

МИНИСТЕРСТВО ОБРАЗОВАНИЯ И НАУКИ РФ

Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского

Учебно-научный и инновационный комплекс
«Новые многофункциональные материалы и нанотехнологии»

Буланов Е.Н.

**ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ
НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫХ
МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА**

Электронное учебно-методическое пособие

Учебная дисциплина: «Введение в технологию наноматериалов»
Специальности, направления:
020100 «Химия», 020201 «Фундаментальная и прикладная химия»,
240100 «Химическая технология»

Нижний Новгород

2012

УДК 544.2
ББК 24.5

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ
БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА.
Буланов Е.Н.: Электронное учебно-методическое пособие. – Нижний Новгород:
Нижегородский госуниверситет, 2012. – 103 с.

Рецензент: к.х.н., ст. преподаватель каф. неорганической химии ННГУ
О.Ю. Трошин

В настоящем пособии изложены основные сведения о наноструктурированных биосовместимых материалах на основе гидроксиапатита и их применении в медицине. Приведены основные методы получения и физико-химического исследования таких материалов, включая подробное описание особенностей работы на современном исследовательском оборудовании.

Электронное учебно-методическое пособие рекомендовано методической комиссией химического факультета для студентов ННГУ, обучающихся по направлениям подготовки 020100 «Химия» и 240100 «Химическая технология», специальности 020201 «Фундаментальная и прикладная химия», а также аспирантов и сотрудников химического факультета.

Ответственный за выпуск:
зам. председателя методической комиссии химического факультета
ННГУ
к.х.н, доцент А.В. Маркин

© Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского,
2012

Содержание

Введение	4
I. Наноматериалы	5
I.1. Чему соответствует единица "нано"?	5
I.2. Виды нанообъектов	8
I.3. Размерные эффекты	26
II. Биосовместимые материалы на основе фосфатов кальция	30
II.1. Основные данные об ортофосфатах кальция	30
II.2. Наноразмерные и нанокристаллические ортофосфаты кальция в костных тканях млекопитающих	32
II.2.1. Кости	32
II.2.2. Зубы	35
II.3. Наноразмерные и нанокристаллические ортофосфаты кальция и костные клетки	43
II.4. Стоматологические приложения	45
II.5. Другие области применения	48
III. Новые подходы к получению наноструктурированных материалов на основе гидроксиапатита для медицины	50
III.1. Синтез гидроксиапатита	50
III.2. Керамика	53
III.3. Вискеры	55
III.4. Биологическая совместимость	58
IV. Получение и исследование биосовместимых материалов на основе гидроксиапатита	64
IV.1. Лабораторная работа №1	64
IV.2. Лабораторная работа №2	79
IV.3. Лабораторная работа №3	81
IV.4. Лабораторная работа №4	88
IV.5. Лабораторная работа №5	97
Литература	100

Введение

Электронная учебно-методическая разработка направлена на ознакомление обучающихся с методами получения и физико-химического исследования биосовместимых наноматериалов и получение соответствующих экспериментальных навыков.

Актуальность учебно-методической разработки определяется двумя факторами. Во-первых, разработка посвящена изучению биосовместимых наноматериалов на основе гидроксиапатита. Данное направление в настоящее время развивается многими отечественными и мировыми научными школами ввиду того, что данные материалы очень перспективны для создания имплантатов костной ткани, которые не только не будут отторгаться организмом, но и постепенно становятся его частью. Большой объем публикаций, посвященных этим вопросам, а также существенные инвестиции в развитие проектов данной тематики (программа ФЦП, фонды РФФИ, «Сколково», «Фонд содействия развитию малых форм предприятий в научно-технической сфере» др.). Данная разработка (как и все направление исследований) имеет, таким образом, высокую научную ценность, заключающуюся в разработке новых методов получения наноструктурированных биосовместимых и изменения подхода к их исследованию с феноменологического к систематическому.

Во-вторых, комплекс лабораторных работ направлен на освоение обучающимися высокотехнологичного оборудования, закупленного ННГУ им. Н.И. Лобачевского по национальным проектам «Образование» и «Национальный исследовательский университет». Практическая ценность разработки заключается не только в создании заготовок биосовместимых наноматериалов для медицинского применения, но и в формировании у обучающихся навыков работы на высокотехнологичном современном химическом оборудовании.

I. Наноматериалы

I.1. Чему соответствует единица «нано»?

Там... внизу... еще очень много места...

Р. Фейнман, нобелевский лауреат по физике (1959 г)

В настоящее время можно говорить о том, что появилась совершенно самостоятельная область знаний – нанонаука. Фактически эта новая наука находится на пересечении физики, химии и биологии и сочетает в себе представления, направленные на создание новых фундаментальных знаний. На многих объектах физики, химии и биологии показано, что переход от макрообъектов к наночастицам приводит к качественным изменениям физико-химических свойств отдельных соединений и получаемых на их основе систем. Легко заметить, что название новой отрасли знаний возникло просто в результате добавления к весьма общему понятию "наука" приставки "нано", означающей изменение масштаба в 10^9 (миллиард) раз. Таким образом, 1 нанометр = 1 нм = 10^{-9} м, что составляет одну миллионную привычного для нас миллиметра (для наглядности можно указать, что 1 нм примерно в 100 тысяч раз меньше толщины человеческого волоса).

Что же такое «наночастица»? Термин «наночастица» прочно вошел в научный лексикон около 20 лет назад, однако критерий наноразмерности до сих пор является предметом научных дискуссий. Согласно международной конвенции IUPAC, предельный (максимальный) размер наночастиц соответствует 100 нм, хотя эта величина является условной и необходима только для формальной классификации. Последнее время определение наночастиц связывают не с их размером, а с проявлением у них новых свойств, отличных от свойств объемной фазы. Действительно, при переходе вещества от макроразмеров к размерам, всего на один-два порядка больше молекулярных, резко меняются его свойства — с увеличением удельной поверхностной энергии изменяется его поверхностное натяжение, температура плавления и температуры структурных переходов, может измениться сама структура, его










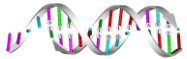
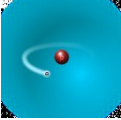
электронные характеристики, то есть весь спектр физико-химических свойств становится иным, чем для веществ в макросостоянии. Поэтому критерием принадлежности частицы того или иного вещества к классу наночастиц правильнее считать сопоставление ее размера с корреляционным радиусом того или иного физического явления (например, с длиной свободного пробега электронов или фононов, длиной когерентности в сверхпроводнике, размерами магнитного домена или зародыша твердой фазы).

В таблице I.1 приведены размеры некоторых известных естественных и искусственных созданий природы в диапазоне размеров от 10 метров до 1 ангстрема. 1 ангстрем ($1 \text{ \AA} = 10^{-10} \text{ м}$) в 10 раз меньше нанометра и соответствует диаметру самого маленького из атомов (атома водорода). Как уже отмечалось, нанотехнологии принято относить процессы и объекты с характерной длиной от 1 до 100 нм. Верхняя граница нанообласти соответствует минимальным элементам в так называемых БИС (больших интегральных схемах), широко применяемым в полупроводниковой и компьютерной технике. С другой стороны, интересно, что многие вирусы имеют размер 10 нм, а 1 нм почти точно соответствует характерному размеру белковых молекул (в частности, радиус знаменитой двойной спирали молекулы ДНК равен именно 1 нм).

Из сказанного ясно, что нанотехнология как бы объединяет все технические процессы, связанные непосредственно с атомами и молекулами. Именно поэтому она представляется весьма перспективной для получения новых конструкционных материалов, полупроводниковых приборов, устройств для записи информации, ценных фармацевтических препаратов и т.д.

Различают два типа наночастиц: нанокластеры, или нанокристаллы, и собственно наночастицы. К первому типу относят частицы упорядоченного строения (часто центросимметричные) размером 1-5 нм, содержащие до 1000 атомов, ко второму — собственно наночастицы размером 5-100 нм, состоящие из 10^3 - 10^8 атомов.

Таблица I.1. Место наноразмерных объектов в окружающем нас мире

	КИТ	
10 м	человек	
1 м	птичье гнездо	
10 см - 10^{-1} м	таракан	
1 см - 10^{-2} м	муравей, песчинка	
1 мм - 10^{-3} м	толщина листа бумаги, яйцеклетка, крупная амеба	
100 мкм - 10^{-4} м	биоклетка, толщина человеческого волоса	
10 мкм - 10^{-5} м	эритроцит крови, кишечная палочка	
1 мкм - 10^{-6} м	минимальный размер элементов БИС	
100 нм - 10^{-7} м	вирус, углеродные нанотрубки	
10 нм - 10^{-8} м	белковая молекула, диаметр спирали ДНК	
1 нм - 10^{-9} м	диаметр атома водорода	
$1 \text{ \AA} - 10^{-10}$ м		

Нитевидные и пластинчатые частицы могут содержать гораздо большее количество атомов и иметь один или даже два линейных размера, превышающих пороговое значение, но их свойства в определенном направлении остаются характерными для вещества в нанокристаллическом состоянии. Если наночастица имеет сложную форму и строение, то в качестве характеристического рассматривают не линейный размер частицы в целом, а

размер ее структурного элемента. Такие частицы, как правило, называют наноструктурами, причем их линейные размеры могут значительно превышать 100 нм.

1.2. Виды нанообъектов

Различия в линейных размерах наночастиц делают целесообразным подразделять их на нуль-, одно-, двух- и трехмерные (соответственно, 0D-, 1D-, 2D- и 3D-наночастицы). К **нульмерным наноструктурам** относят свободные и стабилизированные кластеры, фуллерены и эндофуллерены и квантовые точки.

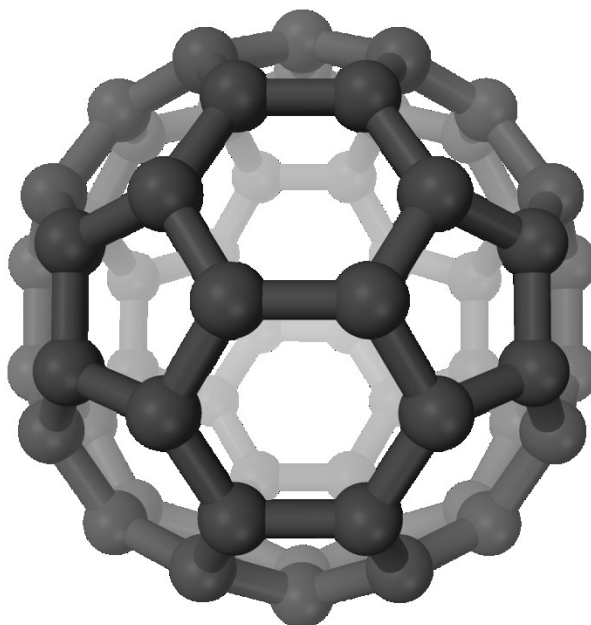


Рис. 1.1. Фуллерен C_{60}

Фуллерен с химической точки зрения представляет собой аллотропную модификацию углерода, уникальную своей молекулярной структурой — практически идеальные шарики удерживаются вместе только слабыми Ван-дер-Ваальсовыми силами (рис. 1.1). В настоящее время обсуждается возможность самых необычных применений этого соединения в нанoeлектронике, медицине, технике (например, в качестве основы для синтеза искусственных алмазов,

элементов квантовых компьютеров, для создания новых электронных приборов, для защиты тканей от радиации, а также в составе лекарств и смазочных веществ).

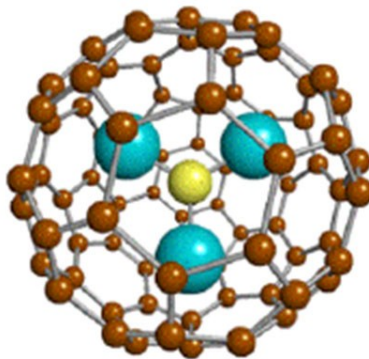


Рис.1.2. Эндофуллерен $Sc_3N@C_{80}$

Молекула фуллерена может содержать только четное количество атомов углерода. Так, молекула C_{60} построена из атомов углерода, находящихся в состоянии sp^2 -гибридизации, в результате чего каждый атом имеет по три соседа, связанных с ним σ -связями. Но, как всем известно, валентность углерода равна четырем, поэтому оставшиеся валентные электроны образуют π -систему молекулы из делокализованных двойных связей «углерод-углерод». С помощью математических расчетов показано (теорема Эйлера), что существуют только многогранники, удовлетворяющие соотношению $V + G - P = 2$ (V — число вершин, G — число граней, а P — число ребер). Поэтому невозможно сверткой идеально ровного графитового листа, который является наиболее энергетически выгодной углеродной структурой из sp^2 -гибридизованных атомов, получить замкнутый многогранник, состоящий только из шестичленных циклов. Следовательно, поверхность фуллерена должна также включать другие грани с меньшим числом вершин — пентагоны, причем если число шестиугольных граней может быть произвольным, то пятиугольных должно быть равно 12. Это только необходимое, но

недостаточное условие существования фуллера — простейший, согласно расчетам, его представитель C_{20} до сих пор экспериментально не получен — при синтезе преимущественно образуются высшие фуллерены, вероятно, из-за стабильности таких каркасов. Отсутствие малых фуллеренов связано с тем, что с уменьшением размера структура становится более напряженной и склонной к полимеризации. Сам по себе фуллерен плохо растворим в воде и не проводит электрический ток, однако модификация поверхности фуллеренового «шара» или заполнение его внутреннего пространства атомами металлов (рис. 1.2) приводит к заметному изменению физических свойств, например переходу в сверхпроводящее состояние или проявлению магнетизма.

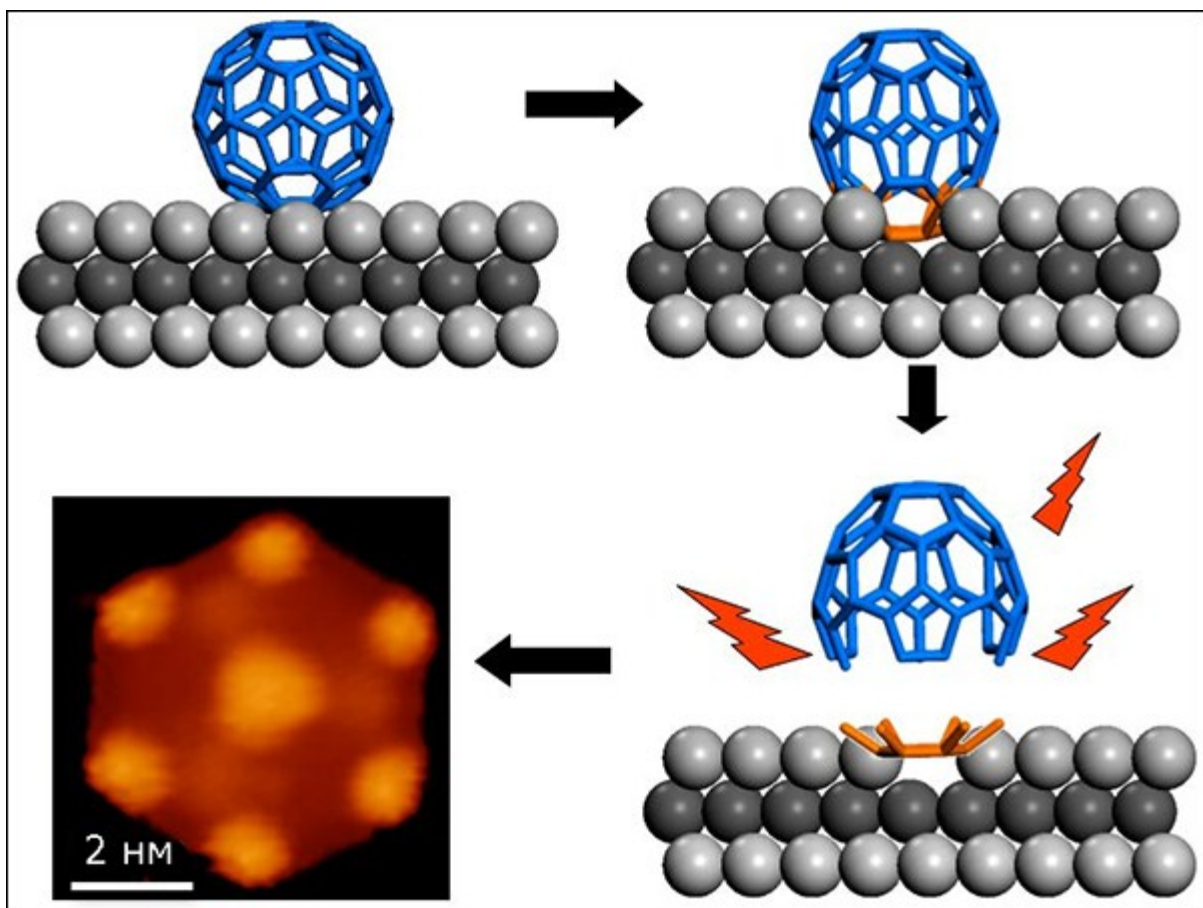


Рис. 1.3. Преобразование молекул C_{60} в квантовые точки размером менее 10 нм

Квантовые точки (КТ) — это изолированные нанообъекты, свойства которых существенно отличаются от свойств объемного материала тождественного состава (рис. 1.3). Сразу следует отметить, что квантовые точки являются скорее математической моделью, нежели реальными объектами. Это связано с невозможностью формирования полностью обособленных структур — малые частицы всегда взаимодействуют с окружающей средой, находясь в жидкой или твердой матрицах. Впервые структуры такого типа были получены профессором Промышленного факультета Токийского университета Х. Сакаи.

Говоря очень упрощенно, квантовая точка – новое понятие современной физики, означающее некоторую искусственно созданную область вещества, в которой можно «хранить» небольшие количества электронов.

Вообще говоря, механизм действия большинства полупроводниковых устройств и приборов основан именно на регулировании потока электронов. Транзисторы имеют в настоящее время размеры несколько мкм и управляют движением «потока», содержащего от сотен тысяч до 1 миллиона электронов. В отличие от них квантовые точки управляют движением лишь очень небольшого числа электронов, так что можно их назвать малоэлектронными транзисторами. Эта особенность квантовых точек открывает перед физиками и инженерами огромные возможности для миниатюризации полупроводниковых устройств и снижения их энергопотребления. Более того, использование квантовых точек позволяет создавать приборы и устройства совершенно новых типов.

Очень важно, что квантовые точки могут образовываться в результате процессов самосборки. Если на кристаллическую поверхность кремния или арсенида галлия нанести небольшое число атомов другого вещества (например, атомов германия и т.п.), то через некоторое время можно наблюдать, как эти «чужеродные» атомы сами собираются в некоторые структуры размером в несколько десятков нм. Структуры такого типа и являются квантовыми

точками, т.е. локальными образованиями (с характерным размером в несколько десятков нм), представляющими собой трехмерные «ловушки» для электронов.



Рис. I.4. Изменение цвета (полосы испускания) коллоидного раствора частиц CdSe в оболочке CdS в зависимости от размера квантовых точек

В квантовой точке электрон под действием внешнего воздействия может переходить на более высокий, не занятый другими электронами энергетический уровень, приводя к образованию возбужденного состояния квантовой точки. Что же при этом происходит с тем пустым местом на энергетическом уровне, где раньше был электрон — так называемой «дыркой»? Оказывается, посредством зарядовых взаимодействий иногда электрон остается с ней связан и в любой момент может перейти обратно. Пару электрон-дырка называют экситоном от английского слова «excited», что означает «возбужденный». Миграция между энергетическими уровнями квантовой точки сопровождается

изменением энергии электрона, что соответствует поглощению или излучению кванта света (фотона) при переходе электрона соответственно на более высокий или низкий уровень. Описанное выше поведение электронов в квантовой точке приводит к нехарактерному для макрообъектов дискретному энергетическому спектру, за который квантовые точки часто называют искусственными атомами.

Энергия связи дырки и электрона определяет радиус экситона, который является характеристической величиной для каждого вещества. Если размер квантовой точки меньше радиуса экситона, то экситон оказывается ограничен в пространстве ее размерами, а соответствующая энергия связи значительно изменяется по сравнению с объемным веществом. Нетрудно догадаться, что если энергия экситона изменяется, то, следовательно, изменяется и энергия фотона, излучаемого системой при переходе возбужденного электрона на свое исходное место (экситонный переход). Таким образом, получая монодисперсные коллоидные растворы наночастиц различных размеров, можно управлять энергиями переходов в широком диапазоне оптического спектра (рис. 1.4).

