічними властивостями кісток людини наведені в табл. 10.

Таблиця 10

Основні матеріали імплантатів [83]

Матеріал	Щільність, г/см ³	Модуль Юнга (пружності) (ГПа)	Міцність на розтягнення (МПа)
Хірургічна сталь X2CrNiMo18164	8,0	193	585
Хірургічний титан Ti6Al4V	4,43	100–110	930–1140
Кортикальна кістка	1,7–2,0	3–30	80–150
Магній AZ91	1,81	45	240
Сплав MgCa (0,8 ваг.%)	1,75	Немає даних	290–300

Біоматеріали, що претендують на роль імплантатів для заміни великих ділянок кістки, повинні відповідати низці вимог, обумовлених структурою, складом і властивостями кісткової тканини: 1) близькість механічних характеристик до характеристик кістки; 2) близькість хімічного складу штучного матеріалу та кістки; 3) для швидкого вrostання кісткової тканини в імплантат необхідна наявність у ньому пор розміром 100–150 мкм [6].

У зв'язку з цим досить перспективним напрямком є використання магнієвих імплантатів, що мають здатність до біодеградації. Вони вже знайшли широке застосування,

незважаючи на те, що традиційно як біоматеріали прийнято використовувати стійкі до корозії метали та сплави [268]. Перші спроби знайти клінічне використання магнієвих імплантатів у різних галузях хірургії були зроблені Ервіном Пейром (Erwin Page) ще у 1892 р. Магнієві сплави – це відмінна комбінація біосумісності, здатності до біодеградації та механічних властивостей, аналогічних таким у натуральній кістковій тканині [184, 287]. Крім того, іони магнію, що утворюються внаслідок його корозії, не чинять шкідливого впливу на організм людини; такі імплантати можуть згодом розчинятись, абсорбуватися та виводитися з організму під час відновлення кісткової тканини [229].

Одним зі шляхів подолання надзвичайно високої корозійної активності магнію є використання сплавів. Існує значна кількість сплавів магнію (Mg-Al, Mg-Ce, Mg-Ca, Mg-Li, Mg-Tl), що активно досліджуються [95, 142, 163, 248, 252, 254, 261]. У деякі магнієві сплави для надання жорсткості додають рідкоземельні елементи, базовими з яких є Ce та Nd [129]. Багато рідкоземельних елементів виявляють антиканцерогенні властивості, забезпечуючи тим самим багатофункціональність сплавів [76, 93]. Найбільш популярними є комерційні сплави: Mg-Al та Mg-RE завдяки їх корозійній стійкості та відносно високій міцності. Однак є відомості, що Al є токсичним для нервової системи та уповільнює ріст організму [289].

Рідкоземельні елементи (Ce, Pr, Y) часто є гепатотоксичними [284]. Елементи Ca, Zn, Mn, що входять до сплавів магнію, уповільнюють біодеградацію магнієвих сплавів [227]. Зокрема, Mg-Ca-сплави мають щільність, близьку до кісткової тканини, крім того, кальцій входить до складу кісткової тканини, а магній є необхідним для засвоєння Ca [174].

Низька стійкість до корозії [264-266] призводить до того, що кісткова тканина в багатьох випадках не встигає сформуватися до повного розчинення імплантата. Одним із ефективних способів зниження руйнування імплантатів є використання кальцій-фосфатних покриттів, включаючи гідроксиапатит, брушит та інші фосфати кальцію, завдяки їх біосумісності,

біоактивності та здатності посилювати антикорозійні властивості [288].

Нанесення біоактивних кальцій-фосфатних покриттів на металеві субстрати дозволяє отримувати комбінації біоактивності, хімічної стабільності та механічної стійкості. Низка чинників впливає на властивості кальцій-фосфатних покриттів: товщина покриття (впливатиме на адгезію покриття і фіксацію – оптимальна величина знаходиться в межах 50–100 мкм), кристалічність (впливає на розчинення і поведінку матеріалів у середовищі організму), фазовий склад, хімічна чистота, пористість і адгезія [82, 92, 238].

Серед існуючих фосфатів кальцію (табл. 11) лише певні сполуки мають біомедичне застосування. Сполуки з іонним співвідношенням $Ca/P < 1$ не використовують через їх високу розчинність та кислотність. Тетракальцій фосфат – через його основність. Однак для використання в медицині навіть їх можна успішно комбінувати з іншими компонентами.

Найбільш поширеним як покриття для медичних імплантатів є гідроксиапатит. Брушит і октакальційфосфат є проміжними сполуками під час осадження більш термодинамічно стабільного ГА в процесі мінералізації кісткової тканини [99].

Таблиця 11

Існуючі фосфати кальцію та їх основні властивості [89, 90, 92]

Ca/P	Сполука	Формула	Розчинність при 25 °C, $-\log K_s$	Розчинність при 25 °C, г/л	Межі стійкості pH у в. р. при 25 °C
0,5	Кальцію дигідрофосфат, б/в	$Ca(H_2PO_4)_2$	1,14	~ 17	Стаб. при $t^\circ > 100^\circ C$
1,0	Гідрофосфат	$CaHPO_4 \cdot 2H_2O$	6,59	~ 0,088	2,0–6,0

Ca/P	Сполука	Формула	Розчинність при 25 °С, $-\log K_s$	Розчинність при 25 °С, г/л	Межі стійкості рН у в. р. при 25 °С
	кальцію двоводн., брушит				
1,0	Гідрофосфат кальцію б/в, монетит	CaHPO_4	6,90	~ 0,048	Стаб. при $t^\circ > 100^\circ\text{C}$
1,33	Октакальційфосфат	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	~ 0,0081	5,5–7,0
1,5	β -трикальційфосфат	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~ 0,005	*
1,0–2,2	Аморфний фосфат кальцію	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \times n\text{H}_2\text{O}$ $n = 3\text{--}4,5;$ 15–20% H_2O	Немає даних	25,7 при рН = 7,4	~ 5–12 Завжди метастаб.
1,5 – 1,67	Кальційдефіцитн. гідроксиапатит	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$	~ 85,1	~ 0,0094	6,5–9,5
1,67	Гідроксиапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	~ 0,0003	9,5–12
2,0	Тетракальційфосфат	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38–44	~ 0,0007	*

* Ці сполуки не можуть бути осаджені з водних розчинів.

Брушит має моноклінну кристалічну ґратку (рис. 45 а), а гідроксиапатит – гексагональну (рис. 45 б) [219, 241].

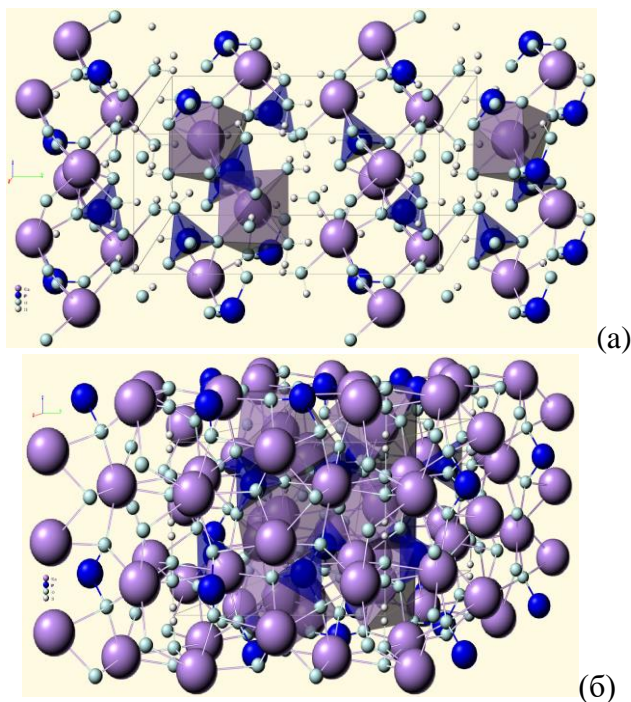


Рис. 45. Кристалічна структура: а) брушиту, б) гідроксиапатиту

Гексагональна модифікація $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ є ідеалізованою ($\text{P6}_3/\text{m}$) [13]. У цій структурі вузли OH^- розміщені на гвинтових осях 6_3 (гексагональна вісь c) [131]. У структурі ГА вузли OH^- розміщені вище і нижче дзеркальної площини і це зміщення ($\sim 0,35 \text{ \AA}$) пошарово чергується в напрямку (вгору чи вниз) відносно вертикальної осі, що перетворює вісь b_3 у 2_1 , а дзеркальну площину в b -осьову площину ковзання. Просторова група $\text{P6}_3/\text{m}$ перетворюється на групу $\text{P2}_1/\text{b}$ моноклінної сингонії [13, 131]. Параметри кристалічної ґратки для брушиту: $a = 5,812 \pm 0,002$, $b = 15,180 \pm 0,003$, $c = 6,239 \pm 0,002 \text{ \AA}$ та

$\beta = 116^{\circ}25 \pm 2^{\circ}$, а для гідроксиапатиту: $a = 9,4214$ (8), $b = 2a$, $c = 6,8814$ (7) Å та $\gamma = 120^{\circ}$ [90].

Природний ГА, як правило, є кальційдефіцитним апатитом, в якому значення $Ca/P < 1,67$ [223, 273]. Формула природного апатиту є наступною:

$(Ca, M)_{10}(PO_4, Y)_6(OH, X)_2$ – де M – катіони металів, що містять Mg^{2+} , Na^+ , K^+ , Str^{2+} , Ba^{2+} та ін., Y – аніони CO_3^{2-} , $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} , SO_4^{2-} та ін., X – F^- , Cl^- , CO_3^{2-} та ін.

Заміщення Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^- в ГА на M , Y та X призводять до зміни параметрів кристалічної ґратки, кристалічності, симетрії кристалів, термічної стабільності, морфології і розчинності, так само, як і хімічних, фізичних та біологічних властивостей [223]. Так, заміщення OH^- групи в ГА іонами F^- може збільшити структурну стабільність і корозійну стійкість у біологічному середовищі і, як наслідок, покращання кристалічності та збільшення розміру кристалів [197]. Заміщення OH^- груп на CO_3^{2-} призводить до утворення карбонатапатиту, що є досить поширеною сполукою в кістковій тканині. Група CO_3^{2-} може заміщувати як OH^- групи (заміщення А-типу), так і заміщення PO_4^{3-} заміщення (В-типу). Здебільшого заміщення в карбонатапатиті відбувається за В-типом [273]. Заміщення катіонів також впливає на властивості апатиту. Наприклад, заміщення Ca^{2+} на Mg^{2+} призводить до зменшення кристалічності та збільшення розчинності апатиту [223]. Синтезований в організмі гідроксиапатит, разом з іншими компонентами (колагеном та водою) є основним матеріалом кісткової тканини. Кістка – це природний композитний матеріал, до складу якого входять до 60–70 % ГА, 5–8 % води, залишок становить органічна фаза (фібрили колагену) [141]. Колаген у формі фібрил з діаметром 0,1 ~ 2 мкм, забезпечує каркас, міцність і щільність кістки. Протеїни, полісахариди виконують роль цементу між фібрилами колагену та ГА. Кристали ГА у формі пластинок та голок розташовані паралельно між фібрилами колагену. Розмір кристалів залежить від типу тканини. Міцність на розтягнення для ГА становить 38 ~ 300 МПа, що відповідає характеристикам кістки, модуль Юнга 35 ~ 120 – вище, ніж для кісткової тканини (10 ~ 20 ГПа).

Однак, незважаючи на подібні до кісткової тканини властивості, для заміни частин організму, що підлягають навантаженням, ГА не використовують як самостійний компонент через низьку механічну стійкість. Тому найчастіше його використовують для покриття металевих імплантатів, а також у поєднанні з полісахаридами, колагеном та іншими речовинами для створення композитних матеріалів. Механічні властивості ГА залежать від його пористості. Від розміру пор залежить також здатність взаємодіяти з кістковою тканиною, що формується [81].

6.2. Огляд існуючих методів нанесення покриттів на металеві субстрати

Імплантати різного складу і морфології, отримані за допомогою різних технологій, поширені в сучасній медицині. Для вирішення проблеми захисту організму від продуктів розчинення імплантата використовують покриття на основі гідроксиапатиту [38, 79]. Такі покриття швидко проникають у кісткову тканину, оскільки ГА є мінеральною складовою кісток й екранують поверхню імплантата від хімічної дії середовища організму [231]. Останнім часом усе більшого використання набувають імплантати на основі магнію, схильні до біодеградації [285]. Однак їх надзвичайно висока здатність до корозії вимагає використання покриттів для їх захисту. Існує багато технологій нанесення ГА та інших кальцій-фосфатних покриттів на металеві субстрати [16, 170].

Комерційно прийнятним є метод плазмового розпилення [16, 298], серед переваг якого є висока швидкість осадження та можливість одержання однорідного покриття. Серед недоліків цього методу потрібно відмітити механічну деструкцію шарів за тривалого використання в організмі, а також складність отримання монофазного покриття з певною кристалічністю та пористістю [290]. Тому необхідним є пошук нових, більш ефективних методів отримання покриттів для медичних імплантатів. Серед них виділяють такі: термічне розпилення [16], осадження з використанням іонних пучків (IBAD) [235],

іонна імплантація [34, 204], іонне розпилення (ІР) [65, 198], іонне осадження (ІО) [281] та метод динамічного перемішування (ДП) [282–283], магнетронне розпилення [53, 205, 270], імпульсне лазерне нанесення [57, 286], метод занурення [59, 260].

Серед методів одержання покриттів при більш низьких температурах: «золь-гель»-метод [249, 261], електрофоретичне [95, 117], електрохімічне [182, 229, 253] та гідротермальне осадження [177], електричне розпилення [166, 214]. Додаткові можливості відкриваються для одержання покриттів з ГА при комбінуванні вищенаведених технологій. Кожний із цих способів має свої переваги та недоліки, пов'язані з фізико-хімічними та структурними параметрами шарів, а також їх механічними властивостями: міцністю, щільністю, тріщиностійкістю, адгезією та іншими.

Останнім часом широко використовуються біоміметичні методи, тобто отримання покриттів за умов, близьких до фізіологічного середовища організму [20, 240, 258]. Кальцій-фосфатні покриття можуть бути отримані шляхом прямого занурення субстрату в пересичений відносно кальцію розчин [164]. Метод працює при фізіологічній температурі, тому формування апатиту відбувається в умовах, близьких до тих, що спостерігаються в організмі. Цей метод дозволяє формувати покриття на імплантатах складної геометрії і дає необхідне зв'язування покриття з кістковою тканиною. Оскільки вихідна поверхня титанових імплантатів не має достатньої біоактивності для формування кальцій-фосфатного покриття, то проводиться попередня обробка поверхні субстрату, наприклад створення біоактивного шару TiO_2 . Хімічний склад, рН-розчину, температура та інші параметри експерименту можуть варіюватися для одержання покриттів необхідного складу й кристалічності [258].

Японськими вченими [154, 157] був запропонований метод термодепозиції (*thermal substrate method*) – спосіб отримання ГА-покриттів на нагрітих титанових субстратах із водних розчинів [154, 156–158, 196]. Домінуючим компонентом осаду, отриманим цим методом при температурах 140–160 °С, є ГА. При

нижчих температурах (95 °С і навіть при 115 °С) отримані лише шари з дуже низьким вмістом гідроксиапатиту [154]. Автори цих праць дослідили вплив технологічних параметрів (концентрації компонентів, рівня рН, шорсткості поверхні та співвідношення Са/Р) на процеси осадження ГА.

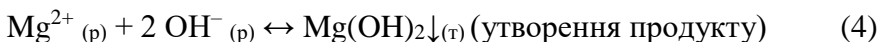
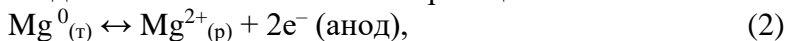
Установка для отримання покриттів методом термодепозиції вперше була запропонована японськими вченими в праці [157], у Мюнстерській лабораторії вона була доповнена системою охолодження [233]. У нашій роботі також була проведена подальша модернізація існуючої установки.

Як відомо, зі збільшенням температури субстрату розчинність ГА зменшується. Залежність константи розчинності ГА (K_s , моль/л)⁹ від температури (T , К) передається таким рівнянням [99, 157]:

$$\log K_s = \log [Ca^{2+}]^5 [PO_4^{3-}]^3 [OH^-] = - 8219,41/T - 1,6657 - 0,098215T. \quad (1)$$

Згідно з даними літератури [99, 154, 156–157, 196] швидкість осадження кальцій-фосфатних покриттів залежить від температури субстрату, рН та концентрацій іонів у розчині й тривалості нагрівання субстрату. Ми вдосконалили й розвинули цей метод для отримання як кальцій-фосфатних, так і більш складних покриттів, зі включенням природного хітозану та інших сполук.

На відміну від досить пасивних сплавів титану магнієві імплантати зазнають руйнування у фізіологічному середовищі. Особливо високий рівень деградації спостерігається безпосередньо після імплантації. Корозію Mg-субстрату можна подати за допомогою таких хімічних реакцій:



У водних розчинах $Mg(OH)_2$, утвореного на поверхні магнієвого субстрату, виконує роль захисного шару, але при зростанні концентрації іонів хлору у фізіологічному середовищі

більше 30 ммоль/л [275] гідроксид магнію перетворюється у високорозчинний $MgCl_2$. Продукти корозії та процеси деградації викликають локальні запалення, що, у свою чергу, прискорюють процес деградації.

Недостатня корозійна стійкість часто призводить до деградації імплантата, ще до остаточного формування на ньому кісткової тканини. Використання кальцій-фосфатних покриттів для медичних імплантатів має на меті покращання їх корозійної стійкості [288].

На магнієві субстрати кальцій-фосфатних покриття осаджують за допомогою таких методів: електроосадження [228–229, 288], осадження за допомогою іонних пучків [277], анодування [123], хімічна [124–125, 257] та гідротермальна обробка [243] та біоміметичні методи [74, 295].

Більшість запропонованих методів потребують використання складних компонентів та спеціальних умов; деякі з них дозволяють отримати покриття при високих температурах або в багатостадійному синтезі. Осадження покриттів в одну стадію більш перспективне, оскільки такі процеси простіше контролювати, до того ж такий синтез є дешевшим. Хімічне осадження при низьких температурах є одним із найпростіших, що використовується для одержання покриттів на поверхні медичних імплантатів.

6.3. Внесення хітозану до складу покриттів

Для біоматеріалів нового покоління, до складу яких входять біоактивні органічні компоненти, можливості існуючих способів одержання покриттів істотно обмежені. Перспективними є методи, в яких умови кристалізації кальцій-фосфатних матеріалів не перешкоджають існуванню за даних умов біоактивних органічних компонентів.

Новим напрямком у реконструктивно-відновлювальній хірургії кісток *in situ* є інженерія кісткової тканини. Відповідно до цього методу організм сам може відтворювати кісткову тканину, якщо для нього створені відповідні умови [1, 18], наявні основа для нарощування тканини та стимули для

остеогенезу. Як матрикс в інженерії кісткової тканини використовують безліч полімерів, здатних до біодеградації [144]. Серед них – синтетичні: полікапролактон [262], поліетиленгліколь [161], полівініловий спирт [218], поліуретан [216] та природні: альгінат [173], желатин [172], колаген [132], крохмаль [111], хітозан [85, 180]. Природні полімери є об'єктом найбільшого інтересу завдяки їх біологічній та хімічній подібності до тканин організму [144].

Хітозан є одним із найбільш перспективних біополімерів для інженерії тканин і можливого ортопедичного застосування, завдяки волокно- та плівкоутворювальним властивостям, антибактеріальній активності, біосумісності, здатності до біодеградації. Хітозану притаманна властивість утворювати структури з прогнозованим об'ємом пор і швидкістю деградації, що робить його одним із альтернативних матеріалів для кісткових імплантатів [85]. Однак через низькі механічні характеристики матеріалів на основі хітозану актуальним є розроблення технологій отримання композитних покриттів на основі ГА та природних біополімерів.

За хімічною структурою хітозан є сополімером D-глюкозаміну та N-ацетил-D-глюкозаміну, що зв'язані β -(1-4)-глікозидними зв'язками. Він містить від 5 до 15 % ацетамідних груп, а також до 1 % груп, що пов'язані з амінокислотами і пептидами.

Вміст глюкозаміну визначає ступінь деацетилювання. Залежно від процедури приготування молекулярна вага хітозану може варіювати від 300 до 1000 кДа зі ступенем деацетилювання 30–95 % [87].

Хітозан має три типи реакціездатних функціональних груп: аміногрупи, гідроксогрупи в положеннях C(2), C(3) та C(6). Функціональні групи забезпечують ковалентну та іонну взаємодії молекул хітозану. Водневі зв'язки між молекулами хітозану призводять до його поганої розчинності у воді, оскільки зв'язки між молекулами хітозану є міцнішими, ніж ті, що існують між молекулами хітозану та водою. У той же час водневі зв'язки хітозану визначають його здатність розчинятися в органічних кислотах – оцтовій, лимонній, оксалатній,

бурштиновій, причому, набухаючи, він здатен міцно тримати у своїй структурі розчинник, а також розчинені в ньому речовини [180]. Мінімальний вміст кислот, необхідний для розчинення хітозану, є таким: оцтова кислота – 0,5 %, лимонна – 2,5 %, оксалатна – 5,0 % [14]. Під час розчинення хітозану у водній оцтовій кислоті відбувається протонування аміногруп хітозану (рис. 46.)

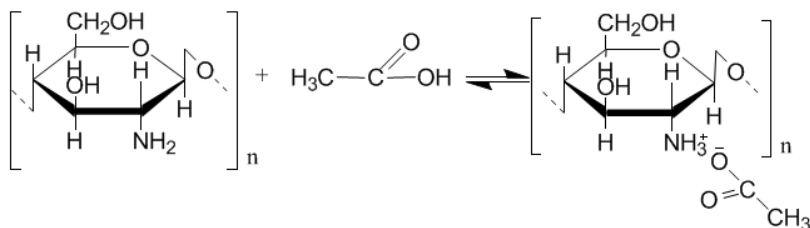


Рис. 46. Взаємодія хітозану з оцтовою кислотою

Надзвичайно перспективним напрямком досліджень є нанесення на поверхню гідроксиапатиту речовин, що підвищують його біоактивність. В ортопедії широко використовують композити «ГА-колаген» [32], покриття і композитні матеріали, що мають у своєму складі ГА та хітозан [107, 211], хітозан та желатин [183]. Показано, що хітозан є стимулятором остеогенезу [107, 191]. У комбінації з колагеном хітозан також стимулює остеогенез [296]. Перспективними є покриття на основі альгілату та хітозану [116].

Хітозан є унікальним сорбентом і саме завдяки сорбційним властивостям можливе його поєднання з антибіотиками [30], протеїнами [130], причому він стимулює також активність фібробластів [30].

У багатьох працях досліджена антибактеріальна активність хітозану [130, 248]. Згідно з даними літератури хітозан інгібує ріст бактеріальних мікроорганізмів завдяки зв'язуванню його молекул із клітинною стінкою мікроорганізмів, а також впливом на механізм репродукції мікробних тіл. Показано, що наявність позитивного заряду протонуваних аміногруп забезпечує антибактеріальний ефект у кислому середовищі як проти грампозитивних, так і для грамнегативних бактерій [7].

Покриття, до складу яких входить хітозан, використовують на титанових сплавах з метою зростання біосумісності [253]. Покриття, що містить кальцій-фосфат і хітозан, має підвищене зчеплення із клітинами строми кісткового мозку, що показано в роботі [253].

Дані літератури [58, 165] свідчать, що титанові поверхні, вкриті хітозаном, демонструють підвищення адгезії остеобластів та проліферації клітин. Ванг та ін. [253] шляхом електролізу отримували змішані покриття «кальцій-фосфат-хітозан», які демонстрували високий рівень розпаду як у кислому, так і в модельному розчині, що імітує сольовий склад плазми крові [253]. В'язкі, щільні та рівномірні покриття ГА-хітозан були отримані на субстратах складної форми методом електрофоретичного осадження в роботі [299]. Структура осаду відрізняється при варіюванні концентрації ГА в розчинах хітозану. Вихід осаду контролюється варіюванням часу осадження.

Ураховуючи викладене, надзвичайно ефективно вводити хітозан та інші біомолекули до складу покриття ГА, чому і присвячені наші дослідження. Введення хітозану до складу покриття, отриманого методом термодепозиції, дозволяє керувати антимікробними властивостями покриття шляхом варіювання складу і концентрацій компонентів у ньому. Одним із завдань дослідження є введення хітозану до складу покриттів, отриманих методом термодепозиції. У ході досліджень вирішували такі завдання: 1) вибір методики введення хітозану до складу покриття; 2) вивчення впливу дії хітозану на елементний та фазовий склад і морфологію отриманих покриттів; 3) дослідження ймовірної взаємодії між хітозаном та кальцій-фосфатами, що раніше не було вивчено.

6.4. Осадження покриттів із додаванням срібла

Бактеріальні інфекції на межі поділу «імплантат – тканини організму» часто спостерігаються. Одним зі шляхів зменшення таких інфекцій є створення антибактеріальних покриттів на поверхні імплантата. Хітозан, що є похідним природного

полімеру, має бактерицидні властивості нижчі, ніж синтетичні бактерицидні агенти, тому з часом він зберігає лише бактериостатичну, а не бактерицидну активність.

Використання срібла є одним із найкращих методів для посилення антимікробних властивостей біоматеріалів та імплантатів [192]. Срібло відоме як своїм бактерицидним впливом, так і широким спектром антимікробної дії [297].

Для посилення антимікробних властивостей хітозану необхідним є його додаткове модифікування. В роботі [19] мембрани, модифіковані хітозаном, витримували в розчинах різних неорганічних бактерицидних агентів. Мембрани, що оброблені розчином AgNO_3 , мають 100 % бактерицидну активність і зберігають її протягом 56 днів [19].

Покриття «Ag-ГА» також мають антибактеріальну активність [68]. Їх отримують різними методами: термічним розпиленням [194, 280], колоїдним золь-гель-осадженням [66, 76], плазмовим розпиленням [68], магнетронним розпиленням [67], електрохімічним осадженням [86], осадженням за допомогою пучків іонів [39]. Відомо, що антибактеріальна активність покриттів викликана наявністю вільних іонів срібла [54]. Бактерії є надзвичайно чутливими до іонів срібла, бактерицидна активність спостерігається навіть при незначних концентраціях (~ 35 ppb) [62].

Інші автори [194] зазначають, що мінімальна концентрація срібла у розчині сироватки телячих ембріонів (FBS – fetal bovine serum), що пригнічує активність мікроорганізмів, становить 4,0–7,9 ppm. Але в середовищі організму біологічна активність може втрачатися завдяки поєднанню з протеїнами, а саме їх групами SH- та NH- [54]. У зв'язку з цим актуальним є пошук оптимальної методики для введення Ag до складу покриттів ГА, отриманих методом термодепозиції та комбінування хітозану, срібла та гідроксиапатиту в покриттях з метою посилення їх антибактеріальних властивостей.

6.5. Основні характеристики покриттів для медичних імплантатів

Якість покриттів впливає на їх біологічну активність покриття та рівень втрати. Багато факторів визначає якість покриттів. Одним із важливих параметрів є здатність покриттів до резорбції, на яку впливають пористість, мікроструктура, кристалічність, відношення Са/Р. Показано [146, 239], що чим меншим є відношення Са/Р, тим більша швидкість резорбції покриттів. Розчинність покриття збільшується, коли воно містить домішки, при $\text{pH} < 6$ [146].

Кристалічність також має істотний вплив на здатність покриттів до резорбції та їх біоактивність і повинна бути як мінімум 62 % [200]. Занурення у фізіологічний розчин на термін 12 тижнів призводить до зростання кристалічності покриття від аморфного до висококристалічного ГА [113]. При нестабільних умовах та умовах навантаження на імплантат деякі автори [200] показують збільшення руйнування покриття ГА низької кристалічності як після 16, так і після 32 тижнів. Низькокристалічний ГА є більш розчинним за висококристалічний. Його розчинність зростає при $\text{pH} < 6$ [201]. Кристалічність покриття визначають методом рентгенівської дифракції за таким рівнянням:

$$\text{Кристалічність (\%)} = \frac{\sum A_k}{\sum A_k + \sum A_a} \cdot 100\%, \quad (1)$$

де $\sum A_k$ – сума площ під усіма піками кристалічного апатиту, а $\sum A_a$ – сума площ під аморфними піками [247].

Покриття з високою кристалічністю мають гострі вузькі піки з високими інтенсивностями, тоді як аморфні покриття мають більш широкі з меншою інтенсивністю піки з виступами [169]

Хімічний склад ГА має відповідати стехіометричній формулі згідно зі стандартами Американського товариства з випробувань матеріалів [37]. Чистота має становити мінімум 95 % ГА,

останнє становить трикальційфосфат, тетракальційфосфат, оксид кальцію чи пірофосфат кальцію. Кількість мікроелементів повинна обмежуватися 50 ppm важких металів, згідно з протоколом Управління по контролю за продуктами та лікарськими засобами США [102]. Відношення Ca/P в атомних відсотках повинно бути $10/6 = 1,66-1,67$ для порошку (стехіометричного ГА) і $1,67-1,76$ для покриттів.

Пористість покриттів є надзвичайно важливим фактором, що має значення для механічних властивостей та резорбції покриттів. Вона визначається методом сканувальної електронної мікроскопії в режимі зворотного розсіювання поперечного перерізу покриття. Пористість відповідає густині, що визначається як відношення маси покриття до об'єму (г/см^3) [147]. Чим вищою є пористість, тим менша міцність покриття. Середній розмір пор може бути розрахований за рівнянням [29]:

$$D = \left(\frac{4xA}{\pi} \right)^{\frac{1}{2}}, \quad (2)$$

де D – діаметр пор, A – середня площа, зайнята порами.

Пористість у покриттях з хітозаном може бути розрахована за рівнянням, використаним у роботі [255]:

$$\text{Пористість (\%)} = \frac{V - (W/\rho)}{V} \cdot 100\%, \quad (3)$$

де V – об'єм субстрату (см^3), W – вага субстрату (г), ρ – густина непористої плівки хітозану (г/см^3).

Не менш важливою є товщина покриттів. З точки зору механічної міцності тонкі покриття є кращими, оскільки зменшується ризик злому покриття та зберігається пориста структура поверхні імплантата. Покриття товщиною більше 100 мкм поводять себе як крихка кераміка і є ризик механічного ушкодження [222]. Експериментальні дослідження *in vivo* показали, що тонке покриття завтовшки 50 мкм призводить до

високого опору зсуву на відміну від товстого покриття 200 мкм [226]. Спосіб руйнування також змінюється залежно від товщини покриття. У роботі [250] показано, що покриття завтовшки 50 мкм руйнується на межі поділу «кістка – ГА», в той час як покриття 200 мкм руйнується на поверхні «імплантат – ГА» і всередині покриття. Отже, покриття ГА завтовшки від 50 до 100 мкм є найбільш придатними для ортопедичних імплантатів [143, 222].

Сила адгезії покриттів до субстрату залежить від структури інтерфейсу та товщини покриттів. Адгезія до субстрату є однією з головних властивостей покриттів, вона визначається як стан, у якому поверхні, що перебувають у контакті, залишаються з'єднаними за допомогою сил різної природи: ван-дер-ваальсових, електростатичних, хімічних зв'язків різного типу [170].

Для визначення адгезії покриттів найбільш поширеними є випробування на розтяг (Tensile (pull-off) test) та метод тестування подряпин (scratch test). У першому випадку зразки, на які здійснюють навантаження, приєднують один до одного (між ними знаходиться покриття) і розтягують (рис. 47). Компоненти, що тестуються, повинні з'єднуватися між собою полімерним клеєм, який може бути нанесений у вигляді плівки. З'єднані компоненти розтягуються, максимальна сила, спрямована на площу покриття на субстраті, позначена Р [36, 247].

Якщо покриття мають деяку пористість або тріщини, то необхідно враховувати це при інтерпретації результатів. У цих випадках клей, що використовується при підготовці зразків для цього тесту, може проникати у покриття, викликаючи необхідність докладання додаткової сили [247]. Основною перевагою цього методу є те, що він дає числові значення для порівняння адгезії покриттів, отриманих різними методами [170].

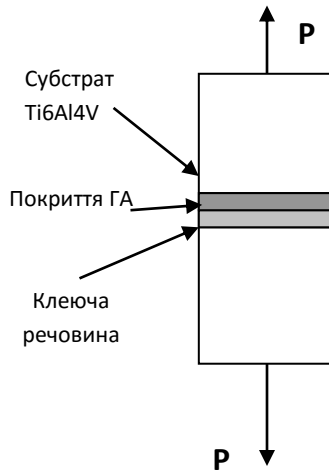


Рис. 47. Схематичне зображення приладу для випробувань на розтяг (вимірювання адгезії) покриттів ГА [247]

Тестування адгезії методом подряпин: стрижень рухається вздовж поверхні зразка під певним навантаженням, яке щодо покриття називається критичним. Це дає порівняльні значення адгезії покриттів [170].

Отже, найкраще покриття ГА для медичних імплантатів має бути з низькою пористістю, високою адгезією до субстрату, з контрольованим ступенем кристалічності, високою хімічною та фазовою стабільністю.

6.6. Поведінка імплантатів у модельних системах та організмі

Ti6Al4V – відносно інертний матеріал імплантата з відмінними механічними властивостями. Корозійна стійкість забезпечується пасивною плівкою, що формується на сплаві й забезпечує бар'єр між біологічним середовищем і субстратом. Коли імплантат Ti6Al4V потрапляє у фізіологічну рідину, відбувається його розчинення.

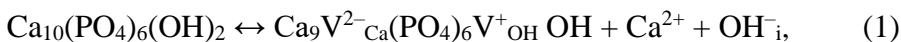
Хімічне перетворення імплантата і вихід іонів металу визначається оксидним шаром та його межею поділу з біологічним середовищем. Оксид є більш інертним і біосумісним, ніж сплав, і демонструє корозійну стійкість. Коли зразок титанового сплаву з оксидною плівкою вміщують у фізіологічну рідину, спостерігається багато механізмів, кожен з яких входить у процес розчинення. Окиснення оксидної плівки відбувається при дифузії атомів металів із межі поділу метал-оксид на межу між оксидом та біологічною рідиною. Розчинення оксиду контролюється такими факторами: 1) природою і силою зв'язку метал-оксид; 2) товщиною оксидного шару; 3) дефектами структури оксиду (вакансіями, елементами проникнення і т. д.); 4) ступенем упорядкованості в оксиді; 5) анізотропною поведінкою [56].

Шар оксиду є полярним і притягує воду й розчинені в ній молекули. Гелі титану мають на поверхні хімічно активні гідроксогрупи, що функціонують як іонообмінні ділянки. Ступінь адсорбції біомолекул на оксиді залежить від багатьох факторів, таких як геометрія, шорсткість поверхні й тип молекули. Десорбція деяких біомолекул та обмін відбувається на поверхні, доки не сформується стабільний шар. Титановий сплав пасивується, створюється щільно прилегла плівка оксиду титану на поверхні, що менш упорядкована. Під час старіння структура стає упорядкованішою [56].

Біологічна фіксація імплантатів, вкритих ГА, пов'язана з процесом розчинення покриттів, що супроводжується утворенням нової кістки в проміжку між поверхнею імплантата та існуючою кісткою. Часткове розчинення ГА-покриття є початком цього процесу, оскільки викликає підвищення концентрації іонів кальцію та фосфат-іонів, початок осадження кристалів ГА на поверхні покриття і, в решті-решт, приводить до біологічної фіксації [146, 273].

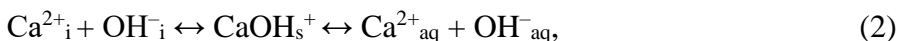
Уживлення імплантата триває досить довго, від 3 до 6 місяців, за які покриття ГА та титановий субстрат піддаються дії різних фізіологічних рідин, що мають нейтральну або слабкокислу реакцію (плазма крові, слина). Кінетика хімічного розчинення ГА у слабкокислих електролітах є такою [24]:

Особливості кристалічної будови $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ є такими, що найбільш рухливими елементами ґратки є катіон кальцію та гідроксил-іон. Вони легко виходять у міжвузлові положення, створюючи точкові дефекти Френкеля – катіонну $\text{V}^{2-}_{\text{Ca}}$ та аніонну V^+_{OH} вакансії:

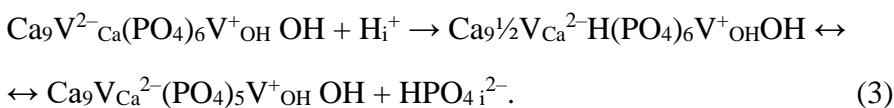


де i – міжвузлове положення катіонів Ca^{2+} та OH^- .

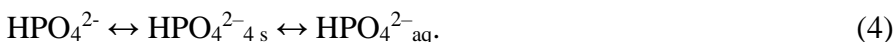
Далі катіони Ca^{2+}_i та аніони OH^-_i потрапляють у фізіологічний розчин:



де s – положення іона на поверхні, а aq – гідратований стан іона. Активованій вакансією ГА взаємодіє з дифундуючим на ґратці протоном H^+ , унаслідок чого відщеплюється та переходить у міжвузлове положення аніон $\text{HPO}_4^{2-}_i$:



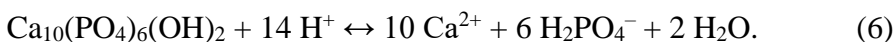
Аніон $\text{HPO}_4^{2-}_i$ дифундує до поверхні кристала і далі переходить у фізіологічний розчин:



Якщо розчин має $\text{pH} < 6$, то утворюється первинний ортофосфатний аніон:



Так відбувається до повного розчинення ГА за сумарною реакцією:



Звідси бачимо, що рухомою силою хімічного розчинення (резорбції ГА) є реакція нейтралізації двох гідроксильних груп

ГА двома протонами з виділенням теплоти ~ 40 кДж/моль [24]. Виділяють декілька розчинів, що імітують сольовий склад плазми крові: SBF (Simulated Body Fluid), HBSS (Hank's balanced salt solution), що використовують для тестування біоактивності матеріалів медичного призначення *in vitro*. Тестування гідроксиапатитних покриттів у розчині SBF дозволяють проаналізувати хімічну та мікроструктурну зміни покриттів в умовах, що імітують їх біологічні взаємодії в організмі. Розчин SBF (Кокубо) готують послідовним розчиненням реагентів, що наведені в табл. 12 [149- 151].

Таблиця 12

Реагенти для приготування розчину SBF (pH = 7,25, 1 л)

Послідовність	Реактив	Кількість (г)
1	NaCl	7,996
2	NaHCO ₃	0,350
3	KCl	0,224
4	K ₂ HPO ₄ · 3H ₂ O	0,228
5	MgCl ₂ · 6H ₂ O	0,305
6	1 кмоль/м ³ HCl	40 см ³
7	CaCl ₂	0,278
8	Na ₂ SO ₄	0,071
9	*(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057
10	1 кмоль/м ³ HCl	Необхідна кількість для регулювання pH

* – гідроксиметиламінометан (трис-буфер)

Виділяють три основні області в розчині біля імплантата [56]: 1) поверхневий шар, де високоструктуровані молекули води фізично адсорбовані на гідроксильованій поверхні за допомогою водневих зв'язків; 2) поверхнево заряджений шар, де позитивно заряджені частинки (такі як гідратовані неорганічні іони) адсорбуються на поверхні; 3) основний електролітний шар. У рідині, що за складом імітує плазму крові (SBF), початкова стадія пасивного розчинення містить гідроліз оксиду доти, поки не встановиться рівновага між поверхнею і розчином.

Протеїни сироватки можуть об'єднуватися з елементами сплаву і залишатись адсорбованими або десорбованими. Рівень розчинення зменшується із часом. Адсорбція протеїнів на поверхневому шарі *in vivo* доповнюється хімічними реакціями під час формування інтерфейсу «імплантат – кісткова тканина». Рівень переміщення гідратованих сполук титану через поверхневий шар знижується, змінюється градієнт концентрацій, зменшується швидкість розчинення.

