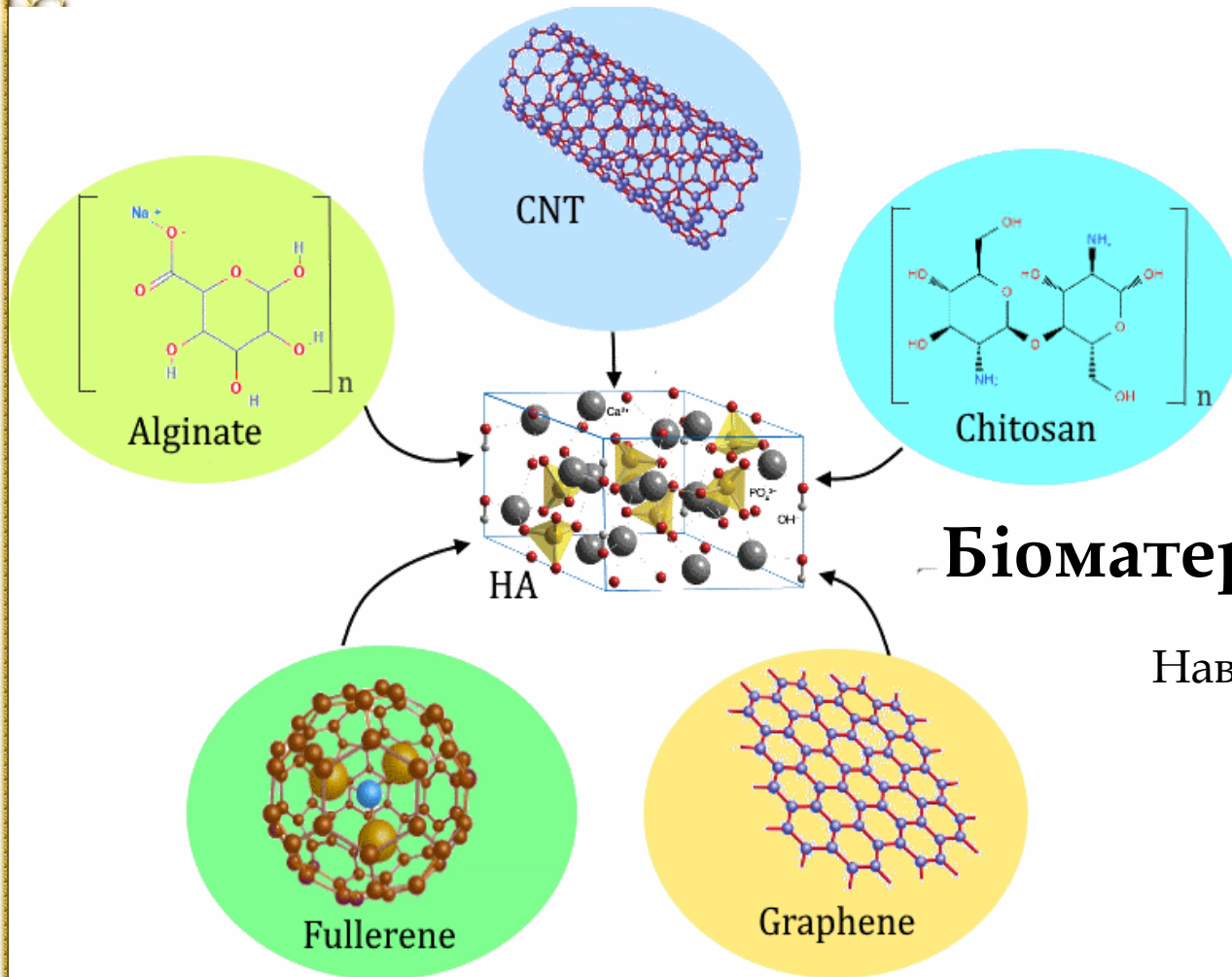


Л. Ф. Суходуб



Біоматеріали та покриття

Навчальний посібник

Міністерство освіти і науки України
Сумський державний університет

Л. Ф. Суходуб

Біоматеріали та покриття

Навчальний посібник

Рекомендовано вченою радою Сумського державного університету



Суми
Сумський державний університет
2020

УДК 618.314+616.7-089.843:615.462(075.8)

C91

Рецензенти:

О. Д. Погребняк – доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач кафедри наноелектроніки Сумського державного університету;

І. В. Прокопович – доктор технічних наук, директор Інституту медичної інженерії Одеського національного політехнічного університету

*Рекомендовано до видання
вченою радою Сумського державного університету
як навчальний посібник
(протокол № 5 від 12 грудня 2019 року)*

Суходуб Л. Ф.

C91 Біоматеріали та покриття : навчальний посібник / Л. Ф. Суходуб. – Суми : Сумський державний університет, 2020. – 300 с.
ISBN 978-966-657-805-4

Навчальний посібник містить інформацію про стан досліджень у сфері сучасних біоматеріалів і покриттів, зокрема розробок у лабораторії «Біонаноккомпозит» СумДУ.

Для студентів спеціальності 163 «Біомедична інженерія» спеціалізації «Біоматеріали» закладів вищої освіти III–IV рівнів акредитації.

УДК 618.314+616.7-089.843:615.462(075.8)

ISBN 978-966-657-805-4

© Суходуб Л. Ф., 2020

© Сумський державний університет, 2020

ЗМІСТ

Передмова.....	4
Лекція 1. Біомедична інженерія на сучасному етапі.....	6
Лекція 2. Основи хімії твердого тіла.....	26
Лекція 3. Біомінералізація і біоматеріали.....	67
Лекція 4. Найважливіші біоматеріали і принципи їх утворення.....	115
Лекція 5. Окремі випадки біомінералізації.....	140
Лекція 6. Композитні біоматеріали.	165
Лекція 7. Властивості гібридних матеріалів на основі HA-ZNO, вбудованих у матрицю альгінату.....	208
Лекція 8. Покриття.....	230
Лабораторні роботи.....	293
Післямова.....	294
Список умовних скорочень.....	295
Глосарій.....	296
Перелік деяких нещодавніх власних (Scopus) публікацій з анотаціями.....	297
Основні джерела.....	299

ПЕРЕДМОВА

Два роки тому на факультеті ЕЛІТ СумДУ (кафедра наноелектроніки) відкрилася нова спеціальність 163 «Біомедична інженерія» за освітньою програмою «Біомедичні прилади та системи». Як відомо, «Біомедична інженерія» визнана Радою Європи стратегічним напрямком економічного і соціального розвитку найбільш успішних держав. Суть цієї спеціальності в поєднанні традиційної медицини і точних наук, таких як молекулярна та клітинна біологія, біохімія, біофізика, математика, інженерія та матеріалознавство. Серед основних навчальних дисциплін зазначеної програми є напрямок, пов'язаний із сучасними біонаноматеріалами, а саме методами їх отримання, вивчення структури та складу, біосумісності й антимікробних властивостей, також можливості їх використання як носіїв лікарських засобів.

Найбільший сегмент ринку біоматеріалів у світі становлять *кісткові* матеріали. В Україні тільки за напрямом ендопротезування кульшових суглобів ринок оцінюється у 100 млн євро на рік, а задовольняється всього на 15 % і майже 90 % із цих 15 – дорога імпортована продукція. Тому головною метою цього навчального посібника є у вигляді лекцій-презентацій ознайомлення майбутніх біомедичних інженерів зі станом розробок сучасних біоматеріалів нового покоління, зокрема розробок апатит-біополімерних нанокompозитів лабораторії «Біонанокompозит» СумДУ, створеної у 2012 році за підтримки ректора, професора А. В. Васильєва, для практичної біомедицини. Інша мета – показати перспективність умов діяльності в цій сфері для талановитої молоді для їх самореалізації у вітчизняних наукових колективах.

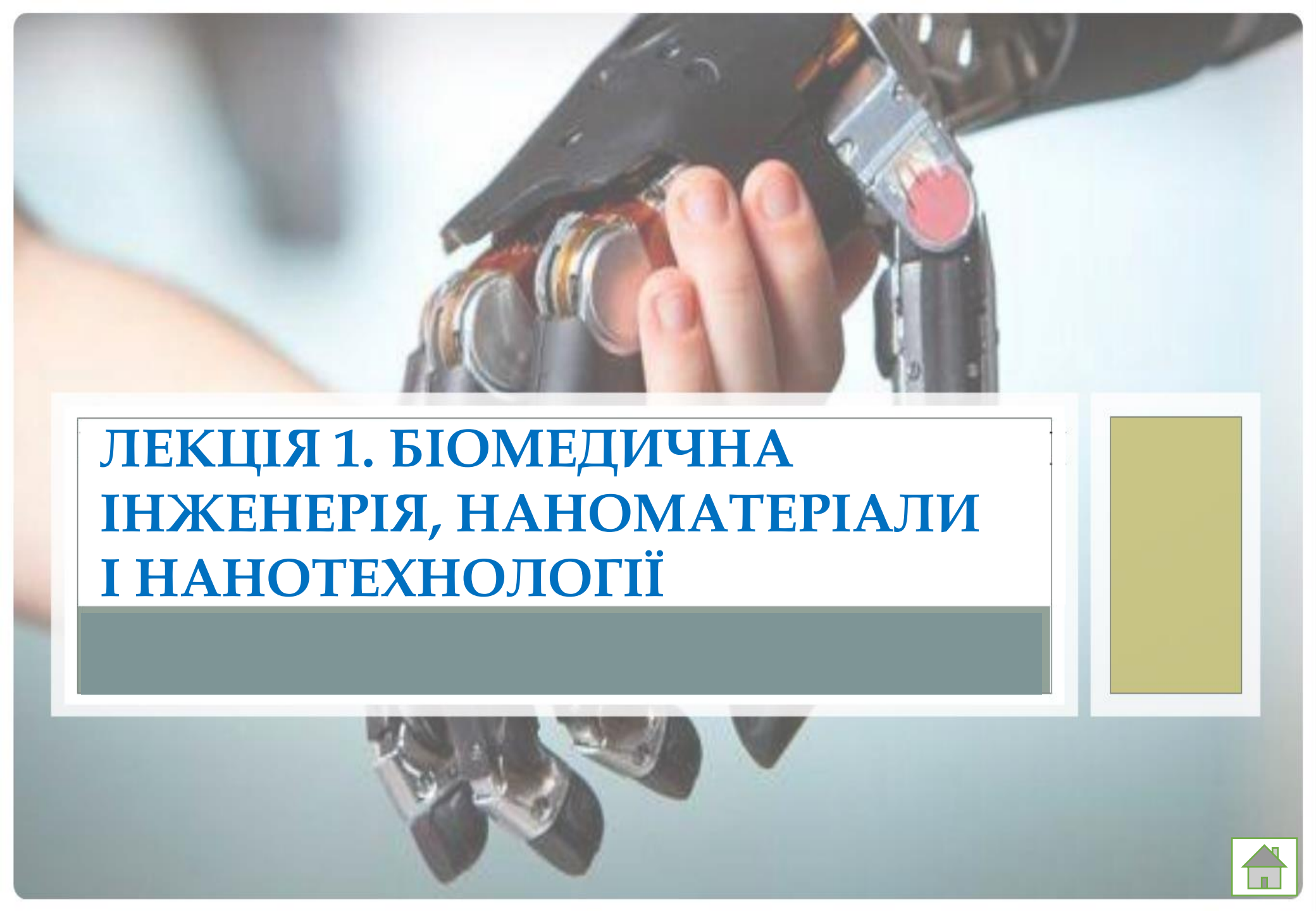
Кістка – це складна природна тканина, що складається з органічної фази, у яку вбудовані нанокристали фосфату кальцію. За вагою кістка містить близько 30 % органічної фази, 60 % – мінералу (гідроксиапатит-ГА), 9 % – води, а решта – білки та інші важливі молекули та іони. Органічна матриця – це переважно колаген (тип I), що відповідає за міцність на розрив. Мінеральна компонента кісткової тканини відповідає за міцність на стискання. Існує 2 типи кісткової тканини: кортикальна (компактна) і губчаста (трабекулярна). Компактна кістка має модуль Юнга (модуль еластичності) у межах 17–20 ГПа та міцність на стиск в межах 131–224 МПа, тоді як для трабекулярних кісток – 50–100 МПа та 5–10 МПа відповідно.

Пристрої для фіксації та відновлення кісток традиційно виготовляють із металів (нержавіюча сталь, титан і його сплави, інші металеві сплави), які широко застосовуються в клінічній практиці. Водночас, ці пристрої і імплантати не є біодеградованими і тому часто потребують повторних операцій для їхнього видалення з організму. Це не лише збільшує термін госпіталізації і фінансові витрати пацієнтів, а й імовірність отримання інфекцій і інших ускладнень. Також через невідповідність механічних властивостей імплантатів і природної кістки механічні навантаження утримуються імплантатами, а не кістковою тканиною, яка відновлюється. Це явище відомо як «стресовий захист» (“stress shielding”), результатом якого є небажана резорбція кістки і втрата імплантату.

Найкращими кістковими заміниками вважаються матеріали біологічного походження: *аутокістка*, *алокістка* і *ксенокістка* [1]. Аутокістка – матеріал видалений у того ж самого пацієнта, має всі характеристики, необхідні для формування нової кісткової тканини, а саме – остеокондуктивність (матриця для кісткоутворення), остеогенезність (наявність стовбурних клітини, детермінованих на певний тип клітин) і остеоіндуктивність (здатність подання сигналів для індукції остеогенної диференціації локальних стовбурових клітин). Інші біологічні джерела (алокістка – з людини-донора; ксенокістка – з тварин) також використовують з певним успіхом як кісткові замітники для відновлення та регенерації пошкоджених тканин.

Використання *синтетичних* матеріалів (*алопластів*) в імплантаційній хірургії – це ще один спосіб відновлення пошкоджених і втрачених кісткових тканин. З погляду деградації матеріали умовно поділені на 2 групи: *біоінертні* та *біодеградовані*. Біоінертні матеріали широко застосовуються в клінічній практиці, тому що не викликають утворення фіброзної тканини, але й не стимулюють остеогенез [1]. Завдяки інертності ці матеріали можуть перебувати в організмі дуже довго до їх видалення хірургічно, що є недоліком.

Головним стимулом для подальшого пошуку біодеградованих матеріалів є **потреба** в нових матеріалах із властивостями, які відповідають біохімічним та біомеханічним вимогам тканинної інженерії. *Основна концепція* полягає в тому, що такий біоматеріал-замісник виконує функцію матриці (scaffold) для навколишньої тканини / клітин для їх поглинання, росту і, внаслідок цього, управлінням регенерацією тканин до формування нових кісток, і після *in vivo* деградації бути вивільненим з організму. Тому біодеградовані біоматеріали активно досліджуються, оскільки імплантати на їх основі не потребують хірургічного видалення як у разі металевих імплантатів.

A close-up photograph of a person's hand holding a prosthetic hand. The prosthetic is dark grey and black, with a prominent red circular sensor on the back of the hand. The background is blurred, showing a person in a light blue shirt.

ЛЕКЦІЯ 1. БІОМЕДИЧНА ІНЖЕНЕРІЯ, НАНОМАТЕРІАЛИ І НАНОТЕХНОЛОГІЇ



Приклади деяких проривів, які змінюють якість життя:

Рентгенівські апарати (XRM). Ця столітня технологія дозволяє бачити зламані кістки, зуби, порожнини всередині людського тіла неінвазивним способом. Комп'ютерна томографія (КТ) і магнітно-резонансна томографія (МРТ) є варіаціями XRM. Принцип томографії (і в тому, і в іншому разі) полягає в пошаровому скануванні органа з подальшим виведенням зображення на комп'ютерний монітор. КТ заснована на використанні рентгенівського випромінювання і здійснює в 15 разів більше опромінення ніж звичайна рентгенографія. МРТ працює на постійному і пульсівному магнітних полях і є абсолютно нешкідливою.

Електрокардіографи (ECG) ще одна столітня технологія, яка контролює роботу серця за різних станів пацієнта (відпочинок, тренування тощо).

Нанотехнології. НЧ – крихітні (мкм, нм) частинки, які використовують як для діагностики, так і лікування різних патологій, зокрема раку на клітинному рівні. НЧ використовують для переносу барвників до малих ділянок як контрастні речовини для виявлення пухлин, а також для прямого лікування раку, а не всього тіла.

Редагування генома. CRISPR (2015-NP) – короткі полідромні повтори, регулярно розташовані групами (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) – послідовності в ДНК бактерій, які з асоційованими генами забезпечують захист клітин від чужорідних генів.



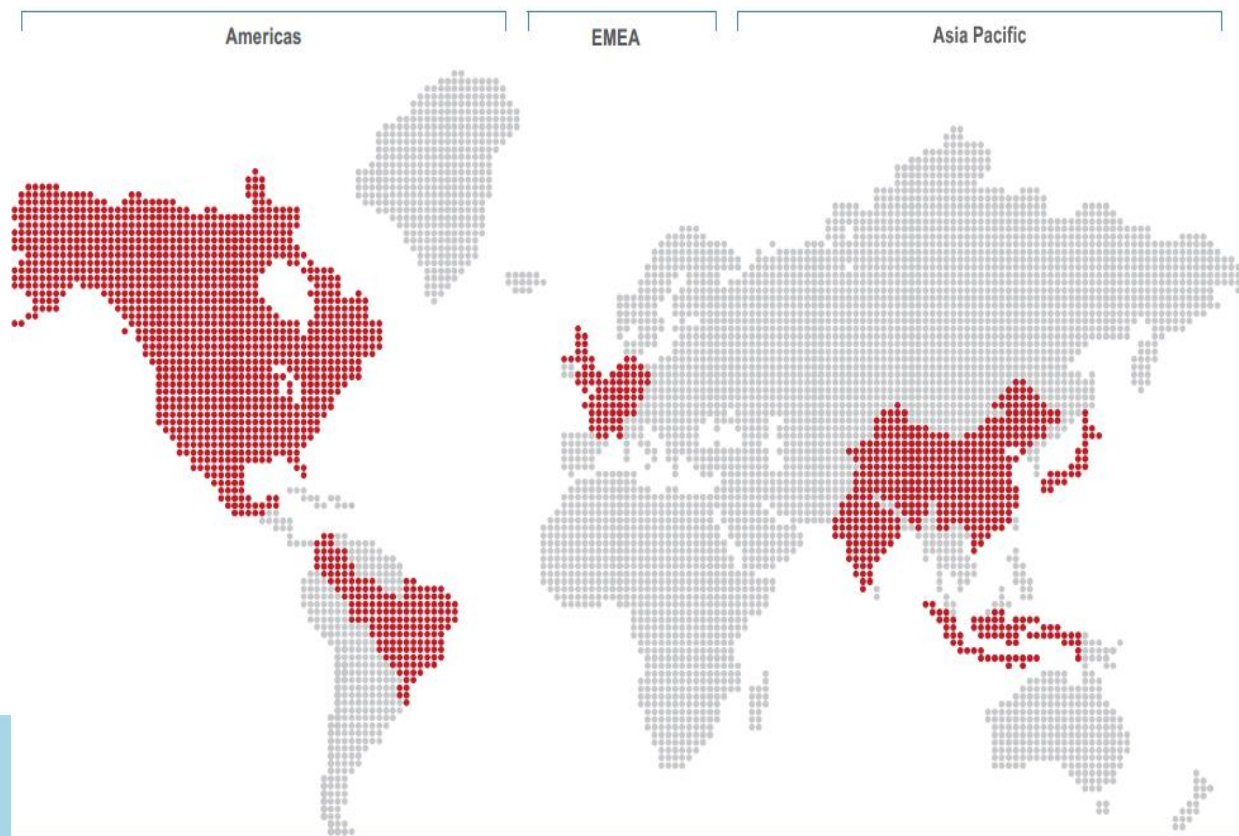
«... Людство вступило в еру самовизначення власної еволюції. Якщо ви вважаєте, що це твердження – наукова фантастика, згадайте нові відкриття в галузі біомедичної інженерії...»

Стівен Хокінг

ГЛОБАЛЬНИЙ РОЗПОДІЛ РОЗВИТКУ НАУК ПРО ЖИТТЯ

У березні 2000 р. Радою Європи «Біомедична інженерія» визнана стратегічним напрямком економічного і соціального розвитку ЄС.

(Joachim H. Nagel Vice President of the International Federation for BME)



ХВИЛІ КОНДРАТЬЄВА

Базові інновації та хвилі Кондратьєва

М. Кондратьєв прийшов до ідеї існування великих – довжиною 50–55 років – економічних циклів, для яких характерний певний рівень розвитку продуктивних сил («технологічний уклад»)



ШОСТИЙ ТЕХНОЛОГІЧНИЙ УКЛАД

Сьогодні світ стоїть на порозі **шостого технологічного укладу**, який характеризуються спрямованістю на розвиток **високих технологій**:

- **біо- і нанотехнології;**
- **генна інженерія;**
- **мембранні і квантові технології;**
- **фотоніка;**
- **мікромеханіка;**
- **термоядерна енергетика.**

№	Фази	Роки
1	Зростання	2010–2020
2	Науково-технічна і технологічна революція	2020–2025
3	Стабілізація	2040

У США частка продуктивних сил **п'ятого технологічного укладу** становить 60 %, четвертого – 20 %, і близько 5 % вже припадають на шостий технологічний уклад.

<http://investycii.org/investuvanya/konferentsiji/problemy-formuvanya-ta-rozvytku-inovatsijnoji-infrastruktury/inovatsiji-shostyj-tehnolohichnyj-uklad.html>

СТАН В УКРАЇНІ

Частка технологій **п'ятого укладу** становить приблизно 10 %, та й то тільки в найбільш розвинених галузях, більше ніж 50 % технологій належить до **четвертого рівня**, а майже третина – і зовсім до **третього**.

Щоб забезпечити входження України в шостий технологічний уклад, **потрібно формування основних принципів науково-технічної політики, пов'язаних із модернізацією української економіки і підготовкою кадрів.**

Часова діаграма активізації драйверів економіки України

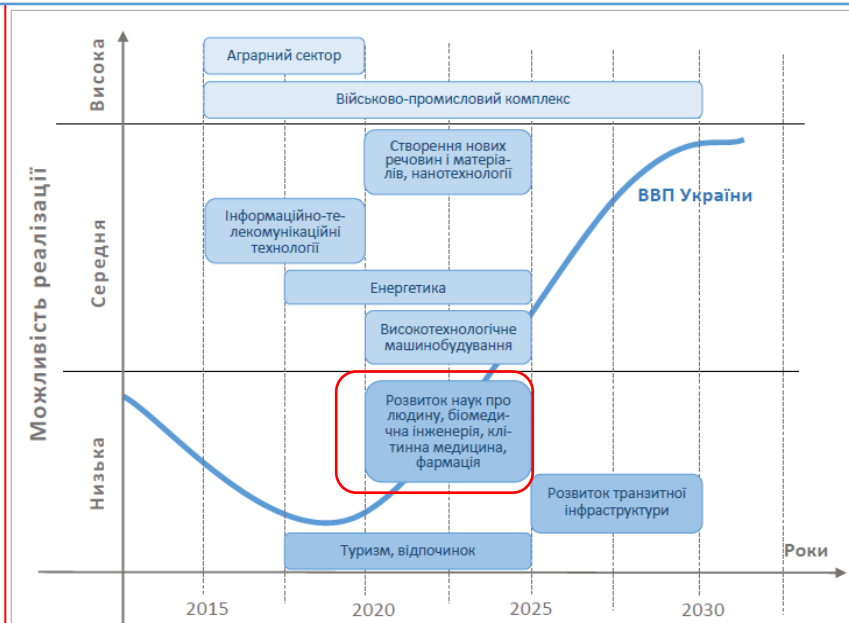


Рис. 3.4. ЧАСОВА ДІАГРАМА АКТИВІЗАЦІЇ ДРАЙВЕРІВ ЕКОНОМІКИ УКРАЇНИ НА СЕРЕДНЬОСТРОКОВОМУ ТА ДОВГОСТРОКОВОМУ ЧАСОВИХ ГОРИЗОНТАХ

ТАБЛИЦЯ 1.1. СТРУКТУРА ЕКОНОМІКИ УКРАЇНИ ЗА ТЕХНОЛОГІЧНИМИ УКЛАДАМИ

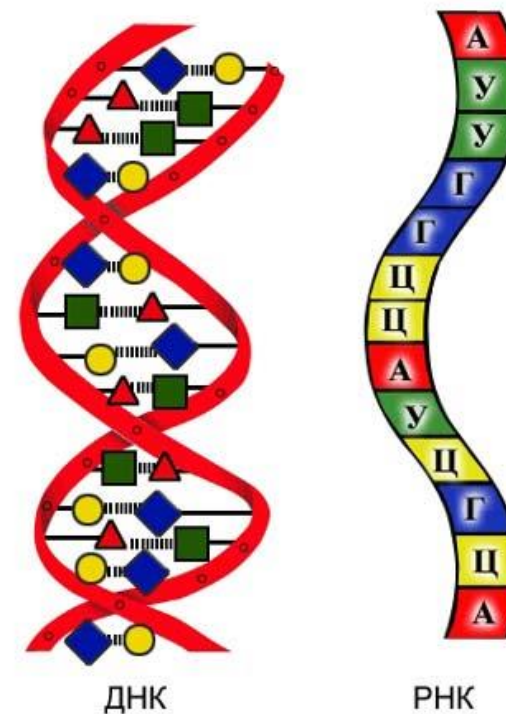
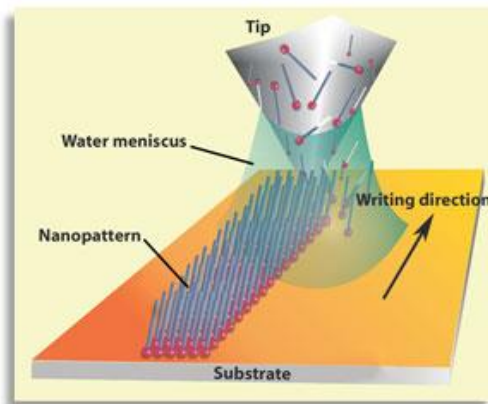
Показники	Технологічні уклади, %			
	3-й	4-й	5-й	6-й
Обсяг виробництва продукції	57,9	38	4	0,1
Фінансування наукових розробок	6	69,7	23	0,3
Витрати на інновації	30	60	8,6	0,4
Інвестиції	75	20	4,5	0,5
Вкладення капіталу на технічне переозброєння і модернізацію	83	10	6,1	0,9

Джерело:
<http://sepd.ntnu.edu.ua/images/stories/pdf/2013/13vvoski.pdf>

<http://investycii.org/investuvanya/konferentsiji/problemy-formuvanya-ta-rozvytku-inovatsijnoji-infrastruktury/inovatsiji-shostyj-tehnolohichnyj-uklad.html>

НАНОМАТЕРІАЛИ І НАНОТЕХНОЛОГІЇ

1. Розвиток наноматеріалів відбувається в тісному взаємозв'язку з розвитком нанотехнологій і нанобіотехнологій.
2. Останнє залежить від розуміння біологічних процесів, що відбуваються на нанорівні (самозбирання, саморемонт, субклітинні процеси тощо).
3. Прості планарні наноструктури формують методами літографії (нанотехнологія), а складні штучні тканини органів – на основі природної самоорганізації.
4. Конструювання подібних до природних систем (ДНК, РНК, Антитіла, тощо) нанооб'єктів дістало назву *біоміметика*.



МІСЦЕ НАНОМАТЕРІАЛІВ У ІЄРАРХІЇ СВІТІВ

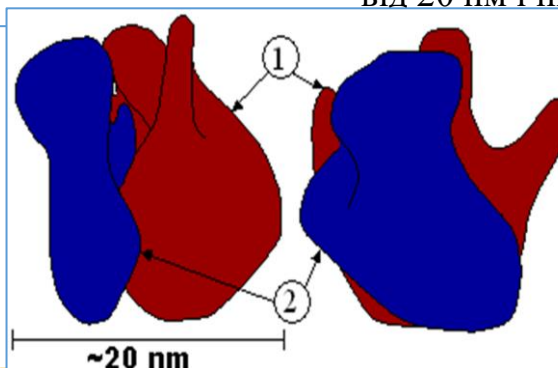
Розгляд відмінностей наноматеріалів доцільно розпочати з визначення їх місця у звичайній ієрархії світів:

- *мікросвіт*, у якому діють закони квантової механіки;
- *мезосвіт*, тобто все те, що нас оточує, і де діють закони класичної механіки;
- *макросвіт* – світ зірок і галактик та могутніх гравітаційних сил, де діють закони загальної теорії відносності;
- **наносвіт** – об'єкти, з характерними розмірами від 1 нм до 100 нм, але такі обмеження є досить умовними.

Саме завдяки малорозмірності в них і проявляються особливі фізико-хімічні властивості.

	Приклад	Геометричні розміри
Наносвіт	Атом водню	0,18 нм
	Переріз молекули ДНК	2 нм
	Довжина видимого світла	400-700 нм
Мікросвіт	Пил	800 нм
	Еритроцит (діаметр)	7,2 мкм
Макросвіт	Товщина компакт-дису	1,2·мм
	Комахи	4-10 мм

Живі організми побудовані з клітин із типовими розмірами до 10 мкм, але їхні компоненти перебувають у нанометровому діапазоні. Так, рибосоми, гемоглобін і холестерол мають розміри від 20 нм і нижче



Структура рибосоми: велика (1) та мала (2) субодиниці з'єднані разом

НАНОМАТЕРІАЛИ

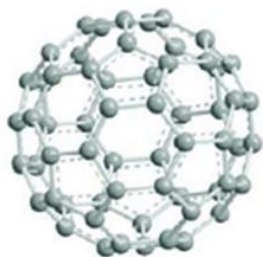
Тому вибір наномасштабних матеріалів для медичних цілей є цілком логічним, оскільки клітини працюють із нанорозмірними елементами.

Під *наноматеріалами* мають на увазі матеріали, основні структурні елементи яких (кристали, волокна, пори тощо) не перевищують умовної наномежі: 100 нм принаймні в одному напрямку. За таких розмірів відзначають такі найхарактерніші особливості наноматеріалів:

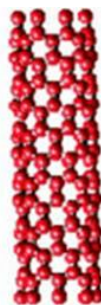
- високу активність поверхонь та особливі типи передання енергії й зарядів;
- появу нетрадиційних типів симетрії структури;
- провідну роль процесів самоорганізації у структуроутворенні.



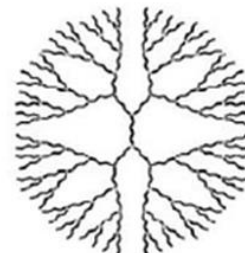
Дизельні Вихлопні
частинки



Фулерен



Нанотрубки



Дендримери



Квантові точки

Випадкові наночастинки

Інженерні наночастинки

НАПРЯМКИ НАНОТЕХНОЛОГІЙ



Нанобіотехнологія використовує два основних напрямки сучасної технології: «**top-down**» («зверху вниз» – нанорозмірного розміру частинок досягають через подрібнення) та «**bottom-up**» («знизу ввверх» – збирання наночастинок із атомів і молекул).

Недоліком цих традиційних методів є досить широкий розподіл частинок за розмірами, тому розвиваються нові методи в межах цього напрямку – самозбирання і самоорганізація, запозичені з явищ самої природи.

ФЕЙНМАН

Американський фізик, лауреат Нобелівської премії, Р. Фейнман ще в 1960 році передбачив, що навчившись маніпулювати атомами, можна отримати будь-яку речовину.

Ця фантастична ідея стала реальністю завдяки створенню **сканувальної зондової мікроскопії**.

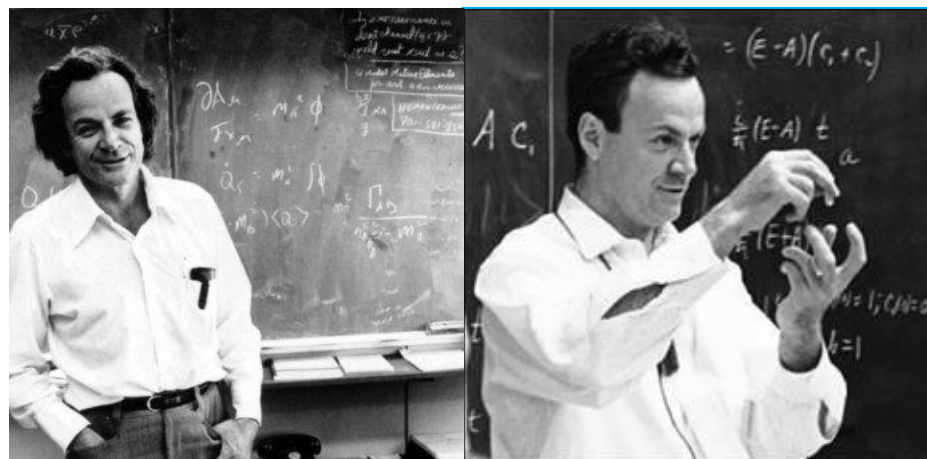
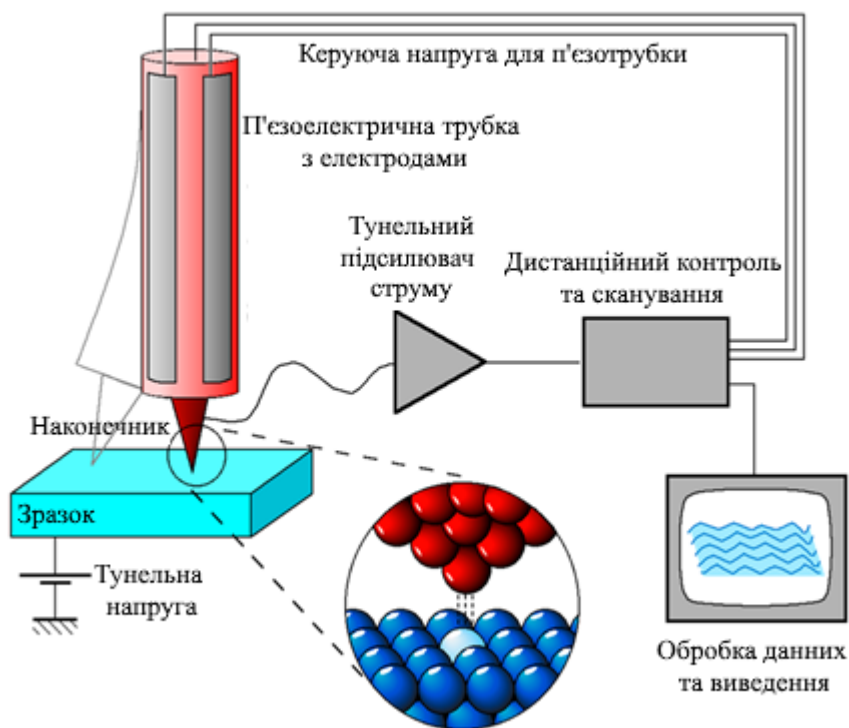


Схема роботи сканувальної зондової мікроскопії: control voltages of piezotube; piezoelectric tube with electrodes – трубка з електродами; tunneling current amplifier – амперметр для виміру величини тунельного струму; distance control and scanning unit – модуль для переміщення голки і контролю відстані голка– зразок; sample – зразок, карта рельєфу якого вимагається побудувати; tunneling voltage; data processing and display – модуль для обробки результатів вимірів і виведення карти рельєфу.

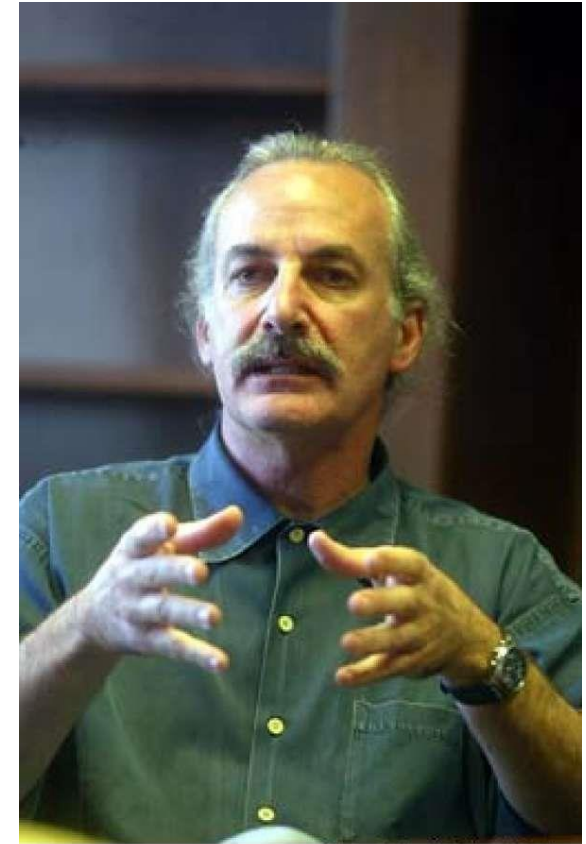
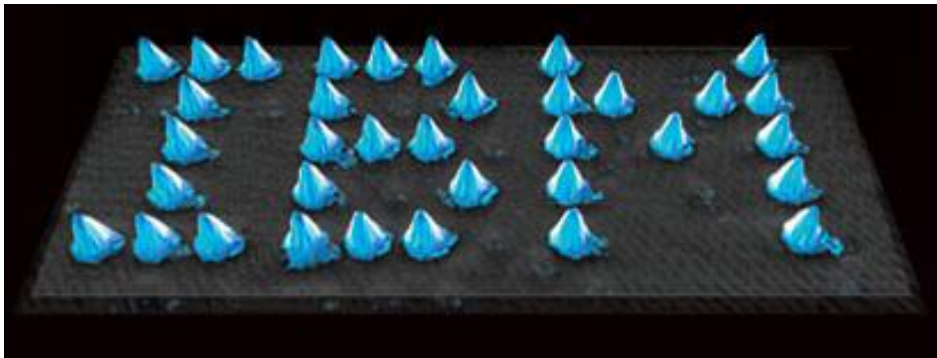
Д. ЕЙГЛЕР

Там де здійснюється збирання діють міжатомні сили, що виникають між атомами голки мікроскопа та атомами на поверхні.

Можливість таких атомних маніпуляцій була вперше показана американським фізиком Д. Ейглером у 1989 році.

Дональд М. Ейглер – американський фізик, пов'язаний з науково-дослідним центром IBM Almaden, відомий своїми досягненнями в галузі нанотехнологій.

У 1989 році він вперше застосував сканувальний наконечник мікроскопа, щоб розташувати окремі атоми на поверхні, прописуючи літери «IBM» 35 атомами ксенону.



Chronicle / Mike Kepka

ОПТИЧНИЙ ПІНЦЕТ

Нобелівські лауреати 1997 року: американські фізики Стівен Чу, Вільям Філіпс і французький дослідник Клод Коен-Таннуджи.



Іншим інструментом для маніпулювання атомами є **лазерний захват** (оптичний пінцет) і його вдосконалений варіант — магнітооптичний захват, створений американськими та французьким фізиками.

Сила, з якою світло діє на навколишні об'єкти, невелика, але її виявляється достатньо, щоб ловити наночастинки у фокус лазерного променя.

Щойно частинка у фокусі, її можна рухати разом із лазерним променем. За допомогою оптичного пінцета можна пересувати частинки розміром від 10 нм до 10 мкм і збирати з них різні структури.

Для «захоплення» колоїдної частинки оптичний пінцет використовує сильно сфокусований лазерний пучок із локальним максимумом. Взаємодіючи з атомом, це поле змінює розподіл електронів навколо атомів й індукує в ньому електричний дипольний момент. Такий атом (частинка) буде притягуватися в область локального максимуму

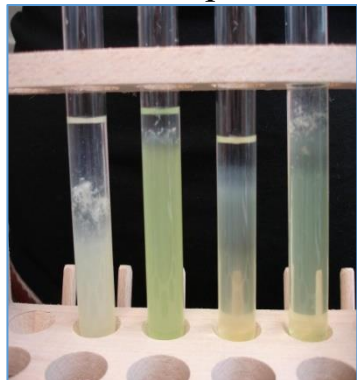


РЕКОМБІНАНТНА ДНК

Прикладом використання біомакромолекул у нанобіотехнології є ДНК-нанотехнологія, що використовує впорядковану структуру ДНК для розроблення наноструктур певного призначення, а також розроблення наномашин, прообразами яких є молекулярні мотори живих систем.

Молекула поєднує в собі генетичний матеріал, виділений із різних біологічних джерел, створюючи у такий спосіб певну ДНК послідовність. У технології рекомбінантної ДНК загалом використовують **паліндромну послідовність**, котра після відповідних маніпуляціях має тупі та липкі кінці. За допомогою технології рекомбінантної ДНК можливо привести в геном одного організму певний ген, виділений із генома іншого організму, створюючи у такий спосіб генетично модифікований організм.

Вперше ідея про створення рекомбінантної ДНК виникла в Пітера Лоббана, аспіранта проф. Дейла Кайзера з факультету біохімії при медичній школі Стенфордського університету. Перші публікації про створення та вдале використання рекомбінантної ДНК датовані 1972 та 1973 рр. Першим продуктом, отриманим із використанням технології рекомбінантних ДНК, був **людський інсулін**.



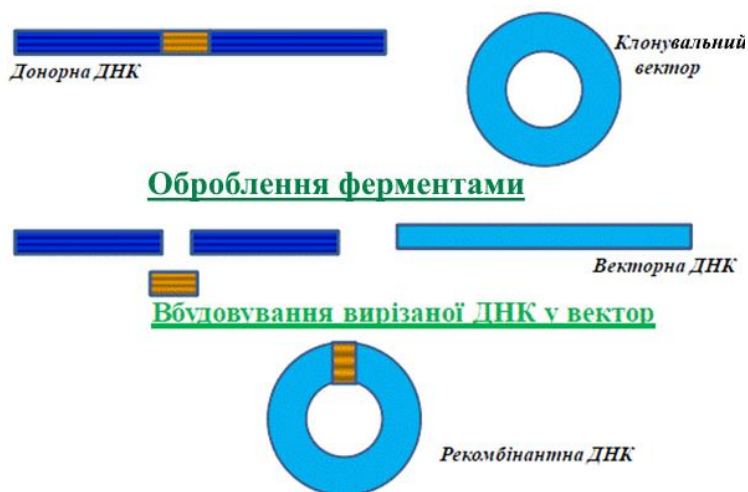
Виділення ДНК методом спиртового осадження.
ДНК виглядає як клубок білих ниток.



СТВОРЕННЯ РЕКОМБІНАНТНОЇ ДНК

Для створення молекули рекомбінантної ДНК необхідно пройти декілька етапів:

- виділення потрібного (цільового) гена;
- вбудова гену в специфічну ДНК-послідовність (вектор), здатну до реплікації в клітині-хазяїні;
- введення вектора в організм-реципієнт;
- визначення (скринінг) і відбір клітин, у геномі яких виявлена наявність гена інтересу.



Створення рекомбінантної ДНК відбувається завдяки методу молекулярного клонування. Це неосновний метод, але найбільш поширений. Отже, спочатку за допомогою рестриктаз (група ферментів класу ендонуклеаз (білки з групи нуклеаз, що розщеплюють фосфодіестерні зв'язки в середині полінуклеотидного ланцюжка), що розрізають подвійну спіраль ДНК) отримують різні фрагменти ДНК, зокрема й послідовності, що кодують гени. Фрагменти ДНК можуть мати як тупі, так і липкі кінці. Унаслідок цього різноманітні фрагменти ДНК можливо комбінувати між собою за допомогою різноманітних методів, наприклад, рестрикційно/лігазного, Гібсона (Gibson assembly) та ін. Після введення чужорідної ДНК у геном організму-господаря, рекомбінантна ДНК-конструкція може експресуватись. У деяких випадках експресія не відбувається.

ПРИКЛАДИ БІОМАТЕРІАЛІВ

Біоматеріали (БМ) відновлюють втрачені функції організму як самостійно, так і в контактi з електронними пристроями.

Синтетична шкіра, синтетичні судини, фрагменти кісток, протези стегна, серцеві стимулятори, зубні протези – все це досягнення сучасної медицини, засновані на відповідних матеріалах, які задовольняють вимоги як щодо хімічного складу, так і механічних характеристик. Для створення БМ необхідна спільна праця медиків, хіміків, фізиків, біологів і інженерів.

Надзвичайно важливим є обговорення біологічного виникнення матеріалів у живій природі (біомінералізація – зуби, кістки у хребетних тварин, раковина, панцир, жало в безхребетних) для демонстрації природних принципів біосумісності і біогенезу таких твердих тіл.

Вивчення БМ і явища біомінералізації (БіоМ) має багато спільного.

Як буде далі показано, БМ знаходиться в тісному контактi з твердою тканиною (ТТ), і тому природне утворення ТТ (БіоМ) має суттєве значення для створення БМ. Як можна створити замісник кісткової тканини (КТ) без знань принципів її утворення?



Штучні кровоносні судини

СПЕЦІАЛІЗАЦІЇ БІОМЕДИЧНИХ ІНЖЕНЕРІВ

Європейський перелік

1. Bioinstrumentation Instrumentation, Sensors, and Measurement
2. Biomechanics
3. Biomaterials
4. Systems physiology
5. Clinical engineering
6. Rehabilitation engineering
7. Biosignals Processing
8. Medical Imaging and Imaging Processing
9. Bioinformatics
10. Physiological Systems Modeling
11. Radiology (Medical Physics)
12. BioMEMS (microelectromechanical syst.)
13. Biotechnology
14. Genomics
15. Micro and Nanotechnology
16. Neural Systems and Engineering
17. Proteomics
18. Robotics in Surgery

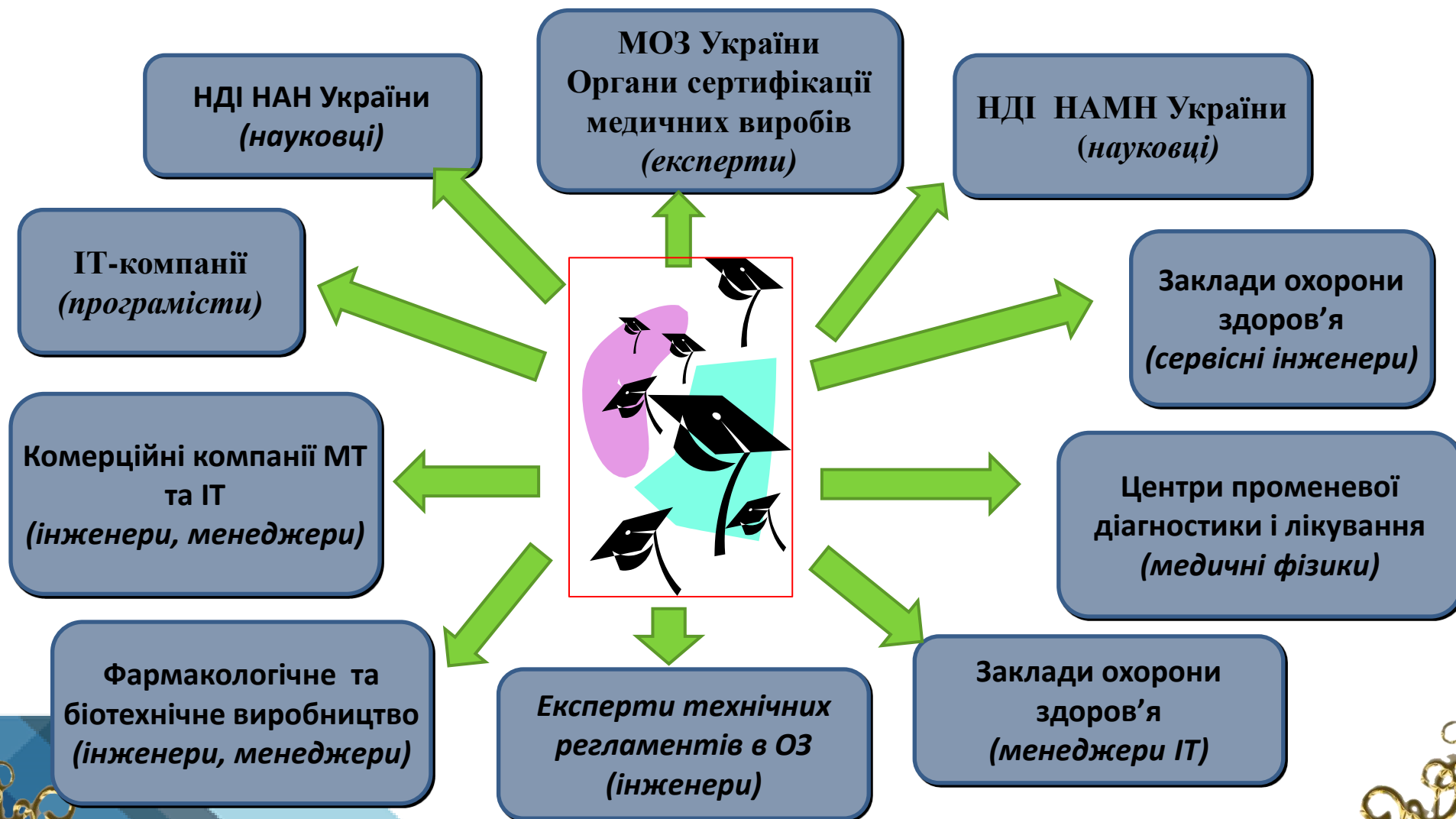
Вітчизняні еквіваленти

- Біомедичне приладобудування
Сенсори та вимірювання
Біомеханіка
Біоматеріали
Системна фізіологія
Клінічна інженерія
Реабілітаційна інженерія
Оброблення біосигналів
Отримання і оброблення мед. зображень
Біоінформатика
Моделювання фізіологічних систем
Радіологія (медична фізика)
БіоМЕМС (мікроелектромеханічні системи)
Біотехнології
Геноміка
Мікро- і нанотехнології
Інженерія нервових систем
Протеоміка
Робототехніка в хірургії

ІНФРАСТРУКТУРА: КАФЕДРИ І ФАКУЛЬТЕТИ БМІ



ПРАЦЕВЛАШТУВАННЯ БІОМЕДИЧНИХ ІНЖЕНЕРІВ



УКРАЇНСЬКА АСОЦІАЦІЯ БМІТ



ЛЕКЦІЯ 2. ОСНОВИ ХІМІЇ ТВЕРДОГО ТІЛА



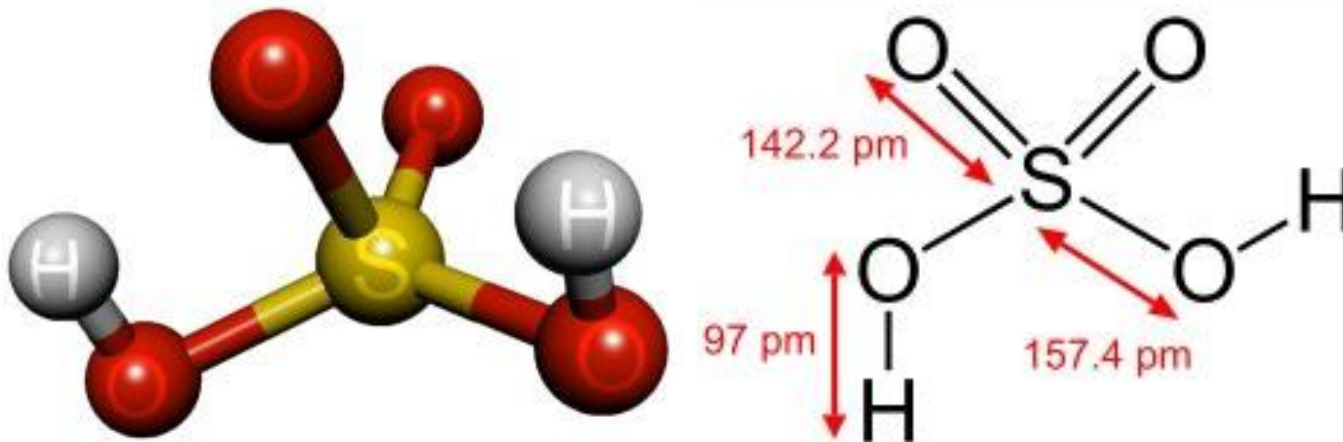
ХІМІЧНІ СПОЛУКИ (ХС)

ХС характеризуються різним атомним складом. Так, молекула сірчаної кислоти H_2SO_4 складається з двох атомів водню, одного атому сірки і чотирьох атомів кисню.

Для молекули завжди характерно те, що в ній міститься ціле число атомів.

Це положення було сформульоване 200 років тому в «Законі постійного складу» (Proust, 1799) і в «Законі еквівалентів» (Dalton, 1803).

Але стосовно ТТ це правило не завжди виконується, особливо для ТТ, які містять іони (заряджені атоми) і тоді можна прийти до співвідношень нецілих чисел складових елементів.



ПРИКЛАДИ ХС

а) двоокис заліза із загальною формулою $\text{FeO} = (\text{Fe}^{2+})(\text{O}^{2-})$. Для збереження нейтральності для кожного двовалентного іона заліза необхідний один атом кисню. Насамперед це справедливо, якщо в ТТ є багато структурних одиниць ($N_A = 6.023 \cdot 10^{23}$ моль⁻¹). Якщо залізо може перебувати в тривалентному стані, то у двоокису заліза незначна частка двовалентних іонів заліза постійно окиснюється, утворюючи тривалентні іони заліза. Унаслідок цього для компенсації заряду іонів кисню необхідно менше заліза, звідси формула $(\text{Fe}^{2+}, \text{Fe}^{3+})(\text{O}^{2-}) = \text{Fe}_{1-\delta}\text{O}$, де δ є малим числом ($\ll 1$).

Унаслідок цього двоокис заліза має співвідношення заліза до кисню, яке не дорівнює 1:1. Це називається «нестехіометрією»;

б) гідроксиapatит $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ – найважливіший ортофосфат кальцію кісток і зубів. Наявні в організмі двовалентні іони (Mg^{2+} , Pb^{2+} , Cd^{2+}) можуть заміщувати двовалентний кальцій. Наприклад, це може відбутися в разі отруєння важкими металами, унаслідок цього важкі метали накопичуються в кістках і зубах.

Отже, для гідроксиapatиту з Mg можна навести формулу $\text{Ca}_{10-x}\text{Mg}_x(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ із малим числом x.

АГРЕГАТНИЙ СТАН

У хімії розрізняють 3 агрегатних стани: твердий, рідкий і газоподібний (наприклад, H_2O як лід, вода і пар), які з підвищенням температури переходять з одного стану в інший. Агрегатний стан розрізняють за ступенем взаємодії частинок (атомів або молекул). Для ТТ характерний, зазвичай, дальній порядок із високою щільністю упаковки ($1\text{--}10\text{ г см}^{-3}$). Для рідин характерний ближній порядок, частинки рухливіші, вони можуть змінювати свої місця, але щільність упаковки все ще висока як і для ТТ. У газах немає структурного порядку; також втрачається щільність упаковки, тобто відстань між частинками набагато більша порівняно з ТТ і рідинами.

Агрегатний стан речовини позначають у дужках після хімічної формули: $\text{H}_2\text{O}(\text{s}) = \text{ТТ}$; $\text{H}_2\text{O}(\text{l}) = \text{вода}$; $\text{H}_2\text{O}(\text{g}) = \text{пар}$; $\text{NaCl}(\text{aq}) = \text{NaCl}$, розчинений у воді. Сполуки, які отримують, можна використовувати як будівельні матеріали, покриття, тканини, інструменти або дисплеї. Більшість матеріалів – це ТТ. У них існує зв'язок між хімічними частинками – атомами і молекулами. Найважливіші класи сполук (метали, кераміка, полімери) будуть обговорюватися далі.

Ця лекція присвячена обговоренню найважливіших властивостей ТТ, без чого неможливе розуміння БМ і біомінералів.

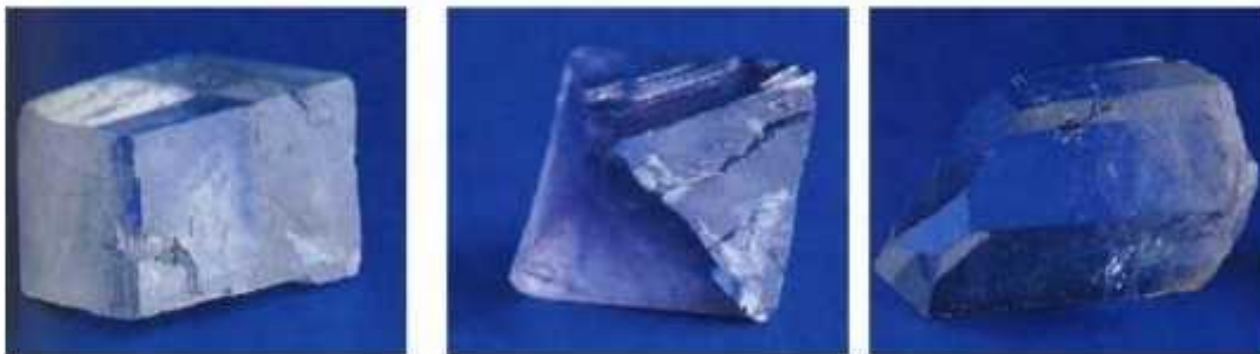


КРИСТАЛОГРАФІЯ

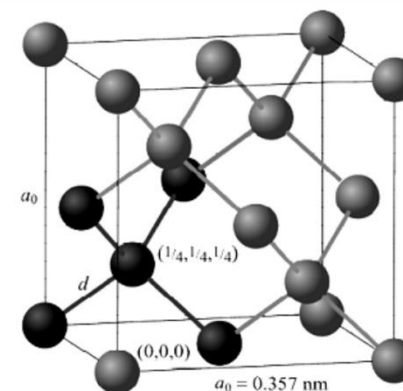
Тверді сполуки часто є кристалами.

Кристал – це високоорганізований порядок окремих частинок, зазвичай, у щільній упаковці, яка має найменший вільний об'єм. Щільна упаковка – це результат взаємодії частинок. Вчення про кристали, їхню структуру і властивості – це наука під назвою «кристалографія». Довга історія кристалографії ґрунтується на аналізі зовнішньої форми кристалів багатьох мінералів, що надало можливості визначити внутрішню симетрію порядку на атомному рівні (гірський кришталь, куб піриту, куб солі).

На сьогодні відомо, що ТТ – кристали, які складаються із структурних одиниць, які повторюються багато разів за трьома просторовими напрямками. Водночас просторовою одиницею є паралелепіпед, який має назву «елементарна комірка» (ЕК).



Кристалічні речовини можуть бути різної форми. Найчастіше вони мають вигляд правильних геометричних фігур

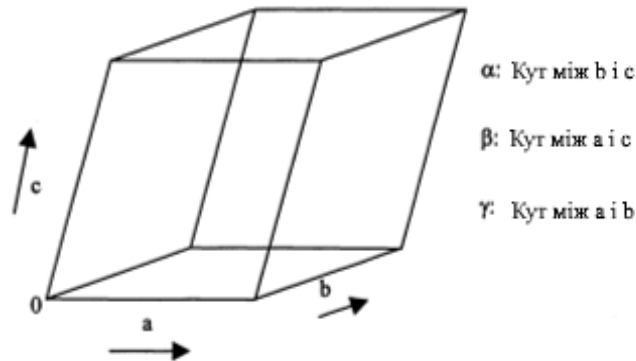


ЕЛЕМЕНТАРНА КОМІРКА

Довжини ребер відповідають основним трансляціям, які дозволяють побудувати всю структуру з однієї ЕК. Цей елемент об'єму однозначно описується 6 параметрами: довжини ребер a , b , c і 3 кута α , β , γ .

Звичайно, довжини цих ребер становлять величини в декілька ангстрем ($1\text{Å} = 10^{-10}\text{ м} = 0,1\text{ нм}$). Координати кожного атома визначаються в одиницях довжини ребра паралелепіпеда, тобто числом між 0 і 1. Можна показати, що існує 7 варіантів ЕК – 7 кристалічних сингоній: **кубічна** ($a = b = c$; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), **тетрагональна** ($a = b$; c ; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), **орторомбічна** (a ; b ; c ; $\alpha = \beta = \gamma = 90^\circ$), **моноклинна** (a ; b ; c ; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma \neq 90^\circ$), **триклинна** (a ; b ; c ; $\alpha \neq 90^\circ$; $\beta \neq 90^\circ$; $\gamma \neq 90^\circ$), **тригональна** ($a = b = c$), ($\alpha = \beta = \gamma \neq 90^\circ$) і **гексагональна** ($a = b$; c ; $\alpha = \beta = 90^\circ$; $\gamma = 120^\circ$)

Структура кристала визначає більшість властивостей ТТ (наприклад, твердість, електропровідність, теплопровідність, реактивність, розчинність) і тому має велике значення. Але не всі ТТ мають кристалічну структуру (наприклад, скло, полімери, багато біологічних матеріалів, а також дерево, волокна). **Механічні** властивості матеріалу визначаються його хімічним складом; одночасно вирішальним фактором для цього матеріалу є його мікроструктура.



ПОЛІМОРФІЗМ

Поліморфізмом називається властивість хімічної сполуки мати різну кристалічну структуру за однакового хімічного складу. Це розповсюджено в хімії, а також в неорганічних кристалах важливих для біології.

Хімічна сполука «карбонат кальцію» = « CaCO_3 » може траплятися в трьох кристалічних формах («поліморфні фази»): як кальцит, арагоніт або ватерит. Всі три фази мають склад « CaCO_3 », але відрізняються порядком розміщення іонів у кристалі. Це обумовлює різні фізичні і хімічні властивості, наприклад, розчинність і твердість.

Оскільки окремі поліморфні фази різняться за енергетичним станом (що обумовлено різними енергіями кристалічних решіток), їх можна ранжувати за цим параметром.

Фаза з мінімальною енергією – це термодинамічно стабільна фаза (**кальцит**), далі – метастабільна фаза (**арAGONІТ**) і потім – більш високоенергетична нестабільна фаза (ватерит). Хоча метастабільні фази мають більш високу енергію, вони можуть бути стабільними скільки завгодно довго. Так, наприклад, черепашки молюсків (**райдушний перламутр наутилуса**) складаються з **арAGONІТУ** нестабільної модифікації, хоча фазових перетворень тут не спостерігається.

Поліморфізм проявляється також в органічних хімічних твердих сполуках (наприклад, лікарських засобах) і в кристалічних протеїнах. Існує багато сполук, які трапляються в одній-єдиній твердій модифікації (наприклад, хлорид натрію).



Перламутр складається із шестикутних пластинок арагоніту (кристалів карбонату кальцію CaCO_3) розмірами 10–20 мікрон у ширину і півмікрона в товщину, розташованих паралельними шарами. Ці шари розділені листами органічної матриці, що складається з еластичних біополімерів (таких як хітин, люстрин і білки).

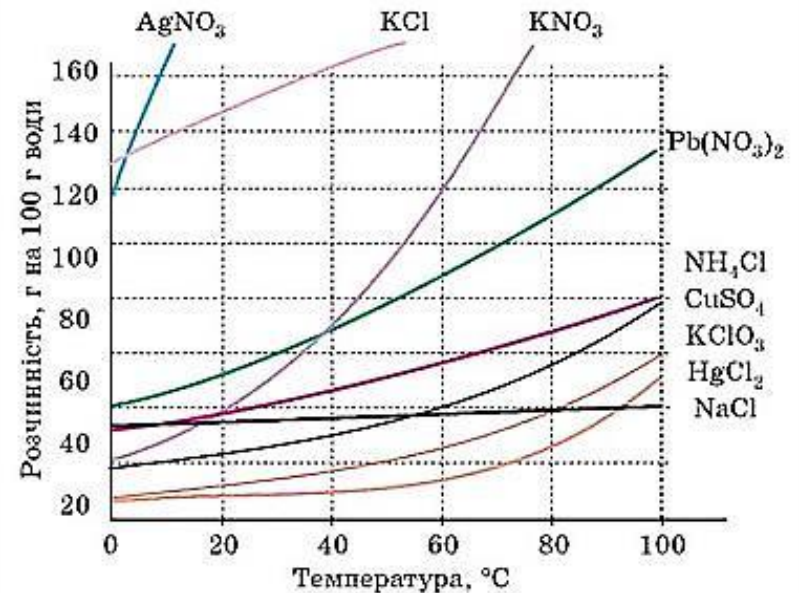
РОЗЧИННІСТЬ

Розчинність хімічної сполуки в даному розчиннику за даної температури і тиску з наявністю домішок (наприклад, інших розчинених солей) є константою сполуки, яка виражається в г л^{-1} або моль л^{-1} . За низьких величин розчинності іонних кристалів використовують добуток розчинності L , який є константою. Для ГА добуток розчинності

$$L = [\text{Ca}^{2+}]^{10} \cdot [\text{PO}_4^{3-}]^6 \cdot [\text{OH}^-]^2 = 10^{-116.8} (\text{моль} \cdot \text{л}^{-1})^{18} = 10^{-116.8} \text{ моль}^{18} \cdot \text{л}^{18} = 10^{-116.8} \text{М}^{18} = \text{const.}$$

Для цієї сполуки добуток розчинності є термодинамічною константою сполуки, яка в разі чистого розчинника (наприклад, чистої води) залежить від температури і тиску. Оскільки тиск, зазвичай, є постійною величиною, то температурний фактор визначальний. Розчинність може підвищуватися з температурою (для багатьох солей), залишатися незмінною (поварена сіль NaCl) або зменшуватися (карбонат кальцію CaCO_3).

Якщо добуток концентрацій більше за L , то розчин є перенасиченим (тверда сполука випадає в осад), якщо менше за L , то осад розчиняється.



Розчинність речовин залежно від температури

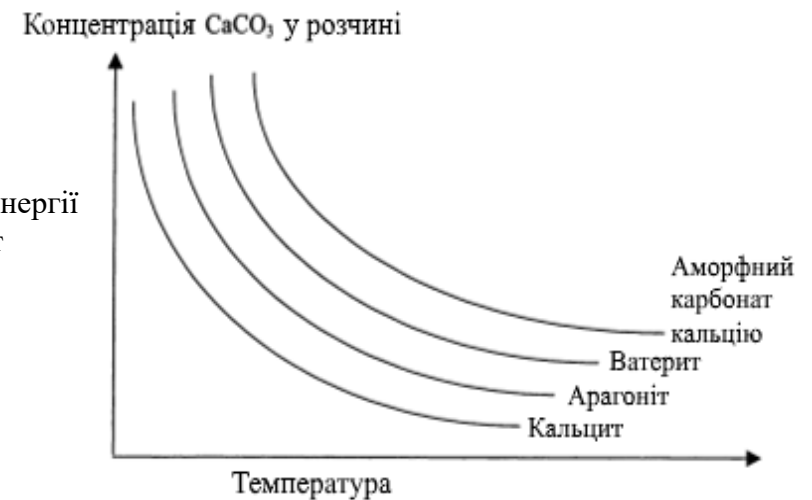
РОЗЧИННОСТІ КАРБОНАТУ КАЛЬЦІЮ

Необхідно пам'ятати, що дані в таблицях розчинності наведені для чистої сполуки, наприклад, для стехіометричного ГА. Розчинність може відрізнятись від табличної величини, якщо:

- а) окремі іони в решітці заміщені іншими іонами (кальцій на магній); розчинність не може збільшитись або навпаки зменшитись *a priori*, раніше вказаним способом;
- б) розчинність залежить від розміру частинок: малі частинки мають звичайно більшу розчинність;
- в) дефектні або аморфні ТТ мають більшу розчинність у порівнянні з кристалізованими фазами.

Розчинність, зазвичай, залежить від енергії даної фази: так, поліморфні фази з високою енергією мають кращу розчинність порівняно з фазами низької енергії.

Схематичне порівняння розчинності 4 модифікацій карбонату кальцію, зміст енергії яких на моль у ряду кальцит < арагоніт < ватерит < АСС (аморфний карбонат кальцію) зростає.



ТЕРМОДИНАМІКА

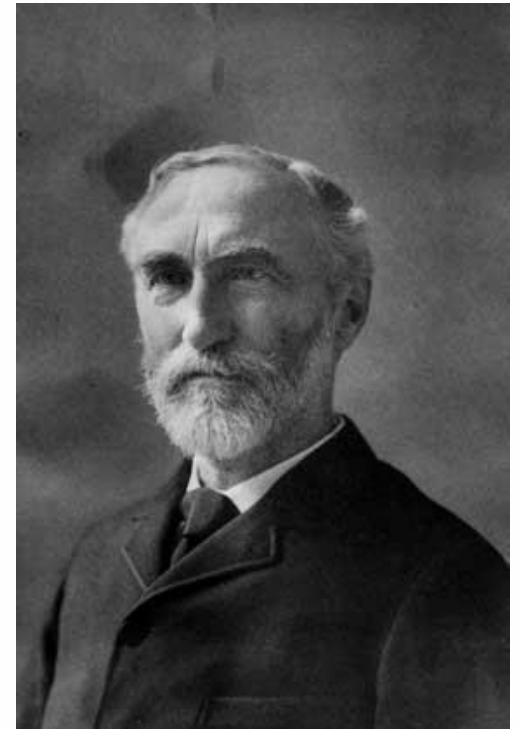
Хімічна термодинаміка вивчає енергетичний стан компонентів, які беруть участь у хімічних реакціях і встановлює зв'язок між хімічними реакціями та їхнім енергетичним обміном. Як форми енергії тут будуть, наприклад, хімічна енергія (теплота), механічна енергія, електрична енергія (наприклад, енергія, акумульована в суміші водню з киснем H_2/O_2). Тепловий ефект хімічної реакції позначають за незмінного тиску (що характерно для біологічних систем) як зміну ентальпії реакції $\Delta_r H$, причому індекс “r” позначає хімічну реакцію.

За екзотермічних реакцій виділяється тепло і, згідно з визначенням, $\Delta_r H < 0$. За ендотермічних реакцій тепло поглинається і $\Delta_r H > 0$. Хоча більшість самодовільних реакцій екзотермічні, визначальною величиною є вільна енергія Гіббса $\Delta_r G$, відповідно до рівняння Гіббса-Гельмгольца

$$\Delta_r G = \Delta_r H - T \Delta_r S$$

Вирішальним для проходження реакції є знак зміни вільної енергії Гіббса. Лише реакції з негативним знаком вільної енергії Гіббса (екзотермічні реакції, $\Delta_r G < 0$) протікають самодовільно (на противагу «ендотермічним реакціями»; $\Delta_r G > 0$).

Ентропію можна характеризувати як міру впорядкованості системи.



КІНЕТИКА

Термодинаміка свідчить про можливість проходження хімічних реакцій і не свідчить про швидкість їх проходження. Так, суміш водню з киснем («гримучий газ»), з погляду термодинаміки миттєво перетвориться на воду з виділенням енергії $2\text{H}_2\text{O} + \text{O}_2 = 2\text{H}_2\text{O}, \Delta_r G < 0$.

Експериментально, такі реакції не спостерігаються. Суміш водно-кисневого газу (наприклад, у повітряній кулі) може бути стабільною як завгодно довго за нормальних умов. Швидкість реакції дорівнює нулю. Якщо підвести енергію нагрівом, іскрою або світовою блискавкою, то реакція пройде миттєво, тобто з великою швидкістю.

Швидкість реакції (RG) можна завжди знайти, тобто визначити, як швидко протікає реакція. Одиницею швидкості реакції є константа швидкості K . Здебільшого швидкість реакції пропорційна концентрації реагуювальних компонентів (закон дії мас). У цьому разі K – константа пропорційності. Для реакції $A + B \rightarrow AB$

$$RG = -d[A]/dt = -d[B]/dt = k[A][B].$$

Величина k може бути знайдена тільки експериментально, за звичайних умов залежить від температури і природи сполук.

РІВНЯННЯ АРРЕНІУСА

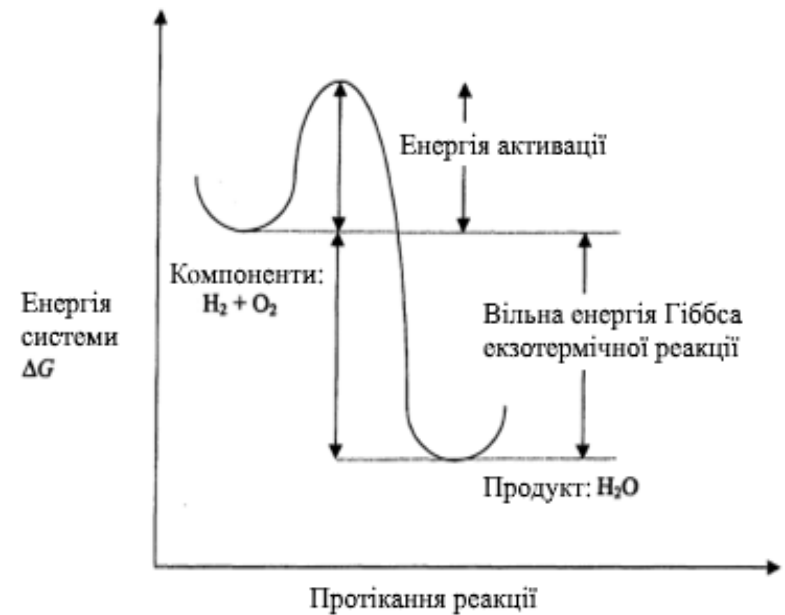
Рівняння, яке описує залежність константи швидкості від температури (рівняння Арреніуса) має вигляд

$$k = k_0 \cdot \exp(-E_a/(RT)),$$

де k_0 і E_a (енергія активації) є для цієї реакції константами; R – газова константа ($8,314 \text{ Дж} \cdot \text{моль}^{-1} \times \text{К}^{-1}$) і T – абсолютна температура за Кельвіном.

Найважливіший параметр для хімічної реакції – це енергія активації. Енергія активації є енергетичним бар'єром (в $\text{кДж} \cdot \text{моль}^{-1}$), який повинен бути подоланим системою так, щоб, наприклад, H_2/O_2 створили H_2O .

Якщо енергія системи недостатня для досягнення енергії активації, то система залишиться в початковому стані. Ці потенційно стабільні стани системи називають *метастабільними*. Багато хімічних і біологічних систем є метастабільними.



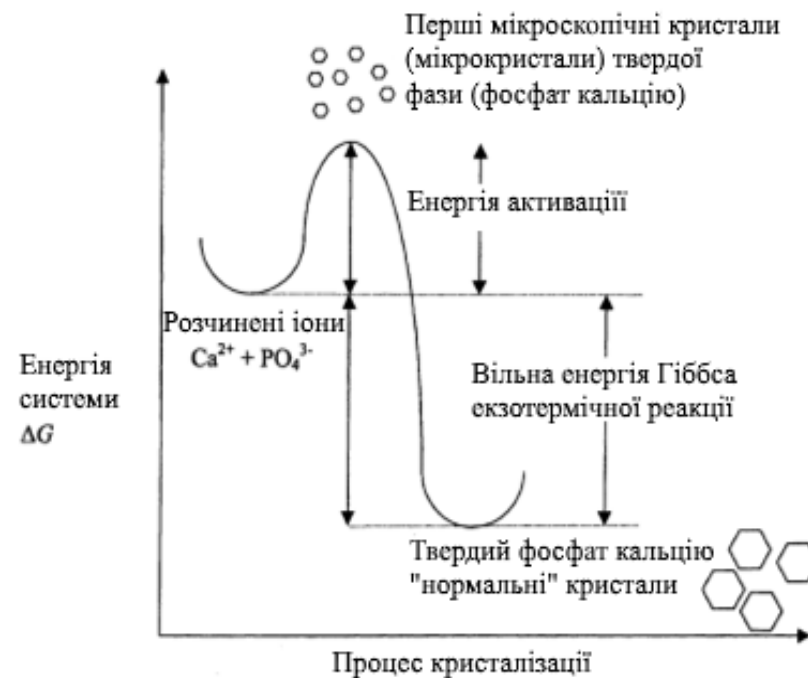
Для протікання хімічної реакції має бути подоланий енергетичний бар'єр, досягнена енергія активації

КРИСТАЛІЗАЦІЯ

Утворення ТТ із розчину вимагає переходу складових (наприклад, іонів Na^+ і Cl^- для хлориду натрію) в упорядковану сполуку (кристал), яка не має розчинника. Таке утворення твердої фази має назву «осадження», а сам процес – «кристалізація». Процеси можуть відбуватися один за одним: аморфна тверда фаза (осадження), яка далі перетворюється на кристалічну фазу (КФ) (кристалізація). Повної теорії кристалізації на сьогодні не існує.

Прогнозування процесу кристалізації щодо кінетики, розміру кристалів і їх морфології (голки, куби або кульки) необхідно проводити ґрунтуючись не на теоретичних положеннях, а виключно за допомогою проведення експерименту. Наглядне уявлення про енергію активації можна продемонструвати на прикладі кристалізації ФК.

Якщо встановити, за допомогою охолодження або випаровуванням розчину перенасичення ($glut$), то $\Delta_r G$ під час утворення осаду має зменшитись, і тоді миттєво утворюється осад. Кінетично енергія активації має бути перевищена, перші мікрочастинки («зародки») мають підвищену розчинність, і тому тільки деякі досягають критичної величини для подолання енергетичного бар'єру (див. рис. зліва направо).



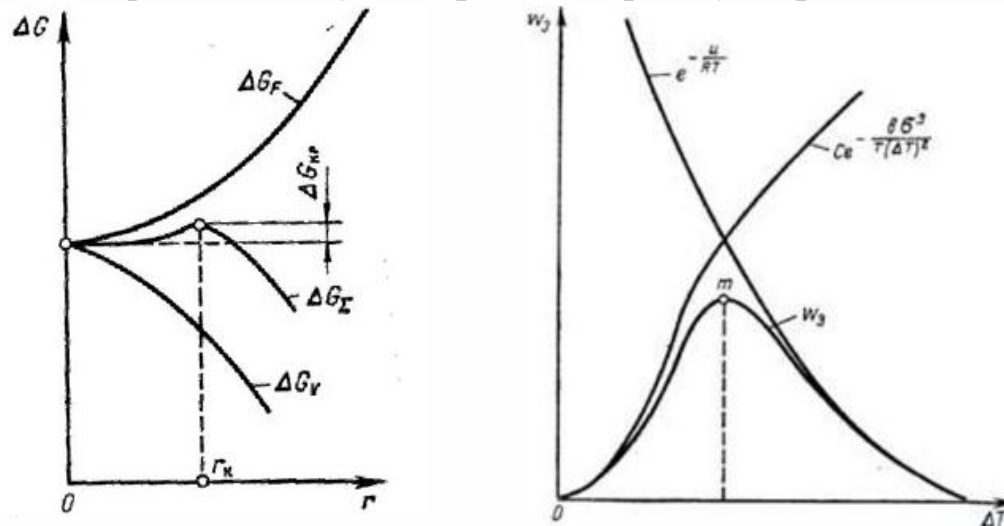
ГОМОГЕННЕ ТА ГЕТЕРОГЕННЕ ЗАРОДКОУТВОРЕННЯ

Цей вид кристалізації називають «*гомогенне зародкоутворення*».

Проте з цієї причини можуть бути перенасиченими і такі рідини людського тіла, як слина та кров, порівняно з ФК, які кристалізуються. Але вони стійкі, хоч і метастабільні.

Перенасичення можна досягнути різними способами, що допомагає системі подолати енергетичний бар'єр. Можна додати затравочні кристали, до яких будуть приєднуватися осадкові іони (через це енергія активації знижується). Можна показати, що і кристалізація на поверхні (наприклад, на стінках судин) найімовірніше викликає зниження енергії активації. Демінералізація зубної емалі у слині в роті – результат дії цих двох явищ (зубна емаль як запалювальний кристал і утворення зародка на граничній поверхні).

Кристалізація на поверхні має назву «*гетерогенне зародкоутворення*».

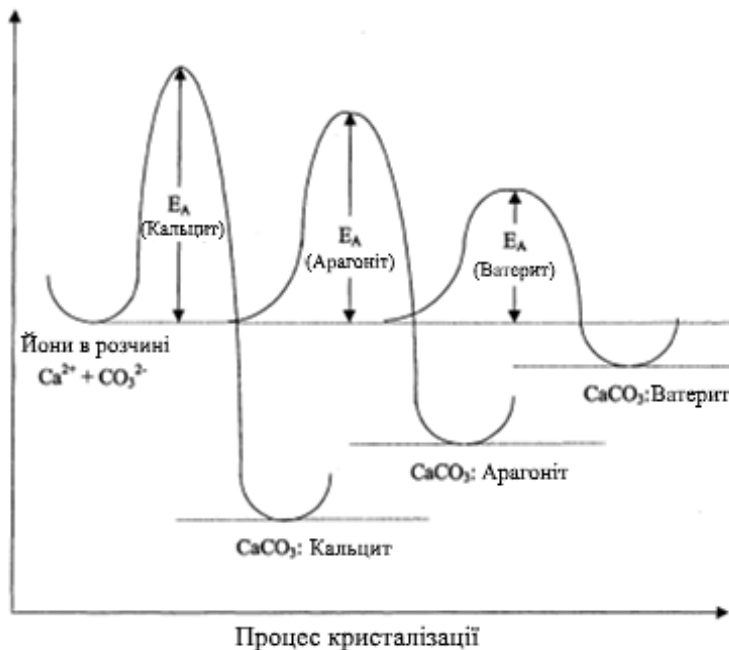


ВИЗРІВАННЯ ОСТВАЛЬДА

Визрівання Оствальда настає в осаді кристала, який щойно випав. Цей осад є спочатку дрібнодисперсним; кристали, які випали дуже малі. Якщо розчин підігріти, то розмір зерна буде зростати, а кількість зменшуватися, що пов'язано з більш високою розчинністю малих кристалів.

Правило визрівання Оствальда працює для багатьох процесів кристалізації. Якщо речовина (наприклад, карбонат кальцію) може бути в декількох твердих модифікаціях (поліморфні фази) (тут: кальцит, арагоніт, ватерит), то в осад випадає за кристалізації спочатку фаза, яка має найвищу енергію, тобто «метастабільна фаза».

У разі з карбонатом кальцію – це **ватерит**. Модифікація з високою енергією має більш високу розчинність і з часом рекристалізується в стабільну модифікацію. Це може спостерігатися в контакті з розчином або за певних умов у ТФ, що можна зобразити схематично через енергію активації, яка для метастабільних фаз зазвичай нижча (рисунок).



ВАЖЛИВІ АНАЛІТИЧНІ МЕТОДИ

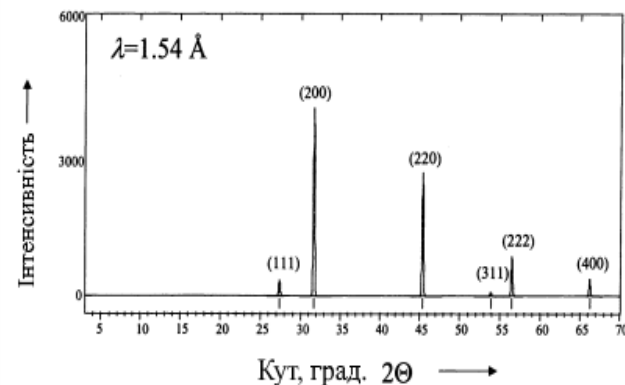
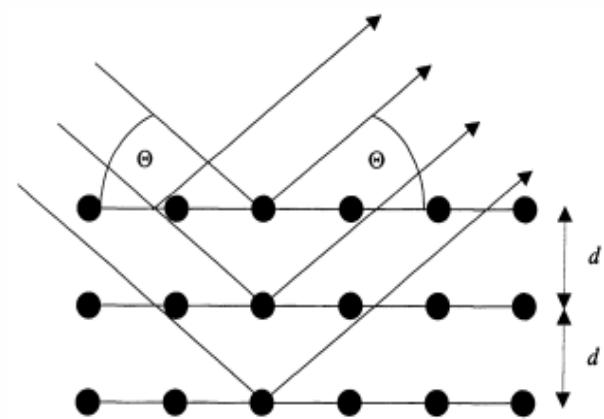
Дифракційні методи

Цей клас методів заснований на дифракції електромагнітних хвиль (тут рентгенівські промені (РП)) на структурах кристала, тобто на явищі інтерференції. Довжина хвилі РП і параметри кристалічної решітки мають бути одного порядку (декілька А). Під час опромінення кристалів спостерігається інтерференція вторинних відбитих хвиль подібно хвилям видимого світла, які виходять із різних щілин дифракційної решітки. Інтерференційне підсилення хвиль спостерігається лише в певних напрямках, тобто відбиття РП може бути за певних дискретних кутів. В основі аналізу дифракційної картини РП лежить рівняння Вульфа – Брегга:

$$n\lambda = 2d \cdot \sin \theta,$$

де λ – довжина хвилі активного випромінювання, що діє; n – порядок максимуму; d – відстань між площинами для даного набору площин решітки і θ – кут дифракції. Рівняння Вульфа – Брегга виконується тільки тоді, коли спостерігається максимальне інтерференційне підсилення дифрагованих РП (рисунок).

