

## **МОДЕЛИРОВАНИЕ КОСТНОЙ ТКАНИ НАНОКОМПОЗИТНЫМИ СИСТЕМАМИ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА – АЛЬБУМИНА – ЖЕЛАТИНА И ИХ СВОЙСТВА**

**А.П. Головань<sup>1</sup>, А.А. Ругаль<sup>1</sup>, В.М. Гунько<sup>1</sup>, В.Н. Барвинченко<sup>1</sup>,  
Я. Скубишевска-Зиемба<sup>2</sup>, Р. Лебода<sup>2</sup>, Т.В. Крупская<sup>1</sup>, В.В. Туров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины,  
ул. Генерала Наумова, 17, Киев, 03164, Украина

<sup>2</sup>Университет Марии Кюри-Складовской, пл. Марии Складовской Кюри 3, г. Люблин,  
20-031 Польша

*На основе наноразмерного гидроксиапатита (ГАП) и белков, желатина и сывороточного альбумина, синтезирован нанокомпозитный материал (ГЖА), гидратационные свойства которого близки к свойствам натуральной костной ткани. Методами ИК-спектроскопии подтверждено наличие адсорбционных взаимодействий между макромолекулами белков и частицами гидроксиапатита, а также обнаружено, что в минеральной составляющей композита ГЖА, так же как и в ГАП, содержится значительное количество карбонатных групп. Согласно данным дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК), радиус водных агрегатов слабосвязанной воды в гидратированном образце ГЖА находится в интервале 1,5 – 80 нм. По данным фотон-корреляционной спектроскопии размер частиц синтезированных материалов после их ультразвуковой обработки составляет 80-100 нм. Показано, что вода, адсорбированная частицами нанокомпозита ГЖА, при контакте с органическими веществами проявляет гетерогенную, кластерную структуру и в зависимости от состава органической среды может находиться в сильноассоциированном и слабоассоциированном состояниях, а также частично переходить в жидкую фазу, если та содержит электронодонорные растворители – ацетонитрил или ДМСО. Свойства синтезированного нанокомпозита в водно-органических растворах близки к аналогичным характеристикам природного костного материала. ГЖА проявил хорошую биосовместимость к клеточным объектам (дрожжевые клетки). В его присутствии происходит существенное ускорение процессов жизнедеятельности клеток, что делает синтезированный материал перспективным для тестирования в качестве синтетического заменителя костной ткани.*

### **Вступление**

Систематические исследования физико-химических свойств высокодисперсных оксидов, в особенности кремнеземов, показали, что их поверхность способна связывать значительное количество воды. Поэтому при обнаружении биологической активности кремнезема, проявляющейся в стимуляции клеточного метаболизма, а также возможности использования пирогенных кремнеземов в качестве эффективных адсорбентов медицинского назначения [1–4], возник вопрос о роли межфазной воды в процессах взаимодействия наноразмерных частиц оксидов с клеточной поверхностью. Одним из инициаторов проведения систематических работ в этой области был основатель Института химии поверхности академик А.А. Чуйко. В частности, им была выдвинута гипотеза о возможности появления на межфазной границе кремнезема биологически активных форм воды. Эти идеи получили свое подтверждение при обнаружении способности межфазной воды переходить в необычное слабоассоциированное состояние [5, 6]. Было показано, что именно в слабоассоциированном состоянии находится вода в микроорганизмах (в состоянии их анабиоза), а в здоровой

костной ткани человека примерно половина связанной воды может находиться в слабо-ассоциированном состоянии [7, 8]. В настоящей работе представления о кластерном состоянии воды использованы для создания нанокомпозитного материала, являющегося аналогом натуральной костной ткани.

Необходимость создания искусственных аналогов костной ткани и биологически инертных имплантатов для исправления дефектов костной ткани обусловлена значительным распространением заболеваний опорно-двигательного аппарата. Известно [9], что костная ткань служит не только для обеспечения жесткости и подвижности тела, но и является биоактивной матрицей, внутри которой происходят сложные биохимические превращения, в результате которых синтезируются эритроциты и некоторые другие клетки крови. Она содержит органическую и неорганическую составляющие. Неорганическая фаза, обычно представленная нанокристаллами гидроксиапатита (ГАП, химическая формула  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), которые имеют вид нанокристаллов (с размером 5–10 нм) пластинчатой формы [9–11], кристаллизующихся на волокнах коллагена из межклеточной жидкости. Эта жидкость содержит ионы кальция и фосфатные ионы. Органическая фаза состоит преимущественно (на 95 %) из коллагена (около 95 % занимает коллаген I типа, а 5 % приходится на коллагены II, III и IV типов) и небольшого количества гликозаминогликанов, а также (около 5 %) белков неколлагеновой природы: гликопротеинов, в том числе сиалопротеинов, и альбумина [12].

В современной ортопедии и травматологии как заменитель костной ткани используют композитные материалы на основе высокодисперсных форм гидроксиапатита и белков костной ткани коллагена или желатина [13–18]. Клинически доказано [14], что эти композитные системы могут эффективно использоваться в качестве временных заполнителей дефектов костной ткани и ранозаживляющих средств, что обусловлено их биодеструктивными и цитосовместимыми характеристиками, а также благодаря высокому сродству желатина с ГАП. Желатин представляет собой денатурированную форму коллагена и содержит значительное количество биологически функциональных групп аминокислот, что делает его перспективным биоматериалом для регенерации костной ткани. В настоящее время проводятся значительные работы в направлении повышения биосовместимости искусственных костных имплантатов, что связано с необходимостью изучения природы биосовместимости материалов и поиском новых видов композитов с улучшенными свойствами.

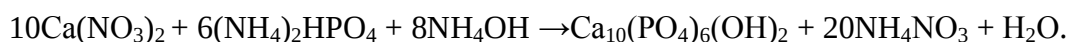
Исследования, выполненные на естественном костном материале с помощью методов низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии показали, что костная ткань содержит до 30 % мас воды, значительная часть которой находится в необычном слабоассоциированном состоянии, когда молекулы воды существуют в виде мономерных молекул или образуют небольшие кластеры, в состав которых входит 2–5 молекул воды, причем геометрия водородных связей может быть далека от идеальной [19–22]. Выполненные в [23] модельные исследования показали, что именно наличие композитной системы белок–ГАП влечет появление значительного количества слабоассоциированной воды. Поэтому в работе [21] было сделано предположение, что для приближения свойств искусственных имплантатов к естественной костной ткани композитные системы на основе белков и наноразмерного ГАП должны находиться в таком состоянии, когда присутствующая в них межфазная вода является слабоассоциированной или может трансформироваться в слабоассоциированное состояние под воздействием определенных факторов, например в присутствии некоторых типов органических веществ. Первые попытки в этом направлении были сделаны на примере изучения гидратных свойств композитных систем, созданных на основе наноразмерного гидроксиапатита (с удельной поверхностью  $120 \text{ м}^2/\text{г}$ ),

нанокремнезема (А-300) и желатина [24]. Измерения обнаружили в таких композитах определенное количество слабоассоциированной воды, однако гораздо меньше, чем в естественном костном материале.

Целью данной работы было создание наноструктурированных композитных систем на основе нано-ГАП и белков – желатина и сывороточного альбумина, содержащих максимальное количество слабоассоциированной воды, исследование их физико-химических свойств и параметров гидратации. Сывороточный альбумин был введен в композитный материал, поскольку альбумины составляют главную массу неколлагеновых белков костной ткани, а по иммунологическим характеристикам альбумин кости идентичен сывороточному альбумину [25]. Предусматривалось, что создаваемые на основе ГАП, желатина и альбумина композитные материалы (ГЖА) будут иметь развитую поверхность и обладать высокой биосовместимостью, о чем можно судить по стимулированию его частицами процессов жизнедеятельности тестовых клеточных культур.

### Экспериментальная часть

*Материалы.* Нанодисперсный гидроксиапатит (химическая формула кристаллов  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ) синтезирован путем осаждения из смеси водных растворов солей азотной и фосфорной кислот в соответствии со схемой [26]:



Было синтезировано несколько типов образцов ГАП, в которых реакция проводилась в водном растворе (образец ГАП) или в растворе, где кроме солей присутствовал желатин (образцы ГАПж1 ГАПж2). Реакционную смесь отстаивали сутки, осадок промывали декантацией и сушили при 120 °С в случае приготовления образцов ГАП и ГАПж1 или при 900 °С для образца ГАПж2. То есть образец ГАПж1 с максимально развитой поверхностью сохраняет в своем составе некоторое количество биополимерного материала, который заполняет пространство между нанокристаллами ГАП, в то время как образец ГАПж2 является практически исходным гидроксиапатитом, так как высокотемпературная обработка исключает возможность присутствия желатина. Композитный материал ГЖА получали путем осаждения из смеси водных растворов солей  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  и белков (желатина и альбумина) в среде 25 %-ного раствора аммиака по методике [13]. Полученный композит сушили при температуре 120 °С. Синтезированные образцы ГАП представляли собой порошки белого цвета (рис. 1, 2). Значения удельной поверхности по БЕТ [27] ( $S_{\text{БЕТ}}$ ) приведены в табл.1.

**Таблица 1.** Адсорбционные характеристики синтезированных материалов

| Образец | $S_{\text{БЕТ}}$ (м <sup>2</sup> /г) | $V_{\text{пор}}$ (см <sup>3</sup> /г) | $R_{\text{пор}}$ (нм) |
|---------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|
| ГАП     | 69,6                                 | 0,44                                  | 40                    |
| ГАПж1   | 156,7                                | 0,57                                  | 26                    |
| ГАПж2   | 26,7                                 | 0,23                                  | 47                    |
| ГЖА     | 117,6                                | -                                     | -                     |

Для синтеза применяли желатин марки Fluka Gelatin from porcine skin (Sigma-Aldrich Chemie GmbH) (Германия). При создании композита ГЖА использовали бычий сывороточный альбумин (БСА), сухой, лиофилизированный для вирусологических исследований, производства Ставропольского НИИВС, с молекулярной массой 67000 Да.

**Методы исследования. ИК-спектроскопия.** ИК-спектры поглощения образцов регистрировали на однолучевом ИК Фурье-спектрометре Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Германия) в виде прессованных порошков с КВг при соотношении компонентов 1 : 5.

**Термогравиметрия.** Метод дифференциального термического анализа (ДТА) основан на сравнении термических свойств образца исследуемого вещества и термически инертного вещества, принятого в качестве эталона (прогретый до 1500 °С  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ). Изменения температуры образца вызываются фазовыми переходами или химическими реакциями, связанными с изменением энтальпии. Кривые ДТА, ТГ и ДТГ для образцов, снимали на дериватографе марки "Q-1500D" (Венгрия). Нагревание образцов проводили со скоростью 10 град/мин.

**Дифференциальная сканирующая калориметрия.** Дифференциальная сканирующая калориметрия (ДСК) является прямым и наиболее эффективным методом регистрации фазовых переходов, в частности замерзания или таяния воды, процесса тепловой денатурации белковых молекул. Он основан на регистрации теплового потока, который характеризует изменения, происходящие в исследуемой системе в процессе нагревания или охлаждения. Исследования состояния воды в ГЖА проводили методом ДСК на микрокалориметре марки Diamond DSC Isothermal со скоростью сканирования 4 град/мин. Масса образцов составляла 0,005–0,025 г. Охлаждение проводили от 20,00 °С до –50,00 °С со скоростью 20 град/мин. Перед нагреванием образец помещали в алюминиевые контейнеры, вносили в рабочую часть прибора и охлаждали жидким азотом до температуры –60 °С. После этого систему выдерживали в течение нескольких минут для установления равновесия и нагревали от –60 °С до 200 °С со скоростью 10 град/мин.