Іони кальцію притягуються вкритою оксидом поверхнею завдяки електростатичній взаємодії з негативно зарядженими іонами кисню, і реагують із кислотними групами макромолекул. Адсорбція Ca^{2+} може нейтралізувати ефекти поверхневого заряду і зменшити різницю потенціалів через наявність шару оксиду [56].

При зануренні гідроксиапатиту у водні розчини відбувається незначне збільшення рН. Це можна пояснити таким чином: ГА частково дисоціює у розчині. Іони HPO_4^{2-} виходять із кристалічної ґратки апатиту швидше, ніж іони PO_4^{3-} [71]. Інші автори [56] вважають, що іони кальцію в розчині взаємодіють із кальцієм, утворюючи гідроксид кальцію. Спостерігається трансформація ГА в ДГА, спочатку рН збільшується, а потім поступово зменшується внаслідок обмеження втрати іонів кальцію ГА. Існує також гіпотеза [215], що оскільки ГА асоційований зі значною кількістю аморфних фаз, вони завдяки своїй розчинності швидко підвищують рН, який потім зменшується, через вимивання аморфної складової та набуває сталого значення [215].

6.7. Формування покриттів ГА методом термодепозиції (МТД) на титанових субстратах

6.7.1. Установка для осадження покриттів методом термодепозиції

Покриття отримували методом термодепозиції, що базується на осадженні кальцій-фосфатів із водного розчину на нагріті металеві субстрати. У нашій роботі метод термодепозиції

[233] набув подальшого розвитку: застосована система охолодження для створення градієнта температур між субстратом і маточним розчином, використана контрольна посудина з термопарою для контролю температури в ході експерименту. Крім того, перемішування здійснювали в контрольній та експериментальній склянках, що забезпечує однакові умови експерименту. Вдосконалена робоча установка для отримання покриттів методом термодепозиції показана на рис. 48.

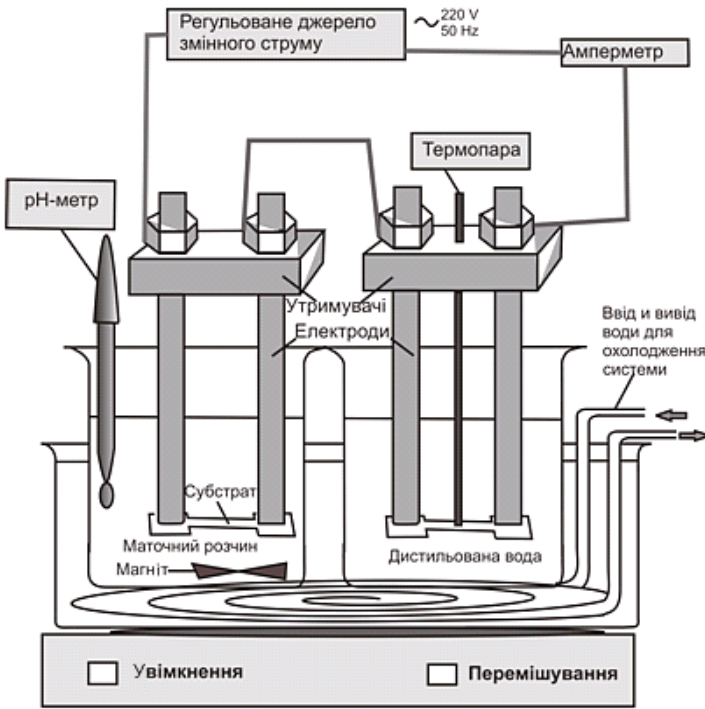


Рис. 48. Установка для одержання покриттів ГА методом термодепозиції із системою охолодження на Ti6Al4V-субстратах

Виникла також необхідність підбору оптимальних умов отримання покриттів ГА цим методом, оскільки аналіз літератури показав, що раніше досліджені були лише деякі

загальні аспекти впливу рН, температури, шорсткості поверхні й типу джерела іонів на формування покриттів [89, 154, 156–157, 196].

6.7.2. Особливості формування покриттів ГА методом термодепозиції

Експерименти проводили таким чином: субстрат прикріплювали до мідних електродів і занурювали в розчин, що містить CaCl_2 (ч. д. а) і NaH_2PO_4 (ч. д. а), з молярним співвідношенням $\text{Ca/P} = 1,67$ і концентраціями 10 ммоль/л і 6 ммоль/л відповідно. Пропусканням змінного струму через субстрат його нагрівали до температури 37–120 °С, яку контролювали мідь-константановою термопарою. Для підвищення точності вимірювань температури використовували контрольну ємність із дистильованою водою, в якій термопара щільно прикріплена до субстрату.

Як субстрати використовували Ti6Al4V -сплав ($S_{\text{субстр}} = 96 \text{ мм}^2$), що широко використовується в ортопедії та стоматології як матеріал для імплантатів. Дві склянки з титановими субстратами вміщували в ємність, заповнену дистильованою водою, в якій розміщена система охолодження. Для підтримки рівномірного розподілу температури у всьому об'ємі вихідного розчину використовували рівномірне перемішування в кожній склянці з використанням магнітної мішалки. Підтримання температури вихідного розчину на рівні не вище 25 °С здійснюється за рахунок циркуляції проточної води у системі охолодження.

У вихідний розчин для синтезу ГА об'ємом 200 мл занурювали очищений титановий субстрат, прикріплений до мідних електродів. Регулювання та підтримку рН на необхідному рівні (6,5–7,0) здійснювали додаванням краплями концентрованого (2 М) розчину NaOH .

Різке збільшення рН призводить до випадання осаду не локально на субстрат, а по всьому об'єму розчину, тому рівень рН підбирали близьким до нейтрального; тоді випадання осаду в розчині для синтезу ГА є незначним. Концентрації NaH_2PO_4 та

CaCl₂ підбирали таким чином, щоб при змішуванні двох розчинів NaH₂PO₄ (6 ммоль/л) і CaCl₂ (10 ммоль/л) не відбувалося випадання осаду, та зберігалось співвідношення Ca/P = 1,67.

Для вибору оптимального режиму отримання покриття ГА процес проводився при різних температурах (37, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120 °С). Загальний вигляд субстрату з покриттям схематично показаний на рис. 49.

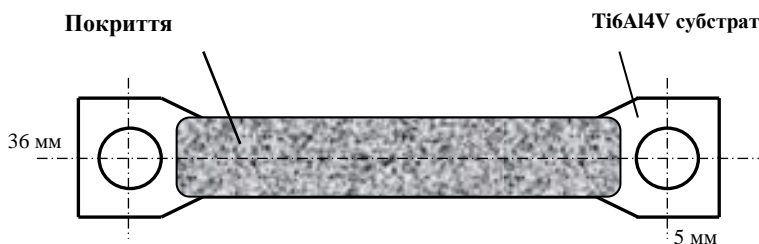


Рис. 49. Загальний вигляд Ti6Al4V-субстрату з покриттям отриманим методом термодепозиції

Результати дослідження фазового складу покриттів наведені в табл. 13 та на рис. 50 та 51.

Таблиця 13

Характеристики покриттів залежно від умов експерименту

Т суб- страту	Час про- вед. (год)	pH вихід- ного розчи- ну	Фазовий склад покрит- тя	Ca/P ат. %	Ca/P ваг. %	Маса по- криття, г
37 °С	2	6,6	–	1,08	1,40	0,0005
45 °С	2	6,58	–	1,32	1,70	0,0075
50 °С	2,5	6,55	–	1,49	1,92	0,0005
55 °С	2	6,54	–	1,58	2,04	0,0005

Т суб- страгу	Час провед. (год)	pH вихід- ного розчи- ну	Фазовий склад покрит- тя	Ca/P ат. %	Ca/P ваг. %	Маса по- криття, г
60 °C	2	6,6	–	1,63	2,10	0,0005
65 °C	2	6,54	–	1,70	2,19	0,0005
70 °C	2	6,5	–	1,65	2,13	0,0020
75 °C	2	6,6	аморф. ГА	1,73	2,24	0,0030
80 °C	2	6,68	аморф. ГА	1,84	2,38	0,0030
85 °C	2,5	6,6	ГА	1,50	1,94	0,0030
90 °C	2,5	6,6	ГА	1,68	2,17	0,0030
95 °C	2	6,6	ГА	1,76	2,27	0,0045
100 °C	2	6,5	ГА	1,92	2,48	0,0035
105 °C	3	6,5	ГА	1,70	2,19	0,0250
110 °C	2	6,6	ГА	1,68	2,17	0,0180
115 °C	2	6,5	ГА	1,70	2,19	0,0250
120 °C	2	6,5	ГА	1,80	2,33	0,0340

Покриття в яких чітко виражена фаза ГА, можна одержати при температурах 100–110 °C та pH не менше ніж 6,5.

Для покриттів, отриманих при температурах 75 і 80 °C при pH \approx 6,68, фазовий склад представлений аморфним ГА, про що свідчать піки низької інтенсивності (рис. 50). У покриттях,

отриманих при температурах від 85 до 120 °С і рН = 6,5–6,6, основною фазою є ГА (JCPDS № 9-0432); інші фази відсутні (рис. 50).

Із підвищенням температури субстрату зростає кристалічність ГА, відповідно збільшуються інтенсивності піків. При температурах 115–120 °С покриття має пористу (d пор = 100–150 мкм) дрібнокристалічну структуру, тому що внаслідок кипіння рідини у приповерхневому шарі в покритті утворюються пори. Дифрактограми покриттів, зняті безпосередньо на титанових субстратах, показані на рис. 51.

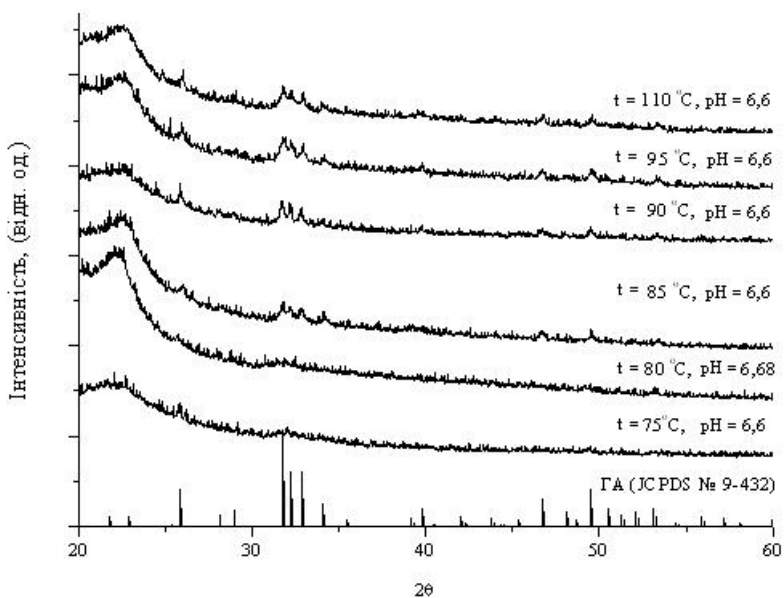


Рис. 50. Характерні криві рентгенівської дифракції для зразків, одержаних при температурах від 75 до 110 °С при рН = 6,5–6,68

При температурах 115 і 120 °С лінії рентгенівської дифракції від кристалічної ґратки титанової підкладки мають меншу інтенсивність, що пояснюється їх поглинанням у більш товстих шарах покриттів апатиту.

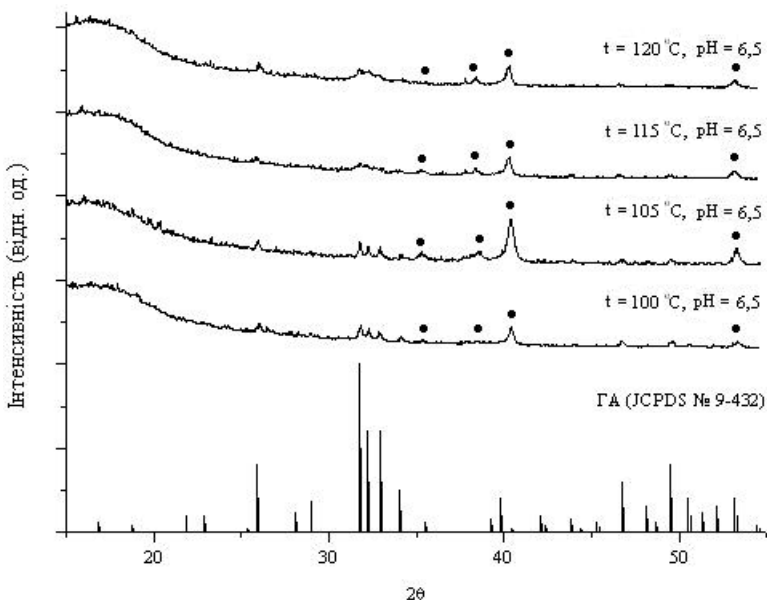


Рис. 51. Характерні криві рентгенівської дифракції для зразків, отриманих при температурах від 100 до 120 °С, рН = 6,5. Покриття зняті безпосередньо на титанових субстратах. Піки титану (JCPDS № 44-1294) позначені - ●

Для вибору часу отримання покриттів було проведено низку експериментів, у яких досліджували динаміку кристалізації покриттів у часі (через кожні 10 хвилин). Температура субстрату, виходячи з отриманих результатів, була обрана 105–110 °С, рН = 6,5. Результати дослідження зміни морфології покриттів у часі, що були отримані методом растрової електронної мікроскопії, показані на рис. 52.

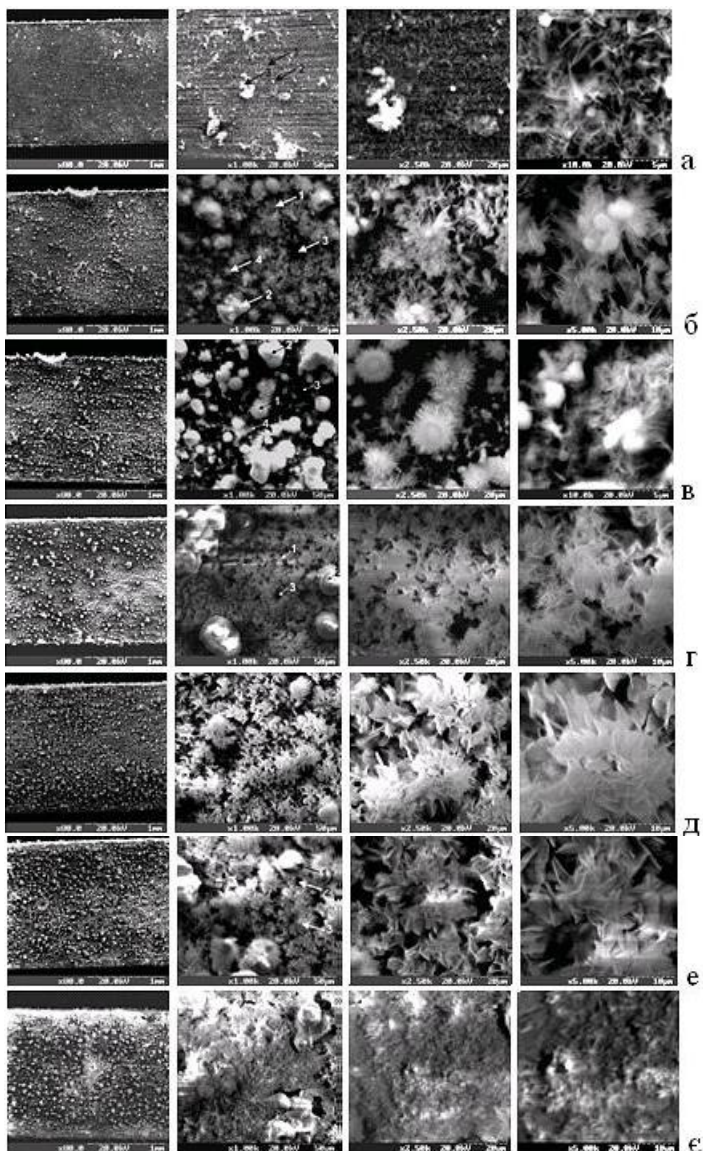


Рис. 52. Морфологія покриттів, отриманих протягом 70 хвилин осадження (після: а – 10, б – 20, в – 30, г – 40, д – 50, е – 60, є – 70 хв)

Після кожних 10 хвилин експерименту субстрат знімали, промивали в дистильованій воді, сушили при $t = 105^\circ\text{C}$ у сушильній шафі (10 хв).

З одержаних даних бачимо, що початок кристалізації відбувається на субстраті вже після 10 хвилин експерименту (рис. 52 а). Проте в цьому разі покриття утворюється у вигляді острівців, між якими видно підкладку, що підтверджується результатами енергодисперсійного рентгеноспектрального аналізу (рис. 53 а).

Після 20, 30 і 40 хвилин осадження покриття не рівномірне: є ділянки, вкриті кальцій-фосфатами, а є ділянки не вкриті, з незначною товщиною (рис. 53 б, в, г).

На рис. 52 (мікрофотографії з 1000-кратним збільшенням) показані точки, в яких проводили енергодисперсійний спектральний аналіз. У цих самих точках виміряне співвідношення Ca/P в отриманих покриттях. Результати наведені в табл. 14.

Дані енергодисперсійного рентгеноспектрального аналізу підтверджують те, що в деяких точках помітний матеріал субстрату (рис. 53 б, в, г).

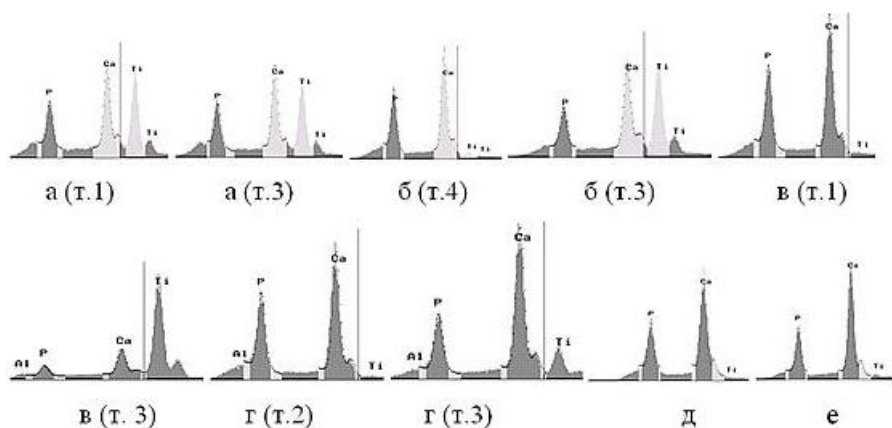


Рис. 53. Енергодисперсійні рентгенівські спектри кальцій-фосфатних покриттів на Ti6Al4V -субстратах, отриманих методом термодепозиції через кожні 10 хв. Осадження через: а – 10, б – 20, в – 30, г – 40, д – 50, е – 60 хв

Таблиця 14

Відношення Ca/P у покриттях, отриманих методом термодепозиції при температурі 105–110 °С, рН = 6,5 через кожні 10 хвилин осадження

Склад розчину	Час осадження, хв	Ca/P ат. %			Ca/P ваг. %			Маса покриття, г
		т. 1	т. 2	т. 3	т. 1	т. 2	т. 3	
Розчин із концентрацією 10 ммоль/л CaCl_2 та 6 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	10	1,6	1,68	1,75	2,08	2,18	2,27	0,0010
	20	1,62	1,63	1,91	2,10	2,14	2,47	0,0035
	30	1,60	1,67	1,96	2,07	2,17	2,53	0,0075
	40	1,66	1,49	2,29	2,14	1,92	2,97	0,0115
	50	1,67	2,13	1,94	2,16	2,76	2,52	0,0150
	60	1,70	1,86	1,7	2,22	2,41	2,22	0,0185
	70	1,77	1,67	1,68	2,29	2,17	2,17	0,0200

Як бачимо з табл. 14, у деяких точках (здебільшого це затемнені ділянки на рис. 52) спостерігається надлишок кальцію, особливо там, де товщина покриття є найменшою. Цьому можна дати як фізичне, так й інструментальне пояснення. Можливо, є кальцій-фосфат, що не ввійшов до структури кристала, але абсорбований на поверхні покриття. За рахунок цього в деяких точках відбувається зміщення відношення Ca/P у бік надлишку кальцію. Інше пояснення пов'язане з дослідженням морфології покриття за допомогою растрової електронної мікроскопії. На деяких ділянках покриття утворюється вуглецева плівка, що поглинає рентгенівське випромінювання. Менш жорстке рентгенівське випромінювання фосфору поглинається більшою мірою вуглецевою плівкою і самим зразком, відповідно відбувається ослаблення лінії фосфору. Внаслідок цього відбувається зміщення співвідношення Ca/P у бік надлишку кальцію.

Після 60 хвилин осадження не спостерігається значного приросту маси порівняно з інтервалом часу з 10 до 60 хв. Звідси можна зробити висновок, що тривалість експерименту 60 хвилин є достатньою для отримання однорідного покриття (рис. 53 е), яке повністю вкриває поверхню субстрату. Після 50 хвилин виміряне співвідношення Ca/P відповідає такому для гідроксиapatиту 1,67 ат. %. Морфологія покриття після 50 хвилин осадження також змінюється мало, що дозволяє зробити висновок, що для формування покриття з розвинутою поверхнею і необхідним співвідношенням Ca/P достатнім є час 60 хвилин [9].

Одержані нами результати вивчення морфології та елементного складу покриття показали, що достатній час для отримання покриття цим методом – 60 хвилин (при температурах від 100 °С). Зниження температури субстрату призводить до відповідного збільшення часу осадження покриття [10].

Перехід із рідкого стану в кристалічний належить до фазового переходу I роду з утворенням енергетично більш вигідної фази. Для здійснення переходу необхідно подолати потенційний бар'єр, який розділяє ці фази, що й відбувається під час нагрівання титанового субстрату за допомогою електричного струму. Завдяки різкому підвищенню температури в певній області розчину відбувається різкий перехід з рідкої у тверду фазу. Поблизу фазового переходу взаємодія найближчих частинок ніби компенсує одна одну, а взаємодія між частинками, що знаходяться на далекій відстані одна від одної, є домінуючою. Відбувається швидке утворення кристалів ГА, що є найбільш термодинамічно вигідною сполукою за даних умов.

Методом растрової електронної мікроскопії можна оцінити товщину отриманих покриттів за мікрофотографією, на якій зображено профіль пластинки (рис. 54 в), визначивши його товщину відносно маркера розміру.

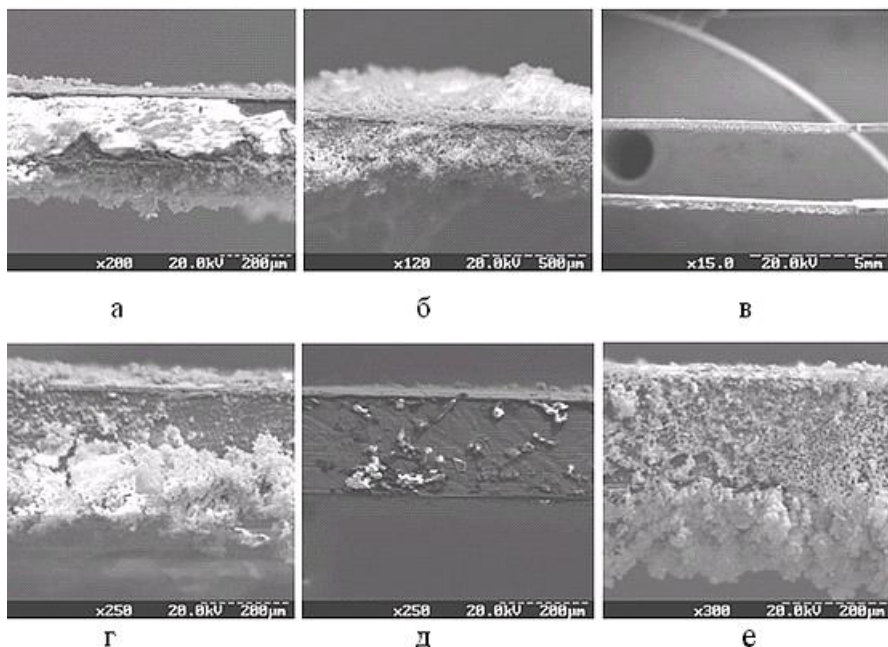


Рис. 54. Оцінка товщини, покриттів осаджених методом термодепозиції за умов: а) t субстрату = 95 °С, рН = 6,82 (1 година); б) t = 90 °С, рН = 6,65 (1 година); в) пластинки з покриттями для аналізу (г, е); г) t = 80 °С, рН = 6,65 (1 година); д) пластинка без покриття для порівняння зі зразком г; е) t = 105 °С, рН = 6,68 (30 хвилин)

Бачимо, що покриття знаходиться не лише зверху й знизу пластинки, а й із її боків. На верхньому боці субстрату спостерігається більша кількість покриття, що можна пояснити не лише осадженням ГА за рахунок підвищення температури субстрату, а й за рахунок дії сили тяжіння.

Для зразка (рис. 54 а) розрахована товщина отриманого покриття становить від 27 до 173 мкм, для зразка (рис. 54 б) від 66 до 277 мкм, для зразка (рис. 54 г) від 30 до 123 мкм, для зразка (рис. 54 е) від 32 до 184 мкм. Цей метод може бути використаний для приблизної оцінки товщини покриттів, отриманих методом термодепозиції.

6.7.3. Особливості морфології та структури покриттів ГА, отриманих у магнітному полі

Певним чином на кристалізацію кальцій-фосфатів впливає магнітне поле. У нашій роботі було застосоване магнітне поле 0,3 Т під час отримання покриттів ГА методом термодепозиції та досліджені зміни морфології, фазового складу, кристалічності та текстури покриттів залежно від орієнтування субстрату відносно напрямку магнітного поля (паралельно та перпендикулярно) та близькості субстрату до південного і північного полюсів магніту. На рис. 55 та 56 показані дифрактограми покриттів, отриманих у магнітному полі методом термодепозиції.

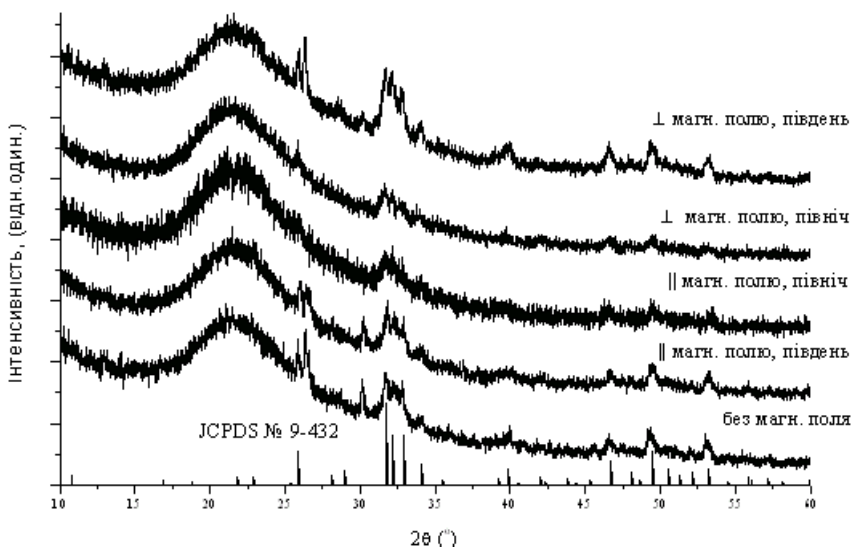


Рис. 55. Криві рентгенівської дифракції, зняті з покриттів, отриманих методом термодепозиції в магнітному полі та без застосування магнітного поля (порошок знятий з пластинки)

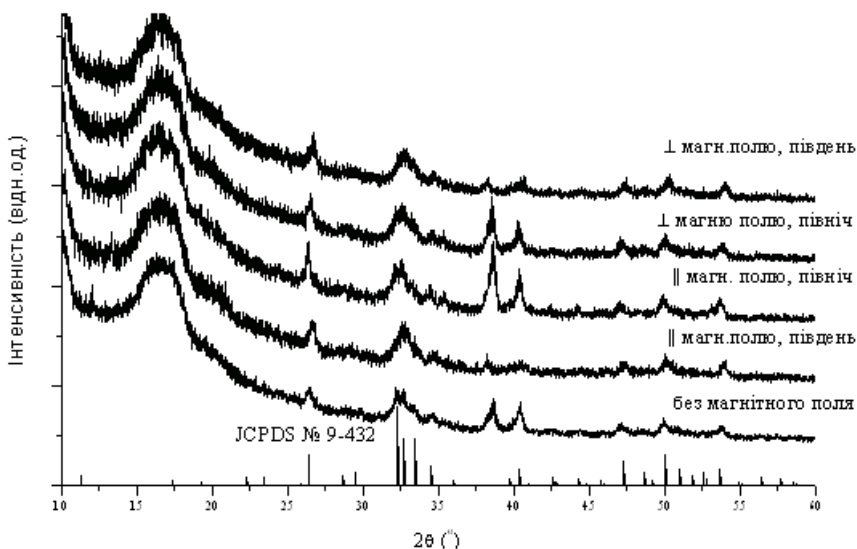


Рис. 56. Криві рентгенівської дифракції, зняті з покриттів, отриманих методом термодепозиції в магнітному полі та без застосування магнітного поля (покриття зняті безпосередньо на пластинці)

Вплив магнітного поля в цьому разі складно оцінити повною мірою через вплив температури, оскільки орієнтації молекул у магнітному полі перешкоджає їх тепловий рух.

Кальцій, у якого парамагнетизм обумовлений електронами провідності, має додатну магнітну сприйнятливість, що не залежить від температури. Зовнішнє магнітне поле намагається орієнтувати його разом зі зв'язаними з ним фосфат-іонами, вздовж свого напрямку (N→S), виникає магнітний момент (парамагнітний), паралельний зовнішньому полю.

У речовинах власні магнітні моменти, як правило, скомпенсовані: так, у спектрі кристала ГА електрони займають найнижчі рівні енергії й розміщуються попарно (з протилежними значеннями спіну). Однією з причин утворення кристалів і є зниження їх енергії під час організації завершеної – магнітно-скомпенсованої електронної оболонки з нульовим магнітним моментом. Кристали ГА орієнтовані в с-площині, що

відповідає орієнтації апатиту щодо колагенових фібрил в організмі.

Оскільки вплив підвищення температури на кристалізацію ГА істотно вищий, ніж вплив магнітного поля, цей фактор під час проведення термодепозиції є вирішальним. Однак спостерігається зростання інтенсивності окремих піків у межах $2\theta = 38\text{--}40^\circ$, що є спільним для покриттів ГА, отриманих поблизу північного полюса магніту, що вказує на певну залежність кристалічної текстури від впливу магнітного поля.

Морфологія покриттів ГА, отриманих методом термодепозиції поблизу різних полюсів магніту при застосуванні постійного магнітного поля (0,3 Т), зображена на рис. 57.

Субстрат розміщували перпендикулярно до напрямку магнітного поля (рис. 57 а–г) та паралельно напрямку магнітного поля (рис. 57 д–ж) та порівнювали з покриттям, отриманим без магнітного поля (рис. 57 з–і). Досліджували також вплив розташування субстрату біля південного та північного полюсів магніту на особливості морфології та кристалічної структури ГА. Так, морфологія покриттів, отриманих біля південного полюса магніту, подана на рис. 57 (а, б, д, е). Енергодисперсійні рентгенівські спектри є практично однаковими, тому на рис. 57 (і) наведено як приклад один спектр.

Існує певна морфологічна подібність покриттів, отриманих у \perp -напрямку магнітного поля між собою (а–г), такий самий ефект морфологічної подібності характерний для покриттів, отриманих у \parallel -напрямку магнітного поля (д–ж).

Покриття, отримані без застосування магнітного поля, не мають упорядкованої морфологічної будови. Така відмінність у морфології отриманих покриттів показує, що застосування магнітного поля впливає на їх структуру, створюючи певну орієнтацію кристалів, що, у свою чергу, відбивається на морфології. Орієнтуючий вплив магнітного поля на кристалічну структуру діє на стадії росту кристалів, оскільки на стадії зародкоутворення відбувається формування кристалів ГА більшою мірою за рахунок локального підвищення температури на субстраті. Магнітне поле в процесі росту кристала може

впливати на орієнтування кластерів або окремих іонів, за рахунок яких відбувається ріст кристалів ГА.

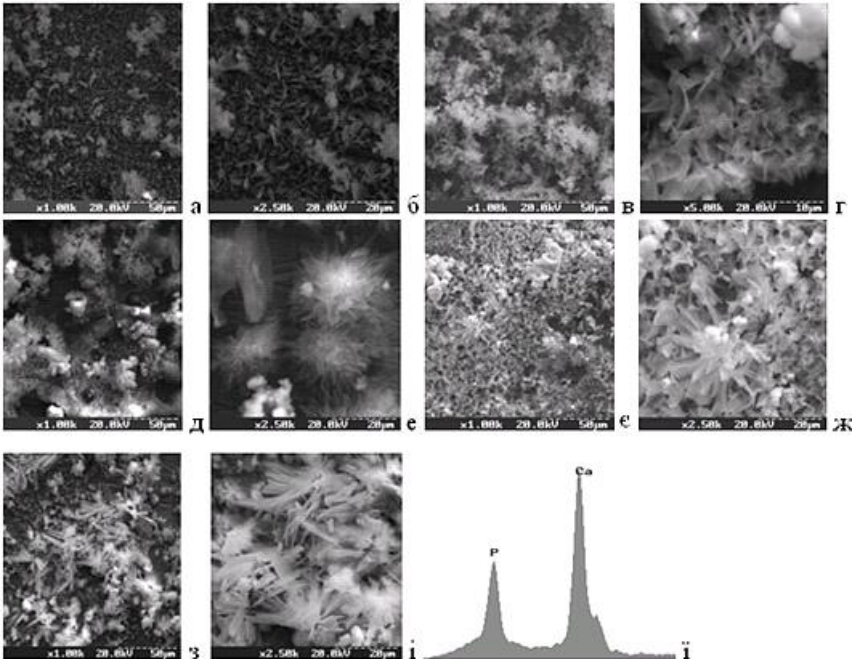


Рис. 57. Морфологія покриттів, отриманих методом термодепозиції в магнітному полі: субстрат розміщували у \perp -напрямку магнітного поля (а–г), поблизу південного полюса магніту (а, б) та поблизу північного полюса магніту (в, г); у \parallel -напрямку магнітного поля (д–ж), поблизу південного полюса магніту (д, е) та поблизу північного полюса магніту (є, ж) та без магнітного поля (з, і) з аналізом елементного складу (ї)

6.8. Вплив фізичної та хімічної обробки субстратів на властивості та характеристики покриттів на основі ГА

6.8.1. Обробка субстратів методом іонної імплантації

Серед фізичних методів модифікування поверхні титанового субстрату найбільш перспективним є метод іонної імплантації.

Основною метою застосування іонної імплантації киснем є створення негативно зарядженої поверхні за рахунок утворення груп Ti–O–, що прискорюють абсорбцію іонів кальцію.

До зразків Ti6Al4V-сплаву були імплантовані іони кисню за допомогою установки для іонної імплантації «Везувій-5». Установка складається із джерела іонів, поворотного магніту, прискорювальної трубки та приймальної камери. У приймальній камері знаходяться барабан зі зразками, піч для нагрівання зразків, циліндр Фарадея, де реєструється струм пучка. Визначаючи струм та час експерименту, задають певну дозу іонів, що імплантуються у зразок. Експеримент проводили за таких умов: $U = 100$ кВ, $T = 130$ °С, варіювали дозу імплантованого кисню $5 \cdot 10^{16}$ см⁻² та $7 \cdot 10^{16}$ см⁻². Умови проведення іонної імплантації киснем наведені в табл. 15.

Таблиця 15

Умови проведення іонної імплантації та осадження покриттів на основі ГА методом термодепозиції

Параметри іонної імплантації				Параметри термодепозиції		
Доза, см ⁻²	U, кВ	T, °С	Час провед.	pH р-ну	T, °С	Вихідні реактиви (ммоль/л)
5×10^{16}	100	130	1 год	6,65	105	10 CaCl ₂ / 6 NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O
7×10^{16}	100	130	1 год	6,72	105	10 CaCl ₂ / 6 NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O

Поверхневий шар представлений переважно TiO₂. В роботі [171] показано, що приповерхневий шар був представлений фазами TiO₂, Ti₂O₃ та TiO. Модифікована поверхня може містити домішки Al₂O₃, оскільки титановий сплав містить у своєму складі алюміній.

Морфологія покриттів, отриманих методом термодепозиції на титанових субстратах та оброблені методом іонної імплантації, показана на рис. 58. Співвідношення Ca/P, виміряні методом елементного мікроаналізу для покриттів, отриманих на оброблених іонною імплантацією зразках у разі застосування дози $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$, становлять від 1,90 до 1,94 ат. %, і при застосуванні дози $7 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$ – від 2,22 до 2,29 ат. %. Спостерігається тенденція зміщення співвідношення Ca/P у бік надлишку Ca зі зростанням дози імпантованого кисню.

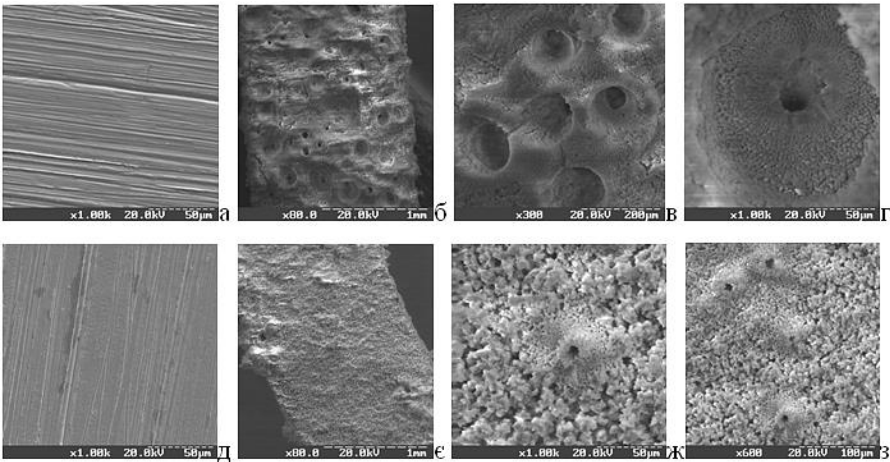


Рис. 58. Морфологія поверхні титанових субстратів, оброблених методом іонної імплантації киснем: а) доза $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$; б–г) з нанесеним методом термодепозиції покриттям ГА д) доза $7 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$; з нанесеним методом термодепозиції покриттям ГА (е–з)

Фазовий склад покриттів, отриманих на модифікованих іонною імплантацією субстратах та субстраті без попередньої модифікації, поданий на рис. 59.