Здебільшого використовують подвоєний кут дифракції 2θ . Існує два основних методи: **рентгенівська дифрактометрія порошку** і **дифрактометрія монокристала**. Дифрактометрія хлориду натрію наведена на рисунку. Типова кількість речовини за дифрактометрії порошку – 10–100 мг у добре розмеленому вигляді.



Дифрактограми порошків дентину й емалі

Положення рефлексів на осі x (в 2Θ) і величина інтенсивності піків є характерними для конкретної речовини. Вигляд дифрактограми порошку визначається структурою речовини, тобто розміщенням атомів і молекул у кристалі. Завдяки цьому можна розрізнити, наприклад, 3 фази CaCO_3 – кальцит, арагоніт і ватерит, а також ідентифікувати їх у суміші.

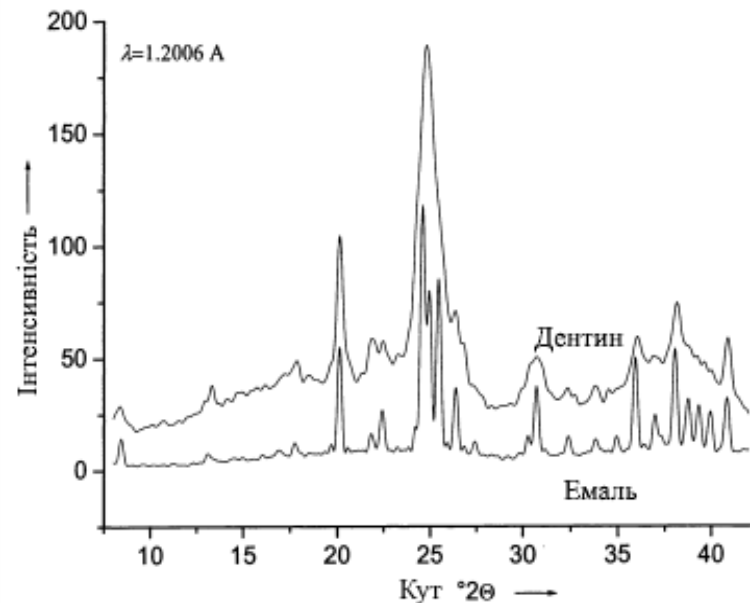
Відносна інтенсивність дифракційних піків може змінюватися для даної речовини від експерименту до експерименту, але положення щодо шкали «кут 2Θ » є константою і залежить лише від довжини хвилі рентгенівського опромінення λ . Розрахунок міжплощинної відстані проводиться з використанням формули Вульфа – Брегга. Рентгенівські рефлекси, звичайно, мають малу ширину (0,1–0,2 від 2Θ). Широкі рефлекси вказують на малі розміри частинок (наприклад у кістках).

Рисунок демонструє дифрактограми від порошку емалі і дентину. Перша від мікрочастин апатиту (вузькі піки), а друга – наночастин апатиту.

З рівняння Шеррера можна оцінити розміри кристалітів

$$D_{hkl} = (k \cdot \lambda) / \beta_{hkl} \cdot \cos\Theta,$$

де D_{hkl} – розмір кристалітів у напрямку (hkl) (в А); k – фактор форми (змінюється в інтервалі 0,8–1,2); λ – довжина хвилі (в А); β_{hkl} – ширина дифракційного піку (hkl) на піввисоті в радіанах для 2Θ (але не Θ) і кут дифракції Θ для даного (hkl) у радіанах.



Дифрактограми порошків дентину й емалі

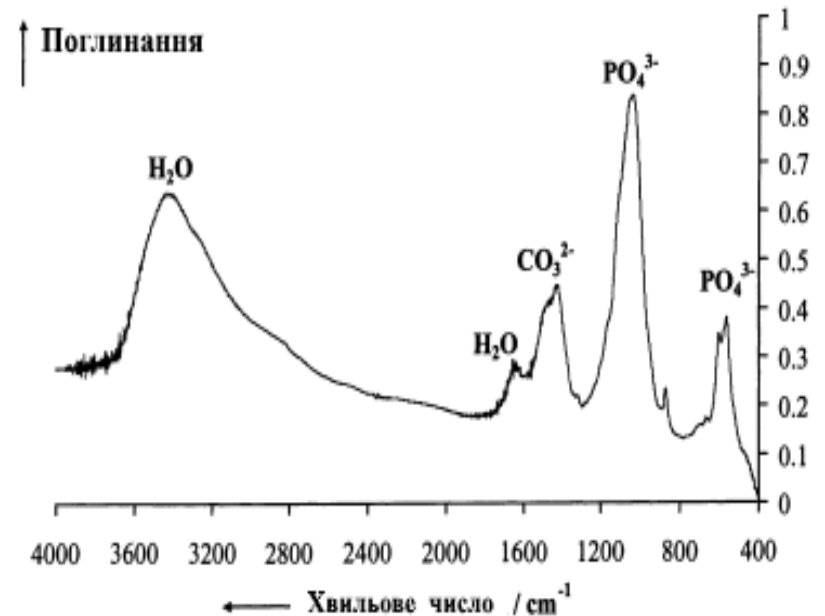
В обох випадках дифракція обумовлена фосфатом кальцію. Емаль дає вузькі піки добре кристалізованого апатиту, тоді як широкі дифракційні рефлекси від дентину характеризують наночастинку структуру апатиту.

Спектроскопічні методи

Взаємодію електромагнітного випромінення з речовиною можна використати для отримання інформації про її структуру. Цю групу методів називають спектроскопією. Здебільшого мова йде про вимірювання абсорбції, рідше – вимірювання емісії або відбитого випромінення. Залежно від довжини хвилі випромінення спостерігають різні процеси в речовині. Так, розрізняють ядерно-резонансну спектроскопію (NMR) (збудження ядерних спінів), коливальну спектроскопію (інфрачервона – IR і раманівська (збудження коливань молекул і решіток)), ультрафіолетову спектроскопію – UV (збудження електронів)).

Особливе значення в дослідженні структури біоматеріалів має IR- і R-спектроскопія. Рисунок демонструє ІЧ-спектр ФК, який містить карбонат і воду.

Співвідношення інтенсивності між різними смугами, наприклад, H_2O щодо C_3^{2-} нічого не означає щодо співвідношення цих сполук у зразку, тому що кожна смуга характеризується її власним співвідношенням кількості й інтенсивності.



Інфрачервоний спектр ФК, який містить карбонат і воду. Вісь поглинання спрямована вгору. Застосовують і протилежний напрямок (буде далі)

Електронно-мікроскопічні методи

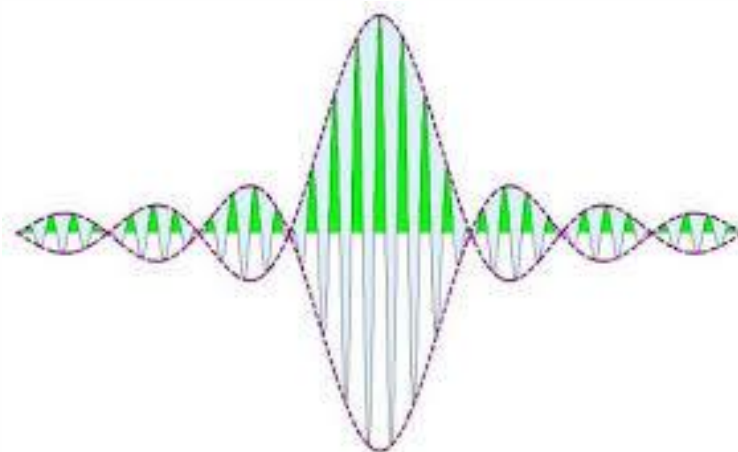
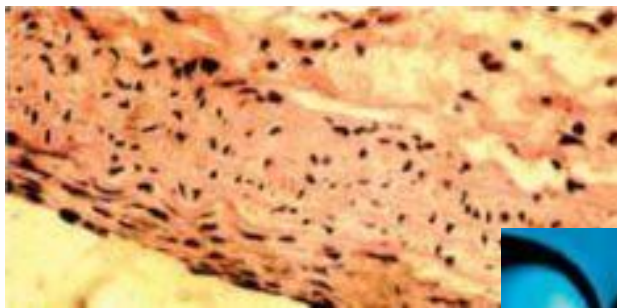
Оскільки роздільна здатність (РЗ) оптичного мікроскопа (0,2 мкм, тобто декілька сотень нм) є недостатньою використовують електронну мікроскопію (ЕМ, РЗ = 5–100 нм растрова ЕМ; 0,1–1 нм ЕМ на просвіт).

Як випромінювання використовують прискорені електрони (прискорювальна напруга від десятків до сотень кВ).

Хвиля де Бройля для таких електронів менша порівняно з видимим світлом

$$\lambda_{\text{дБ}} = \sqrt{150/V} \text{ \AA (ангстрем)}$$

для $V = 1 \text{ eV}$ $\lambda_{\text{дБ}} = 12,2 \text{ \AA}$, а для $V = 10\,000 \text{ eV}$, $\lambda_{\text{дБ}} = 0,122 \text{ \AA}$.

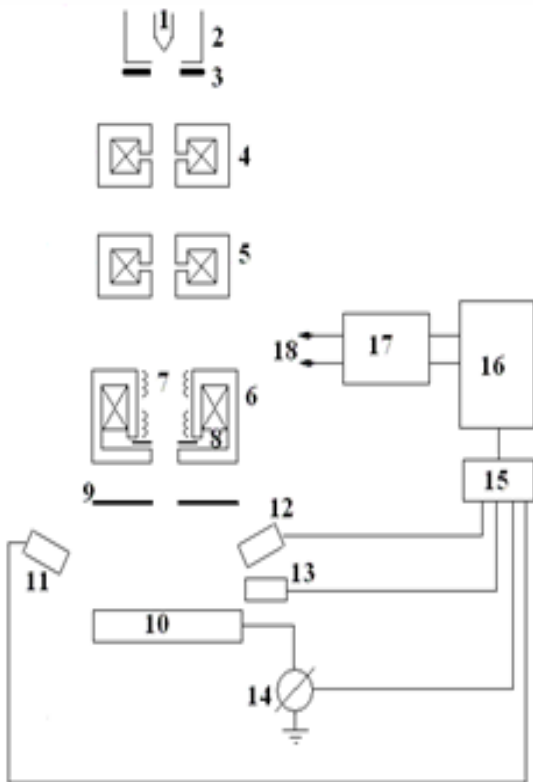


Растрова ЕМ

У растровій ЕМ (REM) поверхня зразка сканується сфокусованим електронним променем. Аналізуються розсіяні або електрони (вторинні), які випромінюються зразком. Унаслідок можна отримати чітке зображення поверхні.

Для зняття неведеного заряду на непровідний зразок напилюють провідну плівку (золото або вуглець), використовуючи для цього, наприклад, іонне розпилювання. Якщо цього не буде, то на поверхні з'являться заряди, які спотворять зображення і спричинять утворення білих плям унаслідок електростатичного відштовхування. ЕМ-дослідження проводять у високому вакуумі для запобігання поглинанню електронів повітрям.

Для **біологічних** зразків одночасно виникає проблема: їх необхідно зневоднити (висушити) і для цього використовують холод (фриз-драйнг).



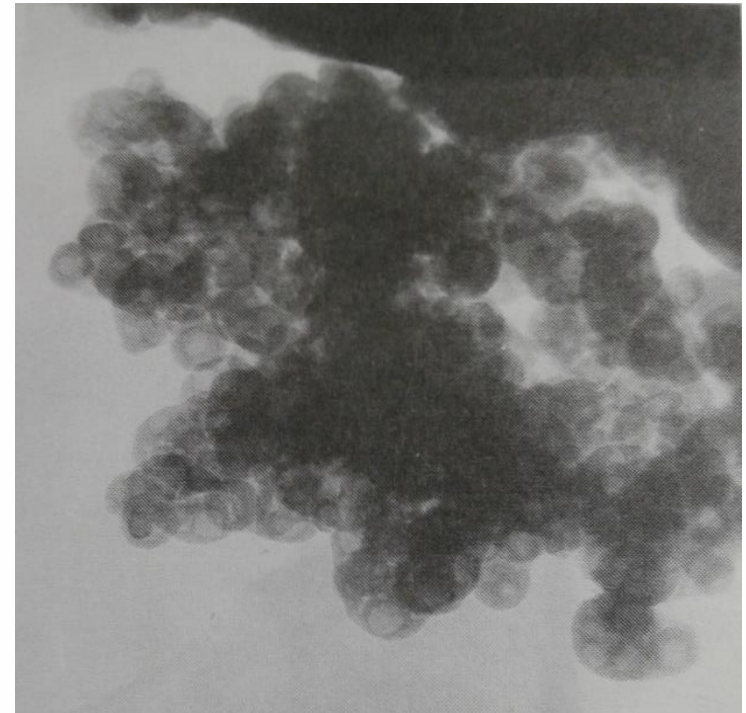
РЕММА-102: 1 – катод; 2 – фокусувальний електрод; 3 – анод; 4 – перша конденсорна лінза; 5 – друга конденсорна лінза; 6 – лінза об'єктива; 7 – котушка подвійного відхилення; 8 – діафрагма для обмеження розміру пучка; 9 – твердотільний детектор для реєстрації відбитих електронів; 10 – зразок; 11 – детектор Еверхарта – Торнлі для реєстрації відбитих і вторинних електронів; 12 – детектори рентгенівського випромінювання; 13 – детектор катодолумінесценції; 14 – потенціометр для реєстрації струму електронів пучка, що поглинаються; 15 – відеопідсилювач; 16 – електронно-променева трубка; 17 – генератор розгортки для керування збільшенням; 18 – вихід до котушок подвійного відхилення

Електронна мікроскопія на просвіт

ТЕМ заснована на дифракції електронів на кристалічній решітці (як і дифракція рентгенівських променів). Можна отримати дифракційну картину і кристалографічну інформацію від ділянки зразка дуже малих розмірів (близько 4 нм). На рисунку наведений знімок нанокристалічного ФК, отриманий В. Путляєвим із використанням ТЕМ.

Електронна мікроскопія на просвіт (ТЕМ) може надати більш високу роздільну здатність (0,1–1 нм) (для порівняння: радіус атома водню: 10^{-10} м = 1А). Зразки мають бути тонкими (0,05–0,2 мкм). Товщина визначається взаємодією електронів із матрицею (поглинання і розсіювання), яке може спричинити повне поглинання випромінювання для товстих зразків. Це ускладнює їхню підготовку. Для біологічних зразків тонкі зрізи готують із використанням мікротомів. Для ТТ достатньо використовувати тонкі кристали; масивні кристали стоншуються іонним бомбардуванням до досягнення необхідної товщини, але це може призвести до зміни структури зразка.

Для біологічних ультратонких зрізів необхідно підвищувати контраст важкими металами (осмій, свинець тощо), які адсорбуються на клітинних мембранах із ліпідами, тим самим роблячи їх більш щільними, і це приводить до затемнення таких зон на зображенні.

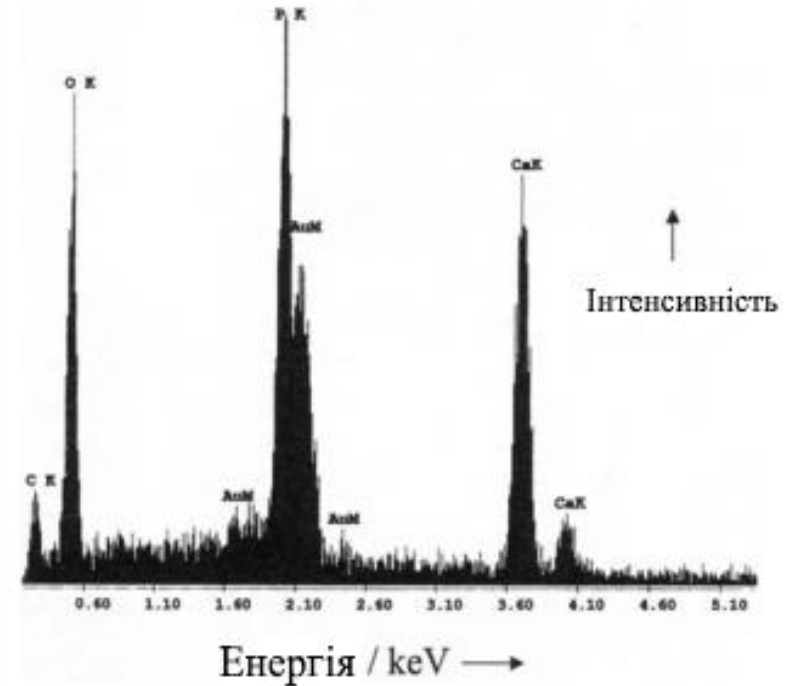


Аналітична ЕМ

АЕМ або енергодисперсійна рентген-спектроскопія (EDX) реалізується за допомогою приєднання додаткового обладнання до РЕМ або ТЕМ. Опромінення речовини електронами викликає іонізацію з подальшою емісією рентгенівських променів. Це так зване, *характеристичне рентгенівське випромінювання* для кожного елемента. Оскільки ЕП можна сфокусувати на малу площу (біля 10 нм²), то можна отримати інформацію про елементний склад із дуже малого об'єму зразка і тому можна знайти елементний склад окремих кристалітів. Інтенсивність ліній можна визначити якісно, якщо їх порівняти з відповідним стандартом.

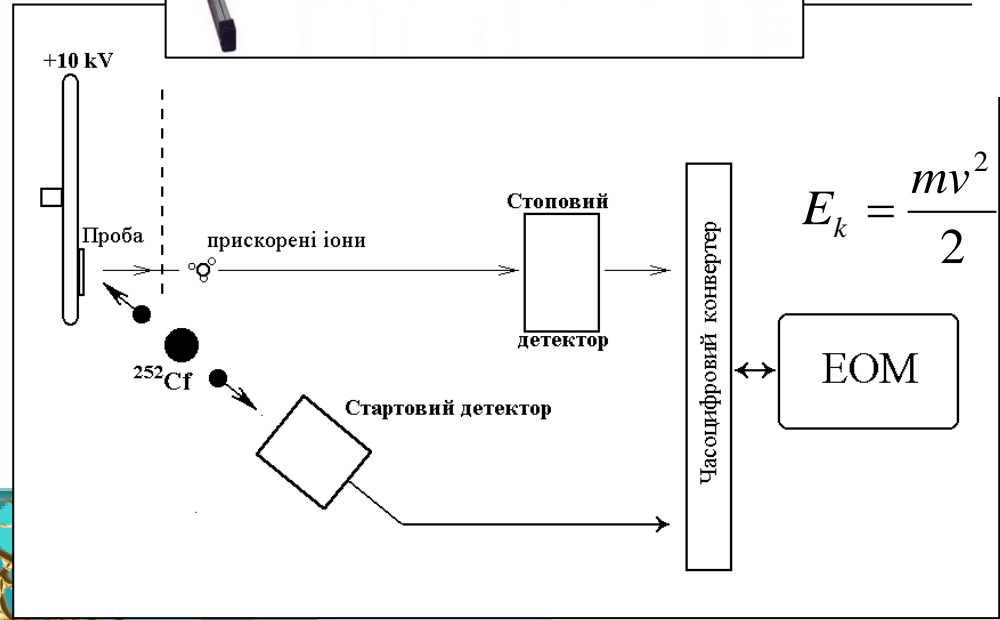
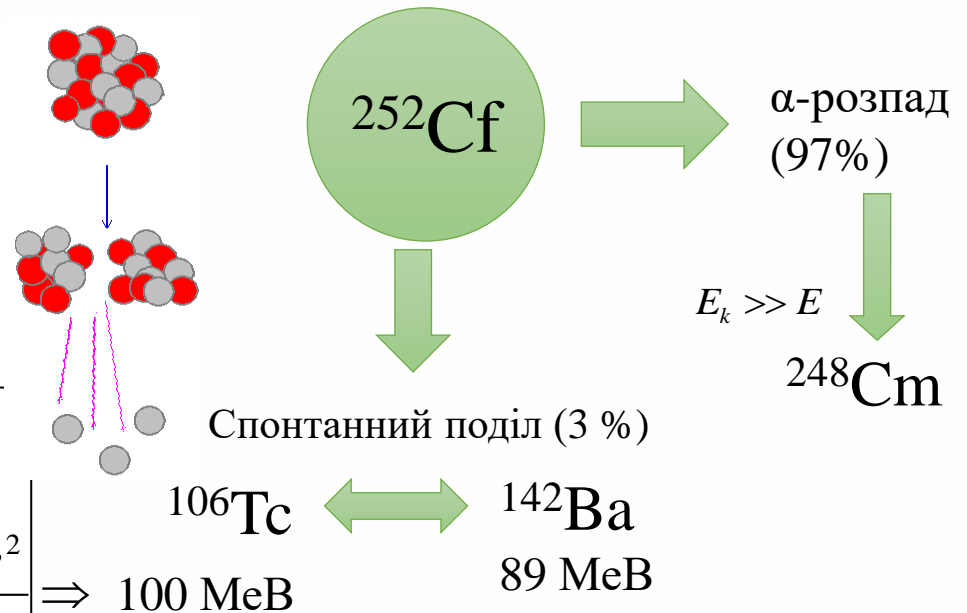
Рисунок демонструє EDX-спектр ФК, до якого входить незначна частка вуглецю. Лінії золота обумовлені напиленням тонкої золотої плівки на поверхню зразка для підвищення контрасту.

Під час позначення елемента використовуються назви орбіт в електронній оболонці.

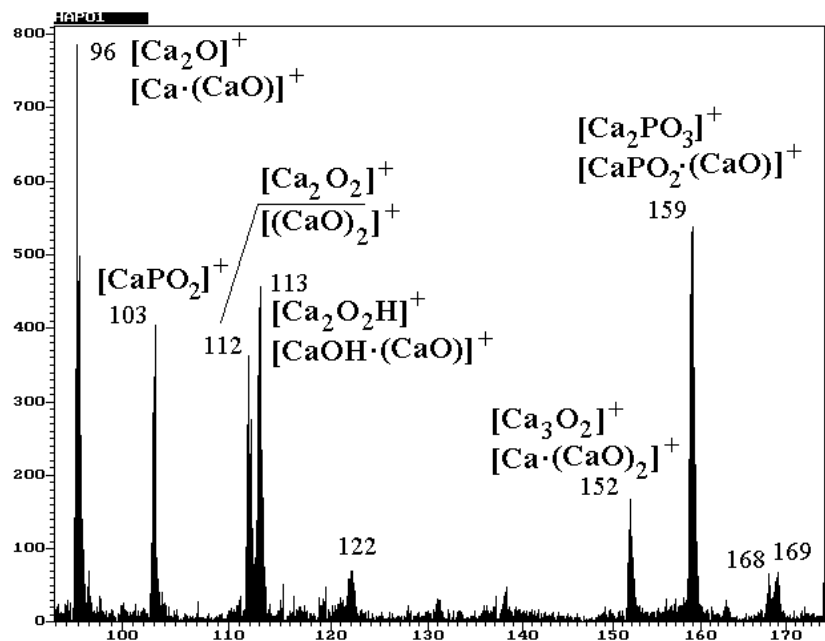


Енергодисперсійна рентгеноскопія ФК з незначним вмістом карбонату. Максимуми інтенсивності характерні для наявних елементів (С, О, Р, Са). Лінії золота (Au) обумовлені тонкою плівкою, нанесеною іонним напиленням

Плазмово-десорбційна мас-спектрометрія

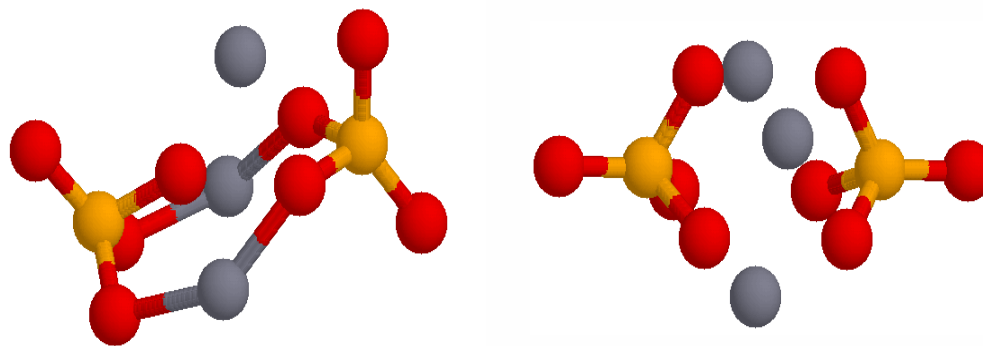


Мас-спектрометричне дослідження кальцій-фосфатних матеріалів



Ab initio моделювання КФ-кластерів

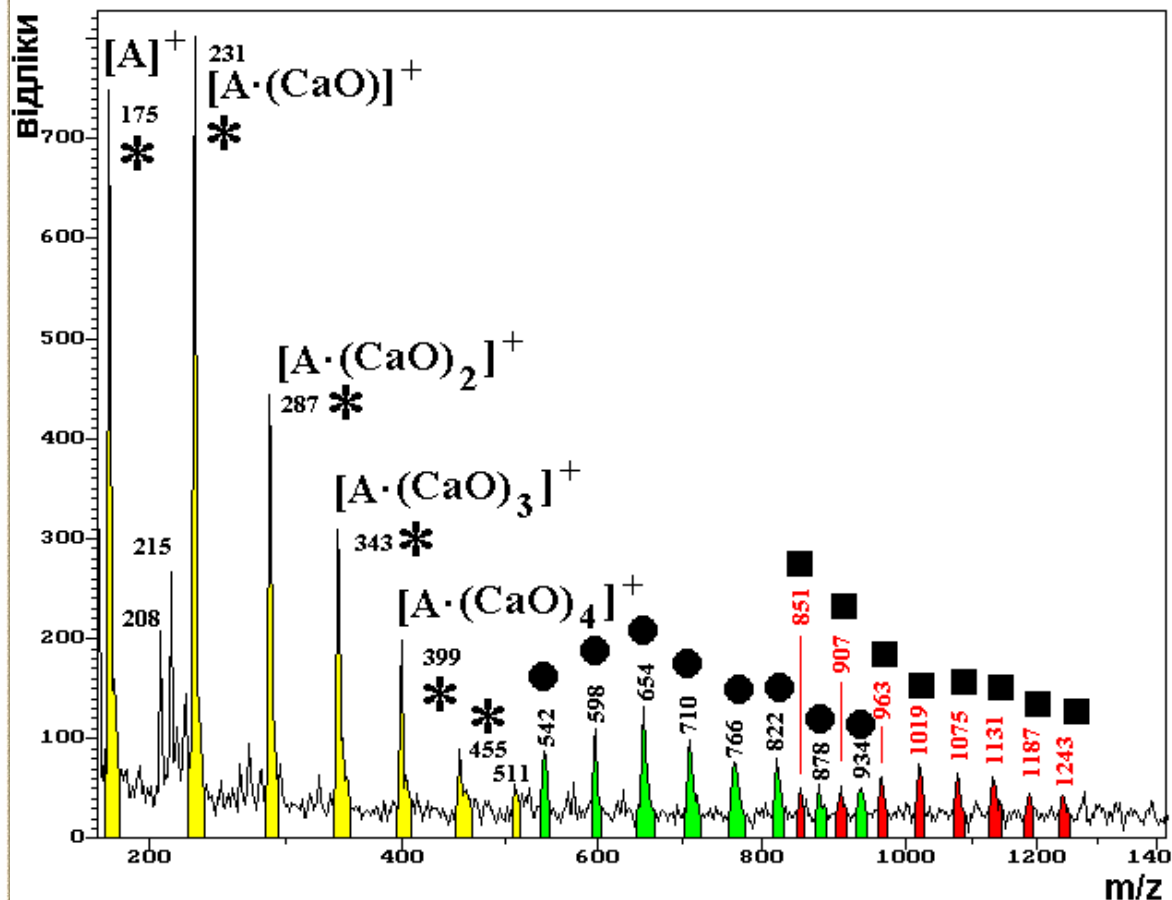
Результати для двох кластерів $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ щодо стабільності отриманих структур (права є більш стабільною) відповідають літературним даним.



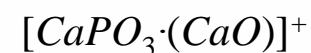
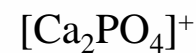
Об'єкти дослідження: штучні гідроксиапатити фірми «Кергап» (Київ)



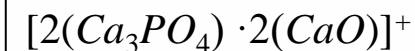
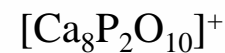
Мас-спектрометричне дослідження ГА (великі маси)



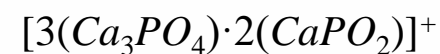
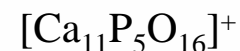
A – m/z 175



B – m/z 542

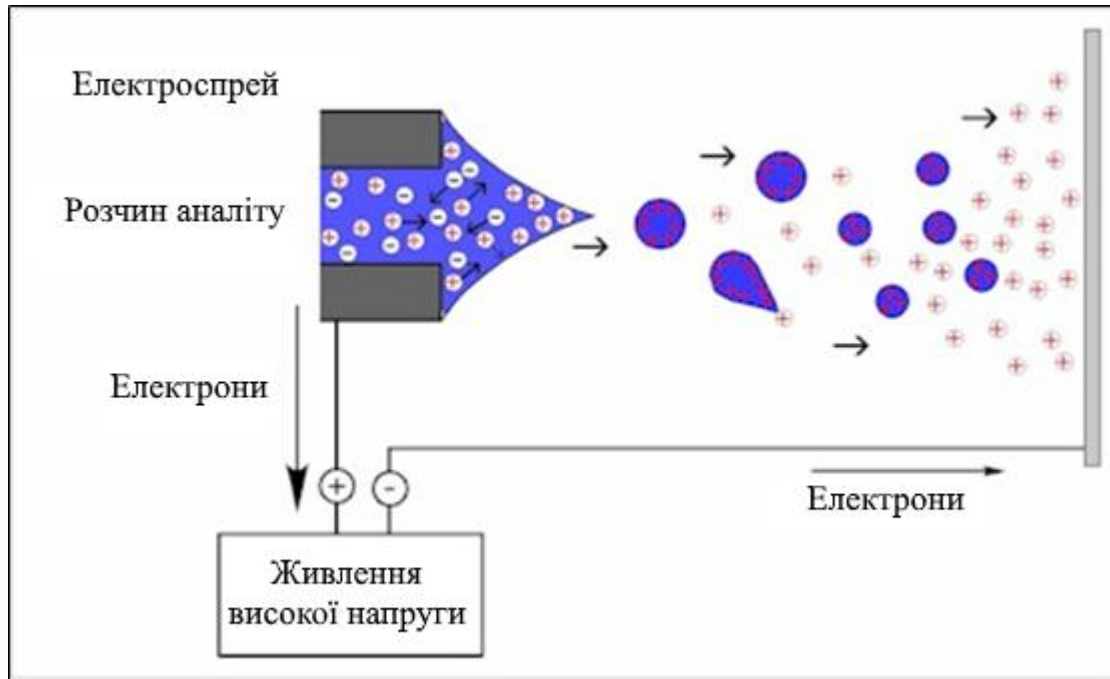


C – m/z 851



ПДМС мас-спектр іонів, ГА великі маси (символами *, ●, ■ позначено серії кластерних іонів)

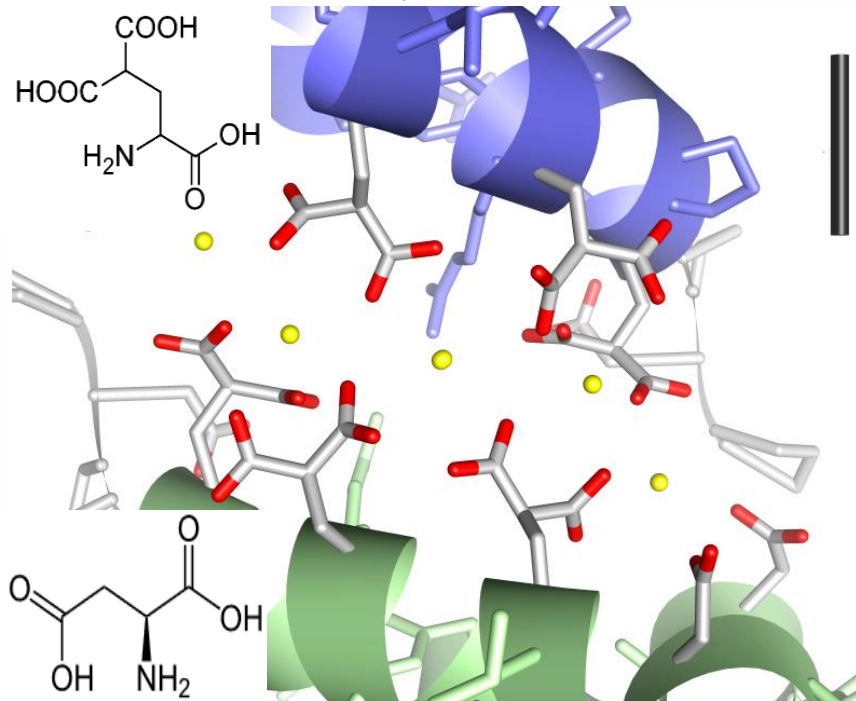
Дослідження зв'язування кальцію з остеокальцином методом «наноспрей» мас-спектрометрії



Мас-спектрометричні дослідження ОК і його комплексів з іонами кальцію та фосфатами кальцію проводили на гібридній установці NSI-FTICR-MS (Finnigan LTQ FTMS, Thermo Electron Co., Бремен)

Зв'язування кальцію з остеокальцином (мас-спектри)

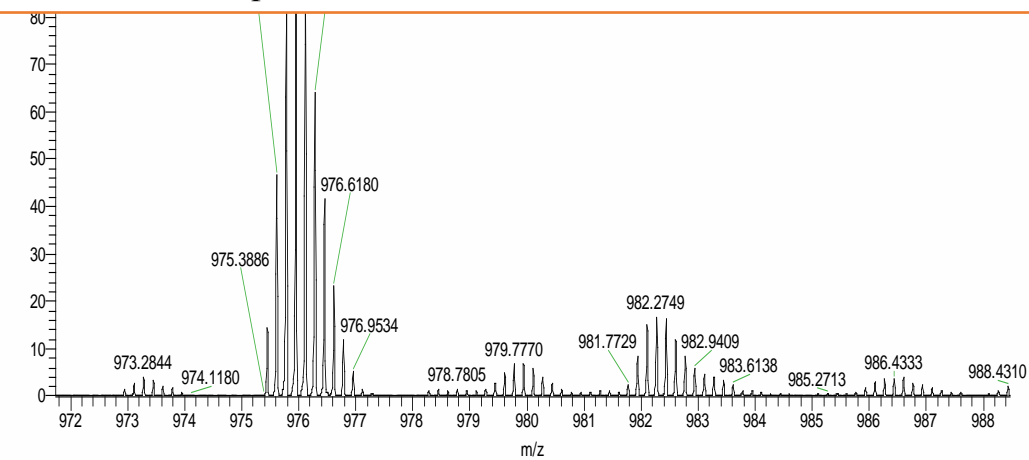
Структура Карбоксиглутамінової кислоти-Gla



L-аспарагінова кислота-Asp

Згори та знизу ділянки α -спіралей двох різних молекул ОК. Іони Ca^{2+} позначені кульками, на α -спіралях позначені залишки gla та asp. Масштабна лінійка справа угорі дорівнює 5 Å.

Кальцій трапляється в природі у вигляді суміші шести ізотопів: ^{40}Ca , ^{42}Ca , ^{43}Ca , ^{44}Ca , ^{46}Ca і ^{48}Ca , серед яких найбільш поширений – ^{40}Ca – становить 96,97 %.

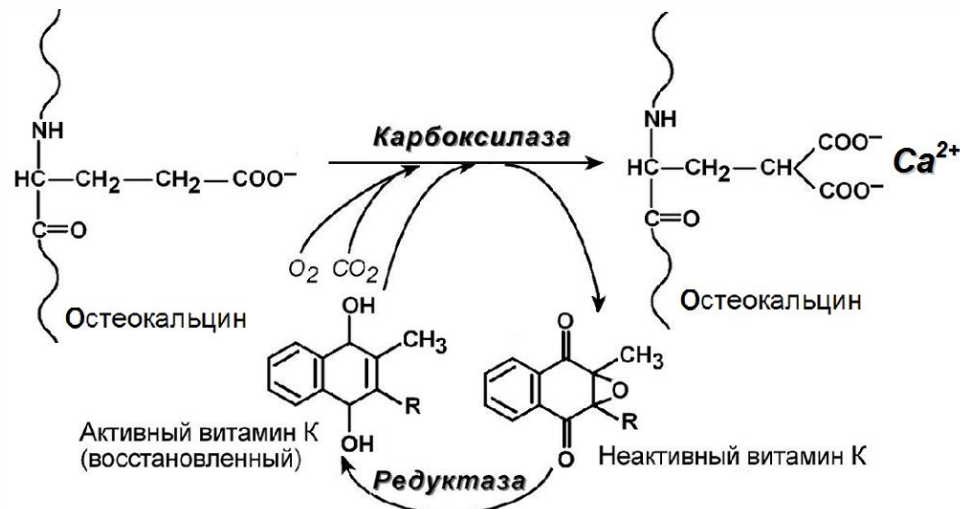


На всіх отриманих мас-спектрах розрізняються дві групи піків: окислена форма ОК із трьома іонами кальцію та ОК із тим же самим числом іонів кальцію, але без додаткового атома кисню. Співвідношення інтенсивностей відповідних піків становлять:

з O: 100 (0 Ca, 6 H) : 50 (1 Ca, 4 H) : 9 (2 Ca, 2H) : 0,8
(3 Ca, 0 H)
без O: 60 (0 Ca, 6 H) : 100 (1 Ca, 4 H) : 100 (2 Ca, 2 H) : 60
(3 Ca, 0 H)

Висновки з мас-спектрометричних досліджень ГА і остеокальцину

1. Знайдено три чітко окреслені серії характеристичних іонів у мас-спектрах гідроксиапатиту, що відрізняються одна від одної на 56 масових одиниць і зводяться до найпростіших кластерів $[\text{Ca}_2\text{PO}_4]^+$, $[\text{Ca}_8\text{P}_2\text{O}_{10}]^+$ та $[\text{Ca}_{11}\text{P}_5\text{O}_{16}]^+$.
2. Окислена та неокислена форми остеокальцину зв'язують три іони кальцію Ca^{2+} на одну молекулу остеокальцину (ОК).
3. Зв'язування з чистим ОК характеризується значно більшою інтенсивністю завдяки іонним місткам із залишками **Gla** (карбоксиглутамінова кислота, мол. маса = 191) у молекулі ОС.

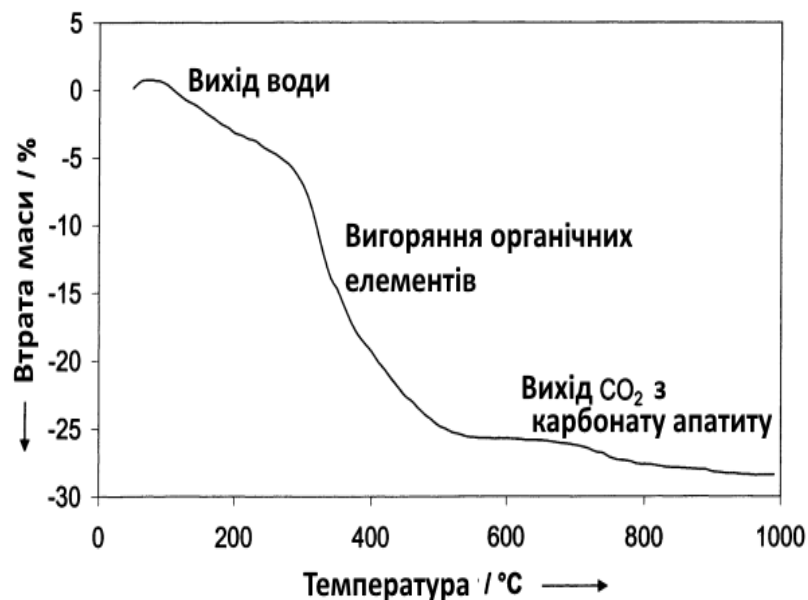


Термічний аналіз

За ТА зразок нагрівається за постійної фіксації його маси. Отже, можна якісно простежити, наприклад, процеси розпаду (вихід води, розклад карбонатів) або процеси корозії (окислення металу).

Під час зміни атмосфери в печі можна отримати деякі параметри речовини: на повітрі або в кисні спостерігається окиснення, в азоті або аргоні – піроліз. Типовими параметрами для ТА є інтервал температур від кімнатної до 1400 °С, а маса зразка – від 10 мг до 100 мг.

Рисунок демонструє термограму зразка природної кістки під час дослідження на повітрі. Три стадії втрати ваги містять втрату води (близько 5 %). Згоряння органічних складових (наприклад, колагену; близько 22 %) і вихід CO₂ з мінеральної фази карбонатного апатиту.



Термогравіметрична крива для зразка із природної кістки

Зразок нагрівався на повітрі з постійною швидкістю (10 К · хв⁻¹). Стадіям втрати маси можна порівняти хімічні процеси.

МЕХАНІЧНІ МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Для БМ твердість і пружність є дуже важливими параметрами. Встановлено, що для багатьох біоматеріалів (зуби, кістки) оптимальні механічні властивості є визначальними. Тому необхідно приділити увагу деяким важливим механічним величинам і методам їхнього визначення.

У сучасному матеріалознавстві такі механічні величини, як твердість, ударна міцність, адгезія або пружність мають бути не лише виміряні, а й оптимізовані.

Мікроскопічні причини, які визначають механічні властивості зрозумілі недостатньо.

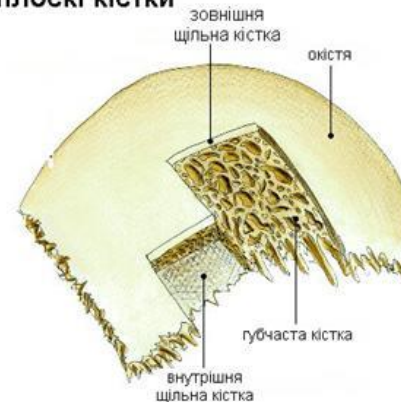
Основною проблемою є простота описання («твердий», «м'який», «пластичний», «гнучкий»). Але таке якісне описання досить важко зробити і, крім того, значною мірою визначається вибраним методом дослідження.

Визначені стандартні методи контролю, які не завжди ґрунтуються на суворих фізичних принципах. Для цього класу матеріалів наводяться лише результати порівняних вимірювань.

Таблиця 1. Фізичні властивості кісткової тканини

Тип кістки	Модуль Юнга, Па	Коефіцієнт Пуассона
Кортикальний шар	17,6e9	0,3
Спонгіозний шар	5,0e8	0,28
Метилметакрилат	2,2e9	0,35
Титан BT-16 і BT-6	1,12e11	0,32
Медична сталь 17X18H9	2e11	0,3

плоскі кістки



Пружність і пластичність

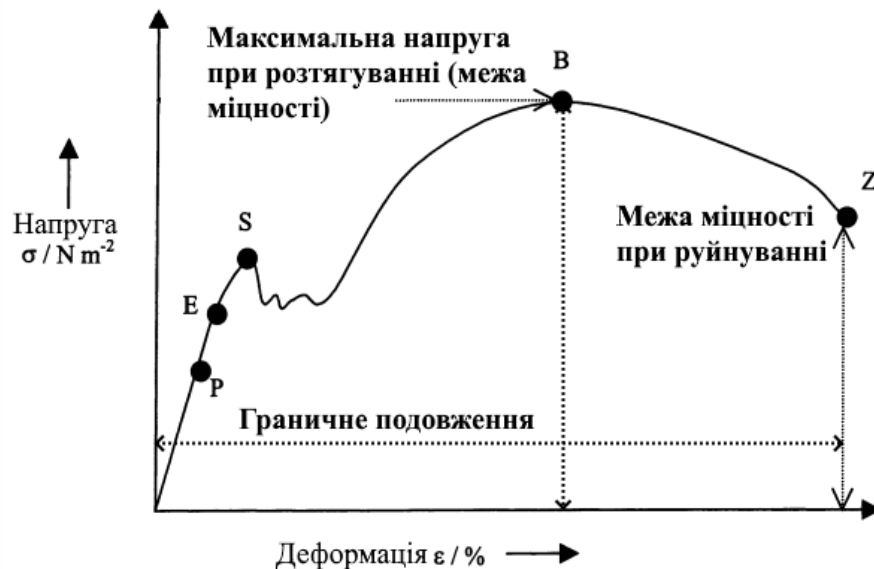
Якщо до циліндра довжиною l і поперечним перерізом A прикласти силу F вздовж осі, то довжина циліндра збільшиться на Δl у напрямку сили або зменшиться (деформація під час стискання). Для малих деформацій справедливе рівняння

$$\varepsilon = \Delta l / l = F / A = \sigma / E,$$

де $\varepsilon = \Delta l / l$ – відносна деформація; $\sigma = F / A$ – напруження (в Па) і E – модуль пружності або модуль Юнга (в Па).

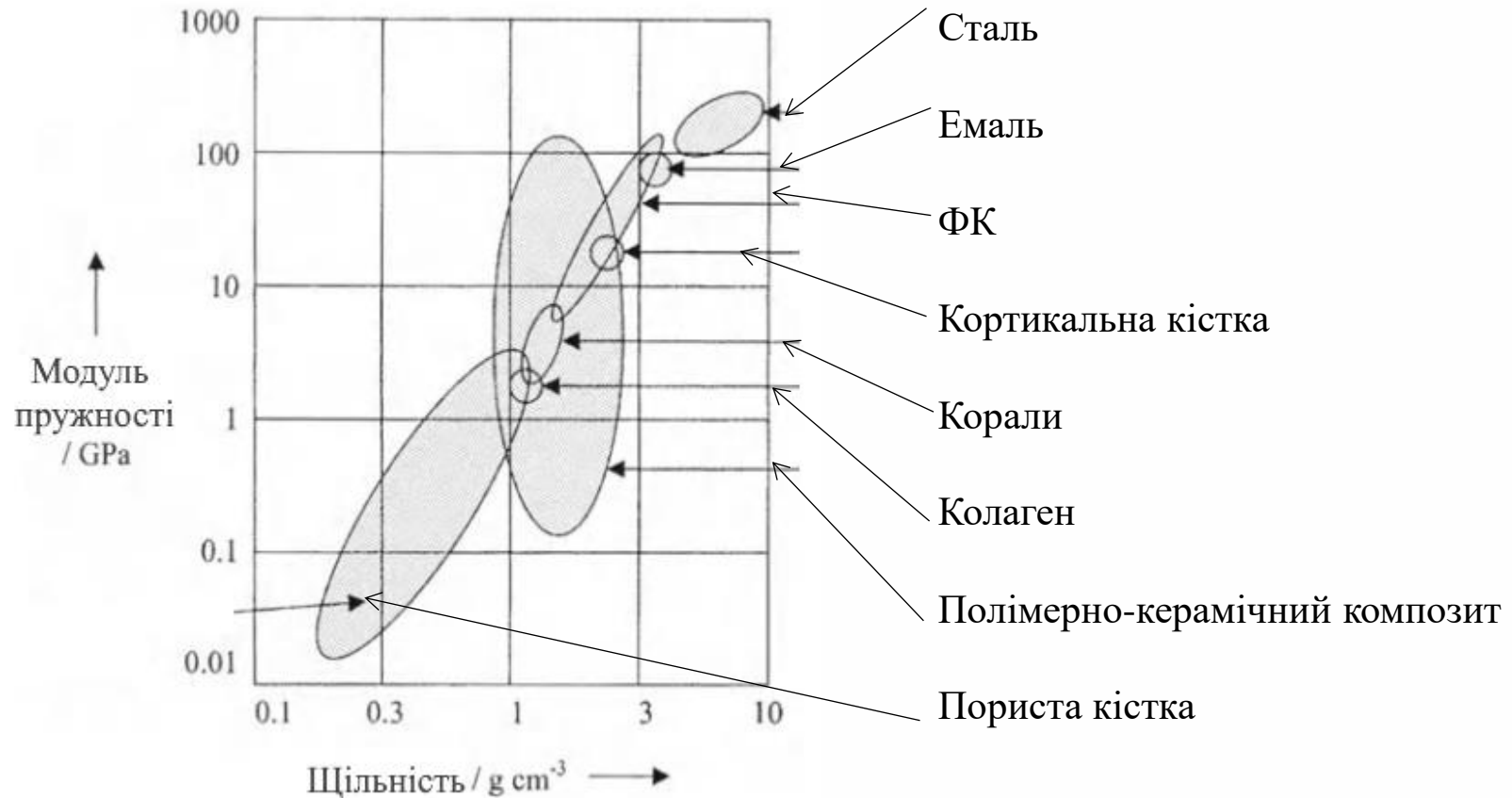
«Тверді» (слабка деформація) матеріали мають високий модуль пружності, і навпаки, «м'які» матеріали (сильна деформація) мають низький модуль пружності. Наприклад, кістки мають модуль пружності від 340 МПа до 13,8 ГПа, дентин – 15 ГПа, емаль – 80 ГПа, **гідроксиапатит – 10 ГПа**, титан – 105 ГПа, Al_2O_3 – 300 ГПа. Для знаходження модуля пружності використовують закон Гука: *подовження пропорційне силі, яка викликає це подовження.*

Наведене співвідношення добре визначається на діаграмі «напруження – деформація розтягування» (рис.).



Ідеалізована діаграма «напруження – деформація розтягування» металевого матеріалу в експерименті на розтягування. На кривій у точці E досягається пластична деформація (границя пружності). Якщо матеріал деформувати далі, то деформація залишається після зняття напруження. Позначка S називається межею плинності. Далі зразок стає нестабільним, тобто поперечний переріз зразка зменшується. Позначка B, у якій до зразка прикладена максимальна напруження називається межею міцності, це максимальна напруження, яку витримує зразок.

Механічні дані деяких типових біоматеріалів і біомінералів



Показаний модуль пружності залежно від щільності відповідного матеріалу.

Пластичність

Пластичність – це властивість матеріалу деформуватися без руйнування (позначка В на діаграмі). Кількісне описання пластичності утруднене через складність цього явища.

У загальному вигляді пластичність можна визначити як відносне подовження (у відсотках) зразка або як відносне зменшення поперечного перерізу зразка (також у відсотках) під час його руйнування щодо ненавантаженого зразка

$$D = 100 (A_o - A_f)/A_o \%,$$

де A_o – площа поперечного перерізу зразка до навантаження; A_f – площа поперечного перерізу після руйнування. Пластичними називають матеріали з $D > 50 \%$.

Це означає, що площа поперечного перерізу зразка може зменшитися на половину без його руйнування (у разі збереження об'єму це відповідає подвоєнню довжини зразка).



Твердість

Твердість вимірюють так. До поверхні зразка матеріалу притискають більш твердий зразок (індентор). Величину твердості можна знайти за допомогою вимірювання площі або глибини вдавнення інтендора за певного навантаження, площі поверхні інтендора, його геометрії і температури випробування. Залежно від інтендора отримують різні величини твердості.

Відомий метод **Брінеля** (індентор – кулька із сталі або карбиду вольфраму), метод **Вікерса** (алмазна піраміда), метод Кнупа (алмазна піраміда) і метод Роквелла (алмазний конус або сталеві кульки різних діаметрів).

Відомий метод вимірювання твердості за **Моосом** заснований на дряпанні матеріалу індентором. Якщо матеріал можна подряпати, то він м'якше, ніж індентор.

Шкала твердості за Моосом змінюється від 1 до 10, де «1» – тальк, «2» – гіпс або NaCl, «3» – кальцит, «4» – флюорит, «5» – апатит, «6» – польовий шпат, «7» – кварц, «8» – топаз, «9» – корунд, «10» – алмаз.

Поняття «твердість» неможливо описати на мікроскопічному рівні. Твердість залежить, насамперед від сил взаємодії між атомами або молекулами і структури матеріалу (розміри, геометрія і кристалічна структура окремих кристалів).

Повзучість, втома, зношення

Повзучість – це властивість матеріалу деформуватися з часом за постійного навантаження. Одночасно вивчається механічна поведінка матеріалу залежно від часу. Матеріал руйнується переважно за в'язким механізмом (повзучість) за температур 0,3–0,4 від температури плавлення.

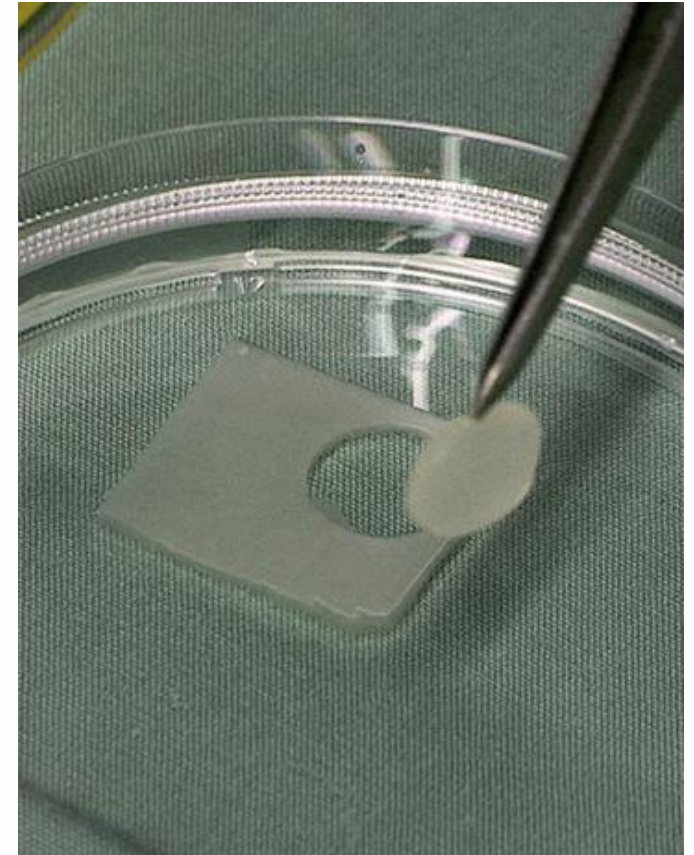
Втома. Під час багаторазових механічних навантажень, нижчих ніж межа плинності, може спостерігатися істотне зниження механічних властивостей (наприклад, межі міцності під час розтягнення). Це означає, що багаторазово зігнута проволока має суттєву меншу міцність під час розтягнення порівняно з проволокою без такої деформації. Причиною цього є мікроскопічні зміни в мікроструктурі матеріалу, які можуть призвести до виникнення мікротріщин. Вони є концентратами напруги, і матеріал стає менш міцним, ніж раніше.

Зношення – зношування матеріалу під час механічних навантажень в умовах тертя. Застосування мастила ефективно знижує зношення матеріалу. Для зменшення зносу під час тертя поверхні, які стикаються, мають бути гладкими, тверді частинки між ними в трибоконтакті мають бути видалені і матеріали повинні бути притертими один до одного (наприклад, ендопротез: твердий – м'який = сталь – поліетилен або твердий – твердий = кераміка – кераміка).

БІОЛОГІЧНІ МЕТОДИ КОНТРОЛЮ

Біологічна сумісність БМ має бути гарантована перед кожним клінічним застосуванням. Водночас спочатку використовуються методи випробувань *in vitro* (у пробірці) – до того, як розпочати експерименти на тваринах і клінічні випробування на людях. Головними аспектами випробувань є:

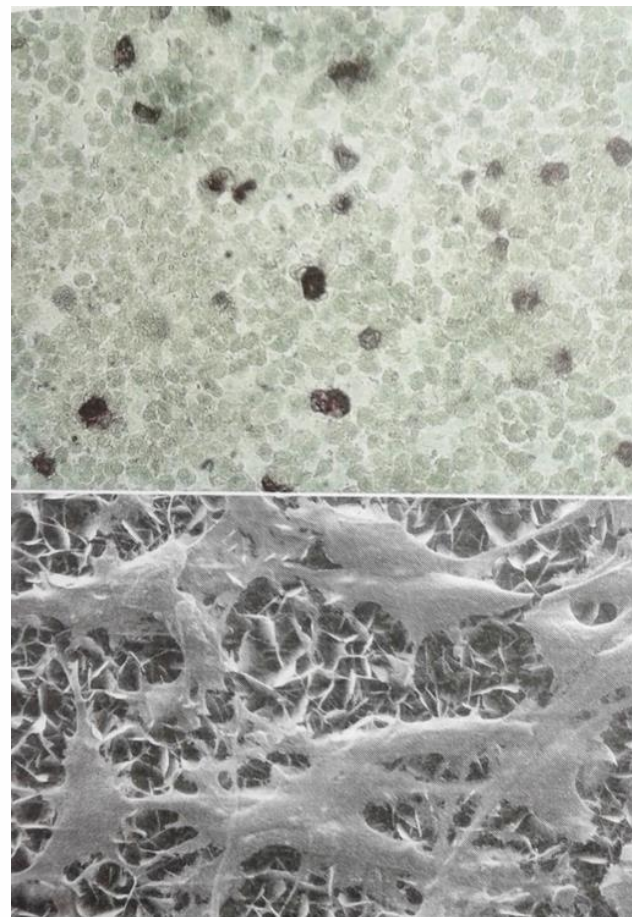
- реакції біологічних клітин і тканин на матеріал («терпимість» матеріалу);
- токсичність – властивість деяких хімічних елементів, сполук і біогенних речовин згубно впливати на живі організми (рослини, тварини, гриби, мікроорганізми) і здоров'я людей (бензопірен, важкі метали, кислотні сполуки, оксиди азоту, сірки);
- мутагенність (фізичні і хімічні чинники, що викликають стійкі спадкові зміни – мутації) та канцерогенність (здатність спричиняти виникнення злоякісних новоутворень);
- імуногенність – це здатність викликати імунну відповідь, тобто стимулювати цілу низку подій, необхідних для активації імунних клітин, та виконання ними специфічних функцій.



Біологічні методи контролю (тестування на культурах клітин)

Реакція біологічних клітин і тканин на матеріал тестується на культурах клітин, з якими БМ буде контактувати в місці його імплантації. Одночасно використовують, наприклад, остеобласти і остеокласти (під час контакту з кістковою тканиною), фібробласти (із з'єднувальною тканиною), ендотеліальні клітини внутрішнього шару кровоносних судин і тромбоцити (контакт із кров'ю), клітини гладеньких м'язів (контакт з артеріями). Критеріями є, зокрема: морфологія клітин (більш сприятливо розпластування клітин), кількість живих і тих, які діляться (проліферація), кількість загиблих клітин. Живі клітини утворюють моношар на поверхні матеріалу доти, поки не стикаються одна з одною. Поряд із морфологічними дослідженнями (наприклад, із використанням світлової мікроскопії або REM), для визначення терпимості (толерантності) застосовують гістологічні дослідження з відповідним фарбуванням (рис.).

На рисунку зображено, згори: оптична мікроскопія первинної культури клітин людини, ізольованих із губчатої кістки. Темнофарбовані клітини з активною луговою фосфатазою (остеобласти), світлофарбовані клітини не є остеобlastами. **Знизу:** растрова ЕМ клітин, схожих на остеобласти, на поверхні фосфату кальцію [1].



Маркери діяльності клітин

Маркери діяльності клітин:

- продукція ферментів (фосфатази для остеобластів і фібробластів);
- продукція остеокальцину (для остобластів);
- продукція колагенів (фарбування за ван Гізоном – для остеобластів, фібробластів, хондробластів);
- продукція ФК (фарбування за фон Коссом – для остеобластів);
- продукція ДНК, ензимів (ферментів) і протеїнів (білків).

Застосовують різні культури клітин. Розрізняють первинні клітинні культури (отримані за допомогою виділення з організму людини і тварин) і клітинні лінії, які зберігаються в рідкому азоті в клітинних банках. Останні, зазвичай, є іморталізованими (безсмертними) клітинами, ймовірніше, пухлинні клітини, здатні безкінечно ділитися поза організмом. Розмноження первинних клітин обмежено певною кількістю поділів, також вони можуть містити домішки інших клітин (наприклад, трапляються фібробласти в культурі остеобластів). Клітинні лінії «чистіші», тобто складаються з одного виду клітин, які утворюють клон (групу дочірніх клітин, отриманих із однієї материнської клітини). Також необхідно мати на увазі, що клітини одного виду, отримані від людини або тварин (наприклад, миш), можуть давати різні реакції на БМ, що обумовлено їх різною чутливістю до біологічних, фізичних і хімічних факторів.

У разі успішного тестування БМ *in vitro* дослідження продовжують на тваринах, у яких досліджувані біоматеріали імплантуються у відповідні тканини (наприклад, кісткову, м'які тканини тощо).

Біологія клітин

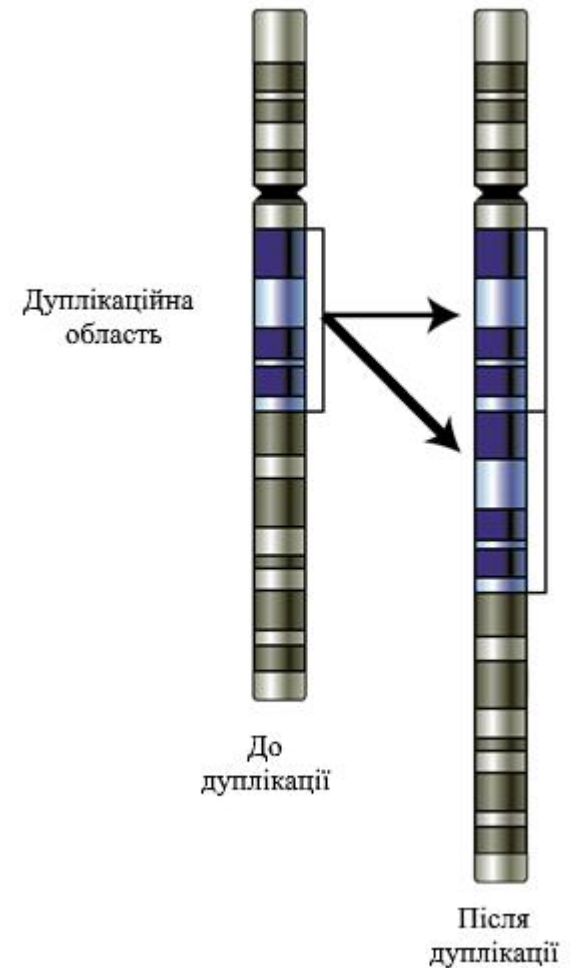
Відкриття клітин приписують Роберту Гуку (R. Hook), англійському мікроскопісту, який у 27 років став куратором Royal Society – англійської найпередовішої наукової академії того часу (VII ст.). Серед багатьох питань Гук намагався дізнатися чому пробки, зроблені з кори дубу, так ефективно утримують повітря в бутилі. Під час мікроскопічних досліджень відповідних зразків були помічені маленькі пори, які нагадували бджолині стільники, які він назвав **клітинами** (cells) тому, що вони нагадували келії (cells) монахів монастиря.

Насправді Гук спостерігав пусті стінки клітин мертвої тканини дерева, які були створені живими клітинами. Але пройшло багато років і лише починаючи з 30-х рр. XIX ст. важливість поняття клітин розпочали обговорювати вчені (Matthias Schleiden, Theodor Schwann), які твердили, що клітини виникають із неклітинних матеріалів (це твердження існувало багато років) до 1855 р., коли Rudolf Virchow, патолог із Німеччини, зробив головний догмат: **«клітини виникають за допомогою поділу вже наявної клітини»**).



Декілька ремарок, щодо загальних властивостей клітин

- надзвичайно складні й організовані;
- мають генетичну програму і способи її реалізації;
- здатні продукувати самих себе;
- отримують і використовують енергію електромагнітного випромінення Сонця, яка через фотосинтез конвертується в хімічну енергію, яка зберігається в карбогідратах (starch, sucrose); у людському організмі реліз глюкози в потік крові для циркуляції по тілу здійснюється печінкою;
- запускають різні хімічні реакції;
- задіяні в багатьох механічних активностях;
- здатні реагувати на стимули;
- здатні до самоорганізації, наприклад, нездатність клітини на корекцію помилок під час дуплікації ДНК спричиняє ослаблення росту клітин, що викликає виникнення ракових клітин.



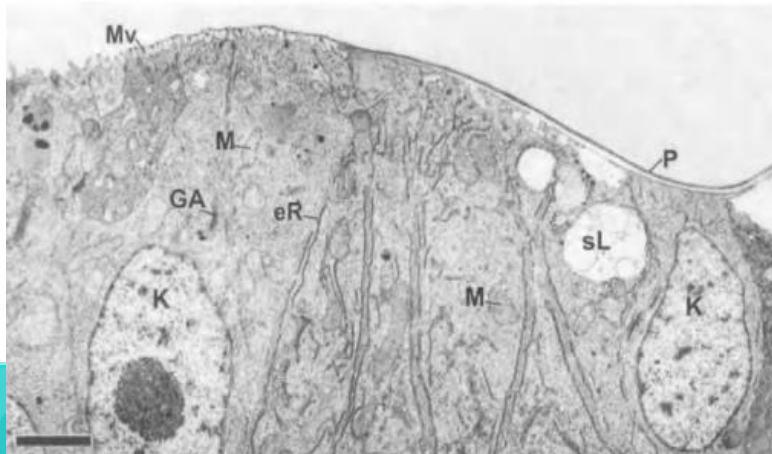
Субклітинні структури

Отже, клітини як найдрібніші структурні одиниці живого організму виконують основні функції, які притаманні всьому організму, зокрема **обмін речовин, ріст, рух, спадковість і розмноження**.

Існують одноклітинні живі істоти, які, здебільшого, складаються з одного типу спеціалізованих клітин. Аналогом таких клітин у багатоклітинних організмах є **остеобласти, фібробласти, еритроцити та інші**. Сукупність однаково спеціалізованих клітин називається тканиною.

В органі зосереджені тканини, які виконують основні функції (**паренхіма**), а також з'єднувальна тканина і її похідні, які створюють строму (**біомеханічний каркас органів**). Всі клітини мають зовнішню мембрану з подвійного фосfolіпідного шару. У мембрану клітини проникають білки, які можуть служити, наприклад, каналами для іонів або рецепторами для різних сигналів і завдяки цьому зв'язують клітину із зовнішнім світом.

Між тваринними і рослинними клітинами немає принципової різниці.



ЕМ-знімок на просвіт зрізу тканини, яка утворює черепашку ембріона равлика. На верхньому лівому краю починається утворення Periostrakum (P) – клітин, зайнятих пальцеподібними наростами Microvilli (M_v). Наступні клітини добавляють матеріал до відділення, двошаровий Periostrakum на правому від тканини краю зображення. За органами клітин можна розпізнати: ядра клітин (K), численні мітохондрії (M), ендоплазматичний ретикулум (eR), ретикулярний шар якого тягнеться вздовж границь клітин, одиночні апарати Гольджі (GA), вторинні лізосоми (sL), у яких спостерігаються мембрани мітохондрій, які розпадаються. Масштаб: 2 мкм (J. Margen).

ЛЕКЦІЯ 3. БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЯ І БІОМАТЕРІАЛИ



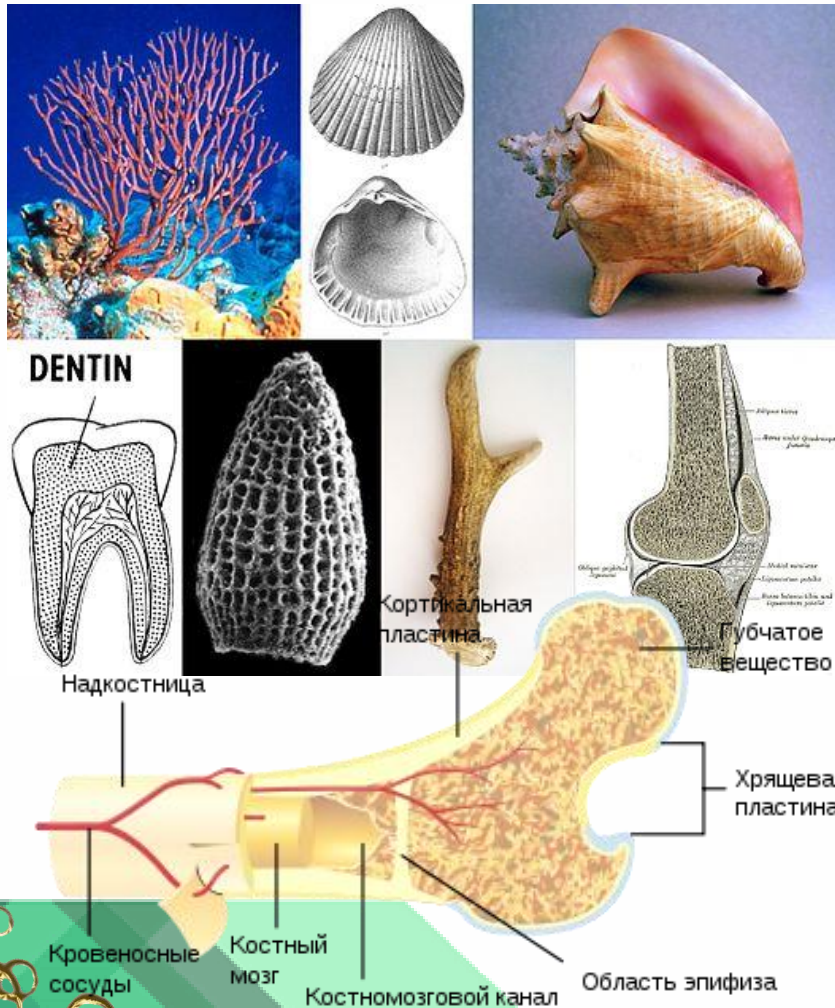
ПРИКЛАДИ БІОМІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН

Біомінералізація – це процес, за допомогою якого живі організми утворюють мінерали, часто роблячи твердими або в'язкими наявні тканини.

Такі тканини називають **мінералізованими (МТ)**.

МТ – це біологічні тканини, що містять мінерали в м'якій матриці. Зазвичай ці тканини утворюють захисний щит або структурну підтримку.

Приклади **МТ**: морська губка, морська раковина, молюск, дентин, радііларіан (*одноклітинна водяна тварина, яка має сферичне амебоподібне тіло з кремнеземовим скелетом*), роги, кістка.



СУТЬ БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ

Процес біомінералізації істотно визначається прямим або непрямим контролем живих організмів і посередництвом (mediation) органічних молекулярних шаблонів (templates), такими як протеїни й інші макромолекули.

У багатьох випадках, кристали і структури, утворені завдяки біомінералізації, містять органічні макромолекули за стратегією «знизу-вгору» (bottom-up); утворені гібридні БМ демонструють специфічні та унікальні поверхневі, оптичні, хімічні і механічні властивості, які перевершують їх в індивідуальних двійниках (counterparts).

Тому розуміння біомінералізації на молекулярному рівні, а також оцінювання співвідношення «структура – властивості» в БМ є однією з топових тем багатьох дослідників протягом останніх 20 років.

За ці роки стали відомі ключові аспекти процесу біомінералізації, які містять у собі взаємодії в інтерфейсі органічно-неорганічних складових, гідратний стан мінералів на різних стадіях їхнього утворення, властивості водного розчину, у якому протікає процес, а також факт, що біомінералізація відбувається за кімнатної (ambient) температури за допомогою формування фаз перехідних прекурсорів (precursor transient phase).

Але багато ще залишається незрозумілим в цих витончених (sophisticated) і відточених еволюцією механізмах формування мінералу, що залишає сферу цих досліджень серед переліку гарячих тем досліджень, нових доказів і гіпотез сучасного медичного матеріалознавства і біомедичної інженерії. Так, наприклад, пізнання ролі органічних молекул – у поліморфному відборі ліпідів і полісахаридів у процесі біомінералізації або органічної матриці у структурі деяких біомінералів у різних розмірних масштабах.

Головна мотивація дослідників – це зрозуміти досконально біомінералізацію для використання цього як парадигми (приклад) нових способів синтезу новітніх функціональних матеріалів структурно максимально подібних природним на різних розмірних рівнях.

КЛАСИ БІОМАТЕРІАЛІВ (БМ)

Виготовлення матеріалів для біомедицини вимагає підвищених вимог до їхніх властивостей.

Взагалі необхідне міжгалузеве співробітництво між матеріалознавцями, медиками і біологами для створення оптимальних матеріалів.

Необхідно розглядати три сфери властивостей, які разом становлять поняття *біосумісності* матеріалів: механічна (мати низький модуль пружності, значну обернену деформацію та високу міцність), хімічна (корозійна стійкість і зносостійкість) і біологічна сумісність (нетоксичі).

Часто дослідники йдуть на компроміси, оскільки не всі параметри БМ оптимально поєднуються.

Сучасні можливості пропонують широкий вибір матеріалів, які можна комбінувати, і створювати *композитні* матеріали, щоб досягти кращих властивостей.

МЕХАНІЧНА, ХІМІЧНА І БІОЛОГІЧНА СУМІСНІСТЬ

Механічна сумісність: прикладом вимог є міцність фіксації ендопротеза, міцність фіксації зубного імплантату, достатня міцність зубного протеза, оптимальна міцність під час стискання штучної кровоносної судини за достатньої її еластичності.

Прикладами проблем є пористість ендопротеза, поломка болта за остеосинтезу, або виведення із ладу штучної кровоносної судини.

Хімічна сумісність: прикладами вимог є швидкість корозії імплантату (зокрема, у разі заміни кістки), відсутність токсичних продуктів, відсутність відторгнення імплантату і гарна місцева сумісність із клітинами (наприклад, у разі напилення КФ-покриття на ендопротез кістки).

Прикладами проблем є виділення токсичного мономера і олігомера у РММА – цементу кістки під час затвердіння, недостатня резорбція імплантатів (наприклад, кераміки в разі заміщення кістки) і місцеве пошкодження тканин (зокрема, остеоліз) через утворення продуктів руйнування, наприклад, поліестерів.

Біологічна сумісність: прикладами вимог є відсутність імунної реакції і сприятливі умови для прикріплення клітин до імплантату (наприклад, рН, іони, які виділилися, шорсткість поверхні).

Прикладами проблем є імунна реакція (локальна або системна) через чужорідні протеїни, кальцифікація штучного серцевого клапана і реакція відторгнення на частинки зносу, виділених ендопротезом (наприклад, поліетилен).

З наведених прикладів випливає, що всі три класи наведених вимог не можна відділити один від одного. Так, зокрема виділення хімічного компонента з імплантату може викликати біологічну реакцію відторгнення, яка, зі свого боку, знизить механічну міцність фіксації імплантату в тканині.

КЛАСИ, ТРИВАЛІСТЬ, БІОРЕАКЦІЇ МАТЕРІАЛІВ

З погляду матеріалу БМ можна розділити на чотири класи: метали, кераміка, полімери і їхні композити.

За тривалістю взаємодії з тканиною можна скористатися класифікацією Wintermantel і На: *понад короткострокові* (ultra short-term) імплантати (наприклад, катетер, скальпель), *короткострокові* (наприклад, болти, зубні брекети), і *довгострокові* імплантати (наприклад, імплантати стегна, зубів); вимоги до біосумісності в них різні.

За біологічною реакцією можна розглянути таку класифікацію:

- біоінертні;
- біосумісні або біотолерантні;
- біоактивні.

У цій шкалі імплантатів залежно від обставин можна спостерігати збільшення біологічної активності. Наприклад, чистий титан добре сприймається організмом, але механічного з'єднання з тканиною, яка його оточує немає. Найпростіше рішення – зробити поверхню металу більш шорсткою.

Хімічне зв'язування можливе за допомогою покриття поверхні титану біологічно активною речовиною, наприклад ГА, яка забезпечить міцне з'єднання з кісткою. Подальше збільшення біологічної активності можна отримати за допомогою фіксації біомолекул (наприклад, RGD – пептид – послідовності для зв'язку з інтегрином) на поверхні.

Аргінілгліциласпарагінова кислота (RGD-послідовність) – трипептид, що складається з L-аргініну, гліцину і L-аспарагінової кислоти. У білку ця послідовність (RGD-послідовність або RGD-пептид) є поширеним елементом розпізнавання і білок-білкової взаємодії клітинних білків

БІОСУМІСНІСТЬ

Визначення терміна «біосумісність» надає European Society for Biomaterials (1986): *«властивість імплантату вступати в адекватну множину реакцій у разі специфічного його застосування».*

Означає, що матеріал придатний тільки для обмеженого застосування. В інших органах і тканинах він не може бути застосований. Біологічно руйнівні полімери можуть бути використані для закриття поранень, а не для виготовлення зубних стрижнів (не вистачає механічної міцності). І, навпаки, кераміка з оксиду алюмінію, завдяки високій міцності придатна для кульшових суглобів, але не має еластичних властивостей, необхідних для накладання швів.

За поведінкою в організмі БМ поділяються на:

- біостабільні;
- біодеградовані.

До 1-ї групи належать імплантати з постійною (переважно механічною) функцією (наприклад, протези, зубні протези, матеріал для остеосинтезу), до 2-ї групи – імплантати, які після виконання своєї функції, мають «зникати», наприклад, біокаталізатор, матеріали для заміни кістки, шкіри, швів тощо.

ІНТЕРФЕЙС

Контакт між імплантатом і тканиною спостерігається на межі їх розділення, і тому природа поверхні є вирішальною для біологічної сумісності. Виділяють такі властивості пограничної поверхні:

- локальна концентрація іонів;
- локальне значення рН;
- абсорбція протеїнів, бактерій, клітин;
- морфологія граничної поверхні (гладка, шорстка).

До пограничної поверхні в пористих імплантатах відносять і внутрішні поверхні, доступні для тканин і рідин тіла. З цього можна зробити висновки:

- у **деградованих** імплантатів важливими є об'ємні властивості у міру їх деградації;
- у **недеградованих** імплантатів об'ємні властивості не мають значення (наприклад, токсичний матеріал можна вважати деякий час нешкідливим, якщо він має біосумісне покриття).

БІОЛОГІЧНІ І СИНТЕТИЧНІ МАТЕРІАЛИ

За походженням можна розрізняти матеріали біологічні і синтетичні. До першої групи належать всі трансплантати (тканини, органи, наприклад, кістки), серед яких розрізняють:

- аутогенні трансплантати: матеріал взятий і пересаджений одному й тому ж пацієнтові;
- алогенні трансплантати: людський матеріал іншої людини (донора);
- гетеролітичні трансплантати: донорський матеріал від тварин.

Такі матеріали, що не підлягають обробленню не належать до БМ. Проблематичним є використання трансплантатів 2-ї і 3-ї груп через ризик передання інфекції і потенційну імуногенність через чужорідний матеріал.

Для запобігання таких явищ необхідно проводити хімічне або термічне оброблення для отримання з біологічного матеріалу напівсинтетичного біоматеріалу. Прикладами є «спалювання» або хімічне оброблення кісток ВРХ для видалення органіки.

МЕТАЛИ В МЕДИЦИНІ

Метали досить давно застосовуються в медицині як матеріали для імплантації. Перший такий імплантат з'явився у XVIII столітті; у другій половині XIX століття застосовувалася переважно срібна проволока для фіксації. Після створення нержавіючих сталей (Cr-Ni steel; Krupp) після Першої світової війни з'явилися нові можливості для використання сталевих сплавів у хірургії (особливо для остеосинтезу). У 1936 з'явилися Co-Cr alloys («Віталліум») для остеосинтезу і дентального застосування. З 50-х років XX століття використовується титан і його сплави.

Позитивними властивостями металів є такі:

- висока механічна стабільність;
- еластичність (відсутність крихкості, на відміну від кераміки);
- гарна оброблюваність, на противагу кераміці;
- просте і недороге виготовлення.

Недоліками є такі:

- відсутність біодеградації (залежно від застосування це є позитивом (зубні імплантати) або недоліком (замісник кістки));
- можливий вихід з ладу через корозію, механічного зносу або втоми, що може призвести до виділення токсичних або алергенних іонів або визвати реакцію відторгнення на частинки зносу;
- небезпечність сенсibiliзації (індукування алергенів, наприклад, проти нікелю).

Головна передумова для використання металу як БМ – це достатня корозійна стійкість у рідинах організму, які є достатньо агресивними (підвищена температура (37 °C), сольовий розчин, активність ензимів (зокрема, макрофагів)).

КЕРАМІКА В МЕДИЦИНІ

Кераміку можна визначити як «неорганічну, неметалеву речовину».

Керамік багато, але лише незначна частка використовується в медицині: ФК, біоскло, окис алюмінію, двоокис цирконію, склокераміки ($K_2O-Na_2O-Al_2O_3$).

Порівнюючи з металами та полімерами, кераміка відрізняється, насамперед, високою твердістю.

Недоліками є важкість оброблення і крихкість.



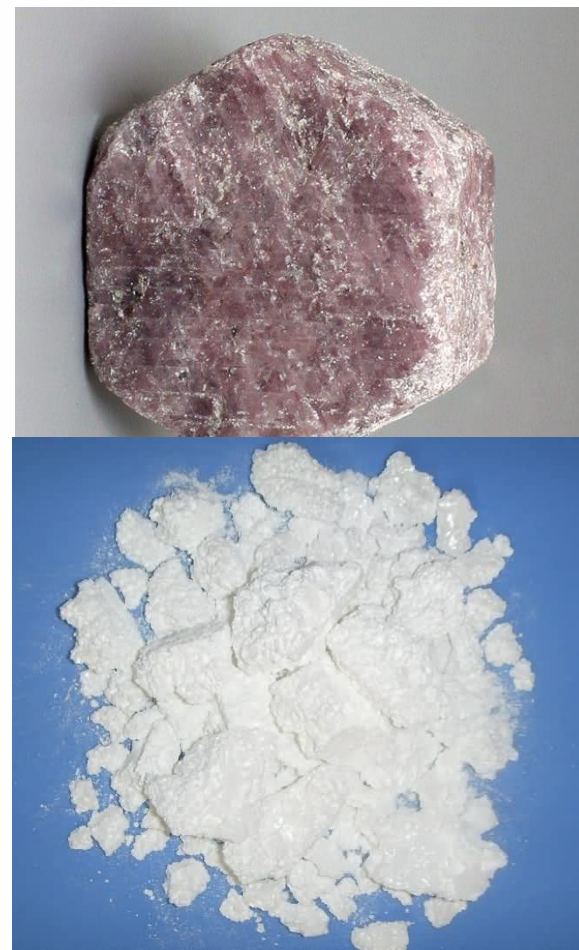
Приклади керамічних матеріалів для застосування в медицині

ОКИС АЛЮМІНІЮ І ДВООКИС ЦИРКОНІЮ

Оксид алюмінію ($\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$, корунд) – основна біологічно неруйнівна кераміка, яка застосовується переважно як імплантати, які мають механічне навантаження. Головна сфера застосувань – це головки та чашечки для ендопротезних суглобів. Водночас корунд застосовується в стоматології для покриття коронок. Корундова кераміка міцна і зносостійка. Вирішальним для мікроструктури є метод отримання, оскільки від нього залежить поведінка розповсюдження тріщин. Бажано отримати малі кристаліти в готовій кераміці, наприклад, використовуючи гаряче ізостатичне пресування.