Исследования КТ начались сравнительно недавно, но широчайшие перспективы их практического использования уже совершенно очевидны для дизайна лазеров и дисплеев нового поколения. Уникальные перестраиваемые оптические свойства КТ находят применение в самых неожиданных областях, например в медицинских исследованиях, для построения кубитов квантовых компьютеров и т.д.

Класс **одномерных наноструктур** представлен гораздо большим разнообразием нанообъектов: это нанонити (вискеры), наностержни, нанотрубки и наноленты.

Нанонити или вискеры (от англ. слова whisker— ус, волос) — нитевидные кристаллы с диаметром от нескольких нанометров до нескольких микрон и отношением длины к диаметру > 1000 (рис. I.5).

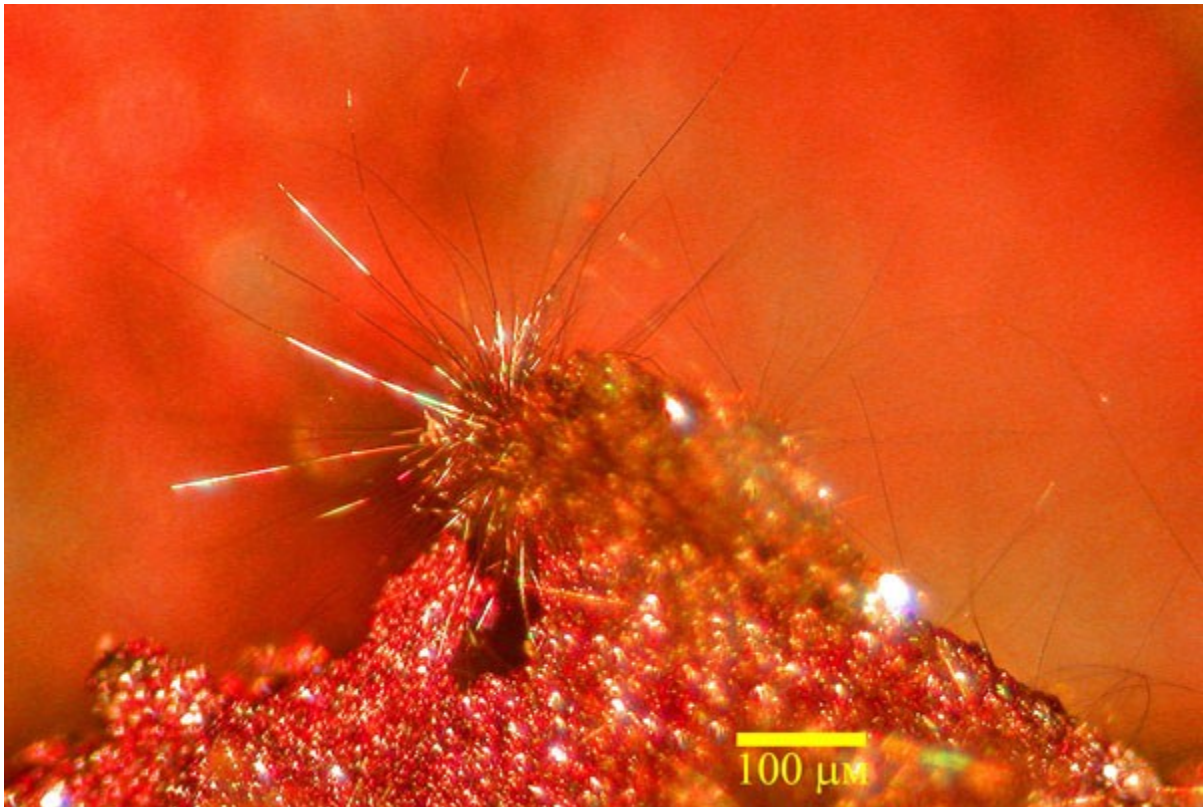


Рис. I.5. Вискеры $\text{Ba}_6\text{Mn}_{24}\text{O}_{48}$

Для получения таких сильно анизотропных структур разработано много методов, включая темплатный синтез, электроспиннинг, литографию и методы кристаллизации. Вискеры характеризуются малым содержанием микроструктурных дефектов, поэтому они обладают рекордно высокой плотностью и их часто используют в качестве упрочняющих волокон. Например, вискеры SiC оказались незаменимы для создания конструкционных композитных материалов с улучшенными механическими свойствами. Нанонити обладают большой площадью поверхности; кроме того, войлок, состоящий из переплетенных между собой нанонитей (рис. I.6), представляет

собой уникальный «пушистый» материал, не требующий носителя. Поэтому вискеры перспективны для использования в качестве катализаторов, сорбентов и фильтров. Большинство удивительных применений вискероов основано на их уникальной прочности, гибкости и большой площади поверхности, что в свою очередь является следствием их сильной анизотропии и малого диаметра.

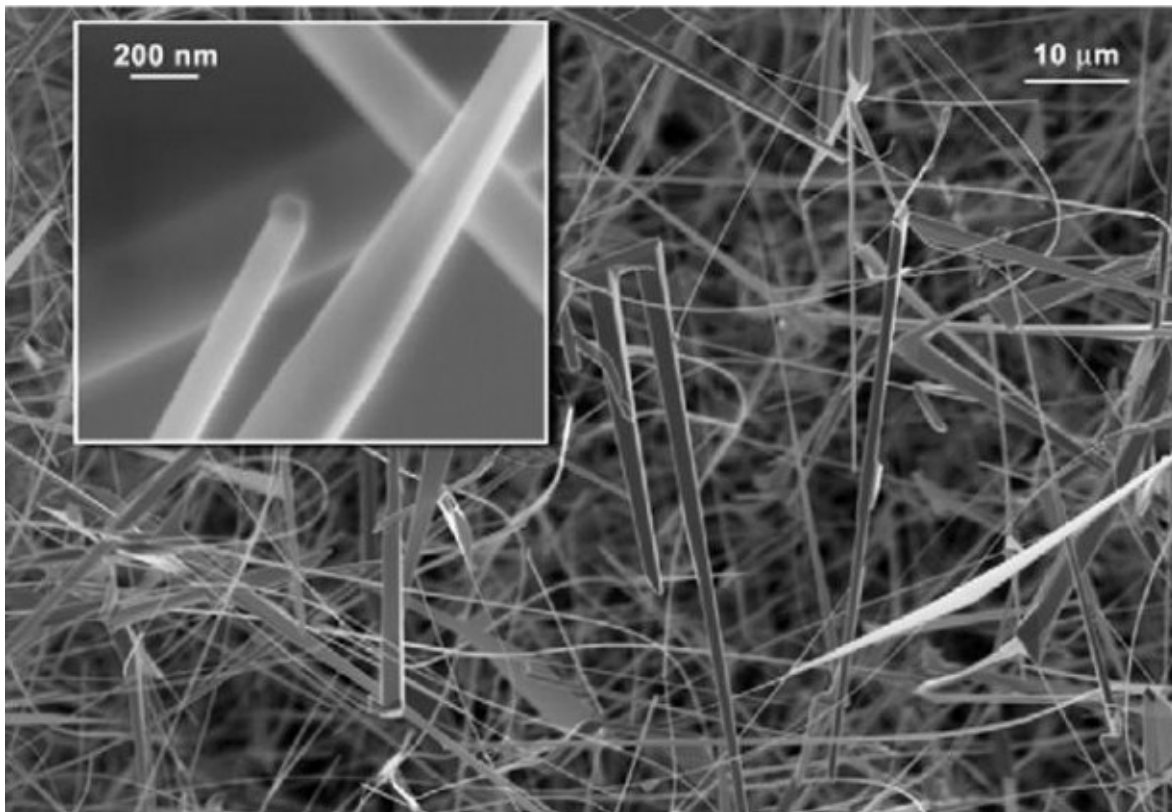


Рис. I.6. Войлок из нитей SnO₂

Одним из наиболее типичных процессов образования вискероов и нанонитей является их рост по механизму «пар — жидкость — кристалл» (ПЖК) (рис. I.7), который был предложен в 1964 году Р. Вагнером для объяснения экспериментальных данных, полученных при росте вискероов кремния. При этом в систему намеренно вводят иницилирующее вещество (иногда его называют катализатором, хотя это не совсем верно), которое способствует росту кристалла в одном направлении, ограничивая его в других,

что придает кристаллу определенную ориентацию. Во время роста это вещество образует жидкую фазу в виде мельчайших капель. Сначала частицы растущего вещества испаряются, затем диффундируют и растворяются в капле жидкой фазы. При насыщении ростовые частицы в капле жидкости осаждаются на границе между подложкой и жидкостью. После осаждения происходит зародышеобразование и впоследствии начинается рост кристалла. Дальнейшее осаждение и рост приведут к разделению подложки и капли жидкой фазы таким образом, что капля окажется на вершине растущего кристалла, что в результате приводит к росту вискеров.

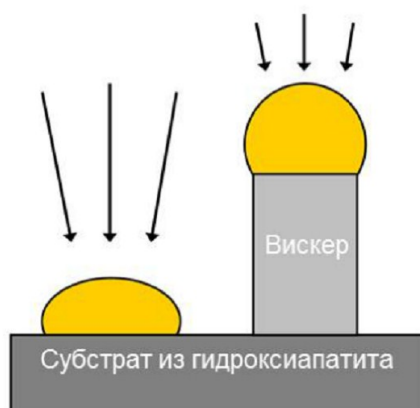


Рис. I.7. Схематическое представление роста кристаллов по механизму «пар — жидкость — кристалл»

Аналогичный механизм роста справедлив и для процессов получения углеродных и неуглеродных нанотрубок, только вместо капли роль инициатора играют наночастицы металла.

Одностенные **углеродные нанотрубки** (рис. I.8) диаметром от 1 нм были открыты в 1993 году. Поразительные свойства этих структур сделали их источником идей для сотен различных применений в науке и технике, в том числе в нанотехнологии и наноэлектронике, и вдохновили исследователей на

поиск новых неуглеродных нанотрубок среди других классов неорганических соединений.

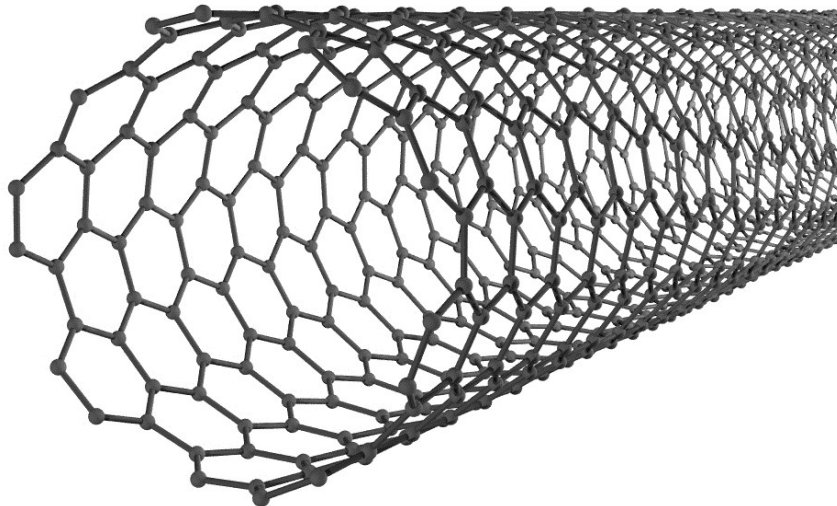


Рис. 1.8. Одностенная углеродная нанотрубка.

Для этого был проведен ряд теоретических и экспериментальных работ, позволивших сначала предсказать, а затем и синтезировать одностенные нанотрубки изоэлектронных аналогов углерода — гексагональных BN , $\text{B}_x\text{C}_y\text{N}_z$, а также наноструктур, полученных замещением атомов углерода в нанотрубках на атомы азота и бора (BC_x , CN_x).

Следует отметить, что трубки, полученные сверткой изоструктурных аналогов графита, таких, как нитрид бора BN , более технологичны, чем сами углеродные нанотрубки и имеют узкое распределение по размеру от 0,5 нм до 3 нм. Они обладают интересными электронными характеристиками, являясь полупроводниками с шириной запрещенной зоны 4,5-5,5 эВ, независимо от диаметра трубки и ее хиральности. Экспериментально доказано, что BN -нанотрубки крепче и легче стали, а полимерные матрицы, содержащие такие нанотрубки, могут использоваться для упрочнения поверхности металлических изделий и для создания стойких к окислению покрытий. Наиболее интересным представителем неорганических ОСНТ являются BC_2N -трубки, настолько

близкие по своей структуре к углеродным нанотрубкам, что их можно получить частичным замещением атомов углерода в последних на атомы азота и бора. Благодаря сворачиванию карбонитрида бора в цилиндры по спирали в нанотрубках BC_2N возникают круговые токи, что позволяет рассматривать их как своеобразные наносоленоиды. Более того, в зависимости от диаметра и хиральности BC_2N -нанотрубок происходит изменение металлического типа проводимости на полупроводниковый, открывая перспективы их использования в различных областях наноэлектроники. Не так давно были открыты нанотрубки большой группы халькогенидов d -элементов MX_Y ($M = Ti, Zn, Nb, Bi, Mo, Cd, W, Ag, Ta$; $X = S, Se$) и выполнен теоретический прогноз нанотрубок новых составов SiC, TiO_2, BeO .

В настоящий момент разработаны различные методики «вливания» простых и сложных соединений в виде раствора или расплава во внутренний канал трубок, например йодидов.

Исследования показали, что в зависимости от параметров электронной и кристаллической структуры внедряемого соединения значительно изменяются электронные и механические свойства образующегося композита трубка-вещество. Во внутренний канал ОСНТ удалось поместить даже цепочку из молекул фуллеренов, получив так называемые «стручки» (pea pods) (рис. 1.9), причем при $1200^\circ C$ «горошины» срастаются с образованием еще одной нанотрубки. Совсем недавно исследователи научились создавать «стручки» с неорганическими «горошинами» из фуллерено-подобных молекул — металлокарбоэдренов состава M_8C_{12} ($M = Sc, Ti, V, Zr, Nb$). Изменяя химический состав «горошин», можно регулировать прочность связей, стабильность получаемых структур и их диэлектрические свойства. На сегодняшний день подобные «стручки» являются интереснейшим и перспективным материалом для микро- и наноэлектроники, который можно использовать для создания нанодиодов, транзисторов, элементов памяти и логических схем, а также аккумуляторов

водорода и высокотемпературных сверхпроводников. Как видите, несмотря на наноразмер, углеродные трубочки в полезности и перспективности для практического применения ничуть не уступают своим гигантским собратьям.

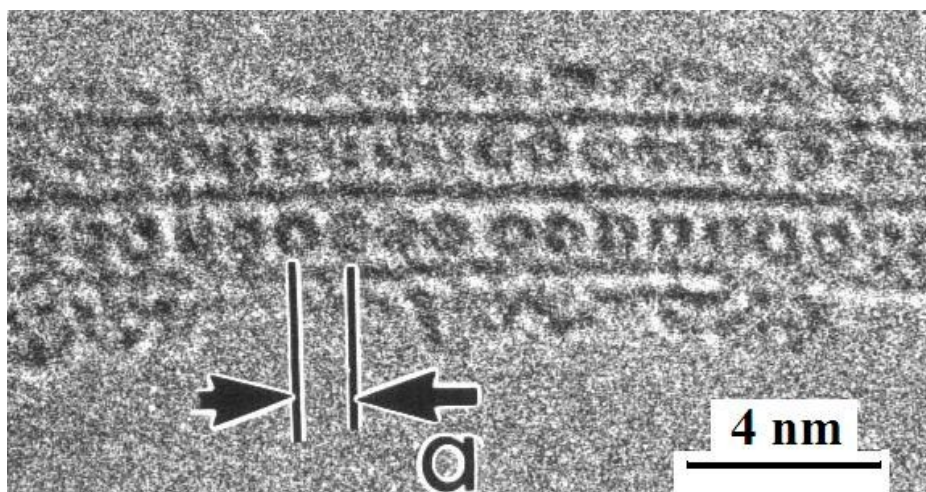


Рис. I.9. Углеродные нанотрубки, заполненные фуллеренами C_{60}

Для **наностержней** характерно самое малое отношение длины к диаметру: порядка 10, при этом длина находится в интервале от 1 до 100 нм. В отличие от нанонитей, наностержни являются более жесткими, и в тоже время, более упругими нанообъектами. Кроме того, часто они имеют огранку подобно нанокристаллам.

Для получения металлических (Au, Fe, Cu, Ag и т.д.) и полупроводниковых (ZnO, GaN, TiO₂, SnO₂ и т.д.) наностержней, как правило, используют те же приемы, что и для прочих одномерных наноструктур: вискеров, нанонитей и т.д. Наностержни обладают всеми свойствами объемного материала, вместе с тем, анизотропная форма, а также возможность получать упорядоченные, одинаково ориентированные массивы наностержней с контролируемой длиной, формой и диаметром сечения, а также плотностью расположения на подложках определенного типа (рис. I.10) создает дополнительные преимущества для конструирования устройств на их основе.

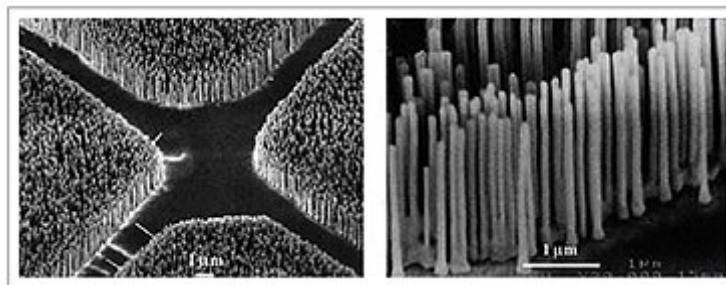


Рис. I.10. Наностержни оксида цинка

Малое число атомов в наностержнях и геометрическая анизотропия приводит к появлению у них свойств, характерных для 1D.

Области применения наностержней самые разнообразные. Так, в биомедицинской диагностике наностержни можно использовать в качестве маркеров. Например, при облучении лазером золотые наностержни светятся в 60 раз сильнее, чем флуоресцентные красители, используемые в стандартных методах визуализации. Наличие двух характеристических размеров (диаметра и длины стержня) приводит к появлению двух резонансных частот в спектрах поглощения металлических наностержней и спектрах испускания полупроводниковых наностержней, что может быть использовано в оптических переключателях и штрих-кодах. Кроме того, наностержни можно использовать для создания лазеров, фотодетекторов, преобразователей частот, волноводов и в солнечных элементах. Так, на основе наностержней CdS были созданы солнечные батареи. Наностержни помещали в слой полимерного полупроводника, который, в свою очередь, находился между двумя электродами. Общая толщина такой системы составила 200 нм, что примерно на порядок меньше толщины традиционной кремниевой солнечной батареи. Еще одно необычное применение связано с анизотропными оптическими свойствами наностержней. Изменяя ориентацию наностержня по отношению к прикладываемому электрическому полю, можно регулировать отражательную

способность стержня, что делает возможным производство дисплеев со значительно улучшенным качеством картинки. Каждый элемент изображения (пиксель) на таком дисплее состоит из остроконечного устройства нанометрового масштаба и характеризуется более ярким свечением.

Недавно стало известно о возможности использования золотых наностержней для усовершенствования жидкокристаллических дисплеев (ЖКД). Одно их неудобств ЖКД — искажение изображения и цвета при определенном угле обзора. Использование золотых наностержней позволяет создать ЖКД, поглощающие свет, тогда как традиционные ЖКД построены на принципе изменения фазы световой волны. Интересным является и тот факт, что при осаждении наностержней, в зависимости от их концентрации в растворе, могут образовываться как изотропные, так и упорядоченные структуры, подобные жидким кристаллам: двумерные нематические, двумерные смектические и трехмерные нематические (рис. I.11), что может в значительной степени определять свойства такого упорядоченного материала

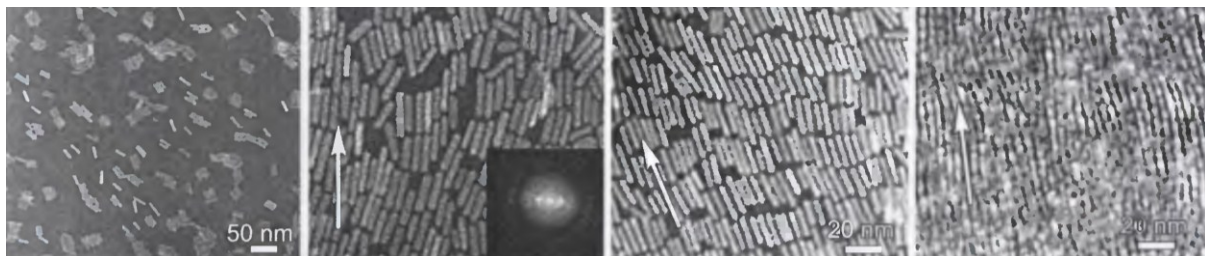


Рис. I.11. Пространственно-упорядоченные массивы наностержней BaSnO_4

Среди **двумерных наноструктур** выделяют тонкие пленки толщиной до сотен нанометров, гетероструктуры, пленки Лэнгмюра—Блоджетт, нанопластины, адсорбционные и самособирающиеся монослои, а также двумерные массивы объектов, размеры которых лежат в нанометровом диапазоне.