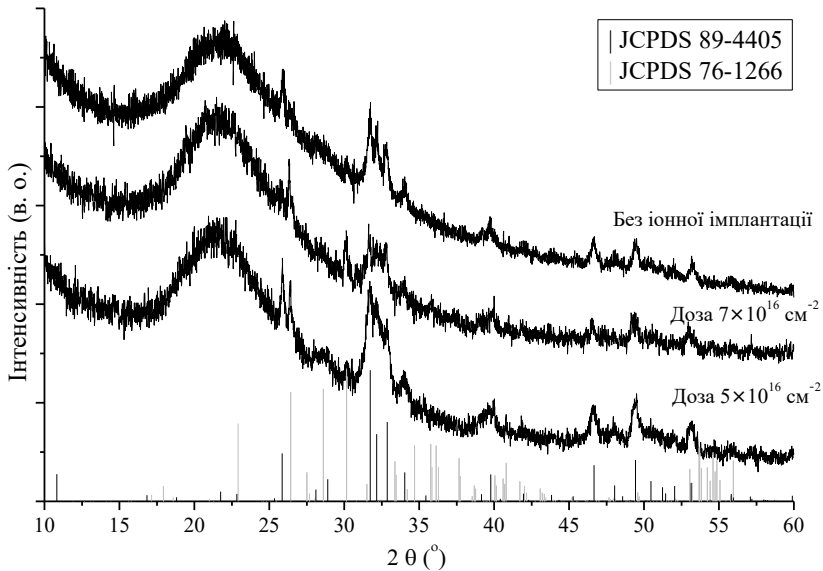


Рис. 59. Криві рентгенівської дифракції покриттів, отриманих методом термодепозиції на оброблених титанових субстратах із застосуванням різної дози імпантованого кисню ($5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$, $7 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$) порівняно з покриттям на необробленому титановому субстраті

На дифрактограмах покриттів ГА, отриманих на Ti6Al4V субстратах, після іонної імплантації наявні піки TiO_2 (JCPDS 76-1266), що підтверджує формування на поверхні оксидного шару, який утворюється після попередньої обробки субстрату методом іонної імплантації.

6.8.2. Дослідження морфології та фазового складу покриттів, отриманих на хімічно оброблених субстратах

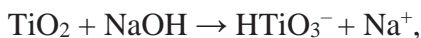
При отриманні біоактивних покриттів гідроксилапатиту методом термодепозиції використовували різні способи попередньої хімічної обробки (NaOH , HF , H_2O_2). Застосовувалися характеристики покриттів (розчинність у фізіологічному розчині (SBF) протягом 7 днів; адгезія до

субстрату; морфологія поверхні та фазовий склад), отриманих на необроблених субстратах і після попередньої хімічної обробки.

Метод термодепозиції застосовується для швидкого отримання однорідних покриттів на титанових і Ti6Al4V-субстратах при відносно низьких температурах. Метою хімічної обробки перед осадженням є модифікування поверхні, внаслідок чого прискорюється процес утворення зародків кристалів ГА. Обробка Ti6Al4V субстрату за допомогою HF проводилася вперше.

Після лужної, пероксидної та кислотної обробок титанові зразки були занурені в 200 мл розчину для термодепозиції, що містить 10 ммоль/л CaCl₂ і 6 ммоль/л Na₂HPO₄ з метою отримання покриття ГА. Термодепозицію кальцій-фосфатних покриттів проводили при 105 °C протягом 2 годин із водних розчинів, які містять іони Ca²⁺ і PO₄³⁻ при pH = 6,5, що регулювали додаванням NaOH.

Під час обробки титанового субстрату 35 % розчином NaOH шар TiO₂ частково розчиняється у лужному середовищі через взаємодію з гідроксо-групами і спостерігаються такі реакції:



Морфологія поверхні Ti6Al4V, обробленої лугом, показана на рис. 60 (А) та після нанесення покриттів рис. 60 (В-Д).

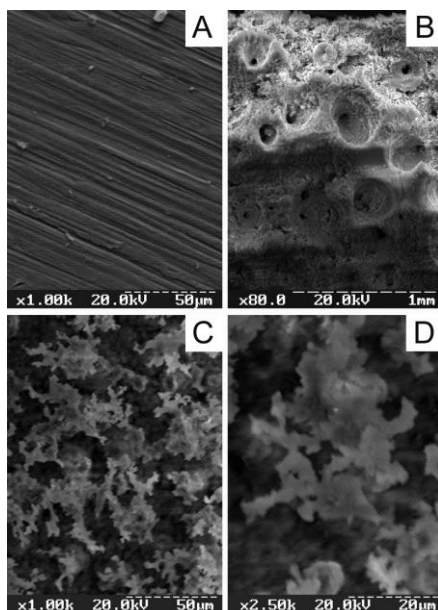
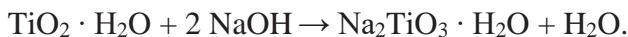


Рис. 60. Мікрофотографії (А) обробленої за допомогою NaOH поверхні та (В, С, D) осадженого методом термодепозиції (105 °С, рН = 6,5, 2 години) покриття ГА (при різному збільшенні)

Подальша обробка гідроксидом натрію гідратованого шару TiO_2 приводить до утворення шару титанату натрію:



У розчинах, що містять іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} -іони, шар титанату натрію гідролізується з утворенням гідроксогруп на поверхні. Ці групи є центрами зародкоутворення під час формування кристалів ГА за рахунок їх взаємодії з іонами кальцію. Механізм взаємодії іонів Ca^{2+} та PO_4^{3-} з поверхнею, обробленою NaOH при утворенні апатиту, показаний на рис. 61.

Негативно заряджені Ti-O-групи взаємодіють із позитивно зарядженими іонами Ca^{2+} , що притягують фосфат-іони з маточного розчину, формуючи кальцій-фосфатний шар.

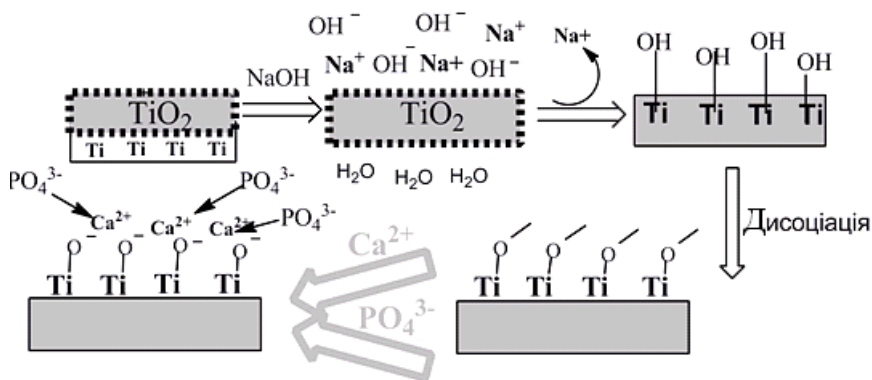


Рис. 61. Схема взаємодії обробленої NaOH поверхні Ti6Al4V-субстрату з іонами Ca²⁺ та PO₄³⁻ з вихідного водного розчину для синтезу апатиту

Застосовуючи метод термодепозиції, можливе формування пористих покриттів ГА різної товщини (до 1,04 мм) на поверхні оброблених лугом субстратів (рис. 60 В). Товщина покриття може варіюватися зміною часу проведення експерименту.

Морфологія попередньо підготованої поверхні Ti6Al4V-субстрату, обробленого 35 % розчином пероксиду водню, показана на рис. 62 (А). Пористе покриття було отримане методом термодепозиції за умов: температура субстрату 105 °С, рН розчину = 6,5, час осадження – 2 години (рис. 62 (В)). Отримане покриття має пори розміром до 150 мкм. На рис. 62 (С, D) показані морфологія пори і рівна поверхня (рис. 62 (Е, F)) покриття ГА.

Обробка титанового субстрату 35 % H₂O₂ приводить до утворення гелю титану, що містить групи Ti-OH і Ti-O-O-N на поверхні. Ці групи сприяють осадженню гідроксиapatиту завдяки утворенню негативно зарядженої поверхні за рахунок Ti-O- та Ti-O-O-. Хімічна обробка розчином пероксиду водню перед осадженням гідроксиapatиту методом термодепозиції сприяє формуванню однорідного пористого покриття на поверхні Ti6Al4V-субстрату (рис. 62).

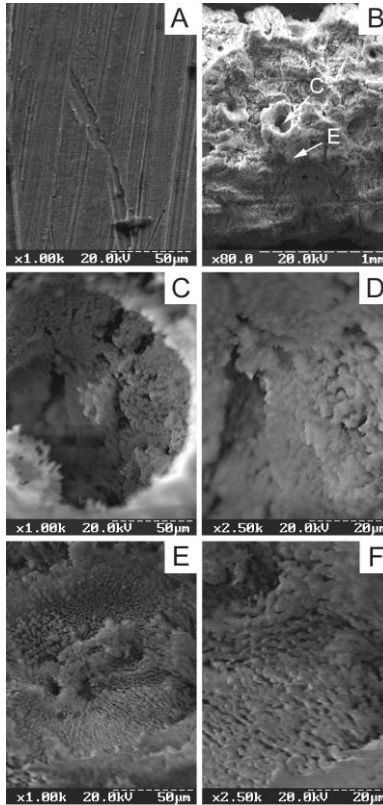
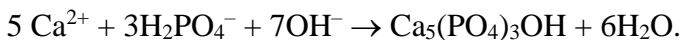


Рис. 62. Мікрофотографії морфології (А) Тi6Аl4V-субстрату, обробленого H₂O₂, після осадження покриття ГА методом термодепозиції, (С) загальний вигляд покриття при збільшенні: (В), (D) – у порі; (Е, F) – на рівній поверхні

Взаємодія поверхні, обробленої H₂O₂, з компонентами розчину для синтезу ГА схематично зображена на рис. 63 і може бути показана такими рівняннями реакцій:



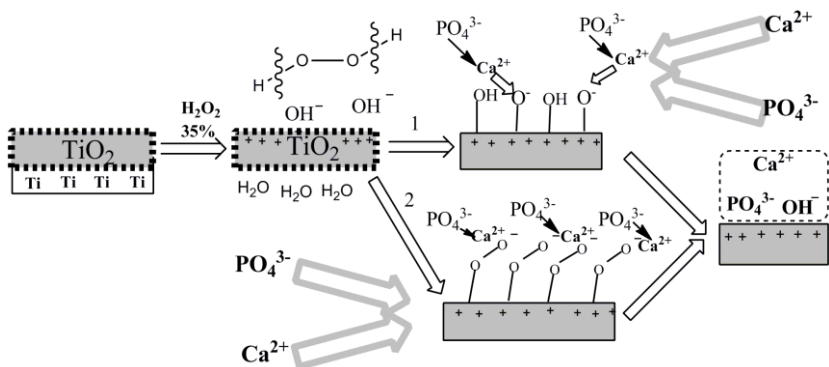


Рис. 63. Схема взаємодії поверхні, обробленої H₂O₂, з іонами Ca²⁺ і PO₄³⁻ вихідного водного розчину для синтезу апатиту

Осадження покриттів гідроксиапатиту методом термодепозиції після попередньої обробки субстратів 10 % розчином HF

Метою попередньої обробки Ti6Al4V-субстратів 10 % розчином HF є модифікування поверхні субстрату для отримання шорсткуватої поверхні, що сприяє кристалізації кальцій-фосфатів. Субстрат був оброблений протягом 1 хвилини при кімнатній температурі, покриття гідроксиапатиту наносили методом термодепозиції водного розчину, що містить іони Ca²⁺ і PO₄³⁻, як зазначалося вище (температура субстрату 105 °C, рН = 6,5 протягом 2 годин).

На рис. 64 показана морфологія Ti6Al4V-субстрату, обробленого 10 % розчином HF (А) і морфологія отриманого методом термодепозиції покриття ГА на обробленому субстраті за таких умов: температура субстрату 105 °C, рН = 6,5 протягом 2 годин відповідно.

Як титан, так і його оксид є надзвичайно реакційно здатними по відношенню до плавикової кислоти. Здатність чотиривалентного титану утворювати фторидні комплекси добре відома [5]. В розчині плавикової кислоти іони Ti⁴⁺ (або більш правильно TiO²⁺), поєднуються із фторид-іонами, з утворенням комплексів: TiOF⁺, TiOF₂⁻, TiOF₃⁻, TiOF₄²⁻. Така

хімічна обробка титанового субстрату приводить не лише до утворення шорсткуватої поверхні, а й до формування на ній фторидних комплексів, що, у свою чергу, сприяє взаємодії з кальцієм і фосфат-іонами.

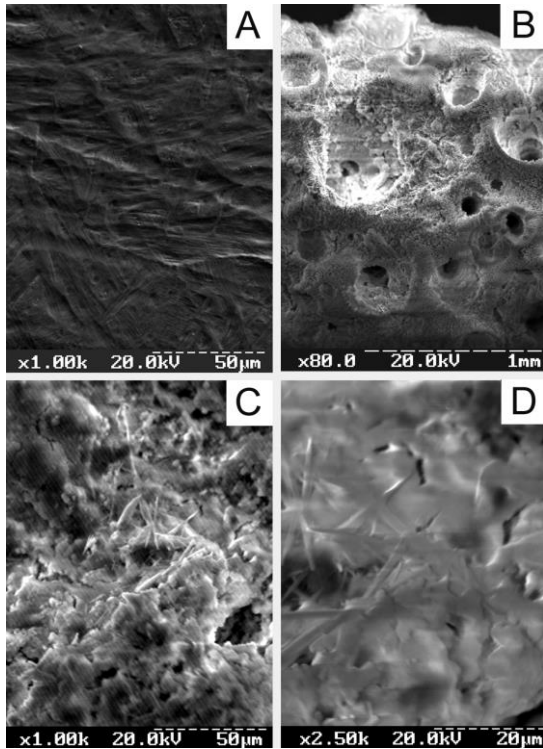


Рис. 64. Мікрофотографії поверхні Ti6Al4V-субстрату, обробленої HF (A), з нанесеним методом термодепозиції покриттям ГА (B, C, D)

Орієнтовна схема взаємодії плавикової кислоти з оксидом титану (IV) на поверхні субстрату показана на рис. 65.

Фазовий склад покриттів, отриманих методом термодепозиції на хімічно-оброблених субстратах, показаний на рис. 66.

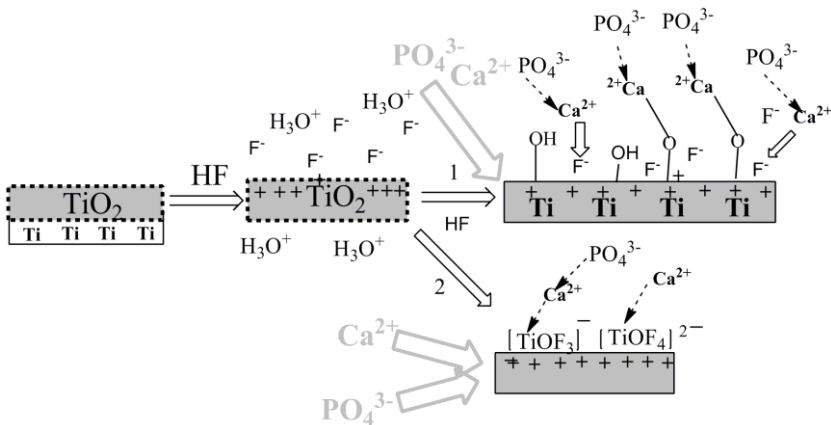


Рис. 65. Схема взаємодії обробленої поверхні Ti6Al4V-субстрату з HF та іонами Ca²⁺ та PO₄³⁻ вихідного розчину для синтезу апатиту

Як бачимо з кривих рентгенівської дифракції (рис. 66), основною кристалічною фазою є ГА. Покриття на необробленому субстраті є більш висококристалічним, ніж на попередньо оброблених субстратах. Це може бути пояснено тим, що в останньому випадку відбувається більш швидке формування покриття. При швидкому осадженні недостатньо часу для поступового росту кристалів ГА. Ось чому покриття на оброблених субстратах є більш аморфними, а піки апатиту мають меншу інтенсивність.

Для аналізу хімічного складу покриттів, осаджених методом термодепозиції на необробленому та оброблених за допомогою NaOH, H₂O₂ і HF титанових субстратах, оцінювали атомне співвідношення Ca/P з використанням енергодисперсійного аналізу. Виміряні відношення Ca/P для покриттів ГА такі: для необробленого – 1,63, після впливу NaOH – 1,57, H₂O₂ – 1,64 і HF – 1,67 відповідно. Такі співвідношення близькі до того, що характерне для апатиту кісткової тканини [99].

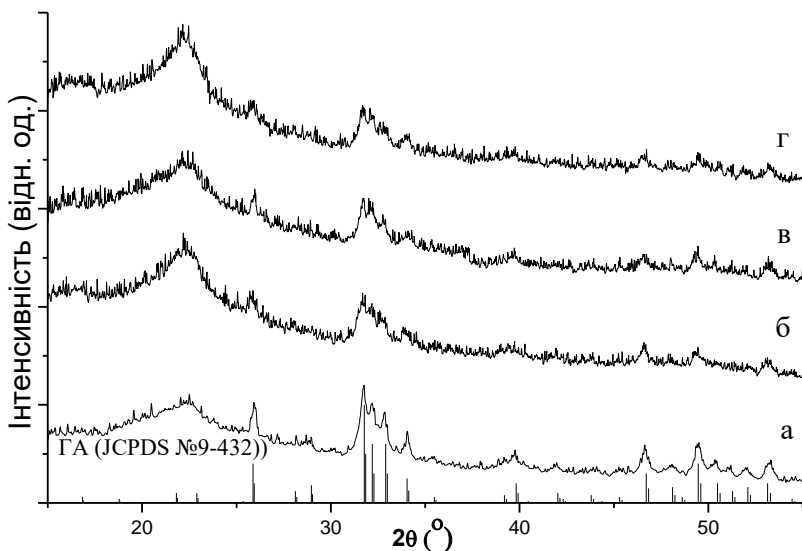


Рис. 66. Дифрактограми покриттів, отриманих методом термодепозиції ($t_{\text{субстр}} = 105\text{ }^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,5$, осадження – 2 години) на: а) необробленій поверхні Тi6Al4V-субстрату; б) поверхнях, що оброблені NaOH; в) HF; г) H_2O_2

6.9. Оцінка властивостей покриттів ГА та їх розчинності у рідинах, що імітують мінеральний склад плазми крові

Зразки покриттів гідроксиапатиту на титанових субстратах, отриманих методом термодепозиції, були занурені в розчин, що імітує сольовий склад плазми крові (SBF), як описано в роботі [151].

Кожен субстрат із покриттям занурювали у 50 мл розчину SBF на визначені проміжки часу. Розчин оновлювали щодня; після експерименту зразки промивали дистильованою водою та висушували при $100\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Результати дослідження фазового складу показали, що інтенсивність піків, що відповідають ГА із зануренням у розчин SBF, зростає. Це пов'язане з тим, що зі зростанням часу занурення зростає кристалічність отриманих покриттів. Завдяки збільшенню кристалічності покриттів зменшується їх

розчинність. Розчинення та осадження є зворотними реакціями, напрям перебігу залежить від різниці між концентрацією розчину (c) і рівноважною концентрацією (c_∞). На початкових стадіях $c_\infty > c$, переважає процес розчинення: концентрація розчину збільшується. Коли $c > c_\infty$, напрям реакції змінюється і переважає процес осадження. На ранніх стадіях на розчинність значною мірою впливає розмір кристалітів. Кінетику розчинення ГА можна описати за допомогою такого рівняння:

$$\frac{dc}{dt} = ks(c_\infty - c)^n, \quad (1)$$

де dc/dt – швидкість розчинення; k – константа швидкості розчинення; s – питома поверхня; c_∞ – рівноважна концентрація; c – концентрація розчину через певний проміжок часу; n – порядок реакції. На початку реакції відмінністю між різними покриттями в параметрах ($c_\infty - c$) можна знехтувати. У цьому разі найбільший вплив на розчинність має питома поверхня. Розчинність зменшується при збільшенні часу контакту поверхні з розчином. Питома поверхня покриття залежить від розміру кристалітів покриття: чим він більший, тим менша питома поверхня покриття. Існує співвідношення між ростом кристалів та їх розчиненням. Ріст кристалів можна описати за допомогою рівняння

$$-\frac{dc}{dt} = k_2 s_2 (c - c_\infty)^n, \quad (2)$$

де $-dc/dt$ – швидкість росту кристала (осадження); k_2 – константа швидкості росту кристала (осадження); s_2 – загальна кількість доступних центрів росту; c_∞ – рівноважна концентрація; c – концентрація розчину через певний проміжок часу; n – порядок реакції.

При зануренні покриттів у розчин SBF відбувається спочатку їх часткове розчинення (перший день) унаслідок невисокої концентрації компонентів у вихідному розчині, але з часом розчинність зменшується. При застосуванні трис-буфера

(гідроксиметиламінометану), концентрації ($c_{\infty} - c$) після першого дня занурення покриття є достатньо високими для того, щоб розчинність покриття ГА практично не змінювалася перші 2 дні (рис. 67).

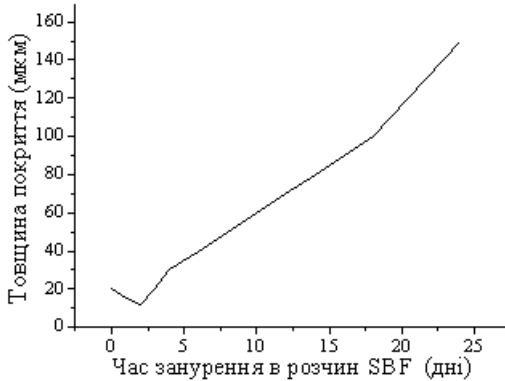


Рис. 67. Залежність зміни товщини покриття від часу занурення в розчин, що імітує сольовий склад плазми крові

Після двох днів знаходження субстрату з покриттям ГА у розчині SBF переважає процес осадження завдяки збільшенню кількості доступних центрів для зародкоутворення. Це можливо як за рахунок часткового розчинення покриття, так і завдяки попередньому проведенню термодепозиції й приводить до збільшення швидкості осадження і товщини утвореного покриття.

Поведінка покриттів ГА, отриманих на оброблених NaOH, H₂O₂ та HF-субстратах *in vitro*, оцінювалася в рідині, що моделює сольовий склад плазми крові. Такий експеримент дає змогу дослідити зміни структури та хімічного складу покриттів у модельних умовах живого організму. Субстрати з покриттями ГА, а також субстрати без покриттів були занурені в 20 мл розчину SBF на 7 днів при 37 °C, розчин SBF оновлювали кожні 2 дні. Після цього зразки були промиті дистильованою водою та висушені при кімнатній температурі протягом 24 годин. Усі покриття, отримані методом термодепозиції на попередньо хімічно оброблених субстратах, мають на поверхні білий осад. Дослідження морфології покриттів (рис. 68) виявили певну

різницю в осадах, отриманих на субстратах, оброблених H_2O_2 , NaOH та HF . При 7-денному зануренні субстратів, у поверхню яких був імплантований кисень, у розчині SBF спостерігається поява ГА низької кристалічності. Осад не утворився після занурення титанового субстрату в SBF протягом 7 днів (рис. 68 А). Такий результат показує, що неокриті Ti6Al4V зразки з аморфним оксидом титану на поверхні не стимулюють ріст кристалів упродовж 7-денного проміжку часу, але після попередньої обробки субстратів NaOH та H_2O_2 відбувається швидке формування однорідного покриття ГА.

Щільний шар ГА був отриманий на поверхнях, модифікованих H_2O_2 та NaOH . Обробка субстрату за допомогою HF створює шорсткувату поверхню, на якій формується покриття з вираженою кристалічністю.

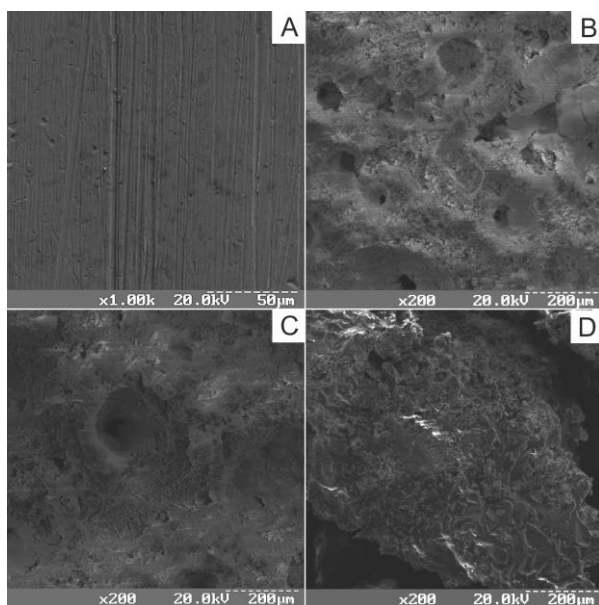


Рис. 68. Морфологія поверхні необробленого Ti6Al4V -субстрату (А) та покриттів ГА, отриманих на оброблених H_2O_2 (В), NaOH (С) та HF (D) субстратах, після 7-денного занурення в розчин SBF

Отже, результати досліджень показали, що внаслідок хімічної обробки титанових субстратів, яка проводиться перед термодепозицією, отримані покриття є більш однорідними та мають кращу адгезію. Передбачається, що такі покриття матимуть краще зв'язування з кістковою тканиною, що формується, завдяки порам розмірами 25–150 мкм.

6.10. Оцінка адгезії покриттів, отриманих на попередньо оброблених субстратах

Виміряна адгезія для покриттів ГА, отриманих після попередньої обробки субстратів методом іонної імплантації та на необробленому субстраті, наведена в табл. 16.

Таблиця 16

Результати вимірювання адгезії покриттів до субстратів після попередньої обробки

Попередня обробка	Площа (мм ²)	Сила (Н)	Адгезія (Н/м ²)
NaOH (35 %)	5	0,5	120000
H ₂ O ₂ (35 %)	7	0,7	100000
HF	6	0,6	133330
Іонна імплантація киснем, доза $7 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$	16	0,5	31250
Іонна імплантація киснем, доза $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$	16	0,2	12500
Відсутня	10	0,8	80000

Адгезія для покриттів ГА, отриманих після іонної імплантації в субстрати кисню, істотно слабша, ніж для покриттів, отриманих на субстратах після хімічної обробки.

Необхідно зазначити, що при підвищенні дози імплантованого кисню адгезія покращується. При іонній імплантації збільшується щільність отриманих покриттів, але вони повністю відриваються від субстрату вже після другої спроби.

Отже, результати досліджень показали, що внаслідок хімічної обробки, що проводиться перед термодепозицією, отримані покриття є більш однорідними з кращою адгезією. Передбачається, що такі покриття матимуть краще зв'язування з кістковою тканиною, що формується, завдяки порам, які мають розміри 25–150 мкм, та кристалічній структурі.

6.11. Формування покриттів ГА на магнієвих субстратах методом занурення

6.11.1. Модифікування поверхні магнієвих субстратів

Обробка магнієвих субстратів концентрованими розчинами NaOH (35 %) та H₂O₂ (10 %), нагріванням при 60 °C протягом 120 хвилин приводить до швидкого утворення оксидного шару, представленого MgO. Покриття осаджували на магнієвих субстратах методом занурення у розчин, що містить 10 ммоль/л CaCl₂ + 6 ммоль/л NaH₂PO₄. На рис. 69 подані криві рентгенівської дифракції для покриттів, утворених на оброблених та необроблених хімічним методом магнієвих субстратах.

Унаслідок швидкої пасивації магнієвих субстратів, що відбувається в розчинах H₂O₂ та NaOH, утворюється поверхня, вкрита MgO. Корозія Mg в розчині (10 CaCl₂ / 6 NaH₂PO₄) істотно уповільнюється, однак кількість осаду, що сформувався на поверхні магнію, також зменшується. Дослідження морфології оброблених поверхонь свідчить про наявність тріщин як наслідок швидкого формування оксидного покриття в агресивному середовищі.

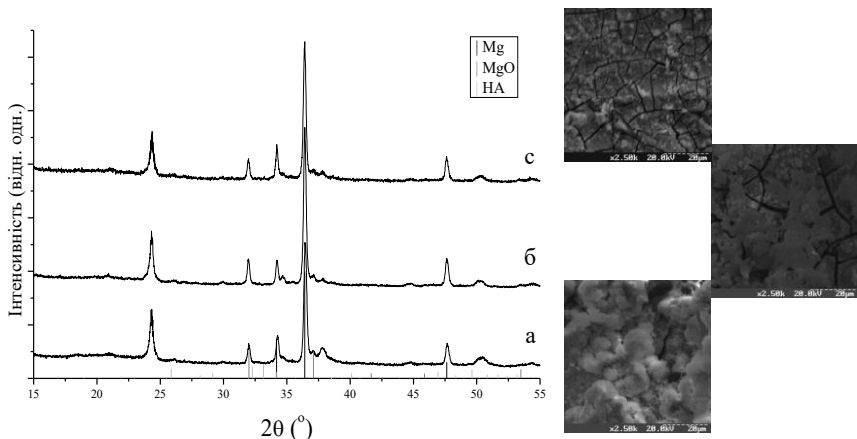


Рис. 69. Криві рентгенівської дифракції та морфологія поверхні покриттів, що одержані на необробленому Mg-субстраті (а) та на субстратах, оброблених NaOH (б) і H₂O₂ (с). Піки магнію та основні піки апатиту накладаються

6.11.2. Дослідження морфології та фазового складу покриттів, отриманих під впливом магнітного поля

Для отримання покриттів на магнієвих субстратах ми використовували метод занурення за умов близьких до фізіологічних (pH = 6,65, t = 37 °C). Як вихідні розчини для синтезу ГА взяті розчини: 10 ммоль/л CaCl₂ + 6 ммоль/л NaH₂PO₄ · 2H₂O та 10 ммоль/л Ca(NO₃)₂ · 4H₂O + 6 ммоль/л Na₂HPO₄ · 12H₂O. Основною перевагою методу занурення є низька температура отримання покриттів, що дозволяє ввести до їх складу біологічні молекули, які руйнуються при високих температурах.

Елементний склад магнієвого субстрату було визначено за допомогою енергодисперсійного аналізу (рис. 70). Фазовий склад субстрату представлений Mg (JCPDS № 35-821) та Mg(OH)₂ (JCPDS № 44-1482), який є основним продуктом корозії магнію.

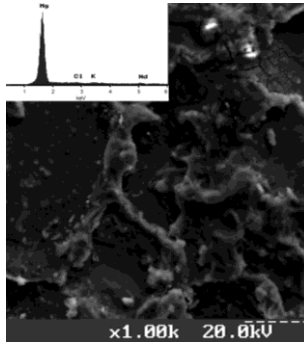


Рис. 70. Морфологія та елементний склад поверхні необробленого Mg-субстрату

Осадження покриттів гідроксиапатиту на магнієві субстрати проводили під впливом магнітного поля низької інтенсивності (0,3 Т) та без магнітного поля. Варіюючи іонний склад вихідного розчину і фізичні умови осадження, можна отримати покриття різного фазового складу: ГА, брушит (дикальційфосфат дигідрат) та їх суміші. Експеримент проводили в постійному магнітному полі. Використовували комплект прямокутних Sm/Co-магнітів розміром 50x20x15 мм, що розміщені на немагнітній основі. По обидва боки магнітів (біля південного і північного полюсів) розміщували склянки з розчинами для синтезу ГА (рис. 71). У кожній склянці було розміщено Mg-субстрат у безпосередній близькості до магніту.

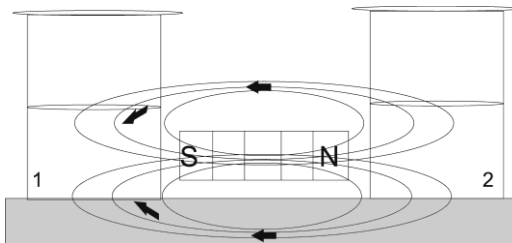


Рис. 71. Схема експерименту для осадження кальцій-фосфатних покриттів у магнітному полі біля різних полюсів магніту (склянка з магнієвим субстратом розміщена біля південного полюса (1) та біля північного полюса (2) магніту

Індукцію магнітного поля (0,3 Т) виміряли на полюсах магніту за допомогою приладу Gauss-/Teslameter F 54 (Magnetphysik Dr. Steingroever. GMBH). Експерименти проводили при температурах 22 і 37 °С за наявності та без магнітного поля.

Зразки занурювали в розчини для осадження кальцій-фосфатів з різним іонним складом при рН = 6,65, температурах розчину 22 та 37 °С на 72 години. Використовували три типи вихідних розчинів, що наведені в табл. 17. рН вихідного розчину підвищували додаванням розчину NaOH. Покриття, отримані на Mg-субстратах, були промиті дистильованою водою та висушені при кімнатній температурі протягом 48 годин.

Таблиця 17

Основні характеристики вихідних розчинів, що використовуються для осадження покриттів на магнієвих субстратах методом занурення

	Склад	Концентрація	рН розчину, час осадження, температура	Фазовий склад
Розчин 1	CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	10 ммоль/дм ³ , 6 ммоль/дм ³	рН = 6,6; 72 год, 22 °С	Брушит
Розчин 2 після термодепозиції	CaCl ₂ , NaH ₂ PO ₄ ·2H ₂ O	Не визначена	рН=6,6; 72 год, 22 °С	Брушит, ГА
Розчин 3	Ca(NO ₃) ₂ ·4H ₂ O, Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O	10 ммоль/дм ³ , 6 ммоль/дм ³	рН=6,6; 72 год, 37 °С	ГА

Осадження покриттів із вихідного розчину 1 проводили методом занурення при кімнатній температурі (22 °С) упродовж 72 годин при $\text{pH} = 6,65$. Фаза брушиту спостерігається на дифрактограмах як у складі осаду, отриманого в розчині, так і у складі покриття на Mg-субстраті. Морфологія покриттів, отриманих у магнітному полі біля північного (рис. 72 А) та південного полюсів (рис. 72 В, D), істотно відрізняється як між собою, так і від покриття, отриманого без магнітного поля (рис. 72 С, E).

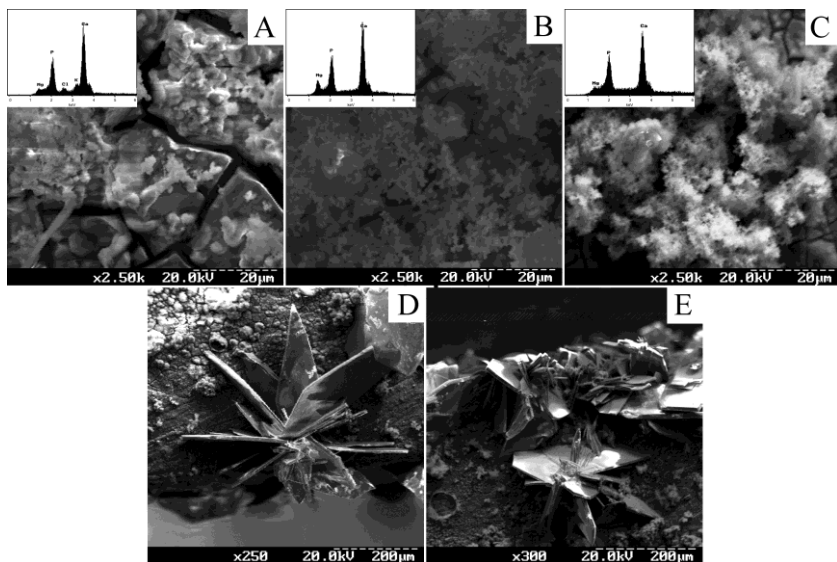


Рис. 72. Морфологія покриттів, осаджених у магнітному полі поблизу північного (A) та південного (B, D) полюсів магніту і без магнітного поля із (C, E) зі спектрами елементного аналізу

Отримане покриття брушиту у деяких місцях представлене пластинчастими мікророзмірними кристалічними частинками зі спільним центром (рис. 72 D, E), але більша частина покриття є аморфною (рис. 72 В, С). Ми досліджували вплив магнітного поля на кристалічну текстуру брушиту. Параметри кристалічної ґратки були розраховані для дослідження орієнтації кристалів

брушиту за наявності магнітного поля. Інтенсивності піків найбільш виражені в покриттях, отриманих поблизу південного полюса магніту.

Із рис. 73 можна бачити, що магнітне поле істотно впливає на кристалічну текстуру брушиту. Кількісний фазовий аналіз показує наявність лише однієї фази – брушиту (JCPDS № 11-293), що має яскраво виражену текстуру. Для покриття, отриманого без застосування магнітного поля (рис. 73 а), інтенсивності піків $(-1\ 1\ 2)$ та $(0\ 2\ 0)$ можна порівняти. У покриттях, отриманих у магнітному полі, інтенсивність піка $(0\ 2\ 0)$ збільшується для покриття, отриманого поблизу південного полюса магніту (рис. 73 б) і досягає максимуму для покриття, отриманого поблизу північного полюса магніту (рис. 73 в). Для брушиту, отриманого поблизу північного полюса магніту, інтенсивність піка $(-1\ 1\ 2)$ значно зменшується, що вказує на переважну орієнтацію кристалітів відносно b-осі.

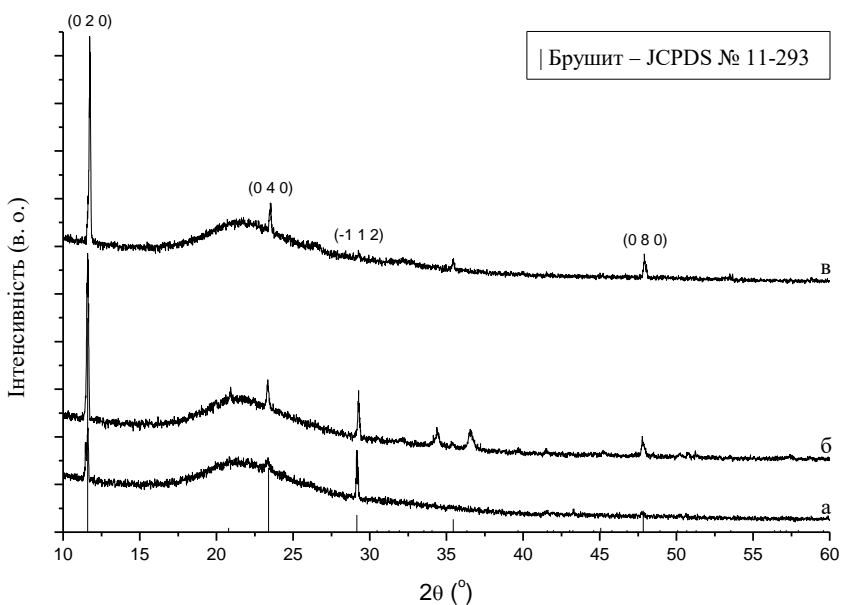


Рис 73. Криві рентгенівської дифракції покриттів на основі брушиту, отриманих на магнієвих субстратах з розчину 1 методом занурення без магнітного поля (а) та в магнітному полі поблизу південного (б) та північного (в) полюсів магніту

Визначення середнього розміру кристалітів брушиту (табл. 18) показує, що під впливом магнітного поля розмір кристалітів збільшується в площині (0 2 0) одночасно зі зменшенням у площині (-1 1 2), що найбільш виражене для брушиту, отриманого поблизу північного полюса магніту (рис. 73 в).

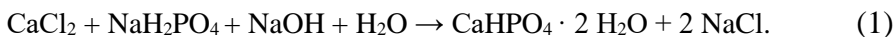
Таблиця 18

Розмір кристалітів брушиту, що визначений за допомогою рівняння Селякова – Шерера

Зразок		а	б	в
(0 2 0)	L, нм	551,115	1081,442	1273,36
(-1 1 2)	L, нм	2424,227	1080,068	720,83

Можливість формування брушиту замість більш термодинамічно стабільного за даних умов ГА під час осадження методом занурення з розчину 1 (10 ммоль/л CaCl_2 , 6 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$) при кімнатній температурі і $\text{pH} = 6,65$, може бути пояснена роллю магнію як стабілізуючого агента під час синтезу брушиту в умовах, близьких до фізіологічних за кімнатної температури.

Утворення покриттів брушиту можливе у водному розчині на магнієвих за рахунок перебігу реакції:



Структура брушиту схематично подана на рис. 74. Його елементарною одиницею кристал, що містить іони кальцію і гідрофосфату, а також подвійні шари води, перпендикулярні до осі b кристала.