**Фотон-корреляционная спектроскопия.** Исследования распределения частиц по размеру (РЧР) и электрокинетического потенциала ( $\zeta$ -потенциала) в водных суспензиях синтезированных образцов (концентрация 0,02 – 6,0 % мас., обработка ультразвуком с помощью диспергатора (Sonicator Misonix Inc., 22 кГц, 500 Вт) были выполнены методом ФКС на спектрометре Zetasizer 3000 (Malvern Instruments) при длине волны лазера  $\lambda = 633$  нм и угле рассеяния света  $\Theta = 90^\circ$ . С целью получения зависимости распределения частиц по размерам как функцию от pH необходимые значения pH устанавливали с помощью 0,1 М NaOH и HCl. Для расчетов РЧР относительно интенсивности рассеянного света ( $\text{РЧР}_I$ ) и числа частиц ( $\text{РЧР}_N$ ) в предположении сферической формы частиц использовали программу Malvern Instruments (версия 1.3).

**Плотность поверхностного заряда.** Плотность поверхностного заряда ( $\sigma_0$ ) определяли методом потенциометрического титрования, с использованием тefлоновой ячейки, в атмосфере азота (без  $\text{CO}_2$ ) при  $298 \pm 0,2$  К. Величину pH измеряли pH-метром РНМ240 (электроды G202C и K401). Величину  $\sigma_0$  рассчитывали, сравнивая данные для чистого раствора электролита и суспензии образца ( $C_{\text{обp}} = 0,2$  % мас.) при  $10^{-2}$  М NaCl

$$\sigma_0 = \frac{\Delta V c F}{m S}, \quad (1)$$

где  $\Delta V = V_s - V_e$  – разность объемов растворов основания (кислоты), добавленных к раствору электролита ( $V_e$ ) и суспензии ( $V_s$ ) для достижения того же значения pH;  $F$  – постоянная Фарадея,  $c$  – концентрация основания (кислоты),  $m$  – масса оксида,  $S$  – удельная поверхность.

**$^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия.** Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц. Температуру регулировали с точностью  $\pm 1$  К, используя термopриставку Bruker VT-1000. Интенсивность сигналов определяли с точностью  $\pm 10$  %. Для предотвращения переохлаждения связанной воды спектры  $^1\text{H}$  ЯМР записывали при нагревании образцов, предварительно

охлажденных до температуры 200 К. Требуемый уровень гидратированности порошков достигали путем их увлажнения необходимым количеством дистиллированной воды (7 – 37 % мас. ). В качестве жидкой слабополярной среды использовали дейтерированный хлороформ, а полярной добавки – дейтерированные ДМСО и ацетонитрил.

Способ определения характеристик межфазных слоев воды с помощью  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии детально изложен ранее [21, 28, 29]. Он базируется на влиянии межфазной границы на температуру фазового перехода вода – лед. Благодаря адсорбционным взаимодействиям температура замерзания связанной воды понижена и таяние связанной воды происходит при  $T < 273$  К. Свободная энергия льда ( $\Delta G_i$ ) с понижением температуры изменяется по линейному закону [30]

$$\Delta G_i = -0,036(273 - T), \quad (2)$$

что можно использовать для оценки изменения свободной энергии связанной воды ( $\Delta G_{uw}$ ), считая, что при ее замерзании  $\Delta G_w = \Delta G_i$ .

Площадь ограничена графиком  $\Delta G(C_{uw})$  определяет величину межфазной энергии ( $\gamma_s$ ), которая равна модулю суммарного понижения свободной энергии воды, обусловленному присутствием границы раздела фаз:

$$\gamma_s = -K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G(C_{uw}) dC_{uw}, \quad (3)$$

где  $C_{uw}^{\max}$  – общее количество незамерзающей воды при  $T = 273$  К.

На графике  $\Delta G(C_{uw})$  обычно наблюдаются участки, которые можно отнести к слабосвязанной (замерзает при 260–273 К) и сильносвязанной (замерзает при  $T < 260$  К) воды. Свободная энергия слабосвязанной воды лишь немного снижена в результате взаимодействий с поверхностью адсорбента в отличие от сильносвязанной воды, которая характеризуется значительно большими величинами  $|\Delta G|$  [21]. Количественные ( $C_{uw}^s$  и  $C_{uw}^w$  для сильно- и слабосвязанной воды, соответственно) и энергетические ( $\Delta G_s$  и  $\Delta G_w$ ) характеристики слоев связанной воды могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков графика зависимости  $\Delta G(C_{uw})$  к осям абсцисс и ординат.

Поскольку каждая молекула воды может принимать участие в формировании четырех водородных связей (двух как протонодонор и двух за счет неподеленных электронных пар атома кислорода как электронодонор), часть из которых разрушена тепловыми движениями молекул, по степени ассоциированности воду можно подразделять на сильно- и слабоассоциированную (SAW и WAW, соответственно). К первой относится вода, в которой каждая молекула принимает участие в формировании двух и более водородных связей [21]. Под влиянием внешних факторов (присутствие молекул растворенных веществ или наличие границы раздела с твердой или иной жидкой фазой) локальная упорядоченность воды в зоне контакта может увеличиваться (космотропный эффект) или уменьшаться (хаотропный эффект). Такая модель оказалась весьма эффективной для объяснения явления повышения растворимости в биологических жидкостях слабополярных веществ под влиянием специально вырабатываемых организмом *co*-растворителей [22]. В присутствии электронодонорных веществ (В) могут формироваться также водородносвязанные комплексы А-Н...В (ассоциированная вода, ASW), присутствующие в дисперсионной среде или на поверхности твердой фазы.

Понижение температуры замерзания воды в порах может быть описано уравнением Гиббса – Томсона [31]:

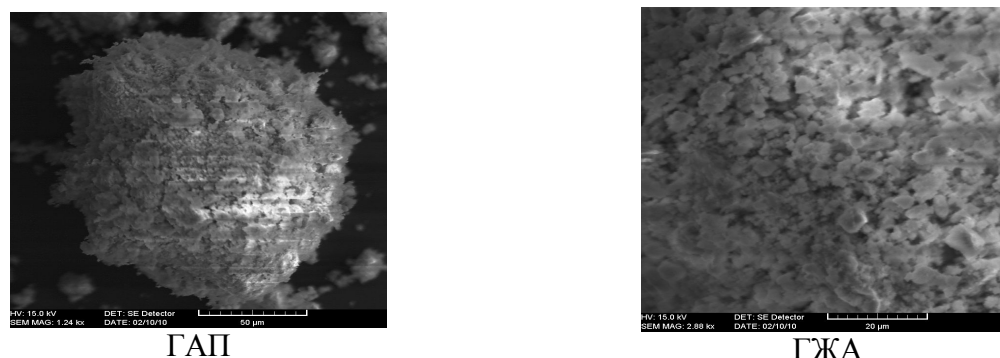
$$\Delta T_m = T_m(R) - T_{m,\infty} = \frac{2\sigma_{sl}T_{m,\infty}}{\Delta H_f \rho R} = \frac{k}{R} \quad (4)$$

где  $T_m(R)$  – температура плавления льда, локализованного в порах (полостях) с радиусом  $R$ ;  $T_{m,\infty}$  – температура плавления объемного льда;  $\rho$  – плотность твердой фазы;  $\sigma_{sl}$  – энергия взаимодействия стенок твердого тела с жидкостью (например с помощью образования водородных связей);  $\Delta H_f$  – объемная энтальпия плавления,  $k$  – константа. Это уравнение использовали для расчета распределений по размерами пор, заполненных незамерзающей (связанной) водой, на основе зависимостей  $C_{uw}(T)$  [21,32].

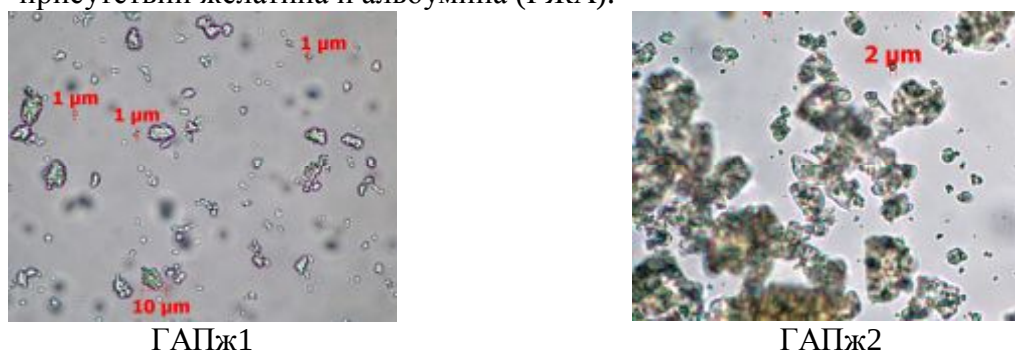
**Биометрические измерения.** Контроль биоактивности синтезированных наноматериалов проводили путем изучения их влияния на процессы жизнедеятельности тестовой культуры (дрожжевых клеток *Saccharomyces cerevisiae*), а именно по кинетике выделения углекислого газа в процессе брожения дрожжей, которую исследовали при фиксированном содержании питательного вещества (сахарозы) [33]. Дрожжи культивировали в 17 %-ном растворе сахарозы при 25 °С. Для опытов брали разные концентрации образцов ГАП, ГЖА, ГАПж1 и ГАПж2 (от 0,025 до 0,1 г/50 мл). Скорость выделения  $\text{CO}_2$  измеряли в ( $\text{г/л}\cdot\text{ч}^{-1}$ ) и рассчитывали по изменению его концентрации в течение 1 ч на протяжении 30 ч эксперимента. Поэтому изменение массы колб с реакционной смесью фиксировали через определенные промежутки времени, и на основании полученных данных рассчитывали изменение концентрации выделенного  $\text{CO}_2$  за 1 ч. Достоверность полученных результатов обеспечивалась повторением измерений и статистическим вычислением среднего значения.

## Результаты и обсуждения

На микрофотографиях образцов ГАП и ГЖА (рис. 1), полученных с помощью сканирующего электронного микроскопа (СЭМ), видно, что частицы порошков образцов ГАП и ГЖА имеют чешуйкоподобную форму с различными размерами; для ГАП диапазон размеров частиц 1,5–10 мкм, которые образуют агрегаты размером до 100 мкм; для ГЖА размеры частиц лежат в интервале 0,2–5 мкм, которые также группируются, образуя агрегаты размером до 30–50 мкм.