В общем случае **гетероструктурой** называют полупроводниковую структуру с несколькими гетеропереходами. Гетеропереходом называется контакт двух различных по химическому составу полупроводников.

Если привести в тесный контакт два различных по химическому составу полупроводника, отличающихся шириной запрещенных зон, постоянными кристаллической решетки и другими параметрами, то схематическая зонная диаграмма образующейся структуры будет напоминать картинку с «ямой», заполненной носителями заряда (электронами или дырками) (рис. I.12). При этом в силу квантово-размерных эффектов, которые проявляются при размерах «ямы», т.е. толщины среднего слоя, от нескольких до ста параметров кристаллической решетки или от 1 до 50 нм, носители заряда будут располагаться на дискретных уровнях, подобно электронам и дыркам в квантовых точках. Меняя размер «ямы», можно изменять расстояние между уровнями и, соответственно, длину волны поглощаемого или излучаемого системой света.

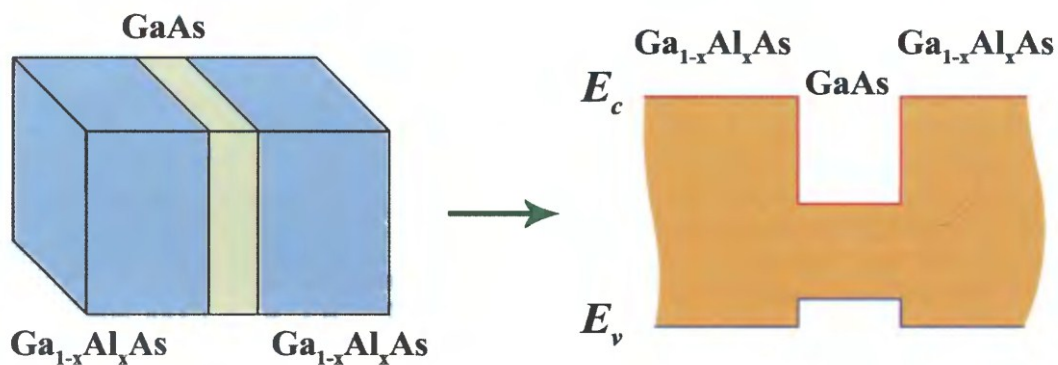


Рис. I.12. Зонная диаграмма структуры, образованной плотно контактирующими слоями полупроводников различного химического состава

Гетероструктуру на основе соединений А и В принято обозначать А/В, при этом соединения А и В называют гетеропарой. Для получения гетероструктур используют различные методы, включая молекулярно-лучевую

эпитаксию, газофазную эпитаксию металлоорганических соединений и химическую сборку.

Проявление эффекта размерного квантования в гетероструктурах позволяет создавать электронные устройства с повышенным быстродействием и информационной емкостью.

На сегодняшний день термин гетероструктура применяют не только в отношении чередующихся полупроводниковых «коржей» различного состава, исторически открытых первыми. Очень интересны, например, гетероструктуры F/S, образованные чередованием атомных слоев ферромагнетика (F) и сверхпроводника (S), что обеспечивает сочетание свойств, которое не встречается в природе. В общем случае сверхпроводимость и ферромагнетизм являются противоположными явлениями: сверхпроводник стремится вытолкнуть магнитное поле (эффект Мейснера), а ферромагнетик, напротив, концентрирует силовые линии поля в своем объеме (эффект магнитной индукции). Такие гетероструктуры могут использоваться в электронике следующего поколения как логические элементы и переключатели сверхпроводящего тока, причем сверхпроводимостью можно управлять с помощью слабого внешнего магнитного поля.

Пленка Ленгмюра—Блоджетт представляет собой монослой или последовательность монослоев вещества, нанесенных на подложку. В 30-х годах прошлого столетия Ирвинг Ленгмюр и его ученица Катарина Блоджетт использовали так называемую ленгмюровскую ванну, имеющую подвижные барьеры, позволяющие менять площадь ванны, трижды дистиллированную воду, поверхностно-активное вещество (ПАВ) в органическом растворителе (быстро испаряется) и твердую подложку.

Благодаря своей амфифильной природе молекулы ПАВ не «тонут» в воде и ориентируются единообразно относительно поверхности — «хвостами» вверх. Используя подвижные барьеры, можно уменьшать площадь водной

поверхности ванны, сжимая молекулы на поверхности воды и создавая, таким образом, тонкую пленку самособирающегося монослоя. Для переноса плавающей мономолекулярной пленки на твердую подложку она вертикально погружается в воду через монослой и затем поднимается (метод Ленгмюра-Блоджетт, вертикальный лифт, рис. I.13а) или горизонтально касается поверхности (метод Ленгмюра-Шеффера, горизонтальный лифт, рис. I.13б).

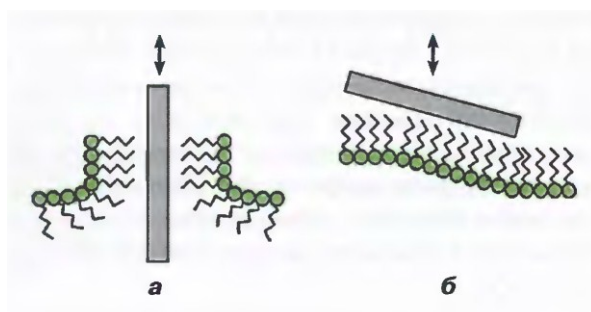


Рис. I.13. Перенос монослоя на твердую подложку вертикальным (а) и горизонтальным (б) лифтом

При изменении степени сжатия монослоя барьерами, и изменятся симметрия и параметры элементарных ячеек, взаимные наклоны цепочек в упорядоченных доменах. Последовательным переносом монослоев можно приготовить многослойную наноразмерную пленку из мономолекулярных (по толщине) слоев, причем, изменяя способ переноса и тип подложки (гидрофильная или гидрофобная), можно сформировать структуры с различной укладкой молекул в смежных слоях, так называемые X-, Y-, Z-структуры (рис. I.14).

К классу **трехмерных наноструктур** следует относить как сами наночастицы и наночастицы в оболочке, так и нанокомпозиты и трехмерные самоорганизованные массивы нанообъектов. При этом сами композиты могут

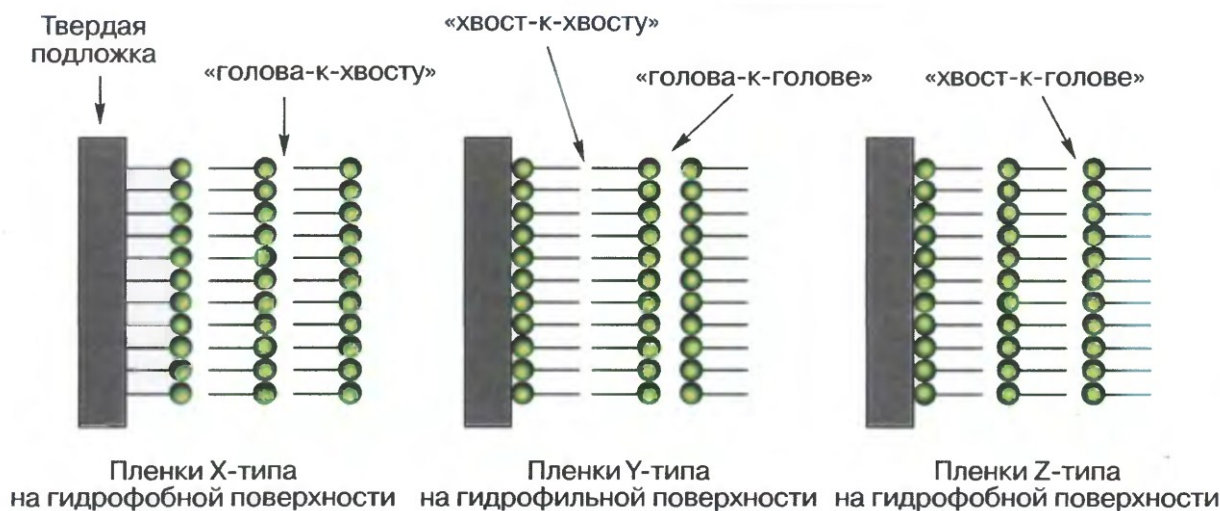


Рис. 1.14. Типы (X, Y, Z) формируемых слоистых структур при переносе нескольких монослоев на подложку (гидрофильную (Y) или гидрофобную (X, Z))

включать ноль-, одно- и двумерные объекты, то есть представлять собой массивы квантовых точек, нитей, многослойные пленки или слоистые соединения, а также различные комбинации этих типов наноструктур. На наноуровне оказалось возможным и существование структур промежуточной размерности, т.н. фракталов и дендримеров, обладающих самоподобием и рассматривавшихся ранее лишь в качестве математических моделей.

В последние годы большие усилия исследователей направлены на получение наночастиц заранее заданных формы и размера, а, следовательно, обладающих определенными физико-химическими свойствами — описано множество различных синтетических подходов, каждый из которых обладает своими преимуществами, но и не лишен определенных недостатков. Сегодня все методы получения наноматериалов разделяют на две большие группы по типу формирования наноструктур: методы «снизу-вверх» («Bottom-up») характеризуются ростом наночастиц или сборкой наночастиц из отдельных

атомов; а методы «сверху-вниз» («Top-down») основаны на «дроблении» частиц до наноразмеров.

1.3. Размерные эффекты

Изучение экспериментальных данных и реакций атомов, кластеров и наночастиц различных элементов периодической системы позволяет сформулировать следующее определение: размерные эффекты – это явление, выражающееся в качественном изменении физико-химических свойств и реакционной способности в зависимости от количества атомов или молекул в частице вещества, происходящее в интервале менее 100 атомно-молекулярных диаметров. Принято различать два типа размерных эффектов: собственный (внутренний) и внешний. Внутренний связан со специфическими изменениями в объемных и поверхностных свойствах как индивидуальных частиц, так и получаемых в результате их самоорганизации ансамблей. Внешний эффект является размернозависимым ответом на внешнее поле или действие сил, независимых от внутреннего эффекта.

Основные особенности проявления размерных эффектов в наноматериалах могут быть сформулированы следующим образом:

- с уменьшением размера зерна значительно возрастает роль поверхностей раздела;
- свойства поверхностей раздела в нанометровом интервале могут быть отличными от таковых для обычных крупнокристаллических материалов; разнообразие поверхностей раздела в нанокompозитах, объединяющих неорганические и органические компоненты или органические и биологические компоненты и т.д., также весьма значительно;
- размер кристаллитов по мере их уменьшения может быть соизмерим с характерными размерами некоторых физических

явлений (например, с длиной свободного пробега носителей в процессах переноса и т.д.);

- размерные эффекты в наноматериалах могут иметь квантовый характер, когда размер зерна (или размер области локализации свободных носителей) становится соизмеримым с длиной волны де Бройля).

Отмеченные обстоятельства оказывают влияние на возможный немонотонный ход зависимостей «свойство – размер зерна» в нанометровом интервале в связи с возможным наличием особых точек на этих зависимостях. К настоящему времени накоплена обширная информация о свойствах наноматериалов, однако не всегда эти данные сопровождаются подробной структурной аттестацией, что затрудняет сравнение результатов и их интерпретацию и не позволяет в полной мере выявить роль размерных эффектов.

Трудность изучения размерных эффектов в наноматериалах обусловлена многообразным влиянием различных факторов на свойства последних. Помимо размера кристаллитов значительное влияние оказывают состав и распределение основных компонентов и примесей, пористость, содержание дефектов и наличие остаточных напряжений, присутствие неравновесных и аморфных фаз и др. Следует также различать размерные эффекты на поверхностях раздела и в объеме нанокристаллитов. Выяснение природы размерных эффектов – одна из важнейших проблем материаловедения наноструктурных объектов.

Структурные размерные эффекты проявляются в виде изменения межатомных расстояний, перестройки кристаллической структуры вплоть до перехода в аморфное состояние, а при химических размерных эффектах изменяется фазовый состав вещества и его реакционная способность. Это означает, что с наночастицами возможно осуществление реакций, не идущих с веществами в компактном состоянии. Для большинства поликристаллических

материалов характерно возрастание твердости и предела упругости при уменьшении среднего размера кристаллитов (закон Холла—Петча) — это пример проявления механических размерных эффектов. Наиболее ярко наблюдаются некоторые физические размерные эффекты: уменьшение температуры плавления наноматериалов по сравнению с объемным состоянием в результате увеличения величины поверхностной энергии, резкое изменение электрофизических и магнитных свойств.

Изменение температуры плавления металлов в зависимости от размера частиц — один из первых размерных эффектов, привлечших внимание исследователей. Наибольшее распространение получило объяснение зависимости температуры плавления наночастиц металлов от размера с точки зрения колебания атомов.

С позиции термодинамики переход из твердого состояния в жидкое с увеличением температуры начинается с появления на поверхности наночастицы бесконечно малого жидкого слоя, когда ее ядро еще остается твердым. Подобное явление обусловлено поверхностным натяжением, отражающим взаимодействие «жидкое-твердое» и изменяющим энергию системы.

Зависимость температуры плавления наночастиц металлов от размера объясняется на основе критериев, предложенных и развитых Линдеманом. Согласно его представлениям кристалл будет плавиться, когда среднеквадратичное смещение атомов δ в кристалле становится больше доли внутриатомных расстояний a : $\delta/a \geq \text{const}$. Повышение температуры ведет к возрастанию амплитуды колебаний. При некоторой температуре они становятся достаточно большими, разрушают кристаллическую решетку, и твердое тело начинает плавиться. Атомы поверхности связаны слабее, и в реальных условиях это может привести к большим амплитудам колебаний при той же температуре, чем у атомов, находящихся в объеме частица. Данный эффект

можно описать как среднеквадратичное смещение атомов на поверхности частицы δ_s , и внутри частицы δ_v : $\alpha = \delta_s/\delta_v$. Значение параметра α обычно изменяется в пределах от 2 до 4. Доля поверхностных атомов в сферических наночастицах размером 3 нм достигает приблизительно 50%, и их колебания оказывают существенное влияние на критерий Линдемана. Это обстоятельство и было использовано для описания зависимости температуры плавления наночастиц от их размера без применений представлений термодинамики.

Линдеманом для описания свойств наночастиц предложено уравнение:

$$\frac{T_m(r)}{T_m(\infty)} = \exp \left[-(\alpha - 1) \left(\frac{r}{3h} - 1 \right)^{-1} \right],$$

где $T_m(r)$ и $T_m(\infty)$ – температуры плавления нанокристалла и компактного металла соответственно, К; h соответствует высоте монослоя атомов в кристаллической структуре.

Данное уравнение можно использовать для прогноза понижения температуры плавления нанокристаллов, если известен параметр α , который обычно определяется из соответствующих экспериментальных данных. Результаты (рис. I.15), полученные для зависимости температуры плавления золота от размера частиц, подтверждают, что рассматриваемое уравнение хорошо описывает экспериментальные данные.

В результате исследований было установлено, что у свободных наночастиц металлов всегда наблюдается понижение температуры плавления с уменьшением размера наночастицы. Для систем, состоящих из металлических матриц с включенными наночастицами другого металла возможно как понижение, так и повышение температуры плавления с уменьшением размера частицы.

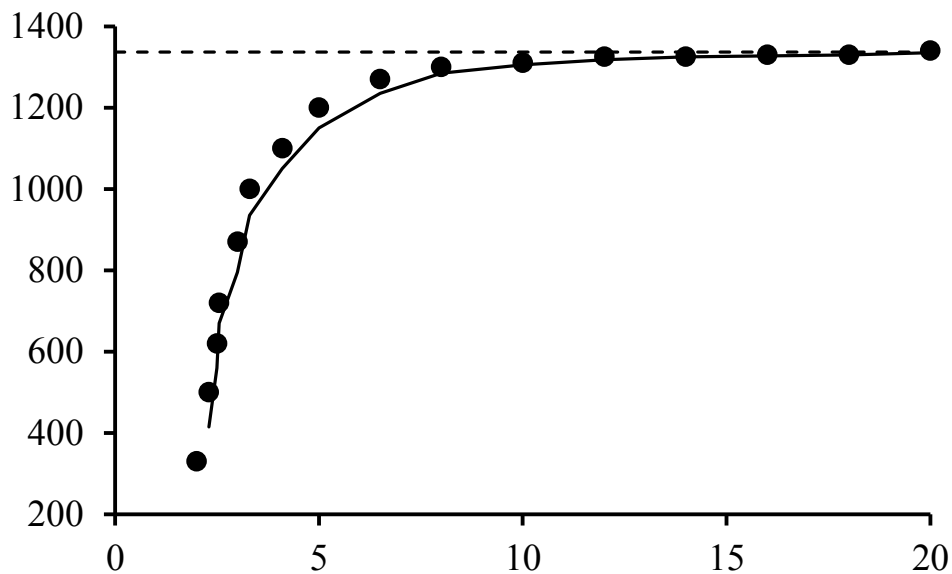


Рис. I.15. Зависимость температуры плавления золота от размера частиц (расчет при значениях параметров $\alpha = 1,6$; $h = 0,204$ нм)

II. Биосовместимые материалы на основе фосфатов кальция

II.1. Основные данные об ортофосфатах кальция

Одной из основных областей применения ортофосфатов кальция является производство на их основе костнозамещающих материалов. Это обусловлено их химическим сходством с минеральным компонентом костной и зубной ткани млекопитающих. В связи с этим, особенно с учетом нецитотоксичности, ортофосфаты кальция являются биосовместимыми, т.е. не отторгаются организмом, и, что особенно важно, проявляют биоактивность и хорошо интегрируются в живую костную ткань. Это приводит к образованию сильного физико-химического взаимодействия имплантата и кости, называемого остеоинтеграцией. Если говорить более конкретно, то ортофосфаты кальция обеспечивают адгезию и пролиферацию остеобластов. Несмотря на это, неудовлетворительные механические свойства данных соединений (в частности, хрупкость) являются основными факторами, лимитирующими использование ортофосфатов кальция в качестве несущих биоматериалов. Плохие механические свойства становятся еще более заметными, когда речь

Таблица II.1. Существующие ортофосфаты кальция и их основные свойства

Соотношение Са/P	Соединение	Химическая формула	Растворимость при 25°C, -log(Ks)	Растворимость при 25°C, г/л	Интервал pH стабильности в водных растворах при 25°C
0,5	Моногидрат дигидрофосфата кальция (МСРМ)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	1,14	~18	0,0-2,0
0,5	Безводный дигидрофосфат кальция (МСРА)	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	1,14	~17	[3]
1,0	Дигидрат гидрофосфата кальция (ДСРД), минерал брушит	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,59	~0,088	2,0-6,0
1,0	Безводный гидрофосфат кальция (ДСРА), минерал монетит	CaHPO_4	6,90	~0,048	[3]
1,33	Октакальций фосфат (ОСР)	$\text{Ca}_8(\text{HPO}_4)_2(\text{PO}_4)_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	96,6	~0,0081	5,5-7,0
1,5	α-ортофосфат кальция (α-ТСР)	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	25,5	~0,0025	[1]
1,5	β-ортофосфат кальция (β-ТСР)	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	28,9	~0,0005	[1]
1,2-2,2	Аморфный фосфат кальция (АСР)	$\text{Ca}_x\text{H}_y(\text{PO}_4)_z \cdot n\text{H}_2\text{O}$, $n=3-4,5$; 15-20% H_2O	[2]	[2]	~5-12[4]
1,5-1,67	Кальций-дефицитный гидроксиапатит (CDHA)[5]	$\text{Ca}_{10-x}(\text{HPO}_4)_x(\text{PO}_4)_{6-x}(\text{OH})_{2-x}$, $(0 < x < 1)$	~85,1	0,0094	6,5-9,5
1,67	Гидроксиапатит (НА)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	116,8	~0,0003	9,5-12
1,67	Фторапатит (ФА)	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6\text{F}_2$	120,0	~0,0002	7,12
2,0	Тетракальций фосфат (ТТСР), минерал гильденстокит	$\text{Ca}_4(\text{PO}_4)_2\text{O}$	38-44	~0,0007	[1]

[1] – Данные соединения не могут быть получены осаждением из водных растворов

[2] – Не поддается точному измерению

[3] – Стабильны при температурах выше 100°C

[4] – Всегда метастабильны

[5] – Иногда CDHA именуют осажденным НА

[6] – В случае $x=1$ (граничное условие с $\text{Ca}/\text{P}=1,5$), CDHA имеет химическую формулу $\text{Ca}_9(\text{HPO}_4)(\text{PO}_4)_5\text{OH}$

заходит о пористой керамике и подложках с размером пор более 100 мкм, который необходим для обеспечения васкуляризации и колонизации костных клеток. Именно поэтому ортофосфаты в биомедицине используются в основном как наполнители и покрытия.