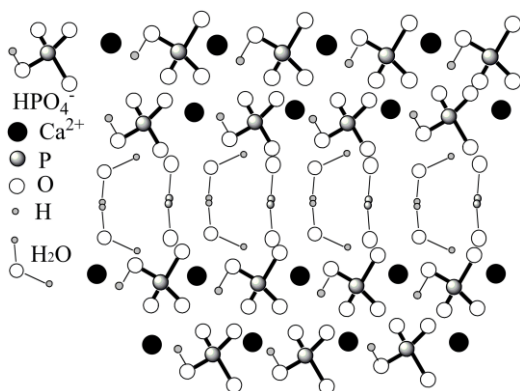


Рис. 74. Структура брушиту, побудована з урахуванням даних, отриманих з літератури. На схемі показане чергування подвійних шарів молекул води та кальцію і гідрофосфат іонів [234–236]

У водному розчині заряджені частинки (іони) утворюють електричні диполі, пов'язані між собою і мають електричний дипольний момент

$$\mu = qr, \quad (2)$$

де r – вектор, спрямований в напрямку позитивного заряду, з довжиною, що дорівнює відстані між центрами зарядів; q – величина заряду.

Коли диполь рухається в магнітному полі, на нього діють сили Лоренца, що протилежно спрямовані на заряди різного знака, а в цілому на диполь діятиме момент сил Лоренца (M_L):

$$M_L = \mu \cdot [VB], \quad (3)$$

де V – вектор швидкості частинки; B – вектор магнітної індукції; μ – електричний дипольний момент.

Електричний диполь орієнтується вздовж напрямку, перпендикулярному до площини, утвореної вектором індукції магнітного поля і вектором швидкості електричного диполя.

У разі, якщо заряди диполя зосереджені в різних за величиною масах, як у випадку Ca^{2+} HPO_4^{2-} -гідрофосфату кальцію, а зв'язок між зарядами не є жорстким, кожен заряд може рухатися по спіральній траєкторії, радіус якої обмежено довжиною і характером зв'язку. Отже, при накладанні зовнішнього магнітного поля момент сил намагатиметься повернути іони Ca^{2+} та HPO_4^{2-} таким чином, аби їх поля були орієнтовані паралельно зовнішньому полю (рис. 75). Біля північного полюса магніту частинки рухаються проти годинникової стрілки, а біля південного – за годинниковою стрілкою.

Осадження покриття брушиту здійснюється на магнієвий субстрат, одночасно відбувається корозія магнію з утворенням $\text{Mg}(\text{OH})_2$, тому групи OH^- є додатковими центрами кристалізації, на яких осаджуються іони Ca^{2+} з подальшим осадженням HPO_4^{2-} .

Саме на цьому етапі, на наш погляд, має вплив дія постійного магнітного поля, коли при близькості певного полюса диполя води іони та диполі «катион – аніон» зміщуються в магнітному полі як одне ціле, рух сусідніх катіона та аніона відбувається також узгоджено, що не приводить до зміни електричних полів. Атоми в кристалі не ізольовані один від одного, а розміщені регулярно й сильно взаємодіють один з одним.

Можливо, при накладанні зовнішнього магнітного поля відбувається орієнтування груп атомів, а також молекул води, що є вбудованою у структуру брушиту в напрямку магнітного поля, викликаючи зміни у кристалічній текстурі, що й спостерігається на дифрактограмах. Під дією магнітного поля також відбувається поляризація іонів, унаслідок чого збільшується ймовірність зближення та утворення центрів кристалізації. Молекули води взаємодіють, притягуючись різнойменними полюсами та відштовхуючись однойменними, утворюючи кластери.

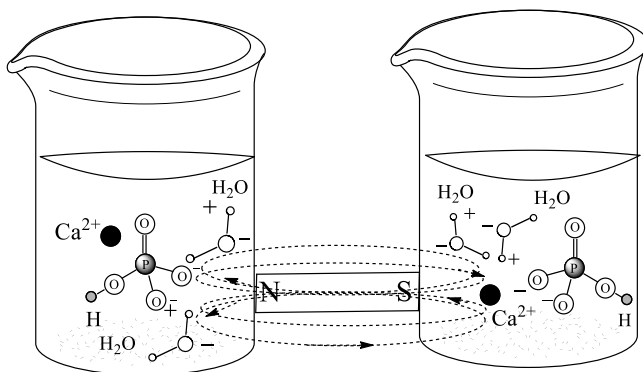


Рис. 75. Схематичне зображення дії зовнішнього магнітного поля, а саме близькості південного або північного полюсів постійного магніту на орієнтування іонів у водному розчині. Стрілками позначений напрямок вектора магнітної індукції, що спрямований з півночі на південь, N – північний полюс магніту, S – південний полюс магніту

Без зовнішнього впливу орієнтація молекул води є неупорядкованою. Диполі орієнтуються вздовж силових ліній магнітного поля (у вертикальній площині). Під час теплового руху молекул виникає рух диполів води перпендикулярно до ліній магнітного поля, виникають моменти сил Лоренца, що намагаються розвернути молекули в горизонтальній площині. Полюси магніту перешкоджають повороту молекул і гальмують їх рух перпендикулярно до силових ліній магнітного поля. Отже, молекули води зорієнтовані здебільшого вздовж силових ліній магнітного поля, здійснюючи коливальні рухи.

Серед можливих ефектів магнітного поля може бути викривлення валентних кутів у молекулах та різна орієнтація спінів молекул у магнітному полі.

Розчин 2 (табл. 17) було отримано після експериментів з осадження покриттів ГА методом термодепозиції на титанові субстрати. Фазовий склад осаду, отриманого з цього розчину, відповідає фазовому складу покриттів, отриманих на магнієвих субстратах методом занурення і представлений нанокристалічним гідроксиапатитом (JCPDS № 9-432) і

брушитом (JCPDS № 72–713). Наявність ГА може бути пояснена утворенням центрів кристалізації ГА в процесі термодепозиції в розчині 2, що приводить до утворення ГА на магнієвих субстратах під час осадження методом занурення. Потрібно зазначити, що магнітне поле впливає на фазу брушиту протягом осадження, спостерігаються істотні відмінності в інтенсивностях певних ліній порівняно з JCPDS № 72–713. Це бачимо у випадках (1 2 -1) та (0 4 0) (рис. 76).

Покриття, отримані поблизу різних полюсів магніту, відрізняються не лише за своєю морфологією (рис. 77), а й мають різну переважну орієнтацію фази брушиту, що залежить від того, поблизу саме якого з полюсів магніту знаходиться зразок (рис. 76).

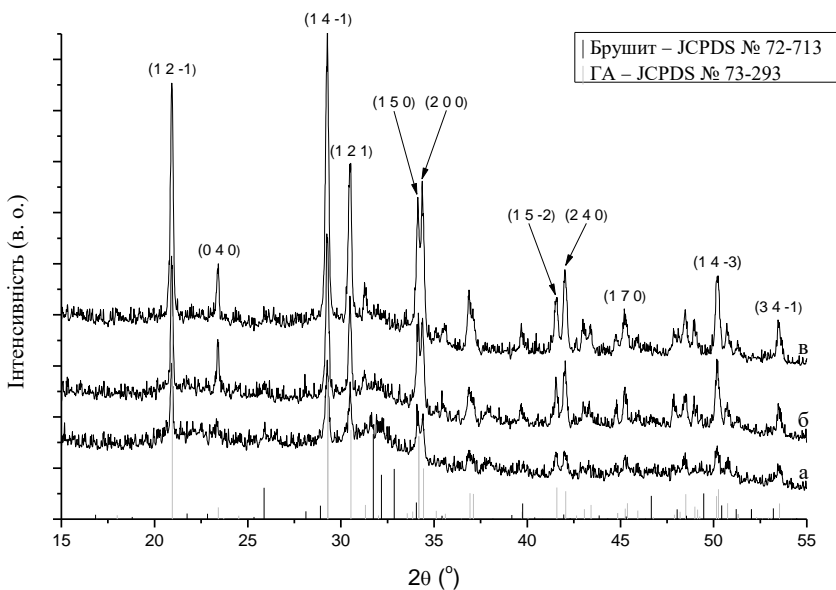


Рис. 76. Криві рентгенівської дифракції для покриттів, осаджених на Mg-субстрати з розчину 2 методом занурення при кімнатній температурі (22 °C): а) без магнітного поля; у магнітному полі: б) біля південного полюса магніту, в) біля північного полюса магніту

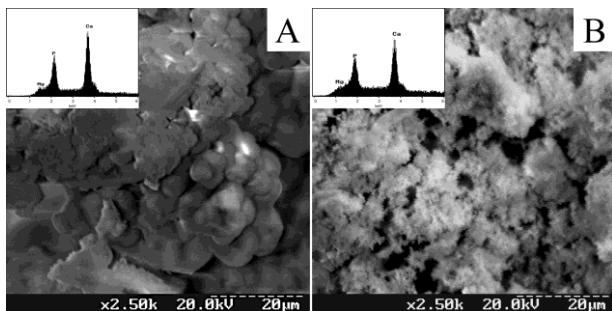


Рис. 77. Морфологія покриттів (брушит-ГА), осаджених на Mg-субстраті з розчину 2, після проведення термодепозиції при розміщенні субстрату біля північного полюса магніту (А) і південного полюса (В)

Вплив магнітного поля на формування покриттів з розчину 1 відрізняється від їх формування з розчину 2. Переважна орієнтація брушиту збільшується у випадку площин $(0\ 4\ 0)$ та $(1\ 5\ -2)$ у покриттях, отриманих поблизу південного полюса, і зменшується в покриттях, отриманих поблизу північного полюса магніту. Для площин $(2\ 0\ 0)$ та $(2\ 4\ 0)$ зменшення текстури спостерігається в обох випадках.

Результати розрахунків показали, що розмір кристалітів варіюється від 48 до 110 нм (табл. 19). Розрахована концентрація ГА становить більше 2 %.

Ріст кристалів є наслідком серії послідовних процесів, що відбуваються в розчині й на поверхні кристала: транспорт іонів і молекул у розчині, адсорбція та реакції на поверхні розділу «кристал / розчин», дифузія на поверхні, а також інтеграція в кристалічну ґратку. Ріст кристалів контролюється найповільнішою із таких стадій: 1) процеси, що відбуваються на поверхні розділу «кристал / розчин»; 2) транспорт матеріалів через розчин унаслідок дифузії або конвекції.

Таблиця 19

Вплив магнітного поля на мікроструктуру брушиту, отриманого з розчину 2 методом осадження протягом 72 годин при кімнатній температурі (22 °C)

Зразок		а	б	в
а, Å		5,817	5,819	5,827
b, Å		15,208	15,204	15,188
с, Å		6,251	6,261	6,252
β , °		116,413	116,443	116,466
(1 2 -1)	L, нм	56,188	83,168	68,334
	Φ_{hkl}	0,6	0,531	0,548
(0 4 0)	L, нм	71,629	87,183	61,56
	Φ_{hkl}	2,566	3,732	2,656
(1 2 1)	L, нм	55,358	65,912	110,51
	Φ_{hkl}	0,954	0,896	1,038
(2 0 0)	L, нм	63,371	74,255	68,091
	Φ_{hkl}	1,628	1,517	1,443
(1 5 -2)	L, нм	48,569	90,982	63,841
	Φ_{hkl}	0,893	1,401	1,296
(2 4 0)	L, нм	65,588	61,881	57,1
	Φ_{hkl}	1,715	1,866	1,455

Основними параметрами, що визначають механізм росту кристалів, є: рівень перенасичення розчину, розмір кристалів, доступна площа поверхні, параметри кристалічних поверхонь. При низькому рівні перенасичення ріст пояснюється спонтанним зародкоутворенням на поверхні (мононуклеарний або полінуклеарний механізми), кристали продовжують змінюватися завдяки дозріванню і фазовому перетворенню (старінню).

Будь-яка двофазна система, що складається з полідисперсного осаду і знаходиться в контакт з рідиною, є термодинамічно нестабільною завдяки розвиненій поверхні. Зменшення енергії досягається при розчиненні маленьких частинок доти, поки не залишаться великі кристали. Частина кристалів зі значною енергією (ребра, кути, дендритні розгалуження), розчиняючись, утворюють надлишок розчиненої речовини, що осаджується на місця з меншою енергією (дислокації). Такий феномен називають дозріванням Освальда [96].

Під час процесу осадження утворюються декілька фаз; фаза, що осаджується першою, має найбільшу розчинність (найменш стабільна). Такою фазою за даних умов є $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$, однак унаслідок наявності в розчині іонів Mg^{2+} фаза $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$ стабілізується. При перебуванні фази брушиту в розчині протягом тривалого часу вона може поступово розчинитися, завдяки чому збільшується концентрація Ca^{2+} та PO_4^{3-} . Після цього відбуватиметься подальше осадження більш термодинамічно стабільної фази ГА. Однією з проміжних фаз може бути утворення аморфного фосфату кальцію.

Кожна елементарна комірка кристала ГА має 10 Ca^{2+} , 6 PO_4^{3-} іонів та 2 ОН групи [35] (рис. 78). Сітка фосфат-іонів має велике значення для стабільності структури [41]. Беттс і Познер [42–43, 208] показали, що основною структурною одиницею гідроксиапатиту є сферичний кластер $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ діаметром 9,5 Å (рис. 78). В роботах [12, 199, 300] показано, що кристал ГА утворюється внаслідок взаємодії кластера $\text{Ca}_3(\text{OH})_6$ з трьома кластерами $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ і представлений як $\text{Ca}_3(\text{OH})_6 \cdot 3 \text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$.

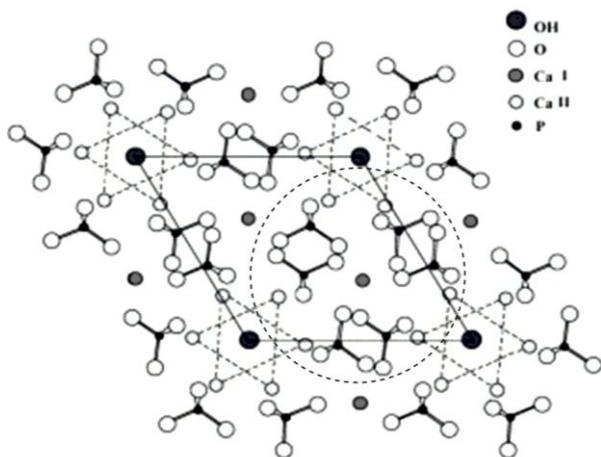


Рис. 78. Проекція на площину (001) структури ГА. Два трикутники, сформовані іонами Ca^{2+} , створюють «тунелі» в структурі, що розміщені в $z \frac{1}{4}$ та $z \frac{3}{4}$. Іони OH^- знаходяться над і під трикутниками [97]. На рисунку колом позначено кластер Познера

Схематичне зображення взаємодії кластерів $\text{Ca}_3(\text{OH})_6$ та $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ при утворенні кристала гідроксиапатиту, подане на рис. 79.

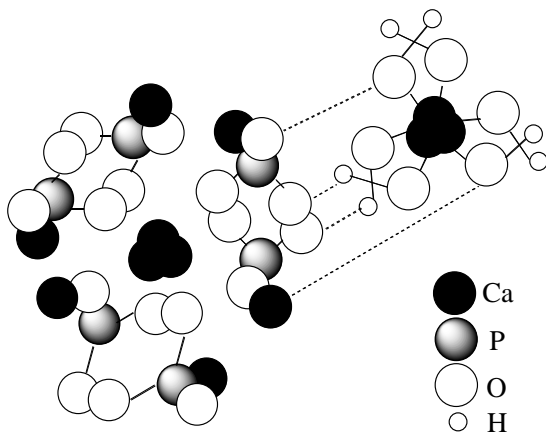


Рис. 79. Схематичне зображення взаємодії кластера Познера ($\text{Ca}_3(\text{OH})_6$) із кластером ($\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$)

Магнітне поле може впливати на створення гідратних оболонок навколо іонів, що формують кристали брушиту та ГА, змінюючи рухливість молекул води. Чим стійкіша і більша оболонка, тим іонам складніше зближуватися. Крім того, магнітне поле може деформувати гідратні оболонки, а також впливати на асоціати води, що приводить до деформації водневих зв'язків, та перерозподілу води з пов'язаними з нею молекулами.

Механізм дії магнітного поля на молекули H_2O може бути таким: у магнітному полі під дією сили Лоренца молекули води здійснюють коливальні рухи, виникає резонанс диполів води, що приводить до відділення молекул води від іонів Ca^{2+} та PO_4^{3-} та їх перерозподілу (переорієнтування). Іони Ca^{2+} осаджуються на магнієвому субстраті, що внаслідок часткової корозії вкритий $\text{Mg}(\text{OH})_2$, і це істотно полегшує процес кристалізації, оскільки наявні центри зародкоутворення. Іони магнію, що частково виділяються у розчин, стабілізують фазу брушиту, зменшуючи його кристалічність. Крім того, оскільки брушит містить воду у своїй кристалічній структурі, молекули води можуть орієнтуватися вздовж напрямку магнітного поля, одночасно орієнтуючи пов'язані з ними частини кристала. У цілому кристал є магнітно нейтральним, але під час його утворення окремі групи можуть мати певну орієнтацію в магнітному полі.

Осадити покриття, фазовий склад яких представлений лише ГА на Mg-субстратах при кімнатній температурі, досить складно, оскільки наявність іонів Mg^{2+} під час осадження апатиту приводить до зменшення кристалічності та затримки росту кристалів.

Осадження на магнієві субстрати кальцій-фосфатних покриттів з розчину 3, що містить $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4 \text{H}_2\text{O}$ (10 ммоль/л), $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (6 ммоль/л) при $\text{pH} = 6,65$, протягом 72 годин при кімнатній температурі (22 °C) методом занурення приводить до утворення покриття, фазовий склад якого представлений брушитом і гідроксиапатитом (рис. 80).

Інтенсивності піків ГА в цьому разі в більшості залежать від кількості покриття, що отримане під час осадження, але ми не можемо говорити про переважну орієнтацію внаслідок

невеликої його кількості. Морфологія отриманого на магнієвих субстратах покриття ГА залежить від того, біля якого полюса було розміщено субстрат (рис. 81).

Осадження із цього самого розчину при $\text{pH} = 6,65$ та витримування магнієвого субстрату протягом 72 годин при температурі 37°C приводить до утворення ГА за схемою такої реакції:

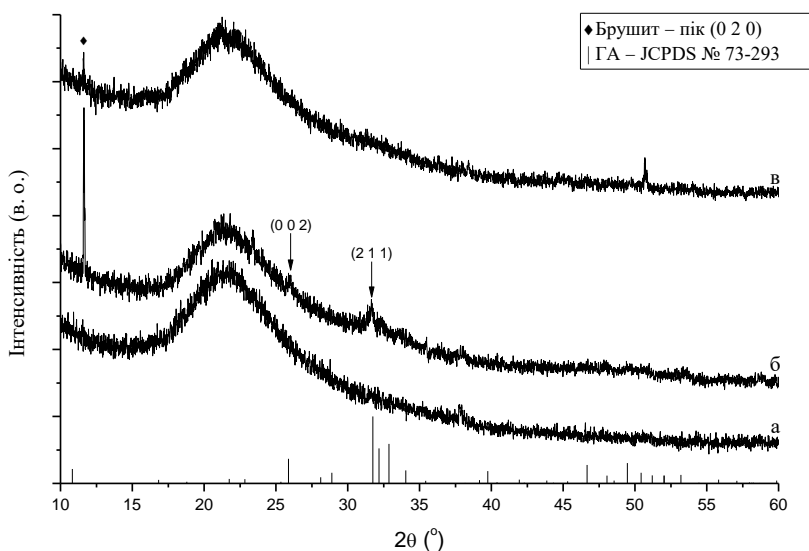
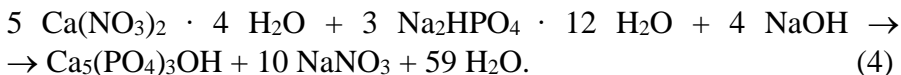


Рис. 80. Криві рентгенівської дифракції покриттів, осаджених на Mg-субстратах з розчину 3 методом занурення протягом 72 годин при $\text{pH} = 6,65$ і $t = 22^\circ\text{C}$: а) без магнітного поля; у магнітному полі: б) біля південного полюса магніту; в) біля північного полюса магніту

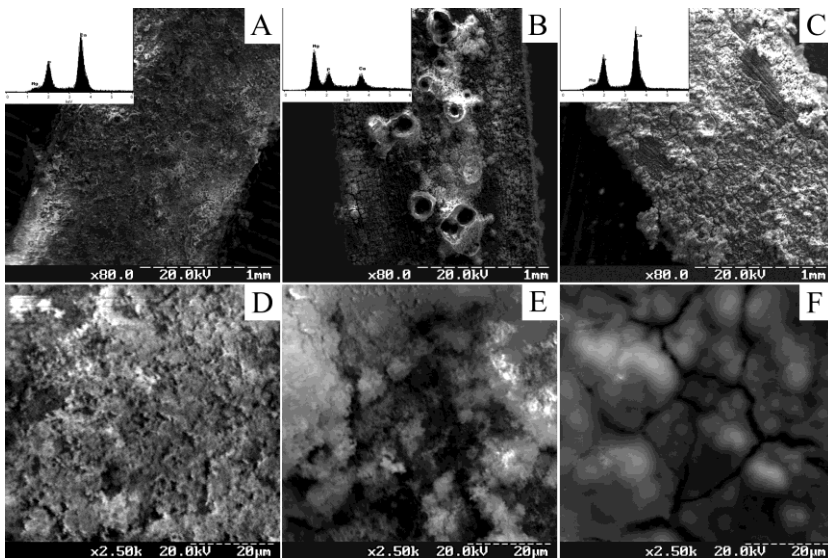


Рис. 81. Морфологія покриттів ГА, осаджених на Mg-субстратах із розчину 3 при 37 °С, розміщених поблизу південного полюса магніту (А, D) та поблизу північного полюса магніту (В, Е) і без магнітного поля (С, F)

Завдяки корозії Mg-субстрату за реакцією

$$\text{Mg} + 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Mg}(\text{OH})_2 + \text{H}_2\uparrow \quad (5)$$

виділення водню в процесі корозії приводить до формування пористого покриття з розміром пор 100–200 мкм (рис. 78 В). Покриття ГА, що були осаджені поблизу південного полюса магніту, є щільними, однорідними і не мають тріщин (рис. 81 А, В) порівняно з покриттям, що отримане без застосування магнітного поля (рис. 81 С, F).

У покритті, отриманому поблизу південного полюса магніту, спостерігається зростання кристалічності ГА (рис. 80 б, 81 б). Переважна орієнтація кристалів ГА, осаджених при 37 °С, відносно с-осі, визначається завдяки більшій інтенсивності піку (0 0 2) при $2\theta = 25,9^\circ$ відносно інтенсивності групи піків близько $2\theta = 32^\circ$ (рис. 82 б, в). Така орієнтація в рості кристалів ГА в напрямку с-площини відповідає орієнтації природного ГА щодо фібрил колагену [190].

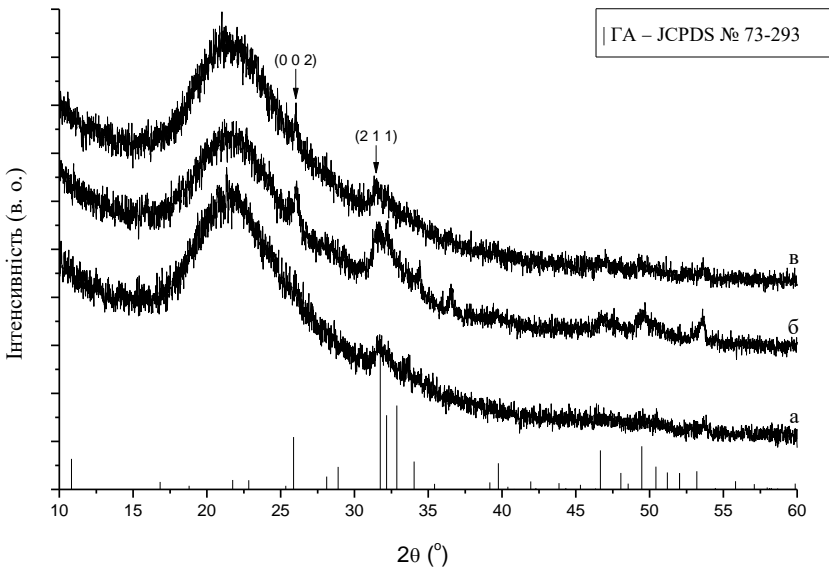


Рис. 82. Криві рентгенівської дифракції покриттів, отриманих на магнієвих субстратах з розчину 3 методом занурення на 72 години при 37 °С: а) без магнітного поля; в) біля південного полюса магніту, в) біля північного полюса магніту

Під час осадження з водних розчинів, що містять іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} , спочатку утворюється аморфний фосфат кальцію, що має визначені структурні одиниці, так звані кристали Познера – $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$. Усі аморфні фосфати кальцію є термодинамічно нестабільними сполуками, здатними переходити в кристалічні ортофосфати, зокрема у гідроксиапатит.

Осад, що утворюється при змішуванні концентрованих розчинів $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ та NaH_2PO_4 при кімнатній температурі та близькому до нейтрального рН, має аморфну текстуру. Іони магнію є стабілізаторами структури аморфного фосфату кальцію $(\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n \text{H}_2\text{O}, n = 3 - 4,5; 15 - 20 \% \text{H}_2\text{O})$ і він може бути осаджений при рН = 6,0 – 6,5 [119]. У водному розчині аморфний фосфат кальцію може перетворюватися на кальційдефіцитний ГА [128].

Цей процес можна пояснити внутрішнім гідролізом частини ортофосфат-іонів аморфного фосфату кальцію у кальцій-дефіцитний ГА за схемами [122, 163]:



Структурна одиниця АФК є елементарною коміркою ГА, що складається із центрального координаційного іона Ca^{2+} , пов'язаного із шістьма оточуючими ортофосфатними групами, які, у свою чергу, стабілізовані іншими 8 Ca^{2+} іонами (рис. 78).

Однак реальні взаємодії між кластерами в більших структурах ще остаточно не відомі. Електростатична та гідрофобна взаємодії і клеювальний ефект молекул води (лише у водних розчинах) спостерігаються серед головних факторів, що утримують іони кластера разом [108].

Ванг та ін. [88, 252] пропонують такий механізм: кальцій- та ортофосфат-іони формують пари та кластери в перші декілька секунд, вони утворюють спочатку тверду фазу, яка значною мірою гідратована. В процесі росту та агрегації збільшуються розміри й кількість твердої фази без зміни рН розчину. Під час індукційного періоду тверді частинки аморфні. В середині частинок кристалічні домени формуються з іонних пар та кластерів, захоплюючи кальцій та вивільняючи гідратований протон, можливо, через стадію утворення кластера $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$.

Гідратований шар наявний у водному розчині на поверхні кристала, що відбивається на його морфології. Він орієнтується в напрямку силових ліній магнітного поля (з півночі на південь); таким чином, біля південного полюса магніту утворюється більша кількість твердої фази (осаду ГА).

Розглядаючи процеси кристалізації кальцій-фосфатних покриттів на магнієвих субстратах, можна зробити такі висновки: розчин 3 є найбільш прийнятним для синтезу ГА на магнієвих субстратах. Утворення брушиту (разом із гідроксиапатитом) при кімнатній температурі можна пояснити тим, що $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ є проміжною фазою, яка повністю трансформується в $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ при 37 °С. При кімнатній

температурі це перетворення частково пригнічується наявністю іонів Mg^{2+} , але при $37\text{ }^{\circ}C$ фаза ГА є більш термодинамічно стабільною.

Загальною закономірністю під час отримання покриттів на магнієвих субстратах у магнітному полі є те, що на субстратах, які знаходяться біля південного полюса магніту, формується більша кількість покриття, якщо порівнювати з отриманням покриттів без магнітного поля, або біля північного полюса магніту.

У магнітному полі брушит є орієнтованим у b -площині, інтенсивності окремих піків істотно відрізняються залежно від того, біля якого полюса магніту отримане покриття, що свідчить про те, що навіть при індуктивності магнітного поля $0,3\text{ T}$ магнітне поле істотно впливає на кристалізацію $CaHPO_4 \cdot 2\text{ H}_2O$. Під впливом зовнішнього магнітного поля в молекулах відбувається поляризація електронних хмарин, що індукує магнітні моменти, антипаралельні зовнішньому магнітному полю. Зовнішнє магнітне поле також ініціює поляризацію електронних хмарин у молекулах води.

Варіюючи густину електронних хмарин як іонів, так і молекул води, магнітне поле впливає на структуру частинок, що дисперговані у воді, енергію взаємодії іонів із молекулами води, що їх оточують, і поляризацію шарів навколо іона. Магнітне поле створює асиметрію гідратованих оболонок завдяки впливу на молекули води, що розташовані навколо іона, та послаблює взаємодію між одними іонами, посилюючи взаємодію між іншими. Це приводить до створення іонних асоціатів або зародків кристалів.

Зміна магнітного потоку, а отже, й зміна напрямку руху іонів, значною мірою сприяє формуванню іонних пар і більш складних комплексів. Кристалізація відбувається, коли речовина переходить у більш термодинамічно вигідний стан. Рівність хімічних потенціалів є основною умовою термодинамічної фазової рівноваги:

$$X_{\text{крист}} = X_{\text{розч}}, \quad (8)$$

де $\chi_{\text{крист}}$ – потенціал речовини в кристалічному стані, $\chi_{\text{розч}}$ – потенціал розчиненої речовини.

Порушення рівноваги є рушійною силою процесу кристалізації. При $\chi_{\text{крист}} - \chi_{\text{розч}} > 0$ відбувається утворення та ріст кристалів, при $\chi_{\text{крист}} - \chi_{\text{розч}} < 0$ – їх розчинення. Магнітне поле викликає утворення зародків кристалів у насичених водних розчинах. Порівняно з отриманням покриття без магнітного поля на магнієвому субстраті утворюється більша кількість зародків, що мають менші розміри. Магнітне поле скорочує період кристалізації, що сприяє швидшому утворенню твердої фази.

Деякі автори [232] пояснюють поведінку немагнітних матеріалів у магнітному полі, виходячи з явища магнітної анізотропії. Магнітна сприйнятливість є різною для різних кристалографічних осей (кристалографічних напрямків). Кристалографічні комірки можуть вирівнюватися в напрямку магнітного поля [225].

6.11.3. Аналіз процесів кристалізації, що відбуваються у розчині під час осадження кальцій-фосфатних покриттів на магнієві субстрати

Можливість утворення як покриттів, так і осаду заданої кристалічної структури, фазового складу та морфології є важливим аспектом під час створення біоматеріалів, оскільки всі параметри отриманого покриття можуть істотно впливати на його біологічну активність та поведінку в організмі. У зв'язку з цим завданнями цього дослідження було визначення особливостей процесу кристалізації при знаходженні осаду біля південного або північного полюса постійного магніту.

Для розуміння механізмів кристалізації брушиту та ГА в магнітному полі істотним є розуміння процесів, що спостерігається у розчині, з якого відбуваються кристалізація кальцій-фосфатів. Відомо, що брушит із часом перетворюється в ГА, але остаточно невідомо, який проміжок часу потрібний для повного перетворення брушиту на ГА. Крім того, істотним

моментом є те, що кристалізація кальцій-фосфатів за наявності магнію у вихідному розчині істотно відрізняється. Дія постійного магнітного поля також певним чином впливає на процеси формування кальцій-фосфатів. Дія всіх перелічених факторів одночасно вперше розглянута в нашій роботі.

Оскільки проблема отримання покриттів на магнієвих субстратах є однією із найактуальніших для сучасної імплантології, виникає необхідність установити, яким чином продукти корозії магнієвого імплантата впливають на кристалізацію брушиту та ГА, а також як відбувається фазове перетворення $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ у магнітному полі при різній тривалості осадження.

Вихідний розчин, з якого осаджували кальцій-фосфати, має склад: CaCl_2 (10 ммоль/дм³) та $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (6 ммоль/дм³). При рН розчину більше 6,5 відбувається утворення осаду, зокрема при рН = 6,5–6,65 фазовий склад осаду представлений брушитом. Цей розчин повністю відповідає складу розчину 1 (табл. 17). Крім того, проводили осадження з розчину 2 (табл. 17), що залишився після проведення експерименту з термодепозиції.

Експеримент проводили за тією самою схемою, що й при осадженні покриттів на магнієві субстрати в постійному магнітному полі (0,3 Т).

У нашій роботі досліджено вплив магнієвого субстрату, що знаходиться у вихідному розчині, на кристалізацію кальцій-фосфатів. Установлено, що наявність магнієвого субстрату в розчині знижує кристалічність кальцій-фосфатних фаз зі збільшенням часу кристалізації, про що свідчить зниження інтенсивності піків брушиту на кривих рентгенівської дифракції (рис. 83 а, с).

Аналіз осаду із розчину із співвідношенням $\text{Ca/P} = 1,67$ при осадженні в магнітному полі й наявності магнієвого субстрату протягом 2 днів показує наявність фази брушиту (JCPDS № 72–713) (рис. 83 а). У розчині після термодепозиції, за тих самих умов, разом із фазою брушиту є гідроксиапатит (JCPDS № 9–432) (рис. 83 б). Оскільки в обох випадках осадження відбувається при однаковому рН та іонному складі розчину

протягом 2 діб, то наявність в осаді ГА можна пояснити утворенням центрів кристалізації в процесі термодепозиції.

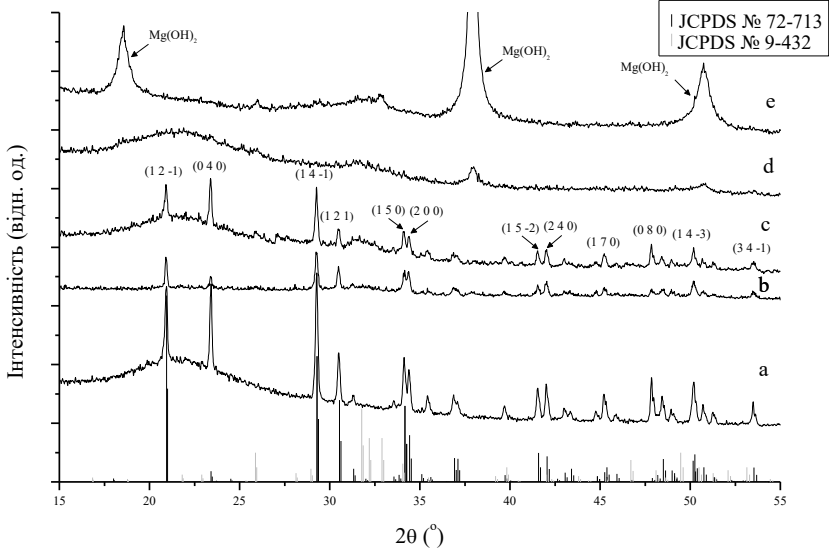


Рис. 83. Криві рентгенівської дифракції при різній тривалості кристалізації за наявності магнію в магнітному полі (біля південного полюса магніту): а) 2 дні $\text{Ca/P} = 1,67$; б) 2 дні в розчині після термодепозиції; в) 3 дні, $\text{Ca/P} = 1,67$; д) 4 дні, $\text{Ca/P} = 1,67$; е) 18 днів $\text{Ca/P} = 1,67$

Наявність магнієвого субстрату може стабілізувати фазу брушиту, яка є метастабільною при кімнатній температурі.

Після 3 діб осадження у магнітному полі спостерігається зменшення кристалічності брушиту, з'являється фаза низькокристалічного ГА (рис. 83 в), що може вказувати на часткове заміщення брушиту гідроксиапатитом. На цьому етапі корозія магнію не має істотного впливу на фазовий склад осадів.

Після 4 діб осадження у складі осадів з'являється фаза Mg(OH)_2 (JCPDS № 44-1482), поява якої, на нашу думку, приводить до зниження кристалічності апатиту (рис. 83 д). Разом з цим спостерігається повне зникнення фази брушиту зі збереженням ознак наявності апатиту. Інтенсивність піків фази

$Mg(OH)_2$ істотно зростає, в той час як інтенсивність піків гідроксиапатиту зростає незначною мірою (рис. 83 е, 84 е).

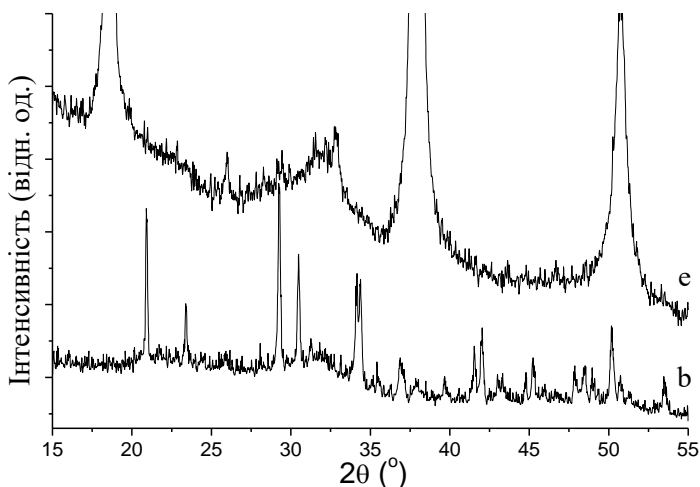


Рис. 84. Криві рентгенівської дифракції при різній тривалості кристалізації у розчині в магнітному полі за наявності магнію: б) 2 дні в розчині після термодепозиції; е) 18 днів $Ca/P = 1,67$ (рис. 84 поданий при більшому масштабі)

Розміри кристалітів у різних площинах змінюються неістотно, хоча зі збільшенням часу кристалізації зразків спостерігається зниження кристалічності фази брушиту. Це може бути обумовлено наявністю мікрвикривлень кристалічної ґратки, тобто відхилень міжплощинних відстаней зразка від еталона, в якому мікронапруги відсутні.

Отже, зі збільшенням часу осадження в розчині зі вмістом компонентів у співвідношенні $Ca/P = 1,67$ при $pH = 6,5 - 6,65$ на 4-ту добу спостерігається повне зникнення піків брушиту за наявності ГА.

Під час дослідження впливу магнітного поля (південного та північного полюсів магніту) на кристалізацію брушиту, виявили, що осад, отримані в магнітному полі, відрізняються не лише за своєю морфологією (рис. 85), а й мають різну переважну

орієнтацію залежно від того, біля якого з полюсів магніту знаходиться зразок (рис. 85).

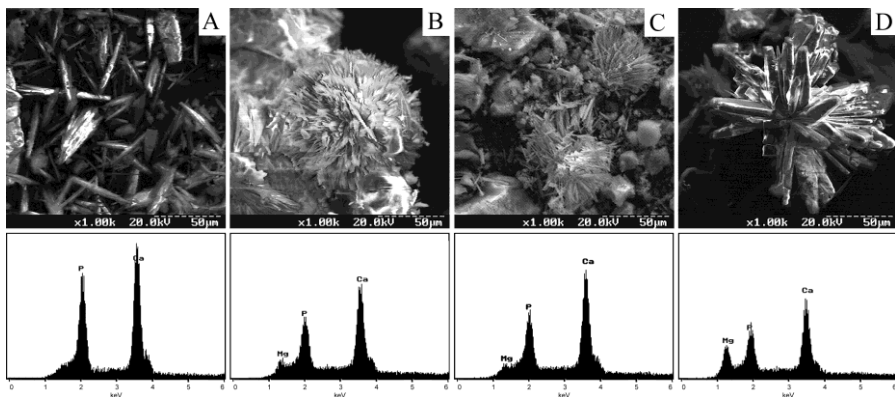


Рис. 85. Морфологія осадів, отриманих протягом двох годин при $\text{pH} = 6,64 - 6,65$ у розчині з відношенням $\text{Ca/P} = 1,67$ без магнію та магнітного поля (А), за наявності магнію без застосування магнітного поля (В), у магнітному полі: біля північного полюса магніту (С); біля південного полюса магніту (D)

Потрібно зазначити, що під час дії магнітного поля на зразки в процесі осадження спостерігаються значні зміни інтенсивностей деяких ліній порівняно з карткою JCPDS № 72–713. Це добре помітно у випадку ліній (1 2 -1) і (0 4 0).