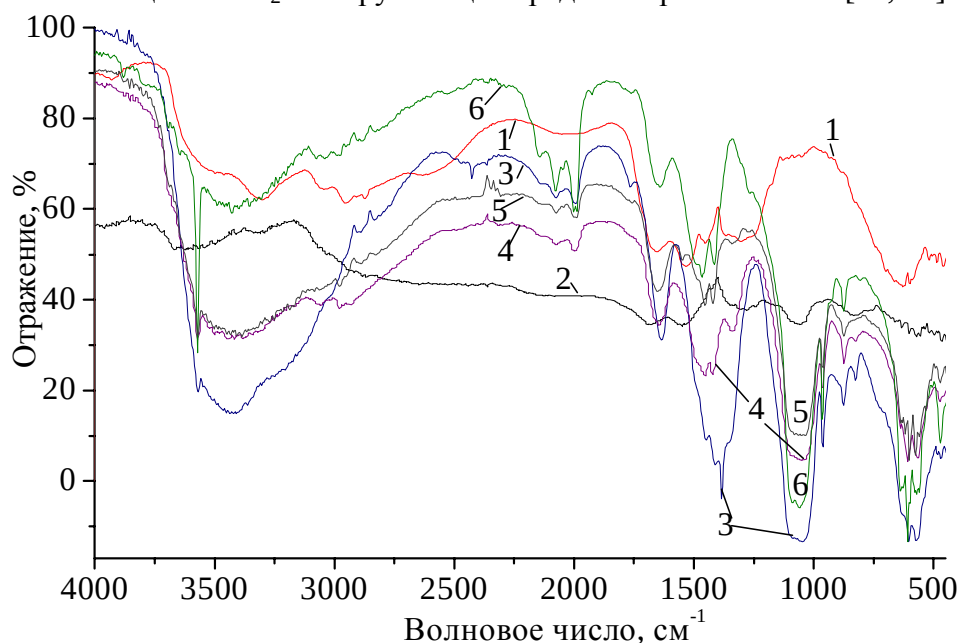
**Рис. 1.** СЭМ фотографии образцов гидроксиапатита, синтезированных в воде (ГАП) и в присутствии желатина и альбумина (ГЖА).



**Рис. 2.** Микрофотографии синтезированных образцов гидроксиапатита в присутствии желатина – ГАПж1 и ГАПж2.

На рис. 2 приведены фотографии синтезированных образцов гидроксиапатита ГАПж1 (с размером частиц от 1 до 20 мкм) и ГАПж2 (с размером частиц от 2 до 100 мкм), полученные с помощью микроскопа Carl Zeiss Primo Star. Наличие таких больших агрегатов для образца ГАПж2 может быть следствием процесса спекания порошка при высокой температуре.

ИК-спектры наноразмерных продуктов синтеза характеризуются полосами поглощения основных структурных компонентов ГАП (тетраэдров  $\text{PO}_4^{3-}$  и гидроксильных групп  $\text{OH}^-$ ), а также адсорбируемой воды  $\text{H}_2\text{O}$  и карбонатных групп  $\text{CO}_3^{2-}$  (за счет поглощения  $\text{CO}_2$  из окружающей среды во время синтеза [18, 20].



**Рис. 3.** ИК-спектры альбумина (1), желатина (2) и гидроксиапатита, синтезированного в воде – ГАП (3), в водном растворе желатина и альбумина – ГЖА (4), в водном растворе желатина – ГАПж1 (5) и ГАПж2 (6).

В образцах ГАП, синтезированных путем осаждения из смеси водных растворов и в присутствии белков (рис. 3), наблюдаются характерные пики при 1095, 1050, 960, 606  $\text{cm}^{-1}$ , которые относятся к валентным и деформационным колебаниям фосфатных групп и карбонатной группы (1490–1410  $\text{cm}^{-1}$  и 876  $\text{cm}^{-1}$ ) [34]. Это дает основание полагать, что синтезированы карбонатные гидроксиапатиты, в которых фосфатные группы в структуре апатита частично замещены карбонатными группами. Известно [35], что биогенный ГАП содержит до 7,4 % масс. карбонатов. Поэтому можно предположить, что синтезированные ГАП, имеющие в своем составе карбонатные группы, могут быть успешно применены в медицине как материал для замещения костных дефектов.

В ИК-спектрах гидроксиапатита, синтезированного в присутствии белков, появляются новые полосы поглощения в области 1645 – 1649  $\text{cm}^{-1}$  и 1548  $\text{cm}^{-1}$ , которые относятся к поглощению белка (Амид I и Амид II), а полоса валентных колебаний свободных  $\text{OH}$ -групп гидроксиапатита смещается к 3569  $\text{cm}^{-1}$  по сравнению с гидроксиапатитом, синтезированным из водного раствора (3572  $\text{cm}^{-1}$ ), что свидетельствует об образовании водородной связи между электронодонорными амидными группами ( $\text{—NH—C=O}$ ) белков и гидроксильной группой гидроксиапатита ( $\text{—OH}$ ) [35–37].

Развитая поверхность порошков гидроксиапатита способствует адсорбции значительного количества воды, которая ответственна за появление в ИК-спектрах интенсивных полос поглощения в области деформационных (1630  $\text{cm}^{-1}$ ) и валентных

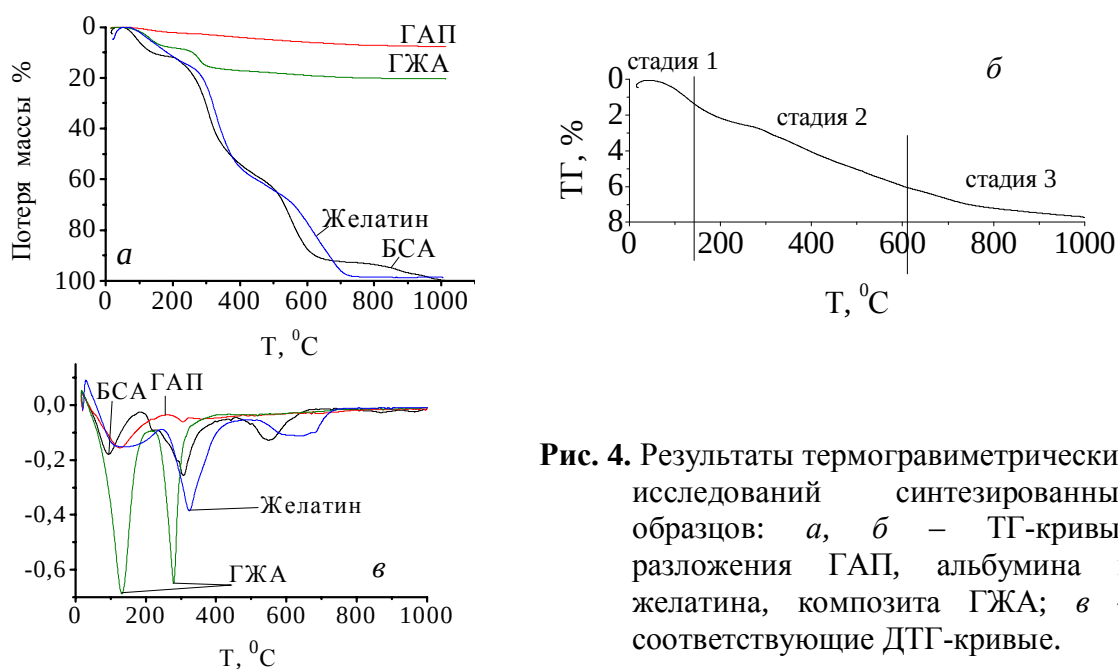


(3500–3350  $\text{cm}^{-1}$ ) колебаний воды. Интенсивность полосы валентных колебаний сильно зависит от температуры обработки образца, что подтверждается минимальным значением интенсивности этой полосы для образца ГАПж2, прогретого при температуре 900 °С (рис. 3, кривая 6).

На рис. 4 приведены термограммы полученных образцов, а также кривые термолитиз исходных белков. Для ГАП потеря массы фиксируется в температурном интервале 35–800 °С. Она может быть обусловлена выделением из образца не только воды, но и углекислого газа. Поскольку оксид углерода хорошо растворим в воде, во время реакции осаждения (при синтезе ГАП), вероятнее всего, он связывается с гидроксильными или фосфатными ионами гидроксиапатита с образованием карбонатного ГАП. Наибольшая потеря массы ГАП наблюдается при достаточно высокой температуре (145–620 °С, рис. 4 б). Поэтому имеющиеся на кривой ТГ три участка потери массы можно отнести к испарению физически адсорбированной воды (35–145 °С), удалению кристаллизационной воды (145–620 °С) и выделению  $\text{CO}_2$  (620–800 °С).

Термолитиз желатина начинается при 315 °С (рис. 4 а), БСА – при 240 °С, а биополимерная составляющая композита ГЖА – при промежуточном значении температур (280 °С), т.е. в композите наблюдается большая термическая стабильность альбумина. Это, предположительно, может быть результатом образования водородных связей между белковыми молекулами разных типов, а также молекулярных взаимодействий белковых компонентов с минеральной матрицей. Полный распад БСА наблюдается при температуре 1000 °С, а желатина – при 720 °С. Потеря массы ГАП при 1000 °С составляет 7,7 %, а нанокompозита ГЖА при температуре 900 °С – 20,4 %, что отвечает совокупной массе адсорбируемой воды и биополимеров (если считать, что потеря массы за счет  $\text{CO}_2$  относительно мала).

На кривых термолитиз белков (рис. 4 а) наблюдается три участка быстрого изменения массы, разделенные участками с меньшим наклоном. Их наличие обусловлено сложным характером термической деструкции биополимеров. Первый спад ( $T > 150$  °С) обусловлен потерей связанной с белком воды. При более высоких температурах осуществляется деструкция биополимерных цепей, карбонизация и окисление углерода до  $\text{CO}_2$ .

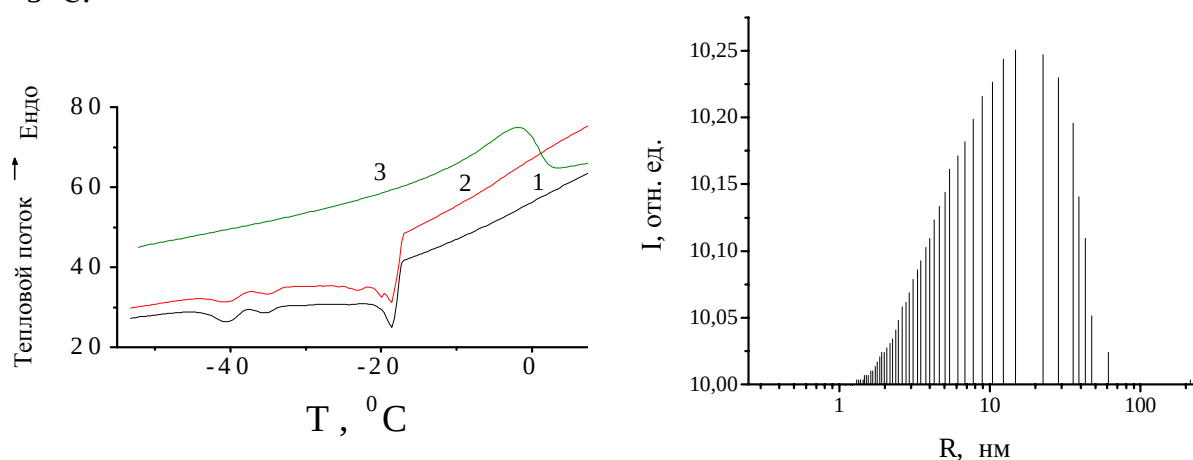


**Рис. 4.** Результаты термогравиметрических исследований синтезированных образцов: а, б – ТГ-кривые разложения ГАП, альбумина и желатина, композита ГЖА; в – соответствующие ДТГ-кривые.