Полный список известных ортофосфатов кальция, в том числе их стандартные сокращения и основные свойства, приведен в таблице II.1.

II.2. Наноразмерные и нанокристаллические ортофосфаты кальция в костных тканях млекопитающих.

II.2.1. Кости

Кость является наиболее типичной кальцинированной тканью млекопитающих. Кости имеют разные формы и размеры, которые обеспечивают выполнение ими функций защиты и обеспечения механики тела. Основным неорганическим компонентом костной ткани является биологический апатит, который может быть описан как низко кристаллический (почти аморфный), нестехиометрический и ионно-замещенный кальций дефицитный гидроксиапатит (CDHA). С точки зрения материала, кость можно рассматривать как объект, собранный из деталей, принадлежащих семи иерархически выстроенным размерным уровням: от макро- и микро- до наноуровня (рис. II.1). Причем каждая из этих деталей предназначена для выполнения определенной функции. Кроме того, все эти уровни организации кости постоянно взаимодействуют с клетками и биологическими макромолекулами. На наноуровне мелкие пластинчатые кристаллы биологического апатита кости размещаются в изолированных пустотах внутри коллагеновых волокон, где в дальнейшем происходит их рост вдоль кристаллографической оси с элементарной ячейки гидроксиапатита, которая в данном случае оказывается параллельной оси фибрилл коллагена. Молекулы коллагена Iго типа самособираются в фибриллы, с зазорами в ~ 67 нм

нм и ~ 40 нм между концами молекул, в которых располагаются нанокристаллы апатита. Сочетание этих двух компонентов и обуславливает минерализацию волокон. Волокна также могут быть связаны друг с другом, что обеспечивает высокую динамику системы, которая изменяется за счет выбора различных аминокислот, что обуславливает различные механические свойства для различных областей применения биоматериала. Именно поэтому кости обычно рассматривают как армированные волокнами композиты биологического происхождения, в которых наноразмерные твердые включения встроены в мягкую матрицу белка. Хотя размеры биологических кристаллов апатита, приводимые в литературе, варьируются в зависимости от областей использования и методов определения, как правило, речь идет о частицах со средними размерами 30-50 нм (длина), 15-30 нм (ширина) и 2-10 нм (толщина). Почему же наноразмерность частиц гидроксиапатита так важна для биологических объектов? Недавние исследования показали, что природные композиты в общем случае обладают такой структурой, в которой наноразмерные минеральные частицы обеспечивают оптимальную прочность и устойчивость к нагрузкам. Кроме того, наноразмерный апатит выполняет еще одну важную функцию в живых организмах. Он является источником кальция и фосфат-ионов, необходимых для обеспечения широкого спектра процессов обмена веществ, которые связаны с использованием упомянутых ионов в "реконструкции" твердых тканей посредством непрерывной резорбции и формирования наноразмерного апатита остеокластами и остеобластами.

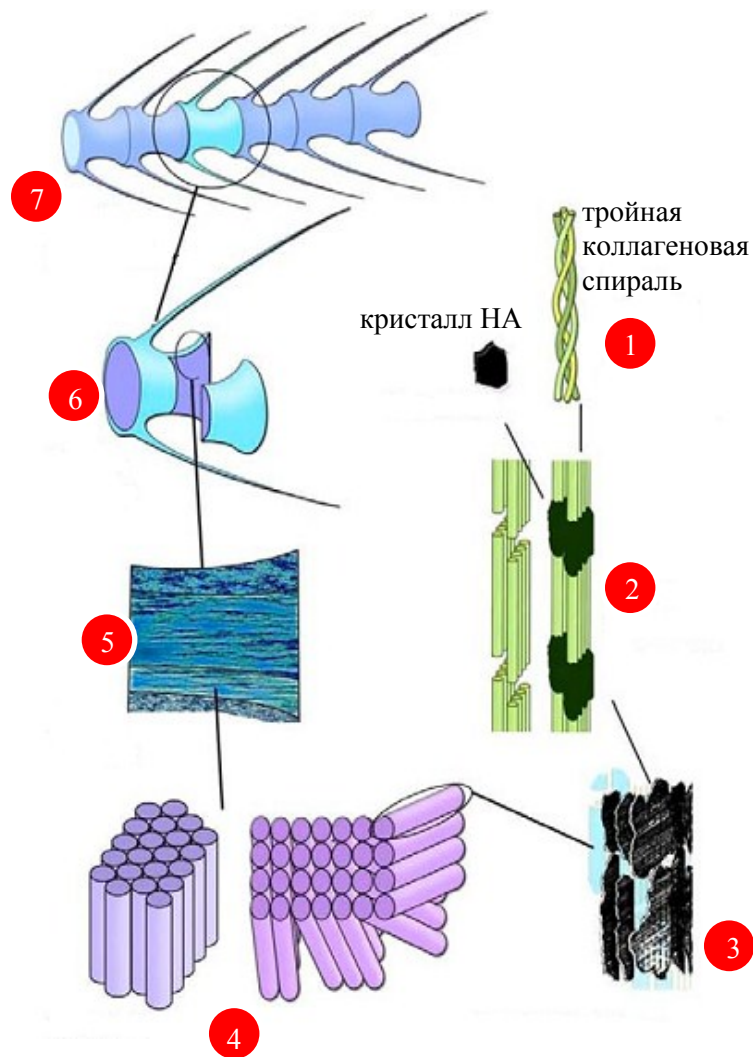


Рис. П.1. Семь иерархических уровней организации костной ткани рыб.
Уровень 1: Изолированные кристаллы гидроксиапатита и часть коллагеновой фибриллы со структурой тройной спирали. Уровень 2: Минерализованные коллагеновые фибриллы. Уровень 3: массив минерализованных коллагеновых волокон с расстоянием между фибриллами около 60-70 нм. Уровень 4: Две модели организации массива фибрилл, которые наблюдаются в костном скелете зебры. Уровень 5: слоистая структура позвонка. Уровень 6: позвонок. Уровень 7: кость

II.2.2. Зубы

Зубы – другой вид твердых тканей позвоночных, имеющий минеральную основу в виде ортофосфатов кальция. В отличие от костей, зубы состоят как минимум из двух различных биоминералов: эмали (корона, часть над десной) и дентина (корень, часть ниже линии десен). Зубная эмаль содержит до 98% биологического апатита, ~ 1% биоорганических соединений и до 2% воды. Типичные стержни в эмали состоят из палочковидные кристаллов апатита толщиной 25-100 нм и длиной, варьирующейся в интервале 100 нм до 100 мкм и более вдоль кристаллографической оси *c*. Однако в кристаллах апатита, содержащихся в эмали, были обнаружены суб-домены или субединицы, имеющие различные химические свойства. Эта структура, как и в костях, имеет 7 иерархических уровней организации. Кроме того, исследования показали, что размеры единиц на каждом иерархическом уровне в зубной эмали и в кости аналогичны. В зубной эмали нанокристаллы биологического апатита в первую очередь формируют минеральные нанофибриллы; нанофибриллы всегда располагаются параллельно друг другу с образованием фибрилл, которые также объединяются в более толстые фибриллы и, далее, в волокна призматической формы. На микроуровне призмы также подвергаются объединению, и образующиеся блоки располагаются вдоль пластин эмали. Такая структура придает эмали такие характерные свойства как анизотропия модуля упругости, эффективные вязкоупругие свойства, высокую стойкость к разрушению при стрессовых нагрузках, что делает ее по характеристикам ближе к металлам, чем к керамикам.

Дентин содержит ~ 50% от биологического апатита, ~ 30% биоорганических соединений и ~ 20% воды. В дентине наноразмерные строительные блоки имеют размеры ~ 25 нм в ширину, ~ 4 нм в толщину и ~ 35 нм в длину, что меньше, чем соответствующие показатели строительных блоков эмали. Дентин аналогичен кости во многих аспектах. Например, он

имеет аналогичный состав и иерархической структуры до уровня костных пластин.

II.3. Биомедицинские применения наноразмерных и нанокристаллических ортофосфатов кальция

II.3.1. Восстановление костной ткани

Благодаря достижениям в хирургической практике и быстрому старению населения, существует постоянно растущий спрос на костные трансплантаты. Современные трансплантаты должны не только заменить утраченные кости, но также должны обладать высокой остеоиндуктивностью, выступая в качестве подложки для направленного роста костей. Кроме того, способность к образованию биологически активных апатитных слоев для взаимодействия с естественной костной тканью является важным требованием к современным биоматериалам. Также хороший имплантат должен служить каркасом для поддержки новых кровеносных сосудов и мягких тканей при формировании связей с существующей костью.

Кальций-фосфатные биокерамики микронных размеров используются в стоматологии, ортопедии и хирургии уже на протяжении более 30 лет ввиду их химического сходства с кальцинированными тканями млекопитающих и, следовательно, превосходной биосовместимостью. В связи с быстрым развитием нанотехнологии, потенциальные возможности наноразмерных и нанокристаллических ортофосфатов кальция привлекли значительное внимание, благодаря тому, что они демонстрируют положительные результаты при восстановлении дефектов кости. Например, благодаря улучшению спекаемости, увеличению плотности и лучшей биологической активности по сравнению с кристаллами, они могут использоваться в качестве основных компонентов самостоятельной настройки костных цементов. Однако, есть исследования, в которых показано, что увеличение размеров частиц ТСР

способствуют не увеличению, а уменьшению времени индуцирования процесса схватывания цемента, что противоречит общим физическим соображениям (как правило, меньшие частицы или кристаллиты должны обладать повышенной реакционной способностью). Тем не менее, можно выделить два основных направления биомедицинского применения наноразмерных и нанокристаллических ортофосфатов кальция:

- использование их в виде порошка в качестве наполнителей для придания биологической активности различным биокompозитам и гибридным биоматериалам;
- производство плотных керамик или пористых подложек, обладающих необходимыми механическими свойствами.

Ввиду наноразмерности частицы ортофосфатов кальция имеют тенденцию агломерировать при нагревании (рис. II.2), поэтому при их получении обычно используют методы низкотемпературного синтеза и/или быстрого затвердевания. Низкотемпературной подход подразумевает получение геля при 4°C) и одноосное прессование при 150-200°C. Метод быстрого затвердевания подразумевает спекание в искре плазмы и микроволновый отжиг в интервале температур 1000-1300°C. Кроме того, наноразмерные кристаллы обожженного гидроксиапатита могут быть изготовлены путем обжига при температуре 800°C в течение 1 ч с веществами, стабилизирующими наноразмерные частицы кальций-дефицитного гидроксиапатита и удаляемыми впоследствии прокаливанием или промыванием. Данные подходы к получению наноразмерных частиц фосфатов кальция обуславливают незначительные изменения исходных частиц, что приводит к сохранению механических свойств биокерамики по сравнению с исходным гидроксиапатитом.

Уже в 1990е года имплантаты на основе наноразмерного апатита также как и органические биокompозиты на его основе были исследованы на системах

in vivo. Два вида цилиндрических имплантатов из наноразмерного апатита и органоапатита, содержащие синтетические пептиды, изучались в течение 28 дней после внедрения в губчатые кости кроликов шиншилл. Оба типа имплантатов хорошо прижились, а взаимодействие их с «родными» тканями проходило так же хорошо, как и в случае человеческих костей, особенно в отношении клеток, подобных остеокластам, и формировании естественной кости остеобластами. Эти исследования показали пригодность таких материалов как для замещения костной ткани, так и для целей переноса лекарственных препаратов.

Среди доступных коммерческих препаратов, NanOss™, препарат для заполнения пустот кости от Angstrom Medica, Inc., можно рассматривать как первое нанотехнологическое медицинское средство, получившее одобрение Управления по продовольствию и медикаментам США в 2005 г. Это средство изготовлено путем осаждения наночастиц ортофосфатов кальция из водных растворов в виде белого порошка, который затем спрессовывался и спекался для получения плотного, прозрачного, нанокристаллического материала. NanOss™ имитирует микроструктуру, состав и такие свойства человеческой кости как механическая прочность и остеокондуктивность. Данный препарат получил широкое распространение в спортивной медицине, травматологии, спинальной хирургии и на рынке ортопедических товаров.

Ostim® (Osartis GmbH & Co.KG, Обенбург, Германия) является еще одним популярным коммерческим препаратом. Это уже готовая к использованию инъекционная паста, которая получила европейский сертификат соответствия в 2002 году. Ostim® представляет собой водную суспензию синтетического нанокристаллического гидроксиапатита (средний размер кристаллов $100 \times 20 \times 3$ нм (иглоподобные кристаллы), удельная поверхность $\sim 100 \text{ м}^2/\text{г}$), приготовленную методом химической реакции в растворе, после завершения которой содержание гидроксиапатита в пасте составляет $\sim 35\%$.

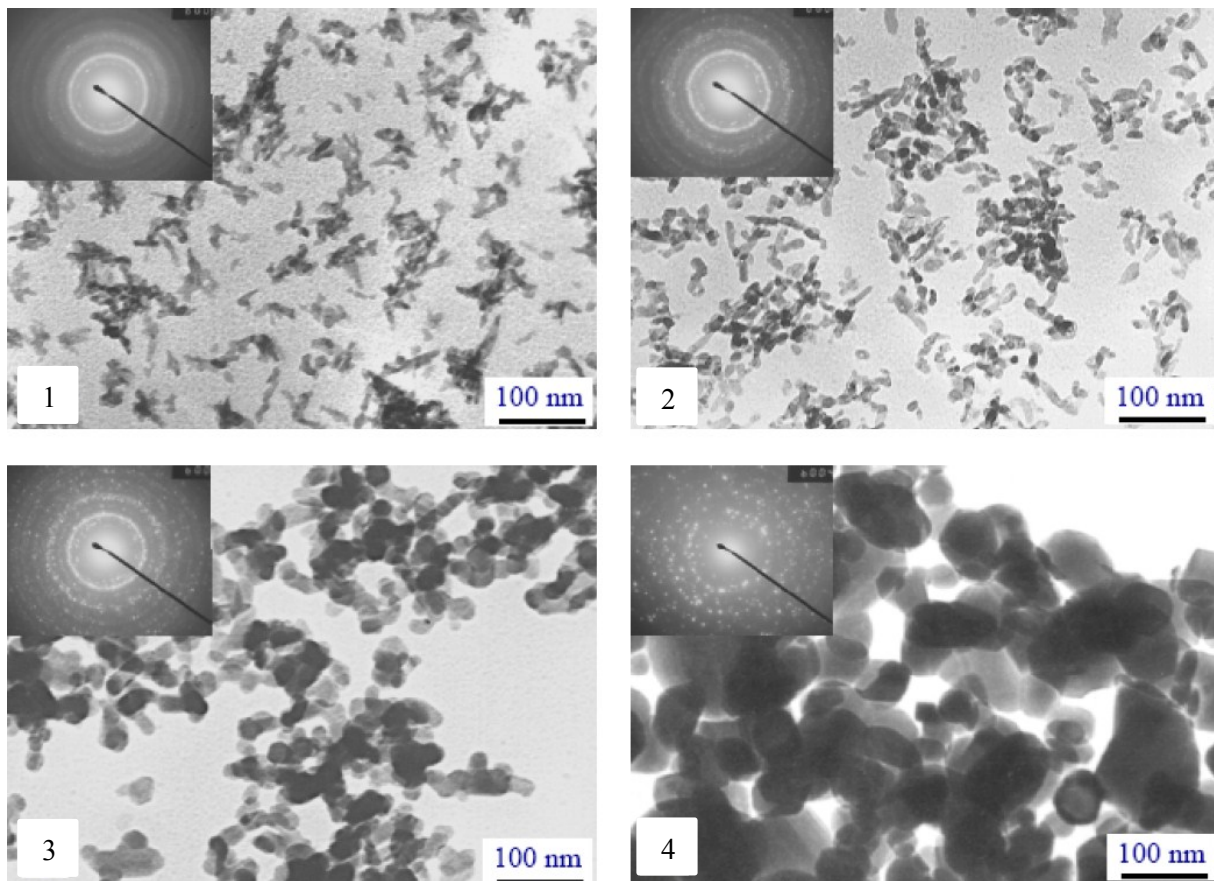


Рис. П.2. Размеры частиц и кристалличность порошков гидроксиапатита после термообработки при различных температурах: (1) 300°C, (2) 500°C, (3) 700°C, (4) 900°C

Ostim[®] не затвердевает при смешивании с кровью, поэтому он отлично подходит для увеличения объема трансплантируемого материала. В то же время вязкость препарата позволяет использовать его в тесном контакте с костью. Ostim[®] может использоваться в метафизарных переломах и кистах, при увеличении альвеолярного отростка, реконструкции суставов и околопротезных переломах во время операции по восстановлению тазобедренного сустава, остеотомии, заполнении блоков в спинальной хирургии и т.д.

Препарат может быть внедрен в кость, при этом формирование новой костной ткани наблюдается только спустя три месяца. Для ряда клинических

приложений Ostim[®] используют в сочетании с другими видами кальций-ортофосфатной керамики, например, с гидроксиапатитными биокерамическими гранулами (Cerabone[®]) или двухфазными (β -ортофосфат кальция + гидроксиапатит) гранулами (BoneSaves[®]). Применение таких комбинаций нанокристаллического Ostim[®] с микрокристаллической биокерамикой на основе фосфатов кальция оказалось эффективным для лечения переломов голени и других костных дефектов.

В начале 2000ых годов Кьюи и др. были разработаны биокомпозиты из наноразмерного HA и коллагена, которые имитировали наноструктуру кости. После имплантации такие биокомпозиты могут быть вовлечены в костный метаболизм. В связи со сложностями при получении и неудовлетворительными механическими свойствами объемных образцов ортофосфатов кальция их применение в качестве несущих имплантатов и пористых объектов и подложек ограничено. В то время как пористые трехмерные нанокомпозиты гидроксиапатита и коллагена или полимера хорошо воспроизводят состав и микроструктуру кости и могут использоваться в качестве матриц для инжиниринга костной ткани.

В виду своих неудовлетворительных механических свойств, ортофосфаты кальция находят ограниченное применение в качестве несущих материалов: они слишком хрупкие и жесткие для таких целей. Сегодня такая задача решается применением в основном биологически совместимых металлов, таких как кобальт-хромовые сплавы, титан и его сплавы, нержавеющая сталь марки 316L, но в данном случае возникают проблемы с их устойчивостью к стрессовым нагрузкам при длительном сроке эксплуатации. Все эти металлы, хотя и нетоксичны, но всегда биоинертны и не могут образовывать связи с костью напрямую. Для того, чтобы улучшить биологические свойства металлических имплантатов, обычно используют наноструктурированные кальций-ортофосфатные (чаще, апатитные) покрытия материала, которые

способствуют ускорению роста кости и повышению костной фиксации имплантата. Методы получения покрытий включают термическое напыление, обычное распыление, импульсное лазерное осаждение, метод динамического смешения, получение покрытия погружением в раствор, золь-гель метод, электрофоретическое осаждение, биомиметические процессы, горячее изостатическое прессования и некоторые другие методы. В большинстве случаев покрытия состоят из равномерного слоя нанокристаллического апатита (рис. П.3).