Таким чином, дія магнітного поля приводить до появи певної переважної орієнтації, що залежить від того, ближче до якого з полюсів магніту був розміщений розчин для синтезу, хоча переважне орієнтування кристалів спостерігається і за відсутності магнітного поля. За наявності магнію кристалічність кальцій-фосфатів (брушиту, ГА) знижується, що підтверджується результатами рентгенівської дифракції. Крім різниці в кристалічній текстурі брушиту, спостерігається істотна різниця в морфології отриманих осадів. Це пояснюється з урахуванням зазначених вище механізмів.

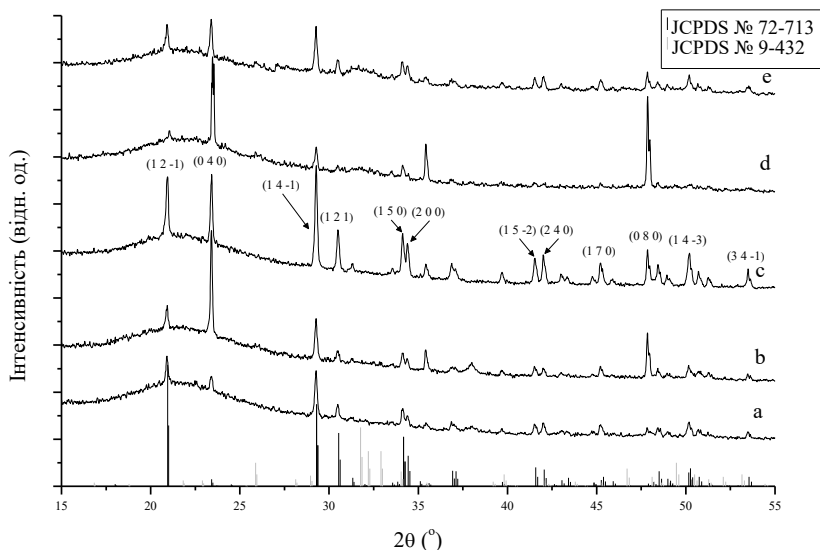


Рис. 86. Криві рентгенівської дифракції продуктів кристалізації у розчині за наявності Mg: а) без магнітного поля Ca/P = 1,67; у магнітному полі; б) біля північного полюса магніту, рН = 6,64, (2 доби); с) біля південного полюса магніту, рН = 6,64, Ca/P = 1,67 (2 доби); д) біля північного полюса магніту, Ca/P = 1,67 (3 доби); е) біля південного полюса магніту Ca/P = 1,67 (3 доби), ф) без магнію та магнітного поля

6.11.4. Оцінка адгезії кальцій-фосфатних покриттів та їх розчинності в SBF

На відміну від досить пасивних сплавів титану магнієві імплантати піддаються руйнуванню у фізіологічному середовищі. Особливо високий рівень деградації імплантатів спостерігається безпосередньо після імплантації.

У водних розчинах $Mg(OH)_2$, утворений на поверхні магнієвого субстрату, виконує роль захисного шару, але при зростанні концентрації іонів хлору у фізіологічному середовищі більше 30 ммоль/л [275] гідроксид магнію перетворюється у високорозчинний хлорид магнію.

Магнієві субстрати з отриманими на них покриттями були занурені в розчин SBF, який імітує сольовий склад плазми крові, що містив: 142,0 ммоль/л Na^+ , 5,0 ммоль/л K^+ , 1,5 ммоль/л Mg^{2+} , 2,5 ммоль/л Ca^{2+} , 147,8 ммоль/л Cl^- , 4,2 ммоль/л HCO_3^- , 1,0 ммоль/л HPO_4^{3-} , 0,5 ммоль/л SO_4^{2-} при $(37 \pm 0,5)^\circ\text{C}$ та $\text{pH} = 7,4$ на 14 діб. Фазовий склад покриттів був представлений брушитом та ГА. Необхідно зазначити, що при зануренні у SBF брушит не лише перетворюється у ГА, а й стимулює осадження гідроксилапатиту.

Рівень корозії вимірювали за втратою маси зразків після певного періоду занурення за формулою, що використовувалась авторами в роботі [274]:

$$DR = \frac{W}{At}, \quad (9)$$

де DR – рівень деградації; W – втрата маси зразка; A – площа поверхні зразка; t – час знаходження у розчині SBF

Зразки після певного часу занурення виймали з розчину, промивали дистильованою водою і висушували. Для видалення продуктів корозії зразки обробляли сумішшю (200 г/л CrO_3 + 10 г/л AgNO_3) 5 – 10 хвилин, промивали та висушували. Висушені зразки зважували і розраховували рівень деградації [274]. В нашій роботі видалення продуктів корозії не проводили, розчин SBF оновлювали кожні 24 години.

На рис. 87 подані криві залежності втрати маси від часу занурення зразка в розчин SBF. З отриманих даних бачимо, що наявність покриття брушиту на магнієвому субстраті приводить до зростання корозійної стійкості приблизно в 1,5 раза. Потрібно зазначити, що при $\text{pH} 7,4$ найбільш термодинамічно стабільною фазою є ГА на відміну від покриття брушиту, що частково розчиняється в розчині SBF і здатне перетворюватися на ГА покриття на основі ГА показує менший рівень втрати маси й знижує рівень корозії приблизно втричі.

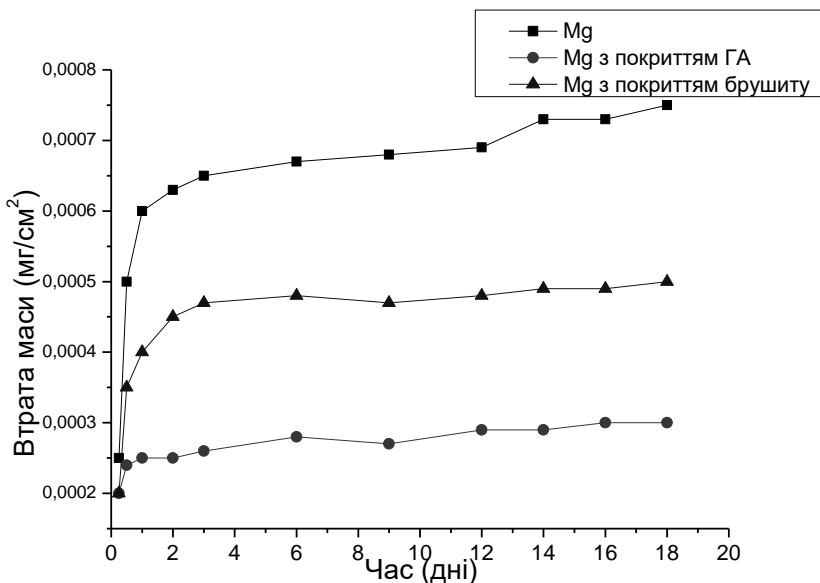


Рис. 87. Залежність втрати маси чистого магнієвого субстрату та магнієвого субстрату з покриттями брушиту та ГА від часу занурення в розчин SBF при 37 °C та рН = 7,4

Рівень корозії магнієвого субстрату зменшується при зростанні часу занурення в розчин SBF. Це пов'язано з тим, що на першій стадії (приблизно 3 дні) продукти корозії вкривають поверхню зразка, що частково захищає зразок від подальшої корозії.

Значення рН розчину SBF змінюється, зростаючи перші 3 дні, що пов'язано зі швидким утворенням продуктів корозії (переважно $Mg(OH)_2$), після чого залишається приблизно на одному рівні. Це пов'язано з рівновагою між утворенням та розчиненням продуктів корозії. Магнієві субстрати з покриттями брушиту та ГА практично не змінюють рН розчину SBF.

При повільному формуванні покриття з вихідного розчину (10 ммоль/л $CaCl_2$, 6 ммоль/л NaH_2PO_4) утворюється покриття без тріщин, отже, отримання покриттів методом занурення є найбільш прийнятним по відношенню до магнієвих субстратів.

Розчинення магнієвого субстрату в процесі корозії при зануренні в розчин SBF супроводжується підвищенням рН розчину (рис. 89)

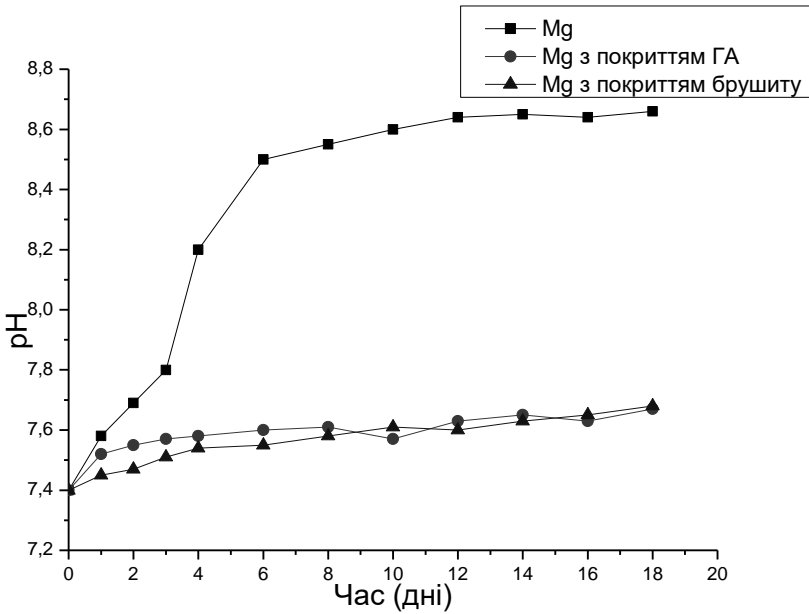


Рис. 89. Залежність рівня рН розчину SBF від часу занурення в нього чистого магнієвого субстрату та субстратів із покриттями брушиту та ГА

Дослідження адгезії кальцій-фосфатних покриттів, отриманих на магнієвих субстратах, наведені в табл. 20.

Необхідно зазначити, що покриття при відриві клейкої стрічки практично повністю залишається на магнієвих субстратах. Це характерно як для покриттів ГА, так і для покриттів брушиту.

Таблиця 20

Адгезія кальцій-фосфатних покриттів до магнієвих субстратів.

Покриття	S (мм ²)	F (Н)	Адгезія (Н/м ²)	Адгезія (МПа)
Брушит	5	0,6	120000	0,120
	5	0,5	100000	0,100
	6	0,6	100000	0,100
Гідроксиапатит	4	0,5	125000	0,125
	4	0,45	112500	0,112
	4	0,5	125000	0,125
Покриття ГА на Ti-субстраті	6	0,5	83333	0,083
	5	0,5	100000	0,100
	6	0,5	83333	0,083

Завдяки створенню в процесі осадження покриттів пористої поверхні, що є наслідком корозії магнієвих субстратів, утворене покриття заповнює пори, зростає адгезія до поверхні шорсткуватого субстрату. Тому повний відрив такого покриття за допомогою клейкої стрічки неможливий. До того ж покриття, отримані методом занурення на магнієвих субстратах, мають антикорозійні властивості, що робить цей метод надзвичайно перспективним для отримання покриттів біомедичного призначення.

6.12. Покриття на основі ГА та срібла з додаванням хітозану

6.12.1. Хітозан-ГА – покриття на титанових субстратах, отримані методом термодепозиції

Оскільки природна кістка є не що інше як мінерал-протеїновий наноккомпозит, багато досліджень присвячено саме отриманню подібних структур, а саме ГА/Колаген (Кол), ГА/желатин, у лабораторних умовах [63–64, 254]. Більше того, іммобілізація колагенових макромолекул на імплантатах сприяє їх міцній фіксації з навколишніми тканинами завдяки тому, що колаген є адгезійним протеїном щодо клітин завдяки наявності в його структурі численних аміногруп [155]. У лабораторії Куроди вперше були поставлені експерименти з формування композитних ГА/Кол покриттів із використанням термодепозиції [155]. Покриття наносилися на комерційно чисті титанові циліндри (діаметр = 2 мм, довжина = 5 мм) і пластини (товщина = 0,3 мм) методом термодепозиції у водних розчинах, що містили 0,3 мМ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 0,7 мМ CaCl_2 і кислотнорозчинний колаген (тип I) ~ 432 мг/дм³. Експерименти проводилися при температурах субстратів 40–140 °С, рН = 8, протягом 15–30 хв. *In vivo* дослідження імплантованих циліндрів (із покриттям і без покриття (стандарт)) у *tibia* щурів також були проведені. Після 14 днів інкубації імплантати досліджувалися щодо формування нової кісткової тканини і тканинної реакції в губчатій та щільній тканинах відповідно. З'ясовано, що ГА/Кол-композити демонструють більшу osteoconductive як у щільній, так і губчастій тканині, причому ефект був пропорційний концентрації колагену в покритті. Але при дуже високій концентрації (40 мас.%) спостерігається негативний osteoconductive ефект.

Осадження гідроксиапатиту на відповідний субстрат має за мету зменшити ризик відторгнення імплантата організмом та вихід іонів металів у навколишні тканини та забезпечити краще живлення імплантата у кісткову тканину. Металічний субстрат забезпечує необхідну міцність імплантата. Для збільшення біосумісності покриття необхідно ввести до його структури біомолекули. Для модифікування поверхні було вирішено використати похідну природного біополімеру хітину – хітозан.

Розчинна форма хітозану є зручною для проведення експериментів зі введення хітозану до складу покриття, тому використовувалися розчини хітозану в 1 % оцтовій кислоті. Досліджені кілька варіантів внесення хітозану в покриття: 1) попереднє нанесення хітозану на субстрат і подальше осадження кальцій-фосфатного покриття з розчину на утворену плівку хітозану; 2) спільне осадження хітозану і кальцій-фосфатів з розчинів на нагрітий субстрат; 3) нанесення покриття гідроксиапатиту згідно з описаною технологією та подальша обробка його розчином хітозану [11, 28].

Тестові експерименти щодо сумісного осадження хітозану та кальцій-фосфатів із розчинів на нагрітий Ti6Al4V-субстрат проведений при різних температурах від 100 до 120 °С. При температурі субстрату 115 °С і використанні розчину з концентрацією хітозану 0,1 г/л він обвуглюється на субстраті. Тому температуру субстрату зменшили до 100 °С за допомогою регулювання сили струму. Були одержані покриття при концентраціях хітозану в базовому розчині: 0,1; 0,05; 0,025; 0,001 г/л. рН в розчині підтримували на рівні 6,5 додаванням NaOH. Значення рН обрано з урахуванням того, що при даному рН як хітозан, так і ГА є розчинним. При збільшенні рН розчину хітозан і гідроксиапатит випадають в осад по всьому об'єму, що є небажаним, оскільки необхідно отримати покриття на субстраті. У першому випадку (0,1 г/л) осадження проводили 2 години, у трьох інших (0,05; 0,025; 0,001 г/л) – 3 години. Як вихідні реагенти для синтезу покриттів були взяті розчини CaCl₂ (б/в) (10 ммоль/л) та NaH₂PO₄ · 2H₂O (6 ммоль/л) зі співвідношенням Ca/P = 1,67.

Експериментально було визначено час проведення експерименту (не менше 60 хвилин), а також обрані рН розчину = 6,5 і температура субстрату (100–105 °С) [8, 11]. За дотримання необхідних параметрів можливе отримання покриттів завтовшки 5–10 мікронів, співвідношення Ca/P у яких близьке до такого для стехіометричного гідроксиапатиту (1,67 ат %).

Була проведена така серія експериментів: 1) попередньо очищені субстрати послідовно занурювали спочатку у в'язкий 2 % (рис. 89 а) і 1 % розчин хітозану в 1% оцтовій кислоті (рис. 89 б), а потім в 10 % розчин гідроксиду натрію для отримання плівки хітозану. Субстрат був ретельно промитий у дистильованій воді для видалення іонів Na^+ . Вихідний розчин, що містить іони Ca^{2+} і PO_4^{3-} , доводили до рН 6,5 додаванням краплями 1 % розчину NaOH . За даними літератури [69], ізоелектрична точка хітозану знаходиться приблизно при рН = 8,7. Інші джерела літератури [271] свідчать, що депротонування полімеру і перехід його з розчинного стану в нерозчинний відбувається при рН = 7,5.

Пластинку, вкриту плівкою хітозану, занурювали у вихідний розчин для термодепозиції. Температуру субстрату підтримували на рівні 100–105 °С, рН = 6,5–6,6; час проведення експерименту – 3 години. Морфологія отриманих покриттів показана на рис. 89. Виміряне методом енергодисперсійного рентгено-спектрального аналізу відношення $\text{Ca/P} = 1,69\text{--}1,73$ ат. %. Виміряне співвідношення Ca/P , дослідження фазового складу (рис. 90), а також розвинена поверхня отриманого покриття дозволяють зробити висновок, що цей варіант внесення хітозану в покриття є прийнятним.

Попередніми експериментами щодо осадження покриттів ГА на Ti6Al4V -субстрати було встановлено, що при температурі 105 °С, рН = 6,5 утворюється покриття, основною фазою якого є ГА (рис. 90).

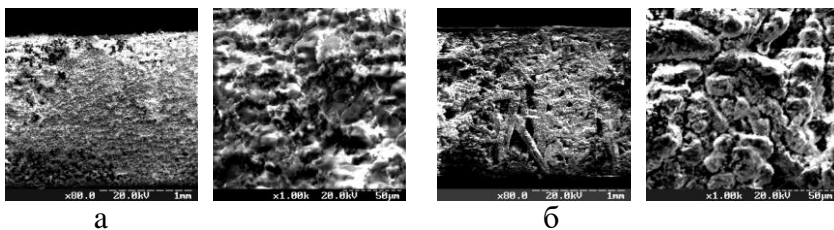


Рис. 89. Морфологія покриттів ГА, отриманих на плівці хітозану, що попередньо нанесена на субстрат при концентрації хітозану у вихідному розчині 1 % (а) і 2 % (б)

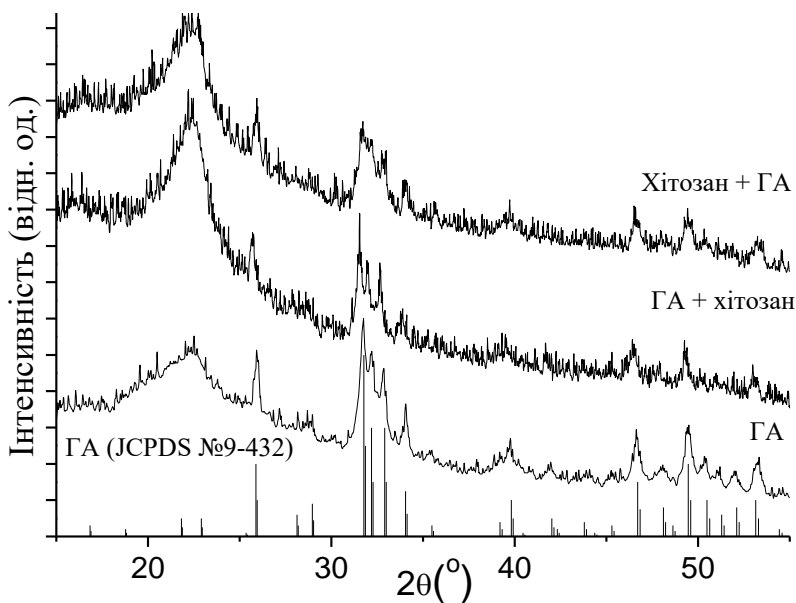


Рис. 90. Характерні криві рентгенівської дифракції для покриття гідроксиапатиту, отриманого при температурі 100–105 °С, рН = 6,5 протягом 2 годин; покриття гідроксиапатиту після знаходження протягом 24 годин у розчині хітозану (спосіб 2) і плівки хітозану з осадженим на неї методом термодепозиції покриттям ГА (спосіб 1)

Пік $2\theta = 20^\circ$ у випадку для чистого апатиту є піком клейкої стрічки, на якій проводилася зйомка, але, як зазначено в роботі

[135, 188], в цьому самому діапазоні знаходиться і дифузний пік хітозану. Однак зменшення відношення інтенсивності основного піку апатиту ($2\theta = 31,65^\circ$) до даного піку ($2\theta = 20^\circ$) у зразках, що містять хітозан, дозволяє підтвердити наявність фази хітозану.

Субстрат із нанесеним на нього покриттям ГА ($t^\circ = 100^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 6,5$; час проведення по 1 годині кожна сторона) занурили в концентрований розчин хітозану на 1 добу (pH розчину = 6,74). Був обраний саме такий діапазон pH , оскільки в кислому середовищі відбувається розчинення покриття гідроксиapatиту, його демінералізація. До того ж доцільно наблизити pH до значення такого у фізіологічному середовищі організму, не перевищуючи ізоелектричної точки хітозану [69, 271]. Порівняння морфології покриттів до і після занурення в розчин хітозану ілюструє значне розчинення покриття, але співвідношення Ca/P залишається близьким до такого для ГА (1,64; 1,71 і 1,68 – 1, 2 і 3 відповідно) (рис. 91 г).

Часткове розчинення покриття ГА при $\text{pH} = 6,5$, близькому до нейтрального, можна пояснити впливом оцтової кислоти. Макромолекули хітозану, маючи досить розгалужену будову і здатність утворювати хелати, захоплюють і частково утримують у своїй структурі розчинник, яким є 1% CH_3COOH . При зануренні покриття в розчин хітозану відбувається його часткова деградація (рис. 92).

Аналіз фазового складу отриманого покриття, зануреного на 24 години в розчин хітозану, показав, що, як і в першому випадку, зберігається структура ГА. На спектрі (рис. 92) бачимо матеріал субстрату (Ti, Al), що свідчить про незначну товщину покриття. Обмеженням застосування цього методу внесення хітозану може бути зміна морфології і товщини покриття та його часткова деградація.

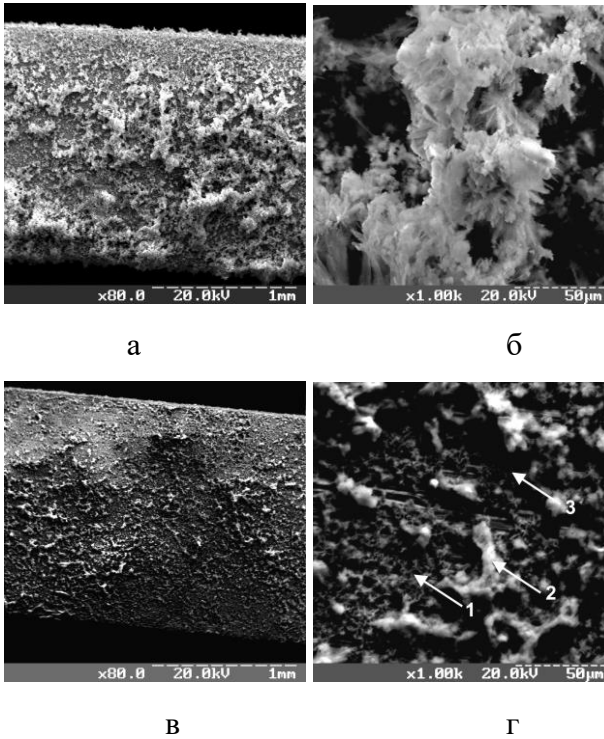


Рис. 91. Морфологія покриттів ГА до занурення на 1 добу в розчин хітозану (а) при 80-кратному збільшенні і при збільшенні $1,0 \cdot 10^3$ (б); після занурення в розчин хітозану при 80-кратному збільшенні (в) і при збільшенні $1,0 \cdot 10^3$, із зазначенням точок аналізу (г)

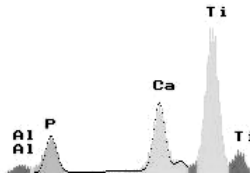


Рис. 92. Енергодисперсійний рентгенівський спектр покриття ГА ($t^\circ = 100^\circ\text{C}$; $\text{pH} = 6,5$; час проведення 2 години) на Ті6А14V-субстраті, що був занурений на 24 години в розчин хітозану

Методика сумісного осадження покриттів ГА-хітозан описана в роботах [8, 11]. Покриття отримані при концентрації хітозану в маточному розчині: 0,1 г/л (а); 0,05 г/л (б); 0,025 г/л (в) і 0,001 г/л (г).

Для проведення експериментів з термодепозиції кальцій-фосфатних покриттів були змішані різні кількості базового розчину, що містить іони Ca^{2+} та PO_4^{3-} , та розчину хітозану (табл. 21).

Таблиця 21

Співвідношення компонентів розчину для синтезу хітозан-ГА покриттів

Концент- рація хітозану у вихід- ному розчині	CaCl_2 (10 ммоль/л)	$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times$ $\times 2\text{H}_2\text{O}$ (6 ммоль/л)	Хітозан (0,1 г/л)	Хіто- зан (1 г/л)
0,001 г/л	90 мл	90 мл	20 мл	–
0,025 г/л	75 мл	75 мл	50 мл	–
0,05 г/л	50 мл	50 мл	100 мл	–
0,1 г/л	90 мл	90 мл	–	20 мл

Субстрати (Ti6Al4V) нагрівали за допомогою змінного електричного струму до 100–105 °С, рН розчину підтримували на рівні 6,5 додаванням NaOH. Осадження проводили протягом трьох годин. У ході проведення серії експериментів встановлено, що морфологія покриттів, отриманих протягом двох і трьох годин, відрізняється мало, за винятком того, що в другому випадку вони значно товщі й мають більш розвинену поверхню (рис. 93). Саме цим і був обумовлений вибір часу проведення експерименту. У другому випадку до розчину хітозану був доданий надлишок фосфат-іонів (PO_4^{3-}) з метою зменшення надлишку кальцію у співвідношенні Ca/P.

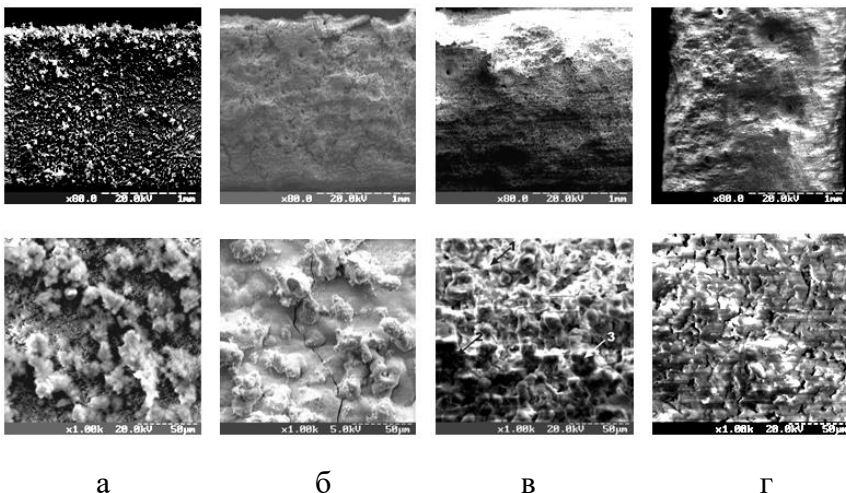


Рис. 93. Морфологія поверхонь хітозан-ГА покриттів, осаджених із розчинів з концентраціями хітозану: а) 0,1 г/л; б) 0,05 г/л; в) 0,025 г/л; г) 0,001 г/л

Найбільш однорідні та міцні покриття з розвинутою структурою були отримані при концентраціях хітозану у вихідному розчині 0,001–0,025 г/л. Можливо, це пов'язано з тим, що макромолекули хітозану, зв'язуючись із компонентами маточного розчину, заважають перебігу звичайного процесу кристалізації ГА. З наведених спектрів рентгенівської дифракції (рис. 94) бачимо, що при збільшенні концентрації хітозану в маточному розчині, який використовувався для отримання покриттів методом термодепозиції, відбувається зменшення відношення інтенсивностей основного піку апатиту ($2\theta = 31,65^\circ$) до дифузного піку хітозану ($2\theta = 20^\circ$).

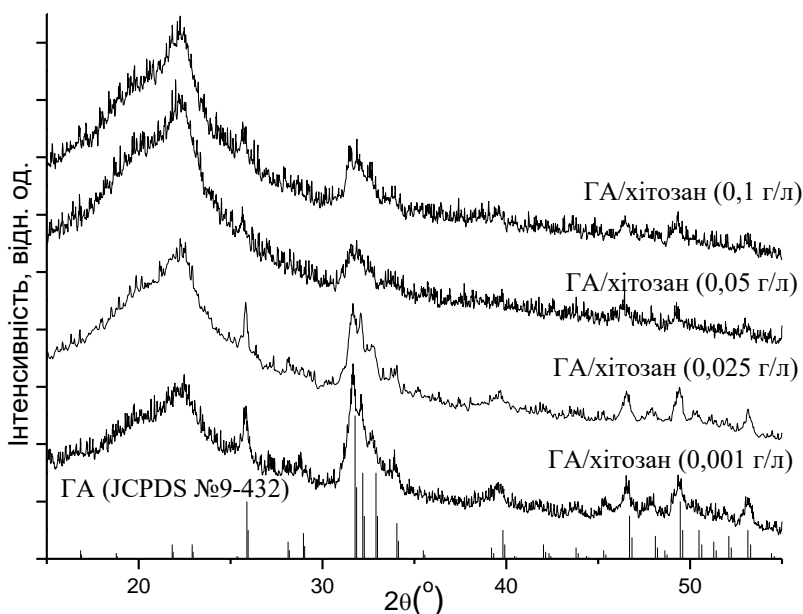


Рис. 94. Криві рентгенівської дифракції покриттів з різними концентраціями хітозану (0,001 – 0,1 г/л) у вихідному розчині

Кристалізацію ГА за наявності хітозану можна пояснити таким чином: взаємодія неорганічних кристалів та органічних молекул у цьому разі є основою процесу кристалізації. Осадження залежить від типу й концентрації доданих речовин. Під час зародкоутворення хітозан адсорбується на поверхні ядра, міжфазна енергія зменшується і швидкість утворення зародків кристалів зростає. Органічні молекули можуть займати місця росту на зародках кристалів, обмежуючи зерна росту, отже, рівень росту кристалів може бути зменшений за рахунок адсорбції полімеру. Морфологія та склад твердої фази можуть також бути зміненими. Адсорбція молекул хітозану на поверхні кристалів зменшує міжфазну енергію на межі поділу фаз «кристал/розчин», унаслідок цього поверхня є несприятливою для основних іонів (Ca^{2+} та PO_4^{3-}), які можуть осаджуватися лише на не зайняті молекулами полімеру зародки. Хітозан, що є

поліелектролітом, при низьких концентраціях може індукувати агрегацію, зв'язуючи розподілені в суспензії частинки. Якщо він наявний у більшій концентрації, то може діяти як стабілізуювальний компонент завдяки його адсорбції на поверхні, що створює заряджену поверхню [47].

У табл. 22 наведені результати фазового складу отриманих покриттів і виміряні методом енергодисперсійного рентгено-спектрального аналізу співвідношення Ca/P. Точки проведення елементного аналізу позначені на рис. 91 (г) і 93 (в).

Таблиця 22

Порівняльні характеристики покриттів, отриманих при введенні хітозану на різних етапах синтезу

Варіант внесення хітозану	Умови експерименту	Ca/P (ваг. %)	Ca/P (ат. %)	Адгезія (кг/м ²)	Фазовий склад покриття
Хітозан нанесений до осадження ГА	t°= 105 °С; рН = 6,5–6,6; час проведення 3 год	2,01	1,55	6000	Виражена фаза ГА
		2,25	1,73		
		2,05	1,59		
Концентрація хітозану 0,1 г/л	t°= 100–105 °С; рН = 6,5; час проведення 3 год	2,48	1,91	5454	Виражена фаза ГА
		2,60	2,01		
		2,52	1,94		
Концентрація хітозану 0,05 г/л	t°= 100–105 °С; рН = 6,5; час проведення 3 год	2,52	1,94	6667	Виражена фаза ГА
		2,70	2,08		
		2,30	1,77		

Варіант внесення хітозану	Умови експерименту	Са/Р (ваг. %)	Са/Р (ат. %)	Адгезія (кг/м ²)	Фазовий склад покриття
Концентрація хітозану 0,025 г/л	t°= 100–105 °С; рН = 6,87; час проведення 3 год	2,28 2,37 2,15	1,76 1,83 1,65	20000	Виражена фаза ГА
Концентрація хітозану 0,001 г/л	t°= 100–105 °С; рН = 6,55; час проведення 3 год	2,17 2,19 2,14	1,68 1,70 1,66	10000	ГА кристалічний
Конц. розчин хітозану на 1 добу (рН р-ну = 7 – 7,8)	t° = 100 °С; рН = 6,5; час проведення по 1 год кожна сторона	2,12 2,22 2,04	1,64 1,71 1,68	2083	Виражена фаза ГА
Покриття ГА без хітозану	t°= 105 °С; рН = 6,5; час проведення 2 год	2,19 2,176 2,15	1,7 1,68 1,66	8000	ГА кристалічний

Для визначення вмісту хітозану в отриманому покритті використовували метод ІЧ-спектрометрії та термогравіметрії.

Термогравіметрію проводили при 700 °С протягом 20 хвилин. Різниці маси в покриттях ГА, отриманих без хітозану та покриттях з різною концентрацією хітозану, наведені в табл. 23.

Таблиця 23

Результати термогравіметричного аналізу покриттів з різним вмістом хітозану

Маса покриття	Концентрація хітозану у вихідному розчині (г/л)			
	0,001	0,025	0,05	0,1
m ₁ (г)	0,1430	0,1420	0,1445	0,1536
m ₂ (г)	0,1425	0,1410	0,1425	0,1511
Δm (г)	0,0004	0,0010	0,0015	0,0025

Спектри поглинання в інфрачервоній області подані на рис. 95, 96.

На рис. 95 представлені інфрачервоні спектри покриттів ГА з хітозаном порівняно зі спектрами ГА та хітозану. Смуги, що спостерігаються в областях 900–1200 см⁻¹, 597–601 см⁻¹, 558–570 см⁻¹ та 470 см⁻¹ відповідають фосфатним групам PO₄³⁻, а саме смуги в області 1047–1049 см⁻¹, відповідають виродженим асиметричним ν₃ Р-О-валентним коливанням фосфатних груп, смуга в області 962 см⁻¹ – це ν₁-невироджені Р-О-симетричні валентні коливання, а дублет 602–573 см⁻¹ може бути віднесений до О-Р-О ν₄-деформаційних коливань [21, 104].

Розширення лінії в області 1050 см⁻¹ вказує на наявність полімеру та взаємодію з фосфатними групами [78]. Смуги, що спостерігаються в області 850–890 см⁻¹ і 1415 см⁻¹, відповідають ν₂- і ν₃-коливанням CO₃²⁻ [187]. Інфрачервоні спектри хітозану (рис. 95 е) представлені широкою –ОН-адсорбційною смугою між 3100 та 3450 см⁻¹ і розширенням смуги в області 2850–2990 см⁻¹, що відповідає аліфатичному С–Н-зв'язку. Оскільки смуги, що відповідають –ОН- та С–Н- зв'язкам, частково накладаються одна на одну, то утворюється широкий діапазон

спектра від 2850 до 3450 см^{-1} . Інша адсорбційна смуга в молекулі хітозану знаходиться між 1020 та 1220 см^{-1} і характеризує вільну первинну аміногрупу ($-\text{NH}_2$) у положенні C_2 глюкозаміну, що є однією з основних функціональних груп хітозану. Пік 1647 см^{-1} характеризує ацетильовану аміногрупу хітину, а це означає, що зразок хітину був неповністю деацетильований. Пік в області 1384 см^{-1} характеризує $-\text{C}-\text{O}$ -коливання первинної спиртової групи ($-\text{CH}_2-\text{OH}$) [217]. Адсорбційна смуга в області 1641 см^{-1} відповідає симетричним валентним коливанням ($\text{C}=\text{O}$) в NHCOCH_3 , а 1560 см^{-1} відповідає коливанням ($\text{C}-\text{N}$) і ($\text{N}-\text{H}$) в молекулі хітозану. Коливанням (CH_2) у CH_2OH відповідають смуги 1456, 56 см^{-1} та 1433,93 см^{-1} .

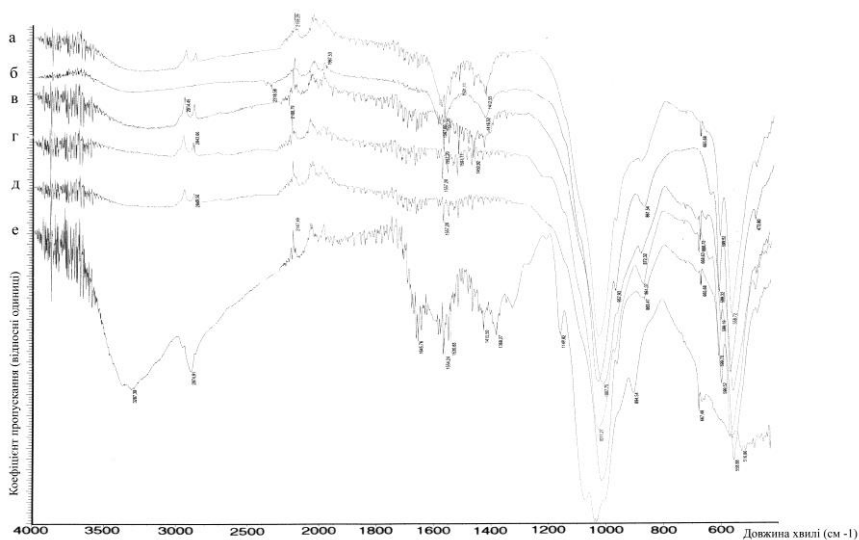


Рис. 95. ІЧ-спектри покриттів, отриманих методом термодепозиції: а) хітозан (0,001 г/л)/ГА; б) хітозан (0,025 г/л)/ГА; в) хітозан (0,05 г/л)/ГА; г) хітозан (0,1 г/л) /ГА; д) ГА; е) хітозан в KBr

Потрібно зазначити, що піки, які відповідають первинним аміногрупам хітозану в діапазоні 1415–1645 см^{-1} , найбільш яскраво виражені у покриттях, при синтезі яких

використовували розчини з низькими концентраціями хітозану: 0,001 та 0,025 г/л (рис. 95 б). При концентрації хітозану у вихідному розчині 0,05 г/л (рис. 95 в) спостерігається суцільний пік у діапазоні 1416–1557 cm^{-1} , що не розділяється. Отже, при збільшенні концентрації хітозану у вихідному розчині можливі два варіанти: перший – хітозан зв'язується в отриманому покритті з фосфат-іонами, внаслідок чого змінюється коефіцієнт пропускання, і другий – зв'язування відбувається при додаванні компонента, що містить фосфат-іони безпосередньо у водному розчині, що використовується для отримання покриттів. У цьому разі при збільшенні рН вихідного розчину хітозан переходить у нерозчинний комплекс, залишаючись у вихідному розчині й лише в незначній ступені переходячи у покриття, внаслідок чого коефіцієнт пропускання змінюється.

На рис. 96 ті самі зразки наведені порівняно з хітозаном, що розчинений в 1 % CH_3COOH з концентрацією 1 г/л.