Двоокис цирконію (ZrO_2) є альтернативою корунду. Вона також застосовується в ендопротезах і стоматології. Для поліпшення механічних властивостей і стабільності до складу вводять інші метали (магній, ітрій).

Ці дві кераміки отримують, зазвичай, методом агломерації або гарячого пресування. Бажана форма формується до відпалу або досягається додатковим механічним обробленням (наприклад, фрезерування, полірування).



ОРТОФОСФАТИ КАЛЬЦІЮ (ОФК)

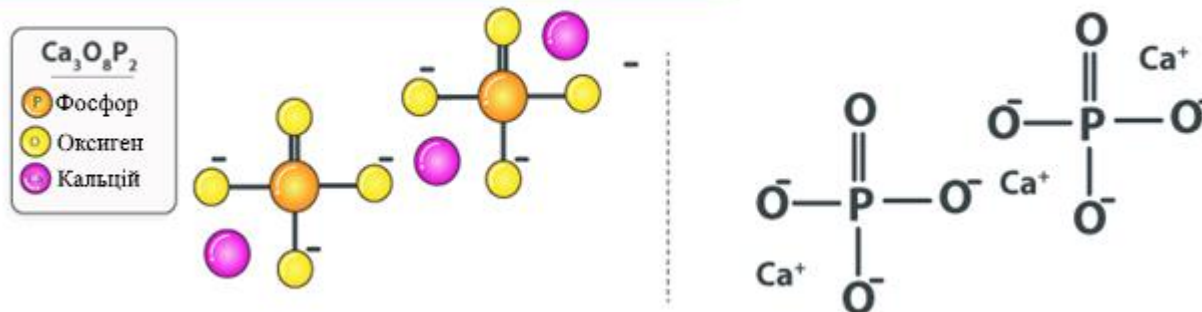
ОФК (CaPO_4) є надзвичайно важливими для організму людини, оскільки вони є органічною складовою кісток і зубів як у нормі, так і патології.

Наприклад, атеросклероз – закупорення кровоносних судин – обумовлений утворенням твердого композиту (холестерин із CaPO_4), тоді як карієс зубів і остеопороз – це наслідок часткової декальцифікації зубів, кісток відповідно, що означає заміщення менш розчинного і твердішого біоapatиту (ГА) на більш розчинний і м'якший (CaHPO_4 або $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

Усі відомі ОФК містять три хімічних елементи: кальцій (окисний стан +2), фосфор (окисний стан +5), кисень (відновний стан –), яких багато на поверхні Землі.

Крім того, хімічний склад багатьох ОФК містить водень, утворюючи кислий ортофосфатний аніон (наприклад, HPO_4^{2-} або H_2PO_4^-), гідроксид ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) і/або інкорпоровану воду ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$).

СТРУКТУРА КАЛЬЦІЙ ФОСФАТУ



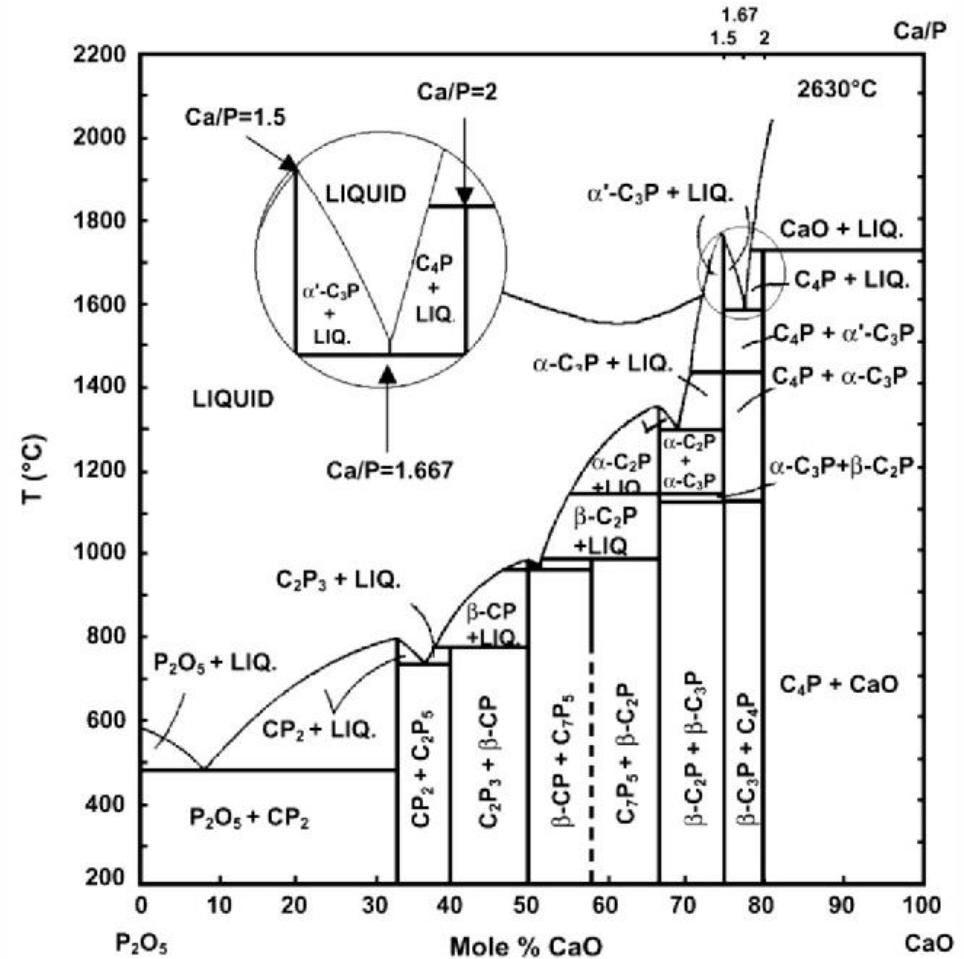
ФАЗОВА ДІАГРАМА $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$

Відповідно до діаграми фазового стану в системі $\text{CaO-P}_2\text{O}_5$ кристалізується 13 ФК.

З них розглянемо лише пов'язані з кістковими тканинами хребетних, що застосовуються в медицині.

Не всі ФК, зазначені на рисунку, можна синтезувати у водному розчині. У зв'язку з цим їх поділяють на:

- низькотемпературні (до 100 °C);
- високотемпературні.



Фазова діаграма системи $\text{CaO - P}_2\text{O}_5$. $\text{C} = \text{CaO}$, $\text{P} = \text{P}_2\text{O}_5$, $\text{C}_7\text{P}_5 = 7\text{CaO} \cdot 5\text{P}_2\text{O}_5$, інші скорочення аналогічні

КОМПОНЕНТИ СІМ'Ї ОФК

Ca/P	Абревіатура	Сполука	Формула	Розчинність за 25 °С, -log Ks	Розчинність за 25 °С, г/л	Межі стійкості рН у в. р. за 25°С
1,0	ДКФД, DCPD	Дикальцій фосфат дигідрат., брушит	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	~0,088	2,0–6,0
1,0	ДКФА, DCRA	Дикальцій фосфат ангідрат, монетит	CaHPO_4	6,90	~0,048	Стаб. при t° >100°С
1,33	ОКФ, ОСР	Октакальційфосфат	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4$ $\cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	~0,0081	5,5–7,0
1,5	α-ТКФ, α-ТСП	α-трикальційфосфат	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~0,0005	*
1,5	β-ТКФ, β-ТСП	β-трикальційфосфат	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~0,0005	*
1,0–2,2	АФК, АСР	Аморфний фосфат кальцію	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$ n = 3–4.5; 15-20% H ₂ O	*	25,7 при рН = 7,4	~5–12 метастаб.
1,5–1,67	КДГА, CDHA	Кальцій-дефіцитний 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	ГА, НА	гідроксиапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	~0,0003	9,5–12
1,67	ОГА, ОНА	Оксіапатит	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{O}$	*	~0,0003	*
2,0	ТТКФ, ТТСП	Тетракальційфосфат	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38–44	~0,0007	*

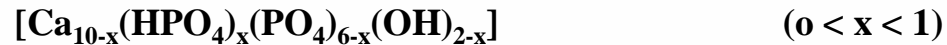
Серед наявних фосфатів кальцію тільки певні сполуки мають біомедичне застосування. Сполуки з іонним співвідношенням Ca/P < 1 не використовують через їхню високу розчинність і кислотність.

Тетракальційфосфат – через його основність. Але 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.

КАЛЬЦІЙДЕФІЦИТНИЙ ГА

Кальційдефіцитний ГА:



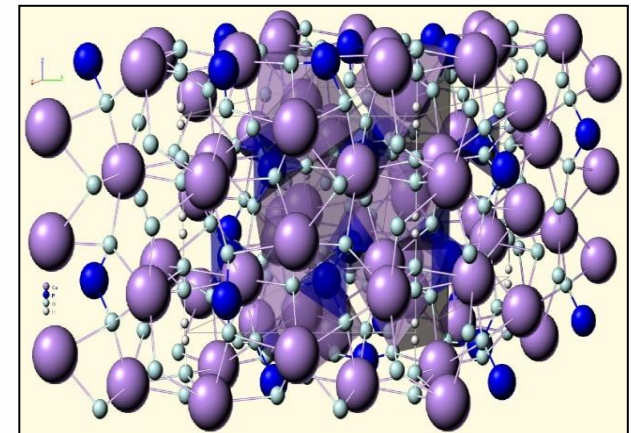
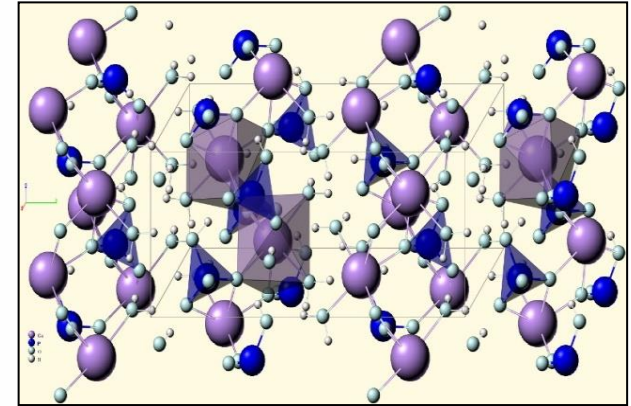
Відомий із перших раних експериментів з визначення хімічного складу кісток. Були запропоновані й інші формули для КДГА (Elliot, 1994).

Як видно з формули, дефіцит Ca завжди в парі з дефіцитом OH і протонуванням PO_4 -групи з одночасним утворенням іонних вакансій у кристалічній структурі (Wilson et al., 2005).

Крім того, КДГА часто містить сильно зв'язані молекули води на місцях цих вакансій.

Наприклад, для компенсації заряду в разі втрати іонів Ca^{2+} частина OH-аніонів заміщується нейтральними молекулами H_2O (Zahn and Hochrein, 2008)

Переважаю, кристали КДГА є слабо кристалізованими і мають субмікронні розміри; за нагрівання ($> 700 \text{ }^\circ\text{C}$) КДГА ($\text{Ca/P} = 1,5$) конвертується в β -ТКФ з утворенням біфазного композиту.



Кристалічна структура (наверху) –
брушиту, (внизу) –
гідроксиапатиту.

Са/Р – «ВІДБИТКИ ПАЛЬЦІВ» ОФК

Мінливість співвідношення Са/Р (0,5–2,0) пояснюється декількома причинами:

- поверхнева адсорбція;
- заміна в решітці;
- міжкристалічні суміші ГА і ОКФ.

Дальній порядок у КДГА існує:

$$a = 9,4418 \text{ \AA} \text{ і } c = 6,8745 \text{ \AA} \text{ (Mochales, 2014).}$$

Як перше наближення, КДГА можна розглядати як ГА з деякими втраченими іонами (іонні вакансії). Нелегований КДГА (включно з іонами Ca^{2+} , PO_4^{3-} , HPO_4^{2-} і OH^-) у біологічних системах не існує. Імовірні заміщення:

- Na^+ , K^+ , Mg^{2+} , Sr^{2+} для Ca^{2+} ;
- CO_3^{2-} для PO_4^{3-} або HPO_4^{2-} ;
- F^- , Cl^- , CO_3^{2-} для OH^- плюс H_2O

Іон-заміщений КДГА формує так званий **БІОЛОГІЧНИЙ АПАТИТ** (або **БІОАПАТИТ**) – головна неорганічна частина як тварин, так і людей (нормальні і патологічні кальцифікати) (Le Geros, 1991; Rey, 2006; O'Neill, 2007).

Тому КДГА є дуже перспективним для промислового виробництва синтетичних кісткових замісників, зокрема доставки ліків.

РОЗЧИННІСТЬ ОФК

МСРМ (моногідрат дигідрофосфату кальцію) є найбільш кислим і найбільш розчинним у воді ФК.

МСРА є вільна від води форма МСРМ. Кристалізується за температури вище ніж 100 °С за тих самих умов, що і МСРА із водного розчину. Так само, як і МСРМ, відсутній у біологічній формі і не використовується в медицині.

DCPD (дигідрат гідрофосфату кальцію, мінерал брушит) може легко кристалізуватися з водного розчину. Вище 80 °С він віддає кристалізаційну воду і перетворюється на ДСРА. Біологічно має значення за патологічних склерозів (зубний камінь, хондрокальциноз і каміння в сечовому міхурі). У подальшому він є проміжною фазою в утворенні кісток і причиною зубного болю в разі карієсу. В медицині DCPD застосовується в цементах із ФК.

ДСРА (безводний гідрофосфат кальцію, монетит) є безводною формою DCPD. ДСРА може кристалізуватися вище ніж 100 °С із водного розчину або його отримують із DCPD за допомогою нагрівання. ДСРА не трапляється ні у звичайних, ні в патологічних склерозах. Застосовується в медицині у цементах ФК.

ОСР (фосфат октакальцію) трапляється як метастабільна проміжна фаза в разі випадіння в осад із водного розчину НА, CDНА.

β-ТСР (β-трикальцій фосфат) є «істинним ортофосфатом кальцію» із стехіометричним складом $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Він не може випадати в осад із водного розчину, а отримується лише через кальцифікацію за температури вище за 800 °С. За температури вище за 1125 °С – перетворюється на α-ТСР. Форма β-ТСР із магнієм наявна в зубних каменях, каменях сечового міхура, в утвореннях карієсу, м'яких тканинах тощо.

АСР (аморфний ФК) є першим продуктом під час випадання в осад ФК із водного розчину.

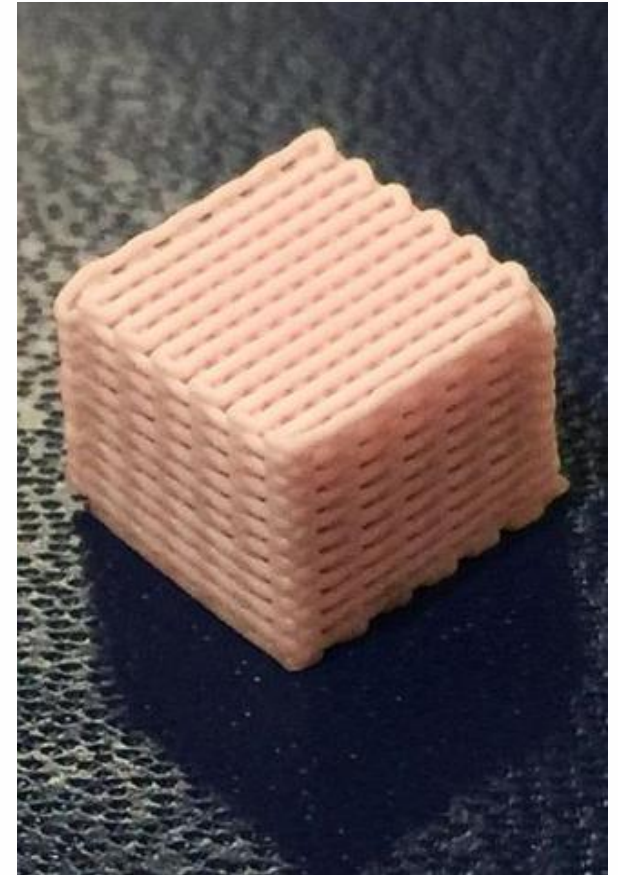
ГА (НА), або ГАП (НАр) (гідроксиапатит) є найбільш стабільним і тому менше всіх розчинним ФК. Хімічно чистий ГА кристалізується в моноклінну просторову групу $\text{P2}_1/\text{b}$ (Elliot et al., 1973), але за температури близько 250 °С спостерігається фазовий перехід до гексагональної групи $\text{P6}_3/\text{m}$.

БІОСКЛО

Особливим класом неорганічних неметалевих речовин є **біоскло**, вперше отримане Hench у 1969 р. Мова йде про аморфний матеріал, який має розгалужену структуру, схожу на «звичайне» бор-силікатне скло (наприклад, віконне скло), яке складається із з'єднаних тетраєдрів SiO_4 і BO_4 . Біологічна дія біоскла пояснюється наявністю кальцію та фосфору у структурі. Типове біоскло має 40–50 % SiO_2 (конструктор сітки), 10–15 % P_2O_5 (конструктор сітки), 30–35 % CaO , 5–10% Na_2O , 0,5–3% K_2O і 2,5–3% MgO .

Реалізована значна кількість комбінацій біоскла, які відрізняються розчинністю і біосумісністю з кістковою тканиною.

З'єднання кістки з біосклом, багатим ФК, стимулює виділення апатиту з навколишньої сироватки і утворення зародків його кристалів на поверхні скла завдяки його хімічному складу. У наслідок цього спостерігається прилипання остеобластів і початок **біологічної мінералізації**.





МЕТОДИ ВИГОТОВЛЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ

Метод спікання

Матеріали, які плавляться, після цього можна лити у форми. Якщо це неможливо (наприклад, через високі температури плавлення, що характерно для багатьох керамік), можна застосувати метод спікання, який часто використовують для керамік.

Спікання – це мікроскопічне сумісне розплавлення окремих зерен речовини, яке відбувається під час окислення, де τ за 0,7–0,9 від абсолютної температури (в К). Типовою температурою спікання для $\alpha\text{-Al}_2\text{O}_3$ з температурою плавлення 2 045 °С є 1 500 °С. Заготовка з необхідною геометрією виготовляється методом пресування або лиття і далі термічно обробляється.

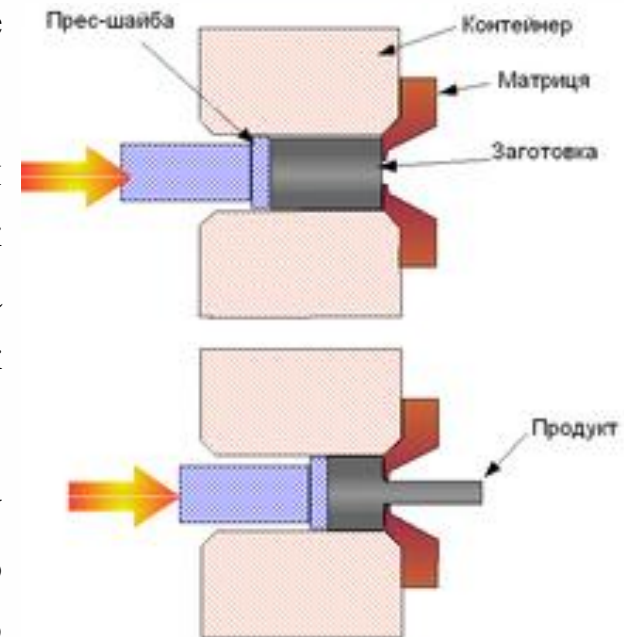
Спікання може бути під або без зовнішнього тиску. Завдяки спіканню спостерігається ущільнення, також зростає розмір зерна і кристалічність; механічна стабільність зростає завдяки тісному зв'язку зерен. Полімери як домішки знижують температуру спікання і підвищують зв'язок між зернами.

Метод пресування

Метод пресування застосовують для виготовлення керамічних деталей і для оброблення полімерів. Найпростіше – це використовують одноосновне пресування за кімнатної температури (тиск або зверху, або знизу) з плоскопаралельними пуансонами, між якими розміщують відповідну прес-форму. Недолік – це виготовлення тільки плоскопаралельних деталей.

Зростання міцності пресованого тіла можна досягти завдяки механічному відведенню тиску і підсиленню прилипання частинок підняттям температури. Відведення тиску з двох боків можна реалізувати під час *біаксіального* пресування. Водночас тиск прикладається як зверху, так і знизу.

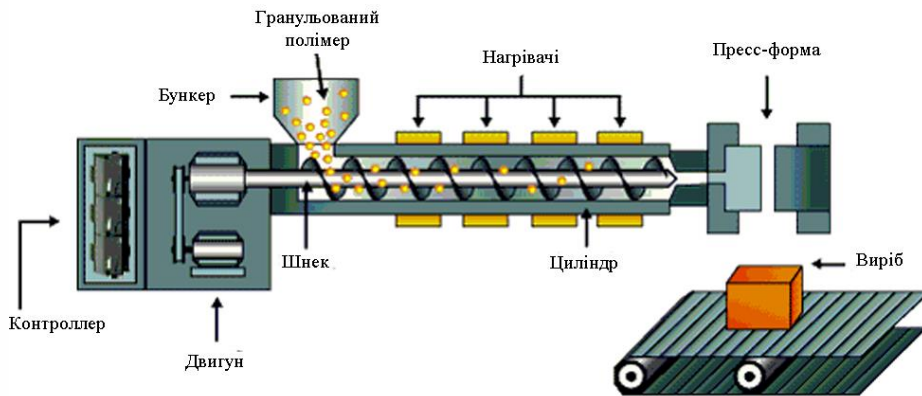
Ізостатичне (тиск з усіх боків) пресування у відповідному середовищі знімає геометричне обмеження. Під час гарячого ізостатичного пресування отримують внутрішнє спікання, тобто отримують міцні вироби (лопатки для турбін літаків тощо).



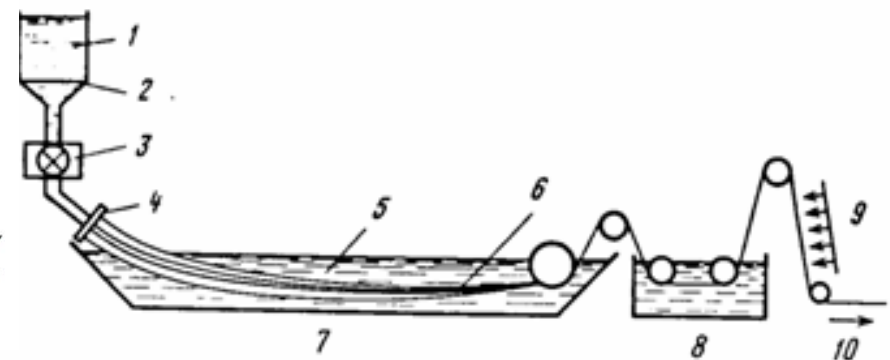
Інші методи

Методи ткання і прядіння: насамперед, полімери можна ткати і прядати машинами. Якщо необхідні товсті «нитки» або стрижні, то можна застосувати екструдер. До того ж полімер пресується за підвищеної температури, близької до точки плавлення з використанням сопла. З таких ниток певної довжини можна отримати тканини або 3D-структури (приклад – остеосинтетичні гвинти з полігліколіду).

Лиття під тиском: полімери, які розкладаються під час плавлення за високих температур можна лити прямо з екструдера у форми, отримуючи велику кількість дешевих деталей, але механічна міцність порівняно з пресуванням і тканням обмежена.



Лиття пластмас під тиском



Прядіння з полімерного розплаву

ГІДРОКСИАПАТИТ, КІСТКА, КОЛАГЕН

ГА – головний мінеральний компонент кісток і зубів хребетних.

Засвідчено, що наночастинки (НЧ) ГА суттєво підвищують біосумісність і біоактивність біоматеріалів.

Кістка складається з ГА (точніше КДГА) (69 %), колагену (20 %), води (9 %), інших органічних речовин, таких як протеїни, полісахариди (2 %).

Колаген, який надає кістці її пружної стійкості (elastic resistance), діє як матриця для осадження і росту мінералу.

Серед КФ солей ГА ($\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) є найближчим до кісткового мінералу.

Кристали ГА мають форму голок 40–60 нм у довжину, 20 нм в ширину і 1,5–5 нм у товщину.

ЗАСТОСУВАННЯ ГА В СТОМАТОЛОГІЇ

Заміщення кістки і пародонтальних дефектів та альвеолярного хребта.

В інженерно-тканинних системах.

Біоактивні покриття на металевих імплантатах кісток.

Наповнювач для зміцнення зубних смол (resins).

Стимуляція формування репаративного дентину.

Відновлення механічної біфуркаційної перфорації (отворів).

Формування апікальних (верхівкових) бар'єрів.

Ущільнення пульпи (pulp).

МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ГІДРОКСИПАТИТУ

Особливості отримання ГА

Для отримання ГА розроблено багато методів, заснованих на:

- твердотільних реакціях;
- «мокрих» хімічних методах (ХМ).

Вони містять преципітацію, гідротермальний синтез і гідроліз інших ортофосфатів кальцію, але в будь-якому разі Ca- і PO₄- компоненти мають бути змішані так, щоб отримати Ca/P = 1,67.

Одна з лабораторних робіт курсу буде присвячена саме отриманню ГА з використанням одного із ХМ.

Але навіть в ідеальних стехіометричних умовах, преципітати, зазвичай, є нестехіометричними, тим самим припускаючи формування проміжних прекурсорних фаз (АСР, CDHA).

Зазвичай неспечений (unsintered) ГА – слабокристалічний і нестехіометричний типу CDHA (Ca_{5-x}(HPO₄)_{2x}(PO₄)_{3-2x}·(OH)), який містить іони гідрогенфосфату (H₃PO₄) і тому молярне співвідношення Ca/P < 1,67. Під час нагрівання > 700 °C CDHA перетворюється на β-TCP (Ca/P = 1,67) або в суміш із β-TCP і ГА (1,5 < Ca/P < 1,67); VCP), залежно від стехіометрії осаду.

Але добре кристалічний ГА може бути отриманий із водного розчину за рН (10–11) і підвищеній температурі (> 90 °C). ГА з Ca/P > 1,67 (Ca-rich HA) також можна отримати (Bonel et al., 1988).

Чистий ГА НІКОЛИ не трапляється в біосистемах.

Методи синтезу наночастинок ГА

Метод	Опис методу	Час оброблення (</> 24 г)	Температура реакції (°C)
Твердотільний	ГА утворений через твердотільну дифузію іонів твердих реактивів. Потребує термічного впливу для ініціації реакції	>	1050 – 1250
Хімічне осадження	Розчин кальцію і фосфору з'єднані за контролю параметрів реакції, що спричиняє зародження і зростання кристалів	>	Кімнатна – 85
Золь-Гель	«Золь» розчин перетворюється в «Гель» систему через гідроліз і поліконденсацію	>	37 – 85
Гідротермальний	Реакція у водному розчині в закритій системі в умовах високої температури і тиску	<	150 – 400
Емульсійний	Краплі незмішуваних рідин у неоднорідній суміші	>	Кімнатна – 50
Згоряння	Частинки утворені з водного розчину через спонтанне згоряння палива і окислювача за підвищеної температури	<	170 – 500

1. Сухі методи.

1.1. Твердотільний.

1.2. Механохімічний.

2. Мокрі методи.

2.1. Хімічне осадження.

2.2. Гідролізний.

2.3. Золь-Гель.

2.4. Гідротермальний.

2.5. Емульсійний.

2.6. Сонохімічний.

3. Високотемпературні методи.

3.1. Згоряння.

3.2. Піролізний.

4. Синтез із біогенних джерел.

5. Комбіновані методи.

Вологі методи

Водневі розчини фосфатних іонів та іонів кальцію

Переваги:

- чіткий контроль морфології і розміру частинок;
- найбільш популярні в наукових дослідженнях;
- найбільш перспективні для отримання нанорозмірного ГА.

Недоліки:

- проблеми з контролем кристалічності і фазової чистоти НЧ;
- трудомісткість синтезу, неможливість отримання значної кількості продукту;
- низька температура (порівняно із сухими методами) призводить до:
 - 1) утворення інших КФ-фаз, Крім ГА;
 - 2) зниження кристалічності;
 - 3) інкорпорації різних іонів із водного розчину в кристалічну структуру.

Звичайне хімічне осадження

Найпростіший спосіб синтезу нанорозмірного ГА.

Примітка. За кімнатної температури і рН 4.2 **ГА** є найменш розчинною і зазвичай найбільш стабільною CaP-фазою у водному розчині.

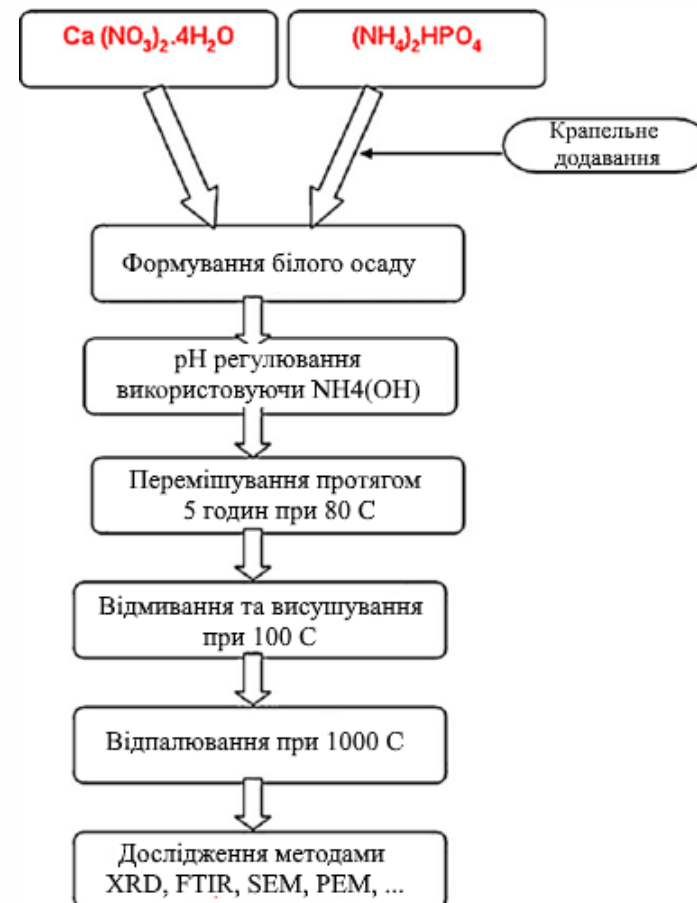
Реакція осадження звичайно відбувається за рН > 4,2 і температур в інтервалі від кімнатної до близької до точки кипіння води.

Джерело Ca^{2+} – гідроксид кальцію або нітрат кальцію ($\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$).

Джерело PO_4^{3-} – ортофосфорна кислота або діамоній гідрофосфат ($(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$).

Типова процедура містить додавання по краплинці (краплинно) одного розчину в інший за постійного перемішування, за Ca/P 1.67.

Результуюча суспензія старіє за атмосферного тиску або миттєво відмивається, фільтрується, сушиться і подрібнюється в порошок.



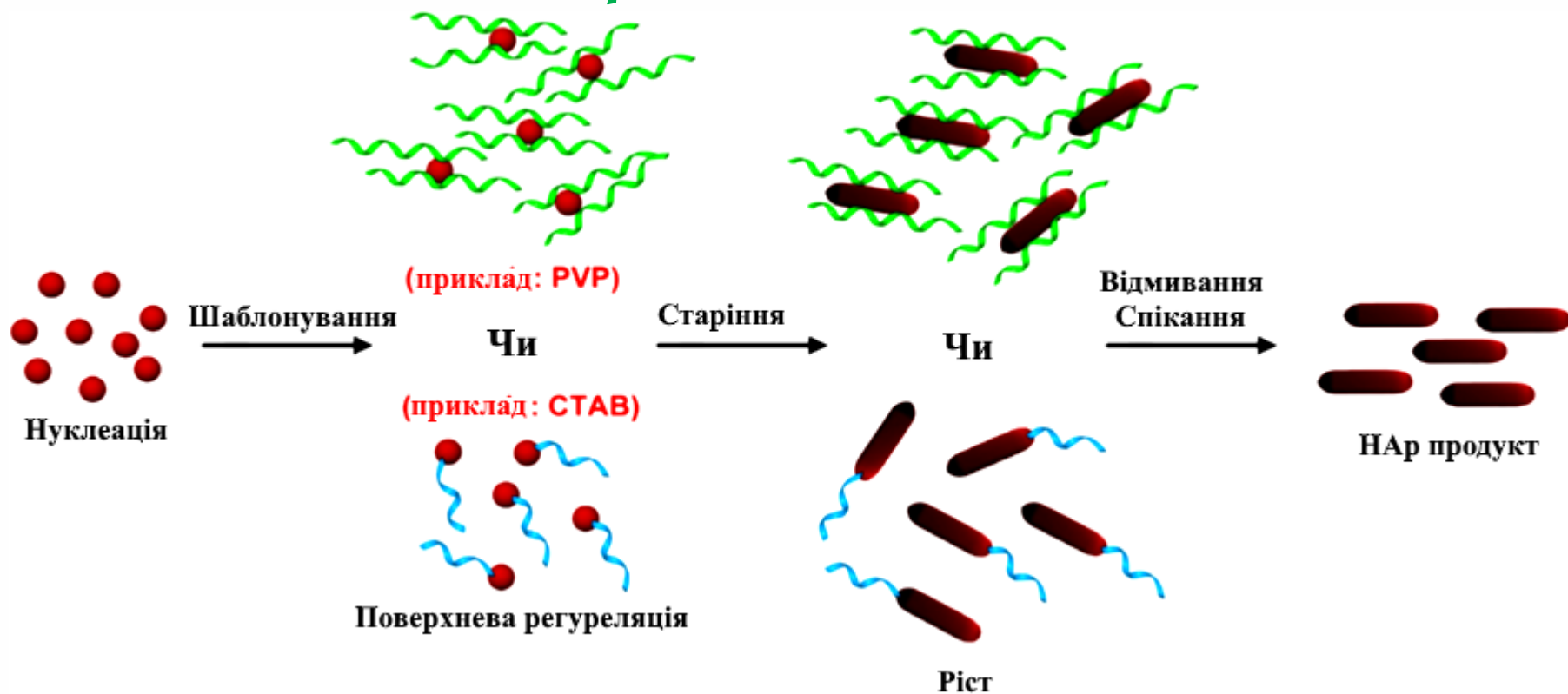
Детальніше про кристалізацію ГА з водного розчину

ЗХО ґрунтується на тому, що за кімнатної температури і рН 4,2 ГА є найменш розчинною і найбільш стабільною СаР-фазою у водних розчинах. Але реакція осадження зазвичай проводиться за рН > 4,2 і температур в інтервалі від кімнатної до температур, близьких до температури кипіння води.

Рисунок відображає схему синтезу з використанням реагентів calcium hydroxide, or calcium nitrate як джерело Ca^{2+} і ортофосфорної кислоти або діамонію гідрофосфату як джерела PO_4^{3-} . Типова процедура полягає у змішуванні по краплинці (drop-wise) одного компонента з іншим за постійного перемішування і Са/Р 1,67 відповідно до співвідношення в ГА (1,67). Отримана суспензія або старіє, або миттєво промивається, фільтрується, сушиться і подрібнюється в порошок.



Механізм утворення стрижневих (rod-like) НЧ ГА на основі різних підкладкок

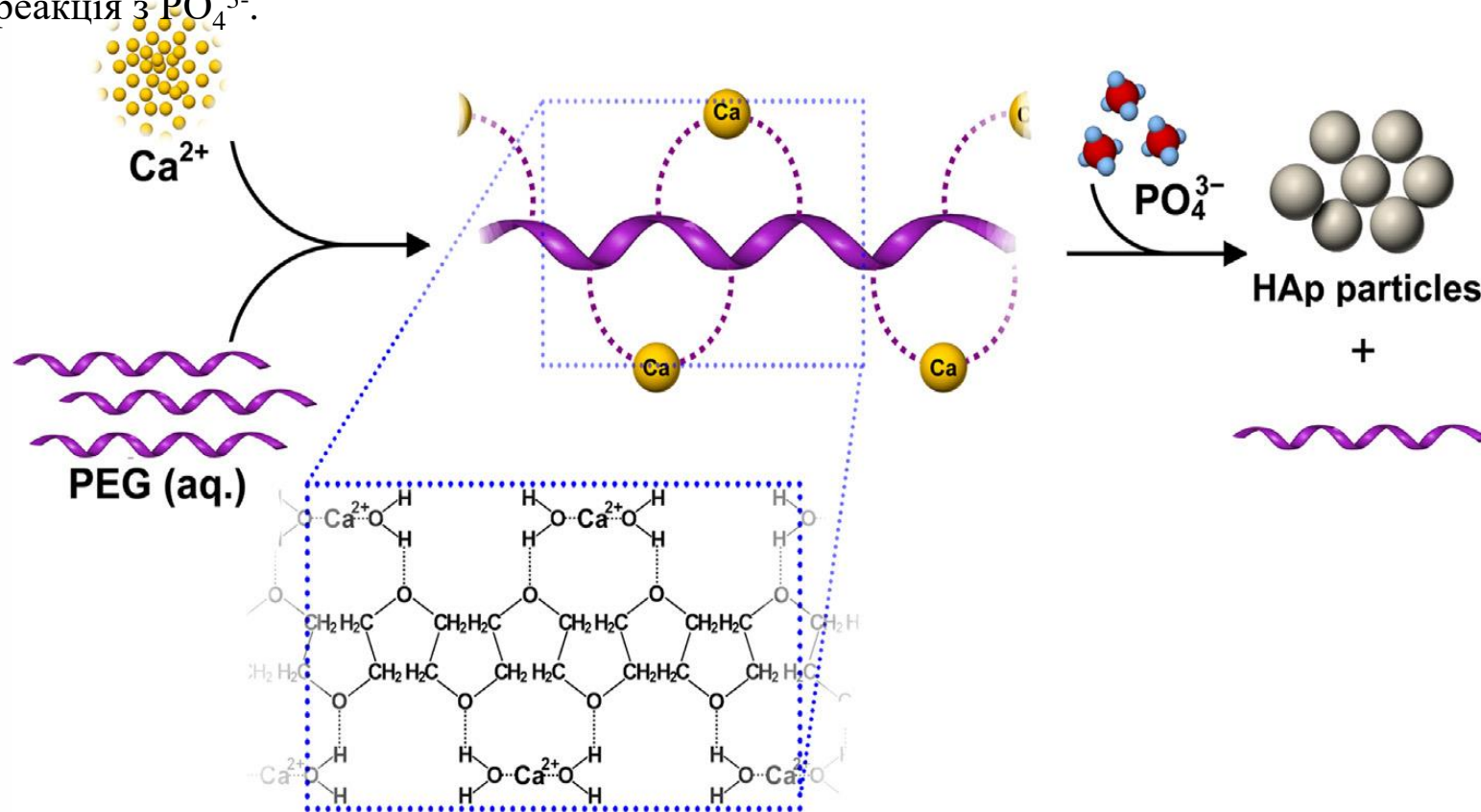


Макромоллекули: цетилтриметил амоній бромід (СТАВ); полівінілпіролідон (PVP), мономер – N-вінілпіролідон, використовується як binder (з'єднувач) у фармації

Схема реакції утворення НЧ ГА за наявності PEG

Поліетиленгліколь – полімер етиленгліколю (C_2H_4O) (**PEG**), використовують у медицині як наповнювач (excipient), або носій лікарських засобів тощо.

Механізм – PEG під час розчинення формує PEG-OH і далі – хелатний зв'язок з іонами кальцію, далі – реакція з PO_4^{3-} .



Гідролізний метод

ГА можна отримати за допомогою гідролізу інших СаР-фаз, зокрема безводний гідрофосфат кальцію (монетит – CaHPO_4), дигідрат гідрофосфату кальцію (брушит – $\text{CaHPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$) і трикальцій фосфат ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$).

Гідроліз октакальцію фосфату ($\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) не можна використовувати для отримання ГА-наночастинок, імовірно, через повільний темп гідролізу ОКФ і/або наявності домішок в ОКФ.

Гідроліз СаР-фаз у водному розчині для отримання ГА проходить через процес «розчинення – осадження» (dissolution and precipitation processes).

Серед СаР-солей кислі фази (монетит і брушит) є термодинамічно менш стабільними при $\text{pH} > 6-7$ і тому трансформуються в більш стабільну СаР-фазу, тобто ГА.



Золь-гель

Типова золь-гель-технологія охоплює створення 3Д неорганічної сітки за допомогою змішання алкохолатів (alkoxides – органічні сполуки ROM , де M – атом лужного металу; приклад: калій метоксид (CH_3OK)) або інших прекурсорів у водному або органічному розчині.

За цим йде старіння за кімнатної температури, гелеутворення (gelation), сушіння на гарячій плиті. І, нарешті, видалення органічних залишків із висушеного гелю через термічну кальцифікацію.

Розмір кристалів і кристалічність зростає з підвищенням температури кальцифікації. Інакше кажучи, прекурсори Ca і P змішуються, рН відкоригується (adjusted) (амоній або гідроксид амонію) з подальшим старінням, фільтрацією, сушкою і прожарюванням (кальцифікація).

Переваги: низька температура; добра хімічна гомогенність кінцевого продукту; стехіометрична структура з великою поверхневою площею; біорезорбція вища від звичайних порошоків.

Недоліки: висока ціна стартових матеріалів; генерація вторинної фази (CaO); CaO є шкідливою.

Гідротермальний метод

Один із типових методів отримання ГА.

Третій за популярністю після ЗХО і комбінаційних методів.

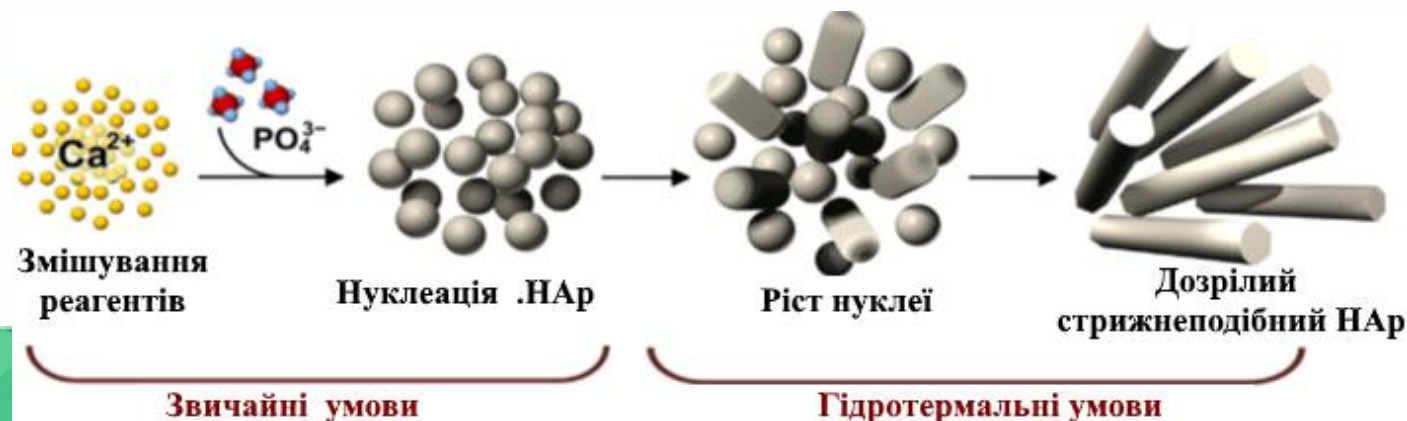
Характеризується реакціями хімічних сполук у водному розчині за підвищеної температури і тиску.

Гідротермальний синтез – це хімічне осадження, у якому старіння відбувається за температури (> температури кипіння води) в автоклаві, але за більш низьких температур порівняно з твердотільними реакціями.

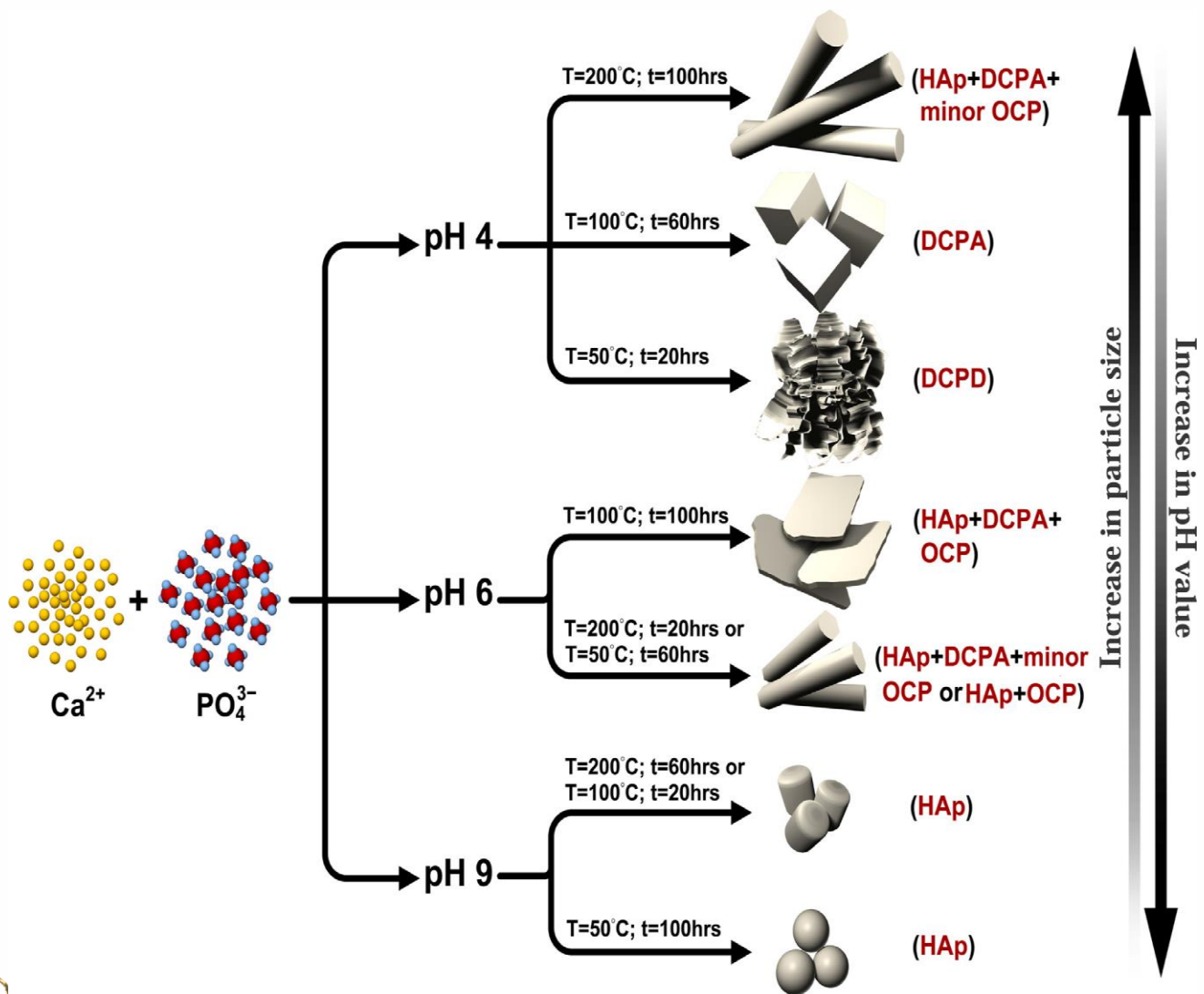
Інші низькотемпературні методи (ЗХО, золь-гель) потребують термічного оброблення для кристалізації ГА, тоді як у гідротермічному методі все відбувається протягом одного циклу.

Початкова стадія – це змішування 2 прекурсорів із Ca/P 1,67. Розчин нагрівається в автоклаві.

Далі суміш старіє, промивається і фільтрується. Останнє – це прожарювання. Стартові компоненти і вода мають займати 50–60 % об'єму автоклава.



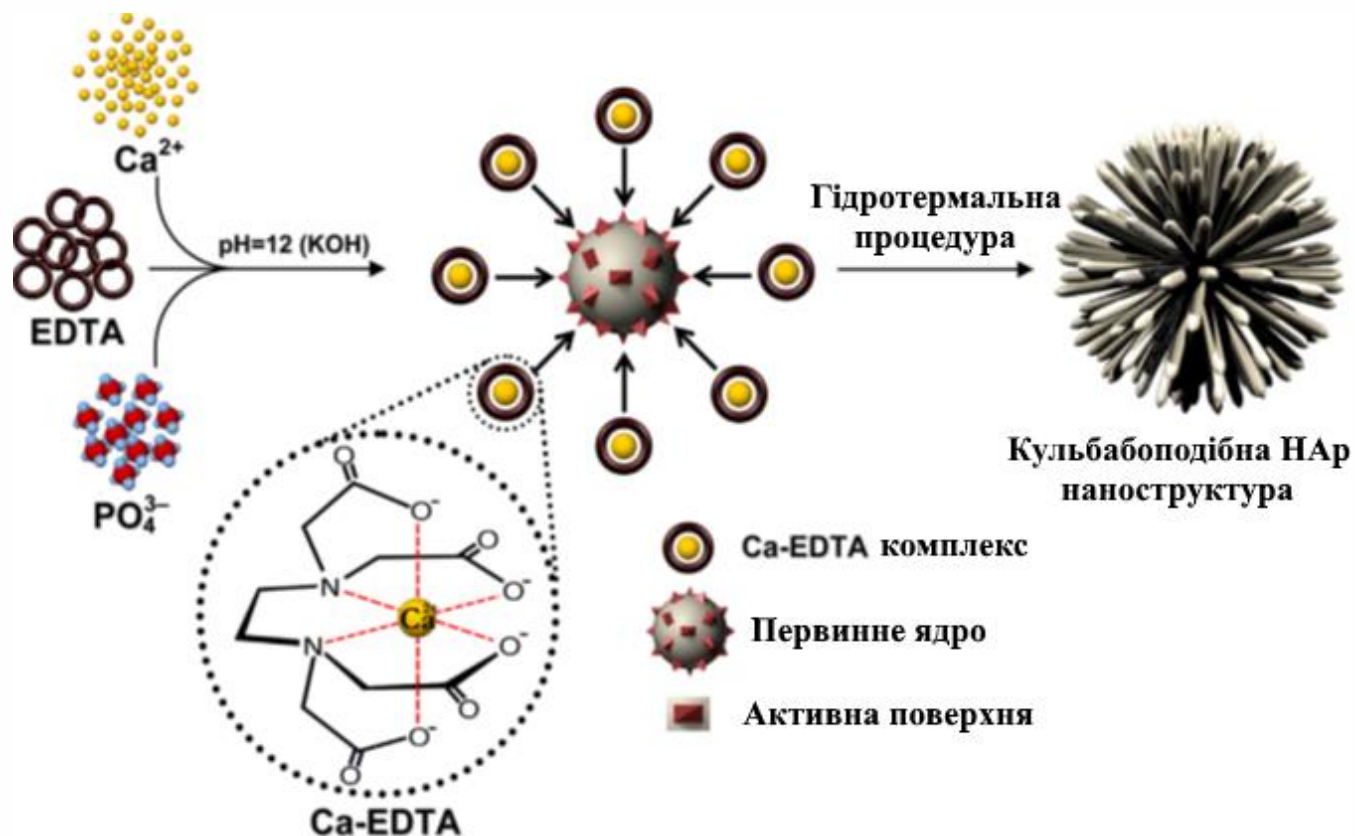
*Двоетапний процес
виготовлення
паличкоподібних
наночастинок НАр у
гідротермальних умовах*



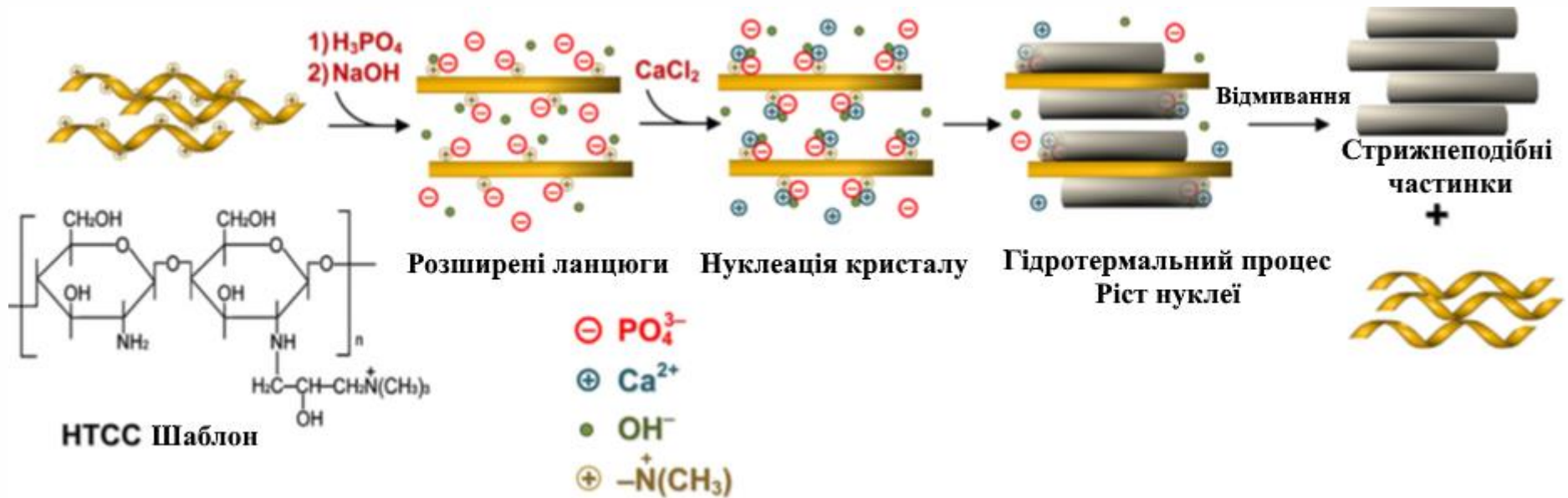
Вплив рН, температури та тривалості гідротермального оброблення на фазу, морфологію та розмір частинок порошку СаР

Гідротермічний синтез подібних до кульбаби наноструктур НАр за наявності EDTA

Етилендіамінтетраоцтова кислота (EDTA) взаємодіє з іонами Ca і формує Ca-EDTA-комплекси, стабільні за підвищеної величини рН. Тоді спостерігається значна абсорбція OH^- на поверхні первинних кластерів за рН12. Ці групи є активними для адсорбції Ca-EDTA-комплексів. Просторові гальмування кальцій-комплексних молекул один щодо одного перешкоджають атомам Ca бути упорядкованими відповідно до кристалічної структури ГА: Ca-EDTA молекули диктують 3D-структуру для подальшого росту в гідротермальних умовах.



Приготування наночастинок Нар з використанням низькотемпературного гідротермічного оброблення



Використання органічних молекул для контролю за ростом ГА: *Zhu et al.* синтезували стрижнеподібні **НЧ ГА** з використанням низькотемпературного гідротермального методу за наявності N-[(2-гідроксил-3-триетиламоніум)пропіл] хітозан хлориду (**HTCC**) як полімерної катіонної підкладки.

Емульсійний метод

Дві незмішувані (immiscible) рідини (наприклад, вода і органічна речовина) стабілізовані поверхнево-активними речовинами (surfactants).

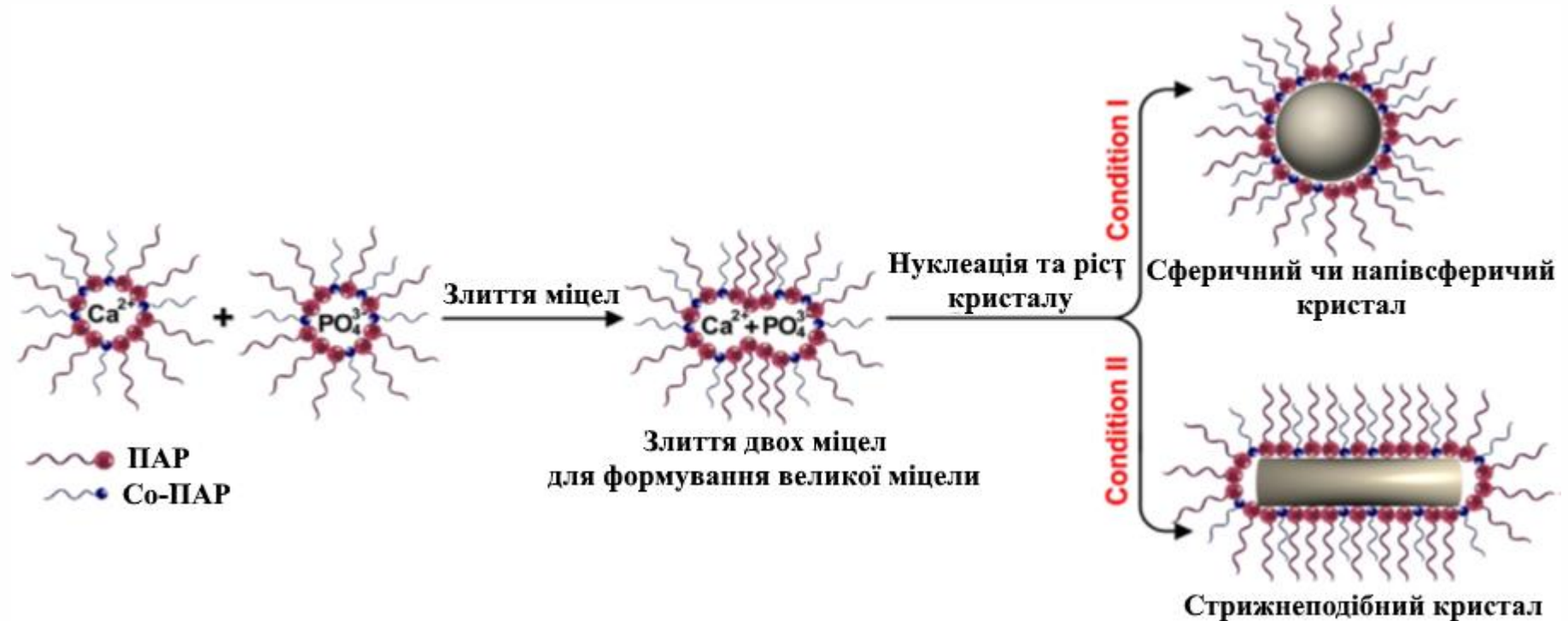
Note: immiscible – нездатність до змішування або досягнення гомогенності.

Surfactants можуть зменшити поверхневий натяг (surface tension) незмішаних рідин, що призводить до дисперсної фази в нанометровому діапазоні.

Surfactants видаляються прожарюванням.

Переваги: зменшена агломерація НЧ; зменшений розмір НЧ; контроль морфології (сфери, стрижні (rods), диски); простота процедури; низькотемпературний синтез; немає потреби у високотемпературному обробленні.

Процес сплавлення зворотних міцел із різними іонами з утворенням частинок ГА різної морфології



Сплавлення між зворотними міцелами (ЗМ) спричиняє реакцію між іонами кальцію і фосфору, що викликає формування ГА-кристалів. Форма ЗМ (мікро- або нанореактори) визначає кінцеву морфологію і форму ГА-кристалів (у цьому разі сферичних або стрижнеподібних).

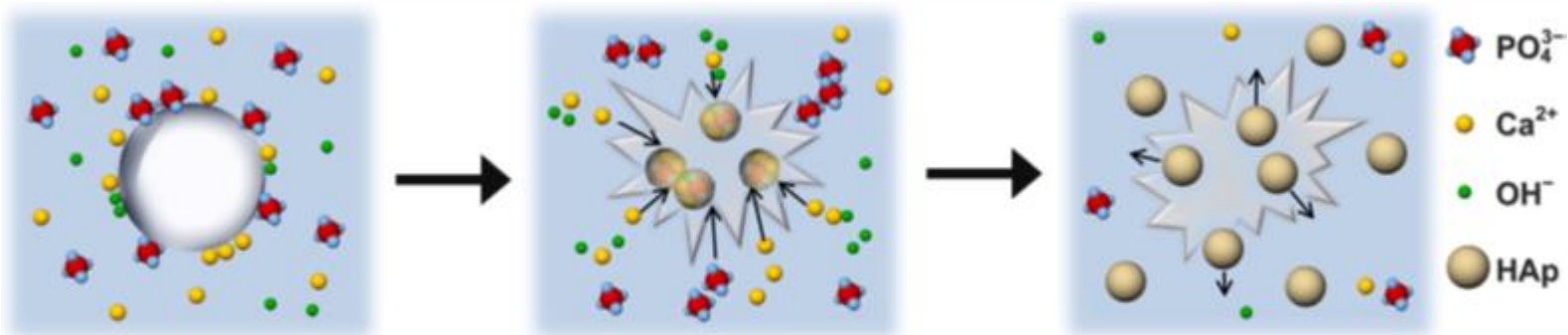
Сонохімічний метод

Хімічні реакції активовані потужним ультразвуковим опроміненням.

Фізичний механізм – акустична кавітація у водневій фазі, де спостерігається формування, ріст і колапс мікробульбашок (microbubbles), що суттєво підвищує швидкість реакцій росту кристалів ГА (у 5–6 разів); 15 хв оброблення (28–34 кГц, 100 Вт) формує кристали сферичної форми 18 нм (питома площа поверхні – 107 м²/г).

1-й крок – це змішування прекурсорів Са і Р, підтримання Са/Р і рН на постійному рівні з подальшим опроміненням ультразвуковими хвилями, далі – сушка і прожарювання

Переваги: Прискорені реакції і ріст кристалів ГА. Більш однорідні (uniform), невеликі і чистіші кристали з мінімальною агломерацією. Однофазний ГА може бути синтезований за 15–60 хв сонікації.



Адсорбція реактивних іонів до акустичної бульбашки

Імплозивний колапс бульбашки призводить до зіткнення іонів під високою темп. та тиском гарячих точок

Відхід утворених кристалів HAp через мікрострумені зруйнованої бульбашки

Високотемпературні методи

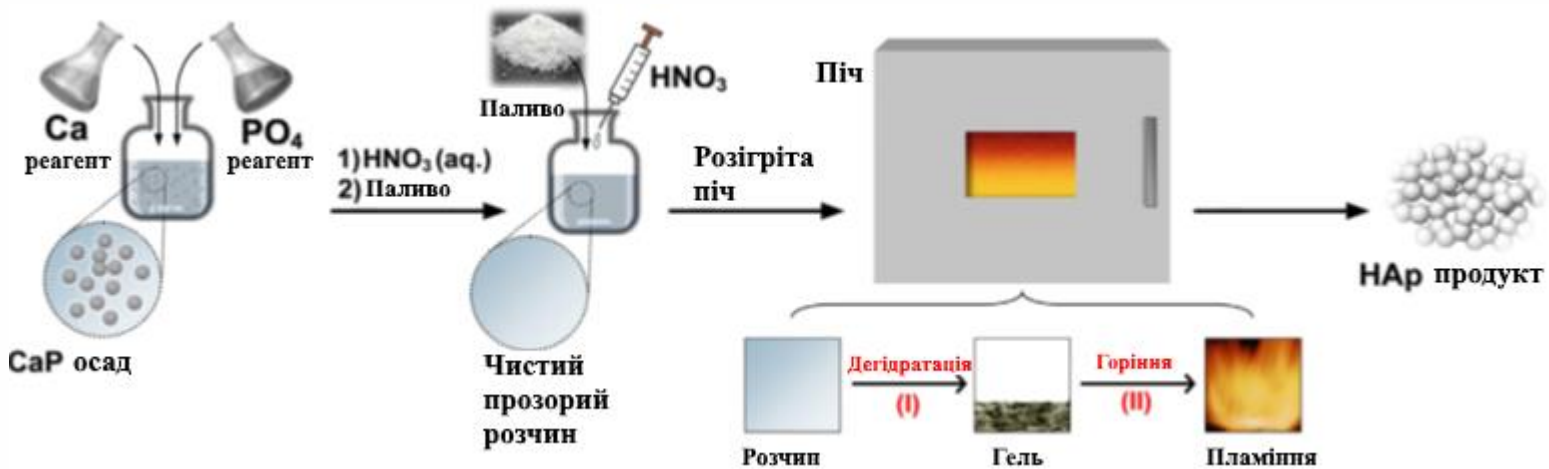
Використовуються для спалення (повного або часткового) прекурсорів.

Переваги:

- уникнення небажаних CaP-фаз;
- отримання висококристалічного ГА високої хімічної гомогенності.

Високотемпературні технології здійснюються із використанням:

- ЗГОРЯННЯ;



- ПІРОЛІЗУ (декомпозиція завдяки високим температурам).

Згоряння

Згоряння – стандартна технологія отримання різної оксидної кераміки.

Спершу водні розчини $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ і $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ змішують, після цього додають оксидний агент (концентрована HNO_3) для розчинення отриманого білого осаду, а потім – паливо (лимонна кислота, янтарна (succinic) кислота, сечовина (urea) і гліцин.

Ініціації реакції досягають нагріванням суміші в печі (300 °C) з подальшим раптовим підняттям температури до максимальної величини.

Фінальний крок – це швидке охолодження суміші для індукування нуклеації і запобігання подальшому росту частинок.

Різні палива дають різні температури полум'я від 100 °C до 900 °C (наприклад, лимонна кислота – 150 °C; янтарна – 425 °C; сечовина – 800 °C; гліцин – 890 °C).

Сильні екзотермічні реакції проходять за наявності окиснювача (oxidizer); газові продукти реакції спонтанно згоряють, що спричиняє підвищення локальної температури, необхідної для формування твердого порошку. Залежно від палива продукт є або аморфним, або кристалічним. Необхідне прожарювання в обох випадках для видалення залишків органіки і кристалізації утвореної CaP-фази.

Піроліз (спрей-піроліз)

Зазвичай під час синтезу ГА для отримання висококристалічного продукту необхідне тривале старіння за високих температур.

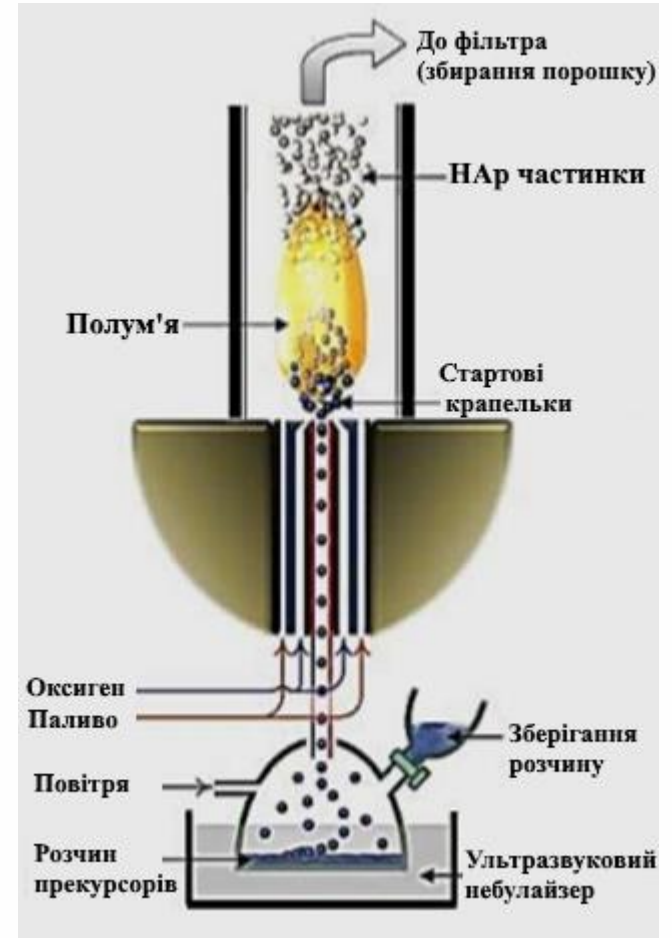
На відміну від цього, швидкий піроліз забезпечує стехіометричність, гомогенність і високу кристалічність одразу.

Частинки продукту формуються в газовій фазі під час фізичного випарювання прекурсорів.

Спрей-піроліз містить в собі розпилювання розчинів прекурсорів у полум'я або гарячу зону електричної печі з використанням ультразвукового генератора.

Унаслідок цього утворені парогазові продукти за високої температури утворюють кінцевий продукт, зазвичай в агломератній формі.

Недоліки: декомпозиція ГА в α -ТСП через в. т. (2000 °С); вторинні агрегати; слабкий контроль за змінами умов реакцій.



Синтез із біологічних джерел

Біологічні джерела: біовідходи (biowastes), яєчна шкаралупа (eggshell) і екзоскелет (зовнішній скелет безхребетних: молюски, членистоногі тощо) морських організмів.

Економічні й екологічні переваги від утилізації відходів.

Карбонат кальцію з морських організмів характеризується пористістю і внутрішніми зв'язками, такими як у кісткових тканинах людини.

Доведено, що макропористість структури, схожої на губчасту кістку, є результатом ранньої (початкової) кісткової мінералізації, отже, кораловий ГА є більш вигідним претендентом для заміщення кісткової тканини.



Приготування НАр за допомогою біогенних джерел:

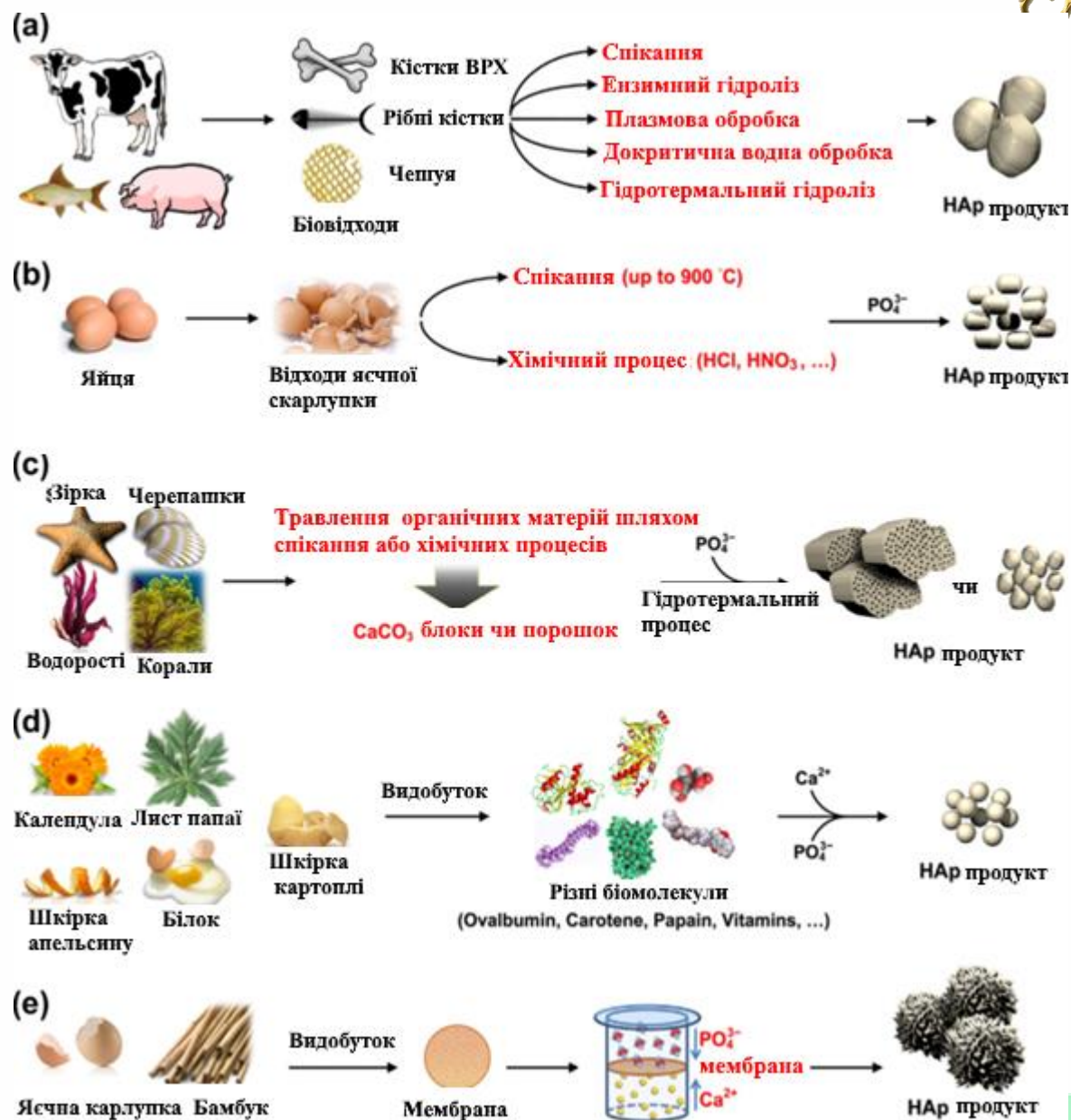
(a) вилучення корисних копалин із біовідходів;

(b) синтез із яєчних шкаралуп;

(c) синтез з екзоскелета морських організмів;

(d) синтез за допомогою природних біомолекул;

(e) синтез із використанням біомембран.



Висновки та перспективи

Розглянуті методи отримання НЧ ГА класифіковані як:

- **сухі методи**, які мають 2 головних напрямки: твердотільний синтез і механохімічний синтез;
- **вологі методи**: водні розчини іонів кальцію і фосфору з різних джерел використовуються для кристалів ГА осадженням за допомогою 6 технологій (ЗХО, гідроліз, золь-гель, гідротермальний, емульсійний і сонохімічний методи);
- **високотемпературні методи**: згоряння і піроліз;
- **синтез із біогенних джерел**;
- **комбінаційні методи**.

Незважаючи на різноманітність технологій, лише декілька з них є оптимальними з погляду економіки і продуктивності, що обумовлено прекурсорами для синтезу, складністю процесів, агрегацією і агломерацією, широким розподілом розмірів частинок, різними фазовими домішками тощо.



**ЛЕКЦІЯ 4. НАЙВАЖЛИВІШІ
БІОМАТЕРІАЛИ І ПРИНЦИПИ
ЇХ УТВОРЕННЯ**



МІНЕРАЛИ, ЯКІ ВИКОРИСТОВУЮТЬСЯ ЖИВИМИ ІСТОТАМИ

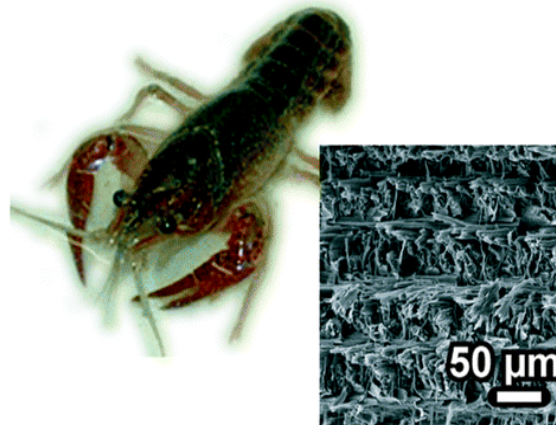
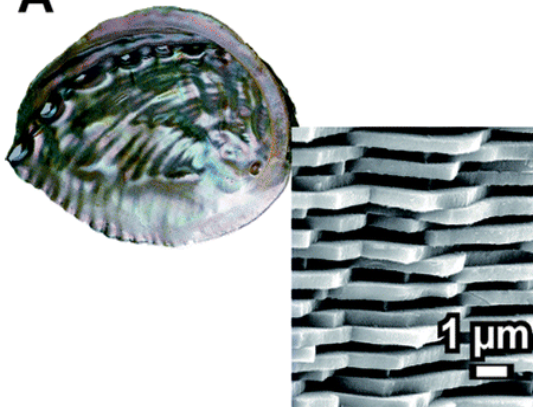
Біологічне утворення неорганічного матеріалу називають «біомінералізацією».

На сьогодні відомо більше ніж 70 різних мінералів, які використовуються живими істотами з різною метою: захисту (панцир), інструмент (зуби), сенсор сили ваги (отохондрії і статоліти – спеціалізовані органели клітин кореня рослини, відповідальних за чутливість до гравітації) або як опорний каркас (скелет).

Дві раковини равлика з біогенного арагоніту.

Форма *біологічно* контролюється і не має зв'язку з кристалографічною структурою мінералу **арAGONІТУ**.

A



ПРИКЛАДИ ВАЖЛИВИХ БІОМІНЕРАЛІВ

Приклади важливих біомінералів

ФК кількісно порівняно з карбонатом кальцію (CaCO_3) і кремнієвою кислотою ($\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$) мають меншу вагу, оскільки останні виявляються у великих кількостях у морських одноклітинних як субстанція скелета. Наступним дуже важливим класом БМ є окисли заліза, які знаходять, наприклад, у зубах равликів.

Для людини особливо важлива наявність ФК, так само, як і для хребетних тварин – адже багато хвороб можуть призвести до пошкоджень кісток і зубів.

Біомінерали – це зазвичай важкорозчинні неорганічні солі (табл.).

Мінерал	Формула	Застосування (приклади)
Кальцит	CaCO_3	Черепашки молюсків, скелети морських одноклітинних
Арагоніт	CaCO_3	Черепашки молюсків
Апатит	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	Зуби, кістки у хребетних
Кремнієва кислота	$\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$	Скелети морських одноклітинних,
Магнетит	Fe_3O_4	Зуби равликів
Сульфат стронцію	SrSO_4	Скелети морських одноклітинних (акантарії)

Величезне значення **мінералів кальцію** пояснюється слабкою розчинністю солей кальцію в нейтральному середовищі (стабільність), яка супроводжується значно більшою розчинністю в кислому середовищі (мобілізація) і також відносною достатністю солей кальцію в природних і біологічних рідинах (доступність).

КРИСТАЛІЗАЦІЯ БІОМАТЕРІАЛУ, МЕХАНІЗМИ РЕГУЛЮВАННЯ

Кристалізація відбувається за суворого біологічного контролю, тобто біоматеріал наявний в організмі постійно в однаковій поліморфній фазі (наприклад, карбонат кальцію) і за певної морфології. Черепашка (панцир) цього виду равликів буде завжди складатися з окремої фази карбонату кальцію (наприклад, арагоніту).

Порядок мікроскопічних первинних кристалів у черепашці також встановлений генетично і біологічно контролюється. Цей високий ступінь порядку як у мікроскопічному, так і макроскопічному масштабі, перевершує все, що дослідник може отримати в лабораторії. Це можливо лише за допомогою суворого контролю над утворенням і ростом кристала через біологічну систему.

Найважливішим принципом є *взаємодія неорганічних твердих тіл і органічних молекул* під час кристалізації.

До цього необхідно додати механізми **регулювання**, які не дають кристалізуватися в небажаних місцях, оскільки біомінералізація відбувається звичайно локально під контролем. Як тільки ці захисні механізми відмовляють, може виникнути патологічна мінералізація, наприклад, відкладення кальцію в атеросклеротичній бляшці артерії (атеросклероз), процес каменеутворення (особливо в жовчному міхурі, нирках, сечовому міхурі).

КАРБОНАТ КАЛЬЦІЮ ТА ЙОГО ФАЗИ

У кількісному відношенні карбонат кальцію є найважливішим БМ.

Кожного року близько 1,7 млрд т CaCO_3 (відповідно, 0,7 млрд т CO_2) осідає в морях у вигляді черепашок або скелетів (для порівняння: річна антропогенна емісія становить 23 млрд т CO_2 , переважно завдяки згорянню твердих палив).

Важливими користувачами карбонату кальцію є молюски, такі як равлики, черепашки, морські одноклітинні, а також корали. Шкаралупа яєць птахів складається з кальциту. Оскільки морська вода перенасичена карбонатом кальцію, то для морських організмів існує невичерпне джерело біомінералізації.

Карбонат кальцію в нейтральному середовищі – важкорозчинна сіль. Відомі три вільні від води модифікації: **кальцит, арагоніт і ватерит**. Також існує аморфний карбонат кальцію (АСС), який містить воду.

Фаза	Кристалогр. дані	Стабільність	Біологічне розповсюдження
Кальцит, CaCO_3	Тригон., $a=4.99 \text{ \AA}$, $b=4.99 \text{ \AA}$, $c=17.06 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$	Термодинамічна стабільна фаза	дуже часто; мушлі молосків, скелети форамініфер, как-колітофорид і морських їжаків
Арагоніт, CaCO_3	Орторомбічна реш., $a=4.96 \text{ \AA}$, $b=7.97 \text{ \AA}$, $c=5.74 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=90^\circ$	незначно нестабільніше, ніж кальцит; не схильний до перетворення на кальцит	дуже часто, мушлі молосків, корали
Ватерит, CaCO_3	Гексагон., $a=7.15 \text{ \AA}$, $b=7.15 \text{ \AA}$, $c=16.95 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$	значно стабільніший, ніж кальцит; схильний до перетворення	дуже рідко, мушлі молосків, жала, ріжки
Аморфний карбонат кальцію („АСС“), $\text{CaCO}_3 \cdot x \text{ H}_2\text{O}$	Рентгеноаморфний	містить різну кількість води; нестабільний, схильний до кристалізації	рідко, імовірно важлива попередня ступінь на шляху до кристалічних фаз
Моногідрокальцит $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$	Тригон., $a=6.09 \text{ \AA}$, $b=6.09 \text{ \AA}$, $c=7.54 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=90^\circ$, $\gamma=120^\circ$	віддача води вище $60-80^\circ\text{C}$	рідко, в патологічних склерозах
Ікаїт, $\text{CaCO}_3 \cdot 6 \text{ H}_2\text{O}$	Моноклін, $a=8.79 \text{ \AA}$, $b=8.31 \text{ \AA}$, $c=11.02 \text{ \AA}$, $\alpha=90^\circ$, $\beta=110.5^\circ$, $\gamma=90^\circ$	віддача води вже $<0^\circ\text{C}$, стабільний при кімнатній температурі	досі не доведено

Склад (ваг %) і структура неорганічних фаз кісткової тканини (дорослої людини) порівняно зі стехіометричним ГА. На основі значного розкиду в біологічних зразках дані типові значення (згідно з Iegeros); [a] кальциновані зразки; [b] некальциновані зразки.

	Емаль	Дентин	Кістки	Гідрокси-апатит (ГА)
Кальцій ^[a]	36,5	35,1	34,8	39,6
Фосфор ^[a]	17,7	16,9	15,2	18,5
Ca/P (молярне співвідношення) ^[a]	1,63	1,61	1,71	1,67
Натрій ^[a]	0,5	0,6	0,9	–
Магній ^[a]	0,44	1,23	0,72	–
Калій ^[a]	0,08	0,05	0,03	–
Карбонат ^[b]	3,5	5,6	7,4	–
Фторид ^[a]	0,01	0,06	0,03	–
Хлорид ^[a]	0,30	0,01	0,13	–
Пірофосфат ^[b]	0,022	0,10	0,07	–
Загальний неорганічний ^[b]	97	70	65	100
Загальний органічний ^[b]	1,5	20	25	–
Вода ^[b]	1,5	10	10	–
Параметри решітки (гексагональна)				
a-вісь, Å	9,441	9,421	9,41	9,430
c-вісь, Å	6,880	6,887	6,89	6,891
Типова величина кристалізації, нм	100 μm-50-50	35-25-4	50-25-4	200-600
Модуль пружності (ГПа)	80	15	0,34-13,8	10
Пружність при стисканні (МПа)	10	100	150	100

КРЕМНІЄВА КИСЛОТА

Кремнієва кислота («опал», або «силіка») має велике значення як неорганічна мінеральна складова в скелетах і черепашках морських одноклітинних (діатомея, радіолярія).