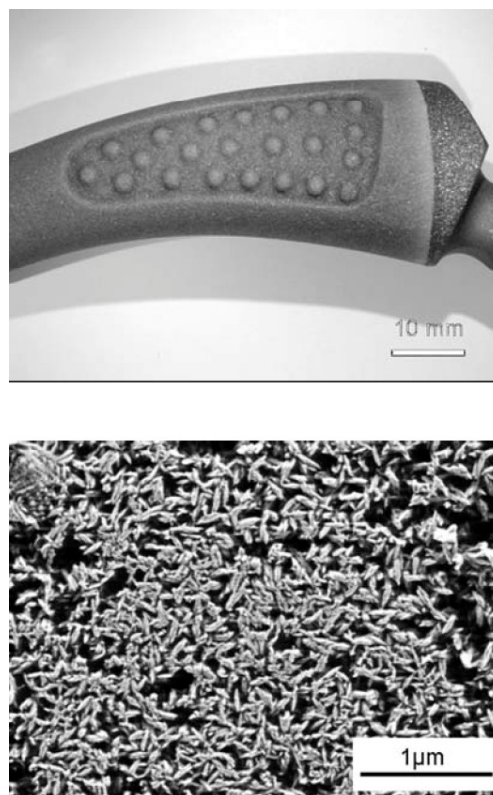


Рис. П.3. Фотография титанового имплантата с покрытием из гидроксиапатита, полученным электрохимическим осаждением при 37°C (вверху).

Микрофотография поверхности того же имплантата (внизу)

Они способствуют формированию костной ткани и содействуют прямой остеоинтеграции с костью, с которой находятся в прямом контакте. Например,

ускорение образования новой кости может быть хорошо видно в случае титана с покрытием из наноразмерного гидроксиапатита по сравнению с титаном, покрытым микроразмерным гидроксиапатитом, и титаном без покрытия (рис. П.4).

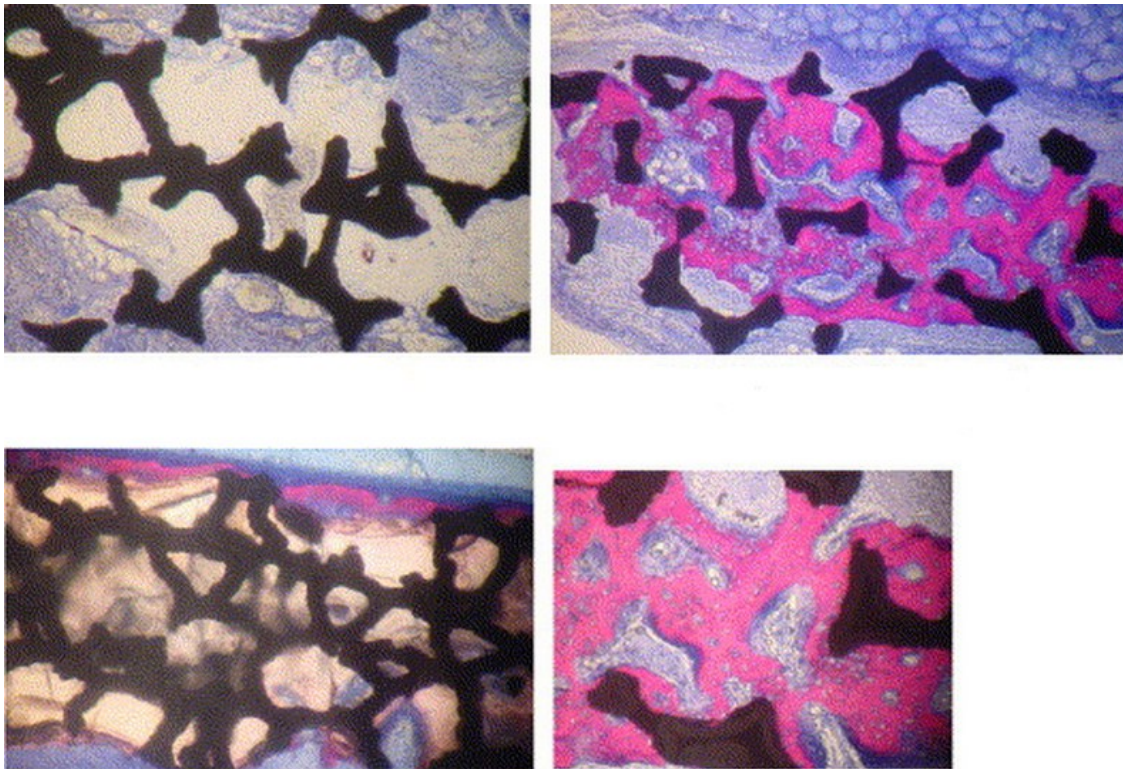


Рис. П.4. Гистология черепа крысы после 2 недель с момента имплантации танталовых имплантатов без покрытия из наноразмерного гидроксиапатита (сверху) и с таким покрытием (снизу). Красным цветом выделены новые костные образования

Кроме того, наноструктурированные ортофосфаты кальция могут использоваться в качестве материала покрытия для придания поверхностной биологической активности и другим материалами, например, стеклам и полимерам. Наконец, такие покрытия могут быть нанесены, например, с помощью лазера или методики электрогидродинамического распыления.

II.3. Наноразмерные и нанокристаллические ортофосфаты кальция и костные клетки

Общепринято связанные с костью клетки (особенно, остеобласты и остеокласты) играют ключевую роль в физиологии формирования кальцинированных тканей. Клетки, связанные с костью не только принимают участие в формировании биоминералов и макроструктуры кости, но они также оказывают воздействие на плотность, регенерацию и деградацию костной ткани. Поэтому понимание взаимодействий костных клеток и наноразмерных ортофосфатов кальция требует детального изучения с целью выяснения механизма формирования костей, для профилактики и лечения костных заболеваний и разработки новых биоматериалов. Лучшие показатели структурной биосовместимости и остеокондуктивности материала могут быть достигнуты с помощью введения в него наноразмерных и нанокристаллических ортофосфатов кальция. Биосовместимость таких биоматериалов является ключевым фактором при определении их области применения в клинической практике. Например, адгезию, пролиферацию и дифференциацию мезенхимальных стволовых клеток изучали на подложках из биокомпозита на основе наноразмерного гидроксиапатита и полиамида. Результаты показали, что такие биокомпозиты проявляют хорошую биосовместимость и обширную остеокондуктивность с принимающей костью как в исследованиях *in vitro*, так и *in vivo*, и доказали, что подложки из наноразмерного гидроксиапатита и полиамида потенциально могут использоваться в ортопедической, реконструктивной и челюстно-лицевой хирургии.

Большинство исследований показали, что наноструктурированный гидроксиапатит может улучшать прикрепление клеток и ускорять процессы минерализации *in vivo*, что говорит о перспективности использования гидроксиапатита в клинических приложениях благодаря его высокой биоактивности. Воздействие наноразмерного гидроксиапатита на клетки

вследствие наноразмерных эффектов были также изучены. Для этого были приготовлены частицы гидроксиапатита с размерами частиц 20 ± 5 , 40 ± 10 и 80 ± 12 нм в диаметре и проведено исследование их влияние на пролиферацию двух типов костных клеток: мезенхимальных стволовых клеток костного мозга (MSC) и клеток остеосаркомы (U2OS и MG63). Эксперименты на культурах указанных клеток показали улучшение их жизнеспособности в присутствии наноразмерного гидроксиапатита по сравнению с субмикронным гидроксиапатитом. Большая клеточная жизнеспособность и пролиферация клеток MSC была зафиксирована в присутствии наночастиц гидроксиапатита с размером 20 нм. Однако в случае клеток костной опухоли, культивируемых в присутствии наногидроксиапатита, наблюдалось обратное явление. Таким образом, можно сделать вывод, что наноразмерные частицы гидроксиапатита могут препятствовать распространению клеток U2OS и MG63, и активность этого процесса обратно пропорциональна размерам частиц, т.е. меньшие наночастицы гидроксиапатита обладают большей способностью к предотвращению пролиферации клеток опухоли. Это говорит о том, что наночастицы гидроксиапатита обладают благоприятными для оптимизации биологической функциональности клеток свойствами, причем размер частиц играет ключевую роль. Эти *in vitro* результаты имеют большое значение для понимания биологической активности наночастиц в процессах биоминерализации.

Исследования подтвердили, что наноразмерный аморфный гидроксиапатит обладает улучшенной биологической активностью по сравнению с наноразмерным гидроксиапатитом в виду лучшей адгезии и пролиферации остеогенных клеток в субстратах с ним. Тем не менее, для того, чтобы правильно оценить механизм влияния кристалличности наноразмерных кальций ортофосфатов на остеогенные клетки, это важно использовать наночастицы аморфного фосфата кальция тех же размеров, что и

гидроксиапатита. Сравнивался в первую очередь эффект от использования частиц размером ~ 20 нм. Адгезия, пролиферация и дифференциация клеток MSC были измерены на пленках аморфного фосфата кальция и гидроксиапатита в одном масштабе. Результат оказался неожиданным: больше клеток были адсорбированы на пленках с хорошо кристаллизованным наноразмерным гидроксиапатитом, чем на пленках наноразмерного аморфного фосфата кальция. Для дифференциации MSC клеток был проведен анализ активности фосфотазы. Результаты показали, что дифференциация MSC-клеток от остеобластов была значительно активизирована наногидроксиапатитом. Эти эксперименты ясно показывают, что кристаллический гидроксиапатит является лучшим субстратом для MSC-клеток, чем аморфный фосфат кальция. Данные исследования показали, что свойства клеток определяются не только размером частиц, на которых они культивируются, но и природой фазы подложки. Клетки достаточно чувствительны, поэтому даже наноразмерные изменения в топографии подложки могут вызывать изменение поведения клеток. Каким образом клетки «определяют» размер частиц подложки – до сих пор остается неизвестным. На самом деле, определение механизмов, посредством которых частицы фосфатов кальция и их размеры оказывают воздействие на костные клетки, требует дальнейших систематических исследований.

II.4. Стоматологические приложения

Кариес зубов является одной из самых распространенных болезней полости рта. В результате деятельности бактерий на начальной стадии кариеса происходит повреждение зубной эмали, которая является внешним покрытием зубов и обладает достаточно высокой твердостью и стойкостью. Будучи самой минерализованной тканью органов позвоночных, зубная эмаль состоит из многочисленных игольчатых апатитных нанокристаллов, которые сгруппированы в параллельно расположенные призмы для обеспечения

уникальной механической прочности и биологической защиты. Эмаль является, по сути, мертвой тканью, основной составляющей которой (~ 97 мас.%) является неорганический наноразмерный апатит, таким образом, живой организм не может ее самостоятельно восстановить после утраты. Обычным методом восстановления поврежденной эмали является заполнение дефектов искусственными материалами. Тем не менее, существует опасность возникновения вторичного кариеса на границе между зубом и лечебным материалом. Наноразмерные гидроксиапатит и аморфный фосфат кальция чаще всего рассматриваются в качестве модельных соединений для разработки материалов, восстанавливающих эмаль, ввиду их химического и фазового подобия. Таким образом, реминерализация эмали минералами с помощью наноразмерных частиц апатита или других ортофосфатов кальция предлагает стоматологические исследования. Например, зубные пасты, содержащие наночастицы апатита, могут способствовать частичной реминерализации деминерализованной эмали, а также обладают некоторыми отбеливающим эффектом. Кроме того, наноразмерный гидроксиапатит добавляется в фторсодержащие ополаскиватели рта. Также исследованиям подвергались реминерализационные возможности спортивных напитков, содержащих наноразмерный гидроксиапатит. Было установлено положительное влияние добавки наноразмерного β -ТСР, способствующего реминерализации эмали при деминерализирующем действии кислотной среды. К сожалению, эти химические аналоги материала эмали не нашли широкого распространения в клинической практике. Естественная структура зубной эмали является слишком сложной для лабораторного моделирования: синтезированные кристаллиты апатита зачастую имеют разные размеры, морфологию и ориентацию по сравнению с таковыми в эмали, что приводит к низким адгезии и механической прочности при работах, связанных с восстановлением зубов. Последние достижения в области исследования биоминерализация также показали, что

меньшие наночастицы гидроксиапатита лучше воспроизводят свойства биоапатита, чем крупные наночастицы, которые обычно используются. Например, было показано, что наночастицы гидроксиапатита могут самоорганизовываться, формируя эмаль-подобные структуры в лабораторных условиях. Таким образом, предлагается, что локальное восстановление поверхности зубной эмали может быть улучшено наногидроксиапатитом с размером частиц ~ 20 нм, который аналогичен игольчатым строительным блокам эмали. Кроме того, было обнаружено, что эти наночастицы могут сильно адсорбироваться на поверхности эмали и даже интегрироваться в ее естественную структуру.

Наночастицы гидроксиапатита с диаметром ~ 20 нм могут значительно снижать минеральные потери с поверхности эмали. Без лечения, деминерализация поверхности естественной эмали особенно заметна в кислой среде ($\text{pH} \sim 4,5 \pm 0,1$): наблюдения выявили образование поврежденных участков уже через 2 дня. Скорость потери массы составила около $0,12 \pm 0,04$ мг/мм² в день. С другой стороны слой наноразмерного гидроксиапатита на обработанной поверхности эмали практически не изменился в кислом растворе. Скорость потери массы на таких участках можно считать нулевой, т.к. ее величина ($<0,02$ мг/мм² в день) была за пределами чувствительности методов обнаружения. Так как покрытие наноразмерным гидроксиапатитом оказалось нечувствительным к растворению, подстилающая поверхность эмали становится хорошо защищенной в слабокислой среде. Кроме того, покрытие поверхности эмали 20 нм частицами гидроксиапатита имеет твердость $4,6 \pm 0,4$ ГПа и модуль упругости $95,6 \pm 8,4$ ГПа, что хорошо согласуется с соответствующими значениями для природной эмали ($4,2 \pm 0,2$ и $94,1 \pm 5,4$ ГПа).

Сходство ~ 20 нм частиц гидроксиапатита и строительных блоков биологического апатита зубной эмали обуславливают хорошую фиксацию

искусственных биоматериалов на натуральных тканях. Кроме того, структура эмали даже усиливается наноразмерным гидроксиапатитом, так как образование вторичного кариеса подавляется при сохранении твердости. Эта стратегия может быть перспективной для применения в стоматологии, так как это предполагает простой, но эффективный способ восстановления зубной эмали при деминерализационных дефектах.

В случае наноразмерного ДСРА (см. табл. II.1), уменьшение размеров ДСРА частицы приводит к увеличению вымывания Са и PO_4 -ионов из биоккомпозитов. Таким образом, биоккомпозиты на основе нано-ДСРА, обладающие высокой прочностью и необходимым уровнем вымывания Са и PO_4 -ионов, могут обеспечить необходимую и уникальную комбинацию хороших механических и кариес-ингибирующих свойств, необходимых для стоматологических приложений.

II.5. Другие области применения

Существуют и другие области применения материалов на основе ортофосфатов кальция. Поверхностная модификация материалов наночастицами фосфатов кальция проводится с целью контроля их коллоидной стабильности, предотвращения растворения в случае низких значений pH, предотвращения воспалений и др. Эти частицы служат в качестве промежуточного слоя, обеспечивающего формирование сильной связи между гидроксиапатит-полимерной матрицей и костью, повышает их биологическую активность и улучшает способность сопряжения благодаря наличию необходимых функциональных групп. В другом аспекте, наночастицы фосфата кальция рассматриваются в качестве невирусных носителей для доставки лекарств и генной терапии в связи с их установленной биосовместимостью, легкостью обработки и высокой способностью к адсорбции. Кроме того, они могут быть носителями радиоизотопов для проведения исследований,

требующих контраста. После «загрузки» генами или лекарственными препаратами путем адсорбции, наночастицы апатитов покрывают защищающим от разрушения при проникновении сквозь клеточные мембраны слоем. Результаты эксперимента показали, что наноразмерные частицы ортофосфатов кальция обладают более высокой скоростью проникновения в клеточные мембраны и их эффективность может быть в 25 выше, чем у частиц микронного размера. Кроме того, в связи с большой удельной площадью поверхности, наноразмерные частицы могут нести большее количество «нагрузки» в виде лекарств, чем более крупные частицы.

Перенос функционально чужеродной нуклеиновой кислоты (ДНК или РНК) в ядра живых клеток (трансфекция) с целью восстановления отсутствующих функций клеток и усиления или уменьшения действия отдельных генов в настоящее время широко используется в лабораториях и в терапии. Так как нуклеиновые кислоты не могут сами по себе проникнуть сквозь клеточную стенку, возникает необходимость в эффективных носителях. Наночастицы фосфата кальция представляют уникальный класс невирусных носителей, которые могут служить эффективными альтернативными носителями ДНК для адресной доставки генов и клеток. Интересным является тот факт, что эффективность трансфекции фосфатов кальция зависит от ионного соотношения Ca/P, а именно: для ортофосфатов кальция с Ca/P = 1,30 определено четырехкратное увеличение эффективности трансфекции по сравнению с фосфатами с соотношением Ca/P = 1,65. Эти данные подчеркивают важность понимания механизмов взаимодействия между ортофосфатами кальция и ДНК, чтобы оптимизировать поглощение ДНК частицей и целенаправленному трансферу к ядру клетки.

III. Новые подходы к получению наноструктурированных материалов на основе гидроксиапатита для медицины

III.1. Синтез гидроксиапатита

Исследования гидроксиапатита и материалов на его основе проводятся на кафедре химии твердого тела Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского с 2008 года. В первую очередь разрабатывались новые методы синтеза данного вещества.

Известно, что для гидроксиапатита разработано множество методов синтеза, из которых наиболее распространенными и детально проработанными оказались растворные, а именно осаждение из водных и неводных растворов. В частности был предложен такой вариант:

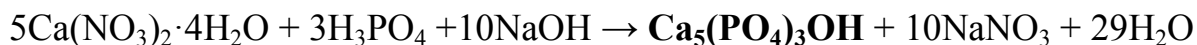


В качестве растворителя в данном методе используется анизол, что значительно повышает стоимость конечного продукта.

В указанной методике неводные среды использовались с целью предотвращения возможного гидролиза целевого продукта и внедрения в него растворенного в воде углекислого газа в форме карбонат-ионов CO_3^{2-} . Метод осаждения из водных растворов получил гораздо меньшее распространение.

Также при получении апатитов с $\text{L} = \text{OH}$ используется гидротермальный синтез. При этом можно выделить два основных вида данного метода: так называемый традиционный гидротермальный синтез, когда водные растворы исходных реактивов смешиваются и помещаются в реактор при температуре 100-200°C, и механохимически активируемый гидротермальный синтез, предусматривающий механическое воздействие на реактор в течение процесса синтеза, что обеспечивает значительное снижение температуры по сравнению с традиционным подходом.

В ННГУ им. Н.И. Лобачевского была разработана золь-гель методика синтеза гидроксиапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Реакцию проводили согласно следующему уравнению:



К раствору $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ в бидистиллированной воде добавляли раствор H_3PO_4 в количестве, необходимом для соблюдения соотношения $\text{Ca/P} = 5/3$. Полученный раствор термостатировали при 37°C , затем его pH доводили до 7 с помощью 1 М раствора NaOH. Начиная с $\text{pH} = 4$, начинал образовываться золь $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$. Реакционную смесь выдерживали при указанной температуре в течение 1 часа. Затем образовавшийся гель центрифугировали и высушивали на воздухе. При необходимости увеличения частиц проводили нагревание образца в течение 6-8 часов при температуре 600°C .

Наноразмерность продукта подтверждали методом атомно-силовой микроскопии (рис. III.1) и косвенно – по сильному уширению дифракционных максимумов на рентгенограмме порошкообразного образца по сравнению с рентгенограммой прокаленного при 600°C образца (рис. III.2).

Изменение времени и температуры термостатирования конечного продукта на финальной стадии процесса его синтеза приводило к появлению примеси фосфата и дифосфата кальция.

Для увеличения стабильности образующихся наночастиц обычно используют различные поверхностно активные вещества (ПАВ). В случае водных золь гидроксиапатита можно использовать различные спирты (этиловый, пропиловый и др.), т.к. их можно впоследствии убрать из продукта при нагревании до невысоких температур. Однако, как показали исследования, наличие ПАВ из подобных классов соединений не приводит к заметному уменьшению размера частиц.