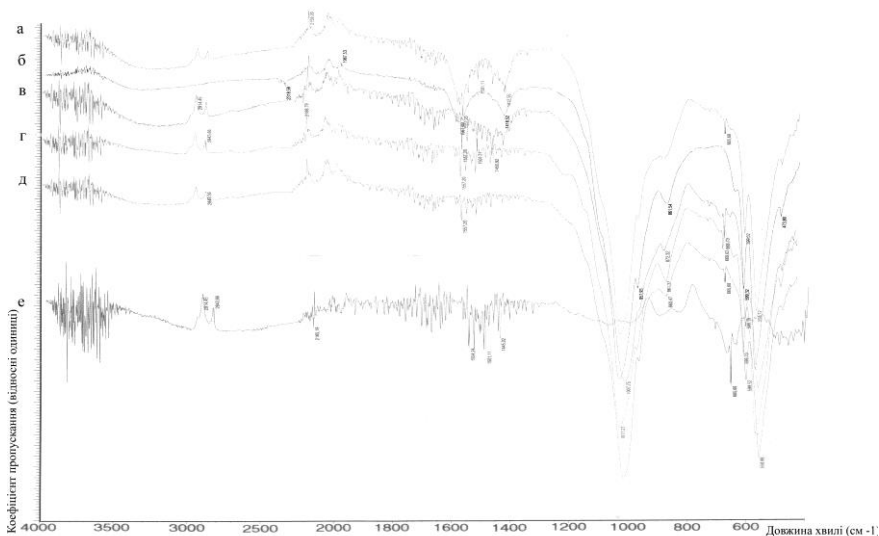


Рис. 96. Інфрачервоні спектри покриттів: а) хітозан (0,001 г/л)/ГА; б) хітозан (0,025 г/л)/ГА; в) хітозан (0,05 г/л)/; г) хітозан (0,1 г/л)/ГА; д) ГА; е) хітозан в CH_3COOH

Протоновані аміногрупи в молекулах хітозану мають менший коефіцієнт пропускання (рис. 96 е), ніж аміногрупи хітозану,

сухий порошок якого змішаний з КВг (рис. 96 е), що може бути непрямим підтвердженням цієї гіпотези.

Порівняні інфрачервоні спектри покриттів, отриманих із водних розчинів ГА та хітозану методом термодепозиції та зі спектром хітозану (е), показали, що при концентрації хітозану в розчині 0,025 г/л більший коефіцієнт пропускання в області 1567 см^{-1} та 1412 см^{-1} , ніж для покриттів, отриманих з розчинів з більшою концентрацією хітозану.

Попереднє нанесення плівки хітозану на титановий субстрат істотно не позначається на інфрачервоних спектрах, що свідчить про наявність аміногруп (1554 см^{-1} і 1416 см^{-1}). У цьому діапазоні спостерігається лише незначне зростання коефіцієнта пропускання. Але в області 1050 см^{-1} спостерігається розширення лінії, що вказує на наявність полімеру та взаємодію з фосфатними групами. В цілому спектр практично збігається зі спектром, отриманим для гідроксиапатиту.

При одночасному знаходженні в розчині хітозану та іонів Ca^{2+} і PO_4^{3-} осадження найбільш якісних покриттів із заданими характеристиками відбувається за умови невеликої концентрації хітозану (0,001–0,025 г/л). Вони мають адгезію кращу за покриття ГА без хітозану в 2–4 рази (табл. 24).

Таблиця 24

Адгезія покриттів ГА з різними концентраціями хітозану

Адгезія/ Склад	ГА/хіто- зан 0,025г/л	ГА/хіто- зан 0,05 г/л	ГА/хітозан 0,1г/л	ГА
Н/м ²	200000	66670	54540	80000
МПа	0,2	0,07	0,05	0,08

6.12.2. Формування хітозан–ГА-покриттів із додаванням Ag

Найбільш прийнятними способами введення хітозану до складу покриттів, як було визначено нами раніше, є: 1) нанесення плівки хітозану й осадження на неї покриття ГА та 2) сумісне осадження ГА та хітозану з водних розчинів. Уведення Ag^+ до складу покриття ГА є можливим в обох цих випадках. У зв'язку з тим, що хітозан має здатність утворювати хелатні комплекси з іонами металів, є доцільним спочатку ввести Ag^+ у розчин хітозану, а потім додавати розчин для синтезу ГА.

Розчин, що містить іони Ag^+ з концентрацією 10 мг/л, було отримано при електролізі зі срібним анодом. Як вихідні розчини для синтезу ГА використовували: 1) 10 ммоль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; 2) 10 ммоль/л $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ + + 6 ммоль/л $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$. Розчин хітозану з концентрацією 5 г/л використовували для отримання полімерної плівки. Для цього титановий субстрат послідовно занурювали в розчин хітозану та NaOH (10 М), після чого висушували протягом доби при кімнатній температурі. На отриману плівку проводили осадження покриттів методом термодепозиції при температурі 80 °С, рН = 6,65–6,72 протягом 60 хвилин.

Були досліджена морфологія (рис. 93) і фазовий склад (рис. 94) покриттів, отриманих із вихідних розчинів з різним співвідношенням компонентів, наведеними в табл. 25.

Для приготування вихідного розчину хітозану з додаванням Ag^+ : 200 мл розчину хітозану з концентрацією 1 г/л змішували з 20 мл розчину Ag^+ з концентрацією 10 мг/л, рН розчину довели до 6,5 додаванням розчину NaOH . Для рівномірного перемішування використовували магнітну мішалку. Розчин для синтезу ГА методом термодепозиції містить 10 ммоль/л $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, 6 ммоль/л $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$.

Таблиця 25

Умови проведення експерименту та концентрації вихідних речовин під час отримання покриттів з додаванням Ag методом термодепозиції

Склад вихідного розчину	Концентрація хітозану в розчині	Розчин хітозану з Ag, мл V(XT-Ag)	Розчин Ag, (10 мг/л), мл	Розчин ГА, мл V (ГА)	Умови експерименту	Плівка хітозану
10 % V (XT-Ag) 90 % V (ГА)	0,1 г/л	20	-	180	t = 80 °C, pH = 6,71, 60 хв	+
10 % V (Ag ⁺) 90 % V (ГА)	-	-	20	180	t = 80 °C, pH = 6,65, 60 хв	+
10 % V (Ag ⁺) 90 % V (ГА)	-	-	20	180	t = 80 °C, pH = 6,65, 60 хв	-
20 % V (XT-Ag) 80 % V (ГА)	0,1 г/л	40	-	160	t = 80 °C, pH = 6,72, 60 хв	-

Склад вихідного розчину	Концентрація хітозану в розчині	Розчин хітозану з Ag, мл V(XT-Ag)	Розчин Ag, (10 мг/л), мл	Розчин ГА, мл V (ГА)	Умови експерименту	Плівка хітозану
50 % V (XT-Ag) 50 % V (ГА)	0,5 г/л	100	–	100	t = 80 °C, pH = 6,71, 60 хв	+
25 % V (XT-Ag) 75 % V (ГА)	0,25 г/л	50	–	150	t = 80 °C, pH = 6,71, 60 хв	–

Використання як вихідного компонента для синтезу ГА-розчину $\text{CaCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ приводить до утворення осаду AgCl , сліди хлору відображено на енергодисперсійних спектрах при елементному аналізі (рис. 97). При цьому потрібно зазначити, що концентрації Ag^+ є низькими для визначення їх як методом рентгенівської дифракції, так і за допомогою елементного аналізу.

Істотної різниці у фазовому складі між варіантами г і є немає, тому на дифрактограмі цей зразок відсутній. На деяких спектрах ЕДС спостерігаються піки титану (матеріал пластинки), що свідчить про те, що покриття є недостатньо щільним. На рис. 98 представлено фазовий склад отриманих покриттів – це ГА. У випадку *a*, де концентрація хітозану у вихідному розчині є найвищою і становить 50 %, основний пік ГА, що знаходиться в діапазоні значень 2θ від 31° до $34,5^\circ$, розділений слабо, що пов'язано з негативним впливом хітозану

на кристалічність ГА. Інтенсивності піків у випадку δ є істотно меншими, ніж у випадках a - z , що пов'язано з меншою кількістю покриття, отриманого без додавання хітозану у вихідний розчин для осадження ГА.

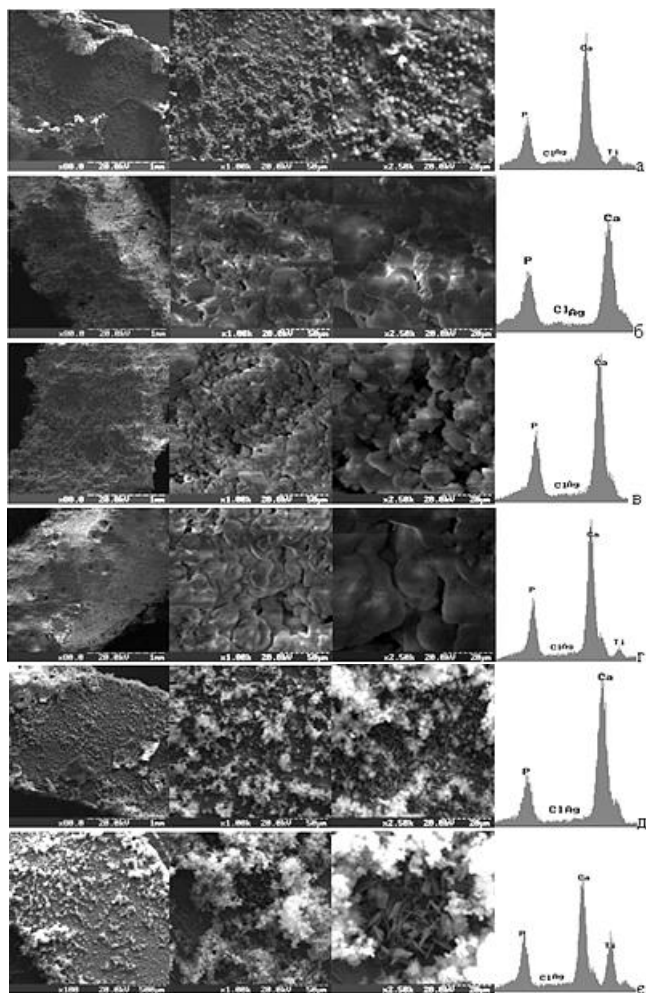


Рис. 97. Морфологія покриттів, отриманих методом термодепозиції: а – 50 % ChAg + 50 % HA; б – 10 % ChAg + 90 % HA, в – 25 % Ch-Ag + 75 % HA, г – 20 % ChAg + 80 % HA, д – 10 % Ag + 90 % HA (пластинка, вкрита плівкою хітозану), є) 10 % Ag + 90 % HA (необроблена пластинка)

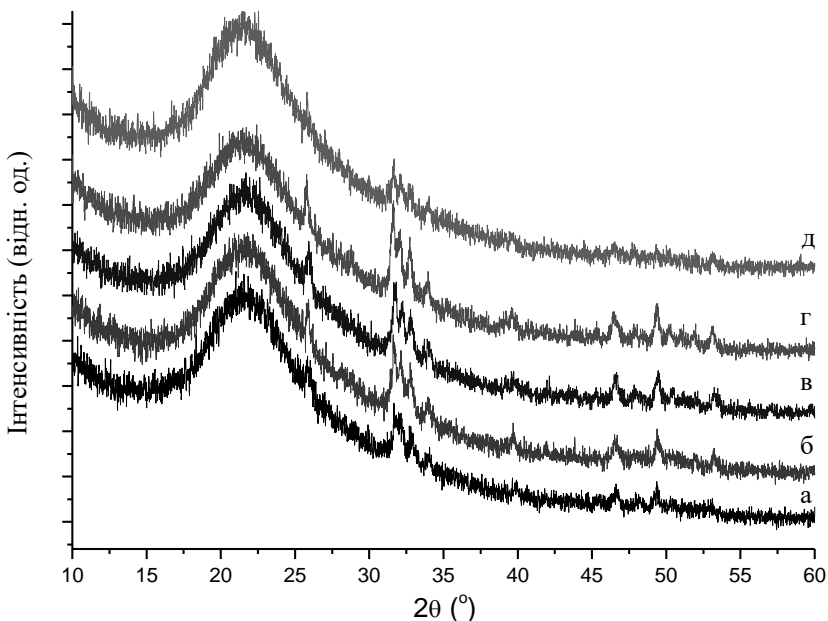


Рис. 98. Криві рентгенівської дифракції покриттів, отриманих методом термодепозиції: а – 50 % ChAg + 50 % HA; б – 10 % ChAg + 90 % HA; в – 25 % ChAg + 75 % HA; г – 20 % ChAg + 80 % HA; д – пластинка вкрита плівкою хітозану 10 % Ag + 90 % HA

Пік у районі 20° належить клейкій стрічці, на яку наносили покриття після зчищення із пластинок. Однак основні піки хітозану також знаходяться в області 10° та 20° , тому можливим є накладання піку хітозану на гало від клейкої стрічки. Кількість отриманого покриття обумовлена розмірами титанової пластинки і є недостатнім для заповнення стандартної кювети, що використовується в методі порошкової дифракції. Тому виникає необхідність зчищати покриття для заповнення простору в малій кюветі.

Оскільки методом рентгенівського мікроаналізу неможливо визначити концентрацію Ag у покритті, що становить максимум 1 мг/л (за умови, якщо все срібло з вихідного розчину перейшло до покриття), виявився необхідним пошук методів для визначення концентрації іонів срібла в отриманому покритті. У зв'язку з цим було обрано метод атомно-абсорбційної

спектроскопії. Для проведення аналізу титанові субстрати з покриттями ГА, що висушені на повітрі за стандартних умов до сталої маси, зважували на лабораторних електронних вагах AD50 (фірма «Axis»). Потім їх обробили в мірній пробірці об'ємом 0,5 мл концентрованою нітратною кислотою до припинення реакції. Після цього титановий субстрат дістали з пробірки, змивши залишки розчину в пробірку бідистилятом. Потім об'єм проби довели до 3 мл. Промиті та висушені субстрати зважували, і за різницею мас перед та після обробки HNO_3 визначили масу покриття ГА. Проби, які необхідно проаналізувати, дозували всередині печі дозатором FAA-50. Довжина хвилі для Ag – 328,1 нм, ширина спектральної щілини 0,4 нм.

Розчини для калібрування були приготовані з державних стандартних зразків розчинів солей металів (ГСО 6077-91) з концентраціями 0,25 та 0,5 мг/л. У роботі використовували бідистильовану воду з електричною провідністю 1 мкСм. Результати вимірювань перераховані на суху масу ГА покриття для кожного зразка і наведені в табл. 26.

Таблиця 26

Вміст срібла в покриттях ГА

Склад зразка	Концентрація, мг/г	Середнє квадратичне відхилення, %
д – 10 % Ag + 90 % НА (пластинка, вкрита плівкою хітозану)	0,967	3
є – 10 % Ag + 90 % НА (необроблена пластинка)	0,290	5

У зв'язку з тим, що хлор утворює з іонами Ag^+ нерозчинну сполуку AgCl , на що вказують сліди хлору на спектрах ЕДС, був проведений пошук вихідних реактивів, аніони яких не

утворюють нерозчинних сполук з іонами Ag^+ . Для осадження покриттів методом термодепозиції було приготовано розчини $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ (10 ммоль/л) та $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O}$ (6 ммоль/л). Склад вихідних розчинів для синтезу наведений у табл. 27.

Таблиця 27

Умови проведення експерименту та концентрації вихідних речовин під час отримання покриттів з додаванням Ag^+ методом термодепозиції

Склад вихідного розчину		Розчин хітозану (1г/л), мл V (ХТ)	Розчин Ag (10 мг/л), мл V(Ag^+)	Розчин $10 \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \times \times \cdot 4\text{H}_2\text{O} / \text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 12 \text{H}_2\text{O}$, мл V (ГА)	Умови експерименту
а	25 % V (Ag^+)	–	50	150	t = 80°, pH = = 6,72; 60 хв
	75 % V (ГА)				
б	25 % V (Ag^+)	50	50	100	t = 80°, pH = = 6,72; 60 хв
	50 % V (ГА)				
	25 % V (ХТ)				
в	100 % V (ГА)	–	–	200	t = 80°, pH = = 6,6– 6,9; 60 хв

Синтез відбувався за такою реакцією: $5 \text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O} + 3\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12 \text{H}_2\text{O} + 4 \text{NaOH} \rightarrow \text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH} + 10 \text{NaNO}_3 + 59 \text{H}_2\text{O}$.

Покриття, отримане при сумісному осадженні, що містить хітозан, Ag та ГА є значно товщим, має пори Ø 150–300 мкм (рис 99 б). На ЕДС-спектрах відсутній титан. Отже, додавання хітозану в розчин для синтезу покриттів забезпечує покращання їх основних характеристик.

Морфологія покриттів, отриманих з додаванням лише Ag^+ і з додаванням розчину хітозану, істотно відрізняється, що бачимо з рис. 99.

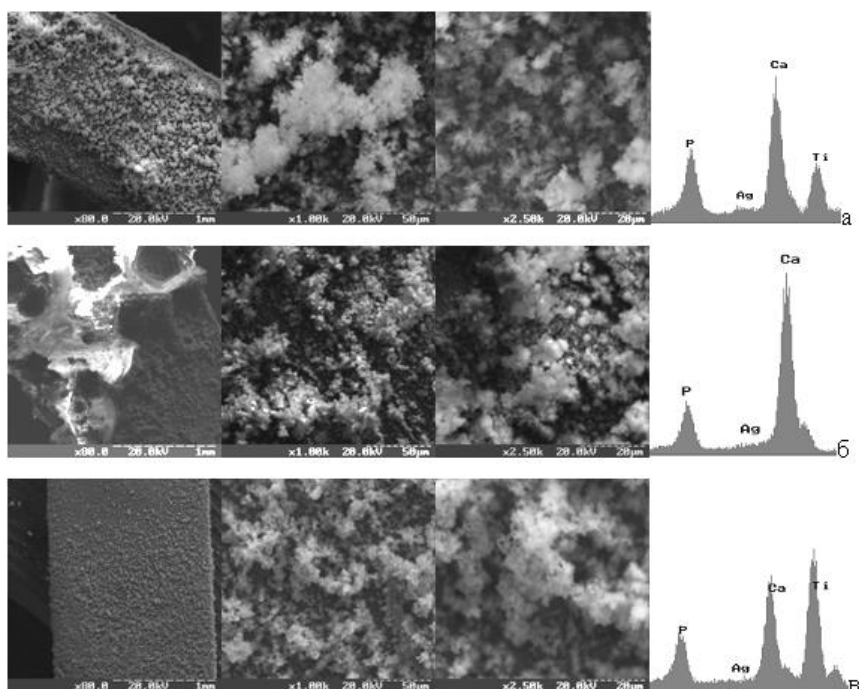


Рис. 99. Морфологія покриттів на основі ГА, отриманих методом термодепозиції з водних розчинів при концентраціях а) ГА (75 %) – Ag (25 %); б) ГА (50 %) – Ag (25 %) – хітозан (25 %); в) ГА (100 %)

На дифрактограмі (рис. 100 б) бачимо, що основні піки ГА добре розділяються, незважаючи на їх низьку інтенсивність.

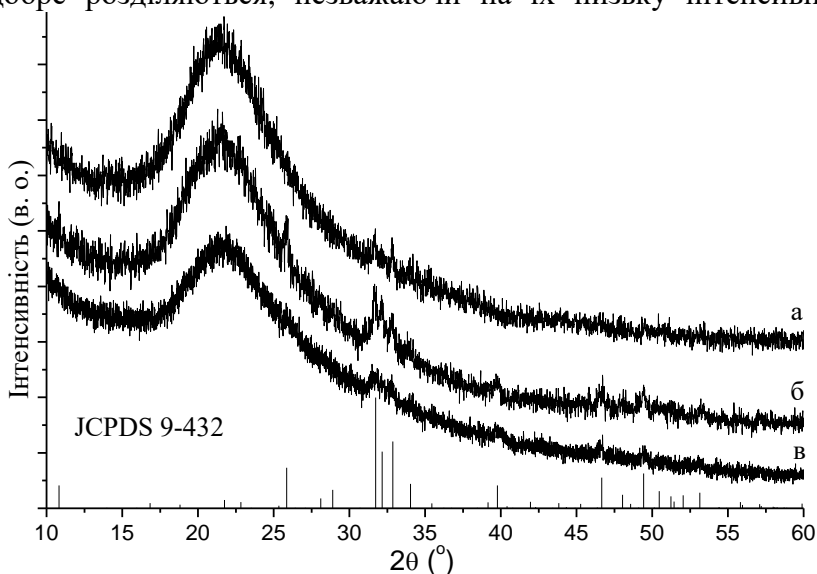


Рис. 100. Криві рентгенівської дифракції для покриттів, отриманих методом термодепозиції з розчинів зі співвідношенням вихідних компонентів: а) 25 % Ag, 75 % ГА; б) 25 % хітозану, 25 % Ag, 50 % ГА; в) 100 % ГА

В області 2θ – 10° та 20° спостерігається гало (рис. 100), що обумовлене як незначною кількістю отриманого покриття, так і матеріалом кювети (оргскло). Саме в цьому діапазоні знаходяться основні піки хітозану, тому зазначеним методом однозначно визначити його наявність неможливо.

Вміст срібла в покриттях на основі ГА має істотне значення, оскільки антибактеріальна активність забезпечується поступовим вивільненням іонів срібла в рідину, що оточує імплантат.

Концентрацію срібла в покриттях визначали атомно-адсорбційним методом. Визначено, що для покриттів, які містять у своєму складі Ag та ГА, концентрації срібла в покритті є меншими (табл. 28 а) і становлять приблизно 4,75 мг/г, ніж для

покриттів, осаджених із водних розчинів, що містять 25 % хітозану (табл. 28).

Таблиця 28

Оцінка вмісту срібла в отриманих покриттях методом ААС

	Склад вихідного розчину при отриманні покриттів методом термодепозиції	Концентрація, мг/г	Відносне середньоквадратичне відхилення, %
а	25 % Ag, 75 % ГА	4,75	4
б	25 % Хтз, 25 % Ag, 50 % ГА	6,40	8

На наш погляд, підвищення концентрації срібла в покриттях, отриманих із розчинів з додаванням хітозану, можна пояснити властивістю хітозану утворювати хелатні комплекси з іонами металів, зокрема Ag^+ , захоплюючи їх до своєї структури. Синтез покриттів ГА методом термодепозиції відбувається при рН 6,72. За цих умов хітозан переходить у нерозчинний стан, захоплюючи срібло з розчину.

Отже, метод термодепозиції є прийнятним як для введення срібла до складу покриттів на основі гідроксиапатиту, так і для створення покриттів, що містять у своєму складі неорганічні та органічні компоненти. Доцільним під час приготування вихідного розчину є додавання срібла до хітозану з подальшим уведенням компонентів для синтезу ГА. Вихідний розчин із концентрацією хітозану 0,25 г/л дозволяє отримати щільніші покриття з більшим вмістом срібла.

6.12.3. Дослідження антибактеріальної активності отриманих покриттів

Покриття з додаванням срібла осаджували на субстраті з попередньо нанесеною плівкою хітозану. Як контрольний зразок використовували покриття ГА, отримані методом термодепозиції при $t_{\text{субстр}} = 90^{\circ}\text{C}$, рН = 6,60–6,75, час проведення експерименту – 30 хвилин.

Фазовий склад отриманих покриттів наведений на рис. 101. Найбільшу інтенсивність піків в області $2\theta = 33\text{--}36^{\circ}$ мають покриття на основі гідроксиапатиту.

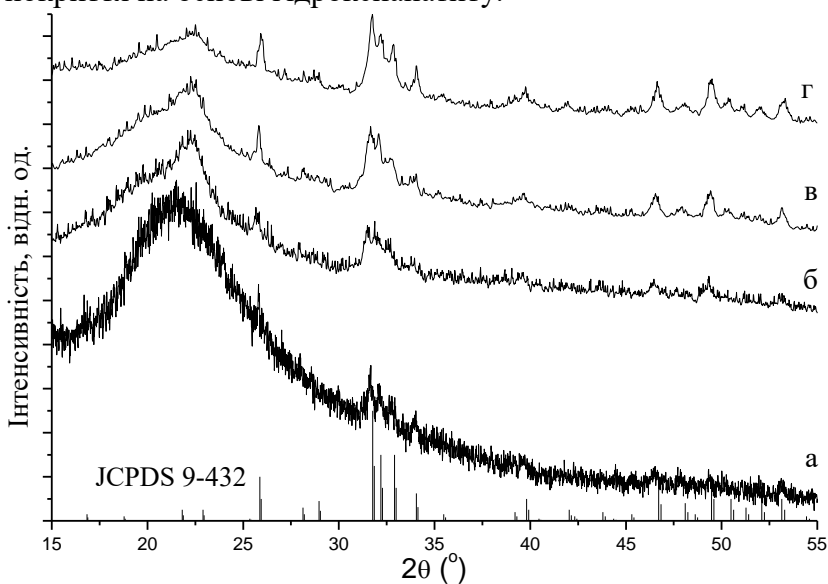


Рис. 101. Криві рентгенівської дифракції покриттів, осаджених методом термодепозиції: а) ГА-Ag покриття при концентрації срібла у вихідному розчині 1 мг/л; б) хітозан-ГА-покриття, отримані при концентраціях хітозану в розчині 0,1 г/л; в) 0,025 г/л; г) покриття ГА

Морфологія поверхні отриманих покриттів показана на рис. 102.

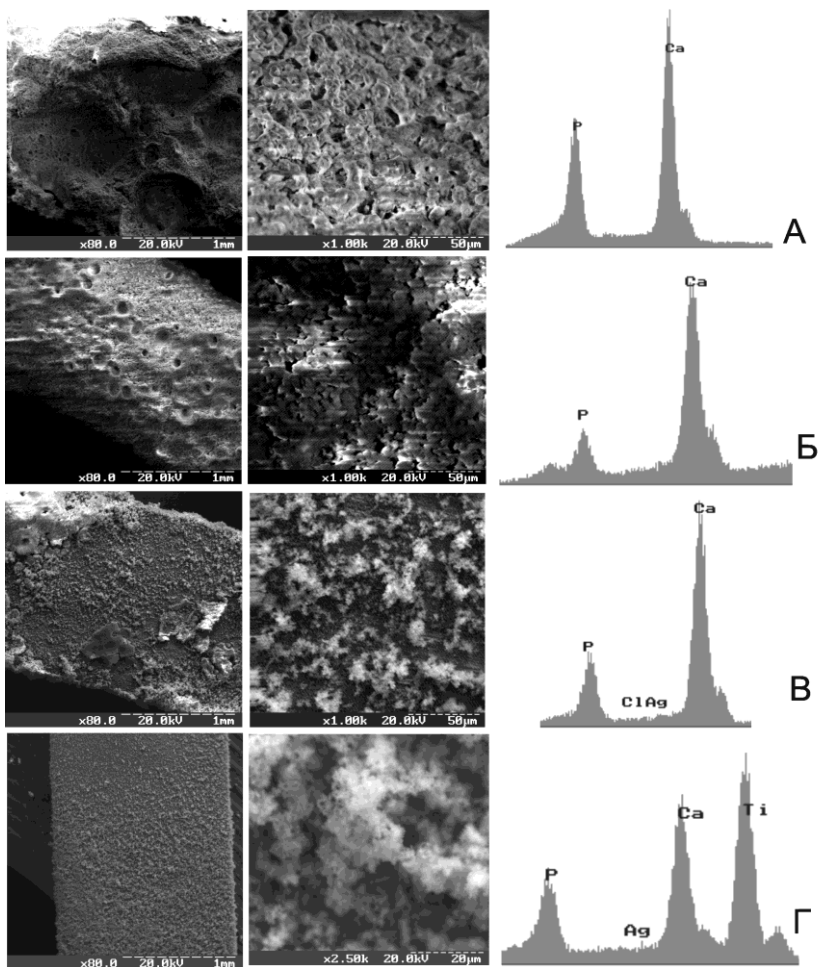


Рис. 102. Морфологія покриттів ГА-хітозану, що отримані методом термодепозиції із водних розчинів з концентраціями хітозану: А – 0,025 г/л; Б – 0,1 г/л; В – ГА-Ag-покриття з концентрацією срібла у вихідному розчині 1 мг/л; Д – покриття ГА, отримане за тих самих умов ($t_{\text{субстр}} = 90^{\circ}\text{C}$, $\text{pH} = 6,60\text{--}6,75$, час проведення експерименту – 30 хвилин)

Дослідження протимікробної активності покриттів на основі гідроксиапатиту з додаванням хітозану та срібла як антимікробних компонентів щодо мікроорганізмів *E.coli* на

титанових субстратах проводили методом спектрофотометрії за допомогою спектрофотометра СФ-56 (довж. хвилі 540 нм).

Із рис. 103 бачимо, що антибактеріальна активність із часом змінюється, і після 48 годин для покриттів ГА-Ag, отриманих на модифікованих плівкою хітозану субстратах, є найбільшою порівняно з контрольним зразком покриття ГА. Одержані результати можна пояснити бактеріостатичною активністю хітозану та бактерицидною дією срібла як антимікробного компонента. Навіть при невеликій концентрації Ag у складі покриття воно виявляє антибактеріальну активність, надаючи покриттю на основі ГА необхідних властивостей. Важливим аспектом є визначення кількості срібла, що вивільнюється в розчин при частковому розчиненні ГА-Ag-покриття, і це потребує подальшого дослідження.

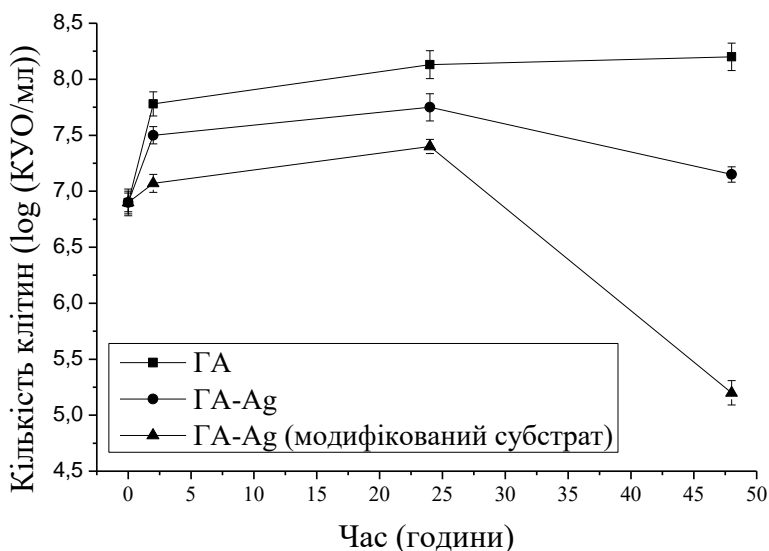


Рис. 103. Залежність логарифма кількості клітин E.coli від часу занурення покриттів ГА, та ГА-Ag і ГА-Ag на модифікованій плівкою хітозану поверхні

З отриманих даних бачимо, що покриття на основі гідроксиапатиту, які містять антибактеріальні компоненти, мають протимікробний ефект у фізіологічному розчині при

температурі 37 °С. Отже, додавання цих компонентів є доцільним унаслідок установленної антибактеріальної активності.

Найбільш ефективним є трикомпонентне покриття, що складається із плівки хітозану, гідроксиапатиту й срібла, що пов'язано, на наш погляд із синергетичною дією хітозану та іонів срібла при виявленні антибактеріальної активності, – як наслідок здатності хітозану утворювати хелатні комплекси. Таке припущення цілком узгоджується з літературними даними, що свідчать про посилення антибактеріальних властивостей хелатних комплексів порівняно з лігандами [256].

7. Стратегія формування імплантатів на основі ортофосфатів кальцію для біомедичного застосування

Новітні біоматеріали повинні відповідати низці вимог: бути стійкими у середовищі організму, не піддаватися корозійному руйнуванню, мати біосумісність із кістковою тканиною, необхідну механічну міцність та характеристики, що близькі до таких у кістковій тканині. Бажаним також є те, щоб матеріал мав здатність до біодеградації, тобто сам виводився з організму після формування кісткової тканини. У зв'язку з цим виникає потреба у розробленні матеріалів, що відповідають переліченим вимогам, та методів їх одержання.

Хронологія пошуку матеріалів на основі ортофосфатів кальцію така. Починаючи з 1950-х років з'являється так звана біоінертна кераміка, що витримує фізіологічний вплив без стимуляції будь-яких реакцій (1-ша генерація). Протягом 1980-х виникає протилежна тенденція: створення матеріалу, що реагує з фізіологічним оточенням з утворенням нової кісткової тканини (2-га генерація). Матеріали обох генерацій на сьогодні виробляються багатьма фірмами світу для населення. Зараз, як вважає один із класиків біоматеріалознавства, проф. Хенч, настав час для 3-ї генерації, а саме створення біоматеріалів, що спроможні надавати «інструкції» фізіологічному оточенню щодо бажаного відгуку на імплантацію від усього організму. Тобто мова йде про реалізацію повного потенціалу матеріалів на

основі ортофосфатів кальцію, а саме поєднання остеокондуктивних властивостей біокераміки 2-ї генерації з остеоіндуктивними властивостями біокераміки 3-ї генерації через дизайн контрольованих 3D-пористих структур із підвищеною біологічною активністю. Склад, мікроструктура, морфологія поверхні новітніх біоматеріалів повинні відповідати специфічним біологічним і метаболічним вимогам тканин або патологічних станів. Апатит-біополімерні структури, розглянуті в монографії, є одним із напрямків подібної активності. Необхідно в подальшому звернути увагу на більш глибоке розуміння фізичних і хімічних факторів функціонування біоматеріалів та відгуку на них, що є однією із проблем сучасного медичного матеріалознавства. Складність проблеми зумовлена умовами функціонування біоматеріалів в організмі людини: рН розчинів тканин змінюється від 1 до 9; кістки знаходяться під тиском ~ 4 МПа (хрящі, зв'язки мають пікові стреси від 40 до 60 МПа); середнє навантаження на стегнові суглоби втричі перевищує вагу тіла тощо [91]. Ці вимоги потребують дуже специфічного синтезу біоматеріалів з точки зору складу, форми, фізичних і біохімічних властивостей. На сьогодні сфера біоматеріалів поєднується з науками про життя, з одного боку, а з іншого – з успіхами в інженерії (нанотехнології), що позитивно вплине на дизайн біоматеріалів для виконання більш складних функцій в організмі людини і таким чином істотно може позначитися на якості життя населення в цілому.

8. Висновки та перспективи подальших досліджень

Розглянуті у монографії характеристики хітозану показують значний потенціал цієї макромолекули для використання її як біоматеріалу з необхідними властивостями (пористістю, ступенем біодеградації) в практичній медицині, зокрема для кісткової регенерації. Однак при цьому необхідні певні додаткові зусилля для підвищення механічних характеристик біоматеріалів на основі хітозану для подібних застосувань. Інша дуже істотна особливість хітозану – це здатність взаємодіяти з

аніонними молекулами, такими як ростові фактори, глікозаміноглікани та ДНК. Здатність зв'язуватися з молекулами ДНК дає змогу отримувати матеріал, придатний для застосування в генній терапії. Тобто фактично комбінації властивостей хітозану (біосумісність, внутрішня антибактеріальна властивість, здатність комплексоутворення з ростовими факторами, ДНК, існування в різних формах) приводить до висновку, що хітозан – це дуже перспективний кандидат для скеффолдів тканинної інженерії. Проте вплив деяких параметрів, таких як молекулярна маса, в'язкість, повинен бути додатково розглянутий для повного використання потенціалу цього природного полісахариду в наномедицині.

Перелік власних (Scopus) публікацій із короткими анотаціями

Біоматеріали та покриття

1. Danilchenko S. N., Kukhorenko O. G., Moseke C., Protsenko I. Yu., **Sukhodub L. F.**, Sulkio-Cleff B. Determination of the bone mineral crystallite size and lattice strain from diffraction line broadening // *Cryst. Res. Techn.* – 2002. – V. 37 (11). – P. 1234–1240. *The crystallite size and lattice strain were calculated by two independent methods: Fourier analysis and approximation with threefold convolution of X-ray lines.*
2. Danilchenko S. N., Moseke C., **Sukhodub L. F.**, Sulkio-Cleff B. X-ray diffraction studies of bone apatite under acid demineralization // *Cryst. Res. Techn.* – 2004. – V. 39 (1). – P. 71–77. *The paper discusses modifications in the bioapatite crystals observed in the bone subjected to demineralization in a 0.1 N HCl solution.*
3. **Sukhodub L. F.**, Moseke C., Sukhodub L. B., Sulkio-Cleff B., Maleev V. Y., Semenov M. A., Bereznyk E. G., Bolbukh T. V.

- Collagen-hydroxyapatite-water interactions investigated by XRD, piezogravimetry, infrared and Raman spectroscopy // J. Mol. Struct. – 2004. – V. 704 (1-3). – P. 53–58. *It was found that in the presence of HA some Cg hydration sites, probably corresponding to its gap region, are closed, at least partly, for direct interactions with water molecules from the Cg hydration shell.*
4. Danilchenko S. N., Pokrovskiy V. A., Bogatyrov V. M., **Sukhodub L. F.**, Sulkio-Cleff B. Carbonate location in bone tissue mineral by X-ray diffraction and temperature-programmed desorption mass spectrometry // Cryst. Res. Techn. – 2005. – V. 40 (7). – P. 692–697. *At least two stages of CO₃²⁻ release during the thermal evolution were observed, each can be attributed to a different type of carbonate location in the bone mineral.*
 5. Danilchenko S. N., Kulik A. N., Bugai A. N., Pavlenko P. A., Kalinichenko T. G., Ulynychich N. V., **Sukhodub L. F.** Determination of the content and localization of magnesium in bioapatite of bone // J. Appl. Spectr. – 2005. – V. 72 (6). – P. 899–905. *It is shown that for the β -TCMP contents measured in bioapatite samples and on replacement of calcium by magnesium to about 8% in this phase the calculated range of Mg concentrations coincides with that available in literature sources (0.2-0.6 wt. %).*
 6. Danilchenko S. N., Koropov A. V., Protsenko I. Y., Sulkio-Cleff B., **Sukhodub L. F.** Thermal behavior of biogenic apatite crystals in bone: An X-ray diffraction study // Cryst. Res. Techn. – 2006. – V. 41 (3). – P. 268–275. *The material obtained by heating a cortical bone fragment between 900°C and 1300°C turns out to be composed of two crystal types: crystals oriented along the bone axis (major morphology) and those of differing shape and orientation (minor morphology).*

7. **Sukhodub L.F.** Materials and coatings based on biopolymer-apatite nanocomposites: obtaining, structural characterization and *in-vivo* tests // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. – 2009. – V. 40 (4). – P. 318–325. *Present paper discusses the results obtained for three different nanocomposite systems, namely chitosan-apatite, hydrogel-HA and collagen-apatite coatings onto Ti6Al4V substrates. Special attention was given to the in-vivo tests of the obtained chitosan-apatite composites using 48 linear laboratory rats at the age of 4 months.*
8. Danilchenko S.N., Protsenko I.Y., **Sukhodub L.F.** Some features of thermo-activated structural transformation of biogenic and synthetic Mg-containing apatite with β -tricalciummagnesium phosphate formation // *Cryst. Res. Techn.* – 2009. – V. 44 (5). – P. 553–560. *The results of present work together with other investigation data testify to a high thermally activated mobility of Mg both in structure of Mg-containing apatites and in the structure of β -TCMP formed after thermal decomposition. Obtained data can be used for new biomaterials design with varied prolongation of Mg released into the living biological tissue.*
9. Danilchenko S.N., Kalinkevich O.V., Kuznetsov V.N., Kalinkevich A.N., Kalinichenko T.G., Poddubny I.N., Starikov V.V., Sklyar A.M., **Sukhodub L.F.** Thermal transformations of the mineral component of composite biomaterials based on chitosan and apatite // *Cryst. Res. Techn.* – 2010. – V. 45 (7). – P. 685–691. *The data obtained suggest that the formation of the calcium-phosphate mineral in chitosan solution is substantially modulated by the chemical interaction of the components; apparently, a part of calcium is captured by chitosan and does not participate in the formation of the main mineral phase. The apatite in the composite is calcium-deficient, carbonatesubstituted and is composed of dispersed nano-sized*

crystallites, i.e. has properties that closely resemble those of bone mineral.