По данным ТГ-анализа можно определить, что количество белковой составляющей в нанокompозите ГЖА составляет 12,7 % мас. Термическая стабильность композита растет с увеличением содержания ГАП. В соответствии с данными [18], связывание ГАП с белковыми молекулами может происходить не только за счет дисперсионных взаимодействий, но и путем образования водородных связей между амидной группой ( $-\text{NH}-\text{C}=\text{O}$ ) белков и гидроксильной группой ГАП.

Методом ДСК определяли зависимости теплового потока от температуры в интервале  $-60...10\text{ }^{\circ}\text{C}$  для нанокompозита ГЖА (рис. 5) в процессах нагревания (кривая 3) и охлаждения (кривые 1, 2) образца, содержащего 10 % мас. воды (кривая 1) или 10 % мас. воды в присутствии 20 % мас. хлороформа (кривая 2). Основным эндотермический эффект обусловлен замерзанием межфазной воды. При этом кривые охлаждения (1, 2) и нагревания (3) существенно отличаются. Если при замораживании образцов максимум эндотерм находится при  $-19\text{ }^{\circ}\text{C}$ , то при нагревании – в области  $-3\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



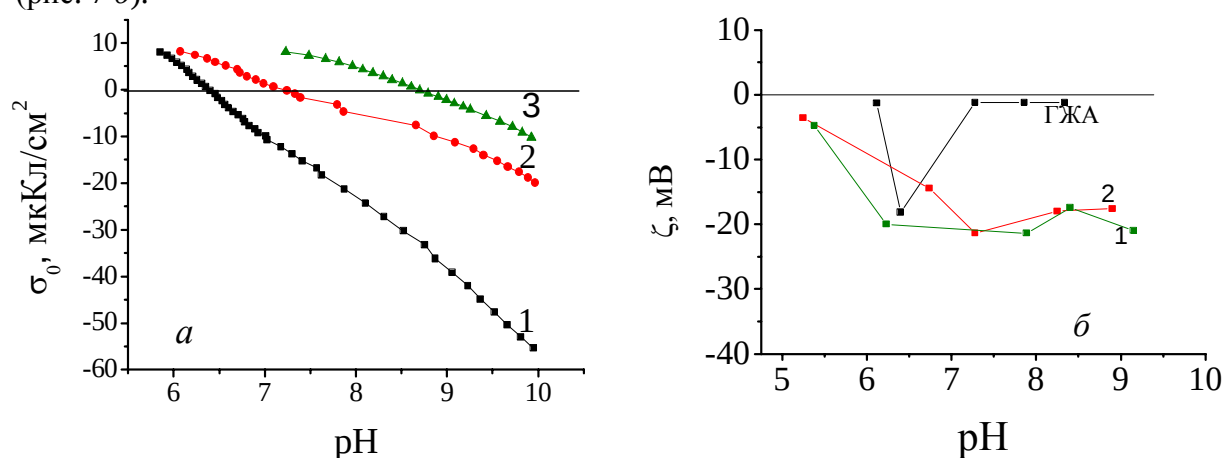
**Рис. 5.** ДСК кривые охлаждения полученного композита ГЖА с добавлением 10 % мас воды (кривая 1), 10 % мас воды и 20 % мас хлороформа (кривая 2) и нагревания образца, содержащего 10 % мас воды (кривая 3).

**Рис. 6.** Распределение по размерам внутренних полостей в нанокompозите ГЖА.

Это вызвано эффектами переохлаждения воды, локализованной в наноразмерных полостях [32]. В соответствии с классификацией межфазной воды, приведенной в [21], воду, которая замерзает при температуре выше  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  следует относить к слабосвязанной, т.е. такой, которая локализована в порах относительно большого размера. Сильносвязанная вода на эндотермических кривых, полученных методом ДСК, обычно не наблюдается вследствие наличия паразитных тепловых потоков, препятствующих выделению на их фоне слабых тепловых эффектов, обусловленных размораживанием воды в относительно малом объеме узких пор. По эндотермических кривых размораживания (рис. 5, кривая 3) методом ДСК-криопорометрии по уравнению (4) может быть рассчитано распределение по размерам водных агрегатов, которые находятся в середине частиц ГЖА. При этом следует считать, что величина теплового потока пропорциональна объему воды, находящейся в порах (полостях) определенного радиуса. Как видно из полученных таким образом кривой распределения пор по размерам (рис. 6) в нанокompозите ГЖА фиксируются водные агрегаты (кластеры или домены) с размером 1,5 – 60 нм. Они могут находиться как во внутренних полостях

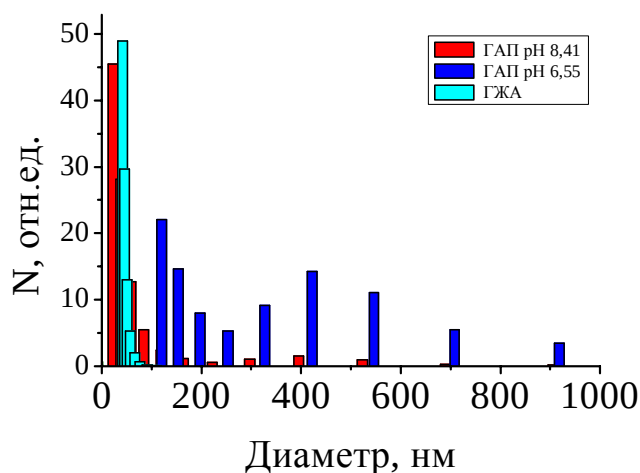
(порах), так и в зазорах между близко расположенными частицами. Поскольку сильносвязанная вода не регистрируется в ДСК-экспериментах, это распределение относится исключительно к слабосвязанной воде.

Поверхностный заряд, возникающий на границе раздела фаз ГАП/электролит, может вызывать изменение конформации адсорбируемых макромолекул и влиять на взаимодействие поверхности ГАП (или композитных материалов, создаваемых на его основе) с другими коллоидными частицами, например клетками. Поэтому его величина и зависимость от состава и pH дисперсионной фазы и являются важными характеристиками при изучении межфазных процессов, которые могут происходить место в сложных биокolloидных системах. На рис. 7 приведены результаты измерения зависимости плотности поверхностного заряда (рис. 7 а) на частицах ГАП, ГАПж1 и ГАПж2 от pH, рассчитанные на основании разницы количества прибавленной кислоты и щелочи для получения равных значений pH исследуемой суспензии и фонового электролита (0,1н NaCl), и зависимости  $\zeta$ -потенциала коллоидных частиц от pH среды (рис. 7 б).



**Рис. 7.** Плотность поверхностного заряда (а) и электрокинетический потенциал (б) как функции pH для синтезированных образцов в 0,01М NaCl: 1 – ГАП; 2 – ГАПж1; 3 – ГАПж2.

Поверхностный заряд (рис. 7 а) на частицах ГАП может возникнуть в результате диссоциации или химического взаимодействия поверхностных гидроксильных групп и неравномерной адсорбции из раствора ионов противоположного знака. Значение плотности поверхностного заряда ( $\sigma_0$ ) должно увеличиваться с ростом размера коллоидных частиц при увеличении содержания на поверхности свободных –ОН-групп, которое является определяющим фактором для величины  $\sigma_0$ . В соответствии с данными рис. 7 а, величина  $\sigma_0$  увеличивается при переходе от образца ГАП к образцам, полученным в присутствии растворов желатина (ГАПж1 и ГАПж2). Поскольку в состав образца ГАПж1 (кривая 2) входит определенное количество желатина, вероятно, что для него существенное уменьшение величины  $\sigma_0$  обусловлено соответствующим уменьшением количества свободных ОН-групп на поверхности частиц, обусловленным их связывания с электронодонорными группами молекул белка. Однако, и для образца ГАПж2, который является практически исходным гидроксипатитом, плотность поверхностного заряда значительно выше, чем для образца ГАП. Это может быть связано с уменьшением количества поверхностных гидроксидов в процессе спекания образца при 900 °С. Для образцов ГАП и ГАПж1 величина  $\zeta$ -потенциала и его зависимость от pH среды оказались близкими (рис. 7 б) и отличным от значения  $\zeta$ -потенциала для нанокompозита ГЖА. Вероятно, в процессе формирования частиц, заряд полимерной и минеральной составляющих этого композита в значительной степени компенсируют друг друга.



**Рис. 8.** Распределение частиц по размерам в суспензиях образцов с концентрацией 0,25 % ГАП и ГЖА в растворе 0,01М NaCl.

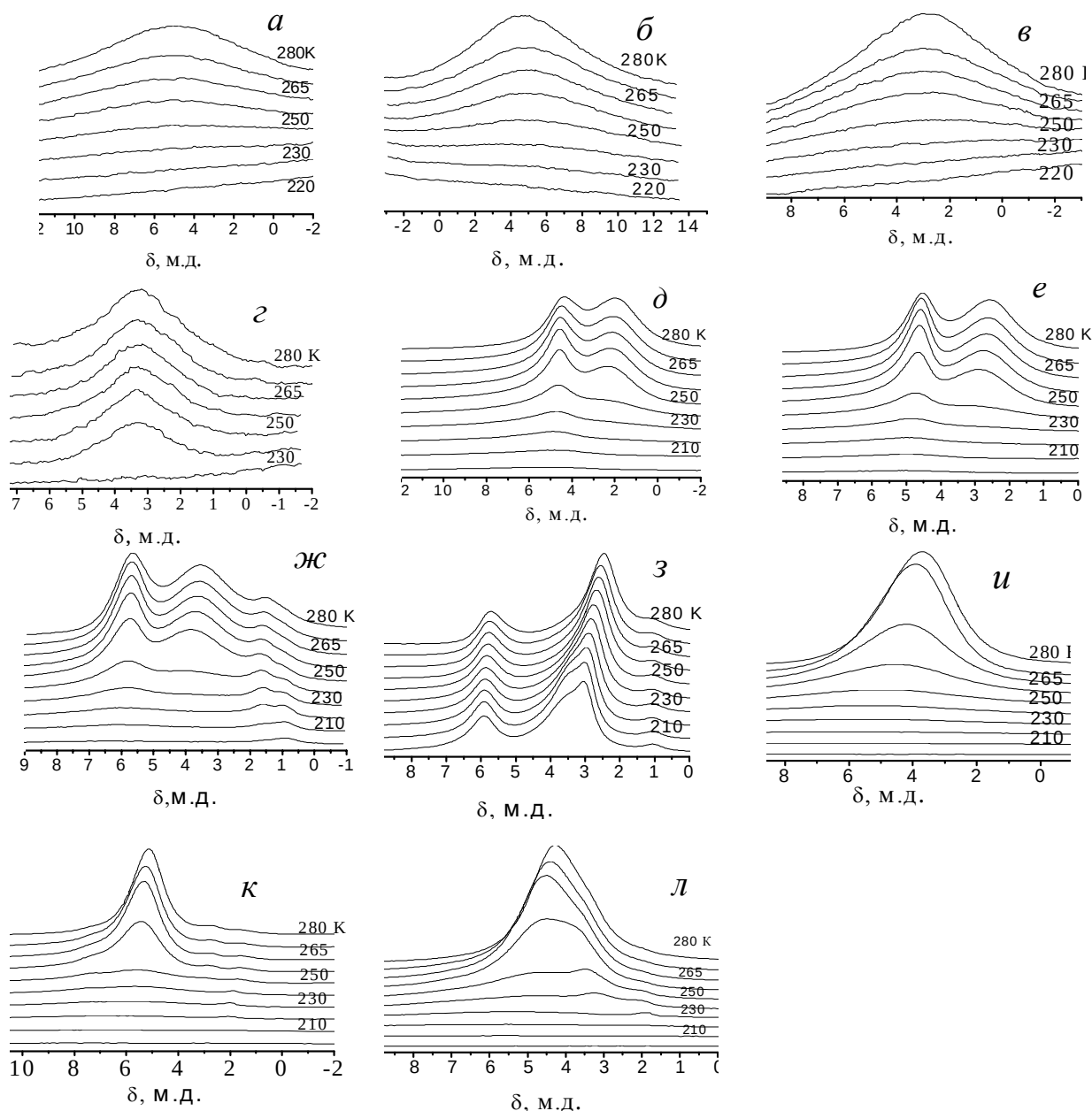
На рис. 8 приведены распределения частиц по радиусам, рассчитанные на основании данных фотон-корреляционной спектроскопии. Как следует из этих данных, для образцов ГАП могут быть зафиксированы максимумы в диапазоне размеров частиц 100 – 1000 нм. Для других образцов они оказались слишком слабыми для количественного определения. Величина максимума (при 400 нм) существенно зависит от pH среды. В суспензиях также наблюдается значительное светорассеяние в области, отвечающей размерам частиц 0,2 – 50 нм, обусловленному поглощением света дисперсионной средой. Полученные результаты согласуются с данными оптической микроскопии. Они свидетельствуют о том, что синтезированные материалы представляют собой стабильные частицы, не слишком чувствительные к механическим нагрузкам, вызванным интенсивным ультразвуковым облучением.