Трапляється у великих кількостях у листях, стеблах і насінні, рослинах, у яких вона слугує для захисту від гризунів (наприклад, пшениця, бавовна, кропива).

Біологічно утворена КК завжди аморфна (без далекого порядку). Водночас геологічно утворені силікати і кварцові матеріали завжди кристалічні. Неорганічні геологічні силікати утворюють основну субстанцію земної кори.

Як загальну хімічну формулу можна взяти формулу біогенної кремнієвої кислоти « $\text{SiO}_2 \cdot n\text{H}_2\text{O}$ » ($n < 1$). Це означає, що структурно мова йде про мінерал, перетворений на кварц (SiO_2), який містить різну кількість води.

ОКИСЛИ ЗАЛІЗА

Біологічно утворені окисли заліза часто трапляються в зубах равликів як магнітні рецептори – в бактеріях. З погляду хімії мова йде про магнетит (Fe_3O_4), окис-гідроокис заліза ($\alpha\text{-FeOH}$; $\gamma\text{-FeOH}$; $\text{Fe}_2\text{O}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$). Залізо дуже поширене в природі, має біологічне значення (особливо в гемоглобіні), має різні ступені окиснення (Fe^{2+} , Fe^{3+}) і відносну нерозчинність гідроксиду заліза. Всі ці властивості використовуються біологічно.

Магніточутливі, або магнітні, бактерії мають нанокристали магнетиту для орієнтації в магнітному полі Землі. Біологічні кристали (40–120 нм) мають розмір магнітного домену з куб-октаедричною, гексагонально-призматичною або голчастою геометрією. Якби кристали були меншого розміру, то намагнічування було б нестабільним, а якби більшого – настало б розщеплення на два магнітних домени, магнітні моменти яких не були б паралельними, і тому сумарний магнітний момент був би малим і навіть нульовим. Крім того, бактерії утворюють кристали магнетиту, розміщені в одному ряду, що призводить до підсилення магнітного моменту. Кристали магнетиту містяться в оболонці з органічної матриці (магнітосомі). Такі нанокристали магнетиту в живих істотах існують здавна: про це свідчать археологічні знахідки в гірських породах, утворених 3,6 млрд років тому, які приписують наявним тоді магнітним бактеріям.

У людському організмі нанокристали магнетиту також наявні, але їх функції наразі не відомі.

ПРИНЦИПИ УТВОРЕННЯ БІОМАТЕРІАЛІВ

Основні принципи біомінералізації на сьогодні зрозумілі. Загалом мова йде про контроль кристалізації організмом із використанням високоспецифічних біоматеріалів. Можна розрізнити **5 процесів**, важливих для більшості БМ:

- контроль утворення центра кристала;
- контроль над ростом кристала;
- кристалізація в обмежених відділах (компартаментах);
- з'єднання неорганічного матеріалу й органічної матриці;
- з'єднання окремих біокристалів у великі агрегати.

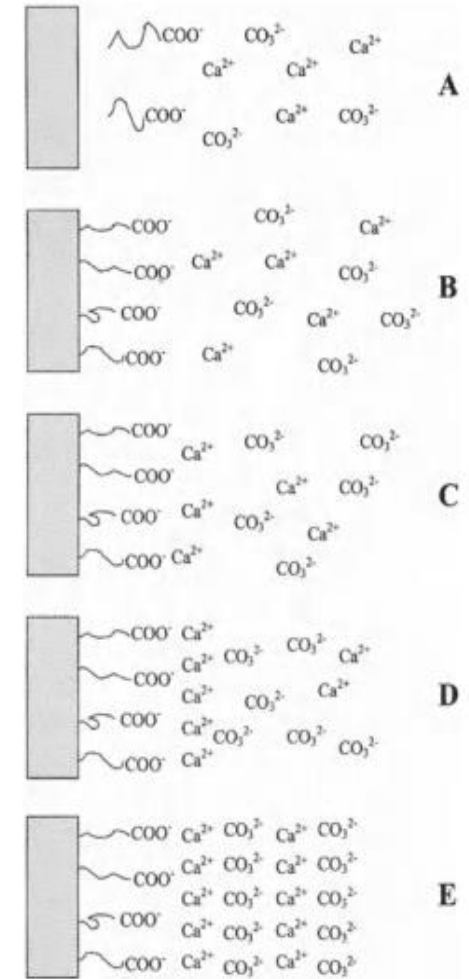
Lovtinstam і Weiner розрізняють «**біологічно індуковану мінералізацію**» і «**біологічно контрольовану мінералізацію**». Водночас як у першому випадку спостерігається більш-менш неконтрольоване утворення центра у відкритому контакті з довкіллям, то у другому випадку мова йде про певний контроль кристалізації, що характеризується насамперед осадженням у відділах (компартаментах). Обговоримо більш детально ці процеси з прикладами.

КОНТРОЛЬ НАД УТВОРЕННЯМ ЦЕНТРА КРИСТАЛУ

Випадіння солей гальмується насамперед кінетичними причинами, про які йшла мова в Лекції 1, оскільки цей процес вимагає енергії активації для утворення центрів кристалізації. Енергія активації може бути знижена з використанням поверхонь, подібних до матеріалу, що кристалізується. Крім цього, мають значення відповідні біомолекули, які адсорбуються на поверхнях із зручною конформацією для кристалізації.

Рисунок демонструє спрощено основні процеси. У реальності процес більш складний: мова йде про низку протеїнів, які вступають з іонами у специфічні взаємодії. Оскільки окремі кристалічні структури вказують на різне розміщення іонів, то можна ідентифікувати через геометричний попередній відбиток полімерну фазу. *Отже, наприклад, молюски контролюють дуже вибірково структури, утворені однією поліморфною фазою карбонату кальцію, і тому виникає тільки арагоніт, а не кальцит або ватерит.*

Механізм гетерогенного утворення зародка біомінералів на прикладі кристалізації карбонату кальцію. А. Біомолекули з негативно зарядженими групами розміщуються на поверхні. В і С. Розміщення негативно заряджених груп викликає електростатичне приєднання катіонів кальцію. Д. Утворення структурованого шару катіонів кальцію на поверхні, які в наступному шарі приєднують аніони карбонату. Е. Утворений зародок може рости в розчині. Поряд з електростатичними взаємодіями вирішальним є геометричне попереднє структурування, тобто активна поверхня розміщує іони в порядку, який відповідає елементарній фазі кристала.

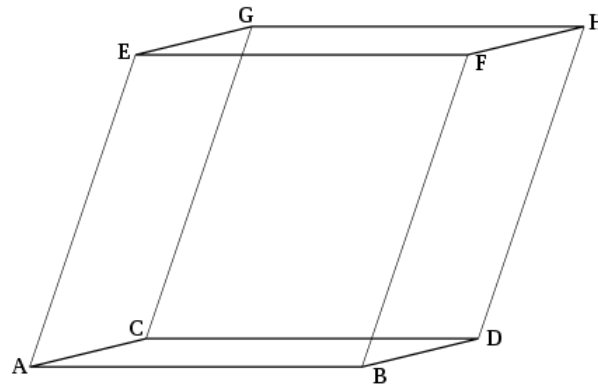
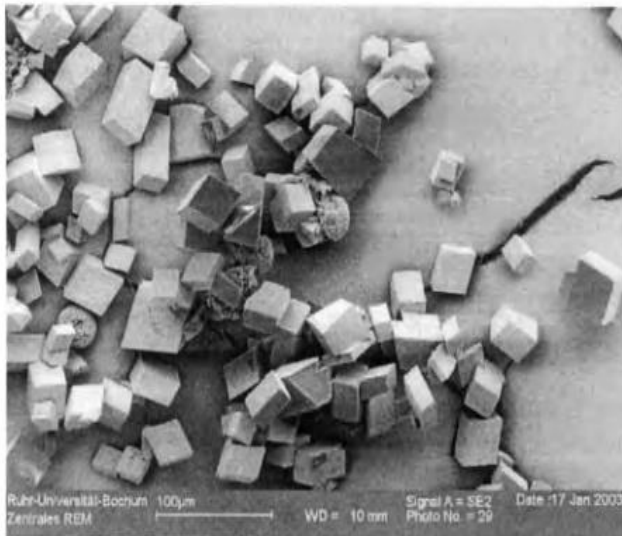


КОНТРОЛЬ НАД РОСТОМ КРИСТАЛУ

Щойно утворився зародок кристала, цим встановлена поліморфна фаза (наприклад, кальцит, арагоніт, ватерит). Кристал буде зростати в розчині, поки розчин перенасичений.

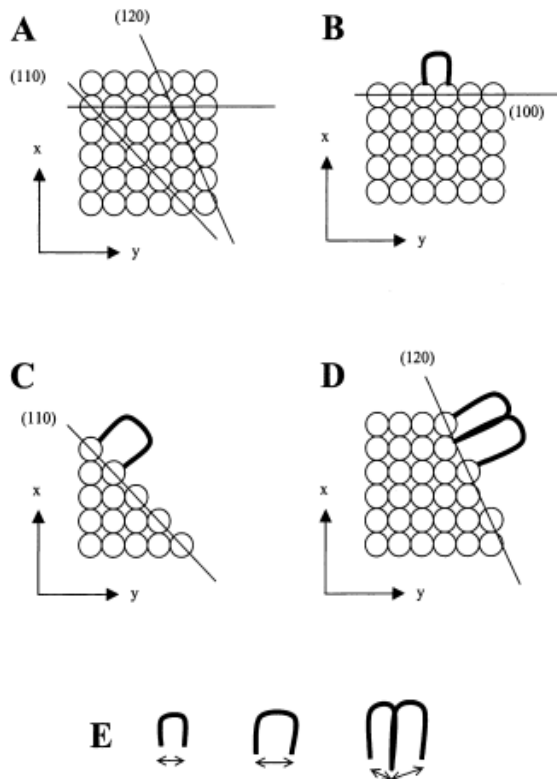
Геометрія утвореного кристала залежить від умов (*pH, температури, концентрації кальцію і карбонату*). Так, кальцит утворює за нормальних умов типовий **ромбоедраїд**.

Зокрема мова йде про фізико-хімічну форму встановленої рівноваги, якій за цих умов відповідає найнижча енергія.



Зображення ромбоедрів кальциту в REM

ОТРИМАННЯ ОСОБЛИВОЇ ГЕОМЕТРІЇ БІОМАТЕРІАЛІВ



Для отримання особливої геометрії біоматеріалів регулюється зростання кристалів у визначених напрямках. Це знову залежить від специфічних взаємодій із біомолекулами, які вибірково адсорбуються на певних поверхнях кристала і ріст припиняється. Імовірно, такі поверхні можна сприймати як зрізи (= площини ґратки) через тривимірну кристалічну ґратку.

Кожний із цих зрізів має своє чергування іонів.

У такий спосіб захищають себе від льодоутворення на тканинах більшість риб, які живуть в холодних водах. Спеціальні протеїни перешкоджають росту кристалів льоду за допомогою селективної адсорбції.

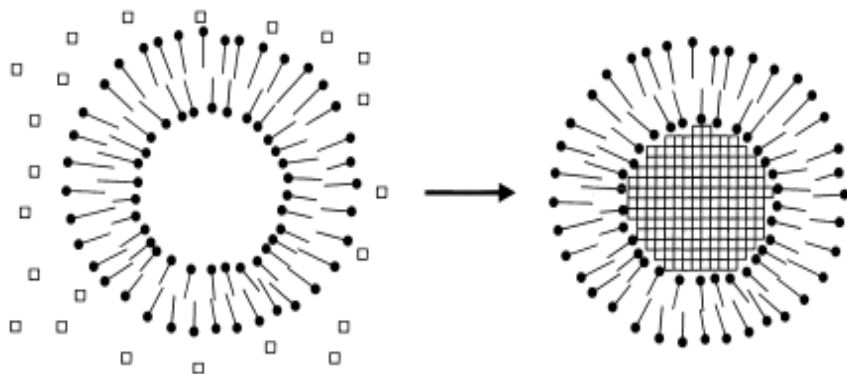
Схематичне зображення переважної адсорбції. А. Кристал, у якому відповідні поверхні визначені індексами Міллера. Кожна з них характеризується власною геометричною послідовністю атомів на поверхні (В, С, D). специфічні біомолекули (Е – зображені у вигляді дужок) можуть селективно взаємодіяти з поверхнями і тим самим блокувати ріст кристала в цьому напрямку.

КРИСТАЛІЗАЦІЯ В ОБМЕЖЕНИХ ВІДДІЛАХ (КОМПАРТМЕНТАХ)

Привілейована адсорбція спеціалізованих біомолекул на певних кристалічних поверхнях сприяє геометричному виділенню цих поверхонь у кінцевому продукті. Так, можна отримати за відомих умов куби, октаедри або стрижнеподібні кристали, але цього недостатньо для пояснення геометрично комплексної структури. Це не пояснює також, чому деякі біокристали (кістки) є завжди в загальному визначених величинах і морфологіях.

Біологічні системи використовуються для подальшого контролю над морфологією кристалізації в просторово обмежених зонах, у які переносяться відокремлені іони через власні механізми перенесення (іонні перенесення) доти, доки розчинність буде перевершена. Частіше – це бульбашки, обмежені подібно клітинній мембрані, або нерозчинні протеїнові шари (рис.).

Для доставки мінералу в клітину застосовується везикула, наприклад, під час мінералізації кісток (апатит).



Схематичне зображення кристалізації в компартментах (тут у везикулі), тобто в зоні, обмеженій подвійним ліпідним шаром.

Кристалізація всередині кулеподібної везикулі сприяє утворенню кристала приблизно кулеподібної форми, який в іншому разі виріс як прямокутний.

УТВОРЕННЯ МІНЕРАЛ-ОРГАНІЧНОЇ МАТРИЦІ

Усі біоматеріали характеризуються тісною взаємодією органічної і неорганічної матриць.

Відносні частки можуть бути різними: так, у кістках і дентині мінеральна фаза (ФК) і органічна матриця (колаген) є приблизно в рівних частках, тоді як високомінералізовані тверді тканини (емаль, черепашка молюска) містять більше ніж 98 % мінералу.

Поряд із біологічними функціями (сигнальна дія протеїнової матриці в кістці), така взаємодія двох компонентів передусім сприяє підвищенню **механічної** стабільності.

Механічні властивості кісток є результатом взаємодії пружного колагену і твердого ГА. Кістка *«м'яка, як масло і тверда, як скала»*, тобто вона як еластична, так і тверда; це властивість, яку синтетичним матеріалам важко реалізувати. Черепашки складаються, з погляду матеріалу, майже повністю з м'якого кальциту або арагоніту (твердість за Моосом 3 і 3,5), але вони твердіші, ніж чисті мінерали.

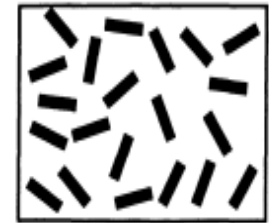
ПОКРАЩАННЯ МЕХАНІЧНИХ ВЛАСТИВОСТЕЙ

Два ефекти сприяють покращанню механічних властивостей.

За однакових частин мінералу і матриці утворюється складна речовина з еластичного матеріалу (матриці) з твердим наповнювачем (мінералом). Аналогія – автошини (каучук + частинки сажі). Частинки, які упровадилися підвищують твердість основного еластичного матеріалу.

З іншого боку, малі частинки органічної матриці (амінокислоти, протеїни) здатні упровадитися в неорганічний матеріал і завдяки цьому змінюється характер розлому.

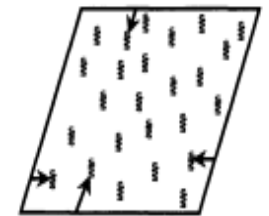
Оскільки механічний вихід із ладу таких керамічних матеріалів загалом виникає від мікрокристалічних тріщин, які розповсюджуються в матеріалі, використання чистого кальциту (наприклад, для шкаралупи або жала) було б недоцільно з погляду механіки. Тому маленькі частинки протеїнів «вводяться» в неорганічну матрицю під час кристалізації не безладно, а так, щоб вони запобігали поширенню тріщини вздовж цих критичних площин решітки.



A



B



C



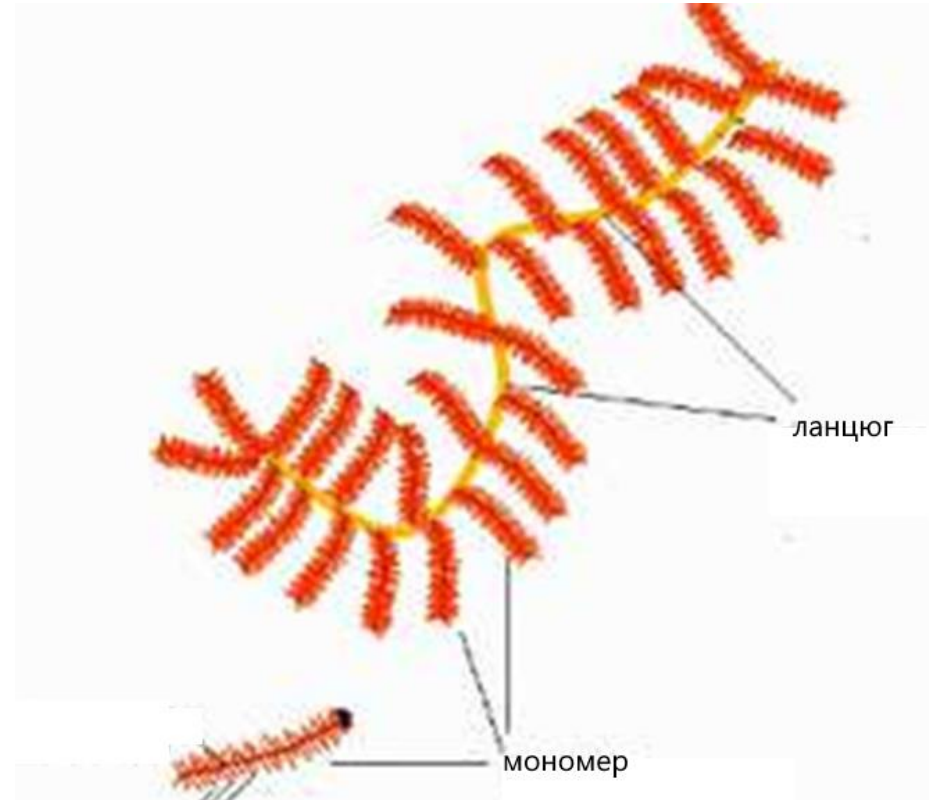
A. Розміщення мінеральних частинок в органічній матриці для підвищення стабільності (наприклад, кістки); **B.** Чистий монокристал показує певні кристалографічні напрямки, вздовж яких можуть поширюватися тріщини (наприклад, кальцит). **C.** Завдяки розміщенню дуже малих частинок (< 1 %) протеїнів у неорганічному матеріалі тріщини закриваються, і зростає опір руйнуванню (міцність на розтяг, приклад, раковина).

УТВОРЕННЯ АГРЕГАТІВ

У багатьох випадках утворення одного єдиного кристала є недостатнім для виконання біологічних вимог.

У цьому разі організм спочатку утворює окремі фрагменти (деталі) і надалі з'єднає їх у великі структурні одиниці.

Це спостерігається в морських одноклітинних (**діатомі**), оболонка яких містить декілька раніше утворених окремих частинок (**частково монокристалічних**).



ОРГАНІЧНА МАТРИЦЯ

Еволюція сприяла утворенню біомолекул на основі протеїнів (протеїни матриці), які виконують регульовальні функції, про які йшла мова. У принципі, за допомогою розчинення неорганічної складової біоматеріалу, органічну компоненту можна виділити, але водночас виникає низка проблем.

Розчинення неорганічного мінералу досягається для карбонату кальцію і фосфату кальцію за допомогою оброблення кислотою або складними сполуками, які з'єднуються з кальцієм (EDTA-етилендіамінтетраацетат). До того ж, можливе пошкодження біомолекул. Також відокремлення біомолекул від великої кількості комплексу кальцію з EDTA є проблематичним.

Протеїни мінералу розчиняються частково і тому розрізняють «розчинну матрицю» (кислі протеїни) і «нерозчинну матрицю» (скелетні протеїни). Колаген – це приклад погано розчинного скелетного протеїну; хітин – приклад погано розчинного вуглецевого полімеру. Більшість протеїнів матриці є значно гліколізованими (зв'язані з вуглеводами) і тому їх важко очистити і характеризувати.

Це вказує на серйозні проблеми, які ускладнюють пояснення процесу біомінералізації. Але завдяки відповідним методам екстракції багато відомо про склад матричних протеїнів. Вони, насамперед характеризуються значною часткою ковалентно зв'язаних молекул цукру, а також амінокислот із коротким ланцюгом (гліцерин, анілін) і кислих амінокислот (глутамінова кислота, аспарагінова кислота).

Завдяки експериментам з осадження і кристалізації можна досліджувати вплив цих протеїнів *in vitro*. У моделі біомінералізації *in vitro* здійснюють кристалізацію на поверхні, у везикулярних шарах або ленгмюрівських плівках.

Дослідження демонструють, що матричні протеїни, що містяться в розчині, є інгібіторами кристалізації (блокують зародки на поверхні), тоді як протеїни, які адсорбуються на поверхні, слугують утворювачами зародків.

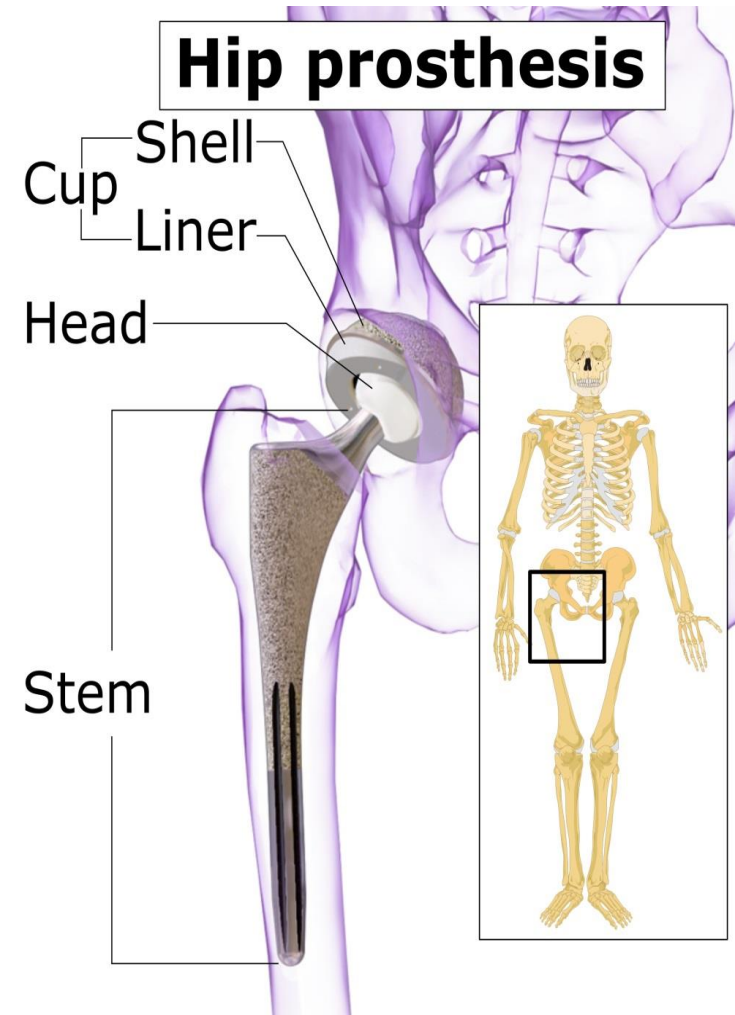
Отже, вплив цієї макромолекули може бути різним залежно від її локації.

ДВА ПРИКЛАДИ БІОМАТЕРІАЛІВ

1. Штучний кульшовий суглоб

У разі порушення працездатності природного кульшового суглоба пацієнтові імплантують **штучний протез**. Сьогодні використовують високотехнологічні імплантати, які повністю відновлюють природний рух.

Головний принцип ендопротеза стегна залишився незмінним із часу його створення. Після хірургічного видалення зношеного суглоба металева ніжка вставляється в кістково-мозковий канал верхньої (проксимальної) частини стегна. Зверху на цьому стрижні розміщується сферична головка суглоба, яка розміщена в чашечці, закріпленій у тазі.

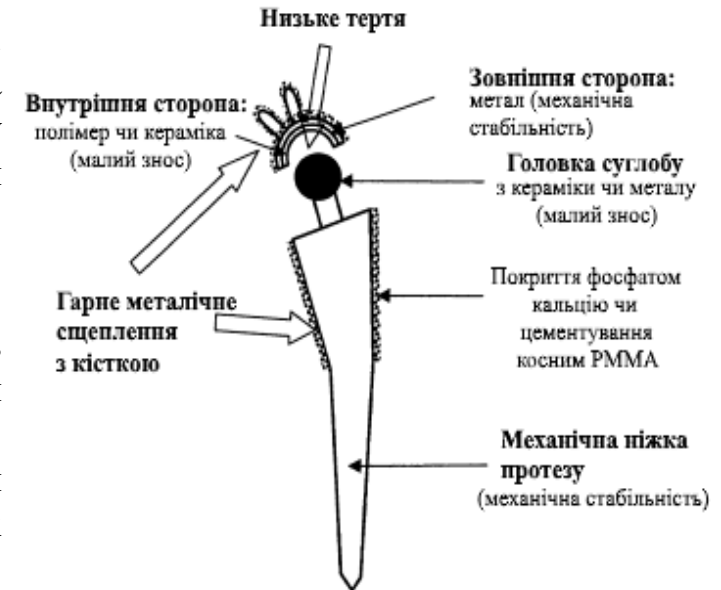


Принцип розділення функцій для кульшового протеза

Перший ендопротез стегна був репрезентований у 1938 р., імплантований «press-fit» (притисканням), тобто закріплений гвіздками. У 1960 р. ніжка ендопротеза була закріплена кістковим цементом на основі РММА, що покращило фіксацію. Приблизно з 1970 р. у практику були введені безцементні ендопротези з біосумісним покриттям (наприклад, ФК).

Штучний суглоб стегна перебуває під значним навантаженням: так, у лежачому положенні лише завдяки напруженню м'язів навантаження дорівнює вазі тіла, тоді як під час ходьби – трикратній вазі. Тому для довгострокової служби протеза необхідно забезпечити: незначне тертя між головкою і чашечкою суглоба, хороший механічний контакт між ніжкою протеза і кісткою, корозійну стабільність всіх компонентів.

Всі ці вимоги неможливі в разі використання одного матеріалу, необхідна комбінація матеріалів. Низька величина зношення досягається за допомогою оптимального поєднання пар тертя. Власний суглоб фіксується на металевій ніжці протеза, яка імплантується у верхню частину стегна. Метал покривають ФК, поверхня стає шорсткою («безцементний протез»), і це підсилює механічне щеплення, або ніжка протеза закріплюється кістковим цементом («цементний протез»).



Принцип розділення функцій для кульшового протеза

2. Штучний замітник кістки

Дефект кістки, викликаний видаленням пухлини, складним переломом кістки, запаленням після імплантації, має бути заповненим власним кістковим матеріалом для поліпшення регенерації. Якщо цього немає, кістку заміщує з'єднувальна тканина.

Ідеальним матеріалом-замісником («золотий стандарт») є власна кістка («аутогенний замітник кістки»), яку беруть із гребеня таза. Але їй мало і є необхідність повторної операції.

Алогенна кістка (з людського донора) є альтернативою, але виникає ризик імунних реакцій і можливих інфекцій (віруси: гепатит, вірус імунодефіциту людини тощо).

Ксеногенні (гетеролітичні) (донори-тварини) замітники кістки необхідно обробляти хімічно або термічно для протистояння ризику інфекцій та імуногенності.

Основні вимоги до синтетичних матеріалів – це механічна стабільність і гарна біосумісність, а також достатня пористість для вrostання кісткової тканини в матеріал для забезпечення механічної фіксації.

Властивість матеріалу сприяти росту називається **остеокондуктивністю**.

Ідеальним потрібно вважати наявність біодеградації (повна заміна штучного матеріалу власною тканиною). Стерильність і невисока ціна – наступні (за значенням) критерії.

У нижчеподаній таблиці наведені основні аспекти деяких матеріалів-замісників.

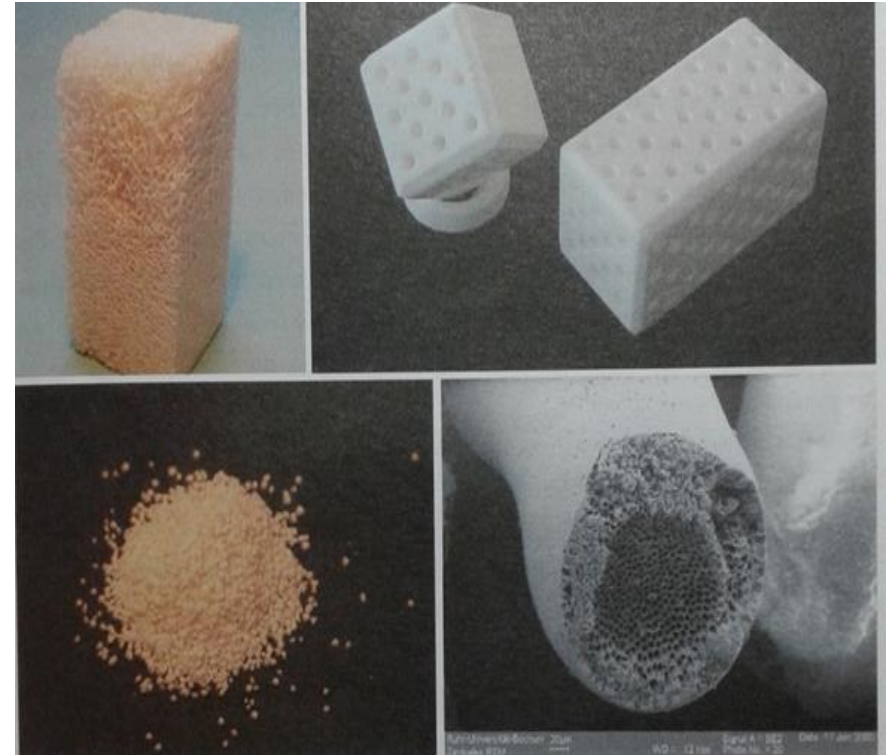
ОСНОВНІ АСПЕКТИ МАТЕРІАЛІВ-ЗАМІСНИКІВ

Матеріал	Механічна стабільність	Біодеградація	Біосумісність у контактi з тканиною	Пористість	Формування кістки у дефекті можливо
Метали та металічна піна (н-д, титан, тантал)	дуже гарна	ні	гарна	Можлива	ні
PMMA - кісткові цементи (полімер)	гарна	ні	гарна	ні	так
Поліестр (полілікомід, полілактид)	помірна	так	помірна	Можлива	ні
Кальційфосфатна кераміка	гарна, але ламка	різна	дуже гарна	Можлива	ні
Цементи фосфата кальція	помірна	так	дуже гарна	ні	так
Цементи сульфата кальція	помірна	так	гарна	ні	так
Кераміки карбоната кальція	гарна, але ламка	так	гарна	Можлива	ні
Біоскло	гарна, але ламка	різна	гарна	Можлива	ні
Коллагени	обмежена	так	гарна	Можлива	можливо
Хімічно та/або термічно оброблені гетерологічні кістки	гарна	так	гарна	так	ні

ІМПЛАНТАТИ З ОРТОФОСФАТІВ КАЛЬЦІЮ

Зупинимось на **ОФК** детальніше. Здебільшого використовують **ГА**, **β -ТСР** і біфазний **ФК** ($\text{ВСР} = \text{ГА} + \beta\text{-ТСР}$).

Їх отримують синтетично під час горіння або осадження, а потім за допомогою спікання або пресування їм надають необхідну форму. Отримують їх у вигляді дрібно- або великозернистого грануляту, а також у вигляді формувального виробу для заповнення дефекту.



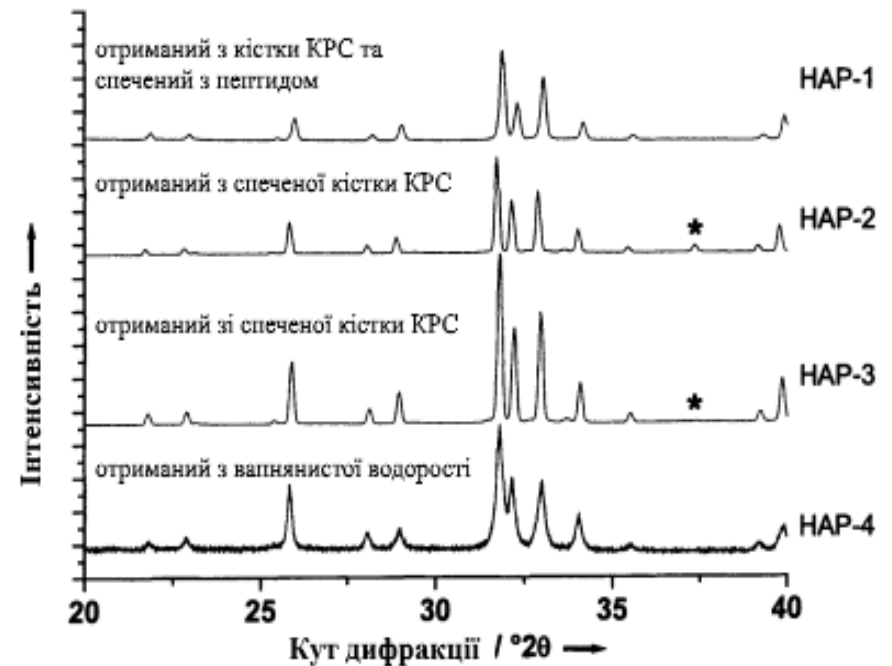
Морфологія деяких типових матеріалів для заміщення кістки: пористий апатит із натуральної кістки (вгорі зліва); форма рівномірних пор із β -ТСР (вгорі праворуч); гранульований β -ТСР для заповнення малих дефектів (внизу зліва); пориста вапняна водорість, яка перетворилася на ГА внаслідок оброблення сульфатом амонію.

Рентгенівська дифрактограма матеріалів-замісників із ГА

Імпланти з ГА з високою кристалічністю через декілька років залишаються в дефекті майже незмінними. Ідеальний матеріал має розчинятися так швидко, як утворюється нова кістка. Тому пористість імплантата є дуже важливим параметром для проникнення клітин і проростання кістки.

Отримати пористий матеріал можна прямо з кісток тварин (гетеролітичні кістки), які перетворюються на пористу кераміку за допомогою багатоступеневого відпалу (близько 1 200 °С).

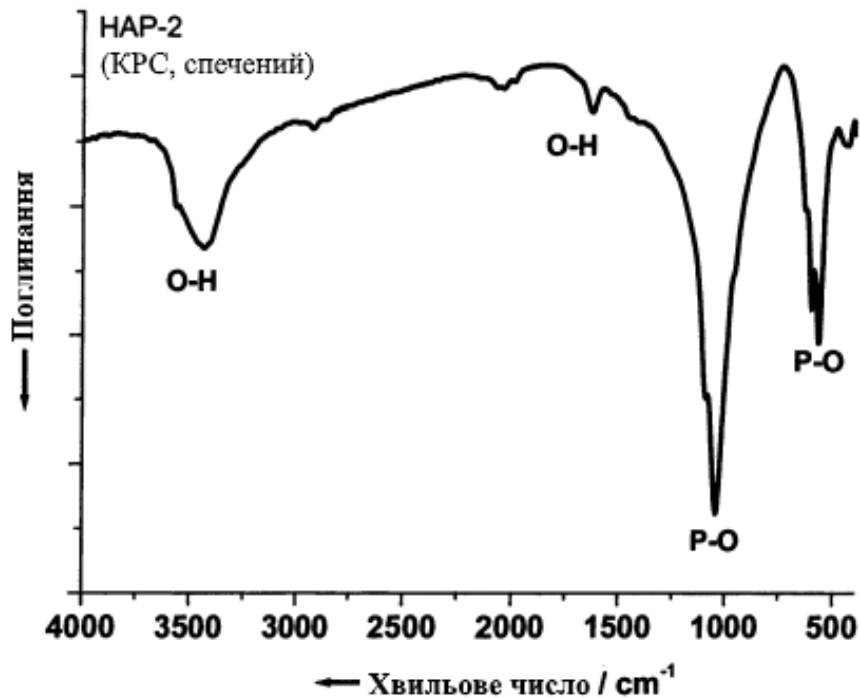
Рисунок показує дифрактограми чотирьох промислових ГА матеріалів-замісників.



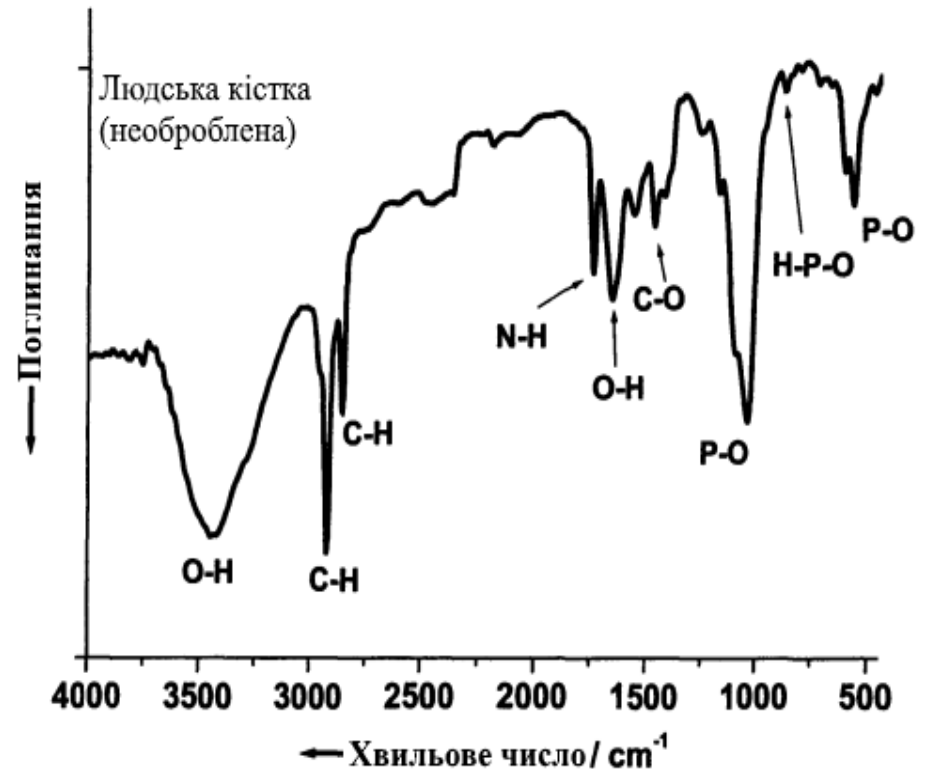
Рентгенівська дифрактограма чотирьох матеріалів замісників із ГА.

Сліди СаО маркіровані (*).

ІЧ-спектр високочисталічного ГА та натуральної кістки



ІЧ-спектр високочисталічного ГА

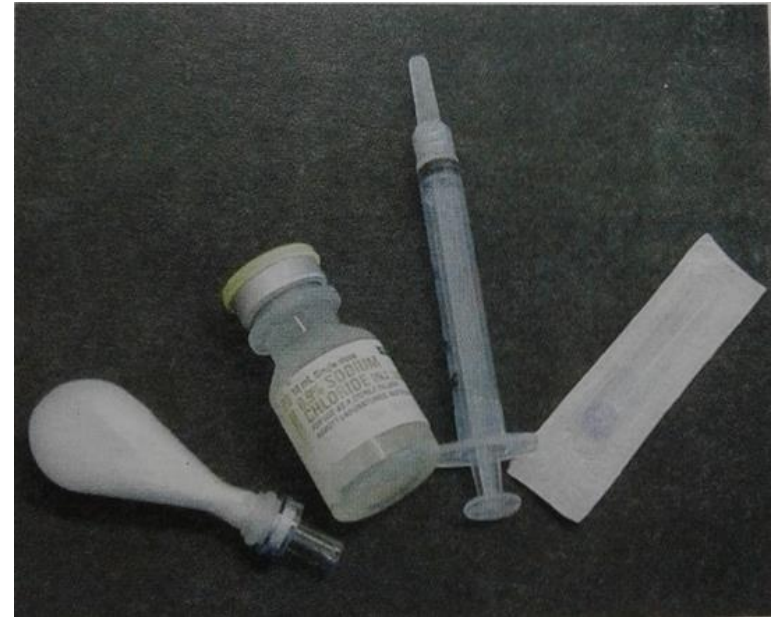


ІЧ-спектр натуральної кістки, яка показує як мінеральну фазу, так і органічні сполуки (насамперед амід колагену)

КІСТКОВІ ЦЕМЕНТИ У ВИГЛЯДІ ПАСТ

Також поряд із КФ-керамікою, що репрезентована як формувальна суміш або гранулят, з 90-х років ХХ ст. клінічно використовують **кісткові цементи** (рис.), які випускають у вигляді паст, що тверднуть у дефекті.

Складовими типового кісткового цементу, на основі ФК є суміш порошку в резиновому балоні, розчин кухонної солі і шприц разом з канюлею, щоб взяти розчин кухонної солі і помістити його в резиновий балон (зліва направо). Порошок і розчин у резиновому балоні добре змішуються, після чого настає фаза випадання в осад апатиту. Отримана паста на декілька хвилин наноситься у вигляді аплікацій, до того як застигне.



Простий метод підвищення біологічної активності матеріалів полягає в їхньому просочуванні кров'ю, або плазмою з тромбоцитами (PRP). Специфічним є використання фактора росту, наприклад, сімейство морфогенетичних білків кістки (BMP), фактора росту фібробластів (FGF), інсуліноподібного фактора росту (IGF) або фактора росту з тромбоцитів (PDGF). Вони можуть бути розміщені на поверхні за допомогою простого просочування речовини через, наприклад, ковалентне зв'язування.

ЛЕКЦІЯ 5. ОКРЕМІ ВИПАДКИ БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ



ОКРЕМІ ВИПАДКИ БІОМІНЕРАЛІЗАЦІЇ

Не всі принципи, розглянуті в лекції 4, діють для всіх біоматеріалів. Тому біомінералізацію необхідно проілюструвати на деяких прикладах.

Кістки

Згідно з Weiner і Wagner термін *«кістка визначає сімейство матеріалів, побудованих із мінералізованих колагенових волокон»*.

Це сімейство мінералів поряд із власне кісткою містить **дентин** (внутрішній мінерал зубів), **зубний цемент** (тонкий шар між коренем зуба і щелепою), **мінералізовані сухожилля** і **мінералізовані хрящі**.

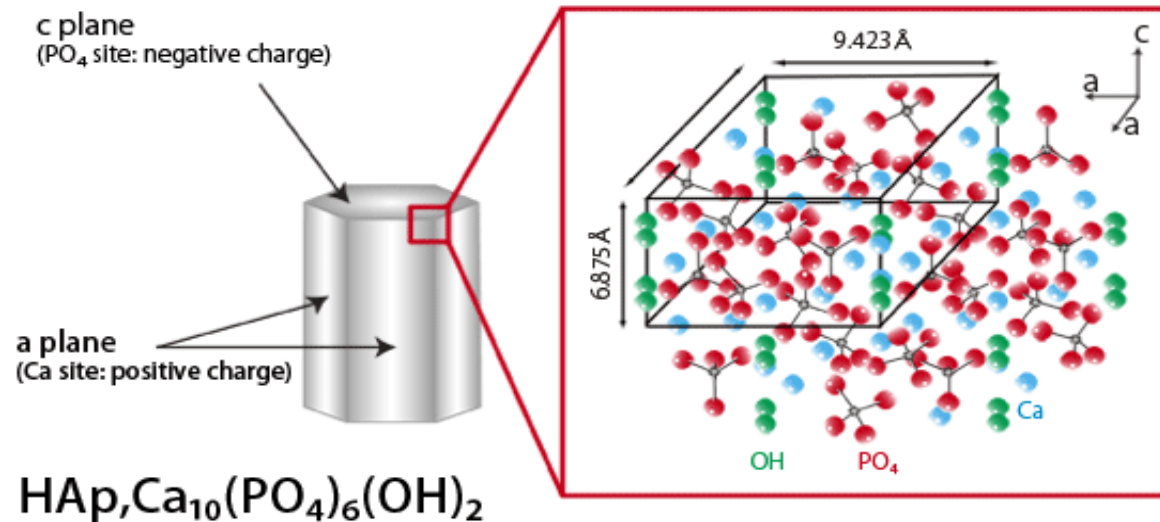
Кістки складають більшу частину твердої тканини людини.

Основними функціями є, з одного боку, забезпечення механічної стабільності, а з іншого – накопичення кальцію і фосфору для різних метаболічних цілей.



АРХІТЕКТУРА КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ: *Від макро- до нанорівня*

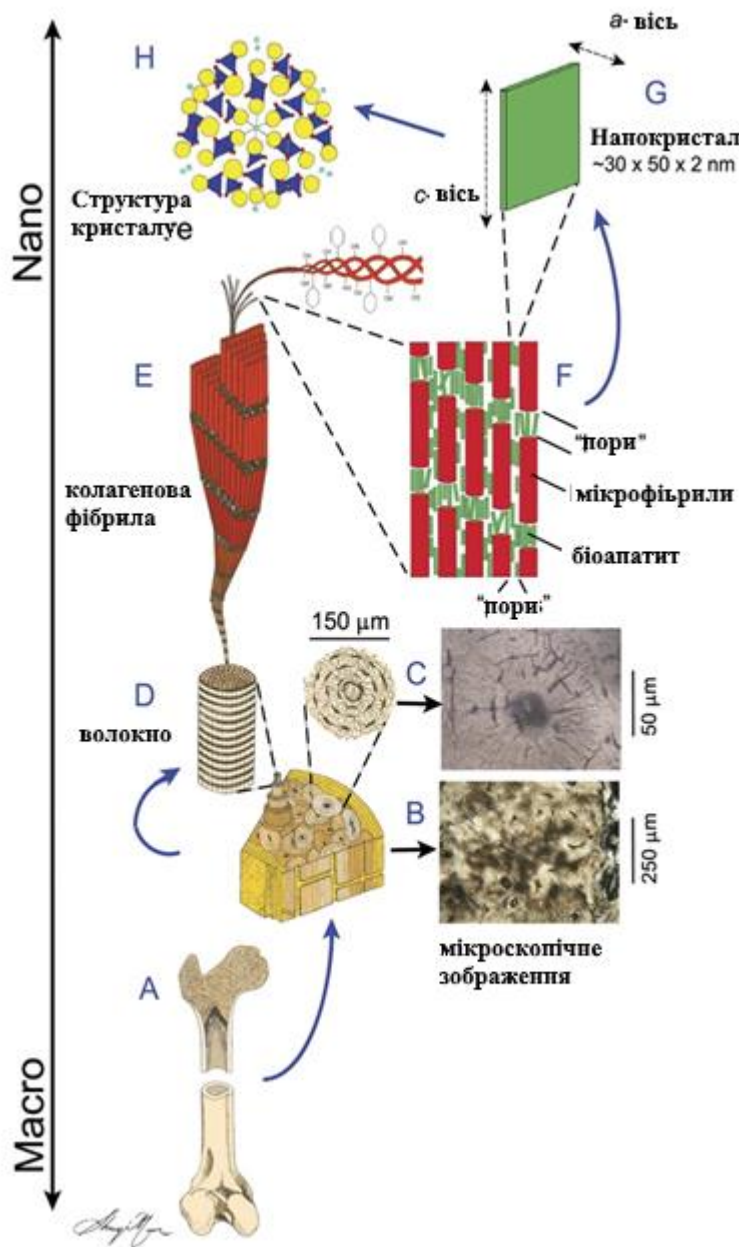
З хімічного погляду кістка є композитом, який складається з **неорганічної фази** (ФК, точніше гідроксиапатит (hydroxyapatite – HA), $[\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3(\text{OH})]$, але частіше використовують формулу $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, тим самим зазначаючи, що елементарна кристалічна комірка містить дві молекули), **органічної фази** (передусім протеїн колаген (Col)) і так званих **неколагенових протеїнів** (остеокальцин, остеопонтин тощо).



Зазвичай, кістка складається з відносно щільного зовнішнього шару (кортикальна або компактна кістка), який оточує пористу кістку (губчата кістка), яка заповнена желеподібним кістковим мозком. Окремі кісткові нитки в губчастій кістці називаються **трабекулами**. Пористі кістки мають велике значення для обміну речовин і для доступності клітин. Поряд із цим вони відіграють важливу роль для анізотропії механічної стабільності кістки. Кістка оточена окістям (періост).

Мікроскопічними складовими кістки є мінералізовані **колагенові волокна («фібрили»)** 80–100 нм у діаметрі в разі довжини в декілька мікрометрів. Вони містять біоapatит (CDHA, «дахліт») і молекули колагену, тип I, які утворюють потрійну спіраль. Кристали апатиту в кістці мають форму пластин (розміщені вздовж кристалографічної осі *c*). Їх товщина становить близько 2–4 нм. Кристали вбудовані паралельно в колагенові фібрили.

Наступний рівень – утворення фібрилами тривимірних решіток (наприклад, пластинчатих або неупорядкованих).



ГА і Кол мають специфічну організацію: все починається з нанорівня, а саме – з нанопластин НА і нанофібрил колагену, які внаслідок цього утворюють єдину структуру – мінералізовані колагенові фібрили, які переходять на більш високий структурний рівень, закінчуючи макроскопічною кістковою тканиною.

Це сприяє унікальним механічним властивостям КТ, яка одночасно є як пружною, так і твердою: колаген відповідає за пружність (навантаження під час розтягу та згину), а ГА – за твердість (навантаження під час стискання).

Склад КТ (елементи)

Важливі
(*major*)

wt%

O (31,9), C (16,7), Ca (25,4),
P (11,0)

Незначні
(*minor*)

wt%

Cl (0,13), K (0,008),
Na (0,526), S (0,08)

Слідові
(*trace*)

ppm

Al (28,9), B (22,3), F (15,40),
Fe (7,6), Pb (4,4), Zn (20,5),
Sr (69,7)

Ca, P – мають стабільний вміст у зрілих кістках.

Mg – змінюється з віком.

Слідові елементи мають різну концентрацію в різних КТ.

ЛОКАЛІЗАЦІЯ

N – кістки, протеїни (колаген; є індикатором колагену в кістці).

O – мінеральна частина кістки, H_2O .

– органічна частина.

C – найбільша частина кістки, пов'язаний з органічною матрицею, також CO_3^{2-} .

P – переважно як ОФ іони (PO_4^{2-}), також HPO_4^{2-} , органічні молекули тощо.

Ca – переважно в КТ, представляє рівень мінералізації.

Якщо слідові елементи перебувають в апатитно-мінеральній фазі (Mg, Na, F, Sr, Pb), то інші (Si, Mn, Cu) – в органічній матриці, а третя категорія (Zn) – в обох.

Так, узагальнюючи літературні дані про роль і ступінь участі мікроелементів у кісткоутворенні, їх можна поділити на п'ять груп:

- 1) активатори кісткової мінералізації – Cu, Mn, F, Si, V;
- 2) інгібітори кісткової мінералізації – Sr, Cd, Be, Fe;
- 3) активатори кісткової резорбції – Mg, Zn, Ba;
- 4) елементи, які беруть участь у синтезі органічних речовин, – Zn, Be, Cu, Mn, Si;
- 5) активатори кісткових клітин і ферментів – Mg, Zn, Be і їх інгібітори – Mo.

Зміна змісту елементів у кістковій тканині (надлишок або недолік), насамперед кальцію і фосфору, призводить до порушення метаболічних процесів і є причиною різних кістково-суглобових захворювань, патологій зубів і патогенного мінералоутворення.

ФАЗОВИЙ СКЛАД КТ

Ідентифікація КТ як стехіометричний ГА (Walt, 1925) є некоректною.

Причини: а) КТ є збідненою на OH^- -іони;

б) наявність CO_3^{2-} -іонів.



КАРБОНАТНИЙ АПАТИТ



Відхилення від стехіометричного визначається співвідношенням

$$\text{Ca}/(\text{P} + \text{C}^*) = (10 - \text{X})/6,$$

де C^* – вуглець карбонатного іона.

Кожний двовалентний іон CO_3^{2-} , який заміщує PO_4^{3-} викликає втрату іонів OH^-

(межа нестехіометричності – $\text{X} = 2$ (всі OH^- вільні))

ІОННІ ЗАМІЩЕННЯ

Однозначної думки щодо ролі іонних заміщень у фізіології КТ не існує.

PO_4^{3-} на CO_3^{2-} заміщення викликає зменшення розмірів кристалітів і ступеня кристалічності, а також є важливими для біохімії КТ і плазми крові.

Заміщення аніонів, локалізованих у каналах (у Z-позиціях). Z-аніони, локалізовані в каналах структури апатиту, здебільшого репрезентованих аніонами F^- , Cl^- , OH^- . Інші замісники, здатні займати цю позицію, можуть належати до одновалентних аніонів (Br^- , I^- , O_2^- , O_3^-) і до двовалентних аніонів. Можуть бути наявними вакансії (Vac), сукупності вакансій, а також нейтральні або органічні молекули.

Аніон фтору (F^-), заміщуючи аніон OH^- , сприяє зменшенню розчинності ГА за pH7.

Бром і йод проявляються як замісники в природних апатитах тільки в незначних кількостях.

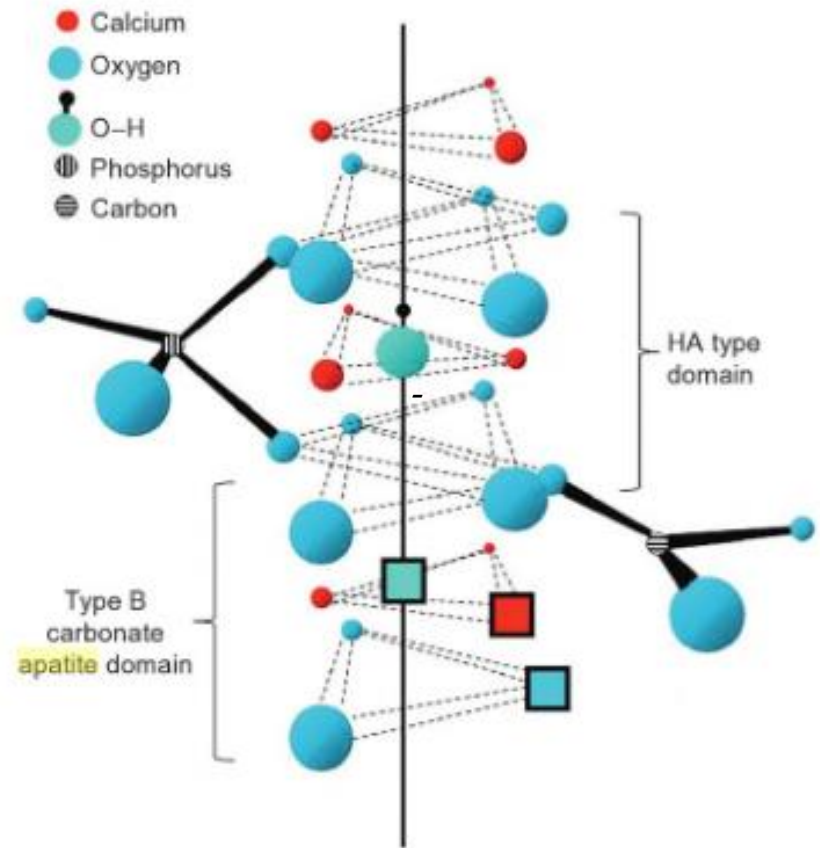
Ще один тип вакансій у каналах пов'язаний із входженням у структуру двовалентних аніонів (таких, як O^{2-} , CO_3^{2-} , S^{2-}).

Апатит, що містить карбонат-іони в каналах структури, називають карбон-апатитом А-типу.

Заміщення в позиціях Ca^{2+} -іонів. Заміщення Ca^{2+} -іонів численні. Кальцій може заміщатися як двовалентними, так і одно- і тривалентними катіонами. Найпоширенішим у природі замісником кальцію в апатитах є стронцій, який утворює різноманітні спектри твердих розчинів із кальцієм в апатитах.

КОМПЕНСАЦІЯ ЗАРЯДУ ЗІ СТРУКТУРНОГО ПОГЛЯДУ

Механізм компенсації заряду у В-типі карбонатних і HPO_4^{2-} -вмісних апатитах, пояснює дефіцит ОН. Заміна PO_4^{3-} двовалентною формою (карбонатний іон) пов'язана з катіонною вакансією на ділянках Ca^{2+} (тип II) і вакансією в моновалентному місці ОН, утворюючи кластери вакансій. Вважається, що вакансії частково зайняті молекулами води. Такі кластери вакансій і середовища типу НА можуть співіснувати в одному кристалі (Rey et al., 2009)



СТРУКТУРА БІОЛОГІЧНИХ НАНОКРИСТАЛІВ

Утворення кісткового мінералу

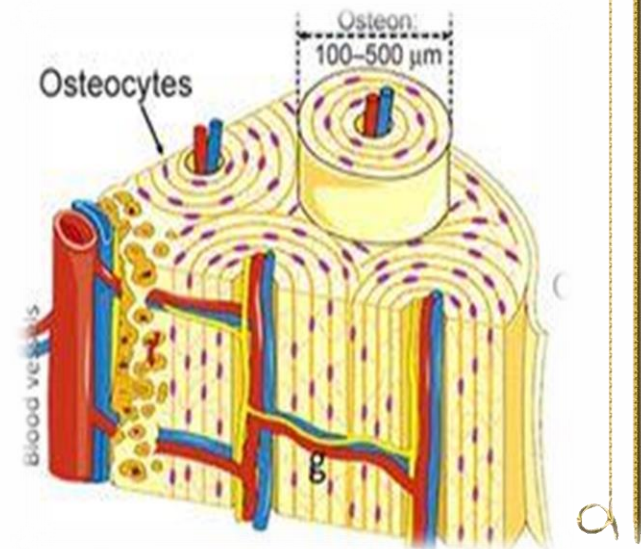
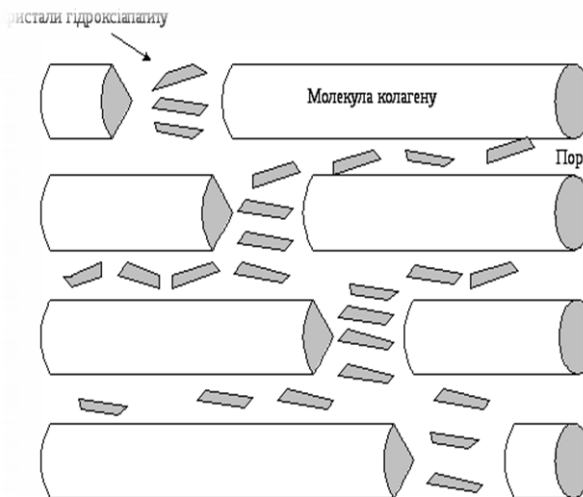
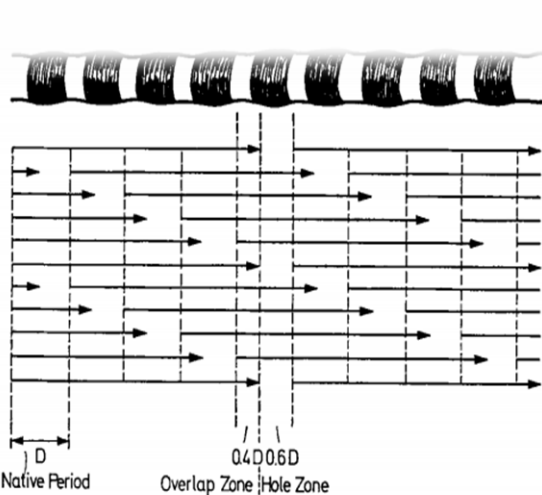
Досліджено *in vivo* (ембріони, дефекти кісток, у системах із повільною мінералізацією).

Осадження в ЕКМ колагенової матриці зі специфічною організацією фібрил (quarter stagger-arrays) із дірковими зонами (Hodge, 1989).

Формування мінералу відбувається в діркових зонах.

ОСТЕОН – концентричне розташування колагенових шарів.

Szymendera J. (1970)

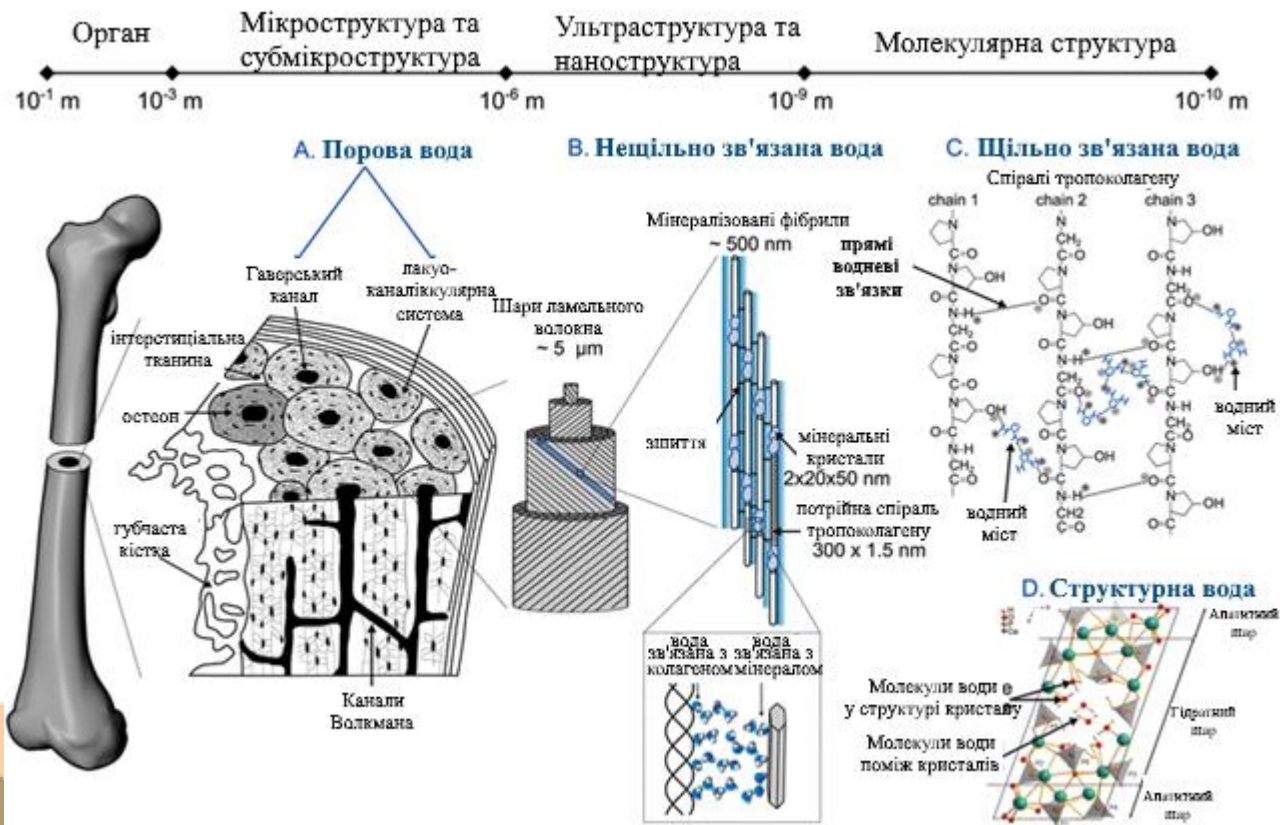


A diagrammatic representation of the quarter-stagger arrangement of tropocollagen molecules in the fibril of native collagen, as advocated by PETRUSKA and HODGE

ГІДРАТНІ ДОМЕНИ КТ

FTIR, SSNMR: КТ утворена апатитною фазою з CO_3^{2-}
та фосфатними іонами HPO_4^{2-} .

- Але ці іони спостерігаються і в «неапатитному» оточенні, які контактують з H_2O .
- Це змінює уявлення про кістковий склад, які *не враховували* гідратацію (поверхневий H_2O шар).

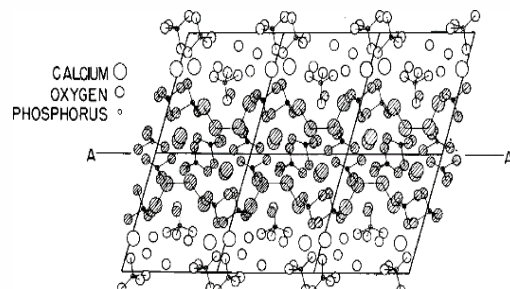


ПРЕКУРСОРИ БІОПАТИТУ

Найчастіше, кістковий апатитний мінерал (КАМ) – це результат трансформації прекурсорних фаз, яка оснований на фіксації **проміжних** фаз під час синтезу ОФК, що характерно для більш загального явища формування перехідних фаз (правило Освальда).

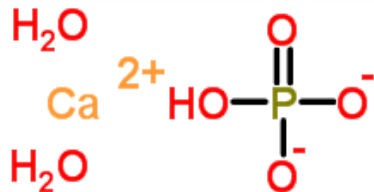
АСР – найстаріша гіпотеза, яка ґрунтується на покращанні кристалічності з часом.

ОСР – $(Ca_8(HPO_4)_2(PO_4)_4 \cdot 5H_2O)$ формується за допомогою сендвіча гідратний шар/апатит).



Але триклинна структура ОСР дає XRD піки, які відмінні від апатиту, а також наявність карбонату, що характерно для біоапатиту, не спостерігається.

- **ДСРД** – (брюшит, $CaHPO_4 \cdot 2H_2O$).



Екстраклітинна рідина перенасичена ДСРД. Умови формування ДСРД – це $pH < 7$, тому цей прекурсор має слабку підтримку.

На цей момент кісткові кристали – стабільні (нестехіометричні) апатитні ядра, оточені неапатитним *гідратним* шаром, який мінімізує поверхневу енергію нанокристалів.

ЕКСТРАКЛІТИННА РІДИНА КІСТКИ (КР)

Кісткові кристали занурені в кісткову рідину, склад якої важко аналізувати (завдяки постійній еволюції мінеральних кристалів, що залежать від змін у рідинах, які перебувають в рівновазі з кристалами).

Загальноприйнятним є: іонна концентрація в КР така, як у крові, за винятком мінеральних іонів, які специфічно зв'язані з кістковими макромолекулами (ОС, ОП, ...).

У сироватці крові вміст Са є постійною величиною в різних організмах: ~2,5 mM.

Навпаки, вміст фосфатних іонів значно варіюється: 2 mM (нові кістки), 1 mM (дорослі кістки), відсутній зв'язок фосфатних іонів із макромолекулами.

Значення рН зрілої КР є більш кислим, ніж фізіологічний рН.

DCPD, ACP – недостатньо насичені і можуть розчинитися, а **ОСР і НА** – перенасичені, тобто будуть стабільними в КР.

СИНТЕЗ БІОМІМЕТИЧНОГО АПАТИТУ

Розроблено декілька методик синтезу кісткового мінералу.

Наш синтез ґрунтується на осадженні з використанням подвійного розкладання (double decomposition) між кальцієвими та фосфатними розчинами:

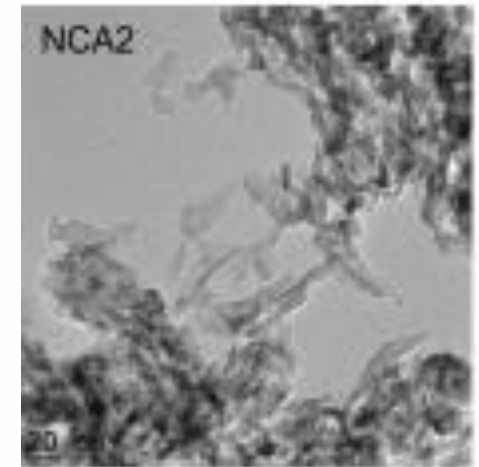
Катіонний розчин (500 ml)	Нітрат кальцію : 0,3 М $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$
Аніонний розчин (500 ml)	Гідрофосфат амонію : 0,5 М $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$
pH = 12 (додавання NH_4OH) Температура – 80 °C	

Осадження отримують за допомогою повільного вливання розчину Ca у фосфатний розчин. Спочатку утворюється аморфна фаза, яка трансформується в нанокристалічний апатит протягом декількох хвилин.

Далі відбувається старіння (24 год), відмивання деіонізованою водою до pH = 7,4 та центрифугування (8 000 об/хв, 8 хв) для отримання твердої фракції. Після цього здійснюються сушіння (37 °C) та відпалювання (900 °C) для подальших досліджень.

Ці умови далекі від тих, що спостерігаються під час утворення кісткових кристалів (які більшості невідомі), але найважливіші параметри (фізичний pH і низька температура) зберігаються, за яких утворюються пластинчасті апатитні кристали з розмірами і нерегулярною морфологією, схожою з апатитними кристалами.

Pascaud et al. (2013)

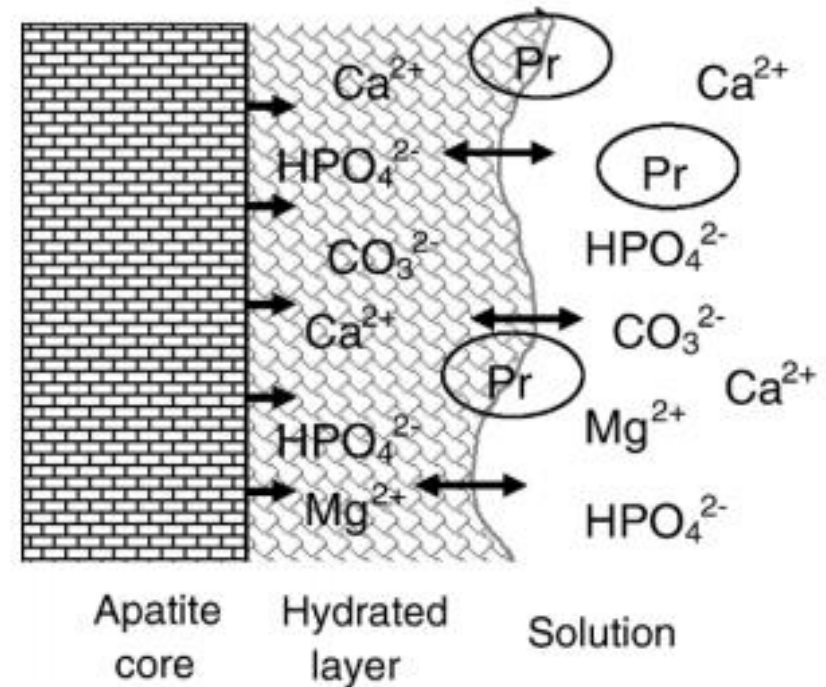


ТЕМ-зображення синтетичного нанокристалічного апатиту з розміром і складом, схожим із мінералом кістки, що демонструє характер тромбоцитів.
Ca/P + C = 1,38

ДОЗРІВАННЯ СИНТЕТИЧНИХ АПАТИТНИХ НАНОКРИСТАЛІВ

Отримані цим методом апатитні нанокристали (АпНК) дуже близькі до отриманих *in vivo* на початку мінералізації з низьким співвідношенням $\text{Ca/P} + \text{C}$, близьким до ОСР (1,33), і малою часткою CO_3 , які містяться в гідратному поверхневому шарі:

Модель кісткового нанокристалічного апатиту: структурований гідратований шар переважно містить слабопов'язані двовалентні іони, деякі з яких, такі як карбонати, HPO_4^{2-} і Ca^{2+} , можуть бути додані до апатитних доменів, що зростають, і замінені на мінеральні іони з розчину та/або заряджені групи білків (Pr) чи інші молекули (Ray et al., 2007).



КЛІТИНИ КІСТКИ

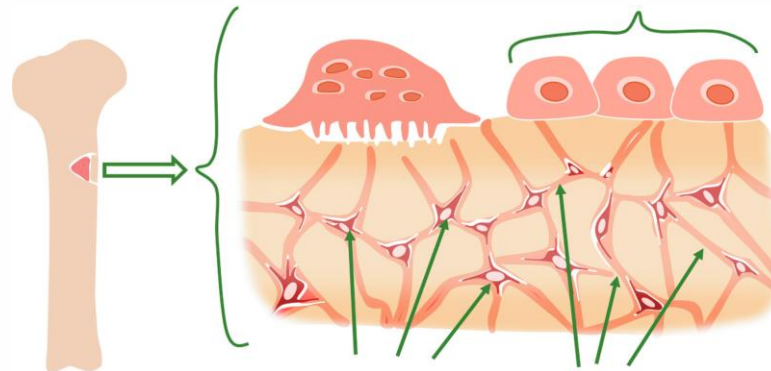
Остеобласти є відповідальними за формування нової кісткової тканини, тобто саме вони синтезують гідроксиапатит і колаген.

Остеокласти є відповідальними за розчинність КТ за допомогою створення кислотного оточення для розчинення фосфату кальцію та протеаз (proteases), які розчиняють колаген. Разом вони забезпечують життєздатність КТ, проходження так званого процесу «remodeling» із метою адаптації до змінних механічних потреб.

Наприклад, збільшення ваги тіла призводить до збільшення кісткової маси, тоді як відсутність механічної стимуляції (астронавти в умовах невагомості, або пацієнти під час довготривалого лікування за відсутності вправ) призводить до зменшення кісткової маси. Якщо ця делікатна рівновага між остеобlastами і остеокластами порушується, виникають захворювання гідроксія до остеопорозу (osteoporosis) (втрата маси кістки) або остеопетрозу (osteopetrosis) (збільшення маси кістки). Цікаво відзначити, що навколо ендопротезів подібно до штучних стегнових імплантатумів спостерігається так званий «stress shielding» ефект, який призводить до втрати механічної стимуляції оточуючої КТ з подальшою втратою кістки (Sumner et al., 1992; Cristofolini, 1997).

Третім типом клітин є *остеоцити* (osteocytes).

Вони утворюються з остеобlastів, які обростають новою кістковою тканиною до повної інкапсуляції. Вони з'єднані з оточуючими клітинами через мережу каналів (canaliculi) і є відповідальними за механотрансдукцію (mechanotransduction), тобто за подання сигналу КТ є механічно навантаженою (і має бути зміцнена) або ненавантаженою (і має бути резорбована).



ПРОЦЕС УТВОРЕННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

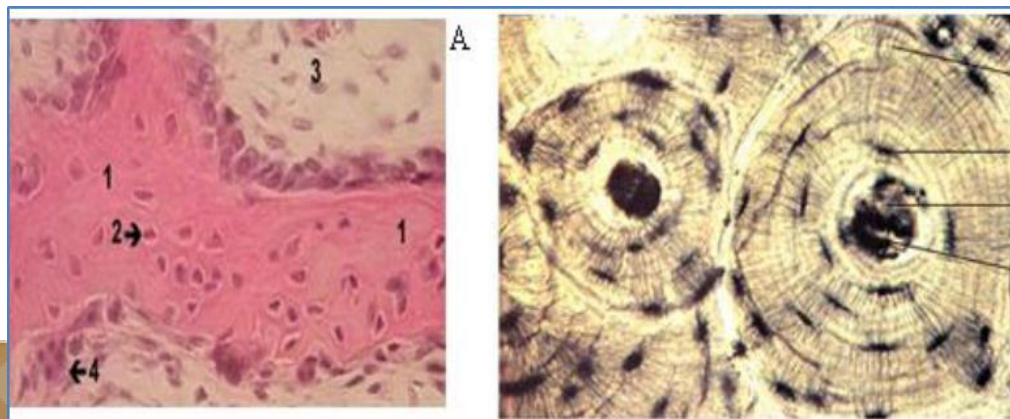
Загалом, процес утворення кісткової тканини відбувається так.

Остеобласти синтезують колаген(и) і фосфат кальцію. Спочатку утворюється немінералізована тканина, так званий остеїд, який складається з колагенів. Порожні простори заповнені переважно водою. Пізніше спостерігається мінералізація, тобто розміщення в органічній матриці ГА з витискуванням молекул води.

Окостеніння в разі початкового утворення кістки в ембріонах. Кістка утворюється із з'єднувальної тканини.

З іншого боку, енхондральна осифікація (окостеніння) спостерігається в зоні росту (епіфізів) у довгих кістках близько суглобів. До того ж врешті, хрящ перетворюється на кістку. Це спричиняє подовження кістки.

Перихондральна осифікація викликає збільшення товщини довгих кісток: нова кісткова тканина утворюється із зовнішнього боку кістки. Обидва процеси спостерігаються особливо під час росту кісток у дітей.

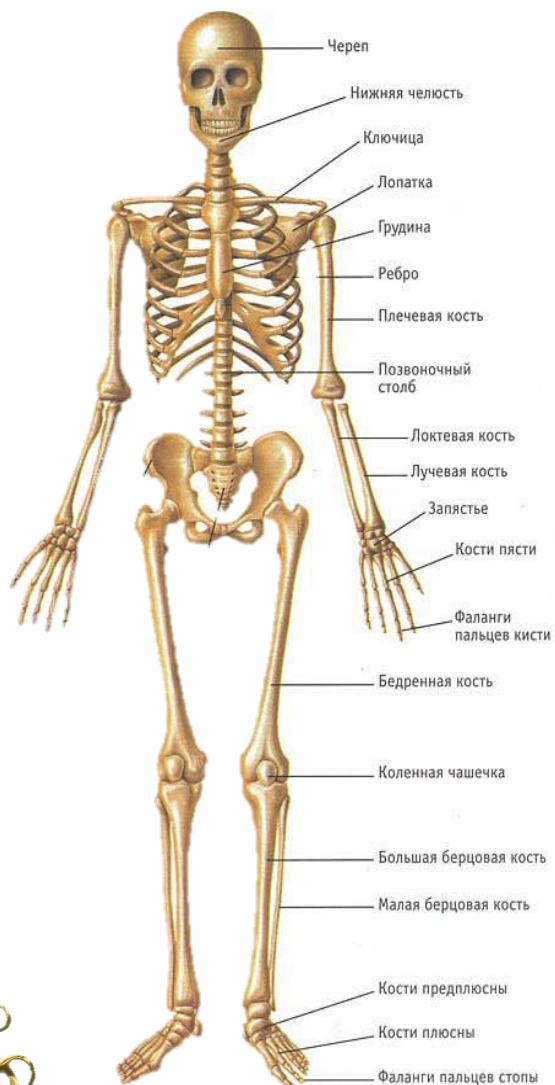


1 – міжклітинна речовина;

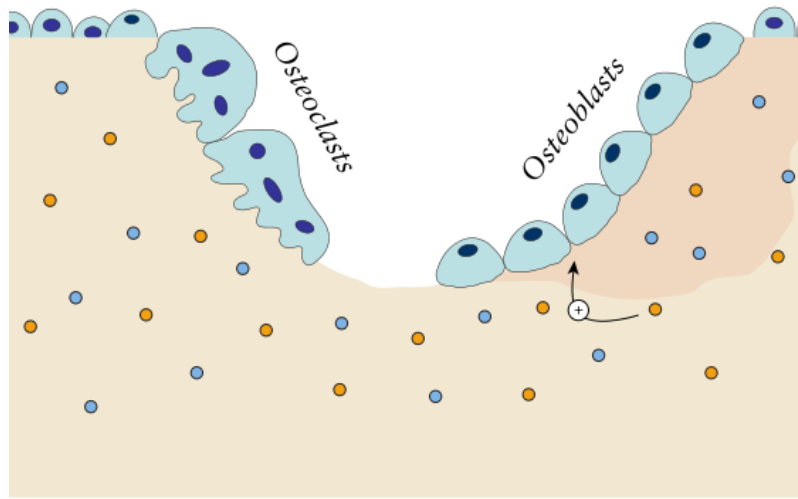
2 – остеоцити; 3 – окістя;

4 – остеокласт

ТКАНИНИ СКЕЛЕТА



РЕМОДЕЛЮВАННЯ



- TGF-β, transforming growth factor Beta
- IGF, insulin-like growth factor

На відміну від інших твердих тканин в організмі, кістка перебуває в безперервному процесі творення і руйнування, так званому **ремоделюванні**. Це стосується більшості, тобто не всіх кісток тіла (винятки становлять, наприклад, кістки в середньому вусі). Як вже зазначалося, остеокласти постійно руйнують кісткову масу, тоді як остеобласти безперестанно будують нову кістку. Водночас остеокласти мають міцну адгезію з поверхнею кістки і розчиняють кісткову тканину за допомогою утворення кислого середовища для розчинення ФК (рН 4–4,5) і виділяють спеціальні ферменти (колагенази), які руйнують колаген.

У здоровому організмі спостерігається динамічна рівновага двох процесів. Якщо переважає кісткове руйнування, то настає **остеопороз**; якщо переважає процес творення – розвивається **остеопетроз**.

Управління цією рівновагою здійснюється через рід сигнальних молекул (факторів), механізм дії яких поки що не вивчений і тому лікування кісткових захворювань і особливо остеопорозу не є досконалим.

ЗУБИ

Зуби – друга важлива тверда тканина у високоорганізованих організмах.

Структура зубів ще більш складна, ніж структура кісток.

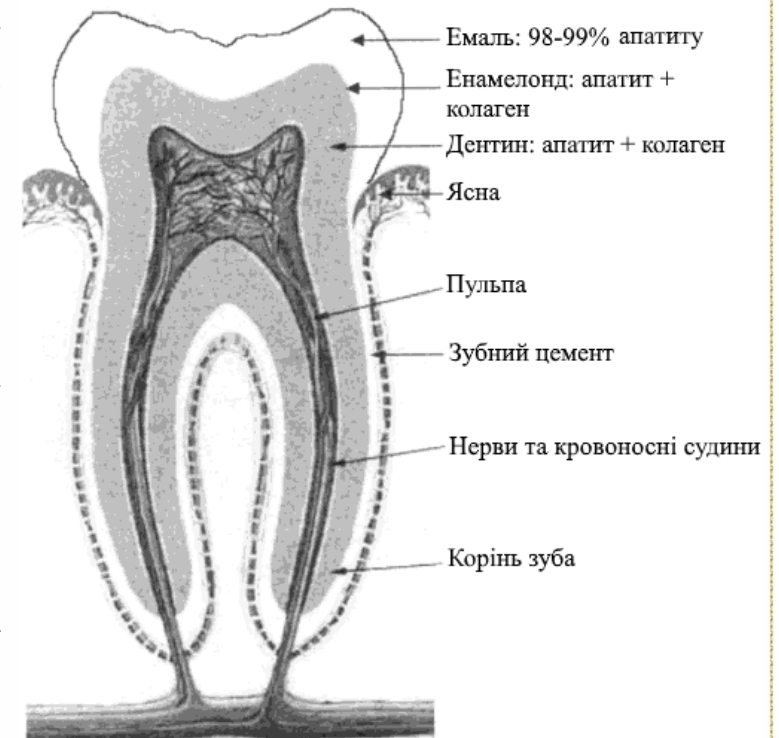
Зуби складаються з 3 різних біомінералів: зубна емаль на зовнішньому боці, «кістка» зуба (дентин) на внутрішньому боці і зубний цемент.

Дентин і кістки мають схожу структуру, тобто їх практично можна порівнювати один до одного.

Корінь зуба оточений цементом, через який спостерігається механічний зв'язок із кістковим оточенням. Ця біомеханічна оптимальна структура надає можливість працювати багато років.

Утворення зубів розпочинається в ембріональній фазі з 4 тижнів до 6 тижнів з дня запліднення.

Зубна емаль має іншу структуру, ніж дентин і кістки. Вона містить кристали з біоапатиту, які значно більші, ніж нанокристали в кістках і дентині. Крім того, емаль не має колагену. Перехідна фаза між емаллю і дентином називається емалеоїдом (тверда тканина з кристалами як в емалі з біоапатиту разом із колагеном).