10. Danilchenko S.N., Kalinkevich O.V., Pogorelov M.V., Kalinkevich A.N., Kalinichenko T.G., Starikov V.V., Sklyar A.M., Bumeyster V.I., Sikora V.Z., **Sukhodub L.F.** Characterization and *in vivo* evaluation of chitosan-hydroxyapatite bone scaffolds made by one step coprecipitation method // J. Biomed. Mater. Res. - Part I. – 2011. – V. 96A (4). – P. 639–647. *Porous chitosan/hydroxyapatite scaffolds have shown osteoconductive properties and have been replaced in the in vivo experiments by newly formed bone tissue.*
11. Danilchenko S.N., Kuznetsov V.N., Stanislavov A.S., Kalinkevich O.N., Kalinkevich A.N., Demidenko M.G., Tyschenko K.V., **Sukhodub L.F.** Structural features of nanocrystalline magnetite obtained by different syntheses according to x-ray diffraction and electron microscopy data // J. Nano- and Electr. Phys. – 2011. – V. 3 (3). – P. 139–147. *Structural features of nanosized magnetite Fe₃O₄ synthesized in the presence of polymeric matrices (polysaccharide chitosan, etc.) were studied using transmission electron microscopy (TEM) and X-ray diffraction analysis. The data obtained strongly suggest the influence of the polysaccharide matrix on the magnetite nanoparticles growth inhibition and size stabilization.*
12. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., **Sukhodub L.** Synthesis and characterization of hydroxyapatite-based coatings for medical implants obtained on chemically modified Ti6Al4V substrates // Surface Coatings Techn. – 2011. – V. 205 (23-24). – P. 5324–5329. *In this study various schemes of chemical pretreatment with NaOH, HF, or H₂O₂ are used to form bioactive hydroxyapatite (HA) coatings by a thermal substrate method. Investigations were conducted to examine the properties of the coatings produced on untreated and chemically pretreated*

substrates as well as the bioactivity of HA coatings subjected to soaking with a simulated body fluid (SBF) for 7 days.

13. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., **Sukhodub L.** Calcium-phosphate coatings obtained biomimetically on magnesium substrates under low magnetic field // *Appl. Surf. Sci.* – 2012. – V. 258 (22). – P. 8577–8584. *It was established that variation of ionic composition of the initial solution leads to the deposition of coatings with various phase composition, i.e. DCPD, DCPD + HA, HA which decreased corrosion rate of Mg.*
14. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., Danilchenko S., **Sukhodub L.** A study of brushite crystallization from calcium-phosphate solution in the presence of magnesium under the action of a low magnetic field // *Mat. Scien. Engin. C.* – 2012. – V. 32 (7). – P. 1883–1887. *The paper discusses the crystallization of dicalcium phosphate dehydrate (DCPD) with subsequent transformation to nanocrystalline hydroxyapatite (HA) under the permanent magnetic field in the presence of magnesium. It was found that the presence of magnesium in the initial solution in concentrations of 0.01-0.03 g/l decreased the crystallinity of calcium-phosphates.*
15. Korotych O., Samchenko Y., Boldescul I., Ulberg Z., Zholobak N., **Sukhodub L.** N-isopropylacrylamide-based fine-dispersed thermosensitive ferrogels obtained via in-situ technique // *Mat. Scien. Engin. C.* – 2013. – V. 33 (2). – P. 892–900. *The present work is devoted to the study of magnetite (Fe₃O₄) formation inside the nanoreactors of (co)polymeric hydrogels. Polymeric templates (hydrogel films and fine-dispersed hydrogels) used for obtaining ferrogels were based on acrylic monomers: thermosensitive N-isopropylacrylamide, and hydrophilic acrylamide.*
16. **Sukhodub L. F.**, Yanovska A. A., Sukhodub L. B., Kuznetsov V. N., Stanislavov A. S. Nanocomposite apatite-

biopolymer materials and coatings for biomedical applications // J. Nano- and Electr. Phys. – 2014. – V. 6 (1). – P. 01001. *The microoverview paper describes synthesis and characterization of novel third generation composite biomaterials and coatings which correspond to the second structural level of human bone tissue (HBT) organization obtained at Sumy state university "Bionanocomposite" laboratory.*

17. Yanovska A. A., Stanislavov A. S., Sukhodub L. B., Kuznetsov V. N., Illiashenko V. Yu., Danilchenko S. N., **Sukhodub L. F.** Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti-6Al-4V substrates and their characterization // Mater. Scien. Engin. C. – 2014. – V. 36 (1). – P. 215–220. *Ti-6Al-4V substrates were modified by a chitosan film to study the influence of surface modification on the formation of the HA-Ag and HA-CS-Ag coatings. Using a thermal substrate method, HA and HA-CS coatings doped with Ag⁺ were prepared at low substrate temperatures (90 C).*

Список літератури

1. Безруков В. М. Оперативное лечение кист челюстей с использованием гидроксиапатита ультравысокой дисперсности / В. М. Безруков, Л. А. Григорьянц, В. П. Зуев, А. С. Панкратов // *Стоматология*. – 1998. – № 1. – С. 31–35.
2. Богатов В. Н. Особенности структуры и химического состава минерального компонента кости человека / В. Н. Богатов // *Успехи современной биологии*. – 1978. – Т. 85, Вып. 1. – С. 71–84.
3. Брик А. Б. Разработка новых подходов к изучению механизмов минерализации костной ткани на основе методов радиоспектроскопии / А. Б. Брик, О. Н. Атаманенко, А. М. Калиниченко // *Ортопед. травматол.* – 2000. – № 2. – С. 28–31.
4. Брик А. Б. ЭПР наноразмерных частиц в биогенных и синтетических карбонатсодержащих апатитах / А. Б. Брик, А. П. Шпак, В. Л. Карбовский // *Минералогический журнал*. – 2005. – Т. 27, № 1. – С. 5–26.
5. Буслаев Ю. А. Взаимодействие диоксида титана с плавиковой кислотой / Ю. А. Буслаев, В. А. Бочкарёва, Н. С. Николаев // *Известия академии наук СССР, отделение химических наук*. – 1962. – № 3. – Р. 388–392.
6. Вересов А. Г. Направленный синтез высокодисперсных материалов на основе гидроксилатапатита: дис. канд. хим. наук: 02.00.01. / Вересов Александр Генрихович. – М. : РГБ, 2003. – 148 с.
7. Гамзазаде А. И. Антибактериальная активность хитозанов / А. И. Гамзазаде, С. М. Насибов, О. В. Лукин // *Современные перспективы в исследовании хитина и хитозана: материалы 8-й Международной конференции, (Казань, 13–17 июня 2006 г.)*. – М. : ВНИРО, 2006. – С. 183–186.
8. Гудакова А. А. Влияние хитозана на морфологию и стехиометрию кальций-фосфатных покрытий / [А. А. Гудакова, П. А. Павленко, Л. Ф. Суходуб,] // *IV Всеукраїнська науково-технічна конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Актуальні питання теоретичної і прикладної біофізики, фізики*

- і хімії. БФФХ – 2008» (21–26 квітня 2008 р., Севастополь): тези доп. – Севастополь : СевНТУ, 2008. – С. 145–148.
9. Гудакова А. А. Исследование динамики кристаллизации кальций-фосфатных покрытий методом растровой электронной микроскопии / [А. А. Гудакова, П. А. Павленко, Л. Ф. Суходуб] // XXII Российская конференция по электронной микроскопии ЭМ-2008 (2–6 июня 2008 г., Черноголовка): тезисы докл. – Москва : 2008. – С. 163.
10. Гудакова А. А. Исследование морфологии Са-Р-покрытий для имплантов, полученных методом термического осаждения в водном растворе на $Ti6Al4V$ субстратах / [А. А. Гудакова, Л. Ф. Суходуб, П. А. Павленко] // III Всеукраїнська науково-технічна конференція студентів, аспірантів і молодих вчених «Актуальні питання теоретичної і прикладної фізики і біофізики. Фізика. Біофізика – 2007» (23–28 квітня 2007 р., Севастополь): тези доп. – Севастополь : СевНТУ, 2007. – С. 121–124.
11. Гудакова А. А. Получение покрытий хитозан-гидроксиапатит на $Ti6Al4V$ субстратах / [А. А. Гудакова, Л. Ф. Суходуб, П. А. Павленко] // II Міжнародна конференція «Нанорозмірні системи: будова – властивості – технології» (21–23 листопада 2007 р., Київ): тези доп. – Київ, 2006. – С. 342.
12. Головань А. П. Математичне моделювання кінетики росту кристала гідроксиапатиту / А. П. Головань, І. В. Головань, Є. М. Дем'яненко // Поверхня. – 2010. – V. 2 (17). – Р. 51–62.
13. Данильченко С. Н. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения / С. Н. Данильченко // Вісник СумДУ. Фізика, математика, механіка. – 2007. – № 2. – С. 33–59.
14. Евдокимов И. А. Физико-химические характеристики растворов хитозана [Електронний ресурс] / И. А. Евдокимов, С. В. Василисин, Л. Р. Алиева и др. // Вестник СевГТУ. Серия «Продовольствие». – 2003. – № 1 (6). – Режим доступа: <http://www.ncstu.ru>.
15. Калинкевич А. Н. Идентификация кальций-фосфатных биоматериалов на основе характеристических ионов в масс-спектрах / А. Н. Калинкевич, С. Н. Данильченко,

- Л. Ф. Суходуб // Біофізичний Вісник. – 2011. – Т. 27 (2). – С. 103–110.
16. Калита В. И. Физика и химия формирования биоинертных и биоактивных поверхностей на имплантатах. Обзор / В. И. Калита // Физика и химия обработки материалов. – 2000. – № 5. – С. 28–45.
17. Каназава Т. Неорганические фосфатные материалы / Т. Каназава ; [перевод с англ. под ред. Акад. НАНУ А. П. Шпака и канд. физ.-мат. наук В. Л. Карбовского]. – Киев : Наукова думка, 1998. – 297 с.
18. Карлов А. В. Использование имплантатов с биоактивным покрытием при лечении переломов ослабленных костей // Человек и его здоровье: труды конгресса. – Санкт-Петербург, 1999. – С. 55.
19. Коновалова В. В. Исследование антимикробных свойств мембран, модифицированных хитозаном. Серия: Критические технологии / В. В. Коновалова, А. А. Побегай, М. Т. Брык, А. Ф. Бурбан // Мембраны. – 2006. – № 4 (32). – С. 56–61.
20. Крыжановская А. С. Низкотемпературный биомиметический рост поликристаллических покрытий гидроксиапатита кальция на титановых подложках / А. С. Крыжановская, Ю. Н. Савин, А. В. Толмачев // Доповіді Національної академії наук України. – 2003. – № 12. – С. 84–89.
21. Накамото К. ИК-спектры и спектры КР неорганических и координационных соединений / К. Накамото; [пер. с англ. Л. В. Христинко]; под ред. Ю. А. Пентина. – М. : Мир, 1991. – 536 с.
22. Ньюмен У. Минеральный обмен кости / У. Ньюмен, М. Ньюмен; [пер. с англ. под ред. проф. Н. И. Демина]. – М. : Иностранная литература, 1961. – 270 с.
23. Погорелов М. В. Матеріали для пластики кісткових дефектів – сучасний стан проблеми / М. В. Погорелов, С. М. Данільченко, О. В. Калінкевич та ін. // Вісник СумДУ, серія Медицина. – 2011. – № 1. – С. 52–65.
24. Салимжанова Е. В. Физико-химические и коррозионно-электрохимические свойства плазмонапылённых биоактивных

- покрытий титан-гидроксиапатит: дисс. канд. хим. наук : 02.00.05., 02.00.04 / Е. В. Салимжанова. – Саратов, 2003. – 186 с.
25. Сікора В. З., Погорелов М. В., Кореньков О. В. Персональне повідомлення.
26. Суходуб Л. Ф. Модифікація структури гідроксилапатиту йонами металів – компонентами медичних імплантів / Л. Ф. Суходуб, І. Ю. Кучма, Л. Б. Суходуб та ін. // *Annals of Mechnicov's Institute*. – 2005.– № 2. – С. 1–6.
27. Хенч Л. Биоматериалы, искусственные органы и инжиниринг тканей / Л. Хенч, Д. Джонс. — М. : Техносфера, 2007. — 304 с.
28. Яновська Г. О. Покриття для біомедичного призначення на основі гідроксиапатиту, хітозану та срібла / Г. О. Яновська, В. М. Кузнецов, О. С. Станіславов та ін. // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. – 2012. – Т. 3, № 3. – С. 346–351.
29. Adekogbe I. Fabrication and characterization of DTBP-crosslinked chitosan scaffolds for skin tissue engineering / I. Adekogbe, A. Ghanem // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 7241–7250.
30. Aimin C. Antibiotic loaded chitosan bar. An in vitro, in vivo study of a possible treatment for osteomyelitis / C. Aimin, H. Chunlin, B. Juliang et al. // *Clin. Orthop.* – 1999. – V. 366. – P. 239–247.
31. Albrektsson T. Tissue reactions to metallic biomaterials / T Albrektsson // *Implant bone interface*, Springer. – 1990.– P. 35–41.
32. 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. – V. 26. – № 1. – P. 77–80.
33. Amsden B. Diffusion characteristic of calcium alginate gels / B. Amsden, N. Turner // *Biotechnol. Bioeng.* – 1999. – № 65. – P. 605–610.
34. Anders A. Metal plasma immersion ion implantation and deposition: a review / A. Anders // *Surface & Coatings Technology*. – 1997. – V. 93. – P. 158–167.

35. Aoki H. Science and Medical Applications of Hydroxyapatite. Tokyo: Takayama Press System Center Co. – 1991.
36. ASTM F1501. Standard test method for tension testing of CaP coating. ASTM Standard F1501–95. Test Method for Tension Testing of Calcium Phosphate Coatings (Withdrawn 2000) [электронный ресурс] // ASTM International, West Conshohocken, PA, 2000, DOI: 10.1520/F1501–95. – Режим доступа: <http://astm.org/DATABASE.CART/WITHDRAWN/F1501.htm>
37. ASTM. Standard specification for composition of ceramic hydroxylapatite for surgical implants. – 1988. – V. F 1185–1188. – P. 514–515.
38. Badr N. A. Hydroxyapatite-Electroplated cp–Titanium Implant and Its Bone Integration Potentiality: An In Vivo Study / Nadia A. Badr, Amany A. El Hadary // Implant Dentistry. – 2007. – V. 16, №3. – P. 297–304.
39. Bai X. Functionally graded hydroxyapatite coatings doped with antibacterial components / X. Bai, K. More, C. M. Rouleau, A. Rabiei // Acta Biomater. – 2010. – V. 6. – P. 2264–2273.
40. Barbosa M. A. Surface layers and the reactivity of metallic implants. In: Muster D. editor / Barbosa M. A. // Biomaterials-Hard Tissue Repair and Replacement.– 1992. – P. 257 – 284.
41. Beevers C. A. The atomic structure of fluorapatite and its relation to that of tooth and bone mineral / C. A. Beevers, D. B. McIntyre // Miner Mag. – 1956. – V. 27. – P. 254–259.
42. Betts F. An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate / F. Betts, A. S. Posner // Mat Res Bull. – 1974. – V. 9. – P. 353–360.
43. Betts F. Structural model for amorphous calcium-phosphate / F. Betts, A. S. Posner // Trans. Am. Crystallodgr. Assoc. – 1974. – V. 10. – P. 73–84.
44. Bhattarai N. Chitosan-based hydrogels for controlled, localized drug delivery / N. Bhattarai, J. Gunn, M. Zhang // Adv. Drug Deliv. Rev. 2009. – 62 (1). – P. 83–99.
45. Blumenthal N. C. Inhibition of apatite formation by titanium and vanadium ions / N. C. Blumenthal, V. Cosma // J. Biomed. Mat. Res.: Applied Biomaterials. – 1989. – V.23, A1. – P.13–22.

46. Boddohi S. Polysaccharide-based polyelectrolyte complex nanoparticles from chitosan, heparin, and hyaluronan / S. Boddohi, N. Moore, P. A. Johnson, M. J. Kipper // *Biomacromolecules*. – 2009 – 10 (6). – P. 1402–1409.
47. Boistelle R. Fundamentals of nucleation and crystal growth. In: Carti N., Sato K., editors. *Crystallization and Polymorphism of Fats and Fatty Acids*. New York: Marcel Dekker, Inc. – 1988.
48. Boldeskul I. E. Ab initio modelling of calcium phosphate clusters and their vibrational spectra / I. E. Boldeskul, L. F. Sukhodub, A. N. Kalinkevich, V. D. Khavryutchenko // *Cond. Matter Physics*. – 2006. – V. 9, No. 4 (48). – P. 669–679.
49. Boriskina E. P. Influence of mineralization onto hydration and structural condition of collagen / E. P. Boriskina, M. A. Semenov, T. V. Bolbukh, L. B. Sukhodub, L. F. Sukhodub, V. Ya. Maleev // *Біофізичний вісник*. – 2007. – Т. 18, № 1. – С. 5–13.
50. Boskey A. L. Bone mineral crystal size / A. L. Boskey // *Osteoporos Int*. – 2003. – V. 14, Suppl 5. – P. 16–21.
51. Boskey A. L. Variations in bone mineral properties with age and disease / A. L. Boskey // *J. Musculoskel Neuron Interact.* – 2002. – V. 2 (6). – P. 532–534.
52. Bourgeois B. Calcium-deficient apatite: A first in vivo study concerning bone ingrowth / B. Bourgeois, O. Laboux, L. Obadia, O. Gauthier, E. Betti, E. Aguado, G. Dasulsi, J. M. Bouler // *J. Biomed. Mat. Res.* – 2003. – V. 65 (3). – P. 402–408.
53. Boyd A. R. Sputter deposition of calcium phosphate/titanium dioxide hybrid thin films / A. R. Boyd, H. Duffy, R. McCann, B. J. Meenan // *Materials Science and Engineering*. – 2008. – V. 28. – P. 228–236.
54. Bragg P. D. The effect of silver ions on the respiratory chain of *Escherichia coli* / P. D. Bragg, D. J. Rainnie // *Can. J. Microbiol.* – 1974. – V. 20. – P. 883–889.
55. Brik A. B. EPR of the impurity crystal phases in biominerals and their synthetic analogues / A. B. Brik, N. V. Ulyanchich, G. H. Kenner et al. // *Минералогический журнал*. – 2001. – Т. 23, № 1. – С. 23–37.

56. Browne M. Surface modification of titanium alloy implants / M. Browne, P. J. Gregson // *Biomaterials*. – 1994. – V. 15. – № 11. – P. 894–898.
57. Bugratashvili V. N. Macroparticle distribution and chemical composition of laser deposited coatings / V. N. Bugratashvili, E. N. Antonov, E. N. Sobol et al. // *Appl. Phys. Lett.* – 1995. – V. 66. – № 19. – P. 2451–2453.
58. Bumgardner J. D. Chitosan: potential use as a bioactive coating for orthopaedic and craniofacial/dental implants / J. D. Bumgardner, R. Wisner, P. D. Gerard, P. Bergin, B. Chestnutt, M. Marin, V. Ramsey, S. H. Elder, J. A. Gilbert // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2003. – V. 14. – P. 423–438.
59. Campbell A. A. Development, characterization, and antimicrobial efficacy of hydroxyapatite-chlorhexidine coatings produced by surface-induced mineralization / A. A. Campbell, L. Song, X. S. Li et al. // *J. Biomed. Mater. Res. (Appl. Biomater.)*. – 2000. – V. 53. – P. 400–407.
60. Carl D. R. Binding energies for the inner hydration shells of Ca^{2+} : An experimental and theoretical investigation of $\text{Ca}^{2+}(\text{H}_2\text{O})_x$ complexes ($x = 5-9$) / D. R. Carl, R. M. Moision, P. B. Armentrout // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2007. – V. 265. – P. 308–325.
61. Cazalbou S. Adaptative physico-chemistry of bio-related calcium phosphates / S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey // *J. Mat. Chem.* – 2004. – V. 14. – P. 2148–2153.
62. Chambers C. W. Bactericidal effect of low concentrations of silver / C. W. Chambers, C. M. Proctor, P. W. Kablar // *J. Am. Water. Works Assoc.* – 1962. – V. 54. – P. 208–216.
63. Chang M. C. Preparation of a porous hydroxyapatite/collagen nanocomposite using glutaraldehyde as a crosslinkage agent / M. C. Chang, T. Ikoma, M. Kikuchi, and J. Tanaka // *J. Mater. Sci. Lett.* – 2001. – V. 20. – P. 1199–1201.
64. Chang M. C. Preparation of hydroxyapatite-gelatin nanocomposite / M. C. Chang, C. Ko, and W. Douglas // *Biomater.* – 2003. – V. 24. – P. 2853–2862.
65. Chen T. S. Crystallization of ion beam deposited calcium phosphate / T. S. Chen, W. R. Lacefield // *J. Mater. Res.* – 1994. – V. 9. – P. 1284–1290.

66. Chen W. Antibacterial and osteogenic properties of silver-containing hydroxyapatite coatings produced using a sol gel process / W. Chen, S. Oh, A. P. Ong, et al. // *Journal of Biomedical Materials Research. Part A.* – 2007. – V. 82. – № 4. – P. 899–906.
67. Chen W. In vitro anti-bacterial and biological properties of magnetron co-sputtered silver-containing hydroxyapatite coating / W. Chen, Y. Liu, H. S. Courtney, et al. // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27. – № 32. – P. 5512–5517.
68. Chen Y. K. In Vitro Cytocompatibility of Silver-Containing Hydroxyapatite / Y. K. Chen, X. B. Zheng, B. Li et al. // *Coatings Materials Science Forum.* – 2009. – V. 620–622. – P. 567–570.
69. Cheng W. P. Using Chitosan as a Coagulant in Recovery of Organic Matters from the Mash and Lauter Wastewater of Brewery / W. P. Cheng, F. H. Chi, R. F. Yu, Y. C. Lee // *Journal of polymers and the Environment.* – 2005. – V. 13, № 4. – P. 383–388.
70. Cho G. Detection of hydroxyl ions in bone mineral by solid-state NMR spectroscopy / G. Cho, Y. Wu, J. L. Ackerman // *Science.* – 2003. – V. 300. – P. 1123–1127.
71. Christoffersen J. Kinetics of dissolution of calcium hydroxyapatite VI: the effect of some biologically important inhibitors / J. Christoffersen, M. R. Cristoffersen // *J. Crystal Growth.* – 1981. – V. 53. – P. 42–54.
72. Chung Y-C. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan / Y-C. Chung, C-Y. Antibacterial characteristics and activity of acid-soluble chitosan // *J. Bioresour. Technol.* – 2008. – 99 (8). – P. 2806–2814.
73. Chung Y. C. Relationship between antibacterial activity of chitosan and surface characteristics of cell wall / Y. C. Chung, Y. P. Su., C. C. Chen, G. Jia, H. L. Wang, J. C. Wu, J. G. Lin // *J. Acta Pharmacol. Sin.* – 2004. – 25 (7). – P. 932–936.
74. Cortes D. A. Spontaneous and biomimetic apatite formation on pure magnesium / D. A. Cortes, H. Y. Lopez, D. Mantovani // *Mater. Sci. Forum.* – 2007. – V. 539–543. – P. 589–594.
75. Cuneyt Tas A. Synthesis of biomimetic Ca-hydroxyapatite powders at 37°C in synthetic body fluids / A. Cuneyt Tas // *Biomaterials.* – 2000. – № 21. – P. 1429–1438.

76. D'iaz M. Synthesis and Antimicrobial Activity of a Silver-Hydroxyapatite Nanocomposite / Marcos D'iaz, Flora Barba, Miriam Miranda et al. // *Journal of Nanomaterials*. Hindawi Publishing Corporation. – 2009. – V. 11, № 55. – P. 498–505.
77. Dai Y. Effects of rare earth compounds on growth and apoptosis of leukemic cell lines In Vitro / Y. Dai, J. Li, L. Yu, G. Dai, A. Hu, L. Yuan // *Cell. Dev. Biol. Anim.* – 2002. – V. 38. – P. 373–375.
78. Danilchenko S. N. Chitosan-hydroxyapatite composite biomaterials made by a one step co-precipitation method: preparation, characterization and in vivo tests / S. N. Danilchenko, O. V. Kalinkevich, M. V. Pogorelov et al. // *Journal of Biological Physics and Chemistry*. – 2009. – V. 9. – P. 119–126.
79. Darimont G. L. In vivo behaviour of hydroxyapatite coatings on titanium implants: a quantitative study in the rabbit / G. L. Darimont, R. Cloots, E. Heinen et al. // *Biomaterials*. – 2002. – V. 23, № 12. – P. 2569–2575.
80. Dash M. Chitosan – a versatile semi-synthetic polymer in biomedical applications / M. Dash, F. Chiellini, R. M. Ottenbrite, E. Chiellini // *Progress in Polymer Science*. – 2011. – 36 (8). – P. 981–1014.
81. Davis J. R. Handbook of materials for medical devices / Davis J. R // *ASM International: Materials Park* – 2003. – 341 p.
82. De Groot K. Calcium phosphate coatings for medical implants / K. De Groot, J. G. C. Wolke, J. A. Jansen // *Proc. Inst. Mech. Eng. Part H: J. Eng. Med.* – 1998. – V. 212. – P. 137–147.
83. Denkena B. Degradable implants made of magnesium alloys / B. Denkena, F. Witte, C. Podolsky, A. Lucas // *Proc. of 5-th Euspen International Conference, May 2005. – Montpellier, France, 2005.* – P. 735–739.
84. Denuziere A. Chitosan-chondroitin sulfate and chitosan-hyaluronate polyelectrolyte complexes: biological properties / A. Denuziere, D. Ferrier, O. Damour, A. Domard // *Biomaterials*. – 1998. – 19 (14). – P. 1275–1285.
85. Di Martino A. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. Di Martino et al. // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 5983–5990.

86. Ding Y. Nano-Ag-loaded hydroxyapatite coatings on titanium surfaces by electrochemical deposition / Y. Ding, Y. Leng, X. Lu et al. // *J. R. Soc. Interface*. – 2010. – V. 29. – № 4. – P. 1–11.
87. Dornish M. Standards and guidelines for biopolymers in tissue-engineered medical products: ASTM alginate and chitosan standard guides / M. Dornish, D. Kaplan, O. Skaugrud // *Ann. NY Acad. Sci.* – 2001. – V. 944. – P. 388.
88. Dorozhkin S. V. Amorphous Calcium Orthophosphates: Nature, Chemistry and Biomedical Applications / Sergey V. Dorozhkin // *International Journal of Materials and Chemistry*. – 2012. – V. 2 (1). – P. 19–46.
89. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates / S. V. Dorozhkin // *J. Mater. Sci.* – 2007. – V. 42. – P. 1061–1095.
90. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates in nature, biology and medicine / S. V. Dorozhkin // *Materials*. – 2009. – V. 2. – P. 399–498.
91. Dorozhkin S. V. Medical application of calcium orthophosphate bioceramics / S. V. Dorozhkin // *BIO*. – 2011. – V. 1. – P. 1–51.
92. Dorozhkin S. V. Review. Calcium Orthophosphates as Bioceramics: State of the Art / Sergey V. Dorozhkin // *J. Funct. Biomater.* – 2010. – V. 1. – P. 22–107.
93. Drynda A. Rare earth metals used in biodegradable magnesium-based stents do not interfere with proliferation of smooth muscle cells but do induce the upregulation of inflammatory genes / A. Drynda, N. Deinet, N. Braun, M. Peuster // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2009. – V. 91. – P. 360–369.
94. Du W. L. Antibacterial activity of chitosan tripolyphosphate nanoparticles loaded with various metal ions / W. L. Du, S. S. Niu, Y. L. Xu, Z. R. Xu, C. L. Fan // *Carbohydrate Polymers*. – 2009. – 75 (3). – P. 385–389.
95. Ducheyne P. Calcium phosphate ceramic coatings on porous titanium: effect of structure and composition on electrophoretic deposition, vacuum sintering and in vitro dissolution / P. Ducheyne, S. Radin, M. Heughebaert, J. C. Heughebaert // *Biomaterials*. – 1990. – V. 11 (4). – P. 244–254.

96. Dutour Sikirić M. The influence of surface active molecules on the crystallization of biominerals in solution / M. Dutour Sikirić, H. Fűredi-Milhofer // *Adv. Colloid surface science.* – 2006. – V. 128. – P. 135–158.
97. Eichert D. Preliminary characterization of calcium chemical environment in apatitic and non-apatitic calcium phosphates of biological interest by X-ray absorption spectroscopy / D. Eichert, M. Salomé, M. Banu et al. // *Spectrochim. Acta B.* – 2005. – V. 60.– P. 850–858.
98. Eiselt P. Porous carriers for biomedical applications based on alginate hydrogels / P. Eiselt, J. Yeh, R. K. Latvala et al. // *Biomaterials* – 2000. – № 21. – P. 1921–1927.
99. Elliott J. C. Structure and Chemistry of the Apatites and Other Calcium Orthophosphates / James Cornelis Elliott. – Amsterdam–London–New York–Tokyo: Elsevier, 1994. – 489 p. – (Studies in inorganic chemistry).
100. Eppell S. J. Shape and size of isolated bone minerals measured using atomic force microscopy / S. J.Eppell, W. Tong, L. T. Katz, M. J. Glimcher // *J.Orthop.Res.* – 2001. – V. 19. – P. 1027–1034.
101. Ergun C. Hydroxylapatite and titanium: Interfacial reactions / C. Ergun, R. Doremus, W. Lanford // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2003. – V. 65 A. – P. 336–343.
102. FDA draft. Calcium phosphate (Ca-P) coating draft guidance for preparation of FDA submissions for orthopedic and dental endosseous implants. Food and Drug Administration. – 1997. – P. 1–14.
103. Feyerabend F. In vitro corrosion and cytocompatibility of two magnesium alloys / F. Feyerabend, N. Hort, F. Witte, K. U. Kainer, R. Willumeit // *Regenerative Med.* – 2007. – V. 2. – P. 612–617.
104. Fowler B. O. Infrared Studies of Apatites. I: vibrational assignment for calcium, strontium and barium hydroxyapatite utilizing isotopic substitution / B. O. Fowler // *Inorganic Chemistry.* – 1974. – V. 13, № 1. – P. 194–207.
105. Fritsch H.-W. Application of ²⁵²Cf plasma desorption mass spectrometry in dental research / H.-W. Fritsch, L. Schmidt, P. Köhl et al. // *International Journal of Mass Spectrometry and Ion Processes.* – 1993. – V. 126. – P. 191–196.

106. Gauthier O. Kinetic study of bone ingrowth and ceramic resorption associated with implantation of different injectable calcium phosphate bone substituted / O. Gauthier, J. M. Bouter, P. Weiss, J. Bosco, E. Aguado // *J. Biomed. Mat. Res.* – 1999. – V. 47 (1). – P. 28–35.
107. Ge Z. Hydroxyapatite-chitin materials as potential tissue engineered bone substitutes / Z. Ge, S. Baguenard, L.Y. Lim et al. // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 1049–1058.
108. Georgalis Y. Cluster formation in aqueous electrolyte solutions observed by dynamic light scattering / Y. Georgalis, A. M. Kierzek, W. Saenger // *J. Phys. Chem. B.* – 2000. – V. 104. – P. 3405–3406.
109. Ghumman C. A. A. Identification of human calculi with time-of-flight secondary ion mass spectrometry / C. A. A. Ghumman, O. M. T. Carreira, A. M. C. Moutinho [et al.] // *Rapid Commun. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 24. – P. 185–190.
110. Glimcher M. J. Bone: Nature of the Calcium Phosphate crystals and cellular structural, and physical chemical mechanisms in their formation / M.J.Glimcher // *Mineralogy&Geochemistry.* – 2006. – V. 64. – P. 223–282.
111. Gomes M. E. Alternative tissue engineering scaffolds based on starch: processing methodologies, morphology, degradation and mechanical properties / M. E. Gomes, J. S. Godinho, D. Tchalamov et al. // *Mater. Sci. Eng. C.* – 2002. – V. 20. – P. 19–26.
112. Gross K. A. Biomedical Application of Apatites / K.A. Gross, C.C. Berndt// In Kohn M. J., Rakovan J., Hughes J. M. (eds) *Phosphates: geochemical, geobiological and materials importance. Series: Reviews in mineralogy and geochemistry, Mineralogical Society of America, Washington, DC.*– 2002. – V. 48. – P. 631–672.
113. Gross K. A. In vitro testing of plasmasprayed hydroxyapatite coatings / K. A. Gross, C. C. Berndt // *J. Mater. Science.* – 1994. – V. 5. – P. 219–224.
114. Guibal E. Interactions of metal ions with chitosan-based sorbents: a review / E. Guibal // *J. Sep. Purif. Technol.* – 2004. – 38 (1). – P. 43–74.
115. Haihong L. Influence of titanium ions on mineral formation and properties of osteoid nodules in rat calvaria cultures /

- Liao Haihong, Wurtz Tilmann, Li Jianguo // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – P. 220–227.
116. Han J. Alginate-chitosan/hydroxyapatite polyelectrolyte complex porous scaffolds: Preparation and characterization / J. Han, Z. Zhou, R. Yin et al. // *Intern. J. Biol. Macrom.* – 2010. – № 46. – P. 199–205.
117. Han Y. Characterization and stability of hydroxyapatite coatings prepared by electrodeposition and alkaline-treatment process / Y. Han, T. Fu, J. Lu, K. Xu // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – V. 54 (1). – P. 96–101.
118. Hanawa T. Titanium and its oxide film: A substrate for formation of apatite / T. Hanawa. — Toronto: University of Toronto Press, 1991. – P. 49–61. – (The Bone-Biomaterial Interface) (Ed. Davies J.E.).
119. Harries J. E. Conversion of amorphous calcium phosphate into hydroxyapatite investigated by EXAFS spectroscopy / J. E. Harries, D. W. L. Hukins, C. Holt, S. S. Hasnain // *J. Cryst. Growth.* – 1987. – V. 84. – P. 563–570.
120. Haynes D. R. The differences in toxicity and release of bone-resorbing mediators induced by titanium and cobalt-chromium-alloy wear particles / D. R. Haynes, S. D. Rogers, S. Hay, M. J. Pearcy, D. W. Howie // *J. Bone Joint Surg. Am.* – 1993. – V. 75. – P. 825–834.
121. Hench L. L. Biomaterials. An Interfacial Approach / L. L. Hench, E. C. Ethridge. – New York : Academic Press., 1982. – 117 p.
122. Heughebaert J. C. Conversion of amorphous tricalcium phosphate into apatitic tricalcium phosphate / J. C. Heughebaert, G. Montel // *Calcif. Tiss. Int.* – 1982. – V. 34. – P. 101–108.
123. Hiromoto S. Precipitation control of calcium phosphate on pure magnesium by anodization / S. Hiromoto, T. Shishido, A. Yamamoto et al. // *Corros. Sci.* – 2008. – V. 50. – P. 2906–2913.
124. Hiromoto S. High corrosion resistance of magnesium coated with hydroxyapatite directly synthesized in an aqueous solution / Sachiko Hiromoto, Akiko Yamamoto // *Electrochimica Acta.* – 2009. – V. 54. – P. 7085–7093.

125. Hiromoto S. Hydroxyapatite coating of AZ31 magnesium alloy by a solution treatment and its corrosion behavior in NaCl solution / Sachiko Hiromoto, Masanari Tomozawa // *Surface and Coatings Technology*. – 2011. – V. 205 (19). – P. 4711–4719.
126. Hodge A. J. Molecular models illustrating the possible distributions of “holes” in simple systematically staggered arrays of Type I collagen molecules in native-type fibrils / A. J. Hodge // *Connect Tissue Res*. – 1989. – V. 21. – P. 137–147.
127. Hodge A. J. Recent studies with the electron microscopy on ordered aggregates of the tropocollagen macromolecules / A. J. Hodge, J. A. Petruska // *Aspects of Protein Structure*. Ramachandran G.N. New York: Academic Press. – 1963. – P. 289–300.
128. Holt C. Amorphous calcium phosphates prepared at pH 6.5 and 6.0 / C. Holt, M. J. van Kemenade, L. S. Nelson, et al. // *Mater. Res. Bull.* – 1989. – V. 23. – P. 55–62.
129. Hort N. Magnesium alloys as implant materials – Principles of property design for Mg–RE alloys. / N. Hort et al. // *Acta Biomaterialia* – 2010. – V. 6. – P. 1714–1725.
130. Hu S. G. Protein adsorption, fibroblast activity and antibacterial properties of poly(3-hydroxybutyric acid-co-3-hydroxyvaleric acid) grafted with chitosan and chitooligosaccharide after immobilized with hyaluronic acid / S. G. Hu, C. H. Jou, M. C. Yang // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24. – P. 2685–2693.
131. Hughes J. M. and Rakovan J. The Crystal Structure of Apatite, $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{F},\text{OH},\text{Cl})$ / J. M. Hughes, J. Rakovan, M. J. Kohn, J. Rakovan, J. M. Hughes. – Washington : Mineralogical Society of America, 2002. – V. 48. – P. 1–12. (Phosphates: geochemical, geobiological and materials importance. Series: Reviews in mineralogy and geochemistry).
132. Ignatius A. Tissue engineering of bone: effects of mechanical strain on osteoblastic cells in type I collagen matrices / A. Ignatius, H. Blessing, A. Liedert et al. // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 311–318.
133. Il'ina A. V. Chitosan-based polyelectrolyte complexes: a review / A. V. Il'ina, V. Varlamov // *Appl. Biochem. Microbiol.* – 2005. – 41 (1). – P. 10–16.

134. Ito A. In vitro biocompatibility, mechanical properties, and corrosion resistance of Ti-Zr-Nb-Ta-Pd and Ti-Sn-Nb-Ta-Pd alloys / A. Ito, Y. Okazaki, T. Tateishi, Y. Ito // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1995. – V. 29 – P. 893–899.
135. Jaworska M. Influence of chitosan characteristics on polymer properties. I: Crystallographic properties / M. Jaworska, K. Sakurai, P. Gaudon, E. Guibal // *Polymer International.* – 2003. – V. 52, № 2. – P. 198–205.
136. JCPDS – International Center for Diffraction Data .Powder diffraction file 1-40. – 1990.
137. Je J.Y. Chitosan derivatives killed bacteria by disrupting the outer and inner membrane / J. Y. Je, S. K. Kim // *J. Agric. Food Chem.* – 2006. – 54 (18). – P. 6629–6633.
138. Jiang T. Surface functionalization of titanium with chitosan/gelatin via electrophoretic deposition: characterization and cell behavior / T. Jiang, Z. Zhang, Y. Zhou, Y. Liu, Z. Wang, H. Tong, X. Shen, Y. Wang // *Biomacromolecules.* – 2010. – 11 (5). – P. 1254–1260.
139. Jones F. H. Teeth and bones: applications of surface science to dental materials and related biomaterials / F. H. Jones // *Surface science reports.* – 2001. – V.42, № 3–5. – P. 75–206.
140. Kanzaki N. Calcium phosphate clusters / N. Kanzaki, G. Treboux, K. Onuma, [et al.] // *Biomaterials.* – 2001. – V. 22. – P. 2921–2929.
141. Kaplan F. S. Form and Functions of Bone, in *Orthopaedic basic science* / F. S. Kaplan, W. C. Hayes, T. M. Keaveny et al. – Rosemont: American Academy of Orthopaedic Surgeons.,1994. – 127 p.
142. Kay M. I. Crystal structure of hydroxyapatite / M. I. Kay, R. A. Young and A. S. Posner // *Nature.*–1964. – V. 204. – P. 1050–1052.
143. Kester M. A. Influence of thickness of the mechanical properties and bond strength of HA coatings applied to orthopaedic implants / M. A. Kester, M. T. Manley, S. K. Taylor, R. C. Cohen // *Annual Orth. Res. Society*, 4–7 of March 1991. : proceedings of the 37-th conference. – 1991. – P.16–95.