На рис. 9 приведены результаты исследования методом низкотемпературной  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии гидратных свойств нанокомпозита ГЖА при фиксированном количестве адсорбируемой воды в разных типах органических сред.

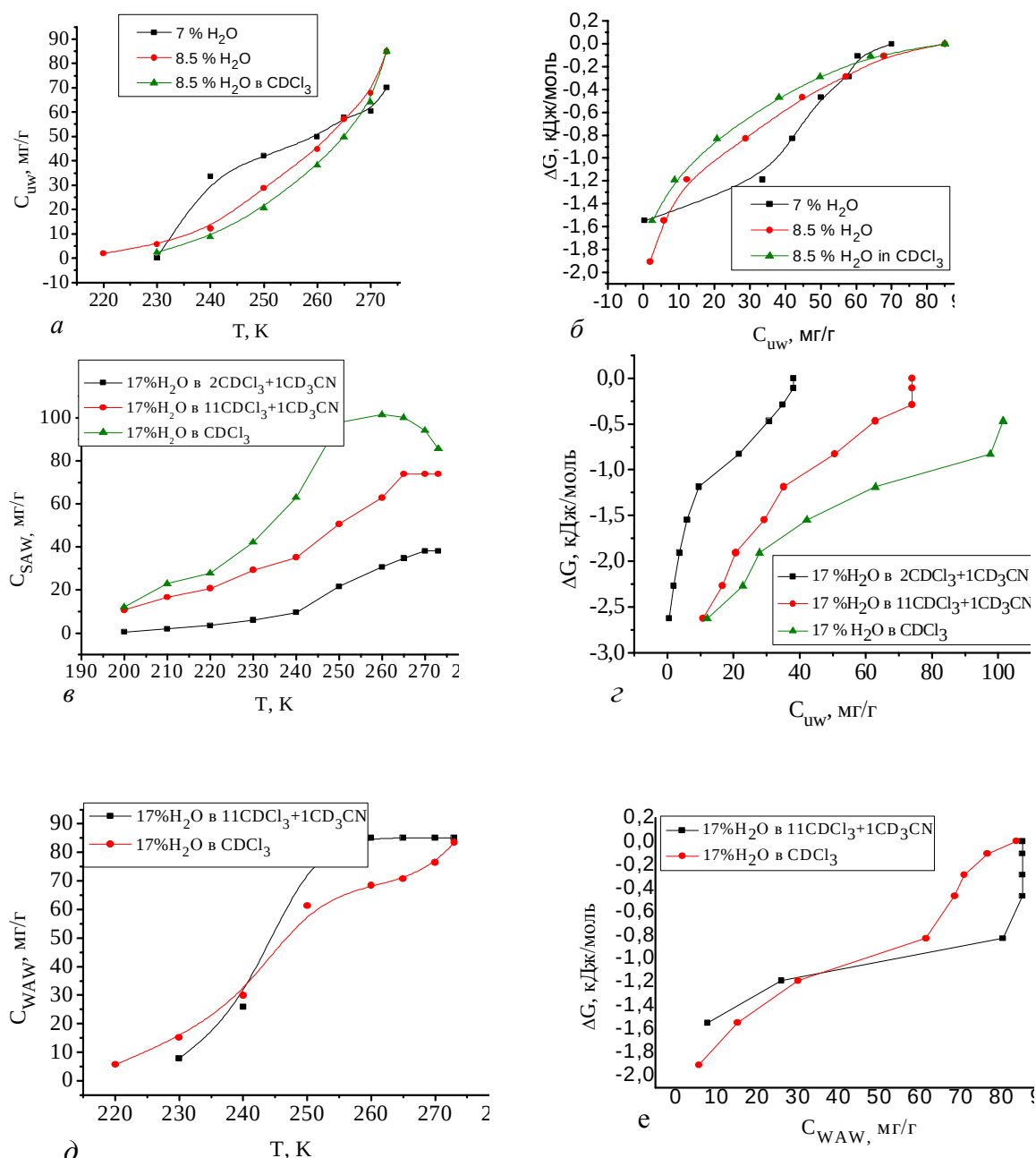
При низкой гидратированности образца ( $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} = 7 - 8,5$  % мас., рис. 9 а, б) спектр воды представляет собой широкий одиночный сигнал, максимум которого находится при значении химического сдвига протонов  $\delta_{\text{H}} \approx 5$  м.д., что близко к величине химического сдвига жидкой воды. В соответствии с классификацией, приведенной в [21], это сильноассоциированная вода (каждая молекула которой принимает участие в образовании по крайней мере двух водородных связей). При снижении температуры сигнал воды уменьшается и перестает наблюдаться в спектрах при  $T < 230$  К, т.е. большая часть адсорбируемой воды является слабосвязанной. В среде слабополярного ( $\text{CDCl}_3$ , рис. 9 в) или слабо электронодонорного органического растворителя ( $\text{CD}_3\text{CN}$ , рис. 9 г) максимум сигнала сдвигается в сторону сильных магнитных полей ( $\kappa \delta_{\text{H}} = 2,5$  м.д. в среде  $\text{CDCl}_3$  и  $\delta_{\text{H}} = 3$  м.д. в  $\text{CD}_3\text{CN}$ ). Это свидетельствует о стабилизации слабоассоциированных форм воды (WAW). Наличие в спектрах лишь одного сигнала воды может быть обусловлено быстрым (в шкале времени ЯМР) обменом молекул воды, которые входят в состав разных адсорбционных комплексов или значительной шириной сигналов [38]. В частности, в среде  $\text{CD}_3\text{CN}$  можно ожидать наличия быстрого обмена между молекулами WAW и воды, которая перешла в фазу жидкого ацетонитрила, где вода существует в виде водородносвязанных комплексов (ASW)  $\text{HO}-\text{H} \dots \text{N}-\text{CCH}_3$ .

С увеличением гидратированности до  $\text{C}_{\text{H}_2\text{O}} = 17$  % мас. (рис. 9 д-з) в спектрах  $^1\text{H}$  ЯМР регистрируется больше одного сигнала воды. В среде хлороформа отдельно

наблюдаются сигналы сильно- и слабоассоциированной воды (с химическими сдвигами  $\delta_H$  5 и 2 м.д., соответственно, рис. 9 д,е). Сигнал WAW (рис. 9 д) исчезает при  $T < 240$  К, т. е. большая часть этой воды является слабосвязанной. При добавлении к хлороформу небольшого количества (1:11) ацетонитрила (рис. 9 е) спектры воды почти не изменяются. Однако, если увеличить вклад ацетонитрила до 1:2 (рис. 9 ж), в спектрах появляется сигнал с  $\delta_H = 3,5$  м.д., обусловленный водой, растворенной в смеси органических растворителей (ASW). Химический сдвиг этой воды определяется образованием нею водородносвязанных комплексов с молекулами  $CD_3CN$ .



**Рис. 9.** Спектры  $^1H$  ЯМР воды нанокмпозитов ГЖА при их различной гидратируемости и составе дисперсионной среды: а – 7 %  $H_2O$ ; б – 8,5 %  $H_2O$ ; в – 8,5 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3$ ; г – 8,5 %  $H_2O$  в среде  $CD_3CN$ ; д – 17 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3$ ; е – 17 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3 + CD_3CN$  11:1; ж – 17 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3 + CD_3CN$  2:1; з – 17 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3 + DMSO-d_6$  1.5:1; и – 37 %  $H_2O$ ; к – 37 %  $H_2O$  в среде  $CDCl_3$ ; л – 37 %  $H_2O$  в среде  $CD_3CN$ .



**Рис. 10.** Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (а, в, д) и зависимости изменения свободной энергии Гиббса (б, г, е) для композита ГЖА с гидратированностью 7 и 8,5 % мас. (а, б), и 17 % мас. (в-е).

Одновременно сигнал слабоассоциированной воды значительно уменьшается по интенсивности и смещается в сторону сильных магнитных полей к значению  $\delta_H = 1$  м.д., т.е. сигнал WAW, который наблюдается на рис. 9 д,е обусловлен водой с несколько большей ассоциированностью чем на рис. 9 ж, при быстром молекулярном обмене между разными состояниями воды. С понижением температуры интенсивность сигнала WAW изменяется слабо, и при низкой температуре он расщепляется на два сигнала с несколько отличающимися величинами химического сдвига. Соответственно вода, которая осталась в слабоассоциированном состоянии, является сильносвязанной и неоднородной по своим структурным характеристикам.

При добавлении к хлороформу более сильного, чем  $CD_3CN$ , электронодонора – ДМСО-d6 (рис. 9 з), вид спектров существенно изменяется. Уменьшается интенсивность

не только слабоассоциированной, но и сильноассоциированной воды. Кроме того, сигнал SAW смещается в сторону слабых магнитных полей ( $\delta_H = 6,2$  м.д.). Сигнал ASW распадается на два сигнала, химический сдвиг которых уменьшается с повышением температуры, но с разными значениями термических коэффициентов, т.е. смесь  $(CD_3)SO - CCl_3$  более активно удаляет воду из межфазных прослоек образца ГЖА, чем смесь хлороформа с ацетонитрилом. Вероятно, два сигнала ASW обусловлены формированием водно-органической смеси не только в объеме, но и на межфазных границах частиц ГЖА, причем они существуют как отдельные фазы, между которыми обмен молекулами воды происходит медленно в шкале времени ЯМР. Большая величина химического сдвига кластеров SAW может быть связана с формированием слоистых кластерных структур, в которых молекулы ДМСО взаимодействуют с периферийными молекулами воды в кластерах SAW. Таким образом, ДМСО повышает среднее число водородных связей в кластерах SAW. При этом вся сильноассоциированная вода становится сильносвязанной.