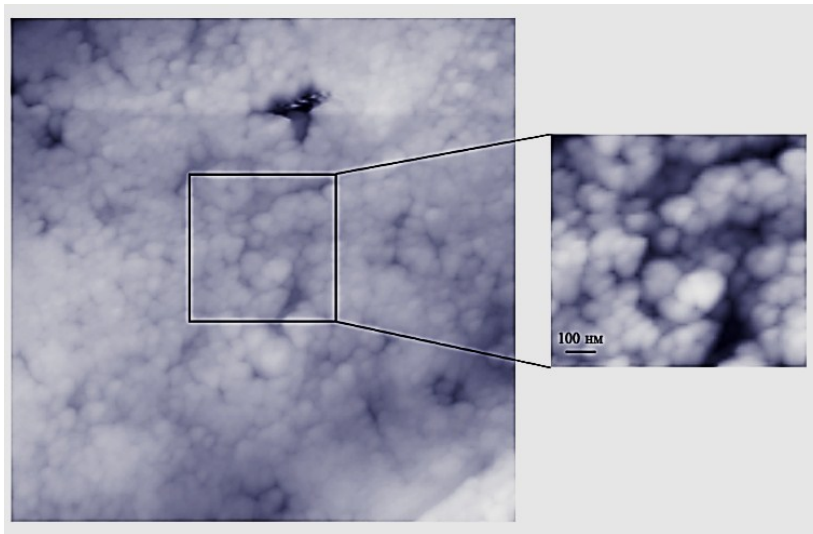


Рис. III.1. Изображение поверхности порошкообразного образца гидроксиапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, полученное на атомно-силовом микроскопе

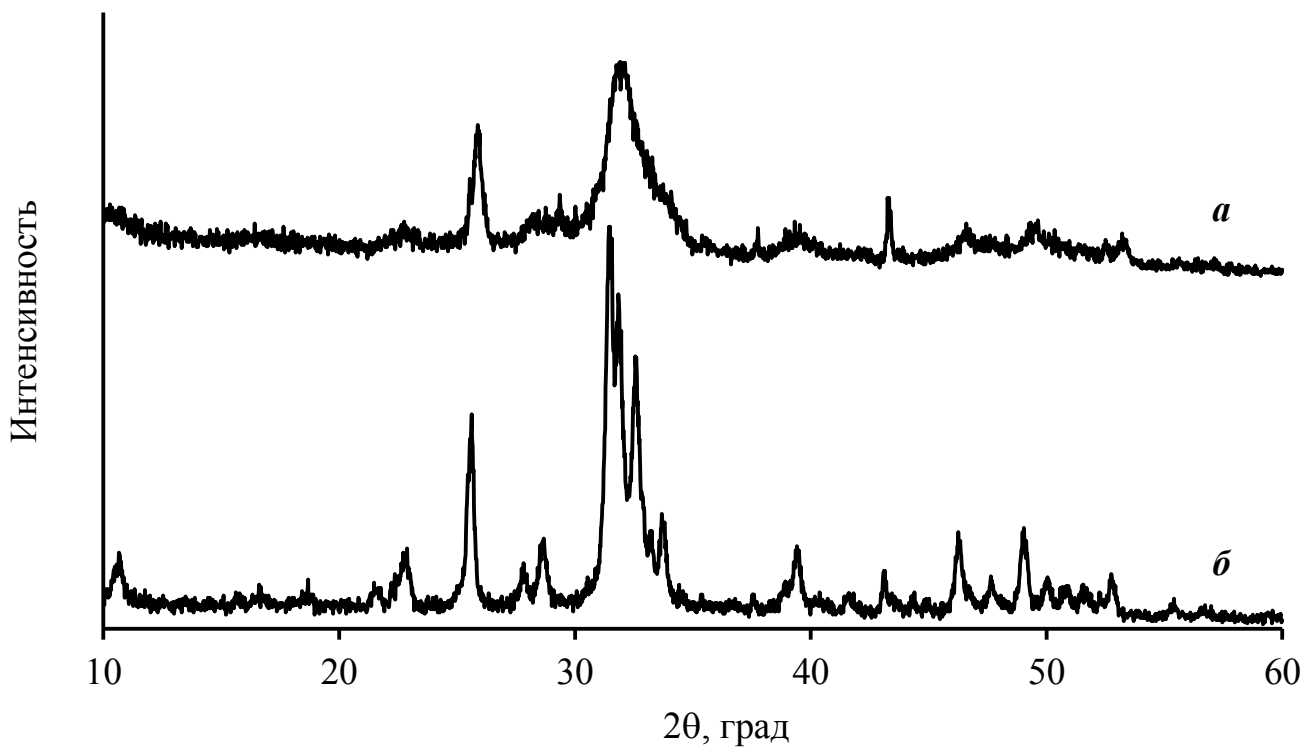


Рис. III.2. Порошковые рентгенограммы гидроксиапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ (*a* – наноразмерного, *б* – прокаленного при 600°C)

Помимо растворных методов синтеза для получения гидроксиапатита возможно использование твердофазных методик. Согласно разработанной схеме, гидроксиапатит образуется в результате следующего процесса:

III.2. Керамика

Для получения керамики наноразмерный порошок $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ диспергировали с ацетоном в агатовой ступке и полученную смесь прессовали на гидравлическом прессе при давлении. Далее заготовку в форме таблетки отжигали при температуре 873 К, поднимая температуру в течение 12 часов до указанного значения, чтобы избежать растрескивания керамики при быстром выделении остатков ацетона и воды. Полученная таблетка с линейными размерами $h = 4.2$ мм, $d = 12.0$ мм оказалась прочной, но хрупкой, с относительной плотностью 46%, вычисляемой по сопоставлению плотности образца с рентгенографической плотностью гидроксиапатита.

Для увеличения пористости керамики исходный порошок гидроксиапатита смешивали с так называемым порогеном, в качестве которого использовали поливиниловый спирт. Базовый порошок диспергировали с порогеном в присутствии ацетона. Далее смесь для формовки подвергалась вышеописанным процедурам. При отжиге керамик ПВС выгорал полностью.



Рис. III.3. Керамика из гидроксиапатита (пороген – поливиниловый спирт)

Образцы керамики, полученных с ПВС, не были деформированы. Во время отжига визуально наблюдалось их потемнение из-за распада ПВС, а затем восстановление белой окраски, из чего можно сделать вывод о полном отжиге ПВС. Установлено, что изготовление керамики с ПВС в качестве порогена возможно в широком диапазоне содержания последнего. При этом пористость керамики также меняется при относительном постоянстве прочностных свойств (рис. III.3). На данный момент удалось получить керамику с относительной плотностью от 25% до 77%. Полученная керамика, как можно видеть из данных сканирующей электронной микроскопии (рис. III.4), имеет сложную внутреннюю структуру каналов, которая в дальнейшем будет обеспечивать проникновение коллагена внутрь имплантата.

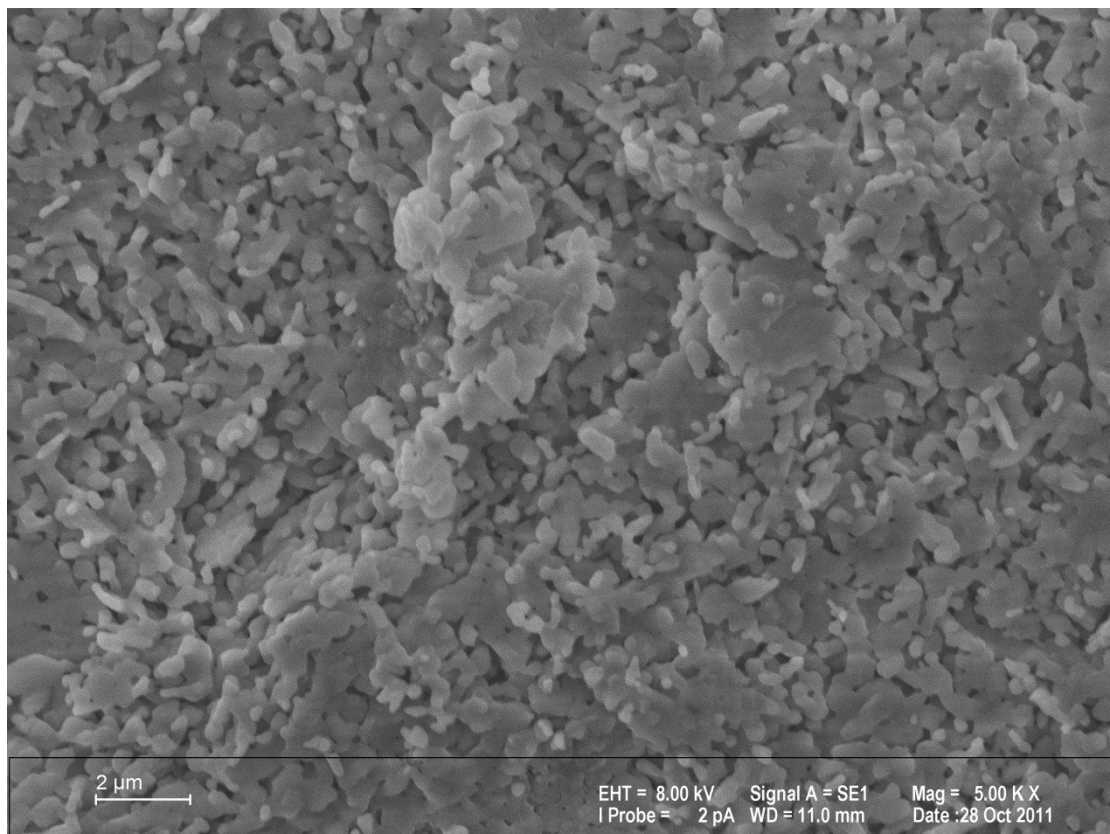


Рис. III.4. Морфология стенки керамического образца из гидроксиапатита при различном увеличении



Рис. III.5. Керамика из гидроксиапатита, обработанная скальпелем

К числу преимуществ полученной керамики можно также отнести возможность ее обработки скальпелем непосредственно на месте использования для получения элемента необходимой формы и размеров (рис. III.5).

III.3. Вискеры

Для получения вискером порошок гидроксиапатита диспергировали в агатовой ступке в течение 20 минут, используя для создания расклинивающего давления ацетон. Не до конца высушенный порошок спрессовывали в таблетки диаметром 13 мм и массой $\sim 0,5$ г при давлении 40 атм на гидравлическом прессе. Далее таблетки на керамической подложке помещали в муфельную печь. Нагревание образцов проводили поэтапно: температура поднималась на 50 К со скоростью $\sim 1,5$ К/мин, затем оставалась неизменной в течение 15 мин. После достижения конечной температуры 873 К печь была выключена, и

охлаждение проходило в естественном режиме. В результате на таблетированных образцах были получены вискеры (рис. III.6).

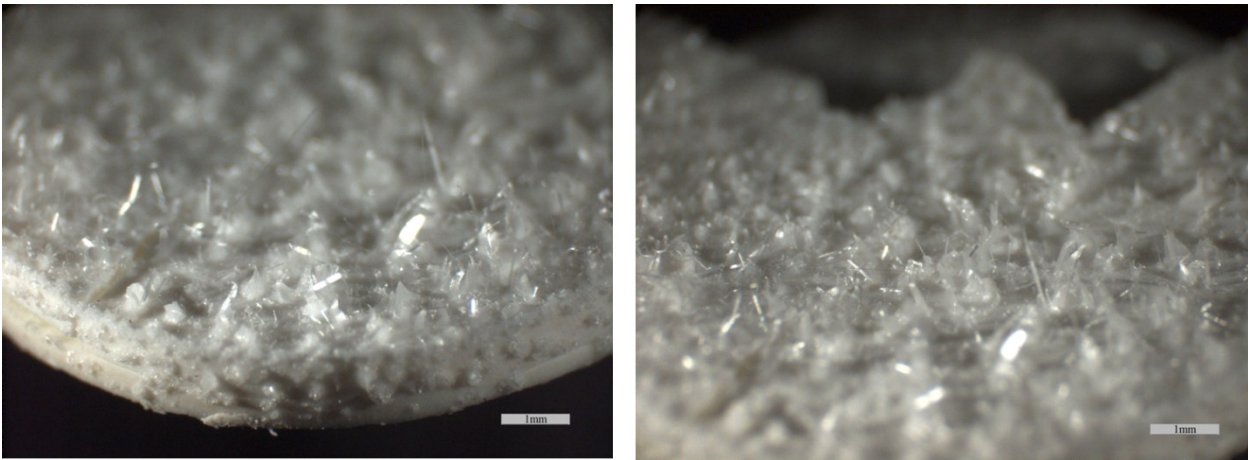


Рис. III.6. Вискеры из гидроксиапатита на поверхности керамической таблетки (изображение получено с помощью электронного микроскопа)

Линейные размеры полученных из гидроксиапатита вискером были определены методом сканирующей электронной микроскопии (рис. III.7). Максимальная длина волокон составила 2,85 мм при диаметре $4.5 \div 36$ мкм. Таким образом, соотношение длина/диаметр вискером составляет несколько порядков, тогда как в литературе говорится о соотношениях 3/1, 5/1. Ввиду дальнейшего использования вискером в качестве наполнителя композитных материалов, большое соотношение длина/диаметр является необходимым фактором.

При росте вискером ключевым моментом является наличие остаточной жидкости в поликристаллическом порошке гидроксиапатита. В данном случае рост нитей происходит по механизму «пар – жидкость – кристалл». Вискеры растут из пересыщенного раствора, находящегося в массе таблетки, откуда вещество «перекачивается» в кристалл. Таким образом, контролируя количество остаточной влаги в «основе» для роста вискером, можно регулировать их длину.

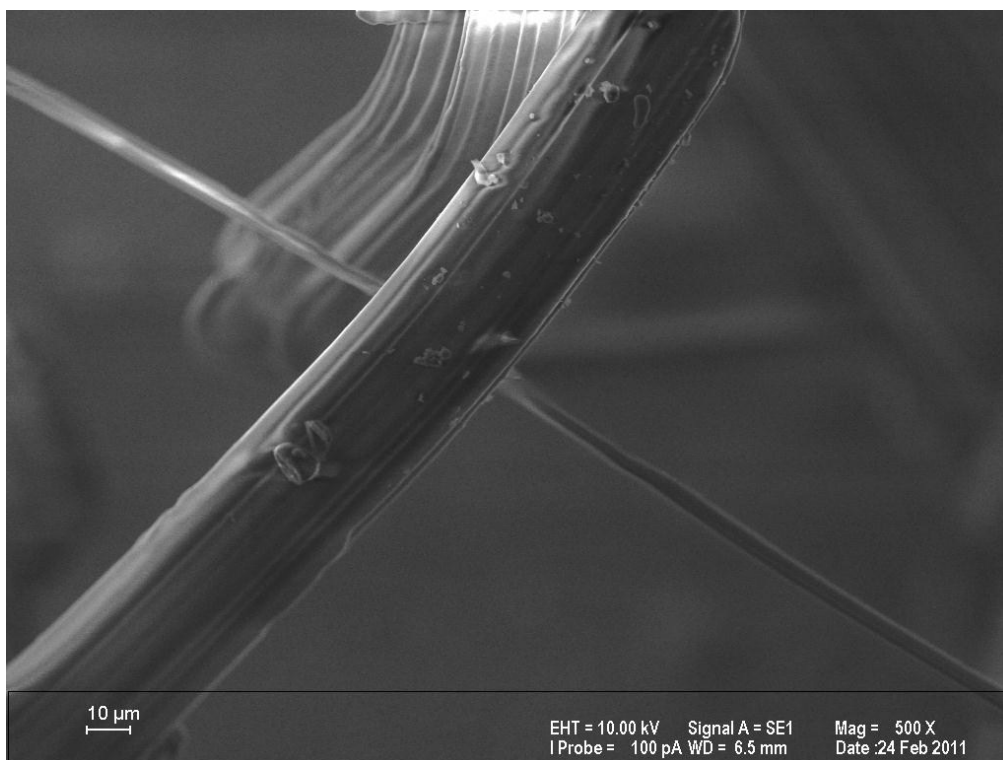
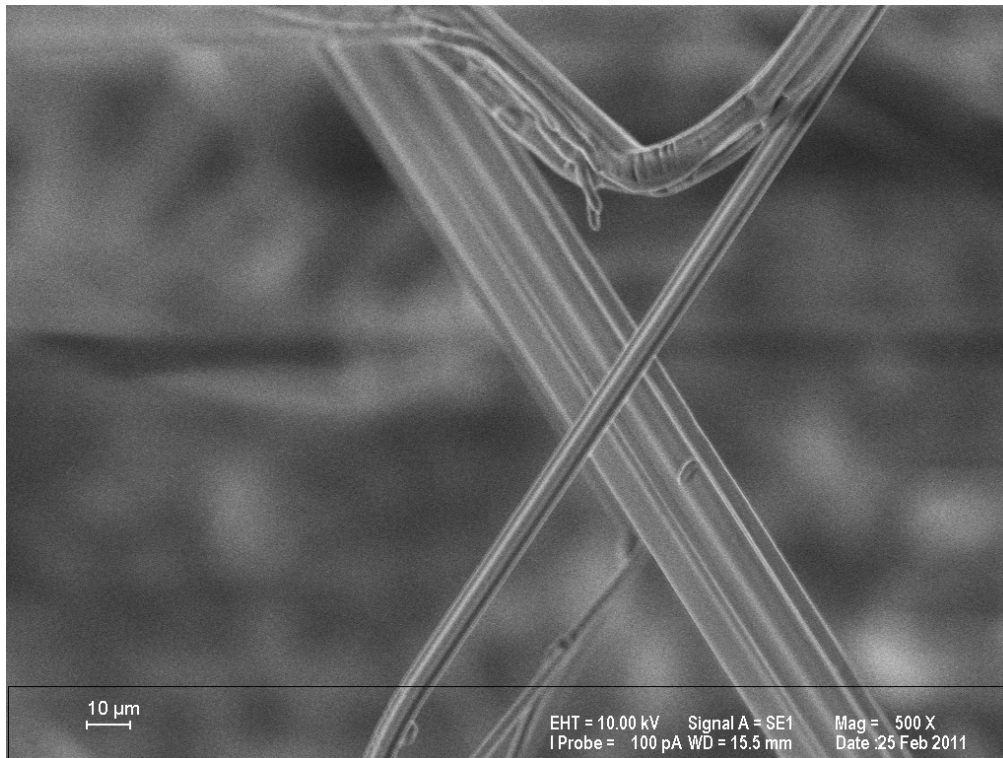


Рис. III.7. Изображение вискеро́в, полученное с помощью сканирующего электронного микроскопа

III.4. Биологическая совместимость

Для определения биологической совместимости и активности гидроксиапатита был проведен ряд предклинических испытаний. Для этого была разработана комплексная методика оценки взаимодействия гидроксиапатита с культурой клеток – диплоидных фибробластов, которая включает в себя:

1. изучение воздействия на жизнеспособность клеток в культуре;
2. изучение воздействия на пролиферацию (размножение) клеток в культуре;
3. изучение воздействия на адгезию клеток к веществу;
4. изучение воздействия на синтез фибронектина.

Преимущество предлагаемой методики состоит в том, что практически все параметры можно определить достоверно в одном и том же эксперименте в необходимом количестве повторов, компьютерное архивирование обеспечивает отчетливую наглядность результатов, а использование методов иммуноферментного анализа — высокую точность количественных исследований. Кроме того, для исследования расходуется минимальное количество испытуемого вещества и клеточного материала. Для сравнения по указанной методике также был проанализирован основной, на данный момент, используемый в клинической практике материал отечественного производства (в дальнейшем «образец сравнения»).

На первом этапе проводилась стерилизация наноразмерного порошка гидроксиапатита путем выдерживания его в течение 1 месяца в 30% водном растворе диамида угольной кислоты $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$. Данная методика стерилизации является стандартной при клинических опытах с материалами.

Для получения клеточной культуры дермальных фибробластов человека используются биоптаты неизменной кожи, полученные после косметических операций (минимальные остатки кожи не более 1 см², не востребованные при

операциях). Используют только материал от пациентов, обследованных на RW, гепатиты, ВИЧ при получении отрицательных результатов. В анамнезе пациентов отсутствуют онкологические заболевания, туберкулез, заболевания кожи. Рост культуры проходит в условиях CO₂-инкубатора при содержании CO₂ в атмосфере 5%, температуре 37°C, абсолютной влажности.