ЕМАЛЬ

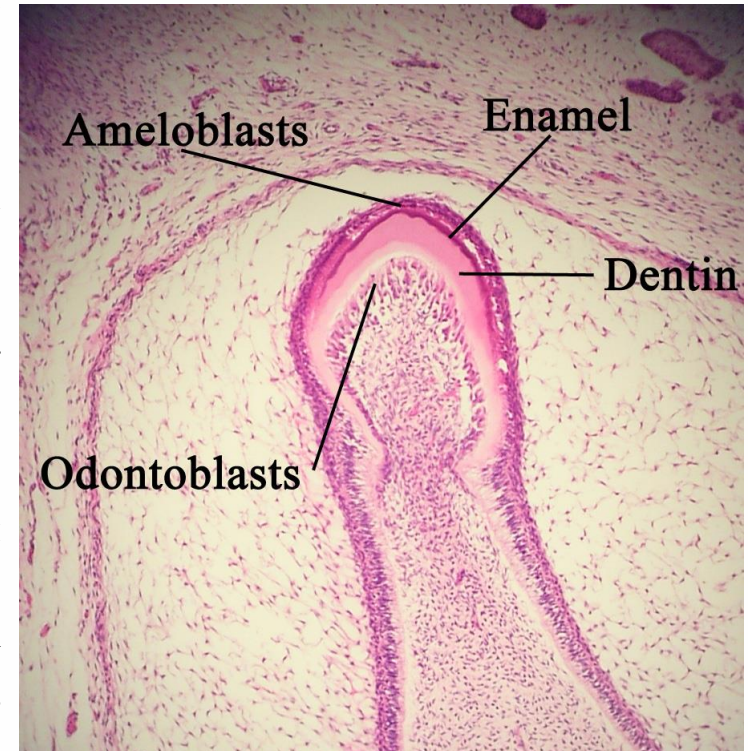
Різниця між емаллю й емалеоїдом – розмір неорганічного кристала: мінеральна фаза в зубній емалі складається з голчастих кристалів, деякі з яких мають довжину 10 мкм (до 100 мкм), але товщина становлять тільки 50 нм.

На поверхні зубна емаль містить також фторид (200–1 000 ppm, близько 0,01 ваг % всього), який заміщує гідроксидні позиції в апатиті. Це підвищує твердість емалі і зменшує кислотну розчинність і бактеріальну агресію.

Довгі кристали емалі ростуть паралельно за умови сурового біологічного контролю, який існує на всіх стадіях утворення зубної емалі.

Кристалічні поверхні в кристалах емалі мають орієнтацію (100) на бокових поверхнях і ймовірно (001) на торцях кристала як для звичного апатиту.

Спеціальні клітини (**амелобласти**) утворюють матрицю емалі, у якій біоматеріал стабілізується. Ця матриця емалі складається на 90% з неколагенового протеїну амелогеніну. У процесі дозрівання емалі органічна матриця заміщується ФК до повного утворення неорганічної тканини.



ДЕНТИН

Дентин після утворення, на відміну від статичної зубної емалі, є динамічною тканиною, яка після прорізання зубів повинна перебудовуватися для пристосування до зовнішніх механічних подразників. Утворення «первинного дентину» під час утворення зуба відбувається за участі преодонтобластів і одонтобластів насамперед у формі немінералізованої матриці дентину (переважно, колагени), у яку відразу закладається ФК. У дозрілому дентині наявні численні паралельні канали.

Фізико-хімічна форма біомінералізації протікає постійно на наших зубах. Оскільки емаль виникає тільки під час утворення зуба в щелепі і не має клітин, то її не можна лікувати клітинними механізмами (відсутнє *ремоделювання* як у кістці). Хімічне пошкодження кислотою (наприклад, кислотовмісними напоями або продуктами) спричиняє локальне розчинення ФК-мінералу.

На щастя, слина (так само як і плазма крові) перенасичена похідними апатиту, що сприяє самолікуванню завдяки кристалізації. Цей процес має виключно фізико-хімічну природу, тобто він не перебуває під біологічним контролем і тому його можна також назвати «пасивна мінералізація». Заміщення у зубній емалі ОН на фториди (хімічні сполуки фтору з іншими елементами – HF, FeF₃ тощо) підвищує її кислотостійкість.

ПАТОЛОГІЧНА МІНЕРАЛІЗАЦІЯ

Більшість патологічних склерозів супроводжуються кристалізацією мінералів у небажаних місцях. З медичного погляду важливими є атеросклероз (відкладення на стінках судин холестерину і ФК) і утворення каменів, наприклад у сечовому міхурі і нирках. Такі камені складаються, найімовірніше, з оксалату кальцію – $\text{CaC}_2\text{O}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, фосфату кальцію, амонієвого фосфату магнію (струвіт) або сечової кислоти.

Утворення карієсу це результат заміни малорозчинного твердого апатиту на інші, більш розчинні і м'які фази фосфату кальцію.

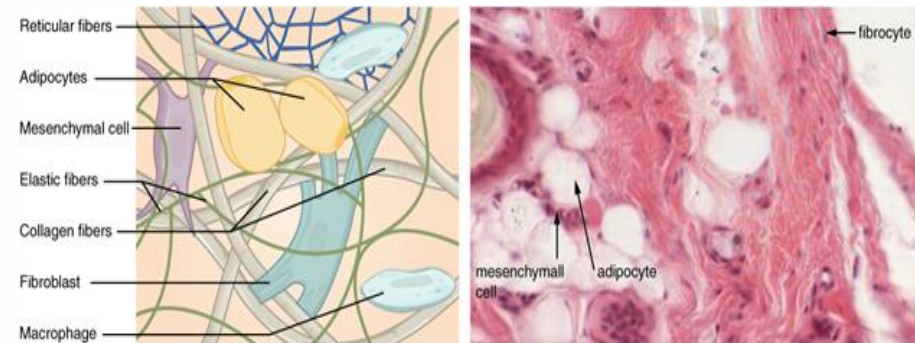
Хондрокальциноз – це захворювання, за якого ФК відкладається у хрящах. Біоматеріали також можуть небажано бути кальцинованими.

З фізико-хімічного погляду бути кальцинованим – це мати кристалізацію неорганічних мінералів з перенасичених рідин тіла в біологічних тканинах. Очевидно, у цьому разі не працюють фізіологічні механізми регулювання (буферні системи), які у здоровому організмі запобігають відкладенню мінералу.

Механізм пригнічення (інгібування) кальцифікації в деталях не відомий; очевидно, що вирішальну роль відіграє або комплексування надлишкових іонів у плазмі, або запобігання росту зародка через переважну адсорбцію інгібітора на поверхні кристала.

Подібно «нормальній» біомінералізації необхідні особливі місця для утворення зародка, на якому відбудеться кристалізація.

Праворуч – гістологічний пофарбований препарат сполучної тканини. Ліворуч – схематичне зображення сполучної тканини



БЛЯШКИ

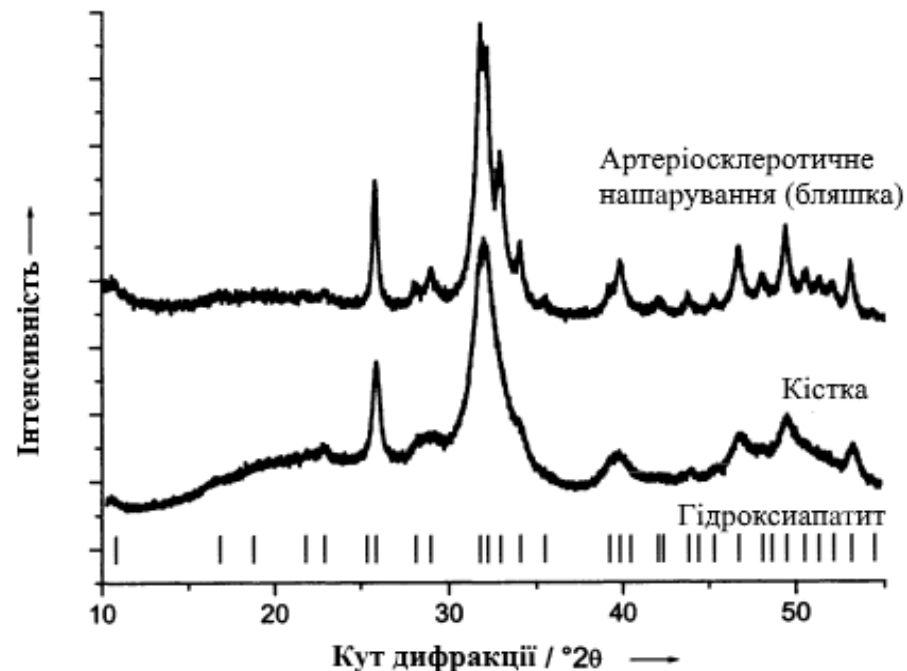
На сьогодні обговорюються такі чинники кальцифікації бляшки в разі атеросклерозу.

1. **Гетерогенне** утворення зародка ФК на мембранах мертвих клітин (індукція кристалізації через фосфатні групи мембранних фосфоліпідів).

2. Утворення зародка **білками-антитілами**, спрямованими проти холестерину і цим дають можливість випадіння кристалів.

3. У прогресивному атеросклерозі кістковоподібні структури утворюються клітинами, схожими на остеобласти (так звані перицити) на внутрішньому боці артерій. Це біологічно **контрольована** мінералізація.

4. Атеросклеротичні відкладення («бляшки») у прогресивній стадії більше ніж 50 ваг % апатиту, схожого на кістковий мінерал.



Дифрактограма атеросклеротичного відкладення (бляшка) порівняно з кісткою. Зображені положення рефлексів ГА. Кристалічність бляшки значно вища (вузькі рефлекси), але матеріал ще нанокристалічний; структурно мова йде про ГА. Інші кристалічні фази не визначені.

ЛІКУВАННЯ

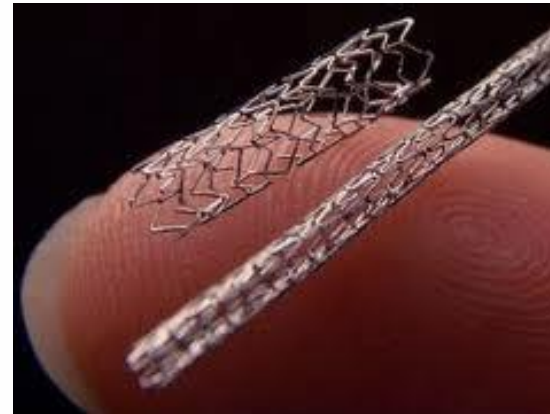
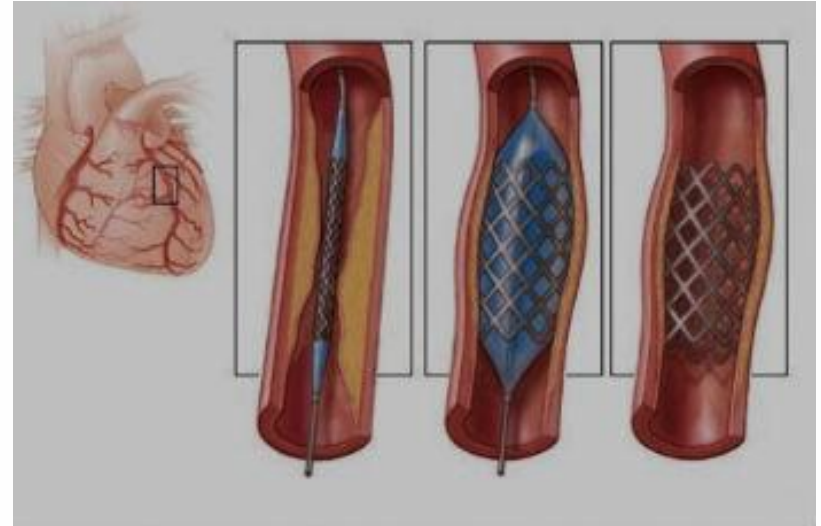
Лікування склерозних судин здійснюється дуже складно.

Часто застосовують такі методи: балонну ангіопластику (процедура відкриття враженої артерії з використанням тонкого катетера з розширюваним балоном на кінці), **стент-імплантації** (введення стиснутого циліндроподібного дротяного плетіння через катетер, під час розкриття якого відбудеться постійне розширення судини) і шунтування.

Призначення **стента** – армування стінки судини на місці бляшки, відновлення адекватного потоку крові, унеможливлення ішемії міокарда (серцевого м'яза – основи серця)

Бажаним було б власне розчинення відкладень холестерину і ФК, але, на жаль, із фізико-хімічного погляду це неможливо, оскільки продукти розчинення апатиту в плазмі крові перенасичені.

Склероз артерій виникає частіше, аніж вен, причина поки що не відома.





ЛЕКЦІЯ 6. КОМПОЗИТНІ БІОМАТЕРІАЛИ



КОВАЛЕНТНІ І НЕКОВАЛЕНТНІ ЗВ'ЯЗКИ

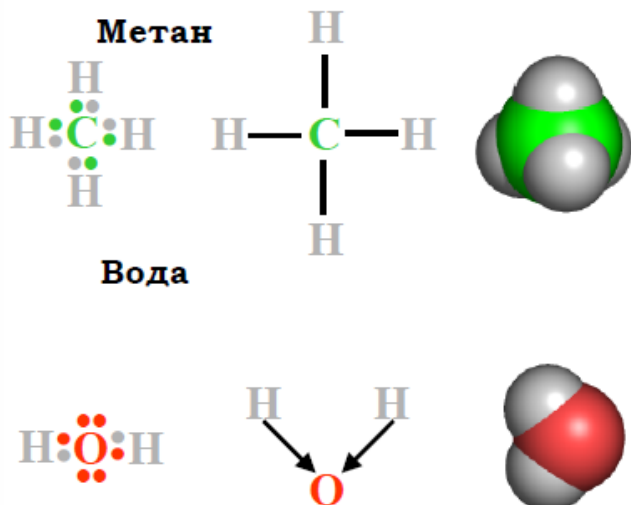
Нековалентні взаємодії: Вандерваальсові взаємодії. Електростатичні (іонні) взаємодії. Водневий зв'язок. Гідрофобні взаємодії.

Ковалентні зв'язки (КЗ)

Ковалентний (або хімічний) зв'язок – це єдина сила, що підтримує цілісність певної системи атомів, яка називається *молекулою*.

Атоми, що утворюють молекули зв'язані КЗ, у яких пари електронів розподілені між парами атомів. Формування КЗ між 2 атомами обумовлено фундаментальним принципом: атом є найбільш стабільним тоді, коли зовнішня електронна оболонка є заповненою. Відповідно кількість зв'язків, який атом здатний утворити, залежить від кількості електронів, необхідних для заповнення зовнішньої оболонки.

Основні властивості ковалентного зв'язку: ковалентний зв'язок дуже міцний. Кожний атом містить певну кількість електронів, які можуть бути узагальненими з іншими атомами; ковалентний зв'язок характеризується певною геометрією: по-перше, кожний зв'язок має конкретну довжину; по-друге, кожний зв'язок певним способом орієнтований у просторі щодо суміжних зв'язків.



ЕЛЕКТРОННА СТРУКТУРА АТОМІВ

Електронна структура деяких атомів наведена на рисунку.

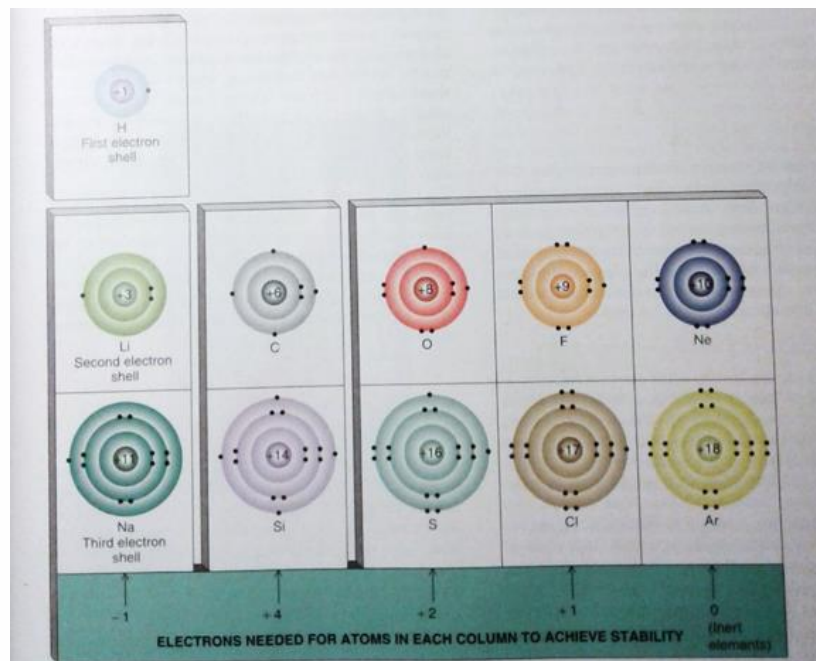
H, He: зовнішня оболонка є заповненою, маючи 2 електрони, решта – 8.

Тому атом O з 6 електронами може заповнити оболонку в комбінації з 2 атомами водню, утворюючи молекулу H₂O, через 2 КЗ, які позначаються як H:O, або H-O.

Формування КЗ супроводжується релізом енергії, яка повинна реабсорбуватися пізніше, якщо КЗ має бути зруйнованим.

Енергія розриву C-H, C-C або C-O КЗ досить значна – типово між 80–100 ккал · моль⁻¹. Калорія – кількість термічної енергії для підняття температури 1 г води на 1 градус.

Якщо дві електронні пари об'єднують 2 атоми (O₂), то КЗ – подвійний зв'язок, три електронні пари – потрійний зв'язок.



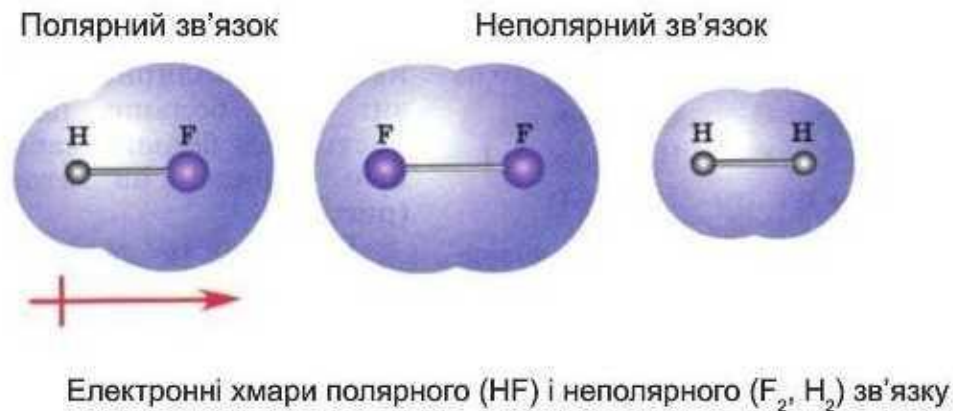
ПОЛЯРНІ І НЕПОЛЯРНІ АТОМИ

H_2O : атом О притягує електрони сильніше, ніж атоми водню. Унаслідок цього О-Н-зв'язки молекули води є поляризованими, тобто один з атомів має частковий негативний заряд, а інший – частково позитивний заряд.

Такі молекули з асиметричним розподілом заряду є **полярними**. Полярні молекули, що мають біологічне значення, містять один або більше електронегативних атомів (О, N, S, P).

Молекули без поляризованих зв'язків, які містять С- і Н-атоми, – **неполярні**.

Біомолекули (протеїни і фосфоліпіди) містять як полярні, так і неполярні ділянки.



ІОНІЗАЦІЯ

Деякі атоми сильно електронегативні і можуть захоплювати електрони інших атомів у процесі хімічних реакцій.

Наприклад, якщо атоми Na (срібний кольоровий метал) і хлору (токсичний газ) змішуються, єдиний електрон зовнішньої оболонки кожного атома натрію мігрує до електрон-дефіцитного атома хлору і внаслідок цього ці 2 матеріали трансформуються в заряджені атоми (іони).



Оскільки іон Cl має екстраелектрон (щодо кількості протонів у ядрі), він має негативний заряд (Cl⁻)-**аніон**. Атом натрію втрачає електрон і має екстразаряд (Na⁺) – **катион**.

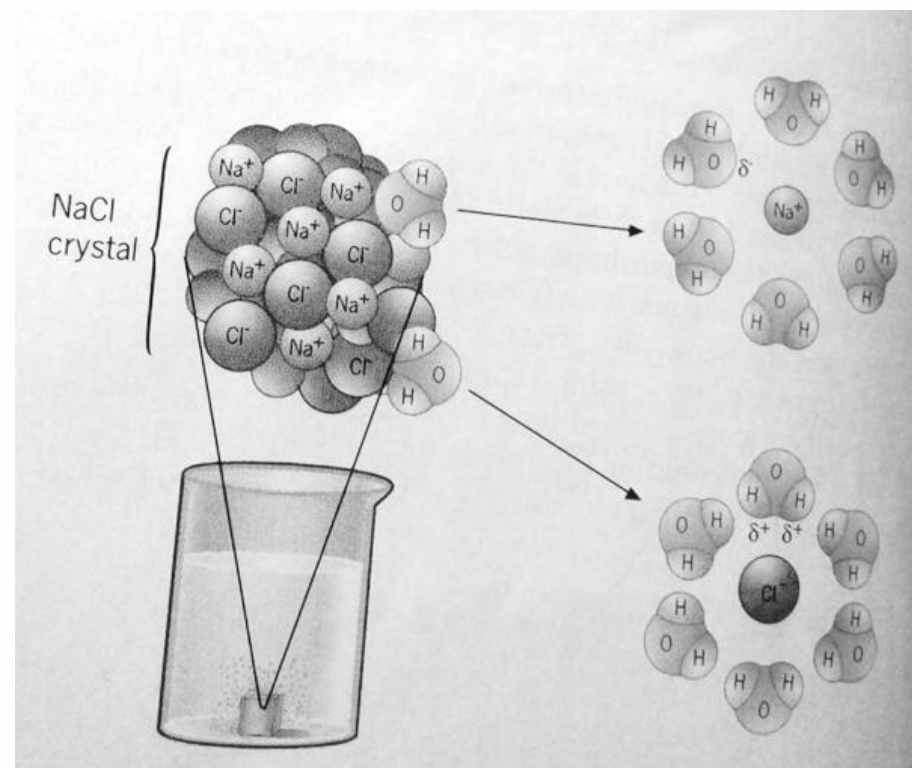
ІОННІ ЗВ'ЯЗКИ

Ковалентні зв'язки утворюють молекули, а взаємодія між молекулами визначається нековалентними зв'язками (НКЗ).

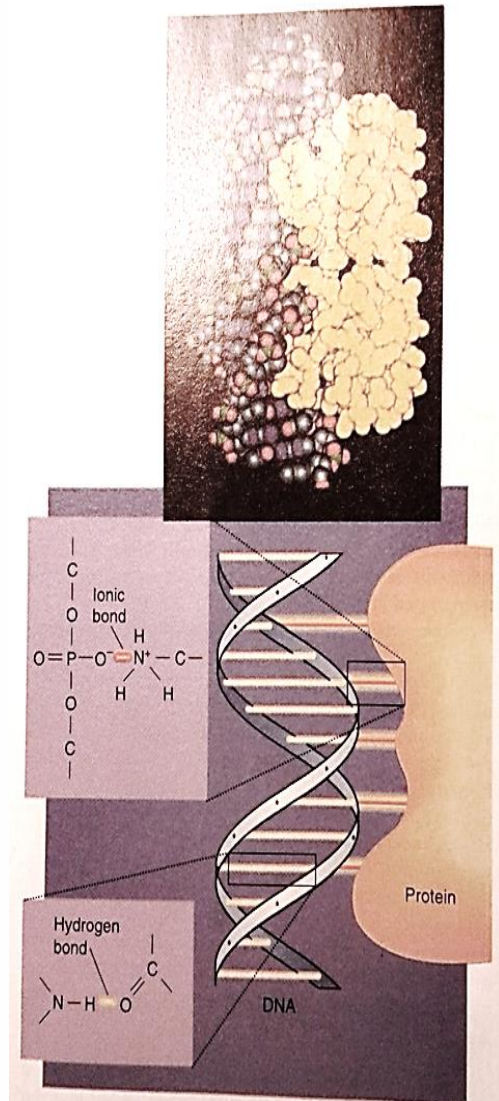
Іонні зв'язки – взаємодія між зарядженими атомами.

Кристал кухонної солі утримується електростатичними взаємодіями позитивно заряджених іонів Na^+ і негативно заряджених іонів Cl^- .

Якщо такий кристал розчиняється у воді, то кожен індивідуальний іон оточений молекулами води (рис.).



ПРОТЕЇН-ДНК-ВЗАЄМОДІЯ



Іонні зв'язки дуже важливі для біомолекул. Наприклад, під час взаємодії негативно заряджених фосфатних атомів ДНК із позитивно зарядженими групами на поверхні протеїну (рис.), іонні зв'язки утримують комплекс як єдину структуру.

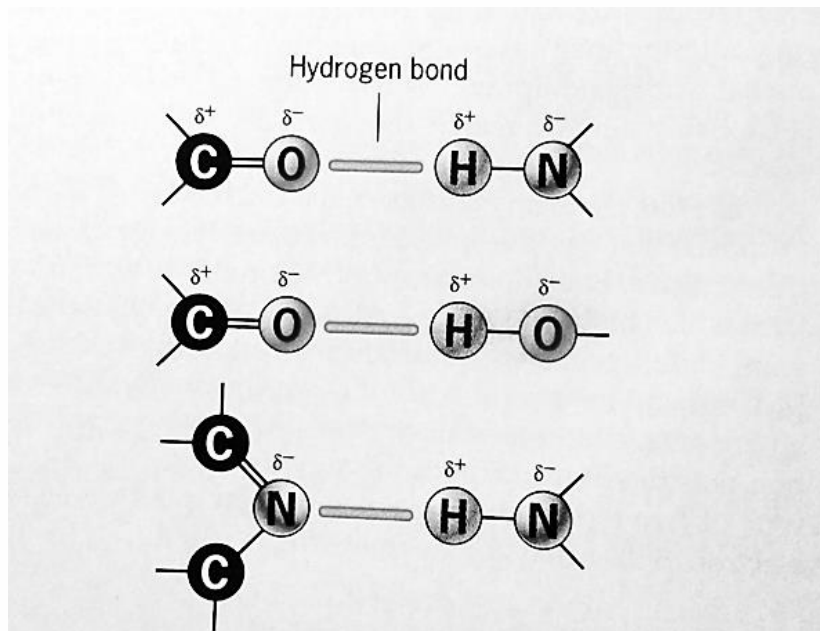
Сила іонних зв'язків у клітині мала (близько $3 \text{ ккал} \times \text{моль}^{-1}$) завдяки наявності H_2O , але всередині протеїну – сила значна.

ВОДНЕВІ ЗВ'ЯЗКИ (Н-ЗВ'ЯЗКИ)

Якщо атом водню ковалентно зв'язаний з електронегативним атомом, зокрема О або N, пара електронів значно зміщена в бік ядра електронегативного атома, залишаючи атом водню з частковим позитивним зарядом.

Унаслідок цього, виникає електростатична взаємодія, яка наближає атом водню до неподіленої пари електронегативного атома і формує притягування (**H-bond**) (рис.).

Ця слабка взаємодія називається *водневим зв'язком* (Н-зв'язок).



ГІДРОФОБНІ ВЗАЄМОДІЇ

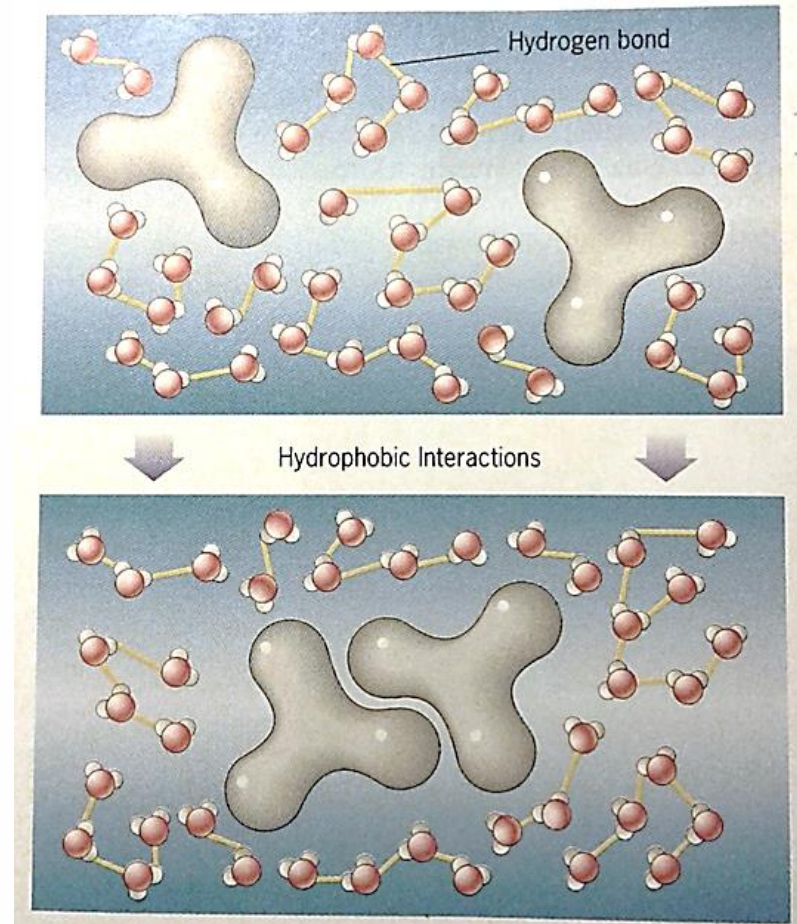
Полярні молекули (амінокислоти, sugars) взаємодіють із водою і тому їх називають гідрофільними (люблять воду).

Неполярні молекули (стероїди, жирні молекули) є нерозчинними у воді, тому що відсутні заряджені групи, які б притягували їх до молекул води.

Якщо неполярні молекули змішані з водою, то неполярні (гідрофобні) структури змушені агрегувати, що мінімізує їх контакт із полярним оточенням (рис.).

Така асоціація неполярних молекул називається *гідрофобною взаємодією*.

Саме тому краплі жирних молекул швидко з'являються на поверхні супу з курки навіть після інтенсивного його перемішування.



СИЛИ ВАН-ДЕР-ВААЛЬСА

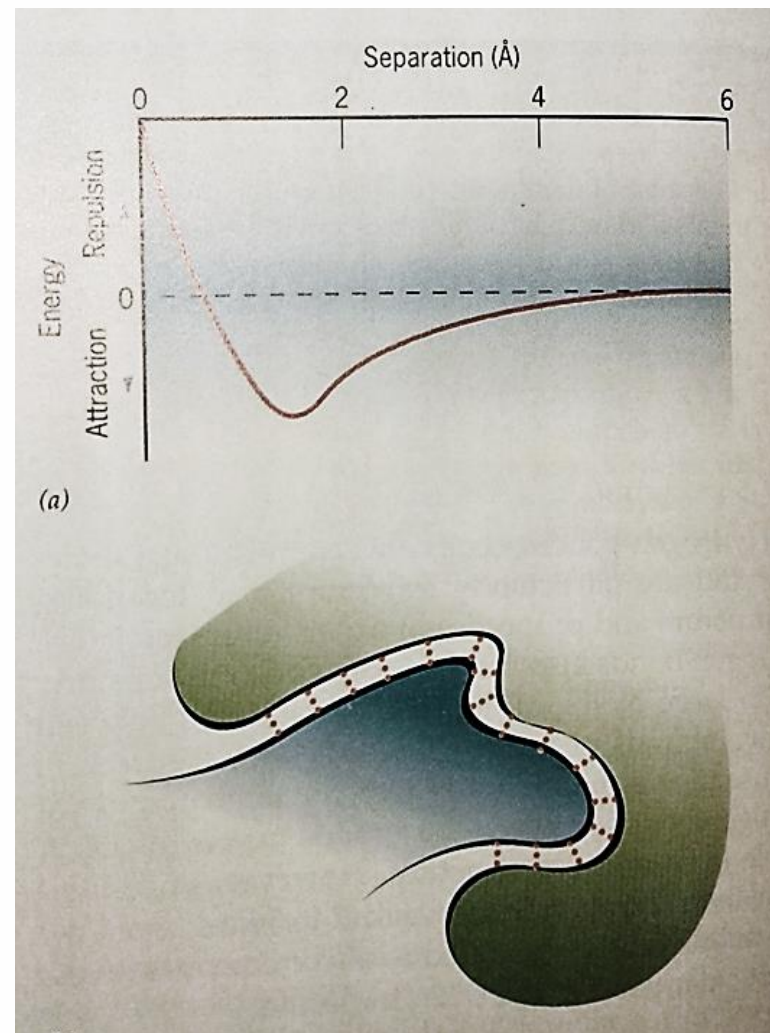
Детальний аналіз КЗ, які утворюють неполярні молекули (H_2 , CH_4), показує, що розподіл електронів не завжди є симетричним.

У кожний момент часу електронна щільність може бути більшою на одному боці атома навіть за рівного розподілу електронів з іншим атомом.

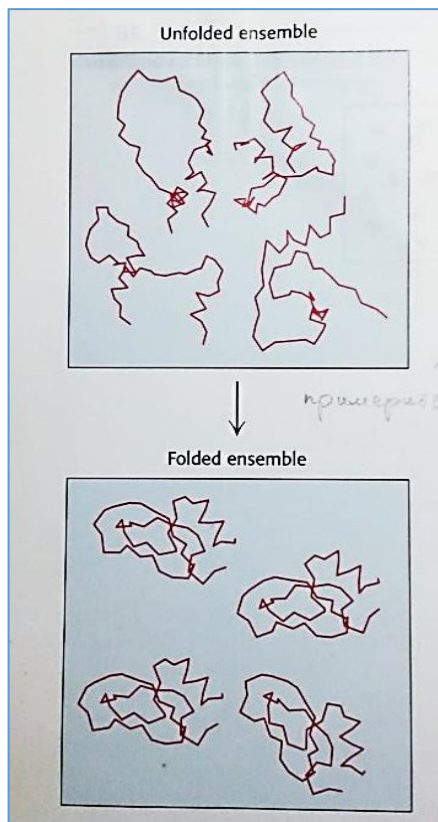
Ця миттєва асиметрія в електронній щільності викликає перерозподіл заряду в молекулі.

Якщо такі молекули розташовані на близькій відстані, вони мають слабку взаємодію – силу Ван-дер-Ваальса ($0,1\text{--}0,3 \text{ ккал} \cdot \text{мол}^{-1}$), яка їх утримує разом і є чутливою до відстані між атомами (рис.).

Якщо атомів багато – сила стає значною.



СКЛАДАННЯ ПРОТЕЇНІВ



Розглянемо систему з розчину нескладених (unfolded) протеїнів. Кожна молекула має свою конформацію, тобто система є неупорядкованою з максимальною ентропією.

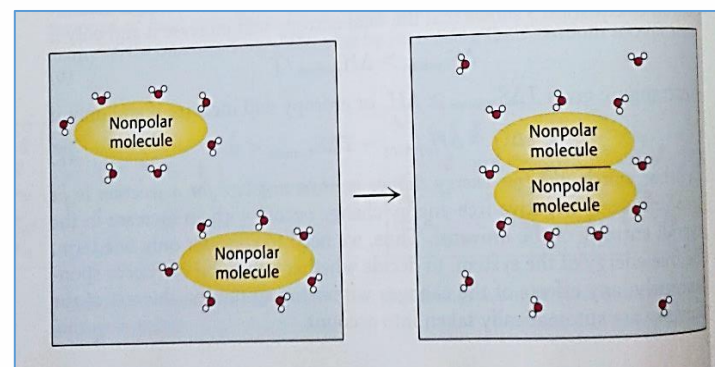
За певних умов може розпочатися спонтанний процес складання протеїнів. Це означає, що ентропія має зростати (2-й закон термодинаміки) або в системі, або в оточенні.

Як пояснити очевидну суперечність між упорядкуванням і зростанням ентропії?

Зменшення ентропії компенсується молекулами води, які не взаємодіють із неполярними молекулами, утворюючи для них «клітки». Дві неполярні молекули під час зустрічі вивільнюють молекули води, утворюючи комплекс і водночас завдяки релізу збільшується ентропія, тобто спостерігається гідрофобний ефект.

Так само гідрофобний ефект сприяє складанню протеїнів завдяки неполярним групам деяких амінокислот, які агрегують всередині протеїнів. Отже, втрата ентропії під час складання компенсується релізом молекул води під час взаємодії гідрофобних амінокислот.

Проте складання спостерігається за умови, якщо комбінація ентропійного й ентальпійного членів призводить $\Delta G < 0$.



КОМПОЗИТНІ МАТЕРІАЛИ

До імплантатів із біоміметичними властивостями належать композитні матеріали на основі природних і синтетичних полімерів.

Найпоширенішим **природним** полімером є **колаген**, який використовується у практичній медицині більш ніж півстоліття. Використання колагену, еластину, хітозану як основа для апатиту та клітин дозволяють відтворити тривимірну будову кісткового матриксу та надати композиту всіх необхідних властивостей.

До **синтетичних** біоміметичних матеріалів відносять полілактанову $(C_3H_4O_2)_n$ та полігліколевую кислоти, полідіоксанон та їхні сополімери, які вже використовуються в багатьох країнах світу як біодеградовані біоміметичні матеріали.

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

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

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА КМ

До **першої** групи відносять полімер/гідроксиапатитні композитні матеріали, полімер/гідроксиапатитні нанокомпозитні матеріали та полімер/апатитні композитні матеріали з **біоміметичними** (грец., *bios* – життя та *mimetiks* – наслідувати) властивостями. Полімер/гідроксиапатитні композитні матеріали мають високу тривкість, пористість і задовольняють більшість вимог до кісткових імплантатів.

Полімер/гідроксиапатитні нанокомпозитні матеріали намагаються відтворити нанорозмірні кристали апатиту, характерні для кісткової тканини, які забезпечують унікальні біомеханічні властивості кістяка.

Так, Webster і співавтори показали зростання абсорбції сироваткових білків та адгезії ОБ на поверхні нанорозмірних кристалів апатиту порівняно з мікророзмірним гідроксиапатитом. Автори пояснюють цей феномен збільшенням ефективною поверхні матеріалів і підвищенням їх гідрофільності.

ПОКРАЩАННЯ ЯКОСТІ КМ

Композитні матеріали є біоміметичними через наявність полімерної синтетичної чи натуральної складової та інкорпорованого фосфату кальцію (кристалічного чи аморфного).

Покращання якості цих матеріалів здійснюється трьома способами:

- **по-перше**, через модифікацію неорганічної складової (нанорозміри кристалів, біоміметичний гідроксиапатит);
- **по-друге**, через внесення до їхнього складу остеоіндуктивних та інших агентів (антибіотики, фактори росту);
- **по-третє**, через модифікацію матриці, а саме – пошуку оптимального полімерного матеріалу для утворення полімерної складової.

Одним із перспективних матеріалів для використання як основи композитних матеріалів є **хітозан**.

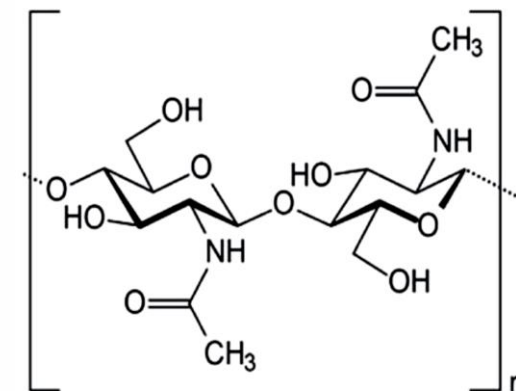
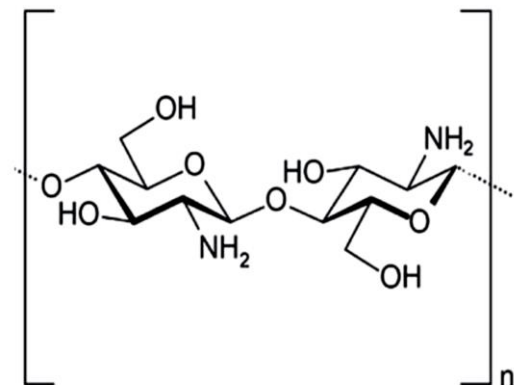
ХІТОЗАН

Хітозан як продукт часткового деацетилювання хітину містить п'ять типів активних функціональних груп: первинні амінні групи в положенні С-2 кожного деацетильованого структурного підрозділу, вторинні амідні групи, ефірні групи основного ланцюга полісахаридів, а також первинний і вторинний гідроксил групи на позиціях С-6 та С-3 відповідно (рис.).

Молекулярна вага (МВ) CS – у діапазоні від 300 кДа до 1000 кДа і залежить від джерела і методу, який використовується для отримання CS.

Ступінь деацетилювання CS (DD) (N-ацетилглюкозамін/глюкозамін) може варіюватися від 30 % до 95 %. Чим вище DD CS, тим більша кількість протонізованих аміногруп у полімері і відповідно вищий заряд на макромолекулі.

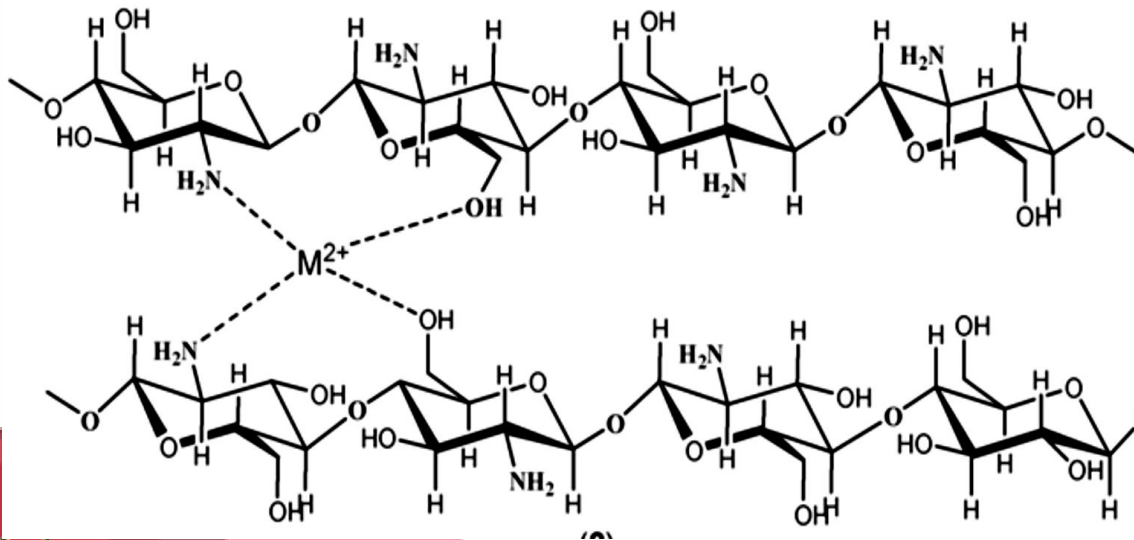
У кристалічній формі CS нерозчинний у водних розчинах із $\text{pH} > 7$, тоді як у розведених кислотах ($\text{pH} < 6$) він стає розчинним через протонування NH_2 -груп.



МЕТАЛ-ХІТОЗАНОВЕ КОМПЛЕКСОУТВОРЕННЯ

Отже, хітозан має реакційноздатні групи – аміногрупи NH_2 . Завдяки цьому він може зв'язувати та утримувати іони різних металів через механізми **хелатування** (від грец. *Chele* – «клішня»).

На рисунку показана структурна хімічна формула двох ланцюгів хітозану та механізм «перехресного з'єднання», спричинений іонами двовалентного металу.



Схематичне зображення метал-хітозанового комплексоутворення

ВОДНЕВІ ЗВ'ЯЗКИ ХІТОЗАНУ

Хітозан може утворювати велику кількість внутрішніх і зовнішніх водневих зв'язків, унаслідок чого здатний зв'язувати органічні водорозчинні речовини. Не розчинний у воді, добре розчиняється у водних розчинах кислот, зокрема й органічних.

Хітозан має низку унікальних фізичних властивостей: біосумісність, нетоксичність, антимікробну активність та інші.

Крім того, він може бути отриманий у різних формах, а саме: у вигляді гідрогелю, ксерогелю (без рідкої фази з великою пористістю), аерогелю (спецформа – без рідкої фази із збереженням форми), порошку, тонких плівок і багатьох інших.

Також хітозан є універсальним сорбентом.

ЗАСТОСУВАННЯ В МЕДИЦИНІ

Усі ці особливості хітозану дозволяють знаходити йому безліч застосувань у медицині, біотехнології, біоінженерії.

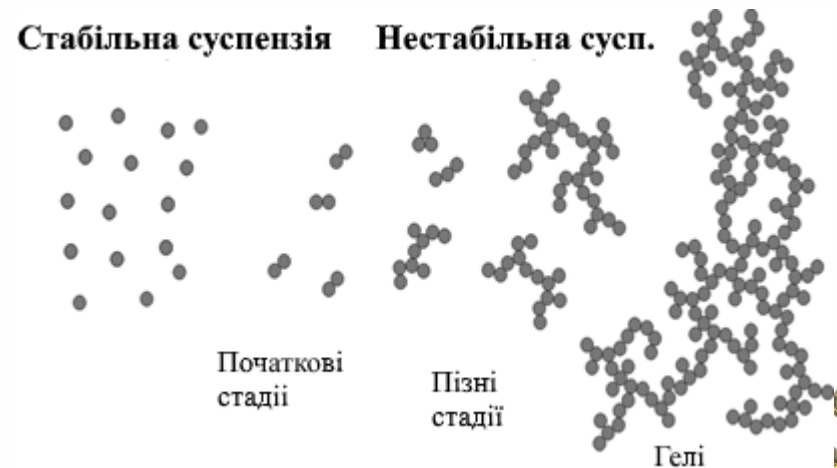
Так, за допомогою тонких плівок на основі хітозану можна створювати захисні біосумісні покриття для штучних біопротезів, зокрема штучних клапанів серця.

Капсули, покриті плівкою з хітозану можна використовувати для доставки ліків, а на основі аерогелю з хітозану існує можливість створення каркасів для регенерації та росту кісткових клітин, оскільки відомо, що хітозан сприяє росту клітин і мінералізації кісток.

У медицині і фармацевтиці хітозан часто використовують у формі гідрогелю.

Гель – це система «полімер – розчинник», у якій існує просторова мережу досить стійких зв'язків нефлюктуаційної природи (тобто енергія зв'язку молекул багато більше ніж енергії їхнього теплового руху) (рис.).

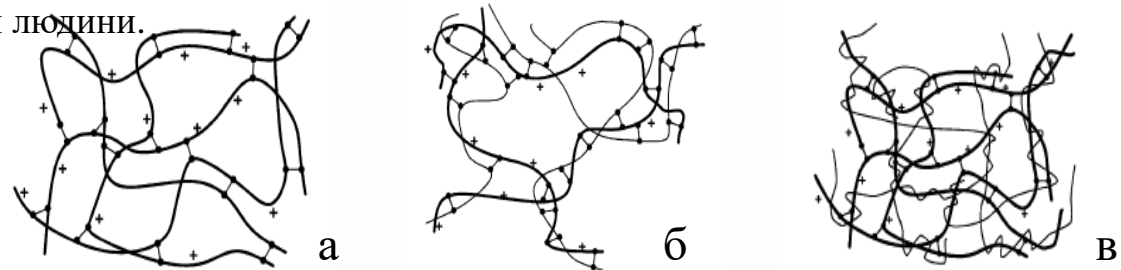
Схема агрегації частинок. Частинки розсіюються окремо в стабільній суспензії, тоді як вони агрегують в нестійкій суспензії. З ранніх до більш пізніх станів, агрегати зростають у розмірах. Агрегація частинок, зокрема, може спричиняти утворення гелів.



ТИПИ ГЕЛІВ

Гелі складаються як мінімум із двох компонентів – високомолекулярна дисперсна фаза, яка утворює тривимірну мережу, що є каркасом гелю, і низькомолекулярна дисперсійна фаза. Мережу можуть утворювати як неорганічні (наприклад, діоксид кремнію), так і органічні сполуки (полімери і біополімери). Дисперсійним середовищем може бути вода, різні біологічні рідини, спирти. Гелі, дисперсійним середовищем яких є вода, називаються **гідрогелями**. Інакше кажучи, гідрогелі – високомолекулярні мережі, які набухають у воді.

Найпростішу структуру має перша група гідрогелів. У гідрогелях, утворених гібридною полімерною мережею, реакція зшивання відбувається між структурними ланками хітозанового полімерного ланцюга за допомогою зшивального агента. Крім того, унеможливлено зшивання між ланками одного і того ж самого полімеру. Зшивальні агенти – молекули, які мають, щонайменше, дві реакційноздатні функціональні групи, що дозволяють утворювати зв'язки між полімерними ланцюжками. Для хітозану найбільш використовувані зшивальні агенти – це діальдегіди (гліоксали) (-СНО-альд-група), зокрема глутаровий альдегід. Альдегідні групи утворюють ковалентні зв'язки з аміногрупою хітозану. Ця реакція відбувається без додаткових умов у кислому середовищі. Однак діальдегіди вважаються токсичними для людини.



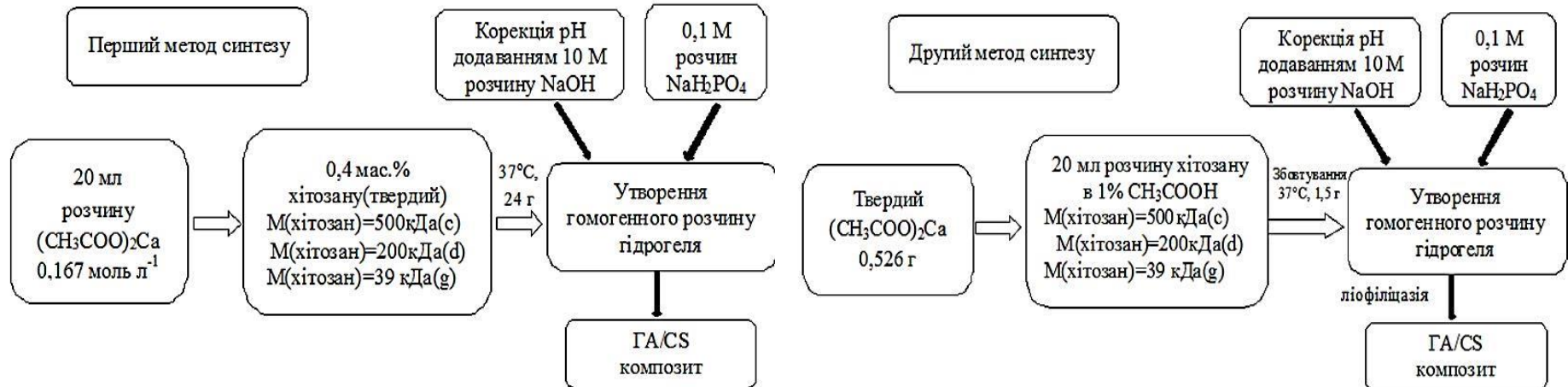
Типи гелеутворення ковалентно зшитого хітозану: а) гель із хітозану, зшитий сам із собою (зліва); б) гібридно-полімерний ланцюг (у центрі); в) напів- і повністю проникаючі полімерні ланцюги

МАТЕРІАЛ ДЛЯ ІН'ЄКЦІЇ «ХІТОГЕЛЬ»

Матеріали: хітозан (молекулярною вагою 500 kDa, 200 kDa, 39 kDa, ступенем деацетилювання 85 %) виробництва фірми «Біопрогрес», Москва, Росія; кальцію ацетат $\text{Ca}(\text{CH}_3\text{COO})_2$, дигідрофосфат натрію NaH_2PO_4 , гідроксид натрію NaOH (виробництва Китаю).

Схеми синтезу: З метою дослідження був синтезований гідроксиапатит (Газа наявності хітозану та як зразок для порівняння за відсутності полімеру. Синтез матеріалу проводили за схемами 1 та 2 (рис.).

Схеми синтезу нанокompозитного матеріалу «гідроксиапатит-хітозан» (HA/CS).



Деталі синтезу

Згідно із **схемою 1** хітозан (0,08 г, що відповідало концентрації 0,4 мас. %) з різною молекулярною вагою (500 kDa, 200 kDa, 39 kDa) був розчинений під час перемішування в шейкері за температури 37 °C у 20 мл 0,167 М розчину ацетату кальцію в оцтовій кислоті, концентрація якої становила 1 мас. %. До утвореної суспензії крапельним способом додавали водний розчин гідрофосфату натрію (0,1 М), коригували значення рН 11,8 додаванням натрію гідроксиду. Після «зістарювання» впродовж 10 діб продукт промивали дистильованою водою до рН 7,4, центрифугували. Водночас вологість гідрогелю становила 88–92 %. Для утворення ксерогелю продукт вологістю 92 % заморожували та ліофілізували.

Згідно із **схемою 2** порошок ацетату кальцію додавався до розчинів хітозану (ММ 500 kDa, 200 kDa, 39 kDa) у 1 % водному розчині оцтової кислоти. Водночас концентрація хітозану становила 0,4 мас. %, а кальцію ацетату – 0,167 м/л. Після перемішування в шейкері впродовж 1,5 години за температури 37 °C до утвореної суспензії крапельним способом додавали водний розчин гідрофосфату натрію (0,1 М). Подальша процедура була аналогічною схемі 1.

Вплив ММ хітозану на характеристики кристалітів ГА

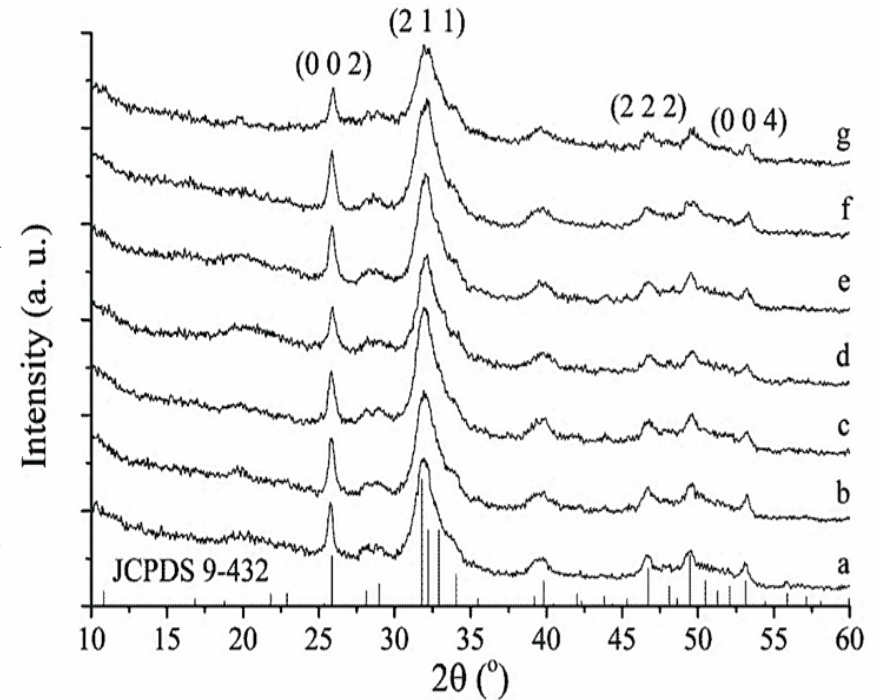
Спектри рентгенівської дифракції (XRD) підтверджують формування кристалітів гідроксиapatиту за наявності хітозану (рис.).

Результати свідчать, що схема синтезу практично не впливає на розміри кристалітів, визначені за формулою Селякова – Шеррера

$$(L = k\lambda/\beta_m \cos\Theta).$$

Середній розмір кристалітів становить близько 23 нм.

Водночас значення мікрODEформацій ($\epsilon = \beta_m/4tg\Theta$) зразків, синтезованих за наявності полімеру, значно відрізняються порівняно із зразком чистого ГА.



Спектри рентгенівської дифракції зразків ГА/CS, отриманих за схемами синтезу 1 та 2: a) ГА, b) ГА/CS 500 (1), c) ГА/CS 500 (2), d) ГА/CS 200 (1), e) ГА/CS 200 (2), f) ГА/CS 39 (1), g) ГА/CS 39 (2).

Розміри кристалітів ГА в композитному матеріалі ГА/СS

Зразок	Індекс Мілера	Розмір кристалітів за Шеррером, нм	За методом Вільямсона – Холла	
			Розмір кристалітів, нм	Мікродеформації, $\cdot 10^3$
ГА	(0 0 2)	22,8	22,8	0,003
	(0 0 4)	22,8		
ГА / CS 500 (1)	(0 0 2)	21,7	21,5	0,097
	(0 0 4)	22		
ГА / CS 500 (2)	(0 0 2)	19,6	21,4	0,71
	(0 0 4)	18,2		
ГА / CS 200 (1)	(0 0 2)	18,3	17,8	0,27
	(0 0 4)	19		
ГА / CS 200 (2)	(0 0 2)	19	18,4	0,32
	(0 0 4)	19,7		
ГА / CS 39 (1)	(0 0 2)	18,2	21,7	1,53
	(0 0 4)	15,6		
ГА / CS 39 (2)	(0 0 2)	21,6	20,7	0,342

ІЧ-СПЕКТРОСКОПІЯ

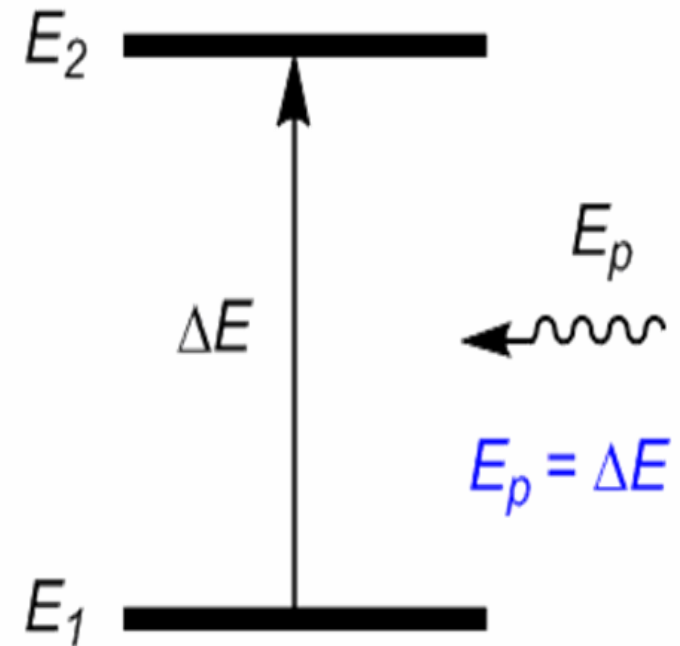
Фізичні основи ІЧ-спектроскопії

ІЧ-спектроскопія є одним із спектроскопічних методів, заснованих на взаємодії речовини з електромагнітним випромінюванням.

Спектр – це послідовність квантів енергії електромагнітних коливань, що виділяються чи розсіюються під час переходів атомів чи молекул з одних енергетичних станів в інші.

ІЧ-спектроскопія є швидким і простим методом аналізу хімічної структури, що ґрунтується на поглинанні інфрачервоного випромінювання молекулами.

Ця техніка дозволяє визначити наявність хімічних функціональних груп у зразку та, отже, ідентифікувати структурні компоненти молекул.



УМОВИ АБСОРБЦІЇ ІЧ-ВИПРОМІНЮВАННЯ

Для того щоб молекули абсорбували ІЧ-випромінювання, необхідне виконання таких умов:

- 1) молекули повинні мати функціональні групи з постійним дипольним моментом, що приводить до нерівномірного розподілу електричних зарядів в молекулі. Під час збудження змінюється дипольний момент молекули. Абсорбція інтенсивності випромінювання певної частоти може спостерігатися на ІЧ-спектрі. Полярні молекули мають найбільш інтенсивні полоси в ІЧ-спектрі. Молекули без постійного дипольного моменту можуть також взаємодіяти з ІЧ-випромінюванням, оскільки взаємодія з вектором електричного поля створює асиметрію заряду в молекулі, що призводить до створення тимчасового дипольного моменту;
- 2) згідно з квантовою теорією молекули можуть мати лише дозволені квантові енергії коливань, отже, ІЧ-світло, яке стикається з молекулою, має бути еквівалентним енергії коливань, що дорівнює різниці між енергетичними рівнями. Більшість молекул мають функціональні групи, які поглинають випромінювання в середині ІЧ-діапазону $\nu = 400\text{--}4\,000\text{ см}^{-1}$.

ОСНОВНІ ФОРМУЛИ ІЧ

Цей діапазон є найбільш інформативним для аналізу біомолекул, хвильові числа ν , визначаються як величини, зворотні до довжини хвилі

$$\nu = 1/\lambda, \quad (1)$$

де ν – хвильове число (см^{-1}), тобто кількість довжин хвиль, що розміщується на відріжку в 1 см. Хвильове число є пропорційним енергії

$$E = h\nu. \quad (2)$$

Коливання вздовж зв'язку між атоматами можна описати за допомогою закону Гука, розраховуючи частоту коливань системи

$$\nu = \frac{1}{2\pi c} \sqrt{\frac{k}{m}}, \quad (3)$$

де c – швидкість світла; k – силова стала зв'язку, яка зростає зі збільшенням міцності зв'язку між атомами; m – наведена маса системи, що обчислюється через маси атомів за формулою

$$\frac{1}{m} = \frac{1}{m_1} + \frac{1}{m_2}. \quad (4)$$

Використовуючи рівняння (3), можна розрахувати частоту коливань хвилі, що поглинається певним зв'язком, оцінити напрямок зміни цієї частоти зі зміною маси атомів, які утворюють зв'язок, оцінити вплив міжмолекулярної взаємодії, водневий зв'язок тощо.

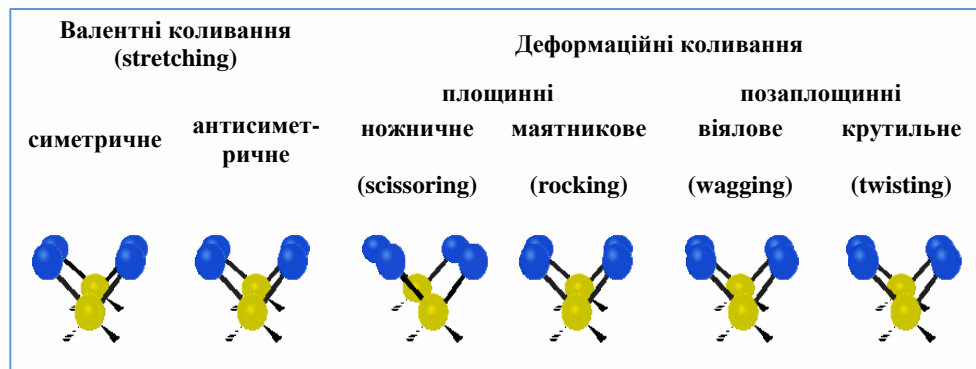
ВИДИ КОЛИВАНЬ

Для ідентифікації невідомих молекул за їхніми ІЧ-спектрами повинні бути взяті до уваги такі характеристики абсорбційних зв'язків: розміщення, інтенсивність, повна ширина на піввисоті. ІЧ-спектроскопія має певні обмеження: вона не є чутливою до моноатомних іонів, що розчиняються у воді, благородних газів і двоатомних мононуклеарних молекул, через їхню симетрію ($N \equiv N$ чи $O = O$). Інтерпретація ІЧ-спектрів комплексних сполук є також досить складним завданням через їхнє накладання: чим більше атомів у молекулі, тим складнішим є перерозподіл енергії по зв'язках, що беруть участь у коливанні.

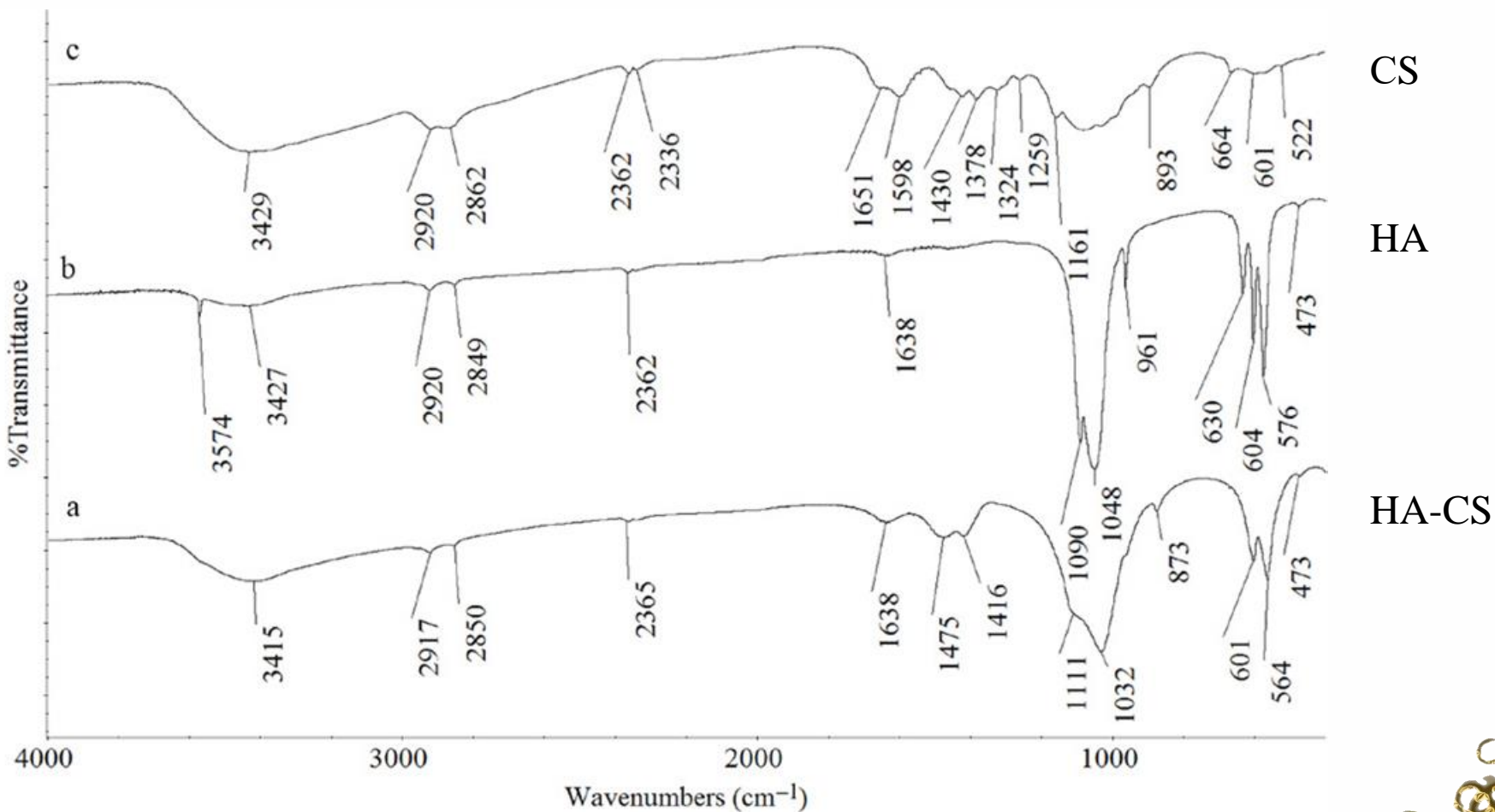
Часто ІЧ-спектри інтерпретуються, на підставі характеристичних коливань, оскільки відомо, що смуги певних груп атомів мають приблизно однакові частоти та мало залежать від характеру груп, що їх оточують. Частоти характеристичних коливань наведені в довідкових таблицях. Наприклад, характеристичні коливання кальцій-фосфатів і хітозану наведені в таблиці.

ІЧ адсорбц. зв'язки (cm^{-1})	Опис	Сполука
3570	(O-H) для OH – в крист. реш. ГА	ГА
1024–1095	$\nu(\text{P-O}) \text{PO}_4^{3-}$	ГА
955-956	$\nu(\text{P-O}) \text{PO}_4^{3-}$	ГА
635	$\delta(\text{O-H})$	ГА
3454–3459	$\nu_s(\text{N-H})$	Хітозан
1642–1654	$\nu(\text{-C=O-})$ амід 1	хітозан
1586–1596	Амін	хітозан
1420	$\delta(\text{C-H})$	хітозан
1153, 1070, 1031	$\nu_{as}(\text{C-O-C})$ та $\nu_s(\text{C-O-C})$	хітозан

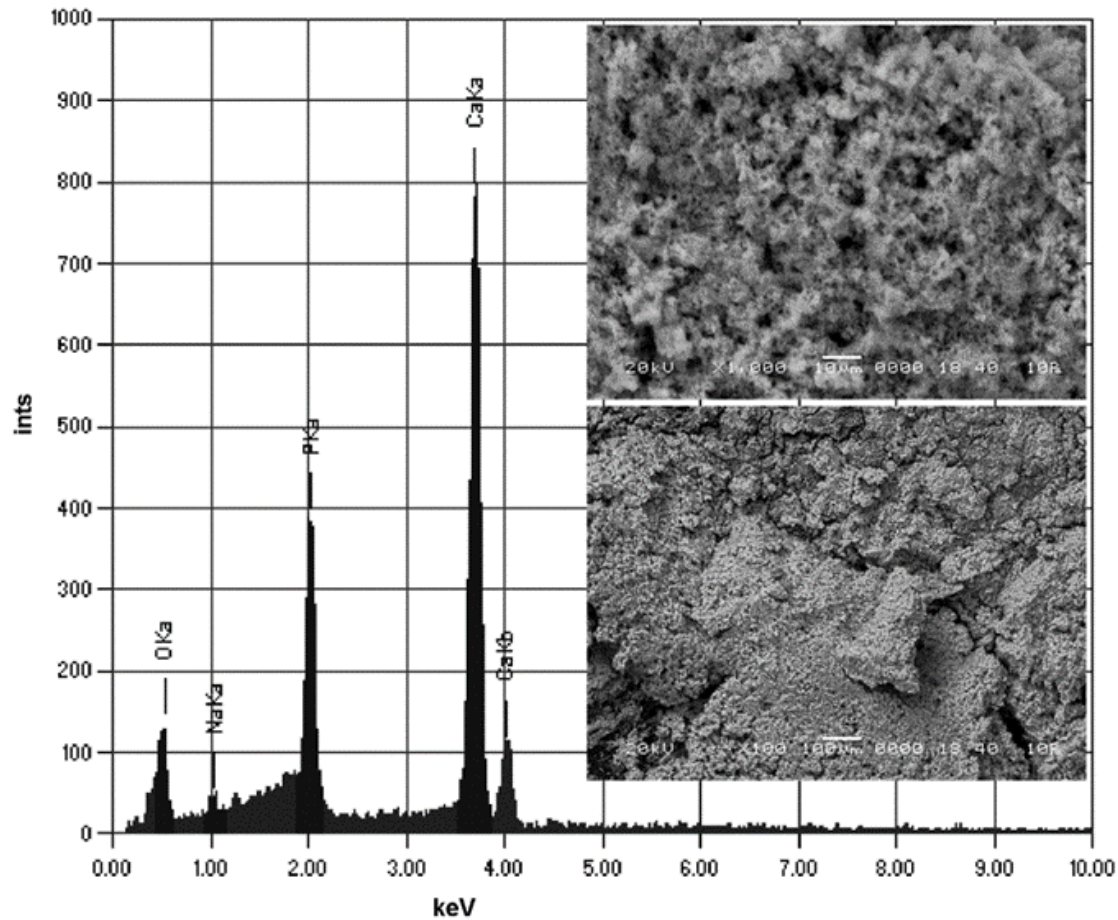
ν – вал. колив.; ν_s – симетр. вал. кол.; ν_{as} – асиметр. вал. колив.; δ – деформ. колив.



*ІЧ-спектроскопія зразків ГА/СS
нанокомпозита порівняно
із зразками ГА та хітозану*



Морфологія та елементний склад



Зображення демонструє гомогенну морфологію композитного матеріалу із вмістом високо-агломерованих наночастинок ГА. Інші зразки мають подібні морфологію та елементний склад, тому їх зображення не наводяться.

Морфологія та елементний аналіз ГА/CS 500 композита

Ступінь набухання композитних матеріалів ГА/СS 39, ГА/СS 200, ГА/СS 500

Відомо, що хітозан характеризується гідрофільними властивостями. Тому, у процесі дослідження був визначений ступінь набухання композитних матеріалів ГА/СS 39, ГА/СS 200, ГА/СS 500. Для цього однакові наважки сухих зразків занурювали в ємність із дистильованою водою на 24 години для насичення до постійної ваги. Після насичення відділяли залишки слабо зв'язаної води центрифугуванням, і зразки знову зважували. Ступінь набухання визначали за формулою

$$S\% = \frac{W_f - W_i}{W_i}$$

де W_f – вага зразка після насичення; W_i – вага сухого зразка.

Унаслідок проведення трьох експериментів за кожним із зразків було визначено середні значення ступеня набухання:

- ГА/СS 39 – 335 %;
- ГА/СS 200 – 350 %;
- ГА/СS 500 – 355 %.

Отже, ступінь набухання композитного матеріалу залежить від молекулярної маси хітозану, який входить до його складу. Очевидно, збільшення гідрофільності молекул хітозану з більшою масою залежить від їхньої конформації та просторового положення функціональних груп, здатних приєднувати молекули води.

МАТЕРІАЛ ДЛЯ НАРОЩУВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ «ХІТОКОМПОЗИТ»

Біокомпозитний матеріал призначений для використання в ортопедії та стоматології для заміщення ушкоджених чи видалених ділянок кісткової тканини, а також у пластичній хірургії для заповнення кісткових дефектів чи нарощування твердих кісткових тканин.

Матеріал має стимулювати ріст нової кісткової тканини завдяки наявності гідроксиапатитної складової, яка є основною мінеральною складовою нативної кістки та природного поліаміносахариду – хітозану, відомого своєю здатністю чинити протимікробну та консервувальну дію.

Завдяки введенню еластичної хітозанової матриці матеріал є достатньо пластичним для можливості заповнення дефектів різної геометрії.

Синтез

Полімерну хітозанову матрицю готують за допомогою розчинення **0,8 г хітозану** (Мм 39 кДА) у **100 мл 0,06 М** водного розчину **фосфорної кислоти** перемішуванням у шейкері (240 грм) за температури 37 °С впродовж 2 годин до утворення однорідної суспензії.

Отриману суспензію крапельним методом (6 мл/хв.) додають до **100 мл 0,1 М** розчину хлориду кальцію **CaCl₂**, значення рН якого доводять до 12 додаванням **10 М** розчину **NaOH**. Коригують значення **рН до 12,4**.

Формування кальційфосфатних наночастинок та іммобілізація їх у поровому просторі хітозанової матриці відбувається **впродовж 14 днів**, після чого декантують поверхневу рідину, а осад багаторазово відмивають деіонізованою водою до досягнення рН промивної води $7 \div 7,4$.

Після цього рідку та тверду фракції суспензії розділяють на центрифугі (8 000 об/хв, 20 хвилин).

Унаслідок цього утворюється перша (плинна) фаза, яка використовується в подальшому як складова біоматеріалу «Хітокомпозит», вологість якої становить 75 %. У цьому разі матеріал містить хітозановий полімер та кальційфосфатний компонент за їх співвідношення 2:5, що за масою становить 25 мас. % від загальної маси першої фази, і деіонізовану воду, що за масою становить 75 мас. % від загальної маси першої фази.

До 2 г утвореної плинної фази додають 2 г твердої фази, репрезентованої дрібнодисперсним порошком карбонат апатиту з розміром часток ≤ 100 мкм.

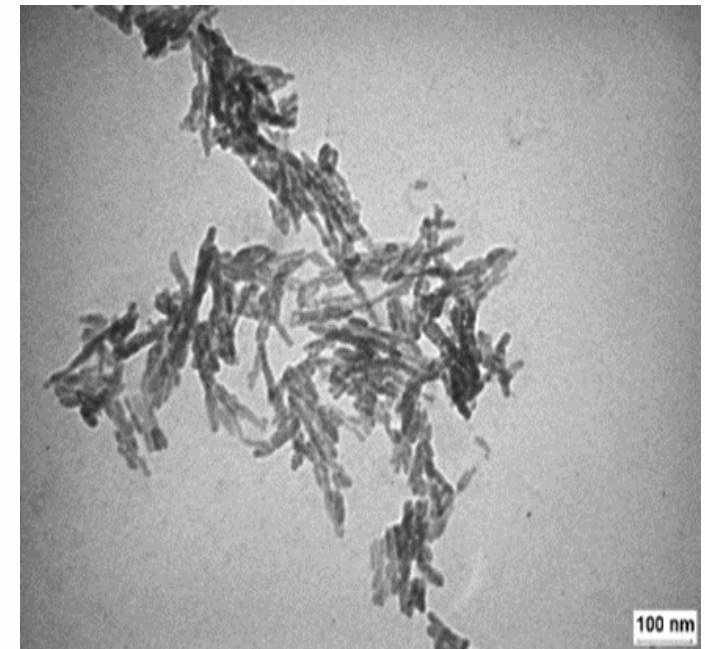
Отримують композитний матеріал, у якому частка плинної фракції становить 50 мас. %, частка твердої фракції – 50 мас. %. Час тверднення матеріалу – до 15 хвилин.

ПЕМ ГА в композиті

Знімок ПЕМ (рис.) демонструє голчасту структуру частинок гідроксиапатиту в складі композитного матеріалу розміром від 20 нм до 100 нм.

Середній розмір кристалітів за даними рентгенівської дифракції становить 23 нм до відпалювання та 50 нм після відпалювання за 900 °С (табл.).

Зразок	Вихідні					Після відпалювання	
	ПЕМ та ЕД			РД		РД	
	а, нм	с, нм	D, нм	L, нм	$\epsilon \cdot 10^3$	L, нм	$\epsilon \cdot 10^3$
Хітокомпозит	0,953	0,696	~80	23,2	1,197	50	0,031

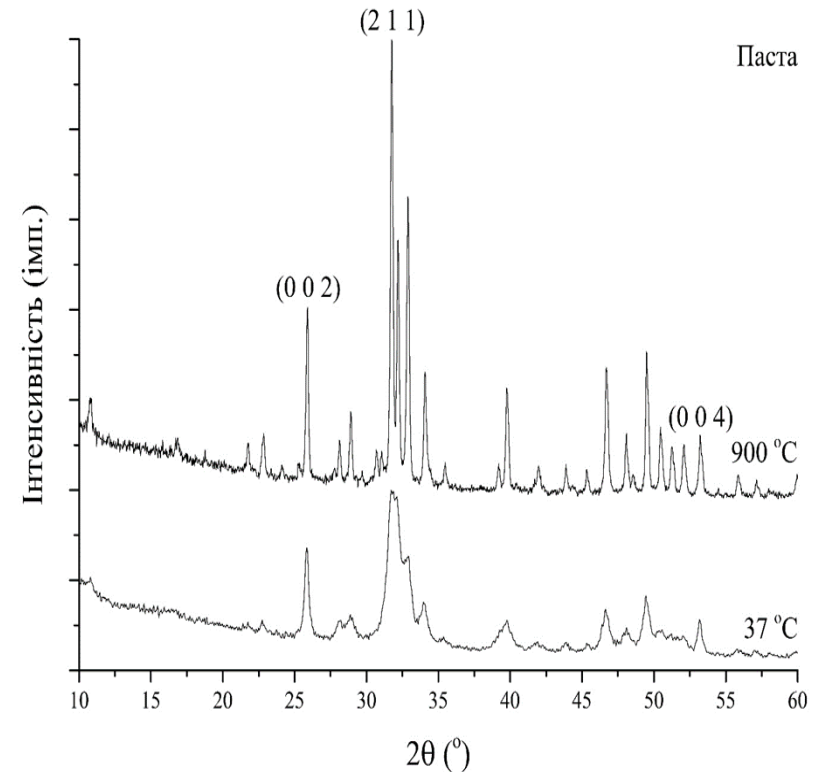


Рентгенодифракційні спектри зразка «Хітокомползит»

У зразку РФА після відпалювання показав наявність трьох фаз – ГА (JCDPS 9-432; ат Са/Р = 1,67; концентрація – 86 %), α -ТКФ (JCDPS 9-348; ат Са/Р = 1,5; концентрація – 11 %) та β ТКФ (JCDPS 9 169; ат Са/Р = 1,5; концентрація – 3 %) (рис.).

У цьому разі атомне співвідношення Са/Р становить ~ 1,64.

Підвищений рівень мікрдеформацій може бути пояснений великою кількістю рідкої фракції у вихідній формі.

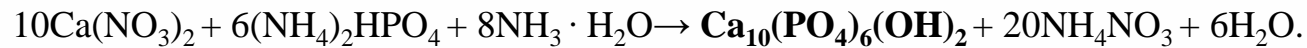


Рентгенодифракційні спектри зразка «Хітокомползит» до та після температурного оброблення

ФОРМУВАННЯ ГРАНУЛ ГА В АЛЬГІНАТНІЙ ОБОЛОНЦІ

Доцільно використовувати природні біополімери (альгінат, хітозан), здатні до біорезорбції для утворення сферичних кальцій-фосфатних гранул.

Синтез гранульованого матеріалу, що складається з гідроксиапатиту в альгінатній оболонці проводили в декілька етапів. На першому – був синтезований гідрогель гідроксиапатиту за реакцією

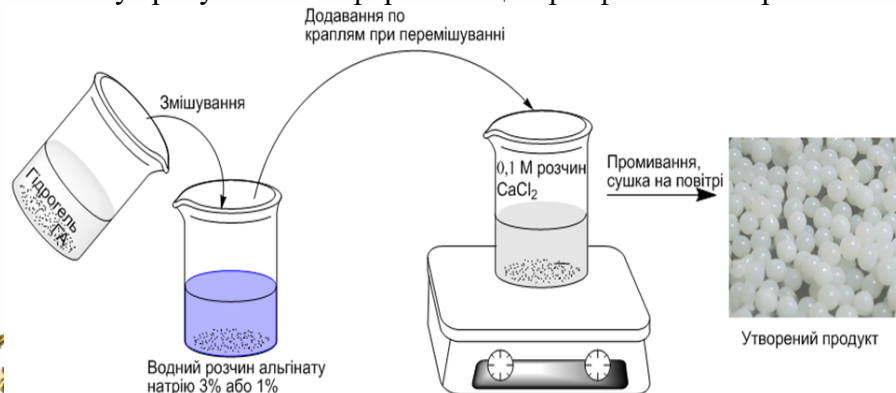


Після цього гідрогель було відмито до рН = 7 та відділено від зайвого розчину центрифугуванням. Потім він був змішаний із 3 % водним розчином альгінату натрію та 1 % розчином. Отримані суспензії по краплям додавали до 0,1 М розчину CaCl_2 , як схематично показано на рисунку. Одночасно утворюються сферичні гранули, усередині яких міститься гідрогель гідроксиапатиту.

Отримані гранули витримували в 0,1 М розчині CaCl_2 протягом доби для остаточної конформації полімеру, промивали дистильованою водою та висушували на повітрі.

Схема синтезу гранульованих форм кальцій-фосфатних матеріалів.

Витримання кальцій-фосфатних гранул в альгінатній (3%) оболонці у 0,1 М розчині CaCl_2 (а) та сушка їх на повітрі (б).