С ростом гидратированности ( $C_{H_2O} = 37$  % мас. , рис. 9 *е-л*) интенсивность сигнала SAW существенно увеличивается. Однако, поскольку вода преимущественно является слабосвязанной, в среде  $CD_3CN$  (рис. 9 *л*) она легко переходит в органическую фазу. Из спектров видно, что как в неполярной среде бензола (рис. 9 *к*), так и довольно полярного ацетонитрила (рис. 9 *л*) в системах наблюдается некоторое количество слабоассоциированной воды. Эта вода может быть структурно неоднородной и существовать в виде двух состояний, для которых наблюдаются сигналы  $^1H$  ЯМР с несколько различной величиной химического сдвига.

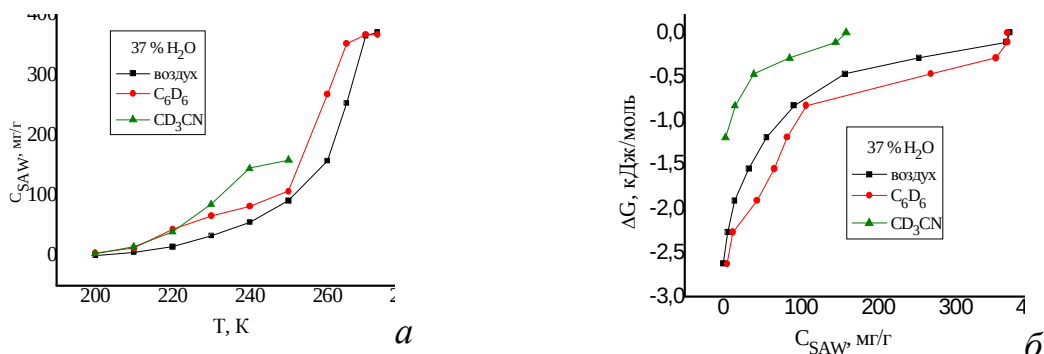
Приведенные на рис. 9 данные свидетельствуют, что в широких диапазонах  $C_{H_2O}$ , температуры, в присутствии органических веществ, связанная вода в составе композита ГЖА находится в кластерном состоянии, причем одновременно могут существовать несколько типов кластерных структур. В частности, могут быть идентифицированы кластеры сильно- и слабоассоциированной воды и водородносвязанные комплексы воды с электронодонорными растворителями. Эти комплексы могут существовать как в жидкой водно-органической фазе, так и на межфазной границе частиц нанокompозита.

Хлороформ, ацетонитрил и ДМСО способны стабилизировать слабоассоциированное состояние воды и изменять температуру замерзания межфазной воды. Даже при большом содержании электронодонора в хлороформе значительная часть воды не удаляется с поверхности нанокompозита ГЖА и находится в сильноассоциированном состоянии.

На рис. 10, 11 приведены температурные зависимости концентрации незамерзающей воды в исследуемых системах и построенные на их основе зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды. Характеристики слоев связанной воды суммированы в табл. 2. Распределение по радиусам кластеров разных типов воды, рассчитанные по уравнению (4) приведены на рис. 12. Несмотря на небольшое изменение величины  $C_{H_2O}$  (от 7 до 8 % мас. , рис. 10 *а*) зависимости  $C_{uw}(T)$  и  $\Delta G(C_{uw})$  изменяются существенно (рис. 10 *б*).

При  $C_{H_2O} = 8,5$  % мас. , значительная часть межфазной воды переходит из сильносвязанного ( $\Delta G < 0,5$  кДж/моль) в слабосвязанное состояние (табл. 2). Это свидетельствует об изменении строения кластеров адсорбируемой воды. Действительно, как следует из рис. 12 *а*, при  $C_{H_2O} = 7$  % мас., большая часть межфазной воды присутствует в виде кластеров с радиусом около 1 нм, в то время как при  $C_{H_2O} = 8,5$  % мас. значительно растёт вклад воды в кластерах с размерами 1,5–6 нм. Об изменении с ростом  $C_{H_2O}$  строения водных ассоциатов свидетельствует также уменьшение величины межфазной энергии ( $\gamma_s$ ), которая характеризует суммарное

изменение свободной энергии воды, обусловленное наличием границы раздела фаз (обычно наблюдается обратная закономерность). В среде хлороформа величина  $\gamma_s$  несколько уменьшается (табл. 2).



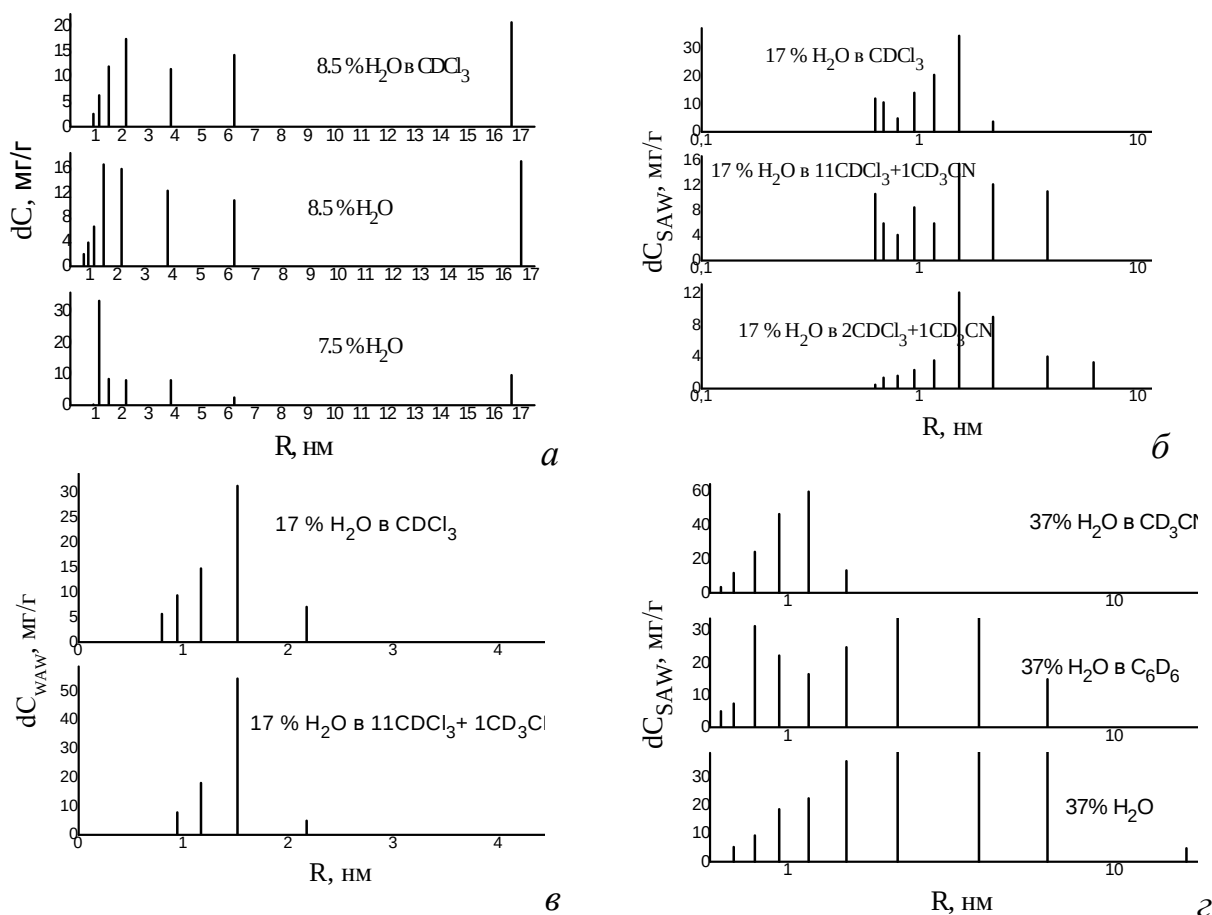
**Рис. 11.** Температурные зависимости концентрации незамерзающей воды (а) и зависимости изменения свободной энергии Гиббса (б) для композита ГЖА с гидратированностью  $C_{H_2O} = 37$  % мас.

**Таблица 2.** Термодинамические характеристики слоев воды, адсорбируемой нанокompозитом ГЖА, в разных средах

| $C_{H_2O}$<br>%мас. | Среда                    | $C_{uw}^s$ ,<br>мг/г | $C_{uw}^w$ ,<br>мг/г | $\Delta G^s$ ,<br>кДж/моль | $\gamma_s$ ,<br>Дж/г |
|---------------------|--------------------------|----------------------|----------------------|----------------------------|----------------------|
| 7                   | воздух                   | 50                   | 20                   | -1,5                       | 3,5                  |
| 8,5                 | воздух                   | 45                   | 40                   | -2,2                       | 2,8                  |
|                     | $CDCl_3$                 | 35                   | 55                   | -1,8                       | 2,2                  |
| 17                  | $CDCl_3$                 | 30 (SAW)             | 10                   | -3                         | 2,1                  |
|                     | 11 $CDCl_3$ + 1 $CD_3CN$ | 65 (SAW)             | 10                   | -3                         | 5,7                  |
|                     | 2 $CDCl_3$ + 1 $CD_3CN$  | 100 (SAW)            | —                    | -3                         | 8,9                  |
| 37                  | воздух                   | 150 (SAW)            | 220                  | -3                         | 12,9                 |
|                     | $C_6D_6$                 | 100 (SAW)            | 270                  | -3                         | 17,1                 |
|                     | $CD_3CN$                 | 25 (SAW)             | 125                  | -1,5                       | 8,9                  |

При концентрации адсорбированной на ГЖА воды 17 % мас. , сигналы сильно- и слабоассоциированной воды наблюдаются отдельно. На рис. 10 в, д приведены температурные зависимости концентрации SAW и WAW соответственно, а на рис. 10 г, е – зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды, рассчитанные в соответствии с формулой (4). По . По данным рис. 10 г, е и табл. 2 большая часть обоих типов воды относится к сильносвязанной. Минимальное количество SAW наблюдается для композита ГЖА в среде хлороформа. Это подтверждает стабилизацию хлороформом именно слабоассоциированных форм воды. Величина химического сдвига, наблюдаемого для WAW ( $\delta_H = 2$  м.д.), совпадает с полученным для образца при  $C_{H_2O} = 8,5$  % мас. (рис. 9 в). Вероятно, и при  $C_{H_2O} = 17$  % мас. во внутренних полостях ГЖА содержится значительное количество малых кластеров WAW, однако их размеры (0,6–2,2 нм, рис. 12 в) существенно меньше, чем в слабогидратированном образце. В присутствии ацетонитрила концентрация WAW и SAW уменьшается за счет перехода части адсорбированной композитом ГЖА воды в дисперсионную среду. При этом распределение по размерам WAW становится еще уже (рис. 12 в). Для кластеров SAW, наоборот, присутствие  $CD_3CN$  вызывает появление водных агрегатов с размерами до 6,5 нм (рис. 12 б).