Культура фибробластов, подготовленная к эксперименту, должна представлять собой микроскопически равномерный монослой клеток с типичным рисунком в виде «завитков». Фибробласты – поверхностно зависимые клетки, имеющие преимущественно веретеновидную, реже - звездчатую, форму, с двумя, тремя выраженными отростками, плотными ядрами, в которых хорошо видны 2-3 ядрышка, и гомогенной цитоплазмой (рис. III.8).

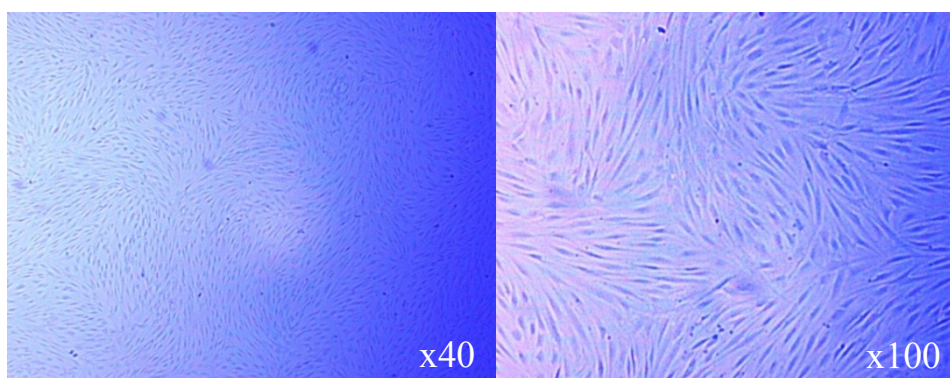


Рис. III.8. Контрольный образец клеточной культуры до эксперимента при различном увеличении

Фибронектин (ФН) – мультифункциональный высокомолекулярный гликопротеин, содержащийся в биологических жидкостях и тканях и участвующий в регуляции функций лейкоцитов, тромбоцитов, ретикулоэндотелиальной системы, пролиферации и дифференцировке фибробластов и эпидермальных клеток. Фибронектин синтезируется фибробластами и обладает определенными химическими, физико-химическими и иммунологическими свойствами и может определяться с помощью иммуно-

химических методов, одним из наиболее точных из которых является метод иммуно-ферментного анализа.

Для эксперимента было подготовлено четыре серии образцов: контрольный образец (чистая клеточная культура), клеточная культура + гидроксиапатит, клеточная культура + «образец сравнения»-1, клеточная культура + «образец сравнения»-2. Состояние культуры регистрировали через 48, 72 и 96 часов во всех четырех сериях образцов, при этом отмечались такие визуальные характеристики культуры как состояние монослоя, так состояние самих клеток. Фиксация изображений проводилась при 40-, 100- и 200-кратном увеличении. Также через указанные промежутки времени отбирались пробы для определения содержания фибронектина. Всего проводилось четыре серии опытов. На рисунке III.9 для примера представлены результаты одной из серий экспериментов.

Использование разработанной методики оценки взаимодействия гидроксиапатита с культурой клеток позволило показать, что гидроксиапатит, синтезированный с помощью технологии золь-гель метода, не токсичен для культуры дермальных фибробластов человека в системе *in vitro*. Свидетельством нейтральности образцов гидроксиапатита является отсутствие повреждения клеток в культуре на протяжении всех сроков наблюдения, хорошая адгезия клеток к поверхности пластика в этих сериях, отчетливая пролиферация клеток в культуре в присутствии образцов гидроксиапатита, удвоение концентрации клеток к четвертым суткам, накопление фибронектина в сериях с образцами этого вещества. Более того, практически во всех исследованных сериях с гидроксиапатитом наблюдали концентрацию клеток вокруг мелких образцов препарата, что свидетельствует о возможности повышения адгезии клеток на этом веществе.

Исследование с помощью комплексной методики воздействия образцов костнозамещающего препарата отечественного производства «образец

сравнения»-1 и «образец сравнения»-2) показало, что образцы этого препарата обладают некоторой токсичностью по отношению к культуре дермальных фибробластов человека. Воздействие «образец сравнения» проявляется в гибели клеток (наличие зон разрушения), их деструкции, нарушении адгезии, снижении пролиферативной активности и синтеза фибронектина по сравнению с контрольными сериями.

Можно предположить, что более выраженная токсичность у образцов «образец сравнения»-1 обусловлена действием диоксида, входящего в его состав, т.к. известно, что все антимикробные препараты токсичны для клеток в той или иной мере, а при увеличении дозы токсичность резко возрастает. Дозировка антимикробных средств в рассматриваемом костнозамещающем средстве не указывается производителем, но в инструкции отмечено, что выделение препарата происходит в течение 20 дней (инструкция прилагается), а такое длительное выделение в среду возможно только при значительном содержании диоксида.

В состав образцов «образец сравнения»-2, как уже указывалось, входят только два компонента: искусственный гидроксиапатит и коллаген. Поэтому более корректно сравнивать гидроксиапатит, полученный золь-гель методом, именно с этим препаратом. Коллаген – это белок, синтезируемый именно фибробластами, обладающий сродством к фибробластам и фибробластоподобным клеткам. И, если не было нарушений в процессе получения коллагена, он не должен повреждать клетки, влиять на адгезию, на функции клеток. В имеющихся инструкциях на «образец сравнения» не указано, какой именно коллаген и гидроксиапатит использовался для получения этого препарата. Возможно, именно примеси, оставшиеся в результате обработки, и обуславливают токсичность образцов «образец сравнения».

Таким образом, образцы гидроксиапатита, полученного золь-гель методом, превосходят оба варианта костнозамещающего препарата «образец сравнения», т.к.

1. не разрушают клетки в культуре;
2. не нарушают адгезию клеток к поверхности, в то время как образцы «КоллапАна»- Д значительно нарушают;
3. не влияют на процессы пролиферации клеток в культуре;
4. не нарушают синтез фибронектина.

По результатам исследований можно заключить, что созданный на основе гидроксиапатита материал может быть использован в медицинских целях, поскольку по своим показателям биоактивности он находится на уровне или превосходит существующие аналоги. Разработанная методика получения пористой керамики позволяет получать образцы с заданной пористостью для использования на различных участках кости. Синтезированные по новой методике вискеры гидроксиапатита могут быть использованы для улучшения прочностных характеристик указанной керамики при сохранении отсутствия цитотоксичности конечного продукта.

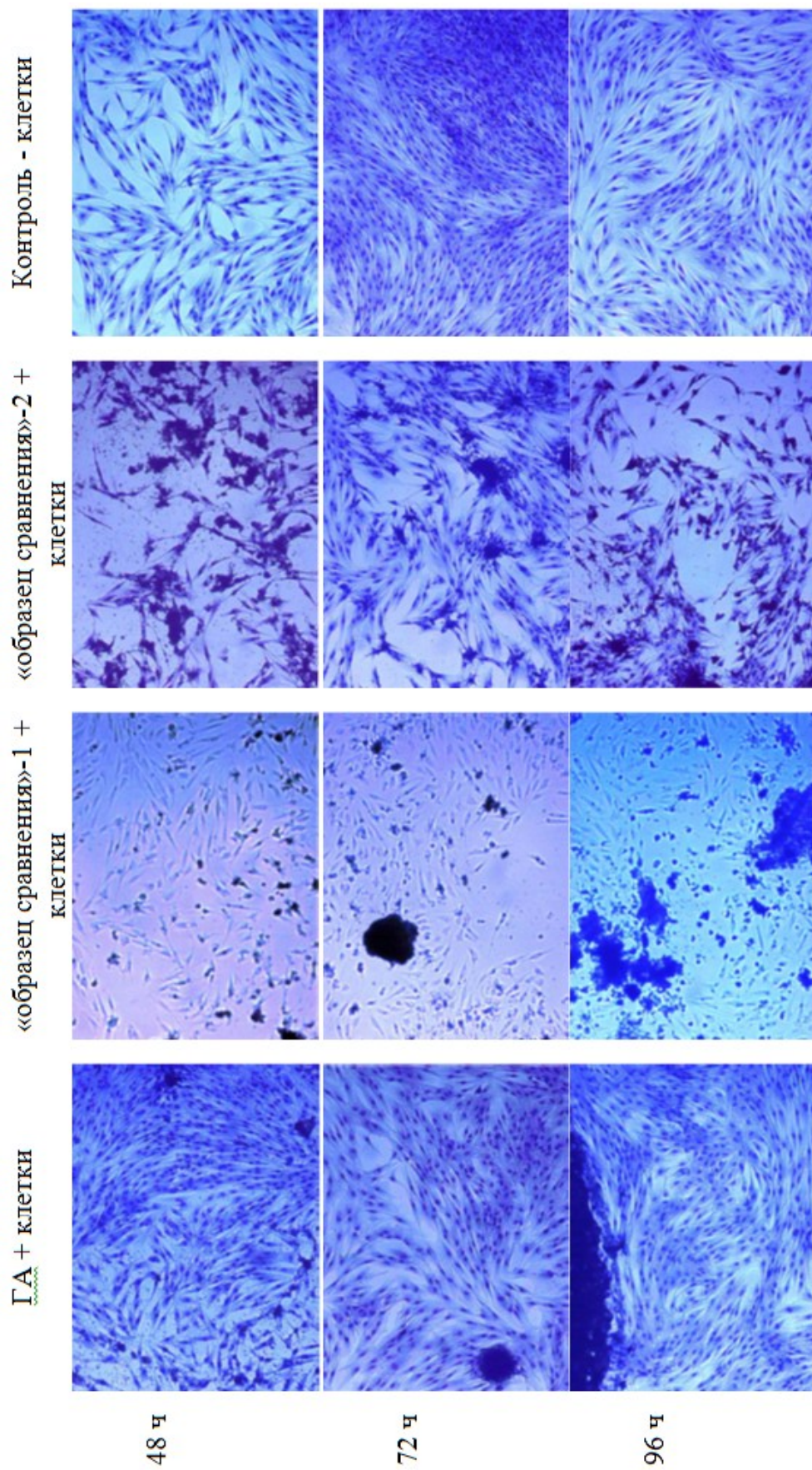


Рис. III.9. Сравнение действия различных материалов на основе гидроксиапатита на культуру клеток (фибробластов). Снимки даны с увеличением x100

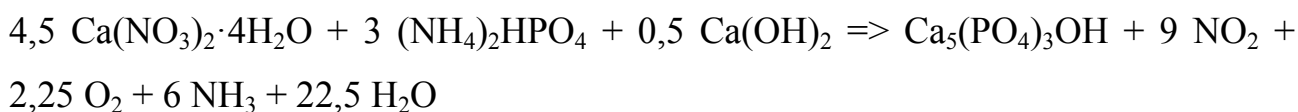
IV. Получение и исследование наноструктурированных биосовместимых материалов на основе гидроксиапатита

IV.1. Лабораторная работа №1

Синтез гидроксиапатита твердофазным и золь-гель методами.

1.1. Твердофазный синтез гидроксиапатита.

Синтез гидроксиапатита методом реакции в твердой фазе проводится согласно уравнению реакции:



Реактивы взвешиваются на электронных аналитических весах *AUX-220 Shimadzu* (рис. IV.1). До включения весов необходимо по встроенному уровню (1) выровнять положение прибора. Затем весы подключаются к электрической сети и запускаются нажатием кнопки «POWER» (2) на панели прибора (3). Калибровка весов происходит автоматически. После окончания калибровки, сопровождаемой появлением надписи «Cal End» на дисплее весов (4), появляется число 0.0000. Стрелка в левом верхнем углу дисплея (5) является индикатором того, что весы уравновешены и можно приступать к взвешиванию.

Реактивы взвешиваются на кальке. Кусочек кальки кладется на чашу весов, после чего необходимо нажать кнопку «→0/T←» (6), чтобы обнулить показания весов. Таким образом, фиксируемая на дисплее масса будет соответствовать массе взвешиваемого реактива.

Стехиометричную смесь реактивов тщательно диспергируют в агатовой ступке, затем помещают в керамический тигель и нагревают до температуры 300°C в течение 3х часов. Далее реакционную смесь снова диспергируют,

нагревают до температуры 600°C и прокаливают при указанной температуре в течение 5 часов.



Рис. IV.1. Электронные аналитические весы AUX-220 Shimadzu (комментарии в тексте)

Нагрев реакционной смеси проводят в печи с электронным программированием Snol 6,7/1300 (рис. IV.2). Для этого с панели управления печи вводится алгоритм, представленный в таблице IV.1.



Рис. IV.2. Печь с электронным программированием Snol 6,7/1300 и ее панель управления

Таблица IV.1. Алгоритм программы для печи Snol 6,7/1300

Шаг	Действие	Комментарий
1	нажать «Run/Rst» (долго)	сброс предыдущей программы
2	нажать «↶» (долго)	вход в меню, отобразится «Menu/Li-0»
3	нажать «↑»	навигация по меню, отобразится отобразится «Menu/Prog»
4	нажать «↶» (долго)	вход в раздел введения алгоритма нагрева, отобразится «Ptrn/3»
5	нажать «↶»	введение количества этапов нагрева «Step/_»*
6	нажать «↶»	номера шага «SP0», ввод температуры (0°C)
7	нажать «↶»	ввод времени нагрева «t0» (0)
8	нажать «↶»	номера шага «SP1», ввод температуры (300°C)
9	нажать «↶»	ввод времени нагрева «t1» (3.00)
10	нажать «↶»	номера шага «SP2», ввод температуры (300°C)
11	нажать «↶»	ввод времени выдержки «t2» (1.00)
12	нажать «↶»	номера шага «SP3», ввод температуры (600°C)
13	нажать «↶»	ввод времени нагрева «t3» (0.30)
14	нажать «↶»	номера шага «SP4», ввод температуры (600°C)
15	нажать «↶»	ввод времени нагрева «t4» (5.00)

* - ввод численных значений осуществляется нажатием клавиш «↓» и «↑».

Времени выполнения программы достаточно, чтобы полностью провести синтез гидроксиапатита в твердой фазе, и вещество готово для дальнейших исследований.

1.2. Синтез гидроксиапатита золь-гель методом.

Данный метод синтеза гидроксиапатита имеет несколько преимуществ по сравнению с предыдущим:

- а. меньшее время процесса;
- б. отсутствие необходимости существенного нагрева реакционной смеси позволяет избежать случайного перегрева и разрушения целевого соединения;
- в. возможность получения наноразмерных частиц гидроксиапатита.

Синтез проводится в растворе. Для этого в стеклянном стакане ($V = 500$ мл) смешиваются 0,5М раствор нитрата кальция $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и 1М раствор ортофосфорной кислоты H_3PO_4 так, чтобы сохранялось необходимое для получения гидроксиапатита соотношение $\text{Ca/P} = 5/3$. В отдельной колбе ($V = 1000$ мл) готовится 1М раствор гидроксида натрия NaOH . Оба сосуда термостатируются в *термостате Alpha A-24 Lauda* (рис. IV.3) при температуре 37°C . Программирование термостата осуществляется длительным нажатием на желтую кнопку 1 с последующим введением температур с помощью синей и красной кнопок на управляющем блоке.

Затем в первом стакане с помощью раствора щелочи кислотность среды доводится до $\text{pH} = 7$. Контроль кислотности и дополнительный контроль температуры осуществляется с помощью *pH-метра pH-410 Аквилон* (рис. IV. 4) (переключение между режимами измерения кислотности и температуры осуществляется с приборной панели).



Рис. IV.3. Термостат Alpha A-24 Lauda и его управляющий блок



Рис. IV.4. рН-метр рН-410 Аквилон

Важно!!! Перед помещением электрода рН-метра в реакционную смесь его необходимо тщательно ополоснуть дистиллированной водой во избежание попадания в раствор компонентов буфера.

При появлении белого золя и достижении целевого значения рН раствор дополнительно выдерживается при заданной температуре в течение 1 часа. Далее образовавшийся гель тщательно центрифугируется и отмывается дистиллированной водой. Гель переносится на чашку Петри и сушится на воздухе или в сушильном шкафу при температуре 150°C.

1.3. Рентгенофазовый анализ

Рентгенофазовый анализ является основным методом идентификации неорганических соединений. В основе рентгенографии лежит анализ дифракционной картины, полученной при рассеянии электромагнитного рентгеновского излучения рассеивающими центрами – электронными оболочками атомов. Дифракция является следствием интерференции вторичных волн, возникающих в результате когерентного рассеяния. Ввиду того, что длины волн рентгеновского излучения соизмеримы с межатомными расстояниями кристалла, при прохождении рентгеновских лучей через вещество возникает дифракционная картина.

Явление дифракции можно рассматривать с точки зрения отражения рентгеновских лучей от идеализированных атомных плоскостей кристалла (рис. IV.5).

По законам интерференции дифракция для отраженного пучка S_1 возможна в случае, если разность хода D лучей пучка S_1 и S_0 равна целому числу длин волн: $\Delta = n \cdot \lambda$, где n – порядок отражения, равный 1, 2, 3... .

Из рисунка следует основное уравнение рентгенофазового анализа – уравнение Вульфа-Брэгга:

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

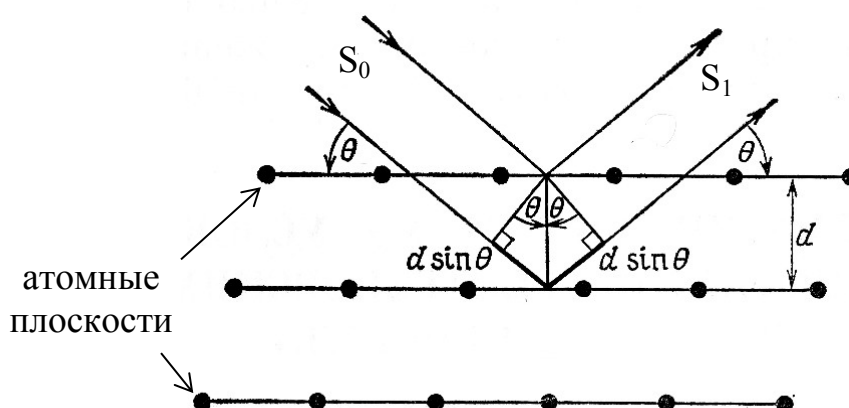


Рис. IV. 5. Дифракция в кристалле: θ – угол, при котором лучи отражаются от семейства плоскостей; S_0 – пучок монохроматических рентгеновских лучей, направленных на атомные плоскости; S_1 – пучок отраженных дифрагированных лучей

После получения порошкообразных образцов гидроксиапатита необходимо подвергнуть их рентгенофазовому анализу на предмет соответствия целевой фазы и обнаружения примесей.

Для рентгенофазового анализа полученных образцов предлагается использовать *рентгеновский дифрактометр XRD-6000 Shimadzu* (рис. IV.6). Порошкообразный образец помещается в кювету (рис. IV.6-1 или 2) и устанавливается в кабине дифрактометра.

Управление дифрактометром осуществляется с помощью программы XRD-6000/7000 V. 5.21, интерфейс которой представляет собой набор модулей (рис. IV.7).

В первую очередь запускается модуль «Display & Setup», который проверяет, закрыта ли дверь кабины дифрактометра, и выполняет его калибровку при первом включении (рис. IV.8).