144. Kim In-Yong Chitosan and its derivatives for tissue engineering applications / In-Yong Kim, Seog-Jin Seo, Hyun-Seuk Moon et al. // *Biotechnology Advances*. – 2008. – V. 26. – P. 1–21.
145. Kim Y. M. Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature / Y. M. Kim, M. J. Glimcher // *J. Bone Miner. Res.* – 1995. – V. 10. – P. 1589–1601.
146. Klein C. P. Biodegradation behavior of various calcium phosphate materials in bone tissue / C. P. Klein, A. A. Driessen, K. de Groot, A. van den Hooff // *J. Biomed Mater Res.* – 1983. – V. 17. – P. 769–784.
147. Klein C. P. A. T. Calciumphosphate implant materials and biodegradation: thesis / C. P. A. T. Klein – The Netherlands: Vrije University, 1983. – P. 1–119.
148. Klug H. P. Diffraction Procedures / H. P. Klug, L. E. Alexander // *Wiley Interscience X-Ray*. Edition.2. – 1974.
149. Kokubo T. Ca, P-rich layer formed on high-strength bioactive glass-ceramic / T. Kokubo, S. Ito, Z. T. Huang et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1990. – V. 24. – P. 331–343.
150. Kokubo T. Solutions able to reproduce in vivo surface-structure changes in bioactive glass-ceramic / T. Kokubo, H. Kushitani, S. Sakka et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1990. – V. 24. – P. 721–734.
151. Kokubo T. Spontaneous formation of bonelike apatite layer on chemically treated titanium metals / T. Kokubo, F. Miyaji, H. M. Kim // *J. Am. Ceram. Soc.* – 1996. – V. 79. – P. 1127–1129.
152. Koutsoukos P. Crystalization of calcium phosphates. A constant composition study/ P. Koutsoukos, Z. Amjad, M. B. Tomson, G. H. Nancollas // *J. Am. Chem. Soc.* – 1980. – V. 102 (5). – P. 1553–1557.
153. Krause C. Mechanical properties of degradable magnesium implants in dependence of the implantation duration / C. Krause (Pekguleryuz MO, Mackenzie LWF, editors. *Magnesium technology in the global age*). – Montreal: CIM, 2007. – P. 329–343.
154. Kuroda K. Effect of ion concentration and pH on hydroxyapatite deposition from aqueous solution onto titanium by

- the thermal substrate method / K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido, O. Tokai // *J. Biomed. Mat. Res.* – 2002. – V. 61. – P. 354–359.
155. Kuroda K. Formation and osteoconductivity of hydroxyapatite/collagen composite films using a thermal substrate method in aqueous solutions / K. Kuroda, M. Moriyama, R. Ichino et al. // *Materials Transactions.* – 2009. – V. 50 (5). – P. 1190–1195.
156. Kuroda K. Hydroxyapatite coatings on a 3D porous surface using thermal substrate method / K. Kuroda, S. Nakamoto, R. Ichino et al. *Materials Transactions.* – 2005. – V. 46 (7). – P. 1633–1635.
157. Kuroda K. Hydroxyapatite coatings on titanium by thermal substrate method in aqueous solution / K. Kuroda, R. Ichino, M. Okido, O. Tokai // *J. Biomed. Mat. Res.* – 2002. – V.59. – P. 390–397.
158. Kuroda K. Preparation of calcium phosphate coatings on titanium using the thermal substrate method and their in vitro evaluation / K. Kuroda, Y. Miyashita, R. Ichino, M. Okido, O. Takai // *Materials Transactions.* – 2002. – V. 43 (12). – P. 3015–3019.
159. Landis W. J. The strength of a calcified tissue depends in part on the molecular structure and organization of its constituent mineral crystals in their organic matrix / W. J. Landis // *Bone.* – 1995. – V. 16. – P. 533–544.
160. Layani J. D. Carbonated hydroxyapatites precipitated in the presence of Ti / J. D. Layani, I. Mayer, F. J. G. Cuisiner // *J. Inorg. Biochem.* – 2000. – V. 81. – P. 57–63.
161. Leach J. B. Characterization of protein release from photocrosslinkable hyaluronic acid – polyethylene glycol hydrogel tissue engineering scaffolds / J. B. Leach, C. E. Schmidt // *Biomaterials.* – 2005. – V. 26. – P. 125–235.
162. Leadley S. R. Investigation of the dissolution of the bioceramic hydroxyapatite in the presence of titanium ions using TOF-SIMS and XPS / S. R. Leadley, M. C. Davies, C. Castro Ribeiro, M. A. Barbosa, A. J. Paul, J. F. Watts // *Biomaterials.* – 1997. – № 18. – P. 311 – 316.
163. Lebugle A. Effect of structure and composition on the thermal decomposition of calcium phosphates (Ca/P = 1.33) / A. Lebugle, E. Zahidi, G. Bonel // *React Solids.* – 1986. – V. 2. – P. 151–161.

164. Lee J. Hydroxyapatite coating on Ti plate by a dipping method / J. Lee, H. Aoki // *Bio-Medical materials and Engineering*. – 1995. – V. 5. – № 2. – P. 49–58.
165. Lee J.Y. Enhanced bone formation by controlled growth factor delivery from chitosan-based biomaterials / J. Y. Lee, S. H. Nam, S. Y. Im, Y. J. Park, Y. M. Lee, Y. J. Seol, C. P. Chung, S. J. Lee // *J. Control Release*. – 2002. – V. 78. – P. 187–197.
166. Leeuwenburgh S. C. G. Mechanical properties of porous, electrosprayed calcium phosphate coatings / S. C. G. Leeuwenburgh, J. G. C. Wolke, L. Lommen et al. // *J. Biomed. Mater. Res. A*. – 2006. – V. 78 (3). – P. 558–569.
167. Legeros R. Structure and composition of the mineral phase of periosteal bone / R. Legeros, N. Balmain and G. Bonel // *J. Chem. Res.* – 1986. – V. 1 (8). – P. 8–9.
168. Legeros R. Z. Properties of osteoconductive biomaterials: calcium phosphates / R. Z. Legeros // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 2002. – № 395. – P. 81–98.
169. LeGeros R. Z. Variations in composition and crystallinity of hydroxyapatite (HA) preparations: papers from symposium : Characterization and performance of calcium phosphate coatings for implants / R. Z. LeGeros, R. Zheng, R. Kijkowska et al. – USA: Miami, 1994. – P. 43–53.
170. León B. Thin Calcium Phosphate Coatings for Medical Implants / Betty León, John A. Jansen. – Springer Science : Business Media, LLC, 2009. – 326 p.
171. Li Jinlong Structural characterization of titanium oxide layers prepared by plasma based ion implantation with oxygen on Ti6Al4V alloy / Jinlong Li, Mingren Sun, Xinxin Ma // *Applied Surface Science*. – 2006. – V. 252. – P. 7503–7508.
172. Li X. Demineralized bone matrix gelatin as scaffold for osteochondral tissue engineering / X. Li, L. Jin, G. Balian, C.T. Laurencin et al. // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27. – P. 2426–2433.
173. Li Z. Chitosan – alginate hybrid scaffolds for bone tissue engineering / Z. Li, H.R. Ramay, K.D. Hauch, D. Xiao et al. // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 3919–3928.
174. Li Zi-jian The development of binary Mg-Ca alloys for use as biodegradable materials within bone / Li Zi-jian, Gu Xu-nan,

- Lou Si-quan, Zheng Yu-feng. // *Biomaterials* – 2008. – V. 29 (10). – P. 1329–1344.
175. Lian Q. Fabrication and in vitro evaluation of calcium phosphate combined with chitosan fibers for scaffold structures / Q. Lian, D. Li, Z. Jin, J. Wang, A. Li, Z. Wang, Z. Jin // *J. Bioact. Compat. Polym.* – 2009. – 24 (1). – P. 113–124.
176. Lind M. M. Improved bone anchorage of hydroxyapatite coated implants in trabecular bone in dogs / M. M. Lind, S. Overgaard, C. Bunker, K. Soballe // *Biomater.* – 1999. – V. 20. – P. 803–808.
177. Liu Dongxia Coating of hydroxyapatite films on metal substrates by seeded hydrothermal deposition / Dongxia Liu, Keith Savino, Matthew Z. Yates // *Surface & Coatings Technology.* – 2011. – V. 205. – P. 3975–3986.
178. Liu H. Chitosan kills bacteria through cell membrane damage / H. Liu, Y. Du, X. Wang, L. Sun // *Int. J. Food Microbiol.* – 2004. – 95 (2). – 147–155.
179. Loong C. K. Evidence of Hydroxyl-Ion Deficiency in Bone Apatites: An Inelastic Neutron-Scattering Study / C. K. Loong, C. Rey, L. T. Kuhn et al. // *Bone.* – 2000. – V.26. – P. 599–602.
180. Madhally S. V. Porous chitosan scaffolds for tissue engineering / S. V. Madhally, H. W. T. Matthew // *Biomaterials.* – 1999. – V. 20. – P. 1133 – 1142.
181. Manjubala I. Bioactivity and osseointegration study of calcium ceramic of different chemical composition / L. Manjubala, M. Sivakumar, R. V. Sureshkumar, T. P.Sastry // *J. Biomed. Mat. Res.* – 2002. – V. 63 (2). – P. 200–208.
182. Manso M. Electrodeposition of hydroxyapatite coatings in basic conditions / M. Manso, C. Jiménez, C. Morant et al. // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 1755–1761.
183. Mao J. S. A preliminary study on chitosan and gelatin polyelectrolyte complex cytocompatibility by cell cycle and apoptosis analysis / J. S. Mao, Y. L. Cui, X. H. Wang et al. // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 3973–3981.
184. Mark P. S. Magnesium and its alloys as orthopedic biomaterials: A review / P. S. Mark, M. P. Alexis, H. Jerawala, D. George // *Biomaterials.* – 2006. – V. 27 (9). – P. 1728–1734.

185. Martino A.D. Chitosan: a versatile biopolymer for orthopaedic tissue-engineering / A. D. Martino, V. Sitting, M. V. Risbud // *Biomaterials*. – 2005. – 26 (30). – P. 5983–5990.
186. Michalkova A. Theoretical study of adsorption of tabun on calcium oxide clusters / A. Michalkova, Y. Pauku, D. Majumdar, J. Leszczynski // *Chem. Phys. Lett.* – 2007. – V. 438. – P. 72–77.
187. Miller L. M. A method for examining the chemical basis for bone disease: Synchrotron infrared microspectroscopy / L. M. Miller, S. C. Carlson, G. L. Carr, M. R. Chance // *Cellular and Molecular Biology*. – 1998. – V. 44. – P. 117–128.
188. Modrzejewska Z. Determination of hydrogel chitosan membrane structure / Z. Modrzejewska, W. Maniukiewicz, A. Wojtasz-Pająk // *Polish Chitin Society, Monograph XI*. – 2006. – P. 114–115.
189. Moussa S. H. Evaluation of fungal chitosan as a biocontrol and antibacterial agent using fluorescence-labeling / S. H. Moussa, A. A. Tayel, A. I. Al-Turki // *Int. J. Biol. Macromol.* – 2013. – V. 54. – P. 204–208.
190. Müller Frank A. Preferred growth orientation of biomimetic apatite crystals / Frank A. Müller, Lenka Müller, Daniel Caillard, Egle Conforto // *Journal of Crystal Growth*. – 2007. – V. 304. – P. 464–471.
191. Muzzarelli R. A. Stimulatory effect on bone formation exerted by a modified chitosan / R. A. Muzzarelli, M. Mattioli-Belmonti, C. Tiez et al // *Biomaterials*. – 1994. – V. 15. – P. 1075–1081.
192. Nair L. S. Silver nanoparticles: synthesis and therapeutic applications / L. S. Nair, C. T. Laurencin // *J. Biomed. Nanotechnol.* – 2007. – V. 3. – № 26. – P. 301–316.
193. Niinomi M. Review. Recent research and development in titanium alloys for biomedical applications and healthcare goods / Mitsuo Niinomi // *J. Science and Technology of Advanced Materials*. – 2003. – V. 4. – P. 445–454.
194. Noda I. Next Generation Antibacterial Hydroxyapatite Coating: Antibacterial Activity of Ag Ions in Serum / I. Noda, F. Miyaji, Y. Ando et al. // *Bioceramics Development and Applications*. – 2011. – V. 1. – P. 101–102.

195. Nygren H. TOF-SIMS analysis of the interface between bone and titanium implants – effect of porosity and magnesium coating / H. Nygren, C. Eriksson, K. Hederstierna, P. Malmberg // *Appl. Surf. Sci.* – 2008. – V. 255. – P. 1092–1095.
196. Okido M. Kuroda K. Ichino R. Formation of calcium phosphate film on Ti substrate in aqueous solutions in the control of temperature and ion activity / M. Okido, K. Kuroda., R. Ichino // *Materials Science Forum.* – 2003. – V. 426–432. – P. 3457–3462.
197. Ong J. L. Hydroxyapatite and their use as coatings in dental implants: A review / J. L. Ong, D. C. N. Chan // *Critical Reviews in Biomedical Engineering.* – 2000. – V. 28, №5–6. – P. 667–707.
198. Ong J. L. Structure, Solubility and Bond Strength of Thin Calcium Phosphate Coatings Produced by Ion Beam Sputter Deposition / J. L. Ong, L. C. Lucas, W. R. Lacefield, E. D. Rigney // *Biomaterials.* – 1992. – V. 9. – P. 249–254.
199. Onuma K. Recent research on pseudobiological hydroxyapatite crystal growth and phase transition mechanisms / K. Onuma // *Progr. in Cryst. Growth Character. Mater.* – 2006. – V. 52. – P. 223–245.
200. Overgaard S. The influence of crystallinity of the hydroxyapatite coating on the fixation of implants. Mechanical and histomorphometric results / S. Overgaard, U. Bromose, M. Lind et al. // *J. Bone Joint Surg. (Br).* – 1999. – V. 81. – P. 725–731.
201. Paschalis E. P. Degradation potential of plasma-sprayed hydroxyapatite-coated titanium implants / E. P. Paschalis, Q. Zhao, B. E. Tucker et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1995. – V. 29. – P. 1499–1505.
202. Pasteris J. D. Lack of OH in nanocrystalline apatite as a function of degree of atomic order: implication for bone and biomaterials / J. D. Pasteris, B. Wopenka, J. J. Freeman et al. // *Biomaterials.* – 2004. – V. 25. – P. 229–238.
203. Peterson M. M. Changes in bone mineral density of the distal femur following uncemental total knee arthroplasty/ M. M. Peterson, C. Nielsen, J. B. Lauritzen, B. Lund // *J. Arthroplasty.* – 1995. – V. 10 (1). – P. 7–11.

204. Pham M. T. Surface induced reactivity for titanium by ion implantation / M. T. Pham, H. Reuther, W. Matz et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2000. – V. 11. – P. 383–391.
205. Pichugin V. F. The preparation of calciumphosphate coatings on titanium and nickel–titanium by rf-magnetron-sputtered deposition: Composition, structure and micromechanical properties / V. F. Pichugin, R. A. Surmenev, E. V. Shesterikov et al. // *Surface & Coatings Technology.* – 2008. – V. 202. – P. 3913–3920.
206. Pilipenko V. V. Hydroxyapatites precipitated in the presence of titanium and cobalt: XRD investigations/ V. V. Pilipenko, L. B. Sukhodub, C. Moseke, O. Boelling, L. F. Sukhodub, B. Sulkiocleff // *Мінералогічний журнал.* – 2003. – Т. 25, №1. – С. 85–90.
207. Pilipenko V. V. Titanium-containing hydroxyapatites: XRD investigations / V. V. Pilipenko, L. B. Sukhodub, C. Moseke, L. F. Sukhodub and B. Sulkiocleff // *Proceedings of Kharkov State University, Biophysical Bulletin.* – 2002. – V. 568, № 2 (11). – P. 124–127.
208. Posner A. S. Formation and structure of synthetic and bone hydroxyapatites / A. S. Posner, F. Betts, N. C. Blumenthal // *Prog. Cryst. Growth. Charact. Mater.* – 1980. – V. 3. – P. 49–64.
209. Puleo D. A. Osteoblast responses to orthopedic implant materials in vitro / D. A. Puleo, L. A. Holleran, R. H. Doremus, R. Bizios // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1991. – V. 25. – P. 711–723.
210. Rai M. Silver nanoparticles as a new generation of antimicrobials / M. Rai, A. Yadav, A. Gade // *J. Biotechnol. Adv.* – 2009. – 27 (1). – P. 76–83.
211. Redepenning J. Electrochemical preparation of chitosan/hydroxyapatite composite coatings on titanium substrate / J. Redepenning, G. Venkataraman, J. Chen, N. Stafford // *J. Biomed. Mat. Res. A.* – 2003. – V. 66. – P. 411–416.
212. Rey C. Calcium phosphate biomaterials and bone mineral. Differences in composition, structures and properties / C. Rey // *Biomaterials.* – 1990. – V. 11. – P. 13–15.
213. Rey C. Hydroxyl groups in bone mineral / C. Rey, J. L. Miquel, L. Facchini et al. // *Bone.* – 1995. – V.16. – P. 583–586.

214. Rohanizadeh R. Adherent apatite coating on titanium substrate using chemical deposition / R. Rohanizadeh, R. Z. LeGeros, M. Harsono, A. Bendavid // *J. Biomed. Mater. Res. A.* – 2005. – V. 72. – P. 428–438.
215. Saalfeld U. Solubility behavior of synthetic hydroxyapatites in aqueous solution: influence of amorphous constituents on pH value / U. Saalfeld, N. M. Meenen, T. T. Jures, H. Saalfeld // *Biomaterials.* – 1994. – V. 15. – №11. – P. 905–908.
216. Santerre J. P. Understanding the biodegradation of polyurethanes: from classical implants to tissue engineering materials / J. P. Santerre, K. Woodhouse, G. Laroche, R. S. Labow // *Biomaterials.* – 2005. – V. 26. – P. 7457–7470.
217. Saraswathy G. A novel bio-inorganic bone implant containing deglued bone, chitosan and gelatin / G. Saraswathy, S. Pal, C. Rose, T. P. Sastry. // *Bull. Mater. Sci.* –2001. – V. 24, № 4. – P. 415–420.
218. Schmedlen R. H. Photocrosslinkable polyvinyl alcohol hydrogels that can be modified with cell adhesion peptides for use in tissue engineering / R. H. Schmedlen, K. S. Masters, J. L. West // *Biomaterials.* – 2002. – V. 23. – P. 4325–4332.
219. Schofield P. F. The role of hydrogen bonding in the thermal expansion and dehydration of brushite, di-calcium phosphate dihydrate / P. F. Schofield, K. S. Knight, J. A. M. van der Houwen, E. Valsami-Jones // *Physics and Chemistry of Minerals.* – 2004. – V. 31, №9. – P. 606–624.
220. Seeherman H. A review of preclinical program development for evaluating injectable carriers for osteogenic factors / H. Seeherman, R. Li, J. Wozney // *J. Bone. Joint. Surg. Am.* – 2003. – 85–A (Suppl 3). – P. 96–108.
221. Seol Y. J. Chitosan sponges as tissue engineering scaffolds for bone formation / Y. J. Seol, J. Y. Lee, Y. J. Park, Y. M. Lee, K. Young, I. C. Rhyu, S. J. Lee, S. B. Han, C. P. Chung // *Biotechnol. Lett.* – 2004. – 26 (13). – P. 1037–1041.
222. Serekian P. Process application of hydroxylapatite coatings. Hydroxylapatite coatings in orthopaedic surgery / P. Serekian; [Editors: Geesink R.T.G., Manley M.T.] – New York: Raven Press, 1993. – P. 81–87.

223. Shi D. Bioactive Ceramics: Structure, Synthesis, and Mechanical Properties, in Introduction to biomaterials / D. Shi, X. Wen. – Beijing, China, Singapore, Hackensack, NJ : Tsinghua University Press. World Scientific, 2006. – P. 13.
224. Shi D. The effect of structural characteristics on the in vitro bioactivity of hydroxyapatite / D. Shi, G. Jian, J. Bauer // J. Biomed. Mat. Res. – 2002. – V. 63 (2).-P. 71-78.
225. Shigeo A. Review. Crystal orientation of non-magnetic materials by imposition of a high magnetic field / Shigeo Asai, Kensuke Sassa, Masahiro Tahashi // Science and Technology of Advanced Materials. – 2003. – V. 4. – P. 455–460.
226. Søballe K. Hydroxyapatite ceramic coating for bone implant fixation. Mechanical and histological studies in dogs / K. Søballe // Acta Orthop. Scand. – 1993. – V. 64. – P. 1–58.
227. Song Guang-ling Control of biodegradation of biocompatible magnesium alloys / Guang-ling Song // Corros. Sci. – 2007. – V. 49 (4). – P. 1696–1701.
228. Song Y. Electrodeposition of Ca–P coatings on biodegradable Mg alloy: In vitro biomineralization behavior / Yang Song, Shaoxiang Zhang, Jianan Li et al. // Acta Biomaterialia. – 2010. – V. 6. – P. 1736–1742.
229. Song Y. W. Electrodeposition of hydroxyapatite coating on AZ91D magnesium alloy for biomaterial application / Y. W. Song , D. Y. Shan, E. H. Han // Materials Letters. – 2008 – V. 62, № 9. – P. 3276–3279.
230. Steinemann S. G. Corrosion of titanium alloys for surgical implants. In: Titanium -Science and Technology/ Steinemann S. G., Eds. G. Lutjering, U. Zwicker and W. Bunk // Deutsche Gesellschaft for Metallkunde. – 1985.– V. 2. – P. 1373–1379.
231. Sugiyama T. The control of crystal orientation in Non-magnetic Metals by Imposition of a High Magnetic Field / Tsubasa Sugiyama, Masahiro Tahashi, Kensuke Sassa, Shigeo Asai // ISIJ International. – 2003. – V. 43 (6). – P. 855–861.
232. Sugiyama T. Surface observation of thin hydroxyapatite-coated implants at 80 months after insertion / Tetsuya Sugiyama, Yasuo Miake, Yasutomo Yajima et al. // Journal of Oral Implantology. – 2011. – V. 37, № 2. – P. 273–278.

233. Sukhodub L. B. Improved thermal substrate method with cooling system for hydroxyapatite coatings on titanium substrates / L. B. Sukhodub, C. Moseke, L. F. Sukhodub et al. // Annual Report, Institut für Kernphysik, Westfälische Wilhelmsuniversität Münster. – 2002/2003. – P. 86–88.
234. Sukhodub L. F. Characterization and identification of hydroxyapatites obtained from aqueous solutions in presence of titanium ions by time-of-flight PDMS / L. F. Sukhodub, V. V. Pilipenko, C. Moseke, A. N. Kalinkevich, L. B. Sukhodub, O. Boelling, B. Sulkio-Cleff // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 2002. – V.4. – P. 126–128.
235. Sukhodub L. F. Properties of Hydroxylapatite Coating for Biological Implants Deduced from Complementary Instrumental Methods / L. F. Sukhodub, C. Moseke, A. B. Brik, O. Boeling, B. Sulkio-Cleff // Mineralogical Journal. – 2001. – V. 23. – № 5/6. – P. 65–74.
236. Sukhodub L. F. XRD-investigation of the hydroxyapatite structure affected by metal ions/ L. F. Sukhodub, V. V. Pilipenko, C. Moseke, O. Boelling, B. Sulkio-Cleff // Reports of the National Academy of Sciences of Ukraine. – 2002. - № 5. – P. 121–123.
237. Sukhodub L. F. Nanocomposite apatite-biopolymer materials and coatings for biomedical applications / L. F. Sukhodub, G. O. Yanovska, L. B. Sukhodub, V. M. Kuznetsov, O. S. Stanislavov // J. Nano- Electron. Phys. – 2014; 6 (1): id01001.
238. Sun L. Review: Material fundamentals and clinical performance of plasma sprayed hydroxyapatite coatings / L. Sun, C. C. Berndt, K. A. Gross, A. Kucuk // J. Biomed. Mater. Res. Appl. Biomater. – 2001. – V. 58. – P. 570–592.
239. Suzuki T. Surface instability of calcium phosphate ceramics in tissue culture medium and the effect on adhesion and growth of anchorage-dependent animal cells / T. Suzuki, T. Yamamoto, M. Toriyama et al. // J. Biomed. Mater. Res. – 1997. – V. 34. – P. 507–517.
240. Thamaraiselvi T. V. Synthesis of hydroxyapatite that mimic bone minerology / T. V. Thamaraiselvi, K. Prabakaran, S. Rajeswari // Trends Biomater. Artif. Organs. – 2006. – V. 19 (2). – P. 81–83.

241. The Mineralogy Database [электронный ресурс]. — Режим доступа: <http://webmineral.com/data/Brushite.shtml>
242. Thomas V. Fabrication, characterization of chitosan/nanosilver film and its potential antibacterial application / V. Thomas, M. Yallapu, S. B. Mohan, S. K. Bajpai // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* – 2009. – 20 (14). – P. 2129–2144.
243. Tomozawa M. Growth mechanism of hydroxyapatite-coatings formed on pure magnesium and corrosion behavior of the coated magnesium / Masanari Tomozawa, Sachiko Hiromoto // *Applied Surface Science.* – 2011. – V. 257 (19). – P. 8253–8257.
244. Tong W. Size and shape of minerals in young bovine bone measured by atomic force microscope / W. Tong, M. J. Glimcher, L. T. Katz, S. J. Eppell // *Calcif. Tissue Int.* – 2003 – V. 72. – P. 592–598.
245. Torrisi A. ToF-SIMS images and spectra of biomimetic calcium silicate-based cements after storage in solutions simulating the effects of human biological fluids / A. Torrisi, V. Torrisi, N. Tuccitto et al. // *Int. J. Mass Spectrom.* – 2010. – V. 289. – P. 150–161.
246. Tsuchida E. Interactions between macromolecules in solution and intermacromolecular complexes / E. Tsuchida, K. Abe // *Adv. Polym. Sci.* – 1982. – 45. – P. 1–119.
247. Tsui Y.C. Plasma sprayed hydroxyapatite coatings on titanium substrates Part 1: Mechanical properties and residual stress levels / Y. C. Tsui, C. Doyle, T. W. Clyne // *Biomaterials.* – 1998. – V. 19. – P. 2015–2029.
248. Uchida Y. Antibacterial activity by chitin and chitosan / Y. Uchida // *Food Chemical.* – 1998. – V. 2. – P. 22–29.
249. Vijayalakshmi U. Preparation and Characterization of Microcrystalline Hydroxyapatite Using Sol Gel Method / U. Vijayalakshmi, S. Rajeswari // *Trends Biomater. Artif. Organs.* – 2006. – V. 19 (2). – P. 57–62.
250. Wang B. C. The shear strength and the failure mode of plasma-sprayed hydroxyapatite coating to bone: the effect of coating thickness / B. C. Wang, T. M. Lee, E. Chang, C. Y. Yang // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1993. – V. 27. – P. 1315–1327.

251. Wang C. Ab initio interionic potentials for CaO by multiple lattice inversion / C. Wang, S. Zhang, N.-X. Chen // *J. Alloys Compounds*. – 2005. – V. 388. – P. 195–207.
252. Wang C. G. Crystallization at multiple sites inside particles of amorphous calcium phosphate / C. G. Wang, J. W. Liao, B. D. Gou et al. // *Cryst. Growth Des.* – 2009. – V. 9. – P. 2620–2626.
253. Wang J. Preparation and characterization of electrodeposited calcium phosphate/chitosan coating on Ti6Al4V plates / J. Wang, J. de Boer, K. de Groot // *J. Dent. Res.* – 2004. – V. 83. – P. 296–301.
254. Wang R. Z. Synthesis of nanophase hydroxyapatite/collagen composite / R. Z. Wang, F. Z. Cui, H. B. Lu et al. // *J. Mater. Sci. Lett.* – 1995. – V. 14. – P. 490–492.
255. Wang Y. Fabrication of a novel porous PGA–chitosan hybrid matrix for tissue engineering / Y. Wang, M. Lin, D. Wang, H. Hsieh // *Biomaterials*. – 2003. – V. 24 – P. 1047–1057.
256. Warra A. A. Transition metal complexes and their application in drugs and cosmetics. A Review / A. A. Warra // *J. Chem. Pharm. Res.* – 2011. – V. 3, № 4. – P. 951–958.
257. Wen C. Characterization and degradation behavior of AZ31 alloy surface modified by bone–like hydroxyapatite for implant applications / C. Wen, S. Guan, L. Peng et al. // *Appl. Surf. Sci.* – 2009. – V. 255. – P. 6433–6438.
258. Wen H. B. Preparation of calcium phosphate coatings on titanium implant materials by simple chemistry / H. B. Wen, J. R. de Wijn, F. Z. Cui, K. de Groot // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1998. – V. 41. – P. 227–236.
259. Weng J. Thermal decomposition of hydroxyapatite structure induced by titanium and its dioxides / J. Weng, X. Liu, X. Zhang // *J. Mater. Sci. Lett.* – 1994. – V. 13. – P. 157–161.
260. Weng W. Alkoxide Route for Preparing Hydroxyapatite and Its Coatings / W. Weng, J. L. Baptista // *Biomaterials*. – 1998. – V. 19. – P. 125–131.
261. Weng W. Sol–gel preparation of bioactive apatite films / W. Weng, S. Zhang, K. Cheng et al. // *Surface and Coatings Technology*. – 2003. – V. 167. – P. 292–296.

262. Williams J. M. Bone tissue engineering using polycaprolactone scaffolds fabricated via selective laser sintering / J. M. Williams, A. Adewunmi, R. M. Schek et al. // *Biomaterials*. – 2005. – V. 26. – P. 4817–4827.
263. Witte F. Cartilage repair on magnesium scaffolds used as a subchondral bone replacement / F. Witte et al. // *Materialwissenschaft und Werkstofftechnik*. – 2006. – V. 37. – P. 504–508.
264. Witte F. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion / F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K.U. Kainer, R. Willumeit et al. // *Curr. Open Solid State Mater. Sci.* – 2008. – V. 12. – P. 63–72.
265. Witte F. In vitro and in vivo corrosion measurements of magnesium alloys / F. Witte et al. // *Biomaterials*. – 2006. – V. 27. – P. 1013–1018.
266. Witte F. In vivo corrosion of four magnesium alloys and the associated bone response / F. Witte, V. Kaese, H. Haferkamp, E. Switzer, A. Meyer-Lindenberg, C. J. Wirth // *Biomaterials* – 2005. – V. 26. – P. 3557–3563.
267. Witte F. Magnesium–hydroxylapatite composite: a novel approach to degradable biomaterials / F. Witte et al. // *Biomaterials* – 2007. – V. 28. – P. 2163–2174.
268. Witte F. The history of biodegradable magnesium implants: a review / Frank Witte // *Acta Biomaterialia* – 2010. – V. 6. – P. 1680–1692.
269. Witte F. Degradable biomaterials based on magnesium corrosion. / F. Witte, N. Hort, C. Vogt, S. Cohen, K.U. Kainer, R. Willumeit // *Curr. Open Solid State Mater. Sci.* – 2008. – V. 12. – P. 63–72.
270. Wolke J. G. C. In vivo dissolution behavior of various RF magnetron-sputtered Ca-P coatings on roughened titanium implants / J. G. C. Wolke, J. P. C. M. van der Waerden, H.G. Schaeken et al. // *Biomaterials*. – 24 (15). – 2003. – V. 24. – P. 2623–2629.
271. Wong T. W. Chitosan and its Use in Design of Insulin Delivery System / T. W. Wong // *Recent Patents on Drug Delivery & Formulation*. – 2009. – V. 3. – P. 8–25.

272. Wopenka B. A. mineralogical perspective on the apatite in bone / B.A. Wopenka, J.D. Pasteris // *Material science and engineering*. – 2005. – V. C25. – P. 5131–5143.
273. Xiao Bai Processing and Characterization of Functionally Graded Hydroxyapatite Coatings for Biomedical Implants: A dissertation submitted to the Graduate Faculty of North Carolina State University in partial fulfillment of the requirements for the degree of Doctor of Philosophy / Xiao Bai. – North Carolina : Mechanical Engineering Raleigh, 2009. – 221 p.
274. Xin Y. Corrosion behavior of biomedical AZ91 magnesium alloy in simulated body fluids / Y. Xin, C. Liu, X. Zhanget et al. // *J. Mater. Res.* – 2007. – V. 22, № 7. – P. 2004–2011.
275. Xin Y. Influence of aggressive ions on the degradation behavior of biomedical magnesium alloy in physiological environment / Yunchang Xin, Kaifu Huo, Hu Tao et al. // *Acta Biomaterialia*. – 2008. – V. 4. – P. 2008–2015.
276. Xu L.P. In vivo corrosion behavior of Mg–Mn–Zn alloy for bone implant application. / L.P. Xu, G.N. Yu, E. Zhang, F. Pan // *Biomed. Mater. Res. A* – 2007. – V. 83. – P. 703–711.
277. Yang J. X. Modification of degradation behavior of magnesium alloy by IBAD coating of calcium phosphate / J. X. Yang, Y. P. Jiao, F. Z. Cui et al. // *Surf. Coat. Technol.* – 2008. – V. 202. – P. 5733–5736.
278. Yanovska A. A. Silver-doped hydroxyapatite coatings formed on Ti-6Al-4V substrates and their characterization / A. A. Yanovska, A. S. Stanislavov, L. B. Sukhodub, V. N. Kuznetsov, V. Yu. Illiashenko, S. N. Danilchenko, L. F. Sukhodub // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* – 2014. – V. 36. – P. 215–220.
279. Yin Y. J. Properties of polyelectrolyte complex films of chitosan and gelatin / Y. J. Yin, K. D. Yao, G. X. Cheng, J. B. Ma // *Polym. Int.* – 1999. – V. 48 (6). – P. 429–432.
280. Yonekura Y. Osteoconductivity of thermal-sprayed silver-containing hydroxyapatite coating in the rat tibia / Y. Yonekura, H. Miyamoto, T. Shimazaki et al. // *J. Bone Joint. Surg. Br.* – 2011. – V. 93, № 5. – P. 644–649.

281. Yoshinari M. Properties of hydroxyapatite-coated Ti-6Al-4V alloy produced by the ion-plating method / M. Yoshinari, K. Ozeki, T. Sumii // *Bull. Tokyo Dent. Coll.* – 1991. – V. 32. – P. 147–156.
282. Yoshinari M. The biocompatibility (cell culture and histological study) of hydroxy-apatite-coated implants created by ion beam dynamic mixing / M. Yoshinari, B. Klinge, T. Dérand // *Clin. Oral Impl. Res.* – 1996. – V. 7. – P. 96–100.
283. Yoshinari M. Thin hydroxyapatite coating produced by the ion beam dynamic mixing method / M. Yoshinari, Y. Ohshiro, T. Dérand // *Biomaterials.* – 1994. – V. 15 (7). – P. 529–535.
284. Yumik O. N. Differences in behavior among the chlorides of seven rare earth elements administered intravenously to rats / O. N. Yumik, T. Yukari, T. Yasuhide, I. Yoshio // *Fundam. Appl. Toxicol.* – 1997. – V. 37 (2). – P. 106–116.
285. Yun Yeoheung Revolutionizing biodegradable metals / Yeoheung Yun, Zhongyun Dong, Namheon Lee et al. // *Materials Today.* – 2009. – V. 12, № 10. – P. 22–32.
286. Zeng H. XPS, EDX and FTIR analysis of pulsed laser deposited calcium phosphate bioceramic coatings: the effects of various process parameters / Zeng H., Lacefield W. R. // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 23–30.
287. Zeng R. Progress and challenge for magnesium alloys as biomaterials / R. Zeng, W. Dietzel, F. Witte, N. Hort, C. Blawert // *Adv. Eng. Mater.* – 2008. – V. 10. – P. 803–814.
288. Zhang Chun-yan Preparation of calcium phosphate coatings on Mg-1.0Ca alloy / Chun-yan et al. // *Trans. Nonferrous Met. Soc. China.* – 2010. – V. 20. – P. 655–659.
289. Zhang Er-lin Microstructure, mechanical properties and bio-corrosion properties of Mg-Zn-Mn-Ca alloy for biomedical application / Er-lin Zhang, Yang Lei // *Mater. Sci. Eng. A* – 2008. – V. 497 (12). – P. 111–118.
290. Zhang X. S. In vivo biocompatibility and mechanical study of novel bone-bioactive materials for prosthetic implantation / X. S. Zhang, P. A. Revell, S. L. Evans et al. // *J. Biomed. Mater. Res.* – 1999. – V. 46. – P. 279–286.

291. Zhang Y. Calcium phosphate-chitosan composite scaffolds for bone tissue engineering / Y. Zhang, M. Ni, M. Zhang, B. Ratner // *Tissue Eng.* – 2003. – V. 9 (2). – P. 337–345.
292. Zhang Y. Calcium phosphate/chitosan composite scaffolds for controlled in vitro antibiotic drug release/ Y. Zhang, M. Zhang // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – 62 (3). – P. 378–386.
293. Zhang Y. Synthesis and characterization of macroporous chitosan/calcium phosphate composite scaffolds for tissue engineering / Y. Zhang, M. Zhang // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2001. – V. 55 (3). – P. 304–312.
294. Zhang Y. Three-dimensional macroporous calcium phosphate bioceramics with nested chitosan sponges for load-bearing bone implants / Y. Zhang, M. Zhang // *J. Biomed. Mater. Res.* – 2002. – V. 61 (1). – P. 1–8.
295. Zhang Y. Controlling the biodegradation rate of magnesium using biomimetic apatite coating / Y. Zhang, G. Zhang, M. Wei // *J. Biomed. Mater. Res. B.* – 2008. – V. 89. – P. 408–414.
296. Zhang Y. The synergetic bone-forming effects of combinations of growth factors expressed by adenovirus vectors on chitosan/collagen scaffolds / Yufeng Zhang et al. // *J. Control. Release.* – 2009. – V. 136 (3). – P. 172–178.
297. Zhao Q. Development and evaluation of electroless Ag-PTFE composite coatings with anti-microbial and anti-corrosion properties / Q. Zhao, Y. Liu, C. Wang // *Appl. Surf. Sci.* – 2005. – V. 252. – P. 1620–1627.
298. Zheng X. Bond strength of plasma-sprayed hydroxyapatite/Ti composite coatings / X. Zheng, M. Huang, C. Ding // *Biomaterials.* – 2000. – V. 21. – P. 841–849.
299. Zhitomirsky I. Chitosan-hydroxyapatite nanocomposite coatings for biomedical applications / Igor Zhitomirsky, Xin Pang // *ECS Trans.* – 2007. – V. 3, № 26. – P. 15–22.
300. Zhu W. Surface energetics of hydroxyapatite: a DFT study / W. Zhu, P. Wu // *Chem. Phys. Lett.* – 2004. – V. 396 (1). – P. 38–42.
301. Zimmermann H. Towards a medically approved technology for alginate-based microcapsules allowing long-term immunisolated transplantation / H. Zimmermann, D. Zimmermann, R. Reuss et al. // *J. Mater. Sci. Mater. Med.* – 2005. – V.16 (6). P. 491–501.



СУХОДУБ Леонід Федорович – член-кореспондент НАН України, відомий біофізик-експериментатор. Упродовж 40 років працює в галузях молекулярної біофізики, молекулярної фізики та біомолекулярної інженерії. Засновник двох нових експериментальних фізичних методик – температурно-залежної польової мас-спектрометрії) та

низькотемпературного кварцового резонатора, за допомогою яких уперше у світі була вивчена енергетика утворення біологічних асоціатів у вакуумі, що моделюють структурні блоки ДНК, РНК та їх іонно-гідратне оточення (Sukhodub L. F., Yanson I. K. Mass spectromic studies of binding energies for nitrogen bases of nucleic acids in vacuo // Nature. – 1976. – Vol. 264. – P. 245–247). Упродовж останніх років був започаткований Л. Ф. Суходубом ще один напрямок досліджень, а саме синтез і вивчення структури та складу нових наноструктурованих біоматеріалів на основі фосфатів кальцію та природних біополімерів, що обумовлено недостатністю знань про особливості мінералізації в нормі й патології живих тканин для ефективного впливу на ці процеси. Він є автором і співавтором 3 монографій і більше ніж 200 наукових праць, серед яких 12 оглядів у таких виданнях, як «Biopolymers», «Chemical Review», «Mass Spectrometry Review», «Journal of Nano- and Electronic Physics», «Биофизика», «Биополимеры и клетка», «Український біохімічний журнал» тощо.