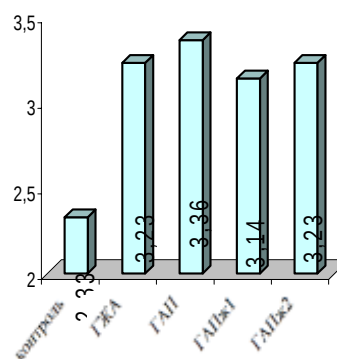
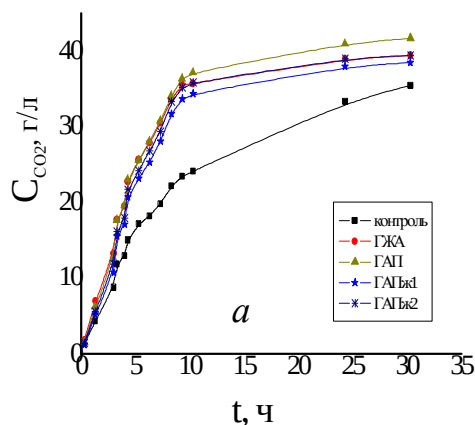


**Рис. 12.** Распределение по размерам водных структур в гидратированных нанокомпозитах ГЖА в воздушной и органической средах для  $C_{H_2O}$  7 и 8,5 % мас. (а); 17 % мас. (б, в), 37 % мас. (з).

С увеличением  $C_{H_2O}$  до 37 % мас. (рис. 11) на зависимостях  $\Delta G(C_{uw})$  появляются достаточно широкие участки, обусловленные слабосвязанной водой. Ее количество в воздушной среде достигает 220 мг/г, а в среде бензола увеличивается до 270 мг/г. Соответственно в распределениях по радиусам водных агрегатов появляются кластеры с размерами до 16 нм. Среда бензола несколько уменьшает взаимодействие кластеров SAW с поверхностью, при этом средний размер кластеров воды растет. Это обусловлено возможностью проникновения слабополярных веществ в узкий зазор между кластерами SAW и поверхностью, в результате чего их взаимодействие с поверхностью уменьшается. Подобный эффект наблюдался раньше в большинстве наноструктурированных материалов разной химической природы и морфологии [21]. В среде  $CD_3CN$  фиксируются кластеры SAW, радиус которых не превышает 1,6 нм. Это обусловлено частичным растворением адсорбированной на ГЖА воды в ацетонитриле. В результате измерение интенсивности сигнала SAW при температуре  $T > 250$  К затруднено ввиду перекрывания сигналов SAW и ASW (рис. 9).

Для оценки биосовместимости синтезированных композитов была исследована их активность по отношению к процессу брожения суспензии дрожжевых клеток (кривые газовыделения представлены на рис. 13). На начальной стадии брожения, при наличии достаточного количества питательных веществ, происходит активный процесс газовыделения клетками дрожжей. Со временем в растворе количество сахарозы уменьшается, что свидетельствует, по-видимому, о накоплении продуктов жизнедеятельности клеток и замедление процессов газовыделения.

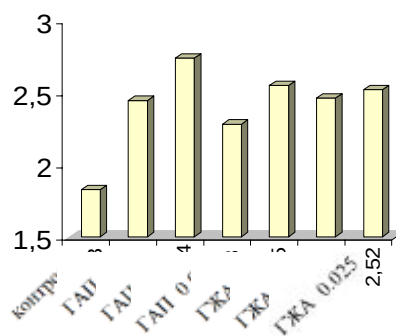
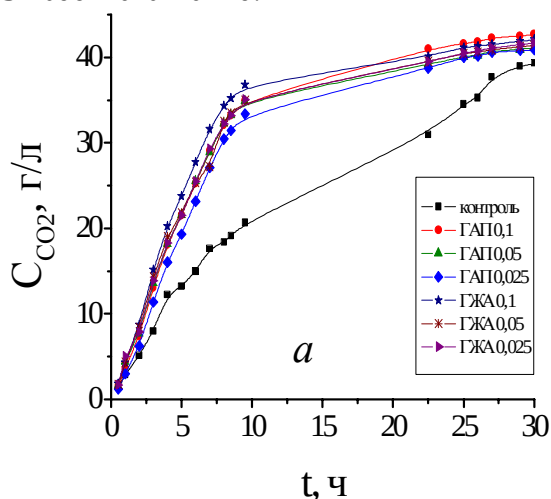
Как видно из рис. 13 *а*, по сравнению с контролем полученные образцы (ГАП, ГЖА, ГАПж1, ГАПж2) способствуют активному выделению  $\text{CO}_2$  дрожжевыми клетками. В течение первых 10 ч наблюдается значительный рост концентрации выделенного  $\text{CO}_2$  за 1 ч для образцов ГАП и ГЖА (рис. 13 *б*), а интегральные количества выделенного  $\text{CO}_2$  в 1,5 раза превышают контроль и равняются 3,36 и 3,23, соответственно.



*б*

**Рис. 13.** Кинетические кривые выделения  $\text{CO}_2$  дрожжевыми клетками в присутствии ГАП и нанокompозитов, созданных на его основе (*а*), и интегральные количества выделенного  $\text{CO}_2$  в течение 30 ч (*б*).

При исследовании влияния разных концентраций ГАП (массой 0,025–0,1 г) и ГЖА (0,025–0,1 г) на биоактивность суспензии клеток дрожжей оказалось, что в течение первых 5–10 ч наблюдается активное увеличение концентрации выделенного  $\text{CO}_2$  для всех образцов, независимо от количества внесенного наноматериала (рис. 14 *а*). Коэффициент выделения  $\text{CO}_2$  за 30 ч эксперимента имеет наибольшее значение для образца ГАП 0,05, в то время как образцы ГЖА 0,1 и ГЖА 0,025 (независимо от массы) имеют приблизительно одинаковые значения коэффициентов выделения  $\text{CO}_2$  – 2,55 и 2,52 соответственно.



*б*

**Рис. 14.** Кинетические кривые выделения  $\text{CO}_2$  дрожжевыми клетками в присутствии разных концентраций ГАП и нанокompозитного материала ГЖА (*а*) и интегральные количества выделенного  $\text{CO}_2$  в течение 30 ч (*б*).

Таким образом, синтезированные наноматериалы значительно ускоряют процессы жизнедеятельности клеток (рис. 13, 14). Наибольшая разница, по сравнению с контролем, наблюдается через 10 ч с момента начала процесса брожения, но она сохраняется и к окончанию эксперимента. Максимальную активность в стимулировании газовой выделения в течение 30 ч проявляет образец, в котором концентрация ГАП составляла 0,05 г, что немногим больше чем для образца ГЖА с массой 0,1 г (рис. 14). Хотя различие в стимулирующих свойствах ГАП и ГЖА на процесс газовой выделения дрожжей относительно незначительно, его механизм для этих наноматериалов может быть разным.

На поверхности ГАП содержится значительное количество ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которые могут служить центрами связывания сахарозы по карбонильной группе. При контакте частиц ГАП с адсорбируемой на их поверхности сахарозой с клетками может происходить дополнительный перенос к клеткам питательных веществ. В случае нанокompозита ГЖА поверхность гидроксиапатита экранирована от среды молекулами биополимеров (желатина и альбумина). Однако, как следует из данных  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии (рис. 9), на границе частиц с гидрофобными участками поверхности клеток, могут возникать слои слабоассоциированной воды, которая влияет на проницаемость клеточных мембран (увеличивая ее). Это может приводить к ускорению процессов жизнедеятельности, а, соответственно, и газовой выделению. Следовательно, синтезированный на основе ГАП и белковых молекул нанокompозит проявляет высокую биосовместимость по отношению к тестовым культурам (дрожжевым клеткам), что позволяет говорить об активации процессов метаболизма и, соответственно, полагать, что ГЖА может быть использован при биометрическом тестировании совместимости с материалом натуральной костной ткани.

## Выводы

На основе наноразмерного гидроксиапатита и белков, желатина и альбумина, синтезирован нанокompозит, гидратационные свойства которого близки к натуральной костной ткани. Методами ИК-спектроскопии подтверждено наличие адсорбционных взаимодействий между макромолекулами белков и частицами гидроксиапатита, а также обнаружено, что в минеральной составляющей композита ГЖА так же как и в ГАП содержится значительное количество карбонатных групп. Содержание белковой компоненты композита ГЖА рассчитанное по данным ТГ анализа, составляет 12,7 % мас. Согласно данным ДСК, радиус водных агрегатов слабосвязанной воды в гидратированном образце ГЖА находится в интервале 1,5–80 нм. По данным фотон-корреляционной спектроскопии размер частиц синтезированных материалов после их ультразвуковой обработки находится в диапазоне 80–100 нм.

Вода, адсорбируемая частицами нанокompозита ГЖА при контакте с органическими веществами, проявляет гетерогенную, кластерную структуру и, в зависимости от органической среды, может находиться в сильноассоциированном и слабоассоциированном состояниях, а также частично переходить в жидкую фазу, если та содержит электронодонорные растворители ацетонитрил и ДМСО. В среде хлороформа адсорбированная вода может присутствовать одновременно в слабоассоциированном (с малым числом водородных связей) и сильноассоциированном состояниях, причем слабоассоциированная вода является слабосвязанной, то есть способная замерзать при относительно высоких  $> 250$  К температурах. С помощью ЯМР-криопорометрии на межфазной границе ГЖА могут быть зафиксированы водные агрегаты с радиусом 0,6–2,2 нм для слабоассоциированной воды и 0,6–16 нм для сильноассоциированной.

Синтезированный образец ГЖА показал хорошую биосовместимость с клеточными объектами (дрожжевые клетки). В его присутствии происходит существенное ускорение процессов жизнедеятельности клеток, которая делает

синтезированный материал перспективным для тестирования в качестве синтетического заменителя костной ткани.

Работа выполнена при поддержке Украинского научно-технологического центра (проект № 3832) и международного гранта 7 Европейской Рамочной Программы (FP7-IRSES „Compositum”), Marie Curie Action, PEOPLE, International Research Staff Exchange Scheme (IRSES).

## Литература

1. Тертых В.А., Павлов В.В, Машенко В.М., Чуйко А.А. Формы адсорбированной и структурной воды на поверхности дисперсного кремнезема // Докл. АН СССР. – 1971. – Т.201. – С. 913–916.
2. Кремнеземы в медицине и биологии / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: УКРИНТЭИ Ставрополь. – 1993. – 259 с.
3. Чуйко О.О., Пентюк О.О. Наукові принципи розробки лікарських препаратів на основі високодисперсного кремнезему // Наук. основи розробки лікар. препаратів.– Харків: Основа. – 1998. – С. 35–51.
4. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния // Под ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наук. думка. – 2003. – 415 с.
5. Turov V.V., Mironyuk I.F. Adsorption layers of water on the surface of hydrophilic, hydrophobic and mixed silicas // Coll. and Surf. A: – 1998. – V. 134. – P. 257–263.
6. Туров В.В. Слои связанной воды и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов // В кн. Химия поверхности кремнезема / Под ред. А.А. Чуйко. – Киев:УКРИНТЭИ – 2001.– С. 510–607.
7. Turov V.V., Gun'ko V.M., Bogatyrev V.M., Zarko V.I., Gorbik S.P., Pakhlov E.M., Leboda R., Shulga O.V., Chuiko A.A. Structured water in partially dehydrated yeast cells and at partially hydrophobized fumed silica surface // J. Coll. Interf. Sci. – 2005. – V.283, N 2. –P. 329–343.
8. V.V. Turov, V.M. Gun'ko, A.P. Shpilko, R.Leboda, M.Jablonski, M.Gorzela, E. Jagiello–Wojtowicz. Bounded water in human bone tissues healthy and affected by osteoporosis // Theor. and experim. studies of interfacial phenomena and their technological applications. P. 2. – 2006. – P. 189–191.
9. Бакунова Н.В., Баринов С.М., Шворнева Л.И. Влияние температуры синтеза на размер наночастиц гидроксиапатита // Рос. технологии. – 2006 – Т.2, №9–10. – С. 102–105.
10. Elliot J.C. Structure and chemistry of the apatites and other calcium orthophosphates // Amsterdam: Elsevier. – 1994. –150p.
11. Murugan R., Ramakrishna S. Crystallographic study of hydroxyapatite bioceramics derived from various sources // Cryst Growth Des. – 2005. – V.5. – P. 111–112.
12. Ковешников В.Г., Абакаров М.Х., Лузин В.И. Скелетные ткани: хрящевая ткань, костная ткань. – Луганск: Изд.-во Луган. госмедун-та – 2000. – с.50.
13. Chang M.C., Ko C.C., Douglas W.H. Preparation of hydroxyapatite–gelatin nanocomposite // Biomaterials. – 2003. – V.24. – P. 2853–2862.
14. Zhao F., Yin Y., Lu W.W. Preparation and histological evaluation of biomimetic tree–dementional hydroxyapatite/chitosan–gelatin network composite scaffolds // Biomaterials. – 2002. – V.23. – P. 3227–3234.
15. Sundaram J., Durance T. D., Wang R. Porous scaffold of gelatine – starch with nanohydroxyapatite composite processed via novel microwave vacuum drying // Acta Biomater. – 2008.– V.4. – P. 932–942.