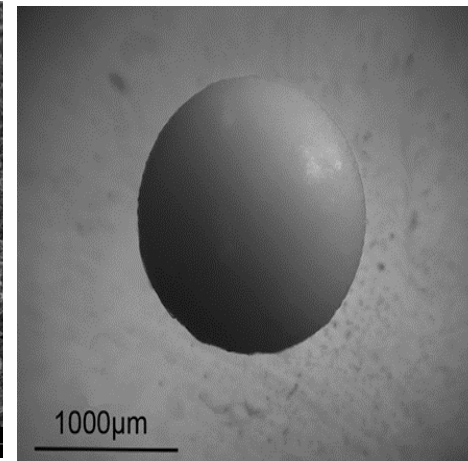
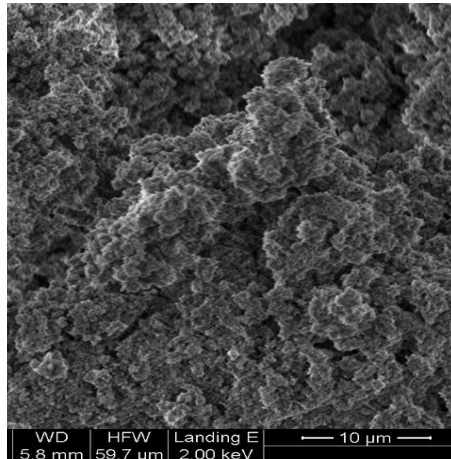
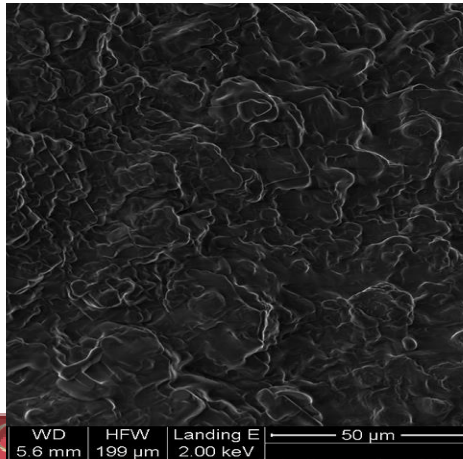


Морфологія сферичних альгінат/ГА гранул

Морфологія поверхні сферичних частинок була досліджена за допомогою оптичного мікроскопа Primo star (Karl Zeiss Group) (рис.).

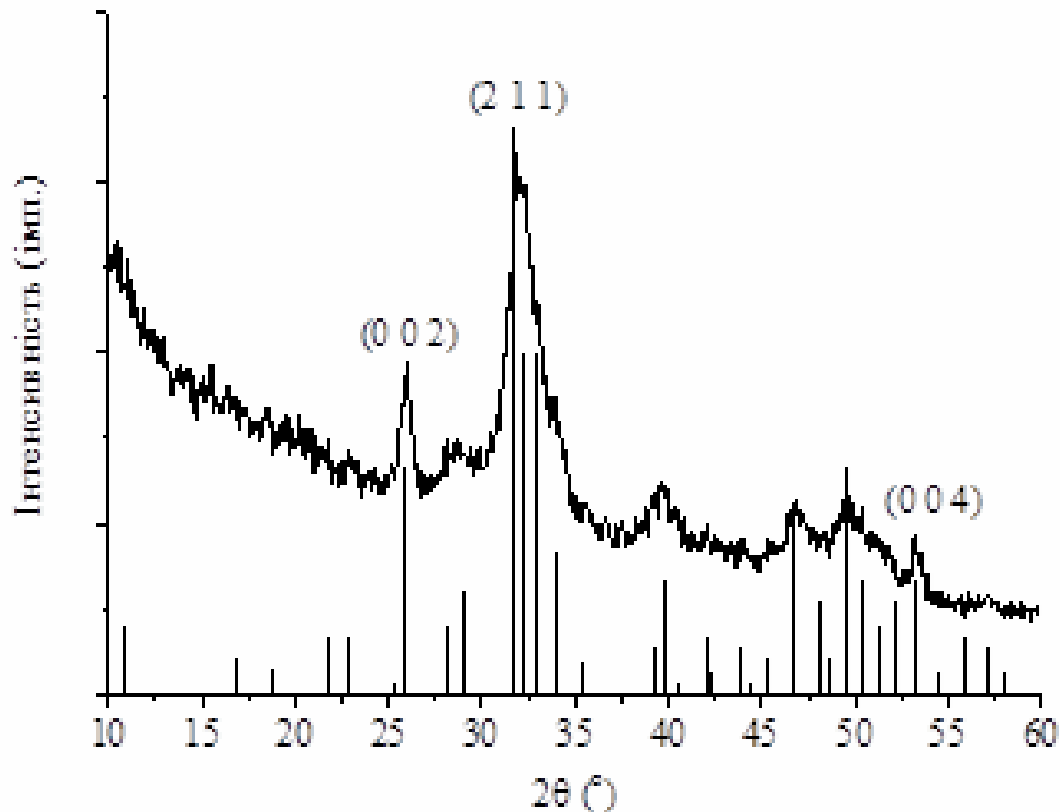
Середній розмір сферичних частинок в оболонці 3 % та 1 % альгінату становить 1 600 мкм та 1 300 мкм відповідно.

Розмір частинок можна варіювати, змінюючи діаметр вихідного отвору піпетки та в'язкості розчину.



Морфологія сферичних гранул альгінат/ГА, що отриманих із 3 % розчину альгінату натрію (зліва направо: загальний вигляд, поверхня та розріз сферичної гранули).

Дифрактограма гідрогелю ГА в оболонці 3 % альгінату



Дифрактограма гідрогелю ГА в оболонці 3 %
альгінату

Результати рентгеноструктурного аналізу (рис.) показали, що єдиною фазою отриманого продукту є ГА.

Середній розмір кристалів ГА, розрахований для площини (002) за рівнянням Шеррера становить **15–30 нм**.

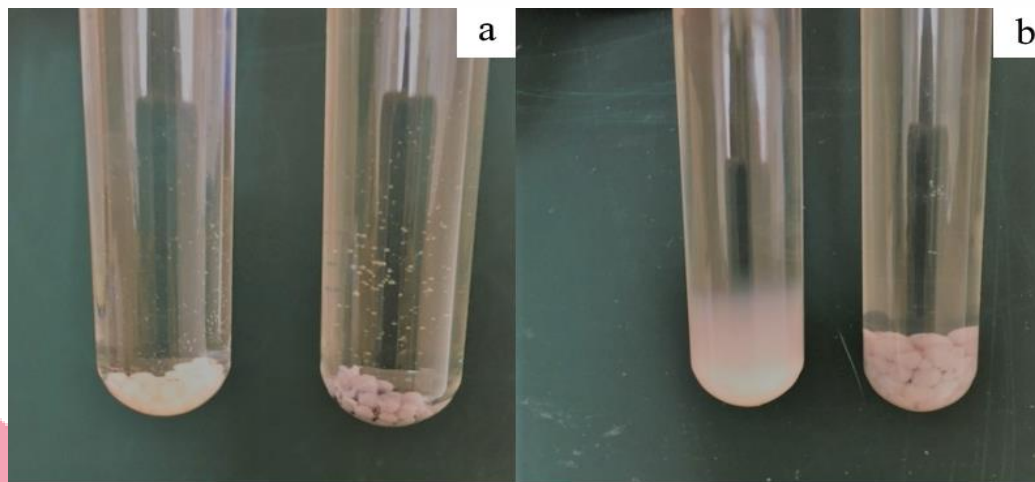
Набухання

Набухання (S_t) у воді за визначений проміжок часу для ліофільно висушених гранул альгінат/ГА розраховано за таким рівнянням:

$$S_t = \frac{(m_t - m_0)}{m},$$

де m_t та m_0 – маса сухого та вологого зразка відповідно.

S_t розраховують як грам води на грам зразка. Для сферичних гранул Га/Алг (1 %) і ГА/Алг (3 %) набухання 293 % та 153%, а пористість становила 38 % та 35,7 % відповідно.



ВИСНОВКИ

Неорганічна фаза ГА сформована в полісахаридній матриці альгінату, що відповідає структурам, подібним до природних нанокompозитів.

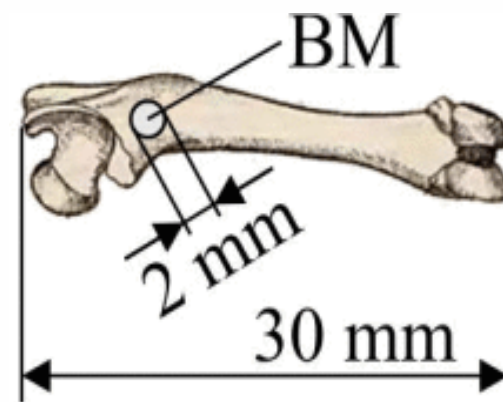
Наночастинки ГА стабілізують структуру нанокompозитів, зменшуючи рухомість полімерних ланцюгів альгінату, змінюється морфологія поверхні та зменшується набухання отриманих композитних гранул.

Найбільш вдалим є поєднання гідрогелю та 3 % водного розчину альгінату натрію, досліджено структуру гранул після відпалювання, встановлено, що збережена сферична форма гранул після відпалювання.

Такі гранули можуть бути використані як носії для контрольованого вивільнення лікарських засобів завдяки поєднанню сорбційних властивостей апатиту та полімерної напівпроникної оболонки.

IN VIVO ДОСЛІДЖЕННЯ

Експерименти виконані на білих лабораторних щурах у 5 серіях експерименту (відповідно до Держстандарту ISO10993-6: 62004, пункт 4 і 6): моделювання дефекту (2 мм) у метадіафізарному відділі стегнової кістки, заповнення дефекту керамічним матеріалом HA/Alg20.



Експеримент виконаний на 1,5–3-місячних білих статевозрілих лабораторних щурах (жива маса – 220–250 г), до кінця експерименту – 4-місячні.

Щури популяції експериментально-біологічної клініки ДУ «Інститут патології хребта та суглобів ім. проф. М. І. Ситенка НАМН України».

Експерименти на тваринах проводили відповідно до вимог «Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших цілях».

Моделювання дефекту в метафізарному відділі стегнової кістки щурів виконували під загальним внутрішньом'язовим наркозом (аміназин – 10 мг/кг, кетамін – 50 мг/кг).

Дефект кістки в щурів моделювали за допомогою зубного бора (діаметр – 2 мм).

Тварин після операції виводили з експерименту на 30-ту добу за допомогою передозування ефіру для наркозу.

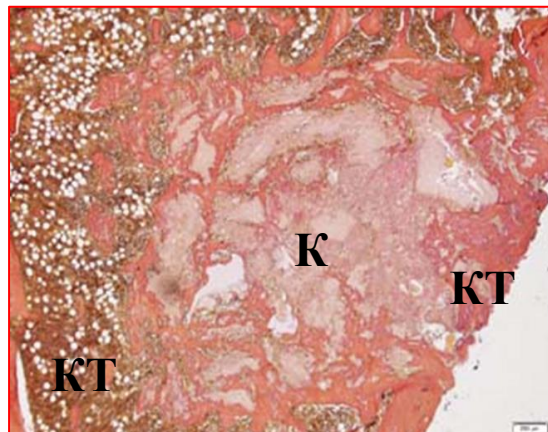
Гістологічний метод дослідження

Для гістологічного дослідження в щурів виділяли стегнові кістки з ділянкою дефекту і фіксували їх у 10 % розчині нейтрального формаліну, декальцинували в розчині 4 % азотної кислоти, зневоднювали в спиртах щораз більшої міцності і укладали в целулоїд.

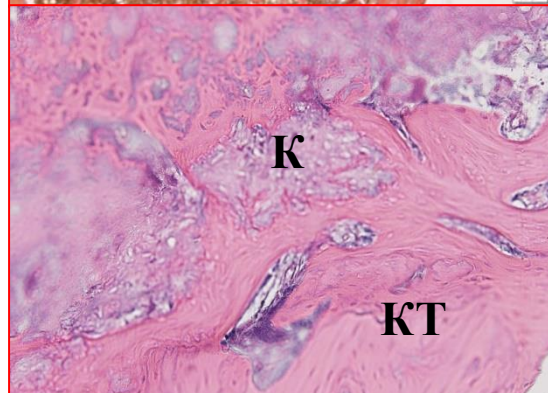
Після виготовлення гістологічних зрізів на мікромомі «Reichert» їх фарбували гематоксиліном й еозином, а також пікрофуксином за Ван-Гізоном для світлової мікроскопії й аналізували.



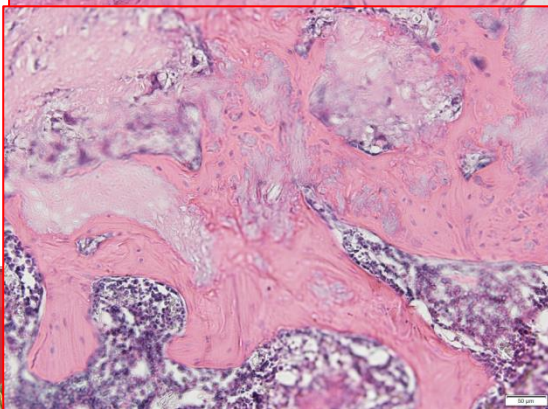
HA/Alg20



Під час мікроскопічного дослідження виявлено, що зона дефекту заповнена залишками керамічного матеріалу, між якими розташовуються кісткові трабекули (КТ). [Ван Гізон. Збільшення – 20]. Керамічний матеріал відрізнявся забарвленням і структурою, що свідчить про зміну його властивостей.



Безпосередньо прилеглі до зони дефекту фрагменти кортекса материнської кістки були тісно спаяні з новоутвореною кістковою тканиною. На кісткових трабекулах відзначена висока щільність остеоцитів. Фрагменти керамічного матеріалу (К), оточені кістковою тканиною (КТ). Гематоксилін й еозин. Збільшення – 200.



Новостворена кісткова тканина оточувала фрагменти біоматеріалу без формування сполучнотканинних прошарків. У товщі фрагментів біоматеріалу розташовувалися клітини як прообраз формування остеїда. Ознак запальної реакції не виявлено. У зоні імплантації синхронно відбувався процес розсмоктування біоматеріалу із заміщенням ділянок деструкції кістковою тканиною.

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Отже, керамічний матеріал **HA/Alg20**, імплантований у зону кісткового дефекту, через 30 днів після імплантації частково розсмоктується і заміщується новоствореною кістковою тканиною, що сприяло формуванню кістково-керамічного блоку.

Матеріал має високі остеокондуктивні й остеоіндуктивні властивості, сумісний із материнською кістковою тканиною і кістковим мозком, про що свідчить відсутність ознак деструкції і запалення в зонах контакту цих тканин із біоматеріалом.

**ЛЕКЦІЯ 7. ВЛАСТИВОСТІ ГІБРИДНИХ
МАТЕРІАЛІВ НА ОСНОВІ НА-ZNO,
ВБУДОВАНИХ У МАТРИЦЮ АЛЬГІНАТУ**



РЕЗЮМЕ

Оцінювання антимікробної активності зразків здійснювалося на грамнегативних (*E. coli*, *P. aeruginosa*) і грампозитивних (*S. aureus* і *S. epidermidis*) бактеріях тестових культур за допомогою коінкубації та модифікованих методів «агар-дифузії».

Мишачі фібробластичні клітини використовувалися для оцінювання біосумісності та цитотоксичності отриманих композитів.

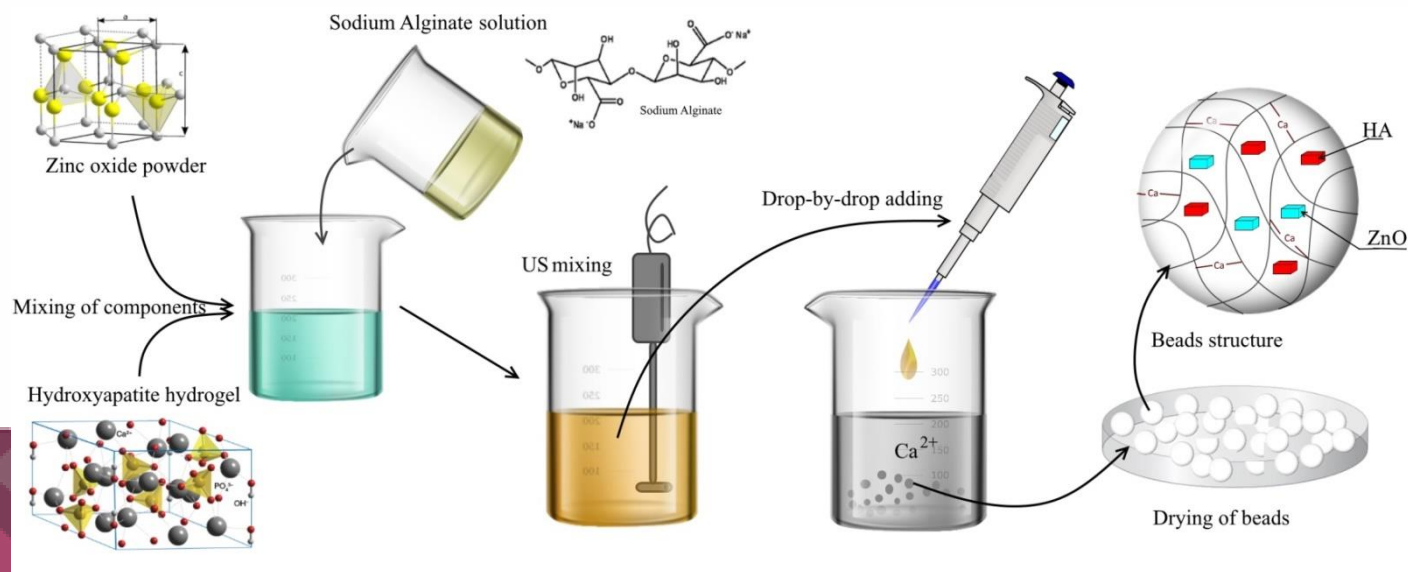
Досліджені композити демонструють яскраво виражену антибактеріальну активність завдяки наявності частинок ZnO в гідрогелі натрію альгінату і ГА.

Обидві форми **HA-ZnO** (гідрогель) і **HA-Alg-ZnO** (кульки) є біосумісними.



ВИГОТОВЛЕННЯ HA-ALG-ZNO ГРАНУЛ

Композитні матеріали були синтезовані з аналітично чистого тетрагідрату нітрату кальцію $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, гідрофосфату амонію $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$, 25 % водного аміаку NH_4OH , гексагідрату нітрату цинку $\text{Zn}(\text{NO}_3)_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$, хлориду кальцію CaCl_2 . Альгінат натрію (Alg) (E401) з молекулярною масою 15 кДа був виготовлений компанією Shanghai Chemical Company Ltd, Китай. Гранули HA-Alg-ZnO були виготовлені за допомогою додавання 2 мас. % водного розчину альгінату натрію до суспензії HA-ZnO у співвідношенні 1:1. Суміш обробляли ультразвуком (потужність – 75 Вт, тривалість – 12 хвилин) до утворення однорідної маси. Кінцевою стадією синтезу гранул HA-Alg-ZnO було опускання (dropping) отриманої суспензії у 0,125 М розчині хлориду кальцію. Час експозиції в розчині CaCl_2 був відповідно 25 хвилин і 18 годин. Одержані матеріали фільтрували, промивали дистильованою водою та сушили.



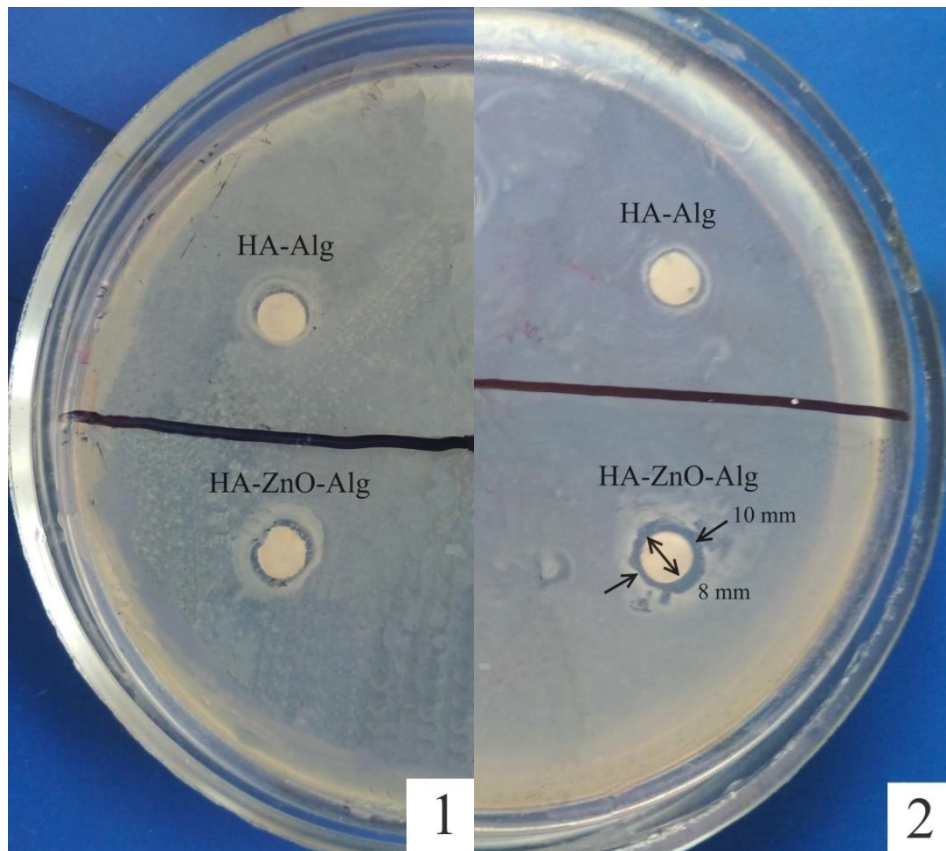
ГІДРОГЕЛЬ НА-ZNO

Гідрогель **НА-ZnO** був виготовлений двома етапами. **По-перше**, синтез гідрогелю НА через додавання краплями гідрофосфату амонію (1 мл/хв) до розчину нітрату тетрагідрату кальцію. Молярне співвідношення Ca/P у розчині становило 1,67.

Розчин рН = 10,5 досягався за допомогою додавання розчину аміаку до суміші під час перемішування. Тверду фракцію відділяли центрифугуванням. Унаслідок цього був виготовлений гідроксиапатитний гідрогель із вмістом вологості приблизно 85 % (**зразок НА**).

Другий етап – підготовка композита **НА-ZnO**. 0,3 г порошку ZnO (≤ 63 мкм) додавали до 6,0 г гідрогелю НА (85 % вологості) і суміш змішували. Отже, композит НА-ZnO одержували у формі гідрогелю (далі – зразка **НА-ZnO**).

АНТИМІКРОБНЕ ОЦІНЮВАННЯ

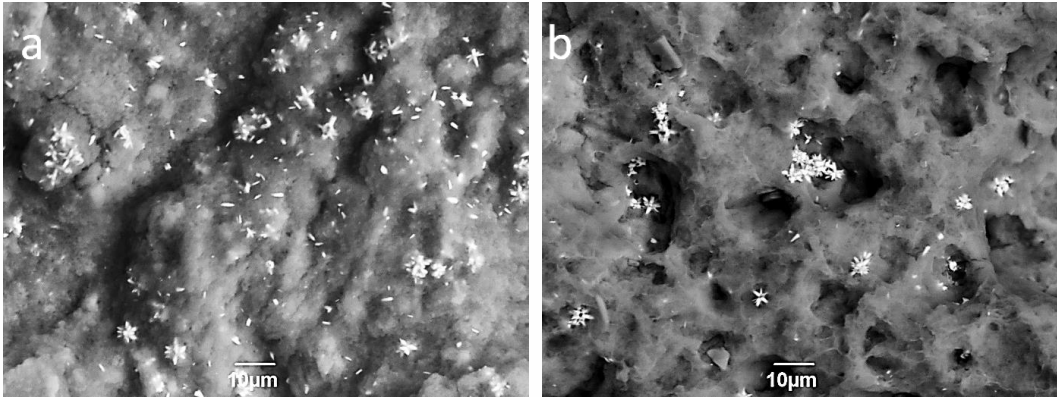


Протимікробну активність гідрогелю **HA-ZnO** та кульбок **HA-Alg-ZnO** вивчали з використанням грампозитивних *Staphylococcus aureus* ATCC 6538 (рис. 1) і тестових культур бактерій *Staphylococcus epidermidis* ATCC 14990, і грамнегативних *Esherichia coli* ATCC 8799 (рис. 2), *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 9027.

Антимікробне оцінювання здійснювали двома способами: (а) методом агарної дифузії і (б) методом «спільної інкубації».

Цитотоксичність цих матеріалів досліджували на клітинних культурах мишачих фібробластів NIH-3T3, отриманих у Лабораторії біомедичної інженерії (Ахенський університет прикладних наук, Німеччина).

МОРФОЛОГІЯ ТА ФАЗОВИЙ СКЛАД НА-ZNO ТА НА-ALG-ZNO



SEM-зображення мікроструктури: а) HA-ZnO; б) HA-Alg-ZnO.

Хімічний склад композитних матеріалів, ваг %

	O	Na	Mg	Al	Si	P	Cl	Ca	Zn	Sum	Ca/P
HA-ZnO	41,02	-	-	0,36	-	11,43	-	21,55	25,63	100,00	1,88
HA-Alg-ZnO	42,63	4,25	0,81	0,48	10,58	6,86	2,09	13,96	18,34	100,00	2,03

Синтезована мікроструктура **HA-ZnO** та **HA-Alg-ZnO** відповідає наночастинкам оксиду цинку в матриці.

Самі наночастинки є наноструктурними конгломератами монокристалів оксиду цинку.

Характерно, що частинки оксиду цинку розташовані уздовж стінок пор для зразків із композитною альгінат-гідроксиапатитною матрицею.

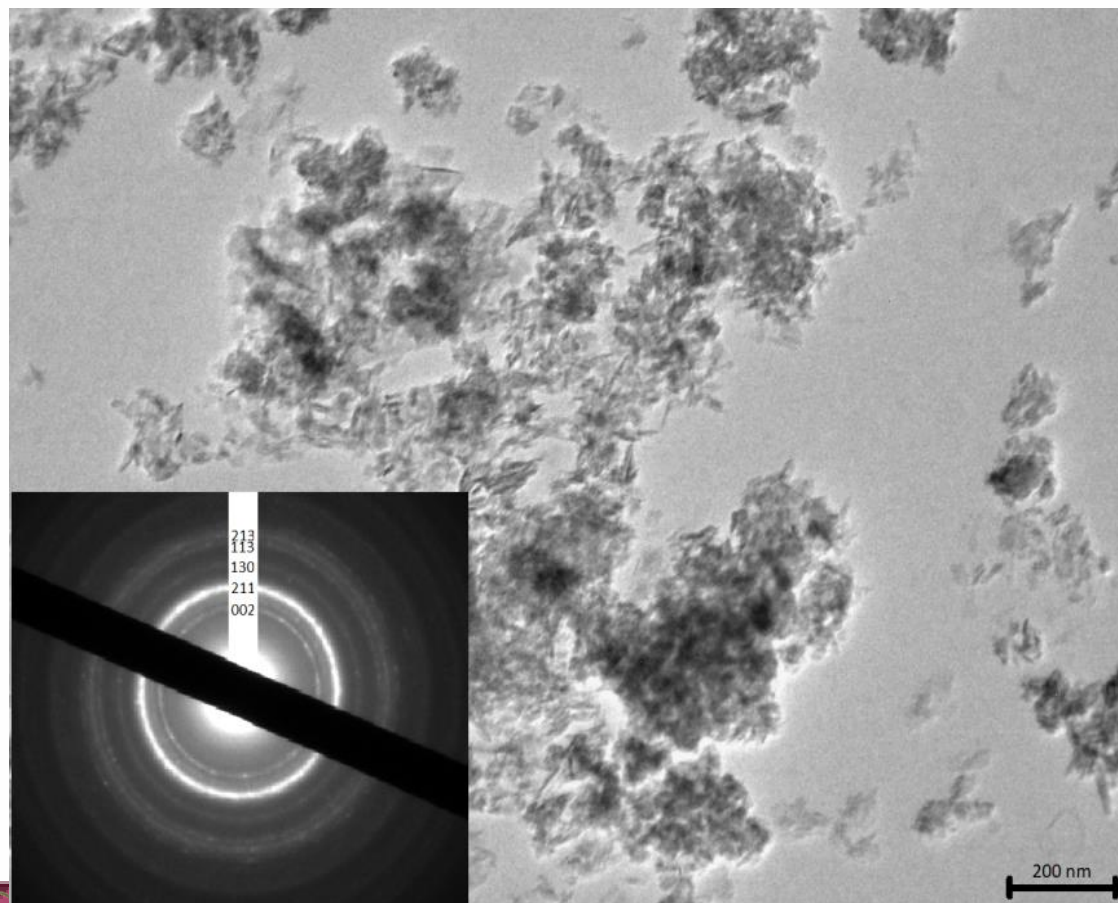
Імовірно, це пояснюється посиленням нагрівання регіонів поблизу частинок цинку в разі пропускання змінного струму під час синтезу.

Причини виникнення кальцій-дефіцитного HA в отриманих композитах

Заміщення Ca^{2+} на Zn^{2+} у HA-решітці внаслідок впливу УЗД (явище *acoustic cavitation* – утворення порожнин низького тиску (вакуумні бульбашки – cavities) у розчині.

Нестримний їхній колапс спричиняє екстремально високу локальну температуру (до 5000 °C), швидкості нагріву/охолодження до 10^9 °C/c та тиску до 10^3 ат, що створює вільні радикали і викликає багато хімічних реакцій (сонохімічних реакцій).

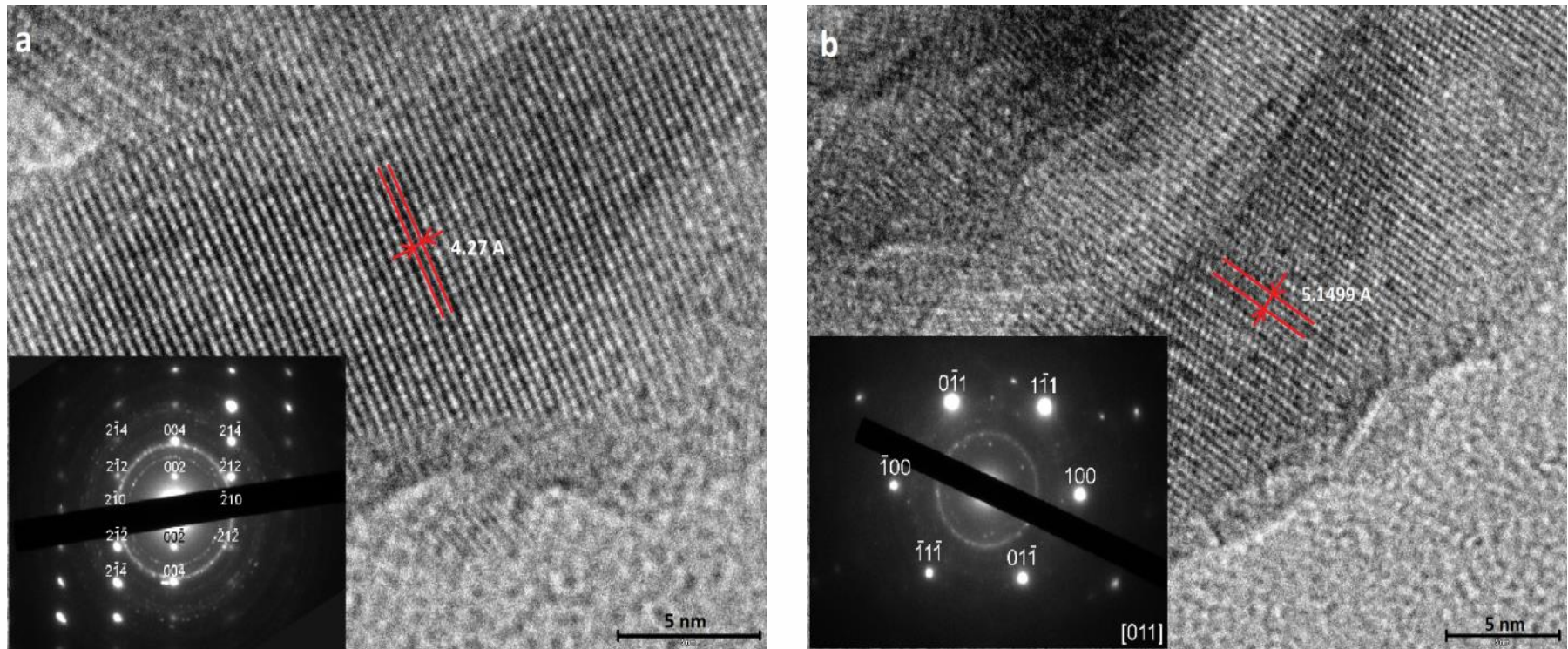
ТЕМ-ДОСЛІДЖЕННЯ



На рисунку зображено ТЕМ-знімки голчастих кристалітів ГА.

Голчаста форма кристалів найбільш характерна для натурального ГА, дифракційна картина відповідає параметрам ГА-площин відповідно до попередньо опублікованих праць [Elliott, 1994; Grigolo et al., 2016].

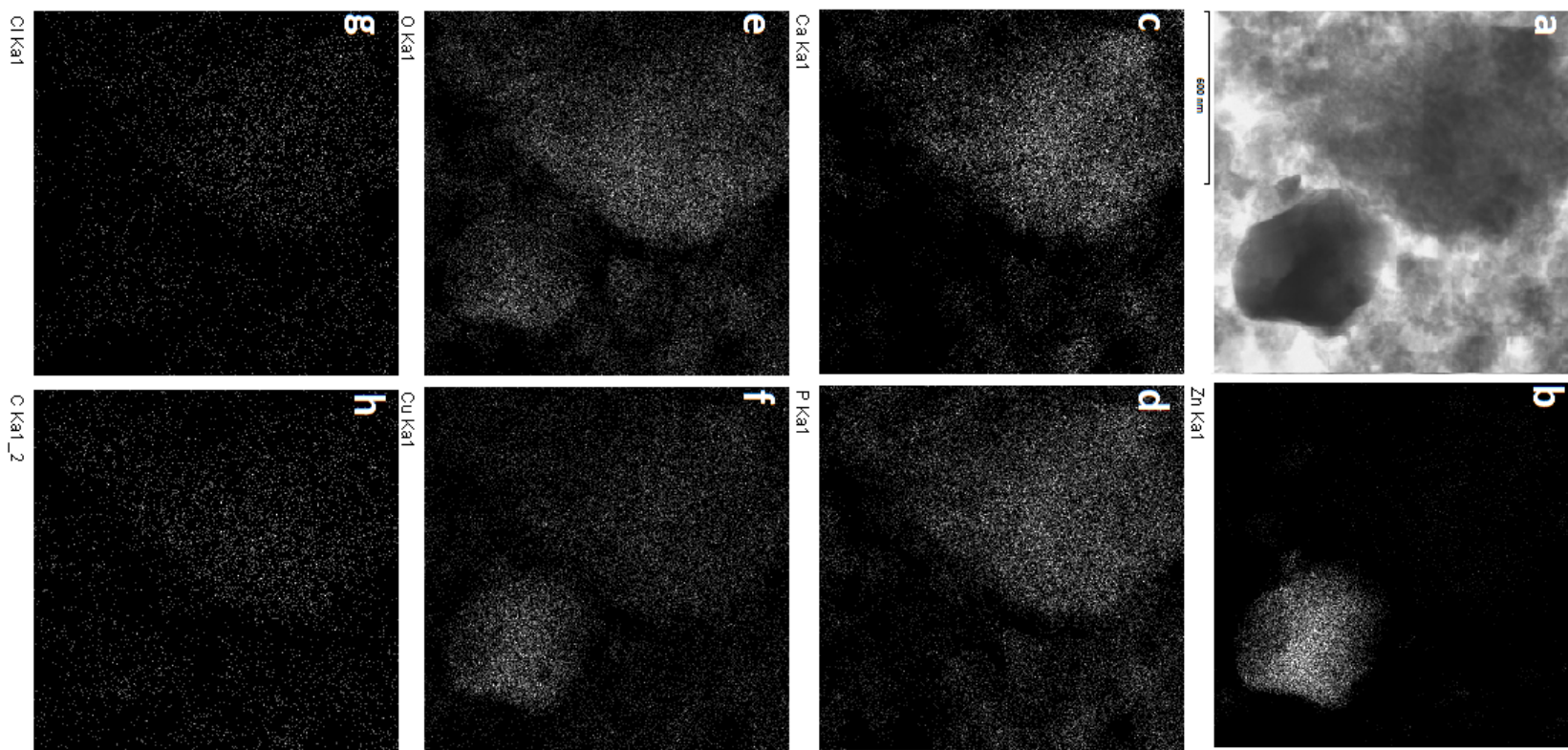
КРИСТАЛІТИ ZnO ЗА ВЕЛИКИХ ЗБІЛЬШЕНЬ



ТЕМ-зображення кристалітів і дифракційні картини ZnO: а) з кубічною ґраткою (шкала 5 nm); б) із гексагональною ґраткою (шкала 5 nm)

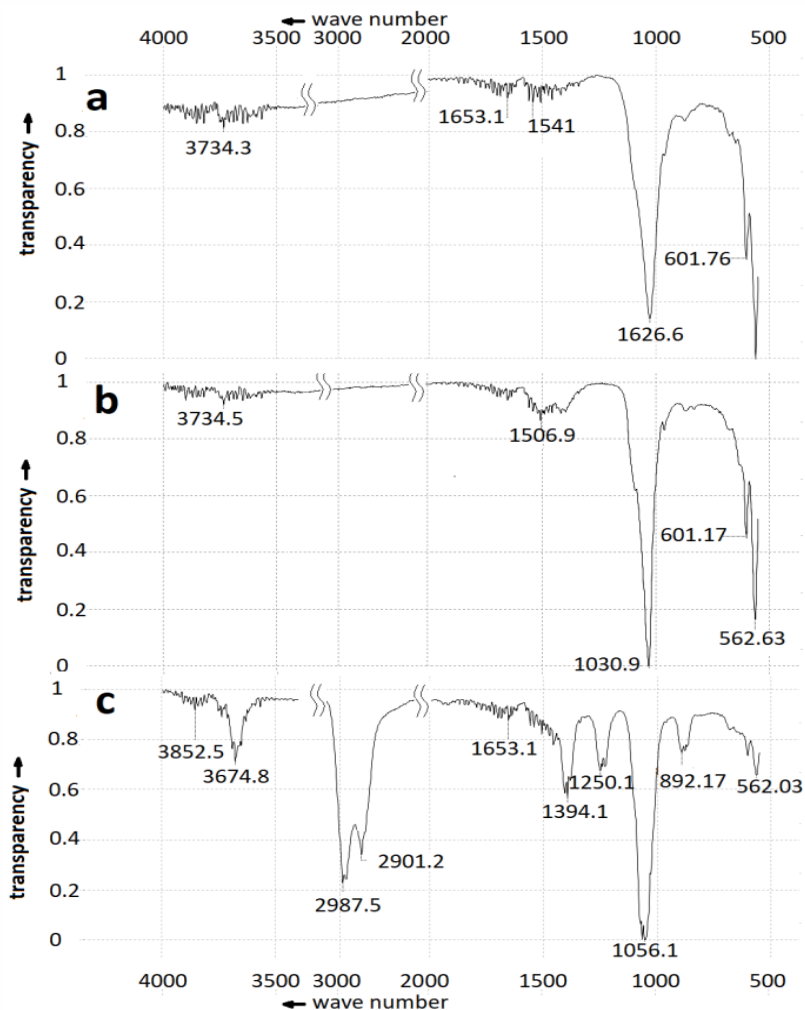
ТЕМ-АНАЛІЗ КОМПОЗИТА НА-ZnO

Висновки: (a) вміст цинку спостерігається лише в зоні мікрочастинки ZnO, що свідчить про його локалізацію; (b) об'ємна частка ZnO в композитному матеріалі з гексагональною кристалічною ґраткою щонайменше в десять разів менша, ніж об'ємна частка кубічної фази ZnO.



а) морфологія для аналізу, шкала 600 нм; б) – г) карти відповідного розподілу елементів

FTIR-СПЕКТРИ СИНТЕЗОВАНИХ ЗРАЗКІВ



Спектр НАр має характерні вібраційні смуги в зоні 562 та 602 см⁻¹ (режим ν_4 вигину), які належать до груп О-Р-О [I. С. Нейра та ін., 2009]. Симетричні (ν_1) коливання фосфатних груп спостерігаються за 962 см⁻¹ [M. Rajkumar, 2011]. Основний пік на 1026 см⁻¹ стосується асиметричного коливання (ν_3) Р-О-коливань.

Після додавання мікрокристалічного ZnO до НА основний пік змістився з 1 026,6 см⁻¹ до 1 030,9 см⁻¹, що може свідчити про порушення симетрії молекули НА.

Значні зміни ІЧ-спектра відбулися після додавання альгілату натрію до системи (рис. b). З'явилися специфічні для альгілату коливання: піки 3 435 см⁻¹ та 2 987,5–2 901,2 см⁻¹ відносять до коливань розтягування вільних і зв'язаних із воднем ОН-груп у вуглекислих кислотах відповідно [M. Rajkumar, 2011]. Основний пік змістився з 1030 см⁻¹ до 1056 см⁻¹, є значне розширення коливальної смуги після введення альгілату до складу композиту, а також зміни коливань ОН у карбоксильних групах альгілату (1340, 1030, 1097, 947, 890 см⁻¹). Ці зміни можуть свідчити про утворення нових хімічних зв'язків у композитному матеріалі. Можна припустити, що карбоксильні групи альгілату іонізуються до COO⁻ і утворюють Н-зв'язок під час утворення композита НА-ZnO-Alg.

FTIR-спектри синтезованих зразків: НА (крива a), НА-ZnO (крива b) та НА-ZnO-Alg (крива c)

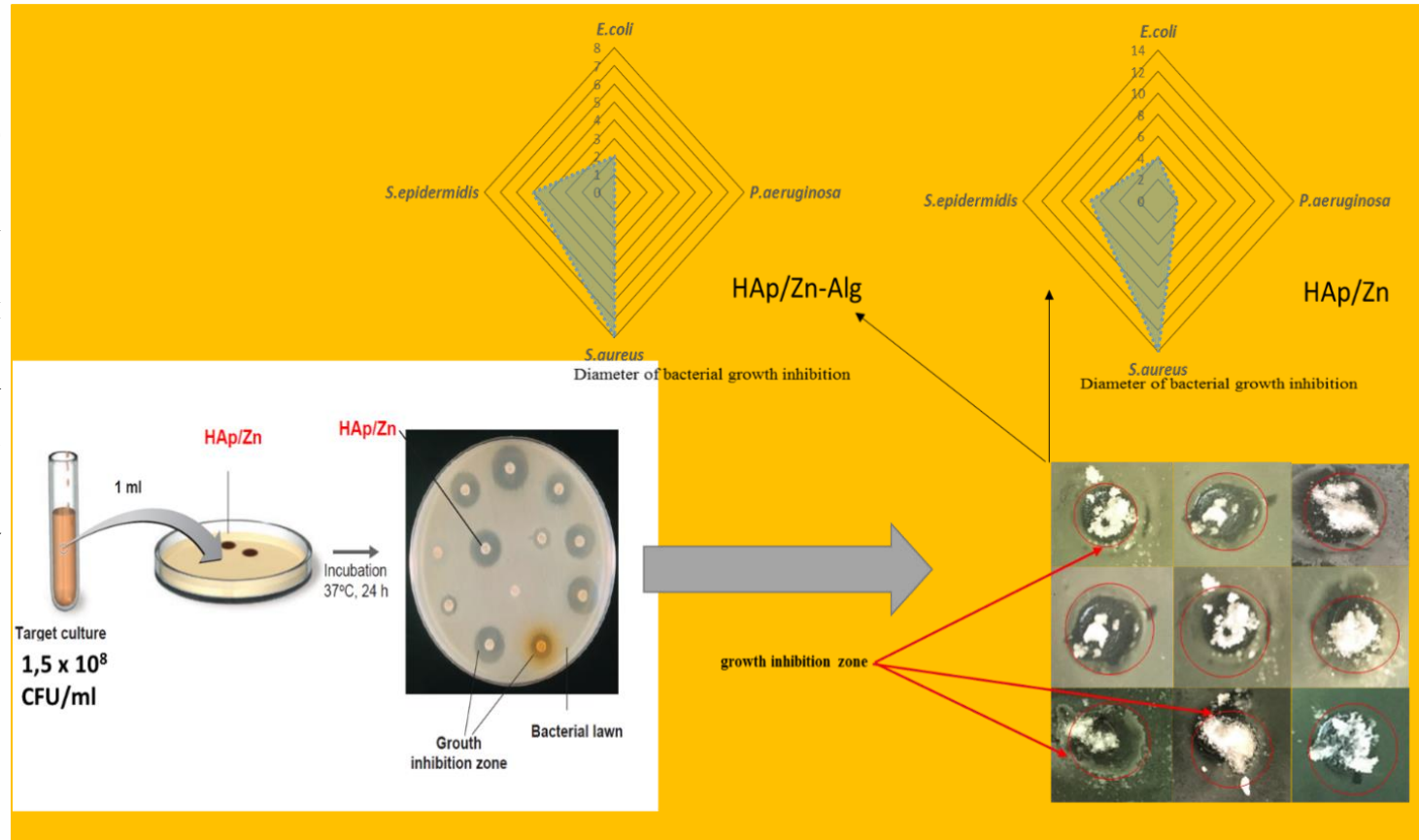
Оцінювання антимікробної активності HA-ZnO та HA-Alg-ZnO за допомогою методу «агар-дифузії»

Матеріали, що ґрунтуються на HA, були поміщені на поверхню агарних пластин, попередньо інокульованих цільовими бактеріями.

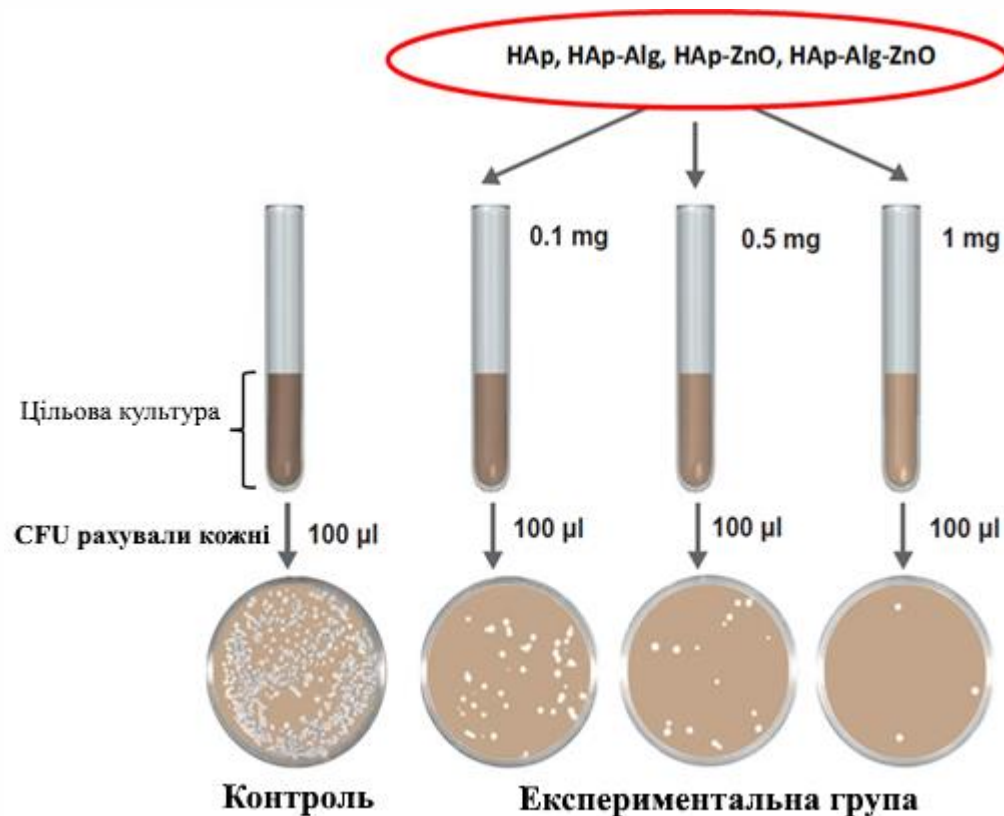
Після цього оцінювалися зони інгібування.

Розмір інгібіторів росту зон *E. coli* та *P. aeruginosa* не перевищував 2–4 мм, тоді як для *S. aureus* та *S. epidermidis* вони були в діапазоні 7–14 мм.

Відсутність великого ефекту полягає в тому, що ZnO не міг дифундувати в агар із нерозчинного гелю.



СХЕМАТИЧНИЙ ОГЛЯД ЕКСПЕРИМЕНТУ «СПІЛЬНОЇ ІНКУБАЦІЇ»



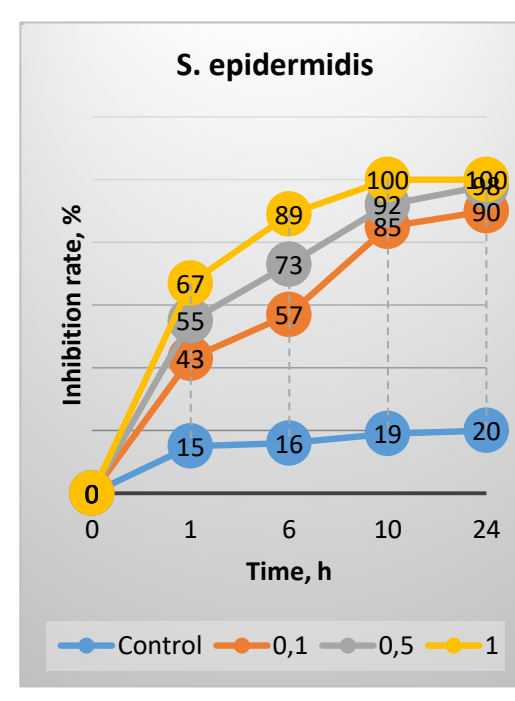
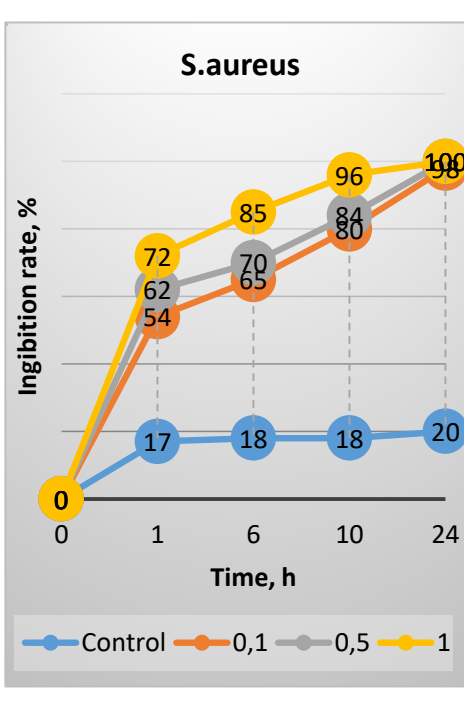
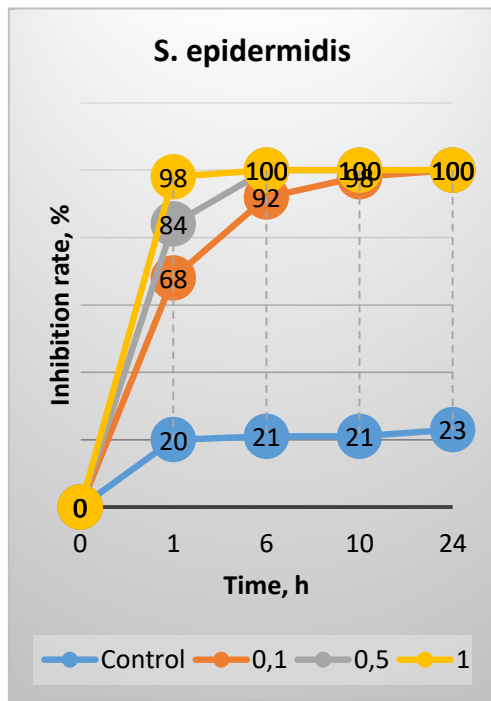
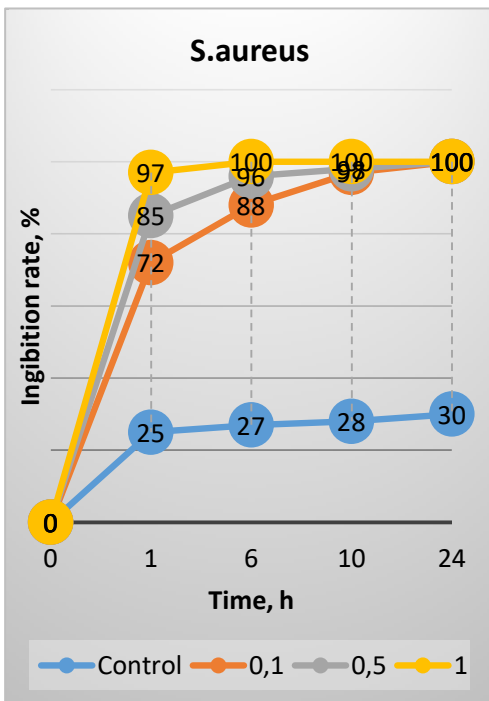
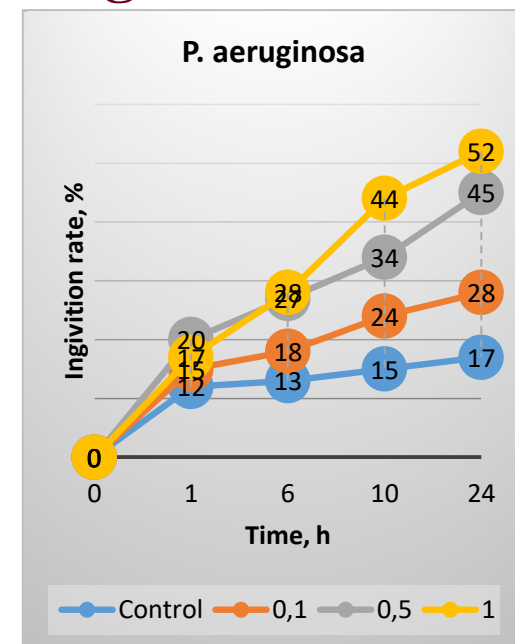
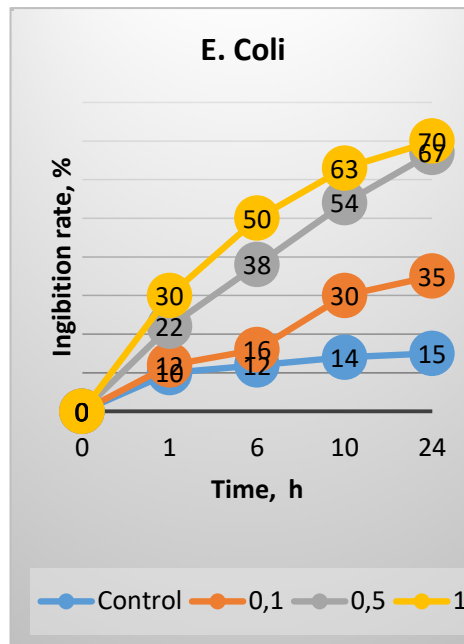
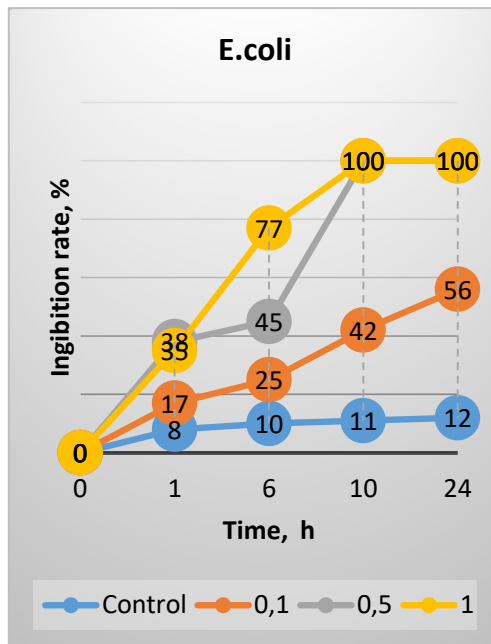
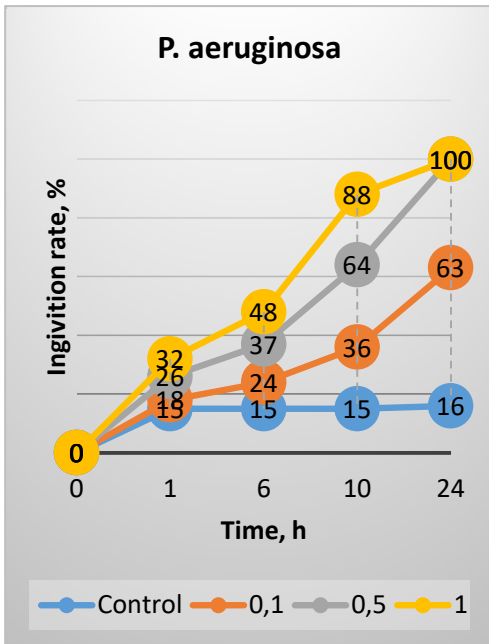
Різні концентрації матеріалів на основі НА в експериментальних серіях були поміщені в пробірки з мікроорганізмами (10^6 CFU/мл титру).

Для того щоб підрахувати кількість життєздатних клітин, застосовували відповідний метод обліку колонії після певного періоду часу. Він містить у собі поширення бактеріальних штамів на агарному шарі, взятому в чашці Петрі.

Порівняння проводили за допомогою підрахунку CFU для бактеріальних штамів, інкубованих за наявності та відсутності наночастинок на основі НА (як контроль).

Колонієутворювальна одиниця (CFU) – це одиниця, яка використовується для оцінювання кількості життєздатних бактерій

HA-ZnO



ДИСКУСІЯ

Одержані результати свідчать про незначне зменшення кількості бактерій (8–25 %) через 60 хв для зразків **HA** та **HA-Alg**.

Рівень зниження майже не змінювався із збільшенням часу експозиції в середовищі з **HA** і **HA-Alg**.

Такі дані були виявлені раніше на *Staphylococcus aureus*, культивованій у середовищі з **HA** [Samani et al., 2013; Stanic et al., 2010].

Це відбувається через те, що бактеріальні клітини прикріплюються до поверхні матеріалів, що сприяє зменшенню кількості колоній у рідкому середовищі. Оскільки адгезійна здатність поверхонь матеріалу обмежена, максимально можлива кількість клітин «прилипає» до нього негайно і зі збільшенням часу їх контакту з матеріалами зразків статистично значуще ($P > 0,5$) не відбувається зниження рівня колоній.

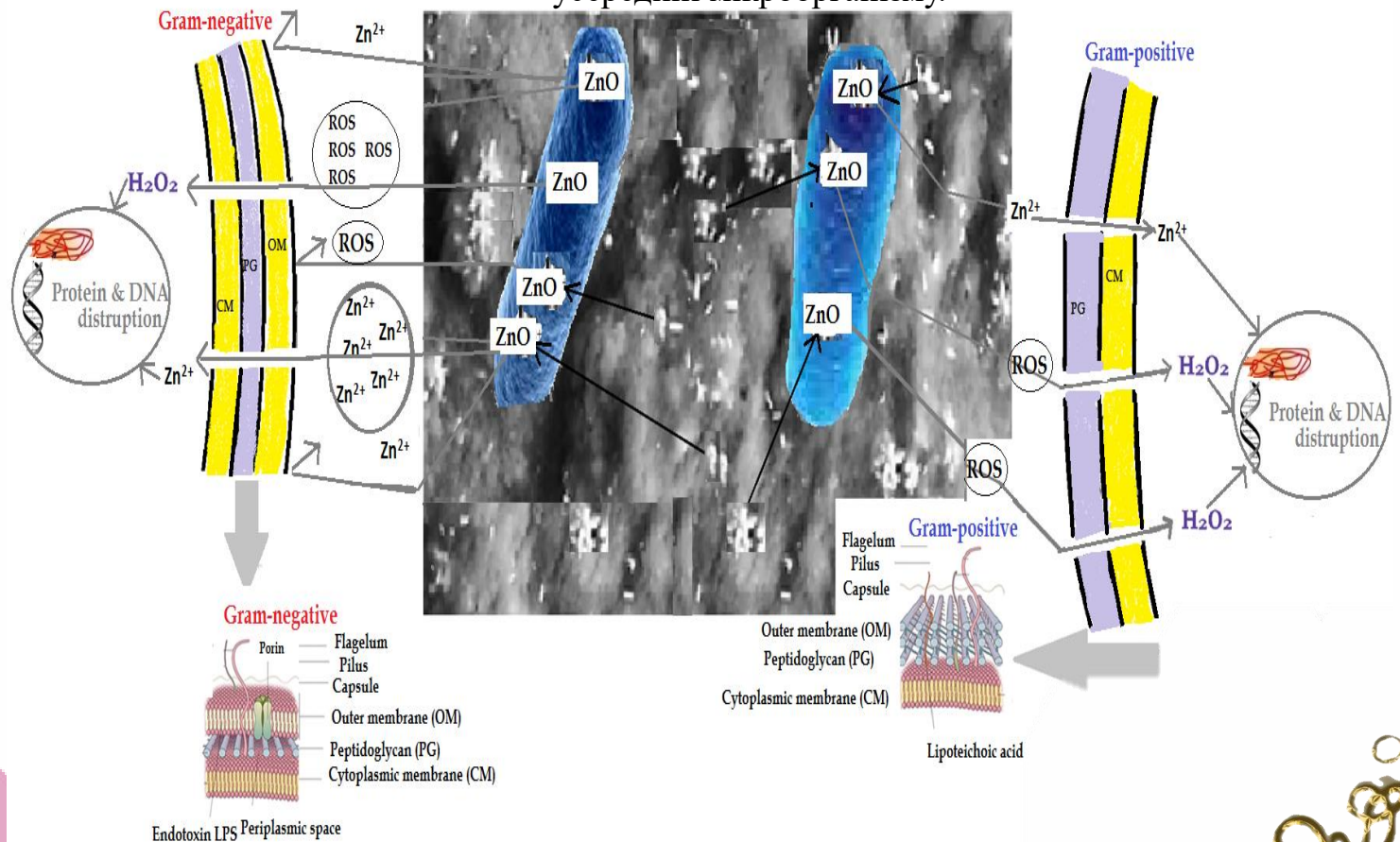
Зовсім інші результати були одержані для зразків **HA-ZnO** та **HA-Alg-ZnO** щодо бактеріальних культур.

Вивчені **ZnO**-вмісні композитні матеріали ефективно пригнічують ріст бактерій у суспензійній культурі. Згідно з результатами цей ефект залежав від концентрації матеріалу, введеного в бактеріальну суспензію, і часу взаємодії з мікроорганізмами.

АНТИБАКТЕРІАЛЬНИЙ МЕХАНІЗМ

Зв'язування частинок ZnO з поверхнею бактерій через електростатичні сили призводить до їх накопичення в мікробній мембрані. Потім відбуваються дезорганізація мембран і клітинна інтерналізація мікробів. Пошкодження клітинних мембран призводить до витоку вмісту клітин і загибелі клітин. Крім того, виділення ROS (H_2O_2) та іонів Zn з НЧ-ZnO з подальшим окисним пошкодженням клітинних структур, білків і нуклеїнових кислот.

Зазвичай антимікробний механізм хімічних агентів можна зрозуміти, вивчаючи специфічне зв'язування поверхні агента з мікроорганізмом і подальшим метаболізмом агентів усередині мікроорганізму.



ВИСНОВКИ

Грампозитивні бактерії *S. aureus* і *S. epidermidis*, які є найпоширенішою етіологічною причиною ортопедичних інфекцій, були значно чутливішими до досліджуваного матеріалу, ніж грамнегативні *E. coli* та *P. Aeruginosa*.

Це повністю співвідноситься з результатами щодо механізму антибактеріальної дії цинку, отриманого іншими авторами [Han et al., 2013; Heiza et al., 2009; Haque et al., 2007; Samani et al., 2013].

Порівняно з грампозитивною клітинною стінкою грамнегативна клітинна стінка є більш складною як структурно, так і хімічно. Грамнегативні бактерії мають додаткову зовнішню плазматичну мембрану з товстим ліпополісахаридним шаром на ньому. Цей шар значно товщий, ніж шар пептидоглікану, наявності у грампозитивних бактеріях.

Це є дві важливі структурні особливості грамнегативної бактеріальної клітини, які протистоять перекисному окисненню ліпідів за наявності **ROS**, сформованих через **НЧ ZnO**.

БІОСУМІСНІСТЬ І ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ

Цитологічне дослідження культивованих фібробластів на 3-й день у тесті (із зразками) та контрольних культуральних груп не виявило відмінностей. Клітини фібробластів утворили розпливчастий шар практично в усьому дні 12-лункової пластини.

У деяких зонах як контрольних, так і експериментальних культур були відмічені клітини з пікнотичними ядрами та вакуолізованою цитоплазмою. Для об'єктивації даних про кількість мертвих клітин і загальної кількості клітин у культурах їхнє кількісне визначення проводили за допомогою методу видалення трипанових блакитних у різних експериментальних і контрольних серіях (табл.).

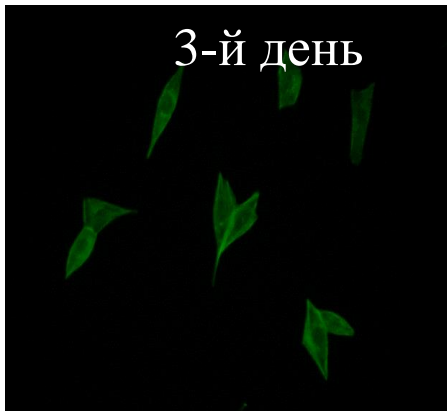
Експер. серія	3 th день		5 th день	
	К-ть клітин	Мертві кліт.	К-ть клітин	Мертві кліт.
Контроль-культура фібробластів	$1,98 \times 10^4$	$6,93 \times 10^2$ 3,5 %	$3,21 \times 10^4$	$1,96 \times 10^3$ 6,1 %
HA-ZnO	$1,59 \times 10^4$	$1,14 \times 10^3$ 7,2 %	$2,66 \times 10^4$	$2,63 \times 10^3$ 9,9 %
HA-Alg-ZnO	$1,46 \times 10^4$	$7,01 \times 10^2$ 4,8 %	$2,32 \times 10^4$	$1,37 \times 10^3$ 5,9 %

Встановлена кількість мертвих клітин у експериментальних і контрольних культурах була в межах норми для первинних культур.

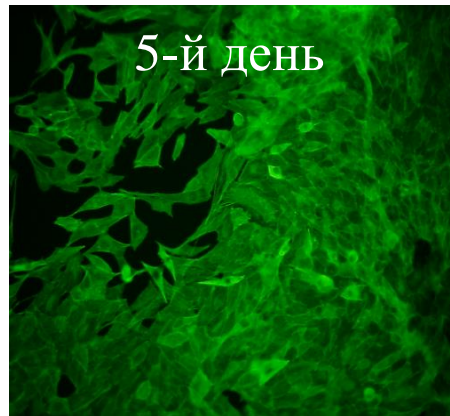
АДГЕЗІЙНІ ТА ПРОЛІФЕРАТИВНІ ВЛАСТИВОСТІ

Адгезійні та проліферативні властивості клітин оцінювали за допомогою флуоресцентної мікроскопії. Щоб візуалізувати клітини, їх раніше забарвлювали флуорогенним барвником DHR-123, що забезпечує зелену флуоресценцію в метаболічно активних клітинах.

3-й день

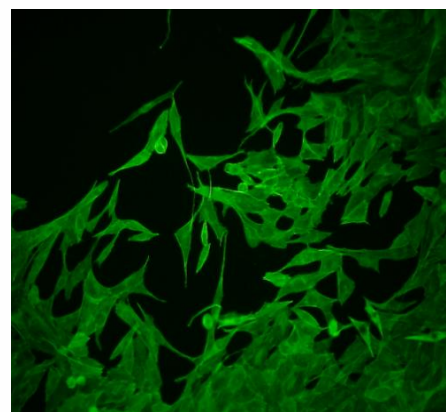
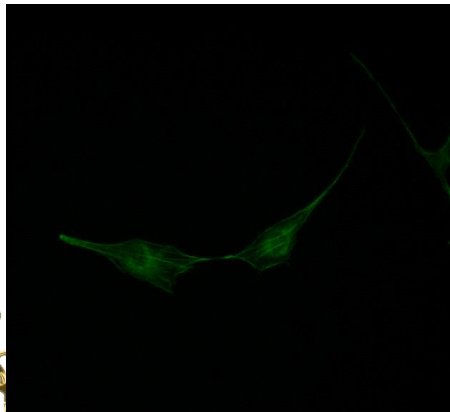


5-й день



Клітини мали нормальну морфологію та виявили гарну адгезію.

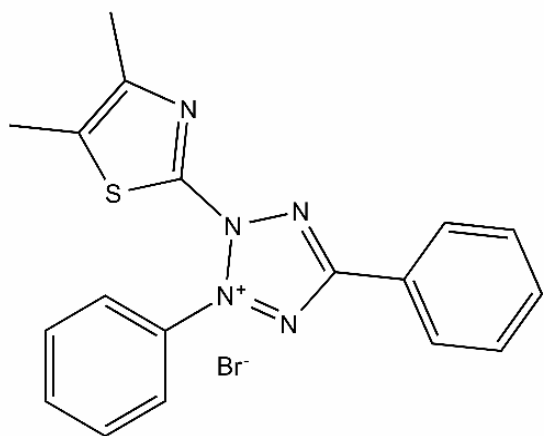
Проте не було візуальних відмінностей у структурі та морфології клітин, культивованих зразками. Клітини залишаються метаболічно активними, про що свідчить зелена флуоресценція в них.



Флуоресцентні зображення клітин NIH-3T3 (мишачі фібробласти), оброблені зразками HA-ZnO (A) та HA-Alg-ZnO (B)

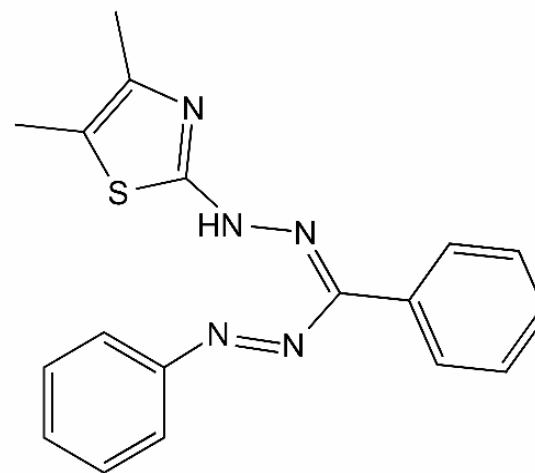
КОЛОМЕТРИЧНИЙ ТЕСТ МТТ

МТТ, жовтий тетразол, у живих клітинах зводиться до фіолетового формазану.



3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
(МТТ)

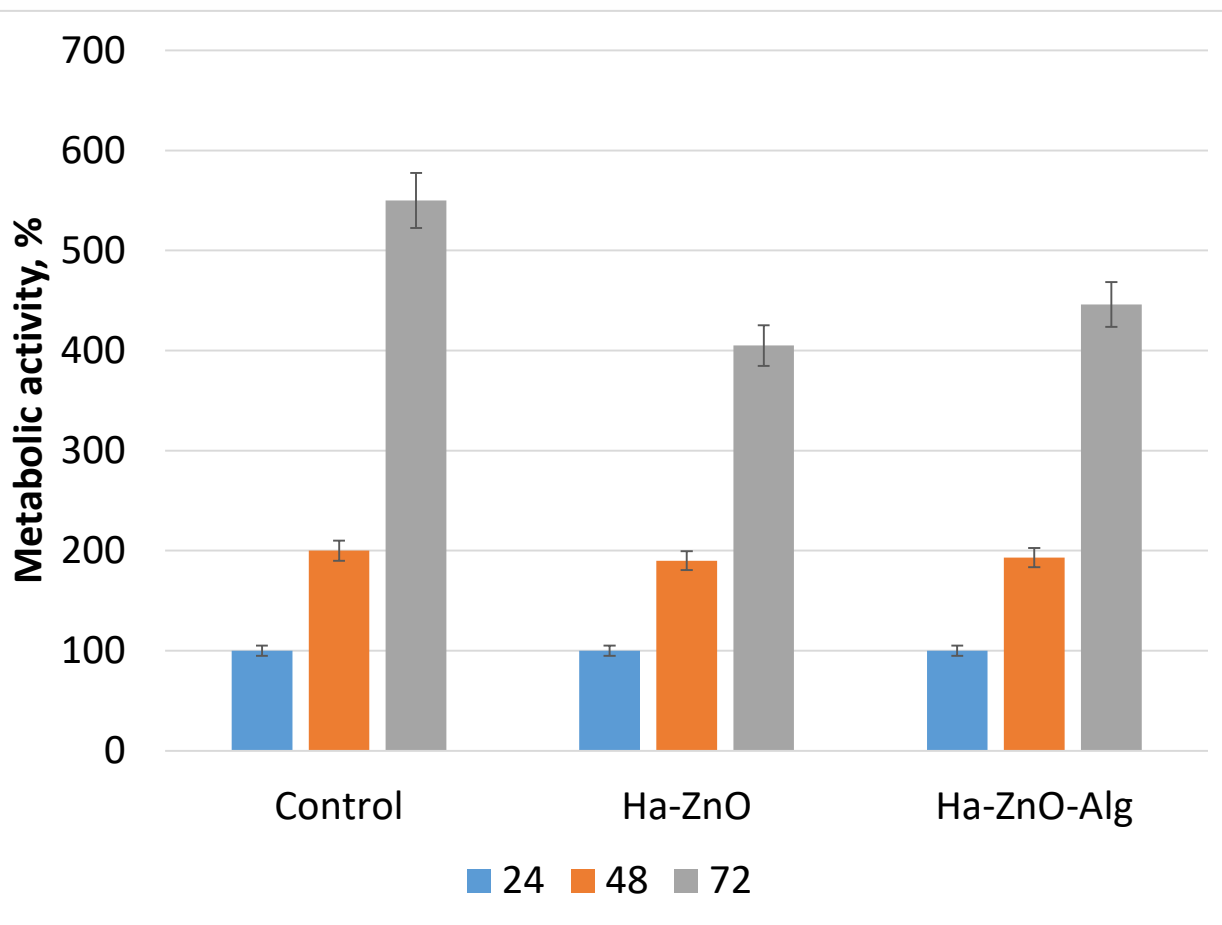
Mitochondrial Reductase



(E,Z)-5-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-1,3-diphenylformazan
(Formazan)

Колометричний тест МТТ використовували для оцінювання метаболічної активності клітин, культивованих зразками гідроксиапатиту, а також цитотоксичності (втрата живих клітин) або цитотоксичної активності (зсув від проліферації до спокою) матеріалів. Зменшення фарбників тетразолію залежить від NADP-Н-залежних ферментів оксидоредуктази переважно в цитозолі клітини. Тому зниження МТТ та інших фарбників тетразолію залежить від метаболічної активності клітин завдяки потоку NADP-Н. Клітини з низьким рівнем обміну речовин відновлюють дуже мало МТТ. На відміну від них, швидкодіючі клітини демонструють високий ступінь відновлення МТТ.

МЕТАБОЛІЧНА АКТИВНІСТЬ МИШАЧИХ ФІБРОБЛАСТІВ



Метаболічна активність клітин у контрольній групі збільшується через 24, 48, 72 години упродовж усього періоду культивування.

У разі експериментальних зразків на 3-й день вирощування спостерігалось незначне зниження ($\leq 7-10\%$) метаболічної активності клітин, культивованих за допомогою зразків **HA-Alg-ZnO** та **HA-ZnO** порівняно з контрольною групою.

Метаболічна активність мишачих фібробластів NIH-3T3, що культивуються з використанням зразків матеріалів на основі HA за часом

ЦИТОТОКСИЧНІСТЬ

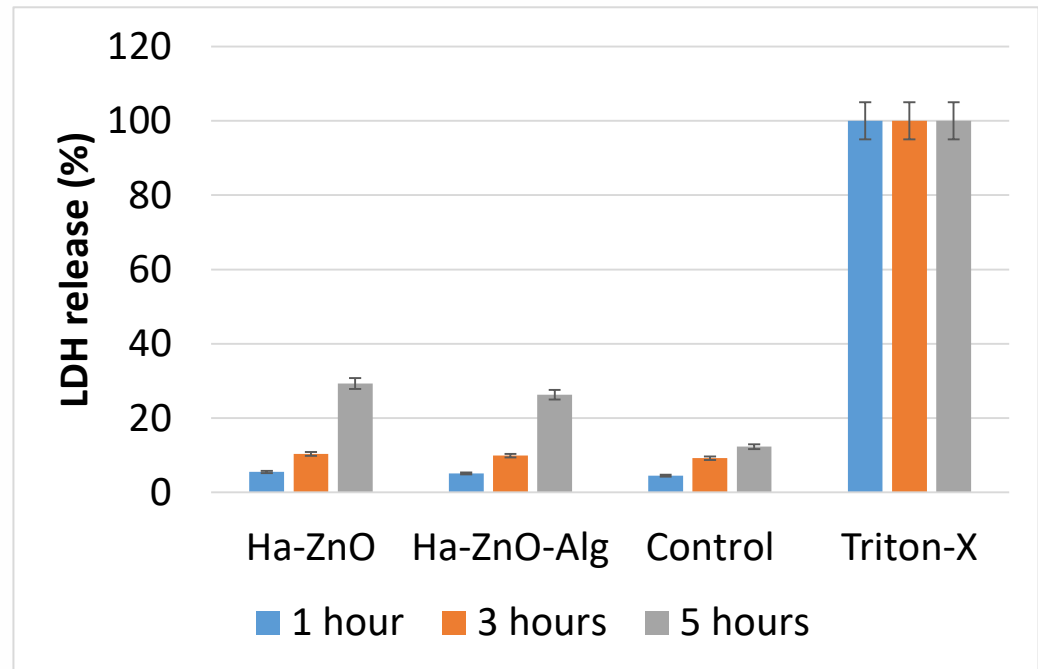
Вимірювання активності лактатдегідрогенази (**LDH**) використовують як основу різних експериментів із цитотоксичності.

Цей фермент зазвичай наявний у цитоплазмі живих клітин і виділяється в середовище клітинної культури через витік мертвих або мертвих клітинних мембран, які порушуються токсичним агентом.

Невеликі кількості культурального середовища можуть бути відновлені в різні проміжки часу після хімічного оброблення клітин для вимірювання вивільненого **LDH** і визначення тимчасової природи токсичності.

Звільненням **LDH** здійснюється загальне оцінювання цитотоксичності. Цей тест корисний, оскільки його легко здійснити в реальному часі.

Як негативний контроль використовували 0,1 % розчину тритону-Х, який відомий своїм ефектом пошкодження на клітинних мембранах, забезпечуючи 100 % виділення LDH із клітин. Для матеріалів HA-ZnO та HA-Alg-ZnO масою 0,1 г, інкубованої впродовж 5 годин із клітинами, спостерігалось незначне збільшення виділення LDH на 17 % та 14% порівняно з позитивним контролем (клітини без матеріалів).



LDH-реліз із NIH3T3-клітин інкубованих із HA-матеріалами впродовж 5 годин

ЗАГАЛЬНІ ВИСНОВКИ

Одержані результати свідчать про виражену антибактеріальну дію наночастинок ZnO, наявних у складі композиційного матеріалу на основі гідроксиапатиту та альгінату. Нанокристали ZnO стикаються з двома параметрами ґратки: кубічною та гексагональною. Ми вважаємо, що гексагональний ZnO зв'язується лише з апатитом, однак кубічний ZnO утворює ліганди з альгінатом.

Кілька механізмів відіграють важливу роль в антибактеріальній місткості матеріалу. Перша – це електростатичне приєднання, що призводить до закріплення на поверхні великої кількості бактерій, безпосередньої взаємодії іонів Zn із мікроорганізмом і генерацією ROS.

Було встановлено, що матеріали, що вивчаються на основі гідроксиапатиту, не є цитотоксичними, клітини, що інкубуються на ньому, зберігають свою життєздатність і морфологічні особливості.

Отримані в роботі матеріали на основі гідроксиапатиту (**HA-Alg-ZnO**, **HA-ZnO**) як нові остеопластичні матеріали, що забезпечують адгезію та проліферацію фібробластів, можуть потенційно бути використані для відновлення дефектів кісткових тканин у тканинній інженерії.

A laboratory setting with a rack of test tubes containing yellow liquid, a pipette, and a multi-well plate in the background.

ЛЕКЦІЯ 8. ПОКРИТТЯ

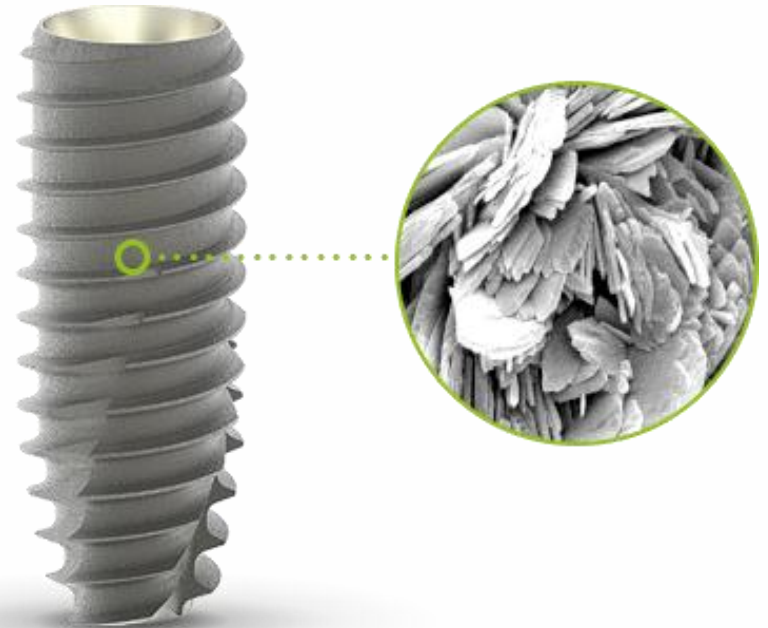


МОТИВАЦІЯ

Оскільки різні взаємодії між клітинами, навколишніми тканинами та імпантованими біоматеріалами завжди відбуваються на їх *інтерфейсах*, поверхневі властивості потенційних імпантатів мають вирішальне значення для клінічного успіху.

З огляду на той факт, що обмежений обсяг матеріалів переноситься живими організмами, була розроблена спеціальна дисципліна, що називається *інженерією поверхні*, для ініціювання бажаних змін зовнішніх властивостей різноманітних матеріалів, але водночас, зберігаючи їхні об'ємні властивості.

Депозити CaPO_4 (покриття, плівки та шари), які використовуються для поліпшення поверхневих властивостей різних типів штучних імпантатів, є **темою цієї лекції**.



ЗАГАЛЬНІ ЗАУВАЖЕННЯ ТА ДЕФІНІЦІЇ

Згідно з Вікіпедією

«Покриття – це плівка на поверхні об’єкта, яку зазвичай називають субстратом. У багатьох випадках покриття застосовуються для поліпшення властивостей поверхні субстрату, таких як зовнішній вигляд, адгезія, змочування, корозійна стійкість, зносостійкість і стійкість до подряпин. В інших випадках, зокрема в процесі друку та виготовлення напівпровідникового пристрою (де підкладка є облаткою), покриття є важливою частиною готового продукту».

Всі типи покриттів можна розділити на дві великі категорії:

а) **конверсійні**, які утворюються продуктами реакції основи матеріалу (наприклад, утворення оксидного шару поверхневим окисненням);

б) **осаджені** (рис.).