16. Li J., Chen Y., Yin Y., Yao F., Yao K. Modulation of nano-hydroxyapatite size via formation on chitozan- gelatin network film in situ // *Biomaterials*. – 2007. – V.28. – P. 781–790.
17. Chen M., Tan J., Lian Y., Liu D. Preparation of Gelatin coated hydroxyapatite nanorods and the stability of its aqueous colloidal // *Appl. Surf. Sci.*– 2008. – V.254. – P. 2730–2735.
18. Shu C., Xianzhu Y., Zhangyin X., Guohua X., Hong Lv., Kangde Yao. Synthesis and sintering of nanocrystalline hydroxyapatite powders by gelatin – based precipitation method // *Ceram. international*. – 2007. – V.33. – P. 193–196.
19. Turov V.V., Gun'ko V.M., Zarko V.I., Leboda R., Jablonski M., Gorzelak M., Jagiello-Wojtowicz E. Weakly and strongly associated nonfreezable water bound in bones // *Coll. and Surf.* – 2006. – V. 48. – P. 167–175.
20. Gun'ko V.M., Turov V.V., Shpilko (Golovan) A.P., Leboda R., Jablonski M., Gorzelak M., Jagiello-Wojtowicz E. Relationships between characteristics of interfacial water and human bone tissues // *Coll. and Surf.* – 2006. – V. 53. – P. 29–36.
21. Гунько В.М., Туров В.В., Горбик П.П. Вода на межфазной границе /В кн.под. ред. В.В. Гончарука. – Київ: Наук. думка – 2009. – С.257–265, 372.
22. Туров В.В., Гунько В.М., Горбик П.П., Цапко М.Д., Головань А.П. Процессы самоорганизации водно-органических систем в наноразмерном пространстве твердых тел и биологических объектов // В кн. Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур / Ред. Шпак А.П., Горбик П.П. – Київ: Наук. думка. – 2007. – С. 91–157.
23. Turov V.V., Gun'ko V.M., Nechypor O.V., Golovan A.P., Kaspersky V.A., Turov A.V., Leboda R., Jablonski M., Gorbik P.P. Self-organization of water-organic systems in bone tissue and products of their chemical degradation // *Nanomaterials and Supramolecular Structures: Physics, Chemistry, and Applications*. – London Springer. – 2009. P. 26 – 32.
24. Головань А.П., Туров В.В., Барвинченко В.М., Мищенко В.М., Горбик П.П., Шевченко Ю.Б. Наноструктурированные композиты на основе белков костной ткани, высокодисперсного кремнезема и гидроксиапатита // *Хімія, фізика та технологія поверхні*. – 2007. – Вип. 13. – С. 309–316.
25. Касавина Б.С, Торбенко В.П. Жизнь костной ткани – Москва: Наука, 1979. –27 с.
26. Высоцкая Е.В., Тарасевич Ю.И., Климова Г.М., Кузьменко Л.Н. Синтез гидроксиапатитов и применение получаемых материалов для извлечения ионов тяжелых металлов из водных растворов // *Химия и технология воды* – 2002. – Т.24., №6.– С.535–546.
27. Brunauer J.S., Emmet P.H., Teller E. Adsorption of gases in multimolecular layers // *J. Amer. Chem. Soc.* – 1938. – V.60 – P. 309–319.
28. Gun'ko V.M. , Turov V.V. , Bogatyrev V.M. , Zarko V.I. , Leboda R. , Goncharuk E.V. , Novza A.A. , Turov A.V. , Chuiko A.A. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic Interfaces // *Adv. Coll. Interf. Sci.* – 2005 – V. 118. – P. 125 – 172.
29. Turov V.V., Leboda R. Application of  $^1\text{H}$  NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Coll. Interf. Sci.* .– 1999. – V. 79. – P. 173–211.
30. Термодинамические свойства индивидуальных веществ / Под ред. В.П. Глушкова.– Москва: Наука, – 1978. – 495с.
31. Strange J.H., Rahman M., Smith E.G. Characterisation of porous solids by NMR // *Phys. Rev. Lett.* – 1993. – V.71.– P. 3589–3591.

32. Petrov O.V., Furo I. NMR cryoporometry: principles, application and potential // Progr. in NMR spectroscopy . – 2009. – V. 54. – P. 97–122.
33. Большой практикум по микробиологии / Под ред. Г.Л. Силибер. – Москва: Высш. шк., – 1962. – 503 с.
34. Danilchenko S.N., Pokrovskiy V.A., Bogatyrov V.M., Sukhodub L.F., Sulkio–Cleff B. Carbonate location in bone tissue mineral by X–ray diffraction and temperature–programmed desorption mass spectrometry // Cryst. Res.Technol. – 2005. – V.40, №7.– P. 692–697.
35. Kikuchi M., Ikoma T., Itoh S., Matsumoto H.N., Koyata Y. et. al. Biomimetic synthesis of bone like nanocomposites using the self organization mechanism of hydroxyapatite and collagen // Composite Sci. and Technology . – 2004.– V.64. – P. 819–825.
36. Тарасевич Ю.И. Монахова Л.И. Взаимодействие глобулярных белков с поверхностью кремнеземов // Коллоид. журн. – 2002. – Т.64., №4. – С. 535–40.
37. Чргадзе Ю.Н. Инфракрасные спектры и структура полипептидов и белков. – Москва: Наука. –1965. – 380 с.
38. Abragam A. The principles of nuclear magnetism. – Oxford: Oxford University. – 1961. –279 p.

## МОДЕЛЮВАННЯ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ НАНОКОМПОЗИТНИМИ СИСТЕМАМИ НА ОСНОВІ ГІДРОКСИАПАТИТУ – АЛЬБУМІНУ – ЖЕЛАТИНИ ТА ЇХНІ ВЛАСТИВОСТІ

**А.П. Головань<sup>1</sup>, А.О. Ругаль<sup>1</sup>, В.М. Гунько<sup>1</sup>, В.М. Барвинченко<sup>1</sup>,  
Я. Скубишевська-Зіємба<sup>2</sup>, Р. Лебода<sup>2</sup>, Т.В. Крупська<sup>1</sup>, В.В. Туров<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Інститут хімії поверхні ім. О.О. Чуйка Національної академії наук України,  
вул. Генерала Наумова, 17, Київ, 03164, Україна

<sup>2</sup>Університет Марії Кюрі-Скłodовської пл. Марії Складовської Кюрі 3, Люблин,  
20-031 Польща

*На основі нанорозмірного гідроксиапатиту (ГАП) та білків, желатину та сироваткового альбуміну, синтезовано нанокмпозитний матеріал (ГЖА), гідратаційні властивості якого близькі до властивостей натуральної кісткової тканини. Методами ІЧ-спектроскопії підтверджена наявність адсорбційної взаємодії між макромолекулами білків та частинками гідроксиапатиту, а також виявлено, що в мінеральній складовій композиту ГЖА, подібно до ГАП, міститься значна кількість карбонатних груп. Згідно даних ДСК, радіус водних агрегатів слабозв'язаної води в гідратованому зразку ГЖА знаходиться в інтервалі 1,5 - 80 нм. За даними фотон-корреляційної спектроскопії, розмір частинок синтезованих матеріалів, після їхньої ультразвукової обробки, знаходиться в діапазоні 80-100 нм. Показано, що вода, адсорбована частинками нанокмпозиту ГЖА, при контакті з органічними речовинами проявляє гетерогенну, кластерну структуру та залежно від органічного середовища може перебувати в сильноасоційованому або слабоасоційованому станах, а також частково переходити в рідку фазу, якщо та містить електронодонорні розчинники ацетонітрил або ДМСО. Властивості синтезованого нанокмпозиту у водно-органічних розчинах близькі до аналогічних характеристик природного кісткового матеріалу. ГЖА проявив високу біосумісність з клітинними об'єктами (дріжджові клітини). У його присутності відбувається істотне прискорення процесів життєдіяльності клітин, що робить синтезований матеріал перспективним для тестування як синтетичний замінник кісткової тканини.*

# MODELLING OF BONE TISSUE BY NANOCOMPOSITE SYSTEMS ON THE BASIS OF HYDROXYAPATITE – ALBUMIN – GELATINE AND THEIR PROPERTIES

**A.P. Golovan<sup>1</sup>, A.A. Rugal<sup>1</sup>, V.M. Gun`ko<sup>1</sup>, V.N. Barvinchenko<sup>1</sup>,  
Ya. Skubiszewska-Zięba<sup>2</sup>, R. Leboda<sup>2</sup>, T.V. Krupska<sup>1</sup>, V.V. Turov<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>*Chuiko Institute of Surface Chemistry, National Academy of Sciences of Ukraine,  
17 General Naumov Str. Kyiv, 03164, Ukraine*

<sup>2</sup>*Maria Curie-Skłodowska University, pl. Marii Curie-Skłodowskiej 3, 20-031 Lublin, Poland*

*Nanocomposite material on the basis of nano-hydroxyapatite (HAP) and proteins, gelatine and serum albumin (HGA) was synthesized. Its hydration properties were found to be similar to those of a natural bone tissue. Adsorption interactions between the protein macromolecules and hydroxyapatite particles were confirmed by FTIR-spectroscopy. It was found that the mineral component of the HGA composite, as well as HAP, contains significant amount of carbonate groups. According to DSC, the radius of water aggregates of weakly bound water in the hydrated sample of HGA is in the range of 1.5 – 80 nm. The photon-correlation spectroscopy has indicated that the particle size of the synthesized materials after their ultrasonic treatment is in the range of 80 – 100 nm. It is shown that the water adsorbed by particles of HGA nanocomposite, when contacts with organic substances displays heterogeneous, cluster structure. Depending on the composition of the organic medium, water can exist in strongly associated or weakly associated state, and partially passes into a liquid phase if the latter contains electrono-donor solvents, acetonitrile or DMSO. The properties of the synthesized HGA nanocomposite in aqueous-organic solutions are close to similar characteristics of a natural bone material. HGA showed good biocompatibility with cellular objects (yeast cells). Synthesized material significantly accelerates the processes of cell live activity what makes it a promising model for testing as a synthetic substitute for bone tissue.*