Зі свого боку, осаджені типи покриттів можуть бути далі класифіковані за методами їхнього отримання.

Завдяки чудовим біомедичним, але несприятливим механічним властивостям матеріалу CaPO_4 , були проведені широкі дослідження щодо їхніх покриттів на поверхнях матеріалів, що мають кращі механічні властивості.

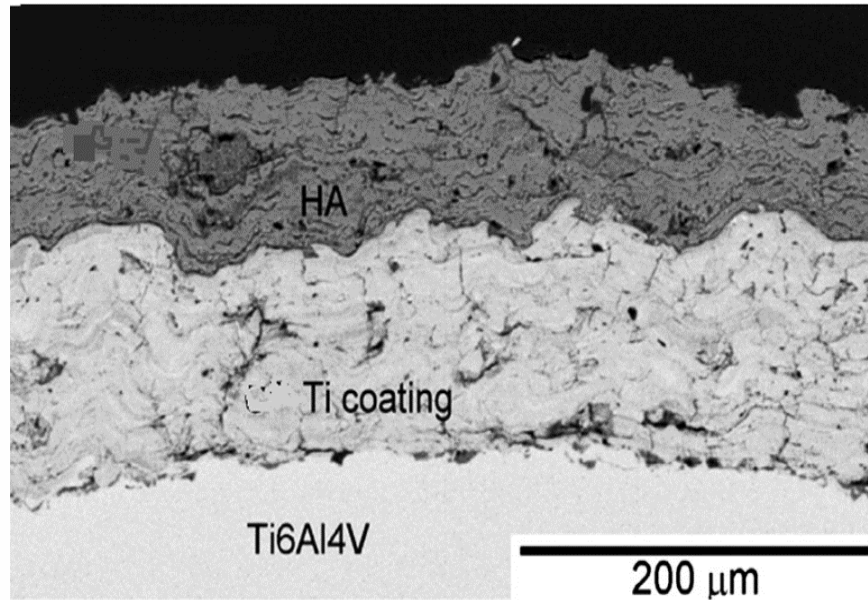
Унаслідок цього були розроблені різні **методи осадження** (див. нижче). Проте здебільшого перед нанесенням покриття необхідно підготувати поверхню підкладки. Зазвичай це очищення та/або знежирення, щоб видалити будь-які поверхневі забруднення, які виникають під час виготовлення та/або зберігання.

Схематичний рисунок, що демонструє відмінності між формуванням конверсійних покриттів і осадженими.

МОДИФІКАЦІЯ ПОВЕРХНІ: *попереднє осадження порошку Ti на поверхню сплаву Ti-6Al-4V*

Крім того, є фізичні процедури, унаслідок чого існують різні **типи модифікацій** поверхні.

Попереднє осадження, наприклад, порошку Ti, на поверхню сплаву Ti-6Al-4V відбувається для зниження залишкового напруження в осадженому **НА** та підвищує міцність адгезії (рис.).



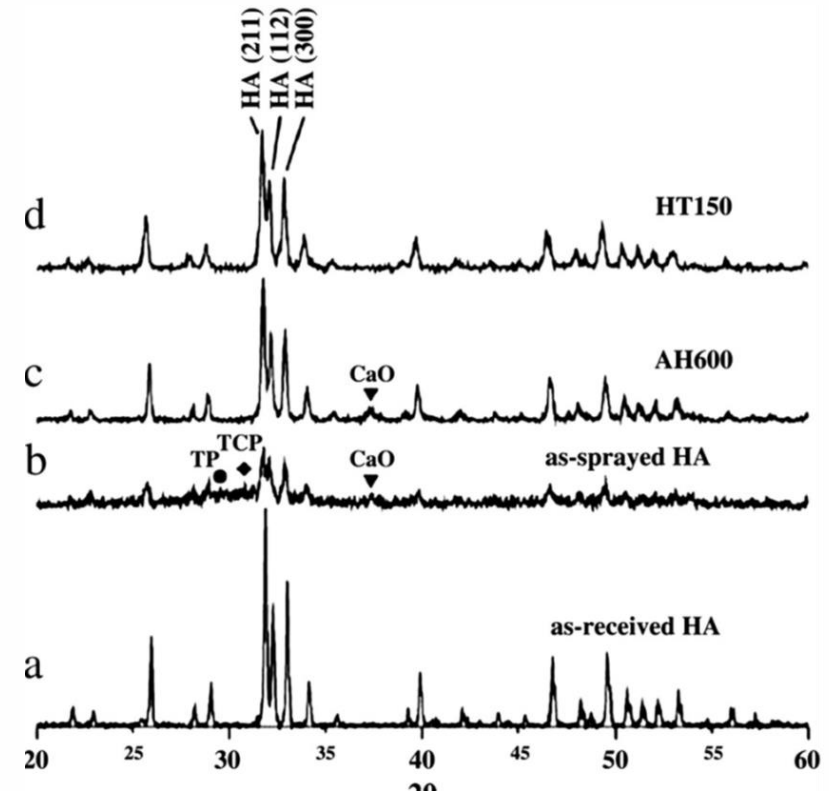
Зображення SEM поперечного перерізу плазморозпилюваного НА, нанесеного на осаджений Ti, – зв’язувальне покриття на поверхні субстрату сплаву Ti-6Al-4V. Попереднє нанесення порошку Ti на поверхню із субстратів зі сплаву Ti-6Al-4V може знизити залишкові напруження в осадженому НА та підвищує міцність адгезії. Отже, Ti виявився зв’язковим шаром між Ti-6Al-4V-сплавом і ГА.

ВИДИ ОБРОБЛЕННЯ ДЛЯ ЗАБЕЗПЕЧЕННЯ КРИСТАЛІЗАЦІЇ

Крім того, після осадження CaPO_4 були застосовані різноманітні види оброблення для забезпечення кристалізації/перекристалізації різних фаз, а також для поліпшення їх фіксації та випарування слідів розчинника, який був захоплений за депозиції.

Видно, що, крім фазових і композиційних модифікацій (рис.), оброблення після осадження викликало зміни як морфології поверхні, так і шорсткості осаджених CaPO_4 .

Характеристики XRD: (a) – початкового порошку HA; (b) – як розпиленням HA-покриттів; (c) – нагрівання на повітрі за t 600°C HA-покриттів (АН600) і (d) – гідротермально оброблені покриття HA за 150°C (HT150). Легко помітити, що кристалічність і фазова чистота слабокристалічних HA-покриттів збільшуються як після **теплого**, так і після **гідротермічного оброблення**.



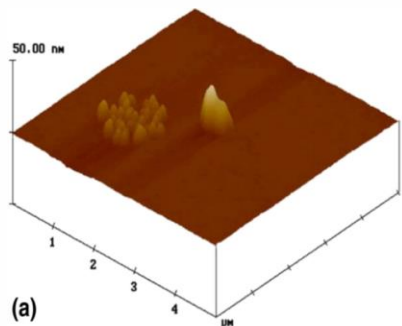
ПОВЕРХНЕВА МОРФОЛОГІЯ РОЗПИЛЕНИХ CaPO_4 -ПОКРИТТІВ

Репрезентативна поверхнева морфологія розпилених CaPO_4 -покриттів на склі підкладки:

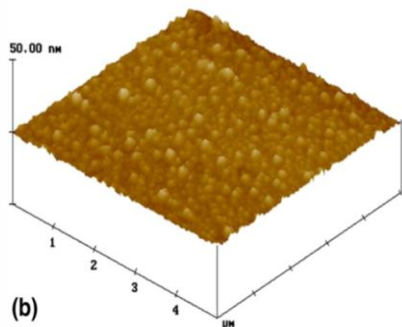
(a) напилена поверхня;

(b) після термічного оброблення за t 350 °C впродовж 1 години за відсутності водяної пари;

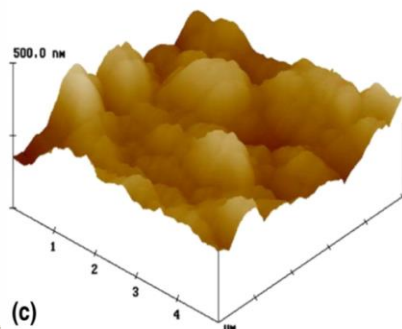
(c) після термічного оброблення за t 350 °C впродовж 1 години за наявності водяної пари.



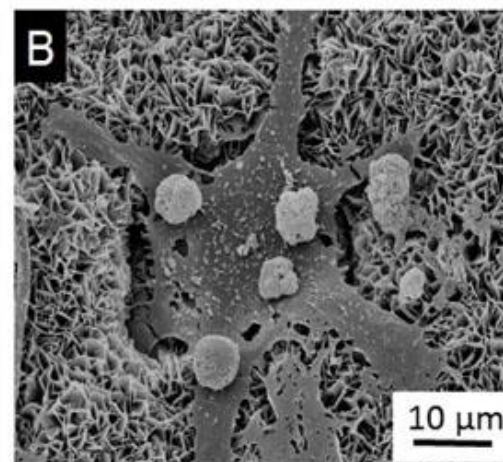
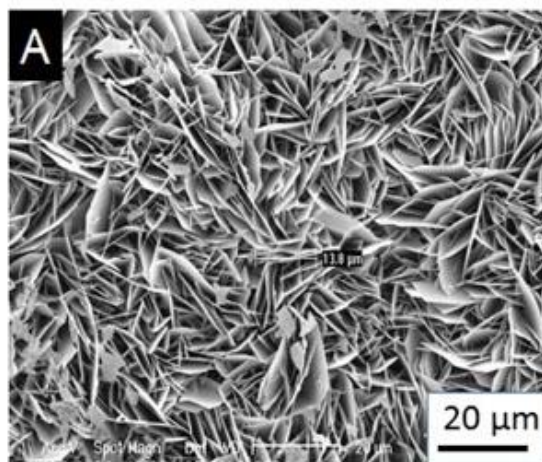
(a)



(b)



(c)



МЕТОДИ ОТРИМАННЯ ПОКРИТТІВ

Взагалі, оскільки більшість процесів осадження є **нерівноважними**, більшість осадів відрізняється від початкових матеріалів, які використовуються для осадження.

А саме склад осаджених покриттів, плівки та шари не завжди обмежуються фазовими діаграмами.

Теплові методи розпилення

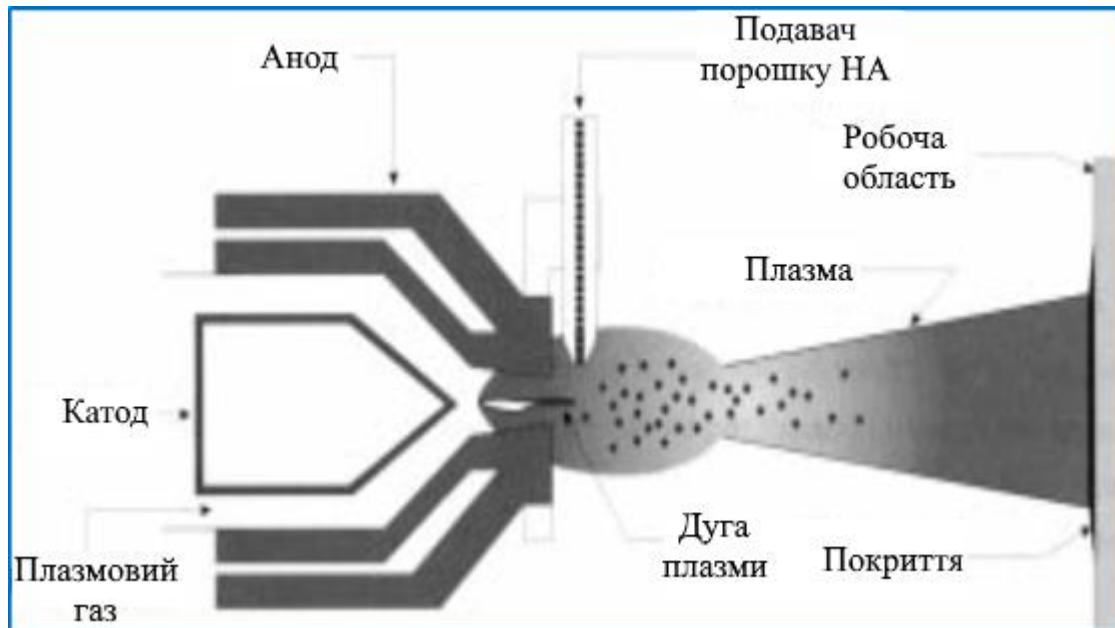
Термічне напилювання – це процес, за якого розплавлений матеріал розпилюють на більш холодну поверхню.

Ідея використання термічного розпилення для депонування CaPO_4 вперше була запропонована в Японії. А саме 3 квітня 1979 року з'явився патент, який описує «поліпшений імплантат для кістки, суглобів і зубних коренів, що містить металевий основний матеріал і шар покриття НА, який утворюється термічним розпиленням порошку НА». Оскільки термічне розпилення відбувається за дуже високих температур, депоновані гарячі краплі завжди підігрівають підкладки. У деяких випадках це може призвести до фазового перетворення та перекристалізації поблизу зони поверхні. Тому в багатьох випадках для підтримання підкладки за оптимальних температур необхідно застосовувати відповідний метод охолодження.

Термічне напилення

Плазму часто називають четвертим станом речовини, оскільки він відрізняється від твердих, рідких і газоподібних станів і не підлягає класичним фізичним і термодинамічним законам.

Як зазначає К. de Groot et al. (1998), метод плазмового розпилення (ПР) був відкритий у 1970 р. випадково студентом, який використовував обладнання для вивчення розплавлених і швидко затверділих оксидних покриттів алюмінію на металевому субстраті (рис.).



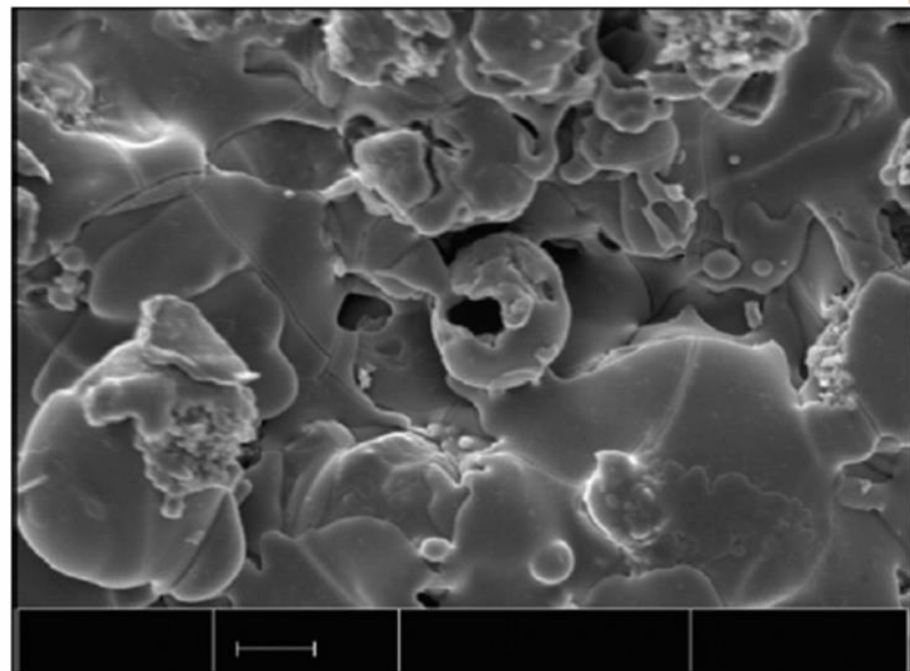
Схематичне зображення
методу плазмового
розпилення

Метод плазмового розпилення

Це метод, у якому електрична дуга постійного струму (DC) створюється між двома електродами, тоді як потік газів (зазвичай, Ar, однак He, H₂ або N₂ також можуть бути використані) проходить через цю дугу.

Високовольтний розряд між катодом та анодом всередині дуги перетворює ці гази на іонізовану суміш (плазму) дуже високої (до ~ 20 000 K) температури і з високою швидкістю до ~ 400 м/с.

Матеріал (наприклад, ГА), який наноситься, подається у вигляді порошку в плазмовий струмінь. Інжектвані частинки піддаються впливу дуже високих температур упродовж дуже короткого часу (~ 10⁻³–10⁻⁴ с), більшість із них достатньо нагрівається, щоб стати розплавленими, напіврозплавленими або принаймні пом'якшеними, що важливо для адгезії.



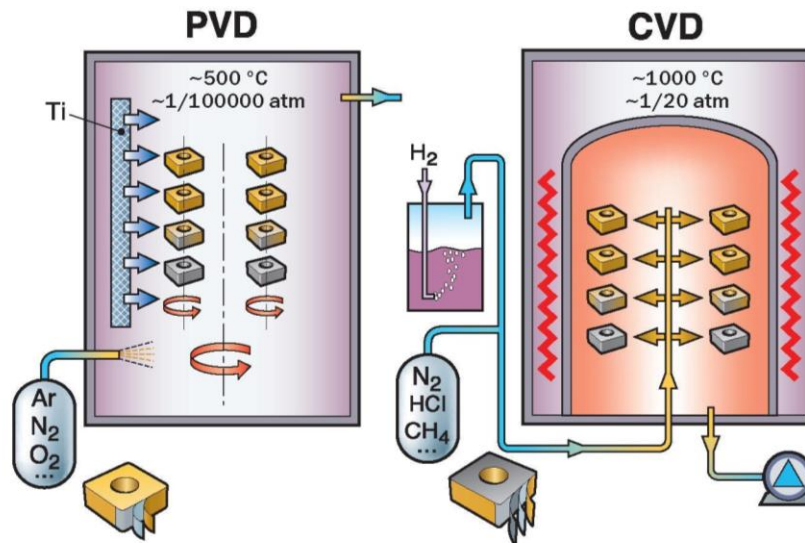
Типовий вигляд морфології розпиленого покриття НА

Технології осадження парів

По-перше, необхідно зазначити, що всі доступні технології осадження парів можна поділити на дві основні групи: фізичне та хімічне осадження парів (скорочено **PVD** і **CVD** відповідно).

Серед них всі види методики PVD можуть бути додатково класифіковані в інший набір із двох груп:

- 1) ті, що пов'язані з термічним випаровуванням, де матеріал нагрівається доти, доки його тиск у парах не стане більше, ніж тиск довкілля;
- 2) ті, що пов'язані з іонним розпиленням, де високоенергетичні пучки іонів та/або електронів бомбардують тверду мішень і вибивають атоми з її поверхні. Зазвичай PVD відбувається у вакуумі, однак це також може бути виконано за наявності деяких газів. Мішенню є вихідний матеріал (у нашому випадку – CaPO_4).



Схематичне зображення технологій PVD і CVD

Магнетронне напилення

Магнетронне розпилення є одним із прикладом техніки **PVD**. Ідея використання магнетронів для введення CaPO_4 була вперше запропонована у США. А саме – 11 листопада 1975 року, що патент (заявка була подана 13 травня 1974 р.), що описує «ідею покриття протезів базовими кістковими частинками» [BJ Shaw and RP Miller, 1975]. Магнетрон – потужна вакуумна трубка, яка генерує мікрохвилі, використовуючи взаємодії потоку електронів із магнітним полем.

Сьогодні магнетронне розпилення є зручним, стандартним методом осадження CaPO_4 на різних підкладках. Необхідно зазначити, що ця технологія є комерційно доступною, наприклад, BioComp Industries BV, Нідерланди.

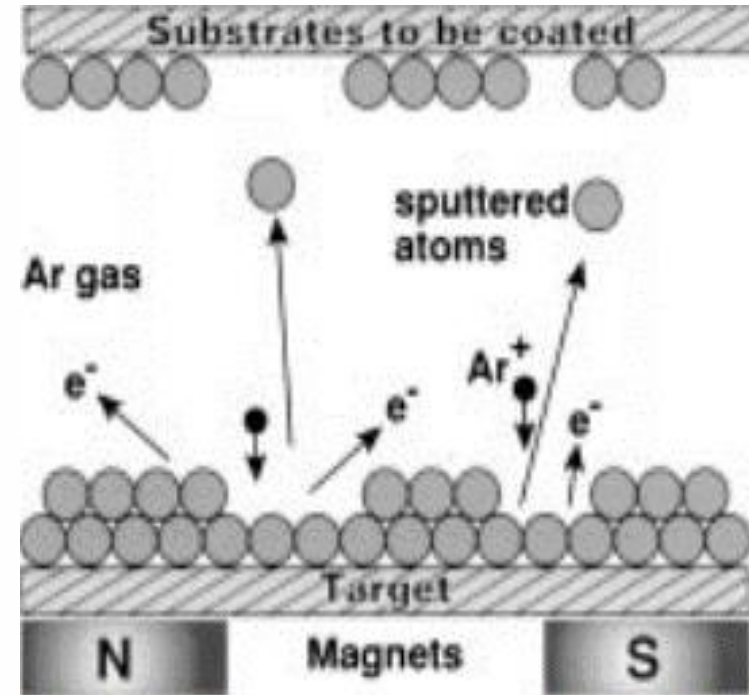


Схема магнетронної технології

Вологі методи

Як випливає з визначення, всі типи техніки мокрого осадження відбуваються з будь-яких розчинів або суспензій як водних, так і неводних. Тому всі вони відбуваються за помірних температур.

Залежно від рН розчину різні CaPO_4 можуть бути осаджені, і отже, буде відпалено. Загалом процес осадження зазвичай ґрунтується на гетерогенному явищі нуклеації, кінетика якого залежить від багатьох параметрів, таких як пересичення розчину, концентрація реагентів, температура, гідродинаміка, наявність або відсутність домішок, нуклеаторів, інгібіторів тощо.

Що стосується механізмів осадження CaPO_4 з водних розчинів, цей процес, здається, досить складний, і для біологічних CaPO_4 (**ОСР**, **CDHA** і **HA**) процес відбувається за допомогою утворення одного або декілька фаз проміжних і/або попередників, таких як **АСР**, **DCPD** і/або **ОСР**.

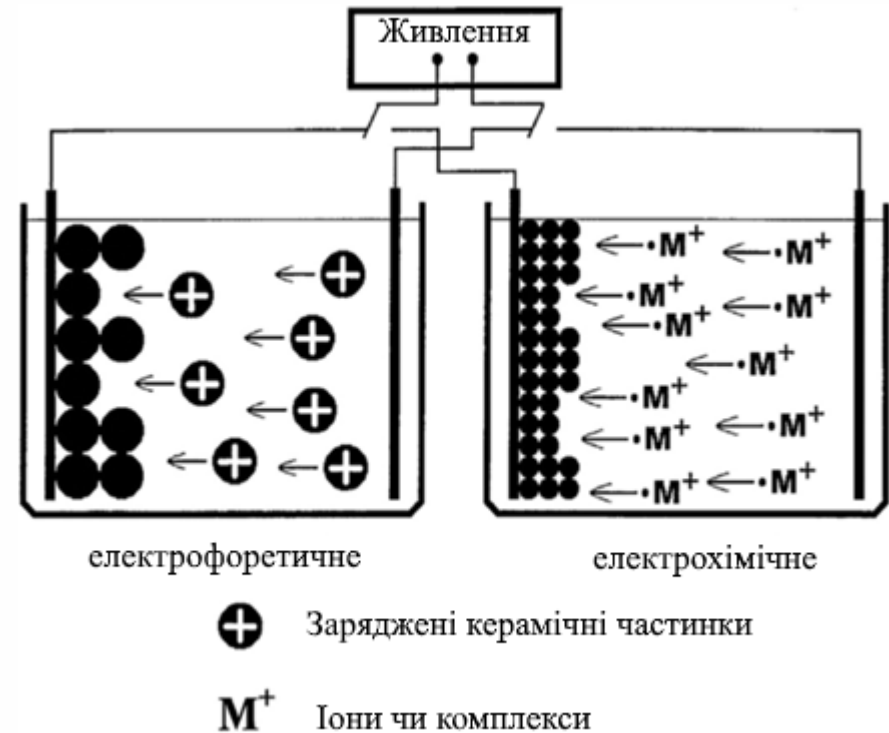


Синтез гідроксиапатиту вологими методами

Електрофоретичне та електрохімічне осадження

Сутність технології: заряджені колоїдні частинки розчину під дією електричного поля мігрують (electrophoresis) і осаджуються на субстраті протилежного заряду⁻.

У **ECD** використовуються пересичені або метастабільні водні електроліти, що містять як кальцій, так і ортофосфатні іони. Типова установка містить платиновий електрод (анод) і металевий імплантат (катод), підключений до генератора струму. Процес ґрунтується на різних електрохімічних реакціях в електролітах, унаслідок цього рН розчину зростає навколо катода. Це призводить до перетворення кислотних ортофосфатних іонів HPO_4^{2-} і H_2PO_4^- на PO_4^{3-} за одночасного утворення менш розчинної CaPO_4 фази (рис.).



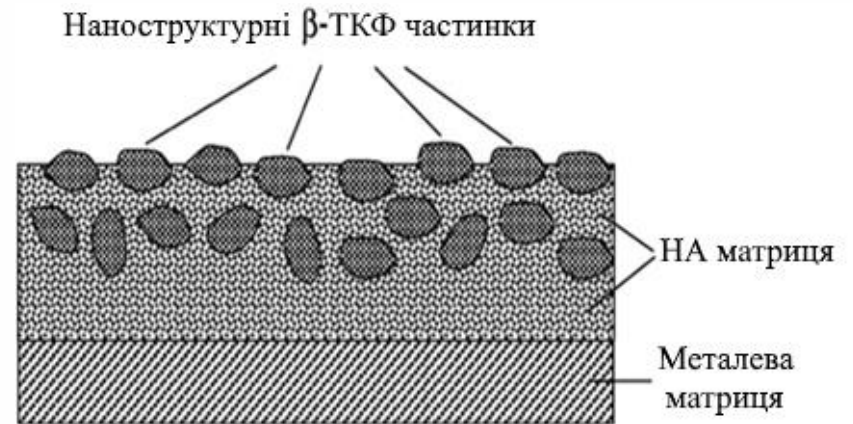
Схеми електрофоретичних та електрохімічних осадів, що показують рух позитивно заряджених керамічних частинок (лівий рисунок) та іонів M^+ (правий рисунок), з подальшим їх осадженням на катоді.

Золь-гелеве осадження CaPO_4

За визначенням, золь є двофазною суспензією колоїдних частинок у рідині, тоді як гелі розглядаються як композити, оскільки вони складаються з твердого скелета, який містить рідку фазу. Отже, як впливає з назви, процес «золь-гель» є мокрим хімічним методом, який передбачає перехід від рідкої «золь» до твердої «гель» фази.

Для проведення золь-гелевого осадження CaPO_4 Ca- і P-солі осаджуються на підкладки за низьких температур реакції. Після цього сіль перетворюється на гель. Після сушіння тверді осад залишаються на поверхні.

Можна отримувати також двофазні покриття, у яких частки одного типу CaPO_4 були вбудовані в безперервне покриття іншого типу CaPO_4 (рис.).



Схематичне подання двофазних покриттів, приготованих методом «золь-гель», в якому нанорозмірні частинки β -ТКФ були вбудовані в безперервне покриття фтористого ГА (ФГА) (К. Cheng et al., 2008).

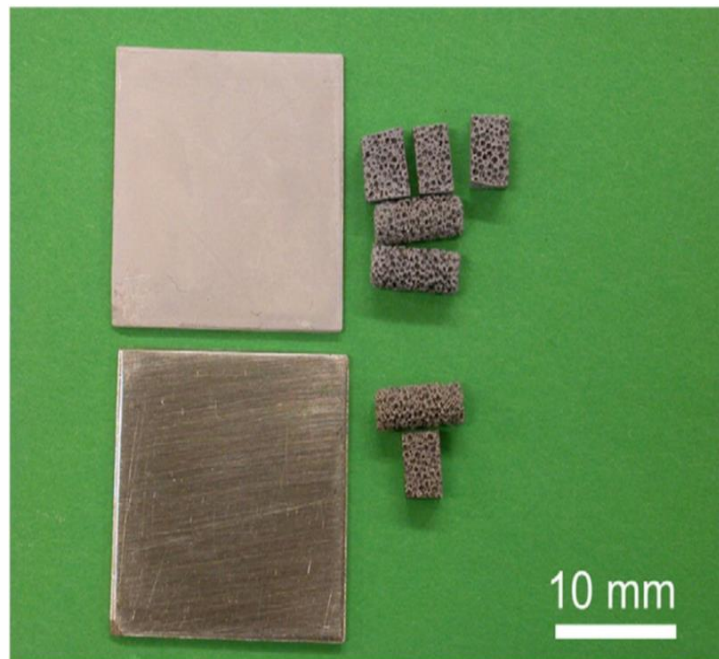
Біоміметичне осадження

Оскільки **біоміметика** (синоніми: біоніка, біоміміка) прагне застосовувати біологічні методи і системи, знайдені в природі, *біоміметичне осадження – це метод, за допомогою якого біологічно активні кістковоапатитні відкладення утворюються на підкладках занурених у різні імітаційні розчини*, такі як розчин солі Хенка (**HBSS**), **PBS** або **SBF**. Історично це було в 1990 році, коли CaPO_4 вперше був біологічно осаджений на підкладку [T. Kokubo et al., 1990]. Цей метод передбачає неоднорідне зародження та зростання кісткоподібних кристалів іонозаміщеної CDHA фази на поверхні імплантатів у фізіологічних умовах (температура – 25 °C або 37 °C та pH розчину в межах 6–8) впродовж декількох днів або навіть тижнів.

Механізм утворення кісткового апатиту на окисленій поверхні титану був досліджений детально. Коротко, це виглядає так. По-перше, утворюється шар аморфного титанату натрію на поверхні Ti після попереднього оброблення лугом. Потім відразу після занурення у SBF титанат натрію обмінюється іонами Na^+ з H_3O^+ -іонами і утворюють Ti-OH-групи на його поверхні. Пізніше Ti-OH-групи вміщують іони кальцію із SBF, щоб утворити шар аморфного титанату кальцію. Після довшого часу замочування аморфний титанат кальцію містять ортофосфатні іони із SBF для утворення ACP-покриття із Ca/P атомним співвідношенням $\sim 1,4$. Після цього ACP конвертується в кісткоподібну іонозаміщену CDHA-фазу із співвідношенням Ca/P $\sim 1,65$. Щоб завершити поділ, необхідно зазначити це біоміметично і хімічно, осадження покриттів, плівок і шарів CaPO_4 на імплантатах є **комерційно доступними**.

Приклади містять Peri-Apatite™ HA (Stryker Corp., Нью-Джерсі, США) та HAnano (Promimic AB, Швеція).

Покриття занурення

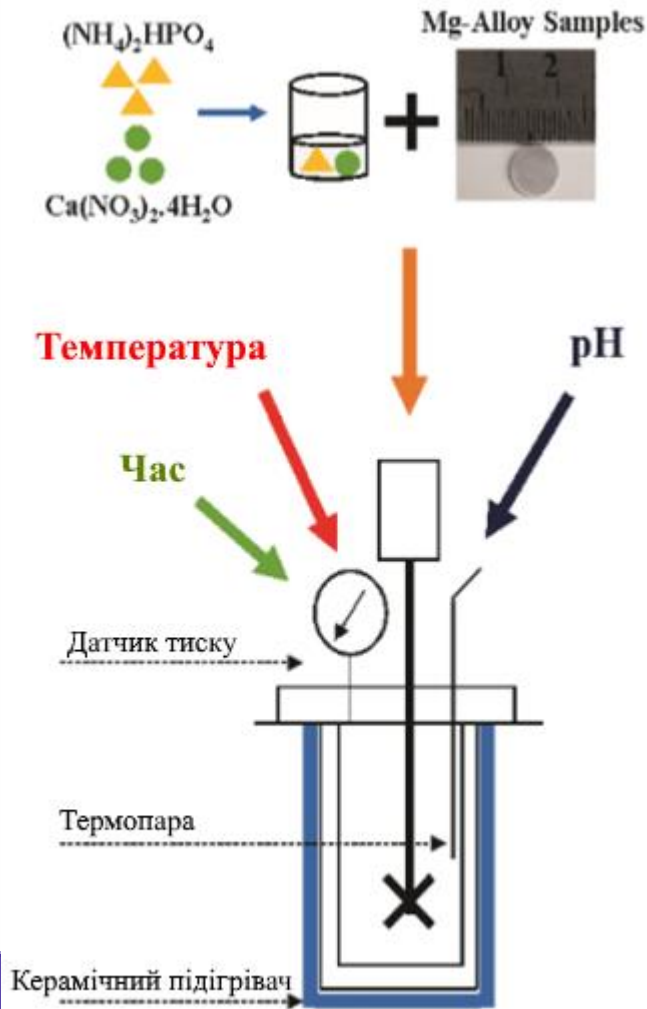


Фотографія, що показує застосування методу занурення та методу осадження на металах. Квадрат із нержавіючої сталі та п'ять пористих (розміром пор ~ 500 мкм) зразків танталу у верхній половині обробляли 8 разів у пересиченому розчині CaPO_4 , після чого сушили. Зразки показують рівномірно білий колір нанесеного покриття. На протипагу цьому щойно отриманий зразок у нижній частині демонструє блиск металів.

Покриття занурення є простою, і отже, популярною технікою осадження для різних підкладок, яка складається з кількох послідовних кроків. Підкладка занурюється в суспензію матеріалу (у нашому разі CaPO_4) за постійної швидкості. Мокрий осад самоосаджується на підкладці під час її виймання з розчину. Швидкість виймання визначає товщину (чим швидше – тим тонше). Розчин зливається з поверхні. Одночасно з випаровуванням розчинника ущільнюється покриття.

Існує два механізми, що регулюють осадження покриття занурення. **Перший механізм** відомий як захоплення рідини. Це відбувається коли зразок витягується із суспензії швидше, ніж стікання з поверхні, утворюючи тонкий осад. **Другий механізм** – це ковзання лиття, яке є процесом фільтрації, у якому пористі підкладки опускаються в суспензію на певний час, а потім видаляються з цього. Завдяки капілярним силам із рідини витікає суспензія (ковзання), тоді як тверді частки концентруються в межі підкладки/суспензія і внаслідок цього утворюється волога мембрана. Приклад покриттів зануренням показаний на рисунку (K. Duan et al., 2008).

Гідротермічне осадження



Гідротермічне осадження – це простий процес і один із найбільш економічно ефективних методів, який досить схожий на вищезгадане біоміметичне осадження та вологохімічне осадження, однак, оскільки гідротермічне оброблення проводиться за підвищених температур ($> 80\text{ }^\circ\text{C}$) протягом відносно тривалого періоду часу ($> 1,5$ год), CaPO_4 -покриття зазвичай **кристалічні**.

Дигідрат дикальцій фосфату (DCPD) і безводний дикальцій фосфат (DCPA), витягнутий із побічного продукту під час виробництва желатину з великої кістки, використовуються як вихідні матеріали, також можуть використовуватися для гідротермального синтезу гідроксиапатиту (ГА) за температури 160 і 200 $^\circ\text{C}$ та тиску пари 1 і 2 МПа відповідно.

ТЕРМОДЕПОЗИЦІЯ З ОХОЛОДЖЕННЯМ

Покриття ГА з використанням гідрооброблення

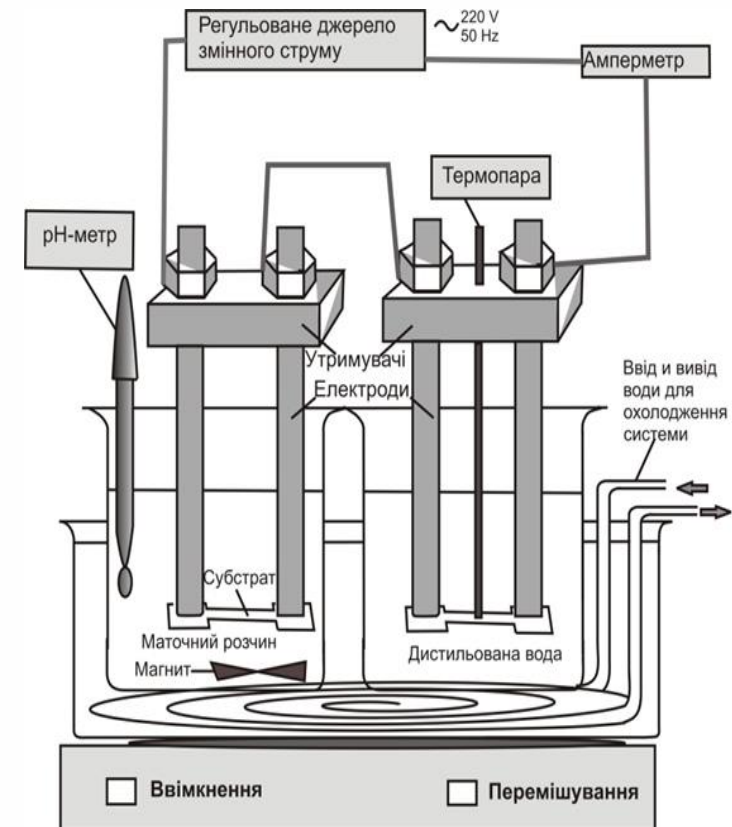
Гідроксиапатитні (ГА) та брушитові (ДКФД) покриття готували на підкладках Ti6Al4V, оброблених методом плазмо-електролітичного окиснення (PEO), використовуючи технологію термічного осадження субстрату (TSD). Для осадження покриттів фосфатів кальцію (CaP) різних фазових композицій використовували температурно-залежне явище розчинності ортофосфатів кальцію за фіксованого рН розчину. DCPD і покриття з дефіцитом кальцію HA (Ca/P = 1,64) були отримані за температури підкладки 85 °C та 140 °C відповідно. За 30 хв осадження було отримано покриття HA з товщиною 300 мкм, що складається з пластинчатих і голчастих кристалів розміром 4 мкм та покриття DCPD товщиною 50 мкм із голкоподібними кристалами розміром 7 мкм. Пористі морфології були характерні для обох покриттів.

Установка для одержання покриттів ГА методом термодепозиції із системою охолодження

Осадження термічного субстрату ґрунтується на різницях розчинності за низької і високої температури, а саме, підігрівання підкладки в умовах насиченого водного розчину, призводить до того, що тверді осадки можуть бути безпосередньо осадженими на підкладку. Запропоновано різні методи нагріву.

Можуть бути провідні підкладки, такі як металеві фольги або дроти, які нагріваються електричним струмом, пропущеним через них. Безконтактні методи, такі як **індукційний** нагрів, можуть бути використані для нагрівання матеріалів із складною формою. У таких випадках техніка називається осадженням з індукційним нагрівом.

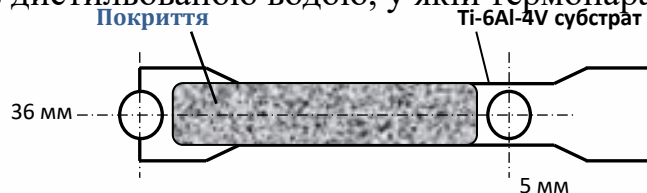
Робоча установка для отримання покриттів методом термодепозиції, яка створена в лабораторії «Біонаноккомпозит» СумДУ, подана на рисунку.



Установка для одержання покриттів ГА методом термодепозиції із системою охолодження на Ti-6Al-4V-субстратах.

Формування покриттів ГА методом термодепозиції

Металевий (титан) **субстрат** (рис.) 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-константовою термопарою. Для підвищення точності вимірювань температури використовували контрольну ємність із дистильованою водою, у якій термопара щільно прикріплена до субстрату.



Загальний вигляд Ti-6Al-4V-субстрату з покриттям, отриманим методом термодепозиції

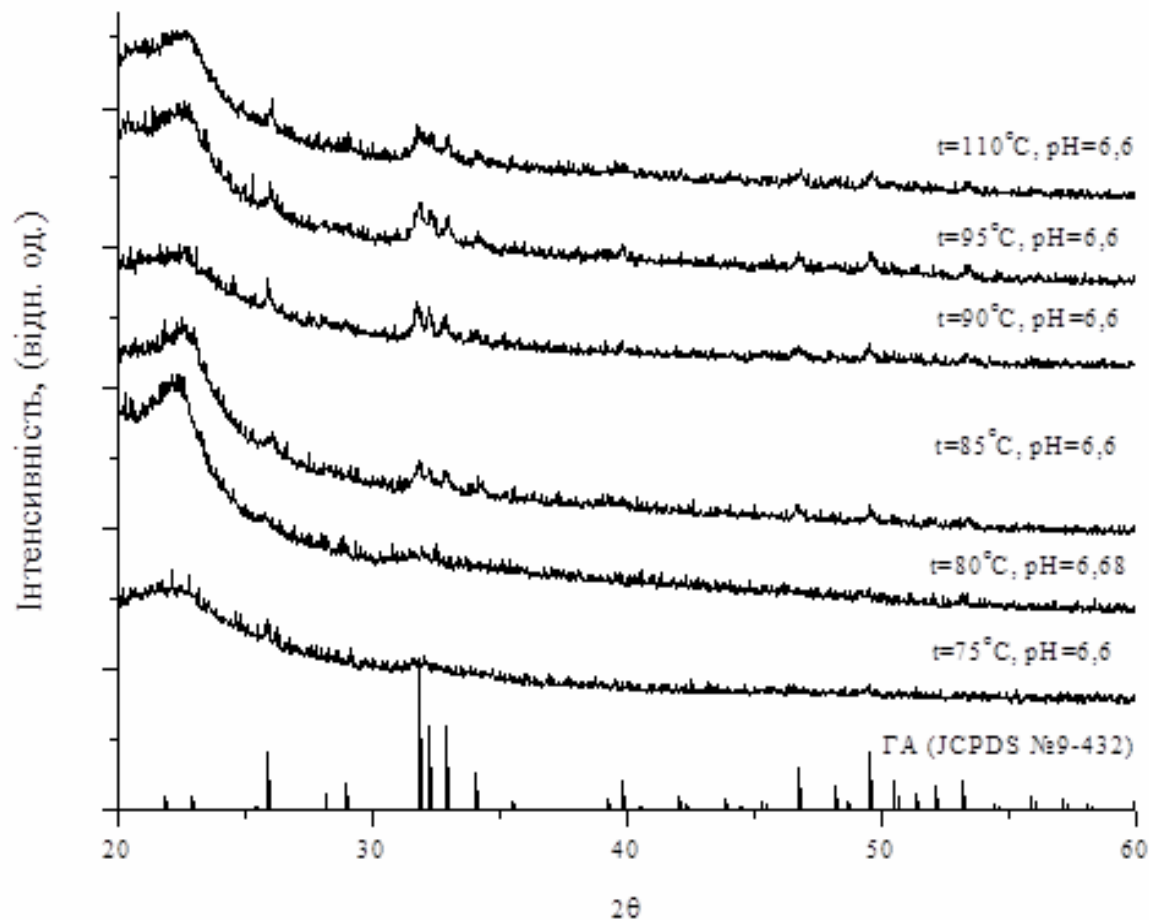
Як субстрати використовували Ti-6Al-4V-сплав ($S_{\text{субстр}} = 96 \text{ мм}^2$), який широко використовується в ортопедії та стоматології як матеріал для імплантатів. Дві склянки з титановими субстратами вміщували в ємність, заповнену дистильованою водою, у якій розміщена система охолодження. Для 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 ніж 25 °С здійснюється завдяки циркуляції проточної води в системі охолодження.

Різке збільшення рН призводить до випадіння осаду не локально на субстрат, а по всьому об'єму розчину, тому рівень рН підбирали близьким до нейтрального; тоді випадіння осаду в розчині для синтезу ГА є незначним. Концентрації NaH_2PO_4 та CaCl_2 підбирали так, аби під час змішування двох розчинів NaH_2PO_4 (6 ммоль/л) і CaCl_2 (10 ммоль/л) не відбувалося випадіння осаду та зберігалось співвідношення $\text{Ca/P} = 1,67$. Інтервал температур: 37–120. рН 6,5 і 110 – чистий ГА.

Покриття за інших температур субстрату

Для покриттів, отриманих за температур 75 і 80 °С при $pH \approx 6,68$, фазовий склад репрезентований аморфним ГА, про що свідчать піки низької інтенсивності (рис.).

У покриттях, отриманих за температур від 85 °С до 120 °С і $pH = 6,5-6,6$, основною фазою є ГА (JCPDS № 9-0432), інші фази відсутні (рис.).



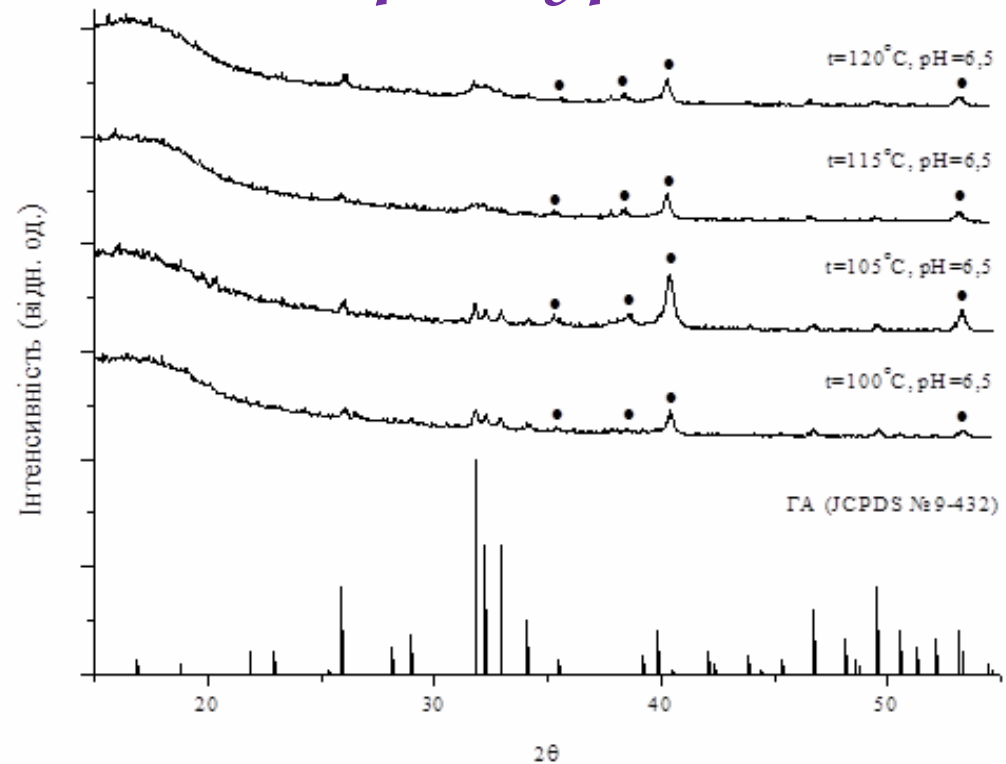
Характерні дифрактограми для зразків, отриманих за температур від 75 °С до 110 °С при $pH = 6,5-6,68$.

Покриття за підвищених температур

З підвищенням температури субстрату зростає кристалічність ГА відповідно збільшуються інтенсивності піків.

За температур 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 знятих безпосередньо на титанових субстратах, подані на рисунку.



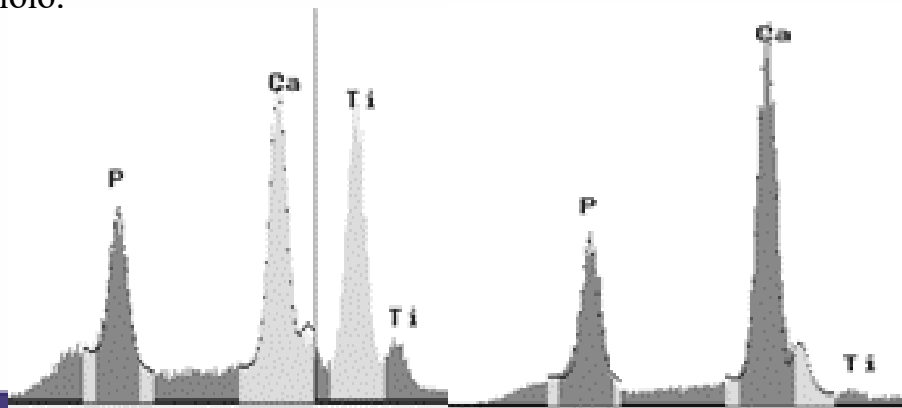
Характерні дифрактограми для зразків, отриманих за температур від 100 °С до 120 °С, $\text{pH} = 6,5$. Покриття зняті безпосередньо на титанових субстратах. Піки титану (JCPDS № 44-1294) позначені – ●.

Морфологія покриттів, отриманих упродовж
70 хвилин осадження (після: а) 10; б) 20;
в) 30; г) 40; д) 50; е) 60; ж) 70 хв)

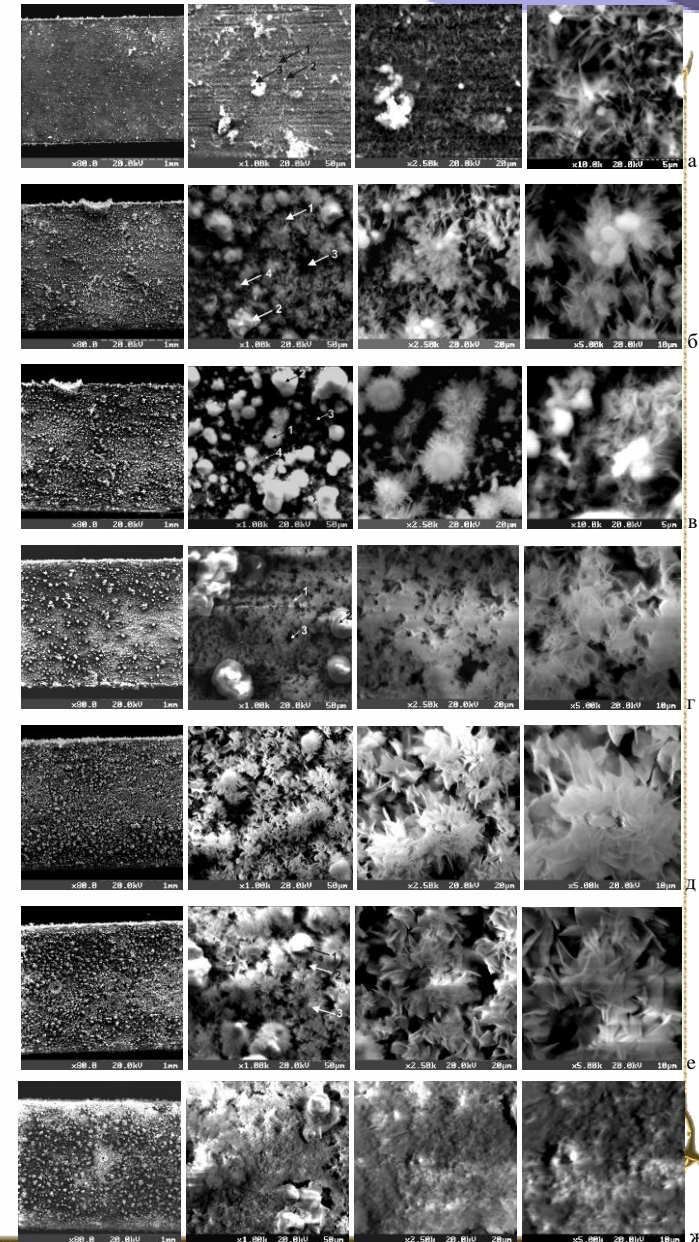
Для вибору часу отримання покриттів було проведено низку експериментів у яких досліджували динаміку кристалізації покриттів у часі (через кожні 10 хвилин). Температура субстрату на підставі отриманих результатів була обрана 105–110 °С, рН = 6,5.

Одержані дані демонструють, що початок кристалізації відбувається на субстраті вже після 10 хвилин експерименту. Проте в цьому разі покриття утворюється у вигляді острівців, між якими видно підкладку, що підтверджується результатами енергодисперсійного рентгеноспектрального аналізу.

Після 20, 30, 40 і 60 хвилин осадження покриття нерівномірне: є ділянки вкриті кальцій-фосфатами, а є ділянки не вкриті з незначною товщиною.



Енергодисперсійні рентгенівські спектри кальцій-фосфатних покриттів на Ti-6Al-4V-субстратах.



Відношення Ca/P у покриттях

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 концентр. 10 ммоль/л CaCl ₂ і 6 ммоль/л NaH ₂ PO ₄ · 2 H ₂ 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 таблиці в деяких точках (переважно це затемнені ділянки), спостерігається надлишок кальцію, особливо там де товщина покриття є найменшою. Цьому можна дати як фізичне, так і інструментальне пояснення. Можливо, є кальцій-фосфат, який не увійшов до структури кристала, але абсорбований на поверхні покриття. Завдяки цьому в деяких точках відбувається зсув 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 власне зразком, відповідно відбувається ослаблення лінії фосфору. Внаслідок цього відбувається зсув співвідношення Ca/P у бік надлишку кальцію.

Висновки

Результати вивчення морфології та елементного складу покриття, які ми одержали, засвідчили, що достатній час для отримання покриття цим методом – **60 хвилин** (за температур від 100 °С). *Зниження температури субстрату призводить до відповідного збільшення часу осадження покриття.*

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 і відбувається під час нагрівання титанового субстрату за допомогою електричного струму. Завдяки різкому підвищенню температури в певній зоні розчину відбувається різкий перехід із рідкої у тверду фазу. Поблизу фазового переходу взаємодія найближчих частинок ніби компенсує одна одну, а взаємодія між частинками, розміщеними на далекій відстані одна від одної, є домінантною. Відбувається швидке утворення кристалів ГА, що є найбільш термодинамічно вигідною сполукою за даних умов.

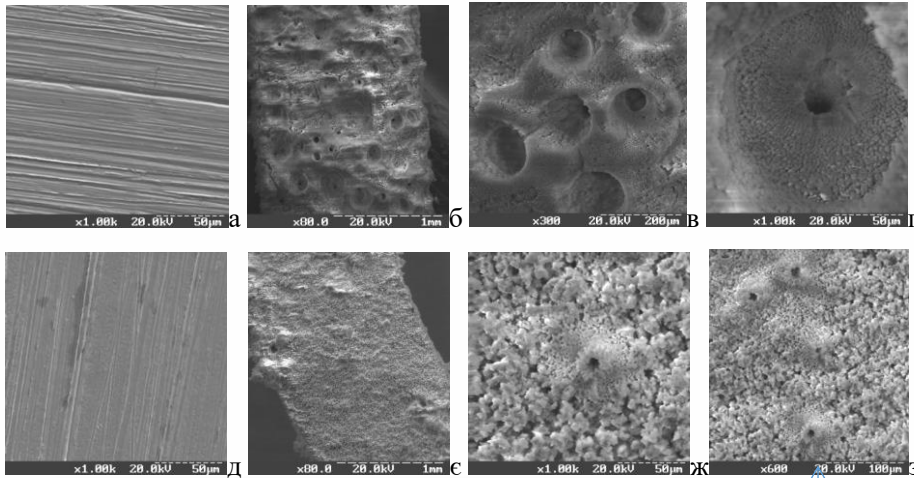
Вплив фізичного та хімічного оброблення субстратів на властивості та характеристики ГА-покриттів

Серед фізичних методів модифікування поверхні титанового субстрату ми вибрали метод *іонної імплантації*. Основною метою застосування іонної імплантації киснем є створення негативно зарядженої поверхні завдяки утворенню груп $Ti-O^-$, що прискорюють абсорбцію іонів кальцію.

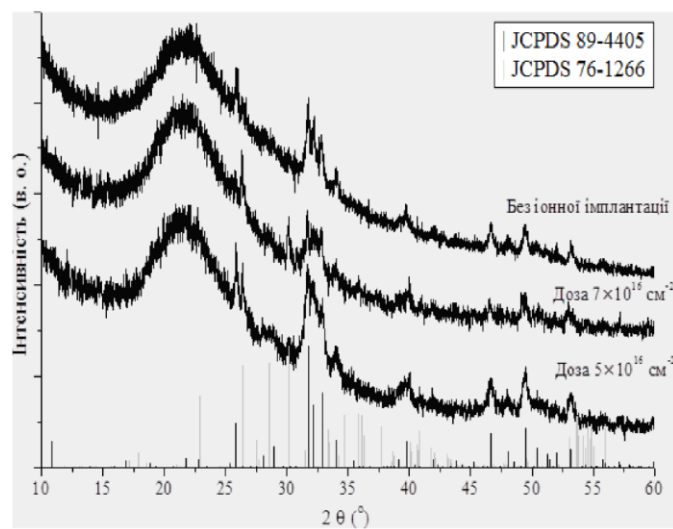
У зразки $Ti-6Al-4V$ -сплаву було імплантовано іони кисню за допомогою установки для іонної імплантації «Везувій-5». Установка складається з джерела іонів, поворотного магніту, прискорювальної трубки та приймальної камери. У приймальній камері є барабан зі зразками, піч для нагрівання зразків, циліндр Фарадея, де реєструється струм пучка. Визначаючи струм і час експерименту, задають певну дозу іонів, що імплантуються у зразок. Експеримент проводили за таких умов: $U = 100$ кВ, $T = 130^\circ C$, варіювали дозу імплантованого кисню $5 \cdot 10^{16}$ см⁻² та $7 \cdot 10^{16}$ см⁻².

Поверхневий шар репрезентований переважно TiO_2 . У праці (L. Jinlong et al., 2006) показано, що приповерхневий шар був репрезентований фазами TiO_2 , Ti_2O_3 та TiO . Модифікована поверхня може містити домішки Al_2O_3 , оскільки титановий сплав містить алюміній у своєму складі.

Морфологія та фазовий склад покриттів на титанових субстратах оброблених методом іонної імплантації



Співвідношення Ca/P, що були 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 ат % 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.



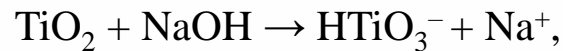
Морфологія поверхні титанових субстратів, оброблених методом іонної імплантації киснем: а) доза $5 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$; б–г) з нанесеним методом термодепозиції покриттям ГА; д) доза $7 \cdot 10^{16} \text{ см}^{-2}$; з нанесеним методом термодепозиції покриттям ГА (є–з).

Дифрактограми покриттів, 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.

Дослідження морфології та фазового складу покриттів на хімічно оброблених субстратах

Метою хімічного оброблення перед осадженням є модифікування поверхні, унаслідок чого прискорюється процес утворення зародків кристалів ГА.

Так, під час оброблення титанового субстрату 35 % розчином NaOH шар TiO₂ частково розчиняється в лужному середовищі через взаємодію з гідроксогрупами і спостерігаються такі реакції:



Механізм взаємодії поверхні з іонами кальцію і фосфору

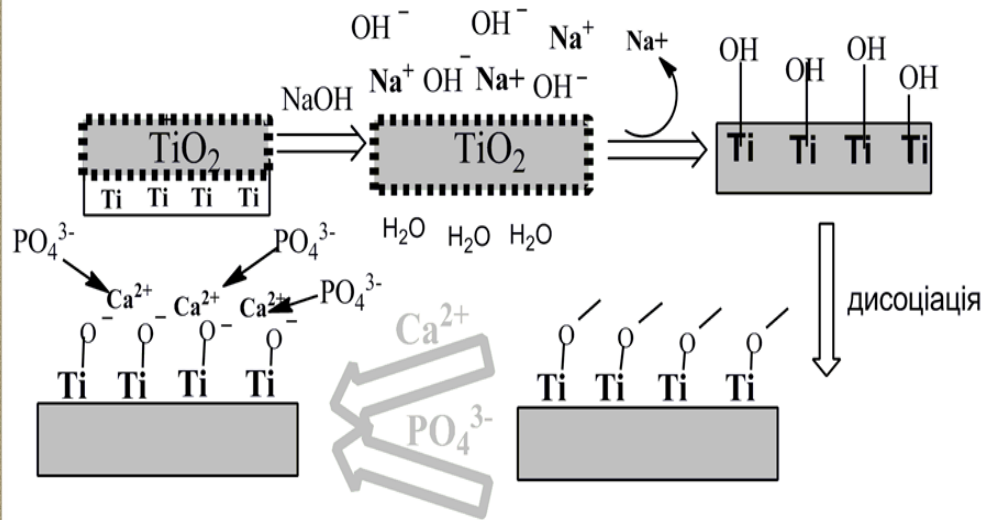


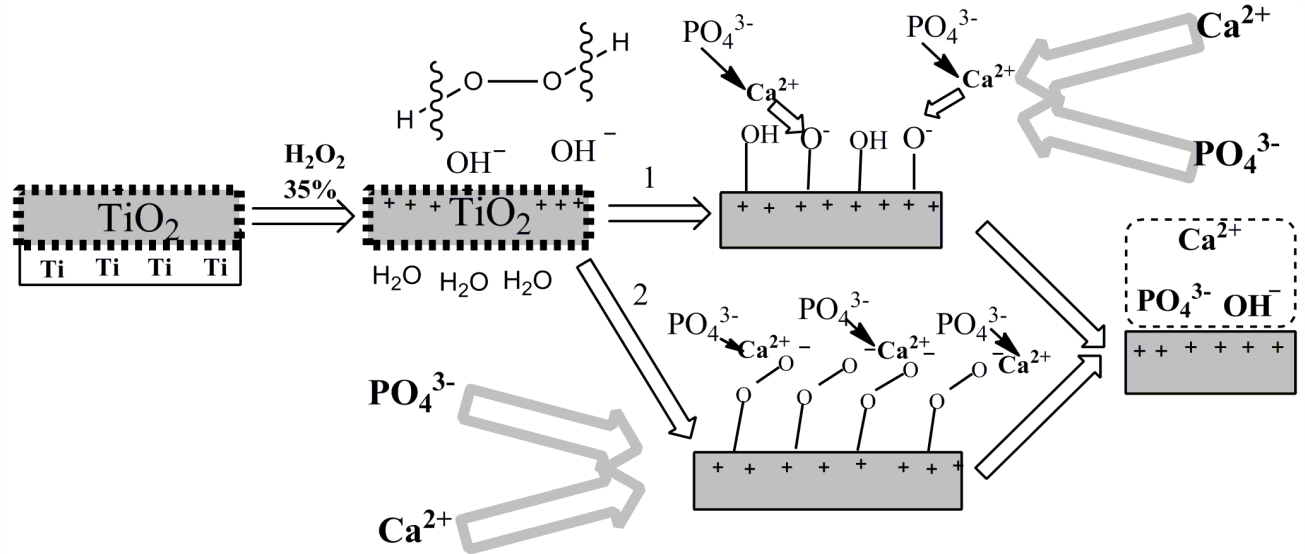
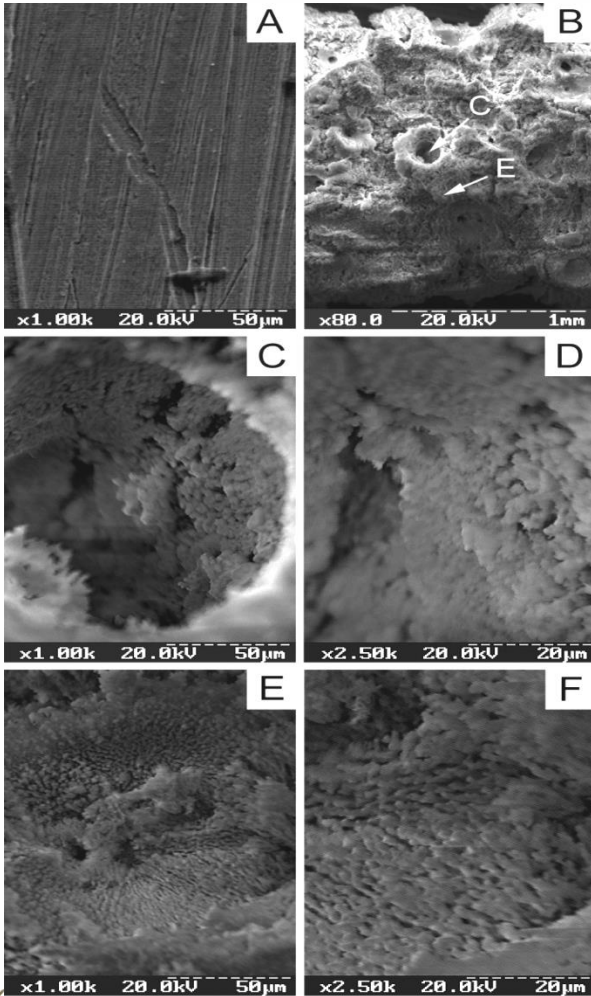
Схема взаємодії обробленої NaOH поверхні Ti-6Al-4V-субстрату з іонами Ca²⁺ та PO₄³⁻ з вихідного водного розчину для синтезу апатиту

У розчинах, які містять іони Ca²⁺ та PO₄³⁻ іони, шар титанату натрію гідролізується з утворенням гідроксогруп на поверхні. Ці групи є центрами зародкоутворення під час формування кристалів ГА завдяки їх взаємодії з іонами кальцію.

Механізм взаємодії іонів Ca²⁺ та PO₄³⁻ з поверхнею, яка оброблена NaOH під час утворення апатиту, показаний на рисунку.

Негативно заряджені Ti-O-групи взаємодіють із позитивно зарядженими іонами Ca²⁺, що притягують фосфат-іони з маточного розчину, формуючи **кальцій-фосфатний шар**.

Взаємодії поверхні, обробленої H_2O_2 , з компонентами розчину для синтезу ГА



Хімічне оброблення розчином перексиду водню перед осадженням гідроксиапатиту методом термодепозиції сприяє формуванню однорідного пористого покриття на поверхні Ti-6Al-4V-субстрату.

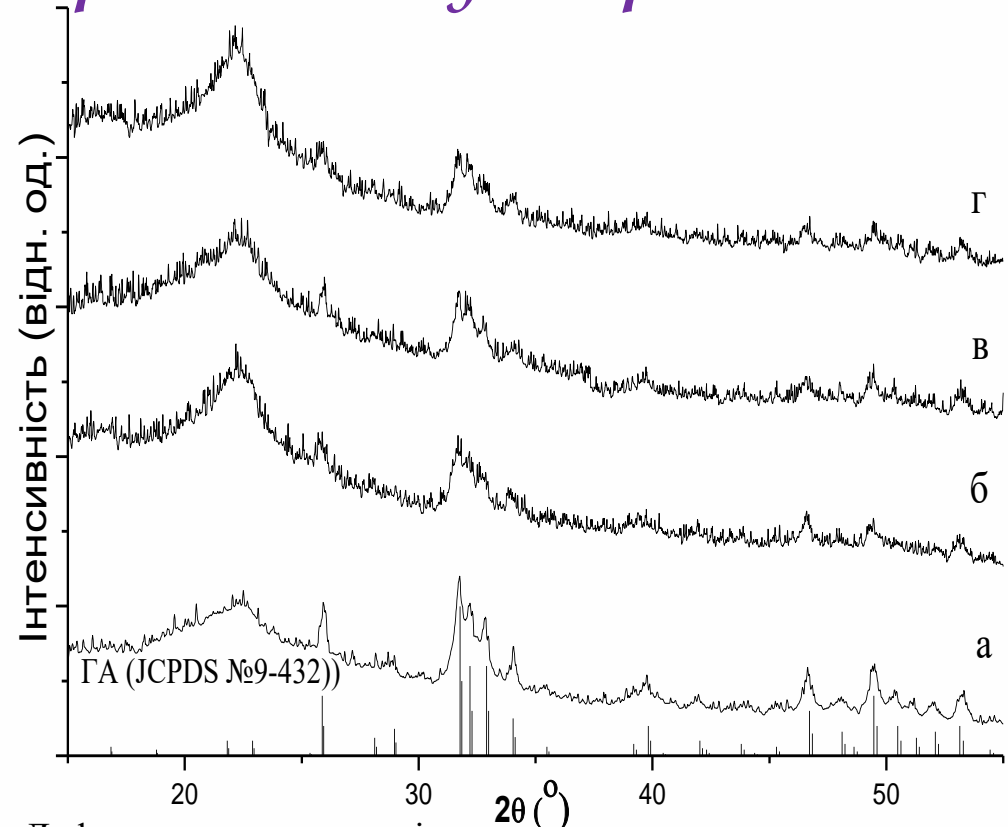
Мікрофотографії морфології (A) Ti-6Al-4V-субстрату, обробленого H_2O_2 , після осадження покриття ГА методом термодепозиції: (C) загальний вигляд покриття за збільшення, (B), (D) у порі, (E, F) на рівній поверхні.

Фазовий склад покриттів, одержаних методом термодепозиції на хімічно-оброблених субстратах

Як бачимо з дифрактограм (рис.), 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 разі відбувається більш швидке формування покриття.

Під час швидкого осадження недостатньо часу для поступового росту кристалів ГА.

Ось чому покриття на оброблених субстратах є більш аморфними, а піки апатиту мають меншу інтенсивність.



Дифрактограми покриттів, отриманих методом термодепозиції

($t_{\text{субстр}} = 105 \text{ }^\circ\text{C}$, $\text{pH} = 6,5$, осадження – 2 години) на:

а) необробленій поверхні Ti-6Al-4V-субстрату; поверхнях, що оброблені; б) NaOH; в) HF; г) H₂O₂.

Розчинності отриманих покриттів у рідинах, що імітують мінеральний склад плазми крові

Кожен субстрат із покриттям занурювали в 50 мл розчину SBF на визначені проміжки часу. Розчин оновлювали щодня; після експерименту зразки промивали дистильованою водою та висушували за t 100 °С.

Результати дослідження фазового складу показали, що інтенсивність піків, які відповідають ГА із зануренням у розчин SBF, зростає. Це пов'язано з тим, що із зростанням часу занурення зростає кристалічність отриманих покриттів. Завдяки збільшенню кристалічності покриттів зменшується їхня 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. Якщо $c > c_{\infty}$, напрям реакції змінюється, і переважає процес осадження. На ранніх стадіях на розчинність значною мірою впливає розмір кристалітів.

Зразки покриттів гідроксиапатиту на титанових субстратах, отриманих методом термодепозиції, були занурені в розчин, мінеральний склад якого ідентичний плазмі крові (SBF) (табл.).

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	HCl	40 см ³ (1 кмоль/м ³)
7	CaCl ₂	0,278 г
8	Na ₂ SO ₄	0,071 г
9	*(CH ₂ OH) ₃ CNH ₂	6,057 г
10	HCl	Необхідна кількість для регулювання pH

де * трис-(гідроксиметил)-амінометан (трис-буфер)

Кінетика розчинення ГА

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 час; n – порядок реакції. На початку реакції відмінністю між різними покриттями в параметрах $(c_{\infty} - c)$ можна знехтувати.

У цьому разі у найбільшій вплив на розчинність має питома поверхня. Розчинність зменшується в разі збільшення часу контакту поверхні з розчином. Питома поверхня покриття залежить від розміру кристалітів покриття: чим він більший, тим менше питома поверхня покриття. Існує співвідношення між ростом кристалів і 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.

Під час занурення покриттів у розчин SBF відбувається спочатку їхнє часткове розчинення (перший день) внаслідок невисокої концентрації компонентів у вихідному розчині, але з часом розчинність зменшується. Під час застосування 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. Після двох днів перебування субстрату з покриттям ГА в розчині SBF переважає процес осадження завдяки збільшенню кількості доступних центрів для зародкоутворення. Це можливо як завдяки частковому розчиненню покриття, так і завдяки попередньому проведенню термодепозиції і призводить до збільшення швидкості осадження і товщини утвореного покриття.

Поведінка покриттів у розчині, який моделює плазму крові

Поведінка покриттів ГА, отриманих на оброблених NaOH, H₂O₂ та HF-субстратах, *in vitro* оцінювалася в рідині, що моделює сольовий склад плазми крові.

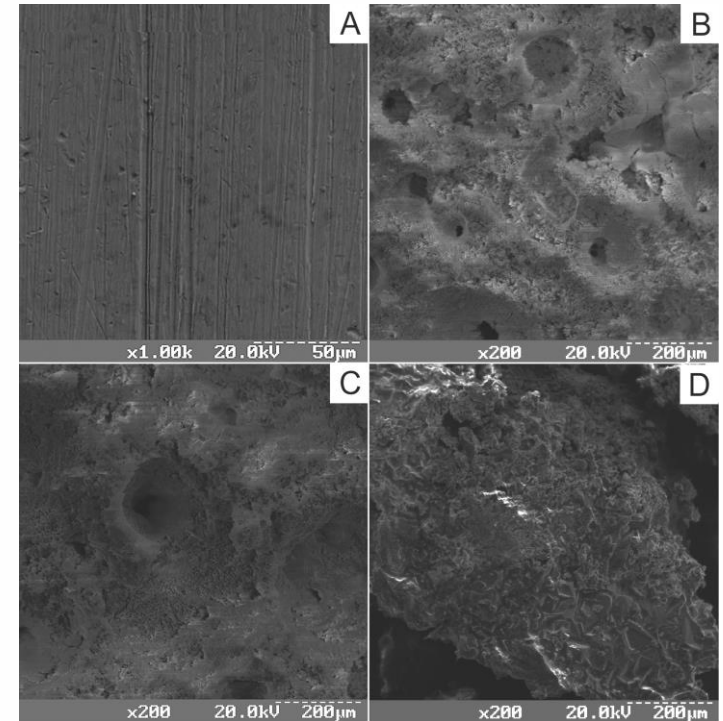
Такий експеримент дає змогу дослідити зміни структури та хімічного складу покриттів у модельних умовах живого організму.

Субстрати з покриттями ГА, а також субстрати без покриттів були занурені в 20 мл розчину SBF на 7 днів за 37 °С, розчин SBF оновлювали кожні 2 дні. Після цього зразки були промиті дистильованою водою та висушені за кімнатної температури впродовж 24 годин. Всі покриття, отримані методом термодепозиції на попередньо хімічно оброблених субстратах, мають на поверхні білий осад.

Дослідження морфології покриттів (рис.) виявили певну різницю в осадах, отриманих на субстратах, оброблених H₂O₂, NaOH та HF.

Щільний шар ГА був отриманий на поверхнях модифікованих H₂O₂ та NaOH. Оброблення субстрату за допомогою HF створює шорсткувату поверхню, на якій формується покриття з вираженою кристалічністю.

Отже, результати досліджень показали, що внаслідок хімічного оброблення титанових субстратів, яке проводиться перед термодепозицією, отримані покриття є більш однорідними, пористими (розмір пор – 25–150 мкм) і мають кращу адгезію.



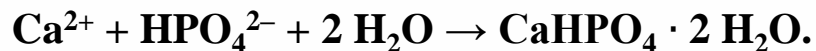
Морфологія поверхні необробленого Ti-6Al-4V-субстрату (A) та покриттів ГА, отриманих на оброблених H₂O₂ (B), NaOH (C) та HF-субстратах(D), після 7-денного занурення в розчин SBF

ПОКРИТТЯ НА І DCPD НА РЕО-СУБСТРАТАХ Тi6Al4V, ОТРИМАНИХ МЕТОДОМ TSD

Для отримання РЕО субстрат Ti6Al4V протравлюють у суміші 1М HF і 4М H₂SO₄ з подальшим анодуванням упродовж 5 хвилин у 0,1 М Ca(H₂PO₂)₂ за 300 В і густини струму 100 мА/см². Як анод використовували сплав Ti, а як катод – сітку титану.

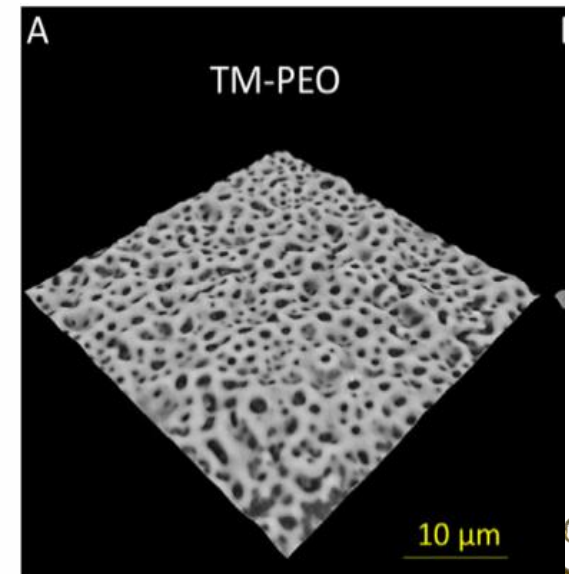
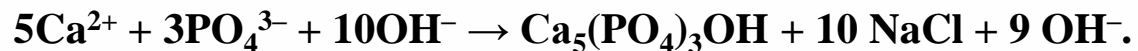
Осадження DCPD проводили на попередньо обробленому РЕО-субстраті методом TSD з 200 мл розчину, що містить 0,01М CaCl₂ та 0,006 М H₃PO₄ за рН 6,52 за 80 °С.

Формування DCPD



Покриття НА наносили вищеописаним способом, але субстрат нагрівали до 140 °С.

Формування НА



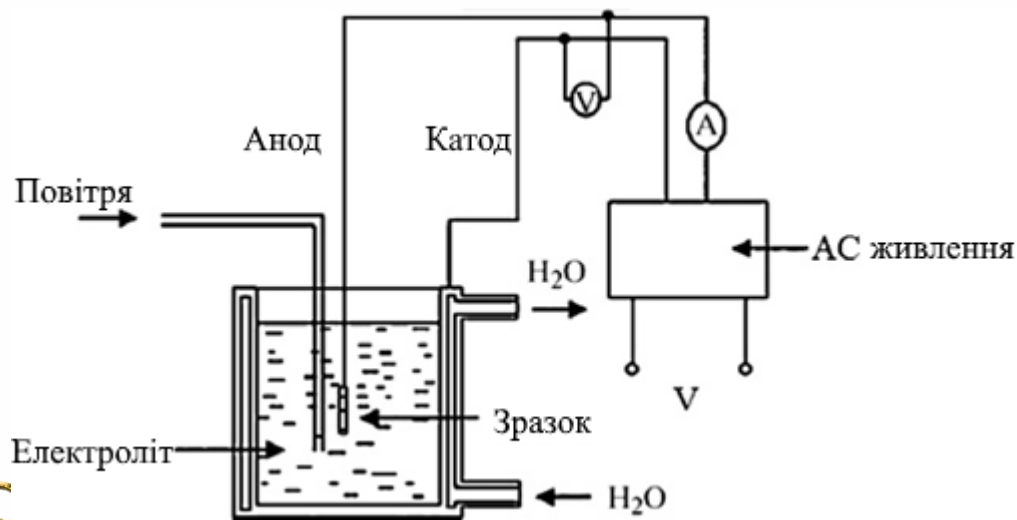
Плазмове електролітичне окиснення (PEO)

Плазмове електролітичне окиснення (PEO), також відоме як мікроаркоокиснення (MAO), є електрохімічним процесом оброблення поверхні для отримання оксидних покриттів на металах.

Він аналогічний анодуванню, але використовує більш високі потенціали, так що відбуваються розряди, а отримана плазма змінює структуру оксидного шару.

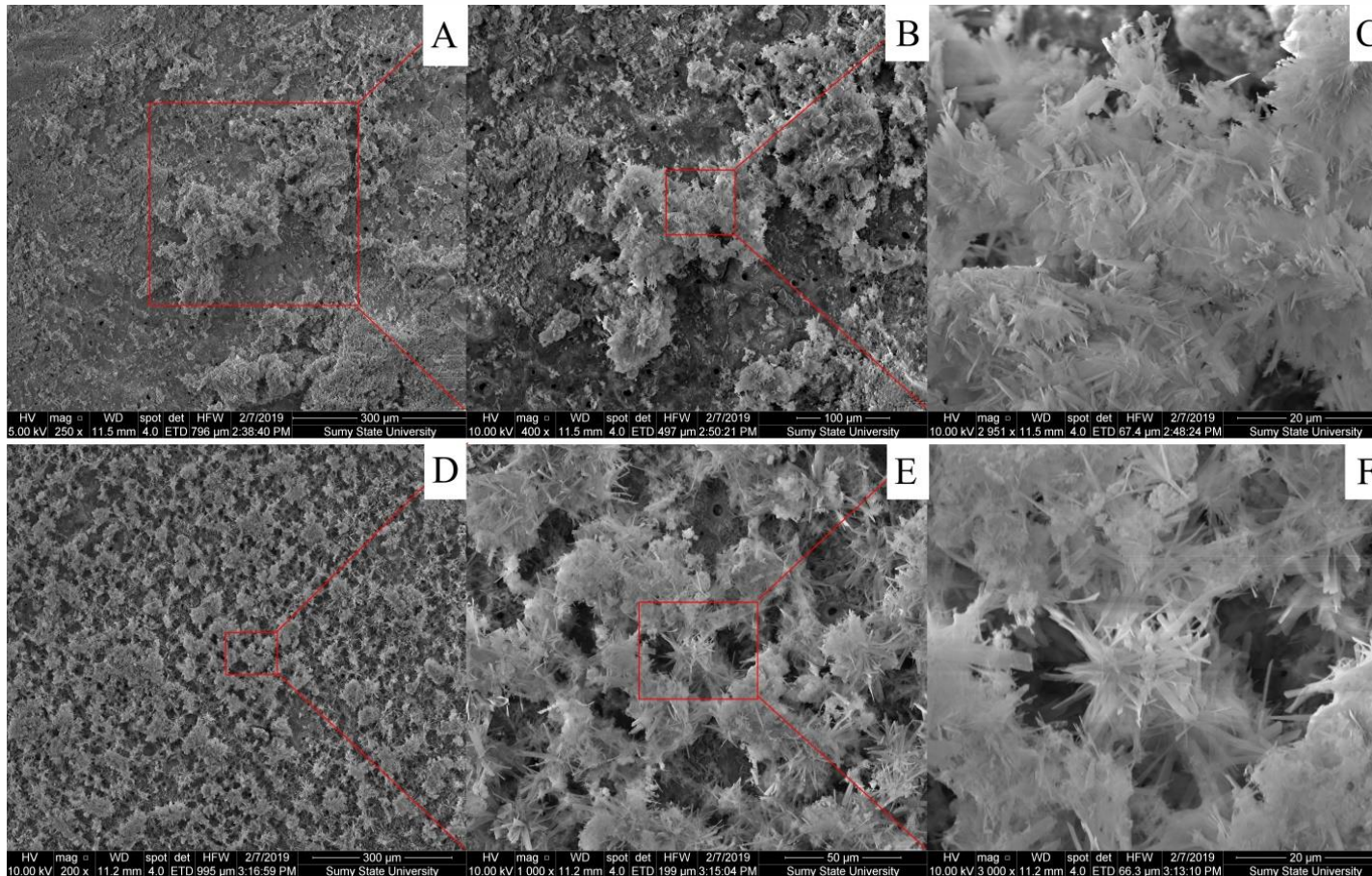
Цей процес можна використовувати для вирощування товстих (десятки або сотні мікрметрів), переважно кристалічних, оксидних покриттів на таких металах, як алюміній, магній і титан.

Оскільки вони можуть мати високу твердість і безперервний бар'єр, ці покриття можуть забезпечити захист від зношення, корозії або тепла, а також електричної ізоляції.



Схематичне подання PEO-установки.
S. R. Paital, N. B. Dahotre, Mater. Sci.
Eng. R 6 (2009) 1–70.

SEM-дослідження

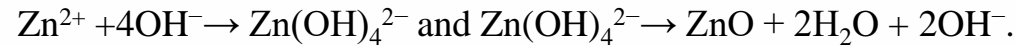


Пористі морфології характерні для обох покриттів із голкоподібними кристалітами та їх середнім розміром близько 25 нм.

SEM-зображення поверхні оброблених РЕО-субстратів Ті6Аl4V: (А, В, С) – покриті НА; (D, E, F) – покриті DCPD при різному збільшенні

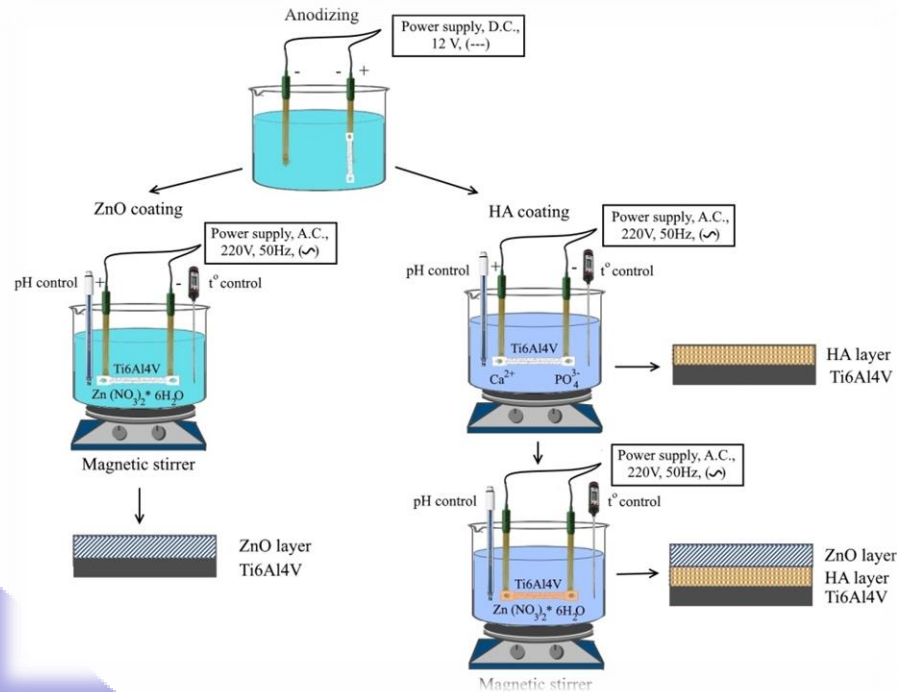
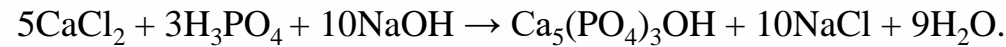
ZNO-ПОКРИТТЯ НА ПІДКЛАДЦІ ТІ6АІ4V

Формування наночастинок ZnO в розчині відбувається за такою хімічною реакцією [Zhang 2007]:

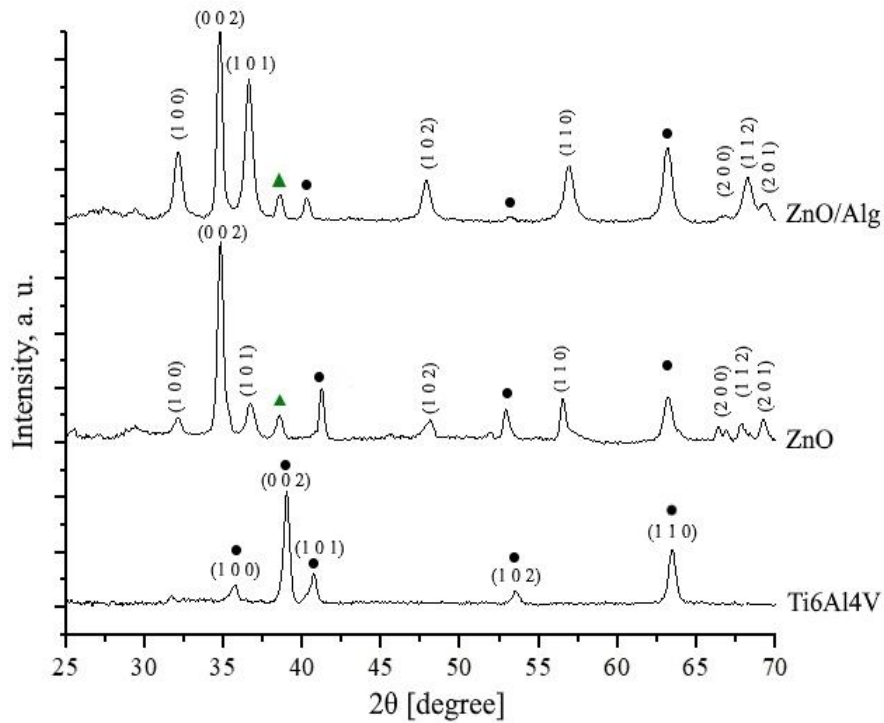


Покриття ZnO на підкладці Ti6Al4V осаджували з альгінатного середовища, використовуючи техніку TSD.

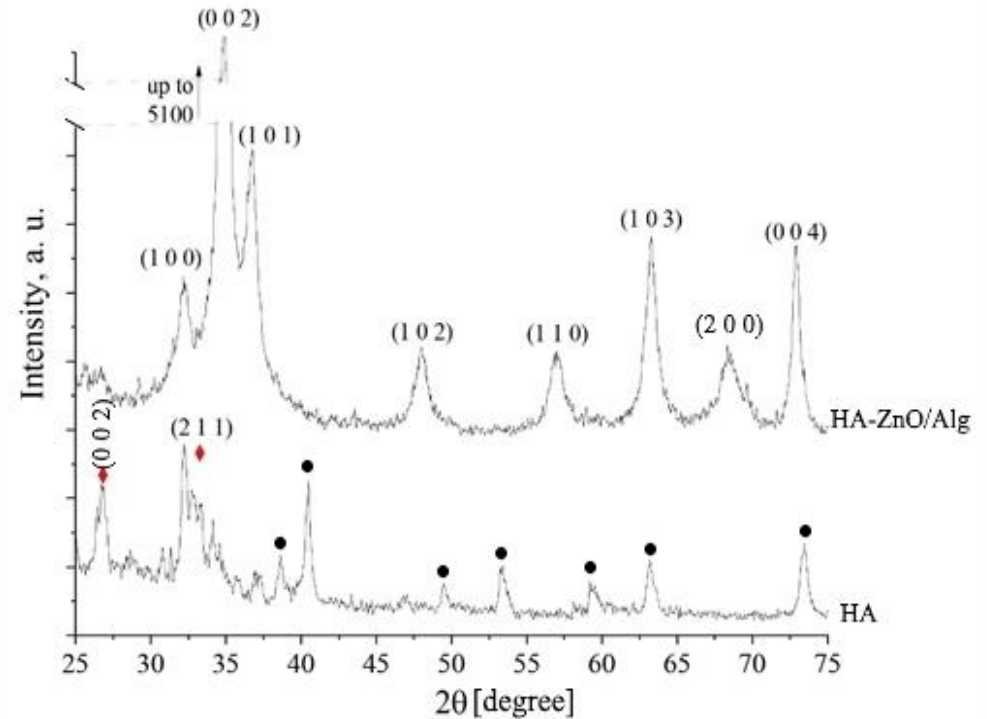
Осадження гідроксиапатиту проводили на титановому субстраті методом TSD із 200 мл розчину, що містить 0,01 M CaCl₂ та 0,006 M H₃PO₄.



SEM-дослідження



Спектри зразків: анодований субстрат титану, ZnO і ZnO/Alg. Піки TiO_2 підкладки позначені ●; піки оксиду титану Ti_3O_5 позначені ▲; піки, що належать до ZnO, позначені індексами Міллера.



Покриття HA: (0 0 2) та (2 1 1) лінії є основними піками HA, позначеними ◆, піки TiO_2 підкладки позначені ●. Двошарове покриття HA-ZnO/Alg з ZnO/Alg у вигляді верхнього шару: піки ZnO позначені індексами Міллера.

Материнський розчин значно впливає на формування покриттів, які відрізняються своєю морфологією.

За відсутності альгінату утворюються сферичні частинки з квітоподібними вкрапленнями, тоді як із полімерного розчину одержують одиничні тетраєдрокристали.

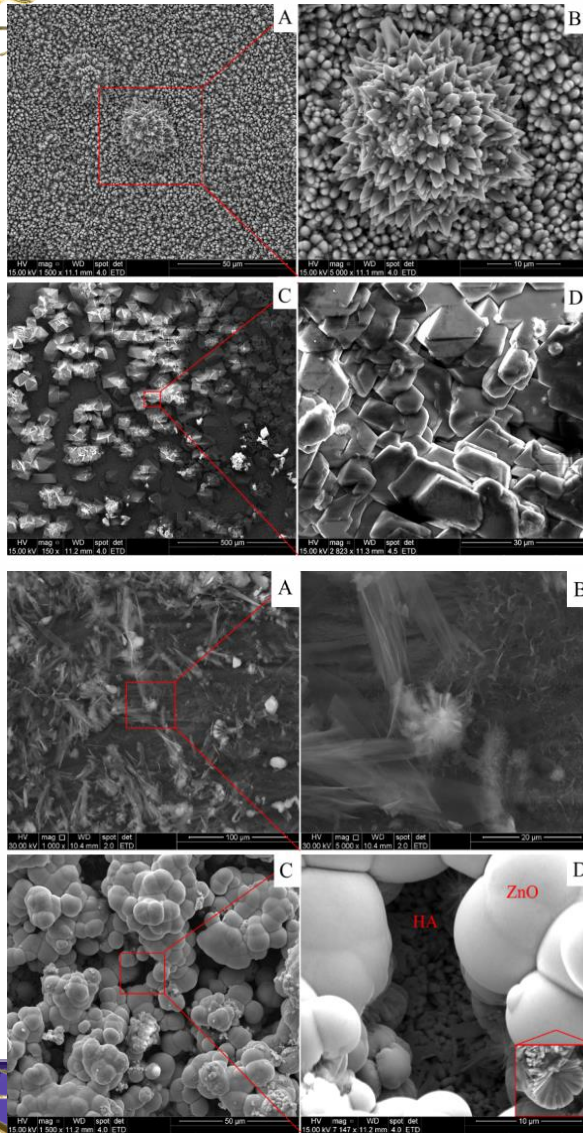
Товщина покриття ZnO становить 180 мкм, тоді як товщина покриття ZnO/Alg – 600 мкм.

Морфологія поверхні покриттів, отриманих методом TSD на титановій підкладці: (A), (B) – ZnO за різних збільшень; (C), (D) – ZnO/Alg за різних збільшень.

Частинки ZnO мають гранулярну форму зі складною внутрішньою структурою.

Середня швидкість осадження ZnO з альгінатного розчину становить 30 мкм/хв, товщина покриття HA-ZnO/Alg – 600 мкм.

Морфологія покриттів отриманих методом TSD: (A), (B) – покриття HA за різних збільшень; (C), (D) – нанесення шару HA-ZnO/Alg покриття: верхній шар ZnO на ГК за різного збільшення.

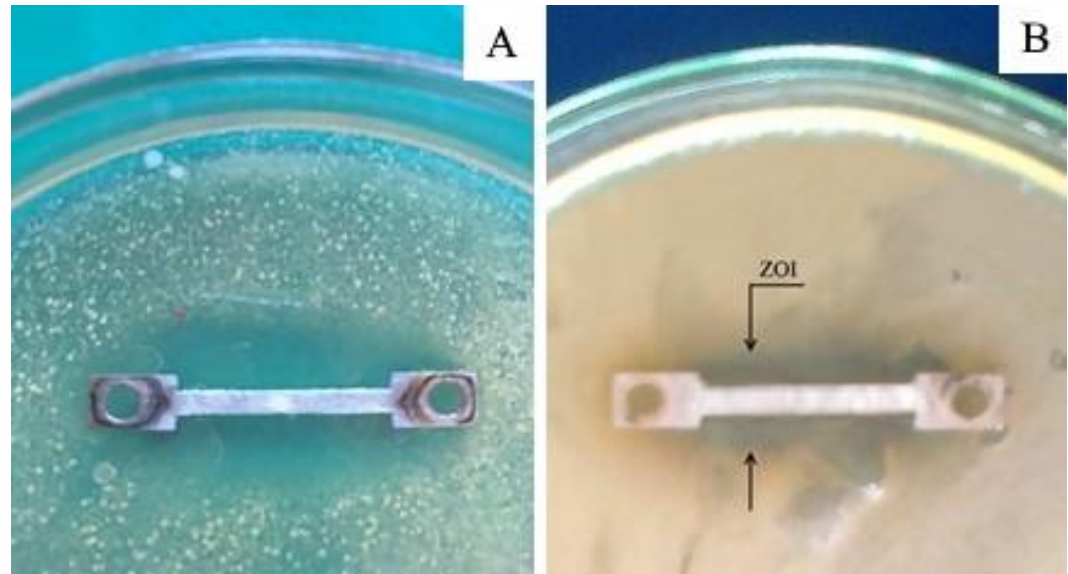


Антимікробні властивості

Антибактеріальну активність покриття ZnO/Alg досліджували проти грамнегативних *E. coli* та грампозитивних бактерій *S. aureus*.

Покриття ZnO демонструє зони інгібування росту навколо покритих субстратів приблизно 16 мм для *S. aureus* і 20 мм для *E. coli*.

Отримані покриття є перспективними для медичних імплантатів на основі титану та його сплавів завдяки їх антибактеріальним властивостям.



Тест-штами мікроорганізмів	Зона інгібування росту (мм) за допомогою модифікації агар дифузійного методу
	ZnO
<i>S. aureus</i> ATCC 25923	16,0 ± 1,33
<i>E. coli</i> ATCC 25922	20,0 ± 0,66

$p \leq 0,05$

ОСТЕОКОНДУКТИВНІСТЬ ПОКРИТТІВ

(Kensuke Kuroda and Masazumi Okido,
Bioinorganic Chemistry and Applications Volume 2012)

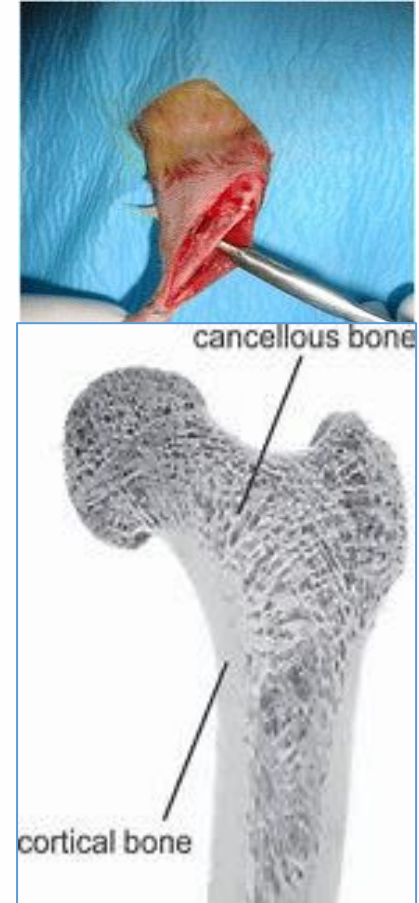
Досліджено формування покриттів на титанових підкладках методом термічного субстрату (ТСМ) і проведено *in vivo* оцінювання (НА)/колагенових і НА/денатурованих колагенових (желатинових) композитів.

Експерименти з покриттям проводили за температури 40–140 °С та рН 8 упродовж 15 або 30 хв. Стрижень з покриттям був імплантований на гомілкові кістки 10-тижневого самця щура, а титановий стрижень без покриття використовували як контроль. Конструкти були вилучені після 14d після імплантації та досліджені на наявність нових кісткових тканин і на відповідь тканин у скакальній і кортикальній частинах кістки відповідно.

НА/желатинові композитні покриття, покриті при > 60 °С, показали незначне поліпшення остеопровідності кістки. На відміну від цього, не спостерігалось поліпшення відновлення кістки порівняно з НА, у якому не було желатину.

Однак композити НА/колагену демонстрували високу остеопровідність у ділянці кіркової кістки, і вона зростала зі збільшенням вмісту колагену в покриттях.

Така ж сама тенденція виявилася і в анульованій кістковій частині. Однак занадто високий вміст колагену (40 мас. %) у покриттях спричинив очевидний негативний остеопровідний вплив.

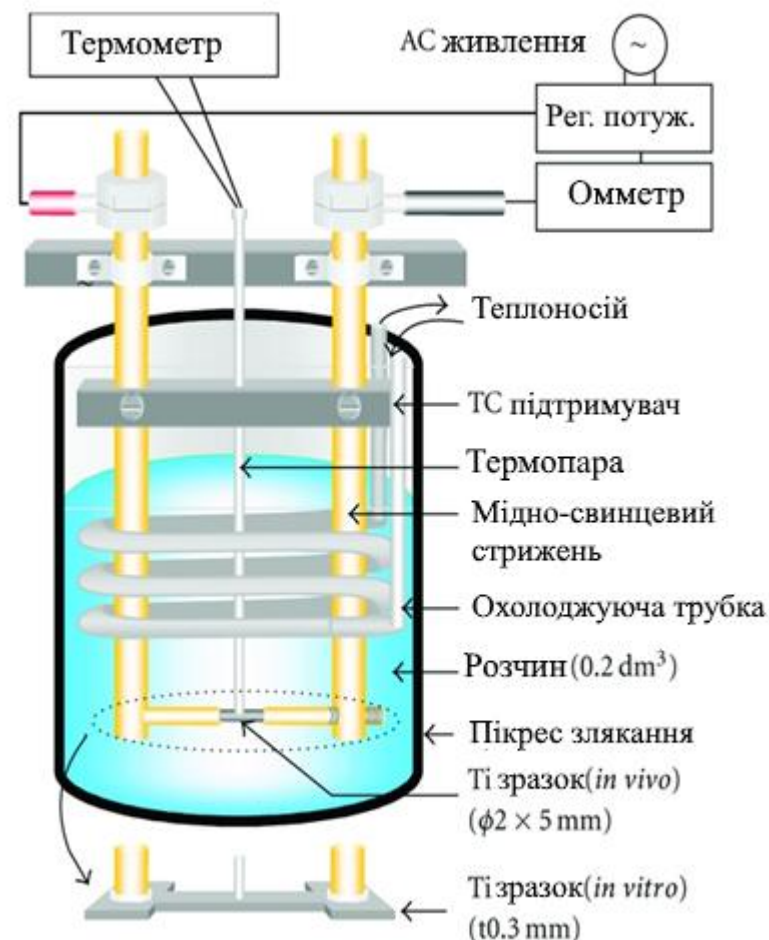


Експериментальна установка

Використовуваний водний розчин складався з 0,3 мМ $\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$, 0,7 мМ CaCl_2 та 432 мг/дм³ кислоторозчинного колагену (тип I), отриманого з телят (Nitta Gelatin Inc.), де одиницею 'М' позначається моль дм⁻³. РН розчину доводять до рН = 8 додаванням водного розчину NaOH, після цього розчин трохи помутнів через гелеутворення колажу.

До проведення експериментів із нанесенням покриття чисті титанові стрижні (2 мм, l = 5 мм) та пластини (товщина = 0,3 мм) шліфували шліфувальним папером SiC (сітка № 400). Зразки розміщували між мідними електродами, занурювали в 0,2 дм³ водного розчину і струшували, щоб вивільнити будь-які повітряні бульбашки, які могли прилипнути до їх поверхні.

Під час нагрівання до зразків була застосована ультразвукова хвиля 100 кГц, яка прискорювала зародження НАр.



Кількісний аналіз колагену/желатину в покриттях

Вміст колагену або денатурованого колагену в композитних покриттях аналізували за допомогою кулометричного методу (куломатичний «С»).

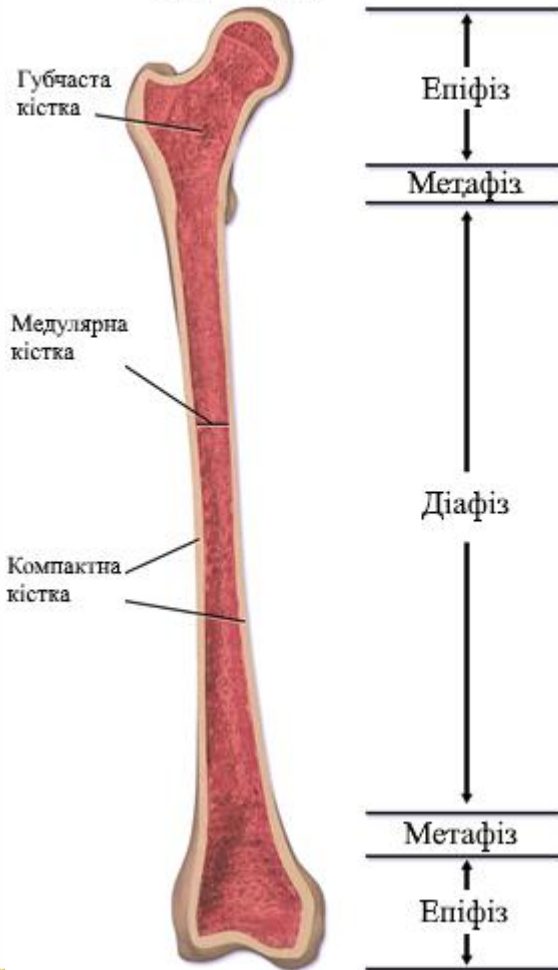
Кількісний аналіз колагену або денатурованого колагену в покриттях був проведений після зберігання у вакуумному ексикаторі впродовж > 48 годин, і було підтверджено, що маса зразків залишалася постійною, оскільки композитні плівки мали вимірювану вологу.

Зразки з покриттям (тобто титанові субстрати з покриттям) поміщали на мюллітний човен і прожарювали за температури $600\text{ }^{\circ}\text{C}$ в атмосфері O_2 впродовж 4 хв. Виділений CO_2 поглинався у водному розчині, що містив перхлорат барію, а кількість поглиненого CO_2 аналізували кулометрично.

Вміст колагену або денатурованого колагену в покритті розраховували з вмісту вуглецю.

In vivo дослідження

Структура кістки



Перед операцією всі імплантати очищали в дистильованій воді та занурювали в розчин хлоргексидину глюконату. Однак їх не стерилізували в паровому автоклаві, щоб запобігти денатурації колагену і розчиненню желатину.

Зразки були імплантовані в тибіальний метафіз щурів. Отвір, який не доходив до задньої частини кістки, був створений за допомогою обертового свердла з низькою швидкістю. Згодом імплантати вставляли в ці отвори, а потім підшкірну клітковину та шкіру зашивали та стерилізували.

Імплантати з навколишньою тканиною були вилучені після 14 днів.

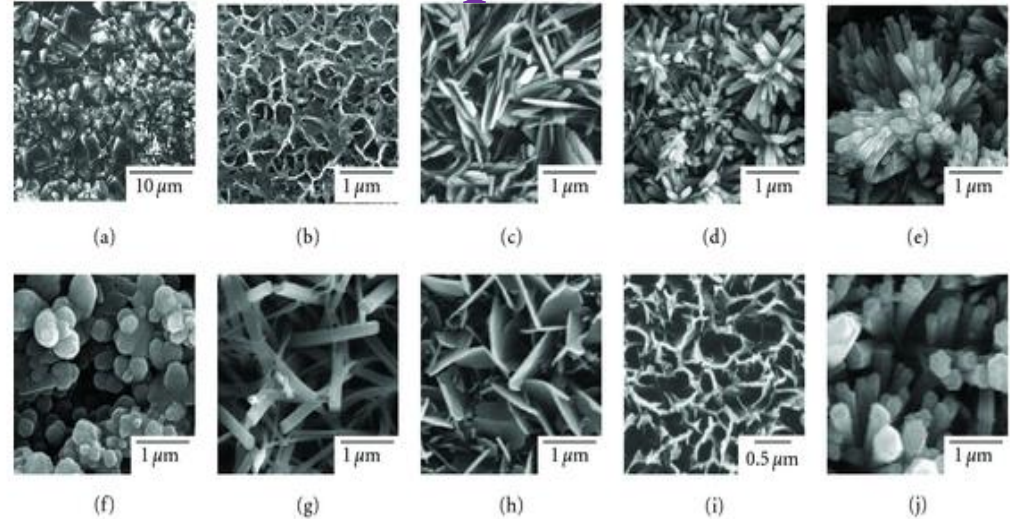
Зразки фільтрували в 10 % нейтральному буферному розчині формаліну, зневоднювали в градуйованому ряді етанолу та вкладали в метилметакрилат. Після полімеризації кожен блок імплантатів розрізали на зрізи товщиною 20 мм. Потім ці ділянки фарбували толуїдиновим синім кольором.

ГА/колаген- і ГА/желатин-компонитні покриття

Осад за рН = 4,0 (рис.) накопичувався і був визначений як ДСРА, яка є стабільною сполукою.

З іншого боку, у розчині за рН = 8,0 осад складався з НА (рис. (b)–(d)).

Морфологія поверхні осажденного НА сильно залежить від температури покриття: низька температура (40 °С) дала сітчастий НА (рис. (б)); висока температура (140 °С) дала НА голчастого типу (рис. (d)); середня температура (60 °С) дала НА пластинчастого типу (рис. (c)).



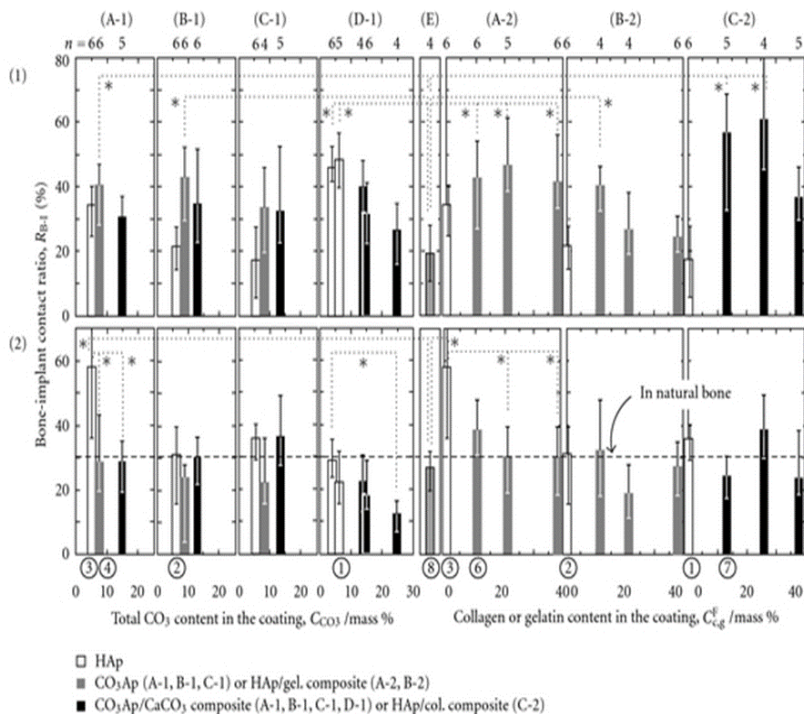
Number of comp.	Technique	Conditions (CC: CaCl ₂ , CP: Ca(H ₂ PO ₄) ₂)			Fig.	
		pH	Temperature	Time		
(a) DCPA		pH 4	150°C	15 min	—	
(b) Net		0.7 mM CC	40°C	30 min	①	
(c) Plate		0.3 mM CP	60°C		②	
(d) Needle	Thermal substrate				③	
(e) CO ₃ Ap	Needle	0.7 mM CC	0.5 mM NaHCO ₃	140°C	15 min	④
(f) CO ₃ Ap	Spherical	0.3 mM CP	10 mM NaHCO ₃			⑤
(g) HA/gel.	Needle	pH 8	72 mg L ⁻¹ col.			⑥
(h) HA/col.	Plate		(Type I)	40°C	30 min	⑦
(i) Net	Cathodic electrolysis	7 mM CC	6 mass% H ₂ O ₂	35°C	60 min	—
(j) Needle		3 mM CP	-0.756 V versus Ag/AgCl			—
(j)		pH 5.5	-1.1 V versus Ag/AgCl	120°C	30 min	—
(k) Control	As polished	No. 400 SiC				⑧

SEM-фотографії поверхні зразків, оброблених різними методами

Визначення остеокондуктивності

Співвідношення контакту кісткового імплантату, RB-I як остеопровідний індекс, заснований на спостереженні тканини тіла на імплантатах. Кістково-імплантаційний контакт визначався лінійним вимірюванням прямого контакту кістки з поверхнею імплантата. Суму довжини кісткового утворення на поверхні імплантата вимірювали і виражали у відсотках від загальної довжини імплантата (відношення контакту кісткового імплантата) у губчастій кістці та кортикальних частинах кісток.

$$RB-I (\%) = (\text{сума довжини сформованої кістки на поверхні імплантату} / \text{загальна довжина імплантата}) \cdot 100.$$



На рисунку показано співвідношення контакту кісткового імплантата, RB-I, зразків, покритих у різних умовах, зазначених раніше та класифікованих на основі чотирьох морфологій поверхні: (A) голчасті; (B) пластинчасті; (C) сітчасті та (D) сфероподібні.

Потім зразки порівнюють із контрольним імплантатом ((E) без покриття Ti).

Зразки розрізняють за кольором залежно від того, чи містить покриття $CaCO_3$ і колаген або желатин (білий: HAp; сірий: $CO_3 - Ap$ або HA/желатин; чорний: $CO_3 - Ap/CaCO_3$ або HA/колаген).

RB-I для різних зразків із поверхневим покриттям (великоомілкова кістка щурів, 14 днів). * $P < 0,05$ (1) кортикальна частина кістки; (2) губчаста кісткова частина. (A) голчасті; (B) пластинчасті; (C) сітчасті; (D) сферичні; (E) як поліровані Ti.

Аналіз

Значення RB-I зразків із покриттям НА (біла смужка) таке ж саме або вище, ніж у відшліфованого (E). Зокрема RB-I у губчастій кістковій частині є найвищим у зразку, покритому голчастою НАр (А-1).

Вплив різних морфологій поверхні на RB-I очевидний.

Невелика кількість CO_3 , що входить до $\text{CO}_3\text{-Ar}$, не впливає на остеопродність, а збільшена кількість CO_3 (>15 масових % $\text{CO}=\text{}$), зокрема вміст $\text{CO}_3\text{-Ar}/\text{CaCO}_3$, має негативний вплив (чорна смуга в (А-1), (В-1), (С-1) і (Д-1)).

Значення RB-I зразків із покриттям НА/желатином є таким же самим, як у НА (сірі та білі смуги в (А-2) та (В-2)), і ми не знайшли позитивного ефекту на остеопродність після додавання до НА желатину або будь-яких негативних впливів у межах використовуваного вмісту желатину.

У покриттях НА/колаген (С-2) поліпшувалася остеопродність, а максимум RB-I був отриманий, коли вміст колагену був таким самим, як у натуральної кістки.

Додавання занадто великої кількості колагену, що перевищує цю кількість вмісту колагену в природній кістці, гальмувало поліпшення остеопродності.

Висновки

Внутрішня частина людського тіла еквівалентна водному середовищу кімнатної температури, оскільки вміст води в організмі становить близько 60 %. Вважається, що гідроформований НА має більшу остеопровідність, ніж НА, синтезований за допомогою піропроцесу, оскільки синтезований НА у водному розчині за нейтрального рН і кімнатної температури подібний до утвореного в організмі.

Крім того, діоксид титану TiO_2 , якого не існує в організмі людини, є чудовою сполукою щодо остеопровідності.

Важливо дослідити та покращити остеопровідність таких речовин, як НА, TiO_2 та $CaTiO_3$. Потрібно звернути увагу на такі їх властивості, як шорсткість поверхні, кристалічність і корозійність, які впливають на остеопровідність.

Розроблення імплантатів із високою функціональністю є важливою проблемою, яку потрібно терміново вирішити, а не просто просуватися в медичних технологіях. Вважається, що ніщо не може конкурувати з такими імплантатами в процесі прогресу та розвитку окремих технологій.

Ми сподіваємося, що ці важливі проблеми можна буде розв'язати використовуючи поєднання нових біоактивних сполук (органічних і неорганічних) і методів нанесення покриттів.

ЛЕГОВАНІ ІОНАМИ AG + ГА-ХІТОЗАНОВІ ПОКРИТТЯ НА ТИТАНОВИХ ІМПЛАНТАТАХ

Визначення терміна «біосумісність» Європейським товариством біоматеріалів (1986): «властивість імплантату вступати в адекватну кількість реакцій із його конкретним застосуванням».

Чистий титан добре сприймається організмом, але не має механічного зв'язку з оточуючою тканиною. Найпростіше рішення – зробити металеву поверхню більш шорсткою.

Для поліпшення біологічної сумісності металевих імплантатів їх поверхні модифікуються функціональними покриттями, серед яких гідроксиапатит (ГА), переважно придатний для використання через його біологічні властивості, близькі до природних апатитових кісток.

Але існує ризик зараження та відторгнення після імплантації, для подолання цих проблем застосовують антибактеріальні метали або іони.

Властивості компонент покриттів

Гідроксиапатит (НА) та споріднені фосфати кальцію (ФК) вивчали десятиліттями для використання як біосумісних і біоактивних імплантаційних матеріалів, оскільки вони мають композиції, подібні до складу кісток.

Однак через погані механічні властивості біоматеріалів на основі гідроксиапатиту розроблення композитних покриттів, що поєднують НА з біополімерами, становить усе більший інтерес.

Також ми використовували іони срібла і фулерен C_{60} .

Іони срібла взаємодіють з аміногрупами білків бактерій, перетворюючи їх ДНК на конденсовану форму та спричиняючи бактеріальну смерть [A. Pawlik et al. *Electrochimica Acta* (2019)].

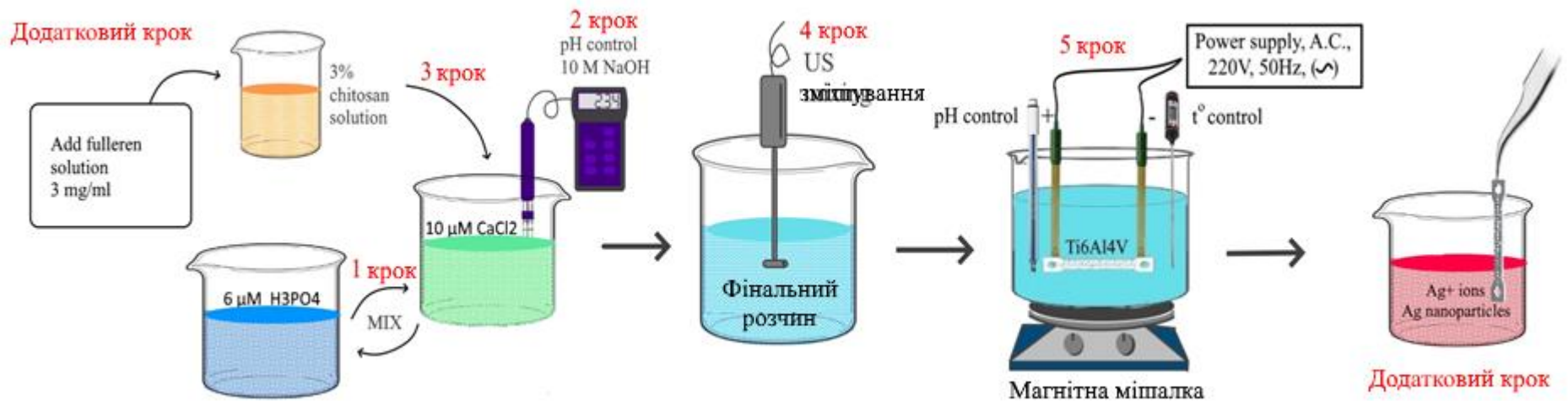
C_{60} є окиснювачем і може утворювати активні форми кисню [Gharbi et al., *Nano Letters* (2005)], має антиоксидантний потенціал для клітин імунної системи [Fortner et al., *Env. Sci. & Tech.* (2005)].

Технологія отримання покриттів

Гідроксиапатитні покриття на імплантатах на основі титану можуть утворюватися різними методами, такими як плазмовий спрей, золь-гель, електрофоретичне осадження (EPD) та температурне осадження субстрату (TSD).

Осадження проводили на титановій підкладці методом TSD із 200 мл розчину, що містить 0,01 M CaCl_2 та 0,006 M H_3PO_4 за pH 6,52.

Змінний струм пропускали через підкладку впродовж 30 хвилин, унаслідок цього субстрат нагрівався до 100 °С.



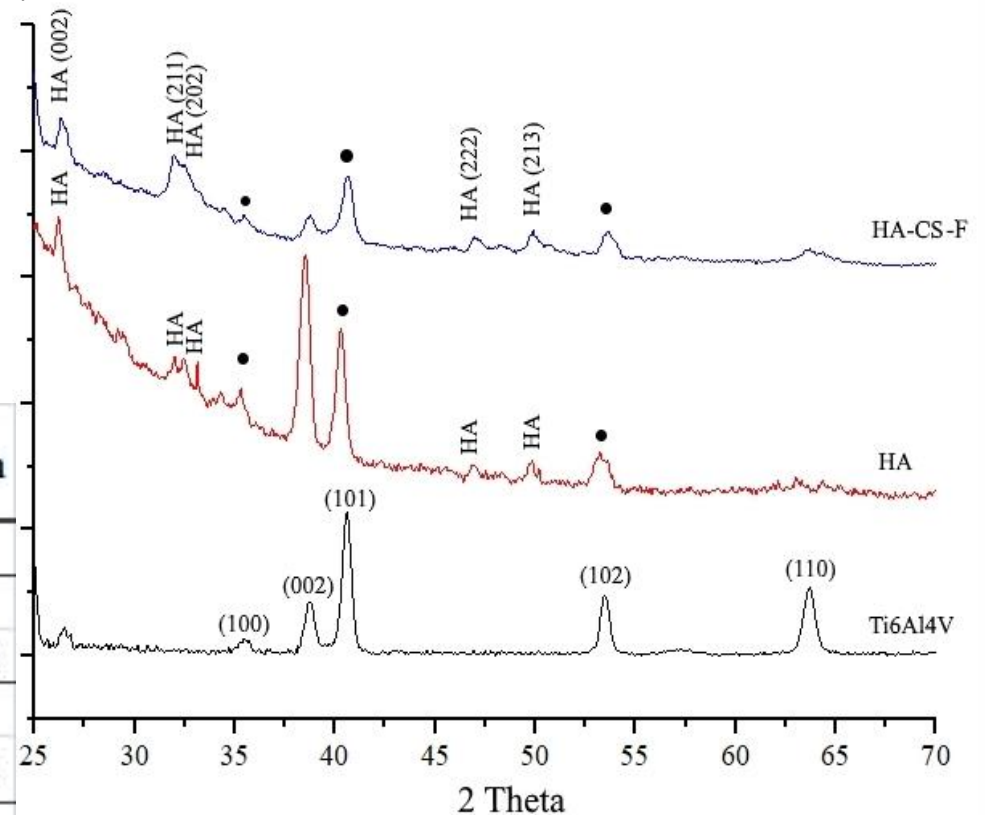
XRD аналіз отриманих покриттів

Покриття були отримані за однакових умов.

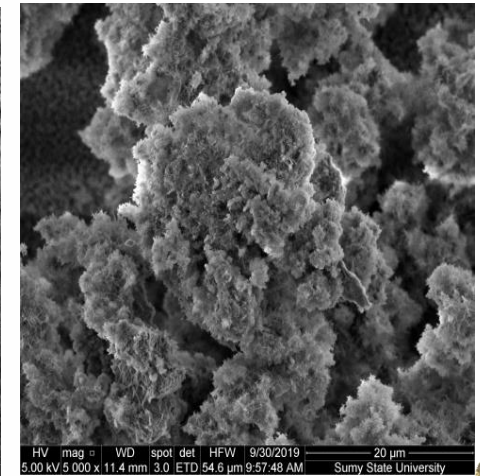
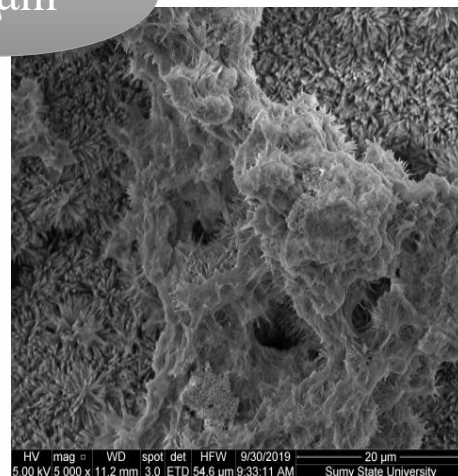
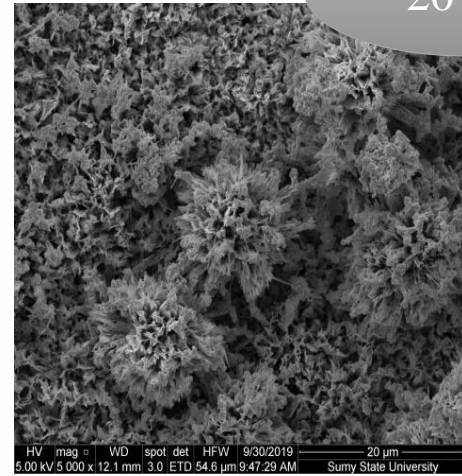
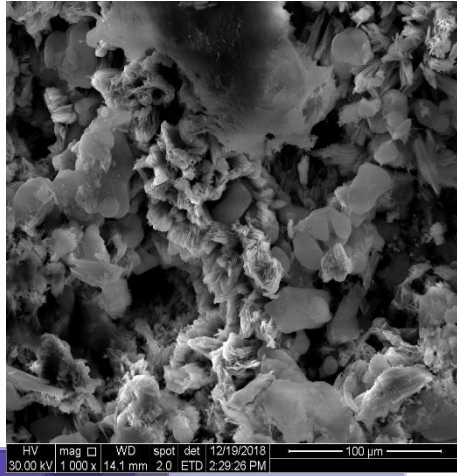
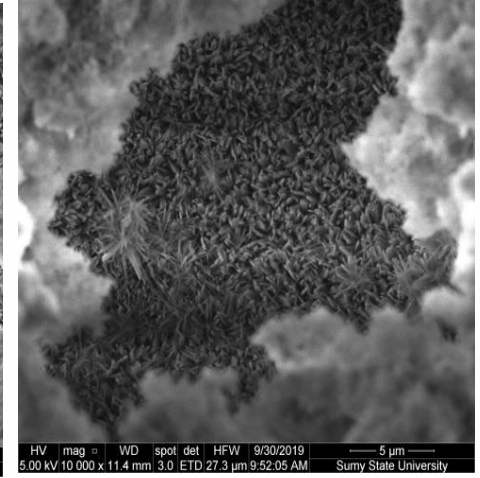
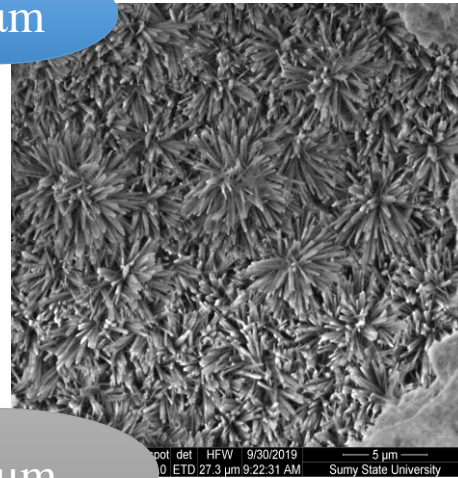
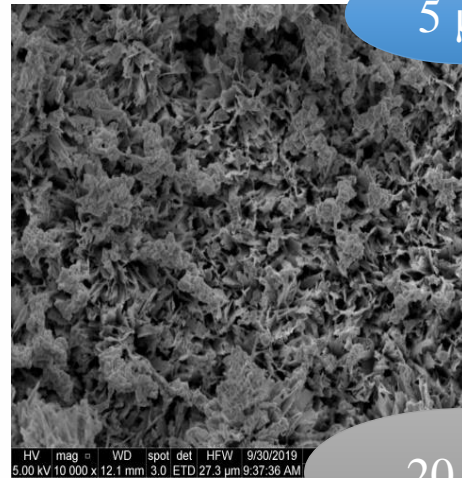
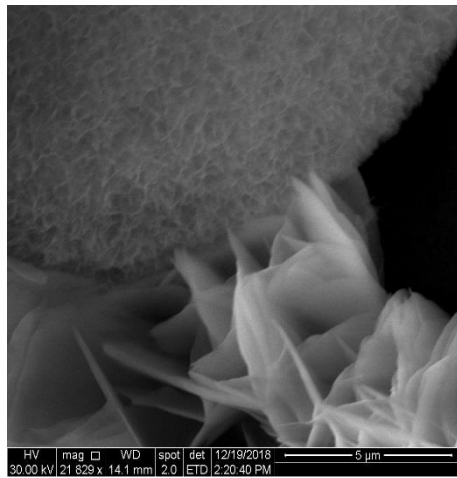
На слайді показані спектри зразків:

- чистої підкладки Ti;
- покриття HA;
- композитного покриття HA-CS;
- HA-CS_Full.

Sample	Phase	hkl(1)	hkl(2)	a, Å	c, Å	L, nm
Ti6Al4V	Ti	110	002	2,91	4,65	-
HA	Ti	110	002	2,941	4,662	
	HA	310	002	9,304	6,797	35,48
HA-CS	Ti	-	002	2,933	4,643	
	HA	310	002	9,188	6,709	34,64
HA-CS-F	Ti	-	002	2,923	4,652	
	HA	310	002	9,294	6,758	43,28



Морфологічні дослідження



HA-CS

HA-CS-Ag⁺

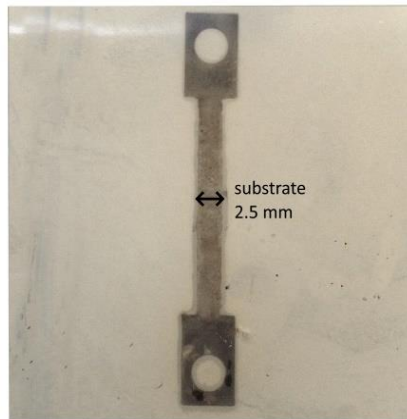
HA-CS-Agnano

HA-CS-Full

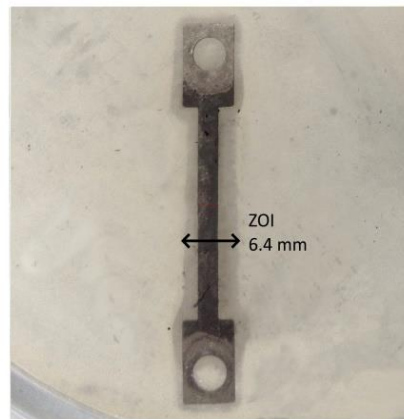
Антибактеріальні властивості покриттів

Модифікований диско-дифузійний метод був використаний для оцінювання антибактеріальної активності покриттів. Спосіб передбачає змочування субстратів фізіологічним розчином, розміщення зразка на інокульованих грампозитивними бактеріями *S. aureus* (ATCC 25923) агар із подальшою інкубацією впродовж 24 годин за 37 °С.

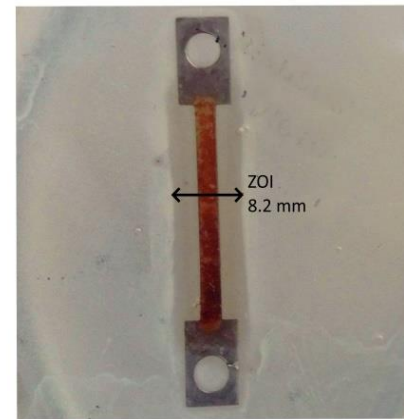
Точний антибактеріальний механізм металевих наночастинок все ще не завершений, запропоновано деякі особливі моменти, які передбачають утворення на поверхнях наночастинок видів реактивного кисню (ROS), що може спричинити загибель бактеріальної клітини.



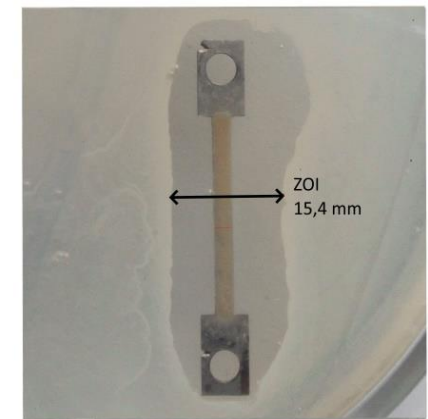
HA-CS



HA-CS-Ag+



HA-CS-Agnano

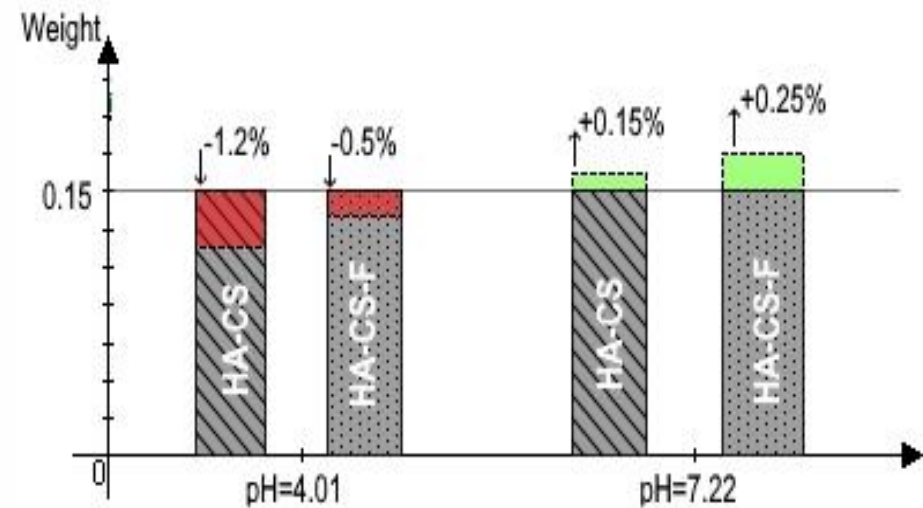
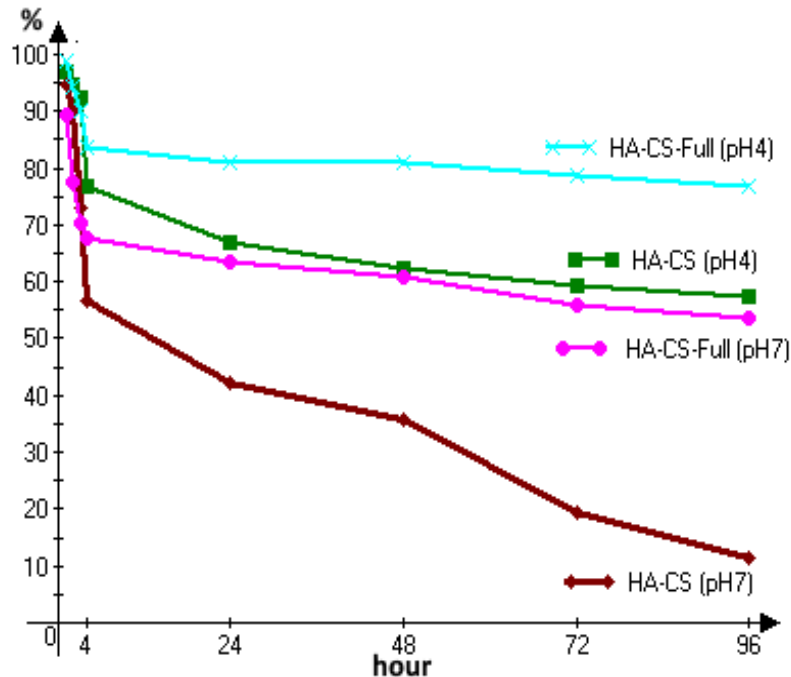


HA-CS-CHX

Хроматографічний аналіз вивільнення лікарського засобу

Фармацевтичний розчин диклофенаку з концентрацією 5 мг/мл як модельний препарат вводили в експериментальний субстрат за допомогою їх насичення впродовж 2 год.

Для тесту на вивільнення ліків кожний зразок поміщали в PBS (pH = 7,4 та 4,01) та інкубували за температури 37 °C з постійним перемішуванням. Потім аліквоти PBS брали з кожної дослідної пробірки щодня впродовж 4 днів. Однаковий об'єм свіжого PBS додавали назад для підтримання постійного об'єму розчину в пробірках.



Висновки

Додавання фулерену сприяє утворенню більш кристалічного НА за наявності хітозану, а також підвищує механічні властивості та адгезію.

Введення у структуру наночастинок фулерену та срібла підвищує щільність покриття, тоді як іони срібла роблять структуру пористою.

Іони та наночастинки срібла надають покриттям антибактеріальних властивостей щодо *S. aureus*.

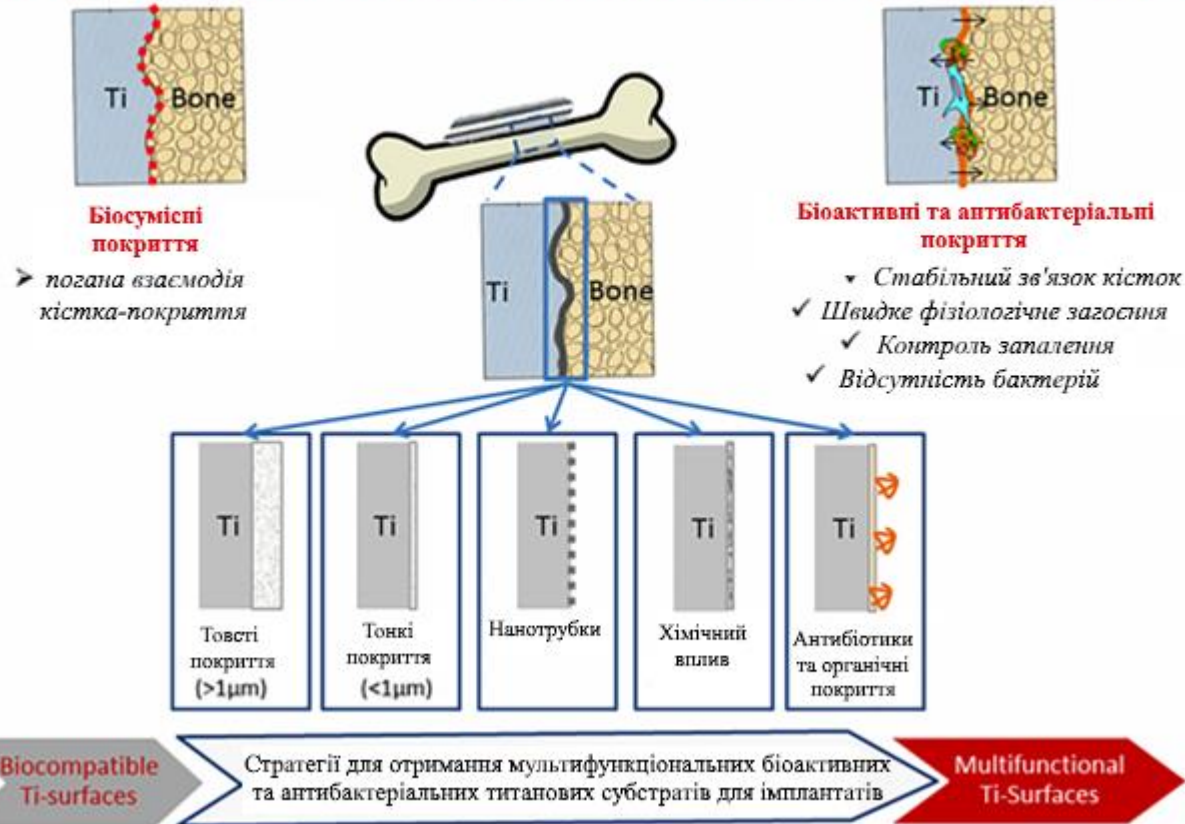
Доведено, що покриття на основі НА та хітозану можуть використовуватися як депо для затримання та вивільнення лікарських засобів.

Отримані покриття чутливі до рН. У кислому середовищі вивільнення лікарського препарату сповільнюється порівняно з нейтральним.

Додавання фулерену допомагає продовжити вивільнення лікарських засобів.

Стратегії отримання водночас біоактивних і антибактеріальних Ti-поверхонь

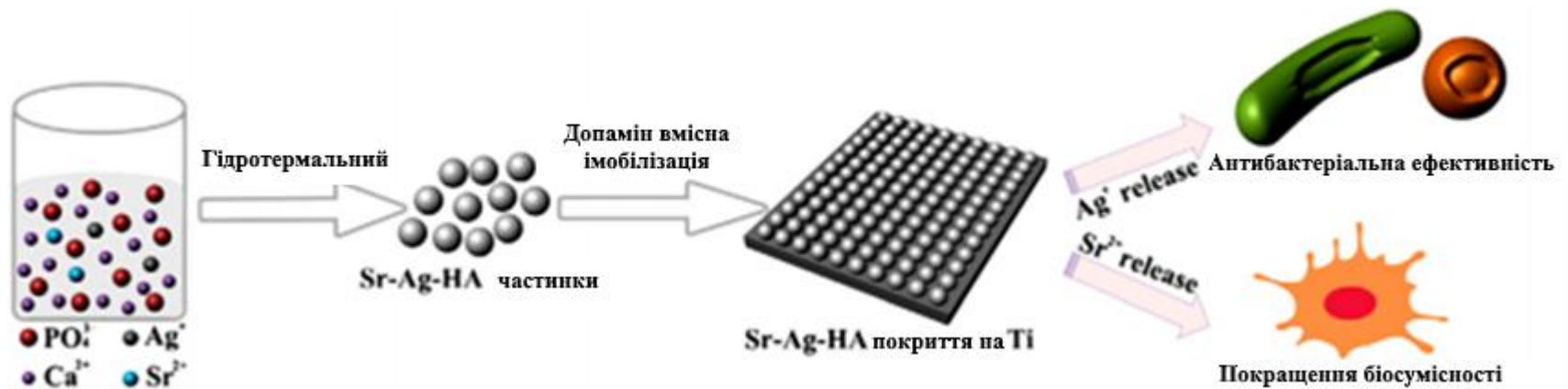
СТРАТЕГІЇ ДЛЯ БІОАКТИВНИХ ТА АНТИБАКТЕРІАЛЬНИХ ПОКРИТТІВ



S. Spriano et al., Acta Biomater. (2018)

Стратегія отримання неорганічних товстих покриттів

- Основні антибактеріальні металеві іони і НЧ: Ag, Cu, Zn, Se: ефект дії залежить від їх концентрації, а також одночасно з антибактеріальним ефектом проявляється і цитотоксична дія, особливо для Ag-легованої поверхні.
- Для подолання цього недоліку в товсте покриття ГА разом з Ag вносять Sr (останній підвищує життєздатність клітин і не гальмує дію Ag).



- *S. Spriano et al., Acta Biomater. (2018)*

Стратегія нанотрубок і наноструктур

Морфологія і шорсткість поверхні впливають на клітинну реакцію *in vitro* та *in vivo*.

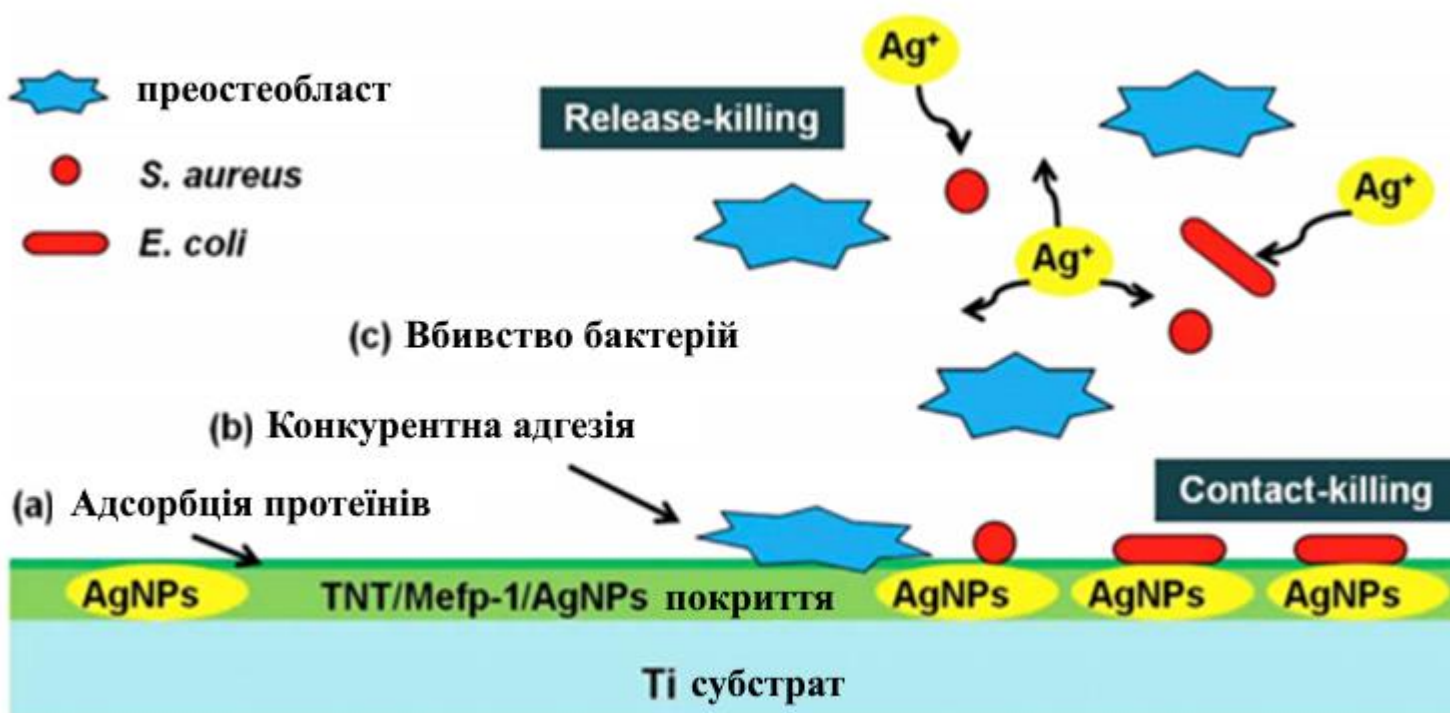
Наноструктура з'являється внаслідок електрохімічного окислення Ti-поверхні з утворенням наноямок або TiO₂ NTs (діаметр – 15–300 нм, довжина – декілька сотень нм).

Але ефект дії NTs важко передбачити; синергетична дія шорсткості, змочуваності і наноструктури визначають енергію поверхні, яка впливає на її взаємодію з остеобластами. Додаткове оброблення наноструктур (Ca, P) надає контролювальний вплив поверхні на взаємодії з клітинами (остеоінтеграція)

Антибактеріальні властивості також додаються завдяки пост-обробленню TiO₂ «нанотрубних» поверхонь; а саме – оздобленням TiO₂ НЧ (3–8 нм) зовнішньої поверхні і внутрішніх стінок TiO₂ NTs, отриманих на анодованих Ti-імплантатах [Liu et al., 2015]. Це також підвищує остеогенні функції стовбурових клітин.

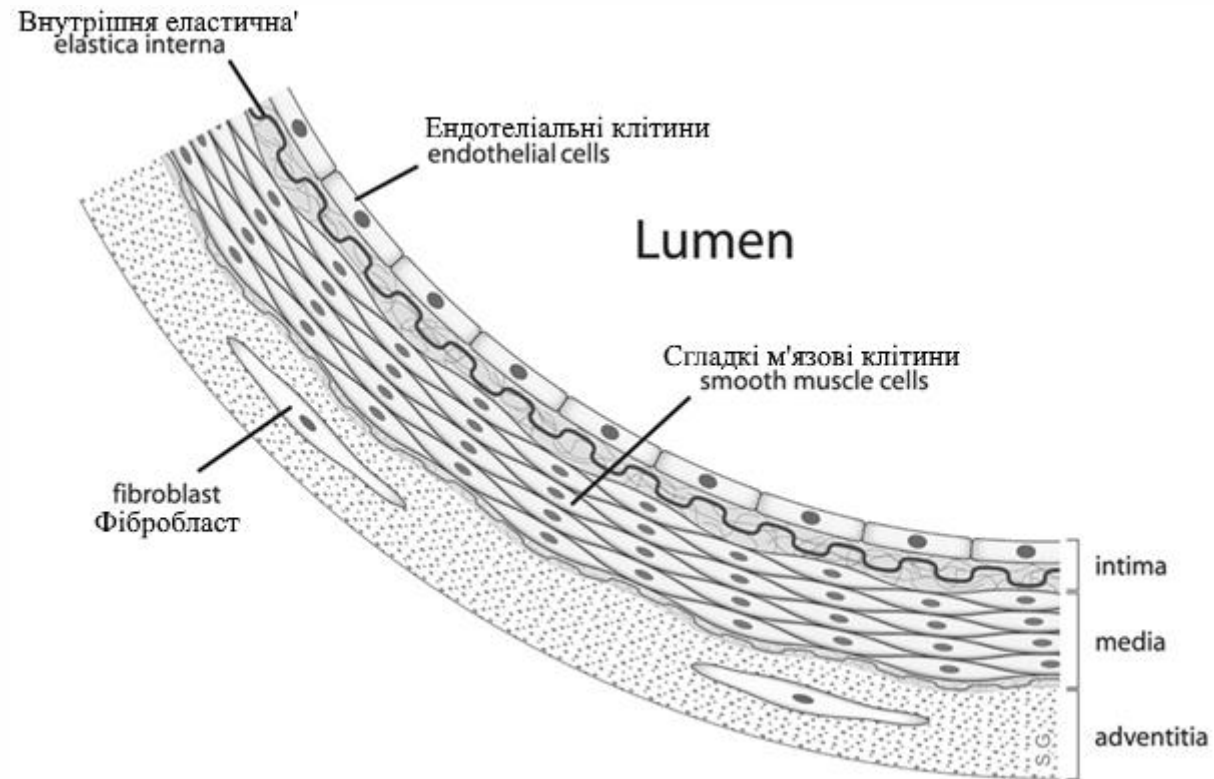
Протеїн/Ag-покриття на TiO_2 «нанотрубній» поверхні

Протеїн/Ag-покриття на TiO_2 «нанотрубній» поверхні демонструє ефективність порівняно з грампозитивними *S. Aureus* і грамнегативними *E. Coli* патогенами з привілейованою адгезією до остеобластів.



Серцево-судинне застосування

Наноструктурні поверхні підвищують проліферацію і рухливість ендотеліальних клітин, запобігають проліферації гладких судинних клітин (smooth muscle cells) і зменшують генну експресію, пов'язану з коагуляцією і запаленням цих двох типів клітин [L. Peng et al., 2010].



ЛАБОРАТОРНІ РОБОТИ

Лабораторна робота 1

Отримання та дослідження структури біоматеріалів (порошок, гідрогель) на основі гідроксиапатиту.

Лабораторна робота 2

Отримання та дослідження наноструктурованих біосумісних матеріалів на основі гідроксиапатиту та хітозану.

Лабораторна робота 3

Отримання та дослідження наноструктурованих біосумісних матеріалів на основі гідроксиапатиту та альгінату натрію.

Лабораторна робота 4

Нанесення наноструктурованих біосумісних покриттів на основі гідроксиапатиту на титановий субстрат методом термічної депозиції.

ПІСЛЯМОВА

Основна мета запропонованого навчального посібника «*Біоматеріали та покриття*» у вигляді лекцій-презентацій – це надання майбутнім біомедичним інженерам інформації про стан досліджень у сфері сучасних біоматеріалів і покриттів, зокрема, розробок у лабораторії «Біонаноккомпозит» СумДУ на основі CaPO_4 -структур і біополімерів. Прогрес у зазначеній сфері зумовлений успіхами з нанотехнологій, з одного боку, а з іншого – розробленням новітніх інструментальних методів аналізу (лекції 1, 2). Розвиток методів синтезу різних типів біоматеріалів неможливий без фундаментальних наук, таких як хімія твердих тіл, кристалографія, термодинаміка, кінетика реакцій, а також технологій їх отримання (лекція 3). Особливості властивостей композитних матеріалів на основі мінеральної основи кістки і біополімерів визначаються як ковалентними, так і нековалентними (фізичними) взаємодіями та процесами біомінералізації, які контролюються певними макроструктурами (лекції 4–6). Перспективним підходом щодо підвищення ефективності біоматеріалів і якості імплантатів є створення комбінованих імплантатів (метал (кераміка) + CaP-покриття) з використанням як фізичних технологій, так і біоміметичних для їх нанесення (лекції 7, 8). Природно, що в цьому короткому курсі лекцій не всі питання CaP-матеріалів висвітлені в повному обсязі. Зокрема це стосується брюшитових і монетитових CaPO_4 структур, які активно розробляються для їх клінічного використання [5]. Мало уваги приділено детальному описанню властивостей цих трьох основних CaPO_4 -структур (апатит, брюшит, монетит), зокрема, реологічним умовам поліпшення, їх схопленню та твердненню. Також мало уваги приділено одній із топових тем застосувань CaPO_4 -формувань, а саме їх використанню як носіїв лікарських засобів у зону імплантації. Ці та інші аспекти CaPO_4 -структур у значно більшому обсязі висвітлені в [5, 6].

Автор висловлює особливу вдячність аспірантці СумДУ М. О. Кумеді за увагу і допомогу в оформленні матеріалу посібника.

СПИСОК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

Alg – альгінат

CDHA, КДГА – кальцій-дефіцитний гідроксиапатит

CFU – колонієутворювальна одиниця

CVD – хімічне осадження парів

DCPA, ДКФА – дикальцій фосфат ангідрат, монетит

DCPD, ДКФД – дикальцій фосфат дигідрат, мінерал брушит

EDTA – етилендіамінтетраоцтова кислота

PEG – поліетиленгліколь

PVD – фізичне осадження парів

REM – растрова EM

TEM – електронна мікроскопія на просвіт

TSD – термічне осадження субстрату

XRD – рентгенівська дифракція

α -TCP, α -ТКФ – α -трикальцій фосфат

β -TCP, β -ТКФ – β -трикальцій фосфат

АпНК – апатитні нанокристали

АСР, АФК – аморфний ФК

АСС, АКК – аморфний карбонат кальцію

БМ – біоматеріали

ГА – гідроксиапатит

ЕК – елементарна комірка

ЗМ – зворотні міцели

КАМ – кістковий апатитний мінерал

КЗ – ковалентні зв'язки

КТ – кісткова тканина

КФ – кальцій фосфат

МСРМ – моногідрат дигідрофосфату кальцію

МТ – мінералізовані тканини

НЧ – наночастинки

ОС – остеокальцин

ОСР – октакальцій фосфат

ОФК – ортофосфат кальцію

ПР – плазмове розпилення

РЕО – плазмоелектролітичне окиснення

РП – рентгенівські промені

ТА – термічний аналіз

ТТ – тверда тканина

ХМ – хімічні методи

In vivo – у перекладі з латини – у живому; в науці означає, що експерименти проводяться на живих організмах.

ROS – хімічно реактивні частинки, до яких входить кисень (H_2O_2 – перекис водню, O_2 , OH – гідроксильний радикал, $O = O$ синглетний кисень). В організмах ROS є побічним продуктом нормального метаболізму кисню.

Адгезія (прилипання) – зчеплення приведених у контакт різнорідних твердих або рідких фаз, обумовлене як міжмолекулярними взаємодіями, так і хімічним зв'язком.

Біоміметика – застосування біологічних методів, наявних у природі.

Гель – одно-, дво- або багатофазові дисперсні системи з рідким дисперсним середовищем, реологічні властивості яких обумовлені наявністю гелеутворювачів у невеликих концентраціях.

Ген – основне поняття класичної генетики. Цим терміном називають ділянку ДНК, на якій у вигляді послідовності нуклеотидів записана інформація про амінокислотну послідовність одного білка.

Генетика – наука про спадковість (передавання з покоління в покоління спадкових ознак).

Гетерогенне явище нуклеації – фазовий перехід у неоднорідній системі, яка складається з однорідних частин (фаз), розділених поверхнею розділу.

Диско-дифузійний метод – ґрунтується на вивченні зони затримки росту мікроорганізмів навколо паперового диска, просоченого антибіотиком; до деяких препаратів метод не чутливий.

ДНК – дезоксирибонуклеїнова кислота. Молекула, в якій міститься генетична інформація, складається з двох полінуклеотидних ланцюгів, що утворюють подвійний ланцюг.

Желатин – білковий продукт деградації колагену, гідролізований колаген, утворює колоїдні системи, які легко переходять у гель.

Змочування – властивість рідини взаємодіяти з твердою поверхнею; визначається за кутом θ (крайовий кут змочування).

Зносостійкість – властивість матеріалу чинити опір зношуванню (відокремлення матеріалу від поверхні тертя твердого тіла) за визначених умов тертя (опір рухові одне щодо одного).

Колаген – це загальна назва сімейства протеїнів, які є основою сполучної тканини (сухожилля, кісток, хрящів) і надають їм міцності.

Корозійна стійкість – здатність матеріалу чинити опір корозійній дії середовища, що визначається швидкістю корозії (кількість металу, що перетворюється на продукти корозії з одиниці поверхні за одиницю часу).

Нерівноважне осадження – термодинамічний процес (сукупність послідовних станів), за якого система перебуває не в рівновазі з оточенням.

Нуклеотид – мономерна ланка ДНК і РНК.

Облатка – тонка оболонка.

Остеокондуктивність – властивість матеріалу, яка забезпечує пасивний процес росту кістки на його поверхні.

Полімери – це макромолекули, які складаються з ковалентно зв'язаних повторюваних мономерів, що можуть бути однаковими або різними, тобто гомополімери або сополімери. Вони бувають аморфними або кристалічними. До температури T_g (температура склування) полімери тверді та крихкі, а після T_g – м'які і гнучкі як каучук завдяки відносному руху ланцюгів.

РНК – рибонуклеїнова кислота. Біологічний полімер, дуже близький до ДНК за своєю хімічною будовою. Здатний утворювати подвійну спіраль, але в природі зазвичай існує як одиночний ланцюг.

Перелік деяких нещодавніх власних (Scopus) публікацій з анотаціями

1. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., **Sukhodub L.** Appl. Surf. Scien. 258,22,2012,8577-8584.

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.

2. Yanovska A., Kuznetsov V., Stanislavov A., Danilchenko S., **Sukhodub L.** Mat. Scien. Engin. C,32,7,2012,1883-1887.

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.

3. Korotych O., Samchenko Y., Boldescul I., Ulberg Z., Zholobak N., **Sukhodub L.** Mat. Scien. Engin. C,33,2,2013,892-900.

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.

4. **Sukhodub L. F.**, Yanovska A. A., Sukhodub L. B., Kuznetsov V. N., Stanislavov A. S. J. Nano-and Electr. Phys. 6,1,2014,01001.

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.

5. Yanovska A. A., Stanislavov A. S., Sukhodub L. B., Kuznetsov V. N., Illiashenko V. Yu., Danilchenko S. N., **Sukhodub L. F.**, Mater. Scien. Engin. C,36,1,2014,215-220.

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).

6. Zykova A., Safonov V., Yanovska A., **Sukhodub L.**, Rogovskaya R., Smolik J. Open Biomedical Engineering Journal. 9,2015,75-82.

The corrosion test results show that the ceramic oxide (alumina) coatings and the double-layered alumina-calcium phosphate coatings improve the corrosion resistance compared with uncoated Ti6Al4V and single-layered Ti6Al4V/calcium phosphate substrates. In addition, the double-layered alumina/hydroxyapatite coatings demonstrate the best biocompatibility during in vitro tests

7. Martynyuk O. O., **Sukhodub L. F.**, Sukhodub L. B., Meshkov A. M. J. Nano- Electron. Phys. 2016. Vol. 8. No. 4(II). 04090.

The article is devoted to study the structure, morphology, mechanical properties, phase and elemental composition of synthesized nanostructured biopolymer apatite samples doped ZnO for the needs of orthopedics and dentistry. It is found that modified hydroxyapatite (HA) (Ca/P ~ 1,62-1,63) has increased the crystallites size compared to stoichiometric HA (Ca/P = 1,67). As a result of annealing (900 °C) is fixed the presence of phases three calcium phosphate and calcium zinc phosphate and reducing of a and c parameters of the HA unit cell. This is the result of the partial substitution of Ca²⁺ for Zn²⁺ ions, which have different ionic radii (0,104 nm against 0,074 nm).

8. Sukhodub L. B., Yanovska G. O., Kuznetsov V. M., Martynyuk O. O., **Sukhodub L. F.** J. Nano-Electron. Phys. 2016. 8(1). 01032.

Hydrogels based on hydroxyapatite (HA) and Chitosan (CS) with addition of sodium alginate (Alg) were synthesized by in situ precipitation method. The introduction of Alginate powder into HA/CS hydrogel solution demonstrate the viscosity enhancing of the HA/CS hydrogel due to polyelectrolyte reaction between Alginate and Chitosan macromolecules.

9. Kuznetsov V. N., Yanovska A. A., Stanislavov A. S., Danilchenko S. N., Kalinkevich A. N., **Sukhodub L. F.** Materials Science and Engineering C.2016. – Vol. 60. P. 547-553.

The paper studies the influence of low intensity static magnetic field on brushite structural and microstructural parameters using the X-ray diffraction and the transmission electron microscopy. This effect was shown to have various influences on brushite structure depending on a magnetic field configuration or time of synthesis, which allows achieving controllability of the main properties of an obtained material. The influence of the magnetic field leads mostly to the decrease of crystallite sizes with no impact on the crystal lattice parameters.

10. A. S. Stanislavov, **L. F. Sukhodub**, L. B. Sukhodub, V. N. Kuznetsov, K. L. Bychkov, M. I. Kravchenko. Ultrasonics - Sonochemistry 2018, 42, 84–96.

11. **Leonid F. Sukhodub**, Liudmyla B. Sukhodub, Olena Litsis, Yuriy Prylutsky, Materials Chemistry and Physics. 2018, 217, 228–234.

We have developed a composite biomaterial based on hydroxyapatite (HA), sodium alginate (Alg) and Chlorhexidine (CHX), which can be used as carrier system for local drug delivery, in particular for dental application. The suitability of HA/Alg/CHX composite to act as slow release drug delivery systems was evaluated in phosphate-buffered saline (PBS) using a high-performance liquid chromatography. The dependence of drug release from the content of Alg and the method of the material preparation (drying at 37 °C, lyophilization at –55 °C and annealing at 1100 °C, in form ceramic scaffolds) was investigated. The presence of Alg in the composite increased the volume of adsorbed and released CHX by 2 times, and the release time from 24 to 72 h.

12. L. B. Sukhodub, **L. F. Sukhodub**, Yu. I. Prylutsky, N. Yu. Strutynska, L. L. Vovchenko, V. M. Soroca, N. S. Slobodyanik, N. G. Tsierkezos, U. Ritter., Materials Science & Engineering. C, 2018, 93, 606–614.

The novel bioactive composite material based on hydroxyapatite and multi-walled carbon nanotubes filled by iron was synthesized by the “wet chemistry” method. The findings clear demonstrate the possibility of application of the created composite material in bioengineering of bone tissue to fill bone defects of various geometries with the function of prolonged release of the drug. It is assumed that this composite material can be used in 3D modeling of areas of bone tissue that have to bear a mechanical load.

13. Pogrebnjak, A., **Sukhodub, L. F.**, Sukhodub, L. B., Bondar, O., Kumeda, M., Shaimardanova, B., Shaimardanov, Z., Turlybekuly, A. Ceramics International, 2019, 45(6),7504–7514.

A nanostructured composite material in the form of a hydrogel and beads based on hydroxyapatite (HA), sodium alginate (Alg) and ZnO microparticles was fabricated under the influence of microwave irradiation. An average crystallite size of the HA was 40 nm, while ZnO crystallites of the size 25 nm–11 μm were formed. The inorganic HA-ZnO phase of studied composite is distributed in the polysaccharide matrix of the alginate, which corresponds to the structures of natural bone nanocomposites. The introduction of ZnO into the composite increases its porosity up to 5 times and the degree of swelling in phosphate buffered saline up to 2 times, as well as provides weak antimicrobial activity. The in vitro biocompatibility and cytotoxicity of the synthesized materials was studied and it was found that addition of ZnO make insignificant effect on biocompatibility.

14. **Sukhodub, L. F.**, Sukhodub, L. B., Simka, W., Kumeda, M. Materials Letters. 2019,250,163–166.

Hydroxyapatite (HA) and brushite (DCPD) coatings were prepared on plasma electrolytic oxidation (PEO)-treated Ti6Al4V substrates using thermal substrate deposition (TSD) technology. For the deposition of calcium phosphate (CaP) coatings of different phase compositions, the temperature-dependent solubility phenomenon of calcium orthophosphates at a fixed solution pH was used. For 30 min of deposition, a 300 nm thick HA coating consisting of both needle- and plate-shaped crystals of 4 μm and a 50 nm thick DCPD coating with needle-like crystals of 7 μm were obtained.

15. L. B. Sukhodub, **L. F. Sukhodub**, M. O. Kumeda, S.V. Prylutska, V. Deinekaa, Yu. I. Prylutsky, U. Ritter. Carbohydrate Polymers. 223,2019,115067.

Bioactive composite material in the form of beads, based on natural polysaccharide Chitosan (CS), hydroxyapatite (HA), and C60 fullerene (C60), was synthesized under influence of microwave irradiation (MW). The presence of CS and C60 provides the Anaestesium release profile, according to the calculated correlation coefficient ($r=0.99$), close to the zero order kinetic release profile.

ОСНОВНІ ДЖЕРЕЛА

1. Эппле Маттиас. Биоматериалы и биоминерализация / пер. с нем. ; под ред. В. Ф. Пичугина и др. Томск : Ветер, 2007.
2. Уварова І. В., Максименко В. Б., Ярмола Т. М. Наноматеріали та їх використання у медичних виробках : навч. посіб. Київ : КІМ, 2013.
3. Суходуб Л. Ф., Суходуб Л. Б., Яновська Г. О., Чорна І. В. Апатит-біополімерні матеріали та покриття для біомедицини. Суми : Сумський державний університет, 2015.
4. Dorozhkin S. V. Calcium orthophosphates (CaPO_4): occurrence and properties. *Prog Biomater.* 2016. № 5. P. 9-70.
5. Dorozhkin S. V. Self-setting calcium orthophosphate (CaPO_4) formulations and their biomedical applications. *AdvNanoBioM&D.* 2019. № 3 (3). P. 321-421.
6. Зиман З. З. Кальцій-фосфатні біоматеріали : навч. посіб. Харків : ХНУ імені В. Н. Каразіна, 2018. 288 с.

Навчальне видання

Суходуб Леонід Федорович

Біоматеріали та покриття

Навчальний посібник

Художнє оформлення обкладинки М. О. Кумеди

Редактор І. О. Кругляк

Комп'ютерне верстання Л. Ф. Суходуба, М. О. Кумеди

Формат 60×84/16. Ум. друк. арк. 17,44. Обл.-вид. арк. 16,84. Тираж 300 пр. Зам. №

Видавець і виготовлювач

Сумський державний університет,

вул. Римського-Корсакова, 2, м. Суми, 40007

Свідоцтво суб'єкта видавничої справи ДК № 3062 від 17.12.2007.



Суходуб Л. Ф. – член-кореспондент Національної академії наук України, доктор фізико-математичних наук, професор, завідувач кафедри біофізики, біохімії, фармакології та біомолекулярної інженерії Сумського державного університету, відомий біофізик-експериментатор, який упродовж 40 років працює в галузі 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 ще один напрямок досліджень був започаткований Л. Ф. Суходубом, а саме синтез та вивчення структури і складу нових наноструктурованих біоматеріалів на основі фосфатів кальцію й природних біополімерів, що обумовлено недостатністю знань про особливості мінералізації в нормі та патології живих тканин для ефективного впливу на ці процеси. Він є автором і співавтором 3 монографій і більше ніж 200 наукових праць, з яких 12 оглядів у таких виданнях, як «Biopolymers», «Chemical Review», «Mass Spectrometry Review», «J. Nanoelectronic Physics», «Биофизика», «Биополимеры и клетка», «Український біохімічний журнал» тощо. Станом на 2019 рік h-індекс автора становить 17, а також він має 135 опублікованих наукових праць у базі даних Scopus із загальним їх цитуванням 1 287 за 1 044 документами.