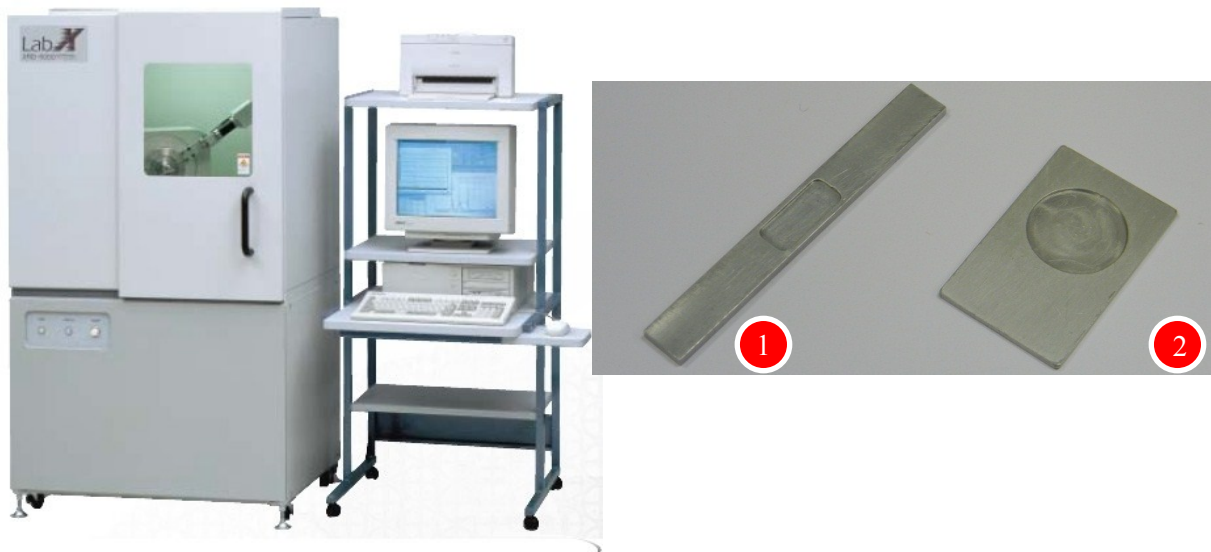


Рис. IV.6. Рентгеновский дифрактометр XRD-6000 Shimadzu и алюминиевые кюветы для образцов (1 и 2)

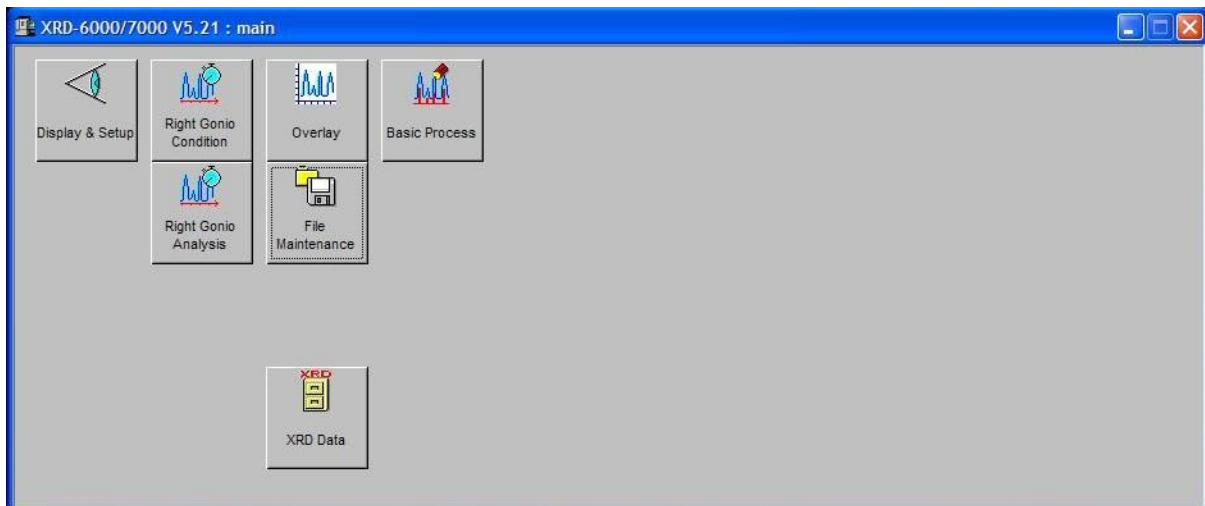


Рис. IV.7. Интерфейс программы XRD-6000/7000 V. 5.21

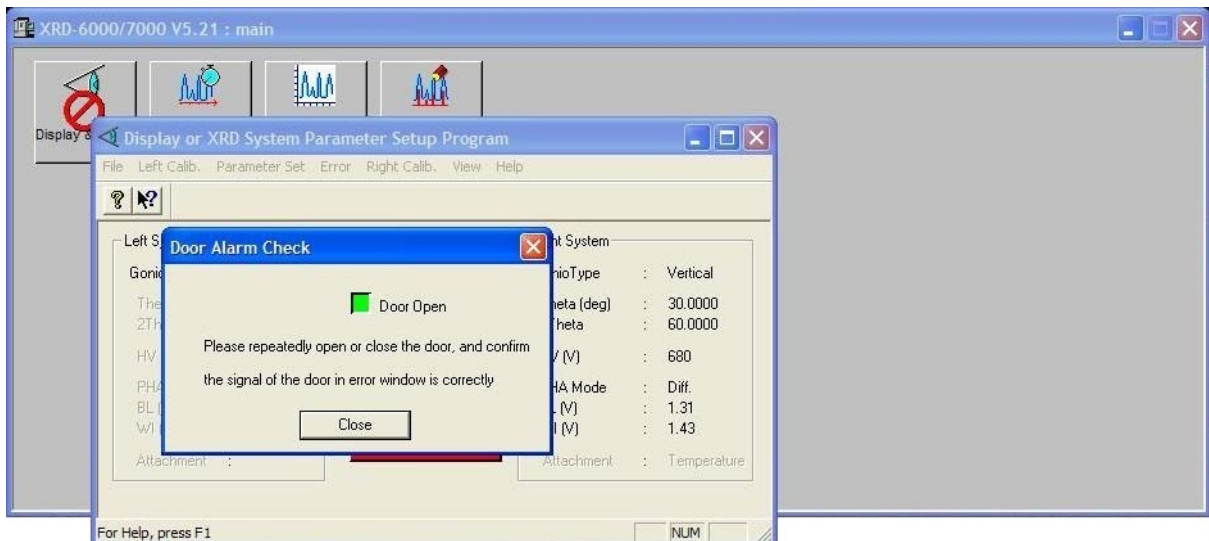


Рис. IV.8. Проверка закрытия двери кабины дифрактометра

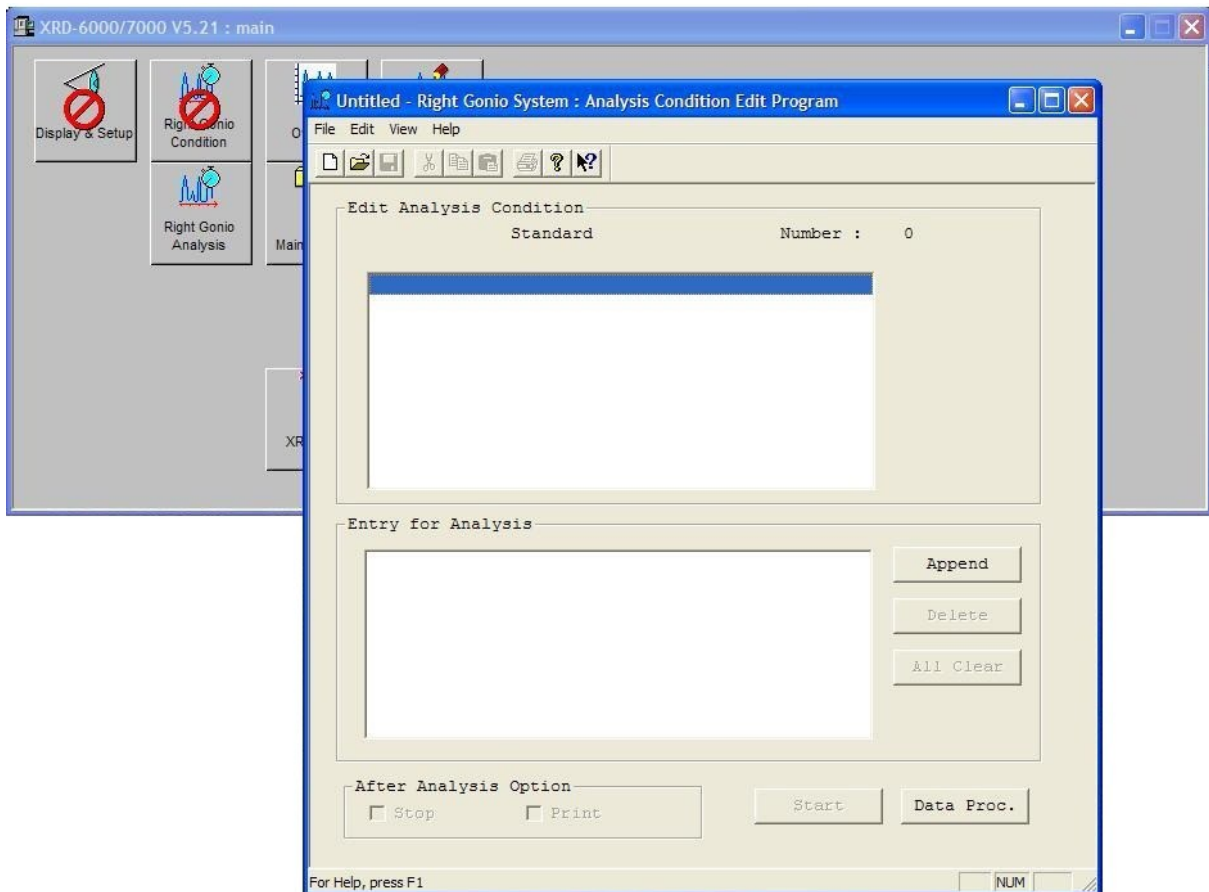


Рис. IV.9. Раздел «Right Goni Condition»

Условия съемки рентгенограммы задаются в блоке «Right Gonio Condition» (рис. IV.9).

В указанном разделе открывается подраздел «Standard» (рис. IV.10).

В подразделе «Standard» непосредственно задаются условия съемки: интервал углов 2θ («Scan Range (deg)»), шаг сканирования («Step (deg)»), скорость сканирования («Scan Speed (deg/min)'). После нажатия кнопки «ОК» появляется раздел, где указываются названия файлов (рис. IV.11).

Записываемая рентгенограмма будет отображаться в реальном режиме в окне, открываемом нажатием клавиши «Right Gonio Analysis» в интерфейсе программы (рис. IV.12).

Записанную рентгенограмму можно перевести в файл с расширением «.txt» следующим образом. В программе XRD-6000/7000 V. 5.21 нужно открыть раздел «File Maintenance» (рис. IV.13). В верхней трети открывшегося окна после нажатия кнопки «Refer» открыть файл с данными (с расширением .raw). В нижней трети окна также после нажатия кнопки «Refer» вводится название будущего .txt-файла.

Затем в разделе «Asii Dump» нужно выбрать «Dump» (рис. IV.14).

Полученный .txt-файл можно открыть в программе MS Excel и построить рентгенограмму для дальнейшей работы.

Для установления соответствия синтезированного вещества гидроксипатиту необходимо сравнить экспериментальную рентгенограмму с рентгенограммой данного вещества из базы данных. Наиболее распространёнными являются рентгенографическая база PDF (Powder Diffraction File) и кристаллографическая Find It.

При анализе экспериментальных рентгенограмм важно также учитывать, что гидроксипатит может кристаллизоваться в нескольких пространственных группах ($P6_3/m$, $P2_1/b$ и др.), а также иметь дефектную структуру, что обуславливает различные изменения рентгенограммы.

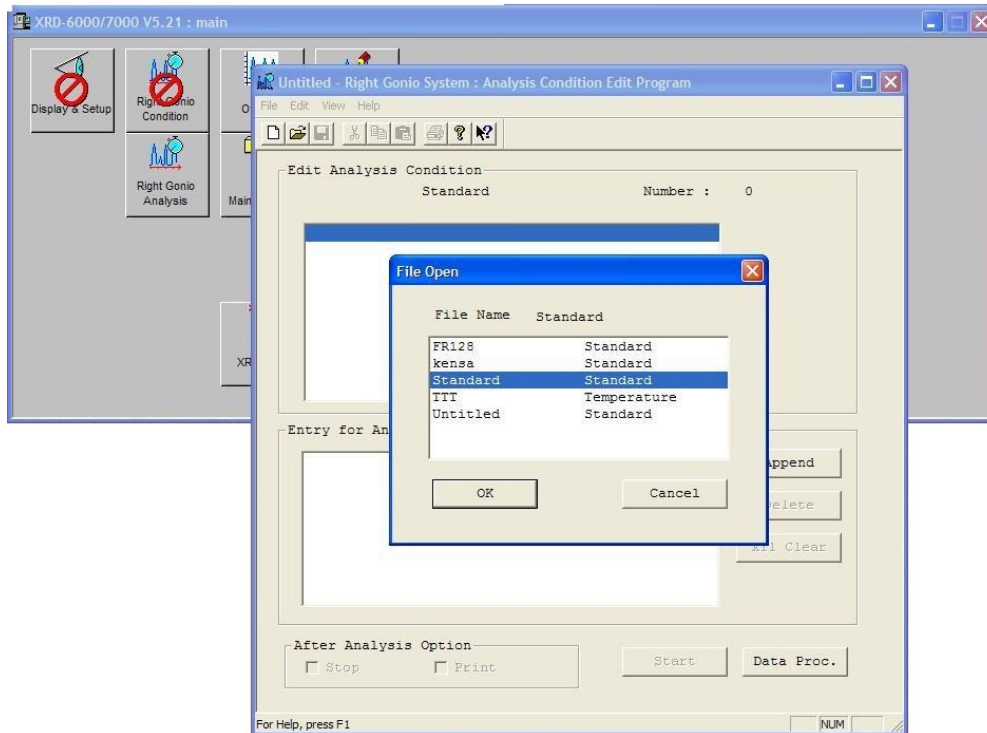


Рис. IV.10. Выбор подраздела «Standard»

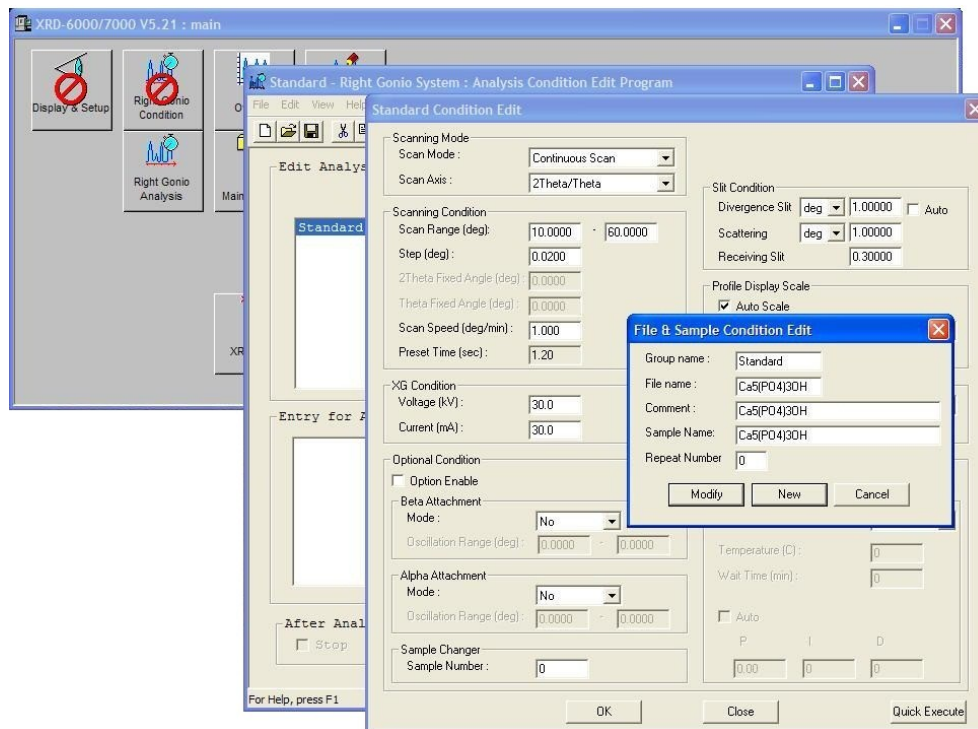


Рис. IV.11. Введение условий съемки рентгенограммы

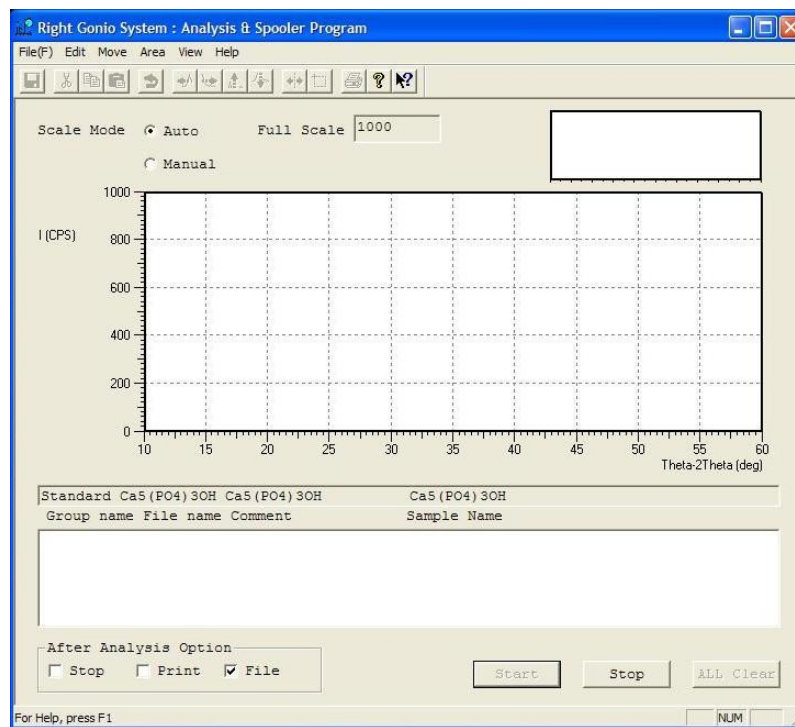


Рис. IV.12. Окно записи рентгенограммы в режиме реального времени

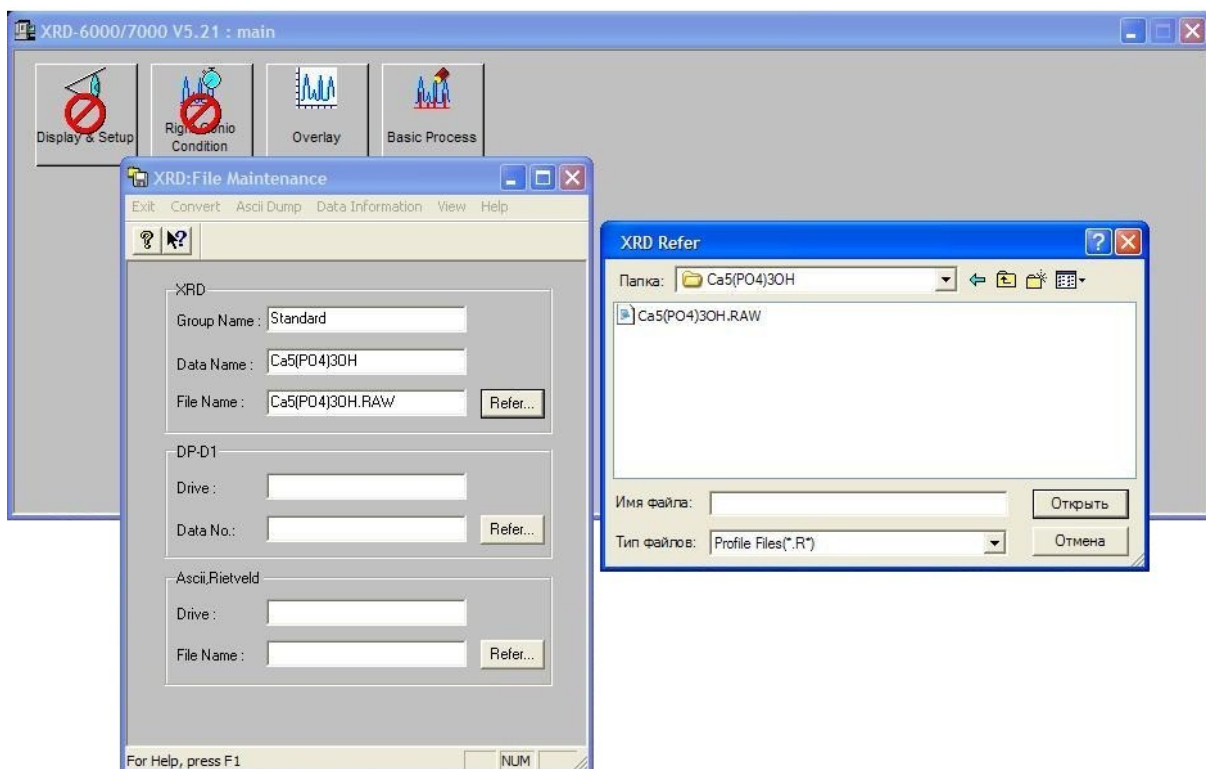


Рис. IV.13. Конвертирование формата файла данных

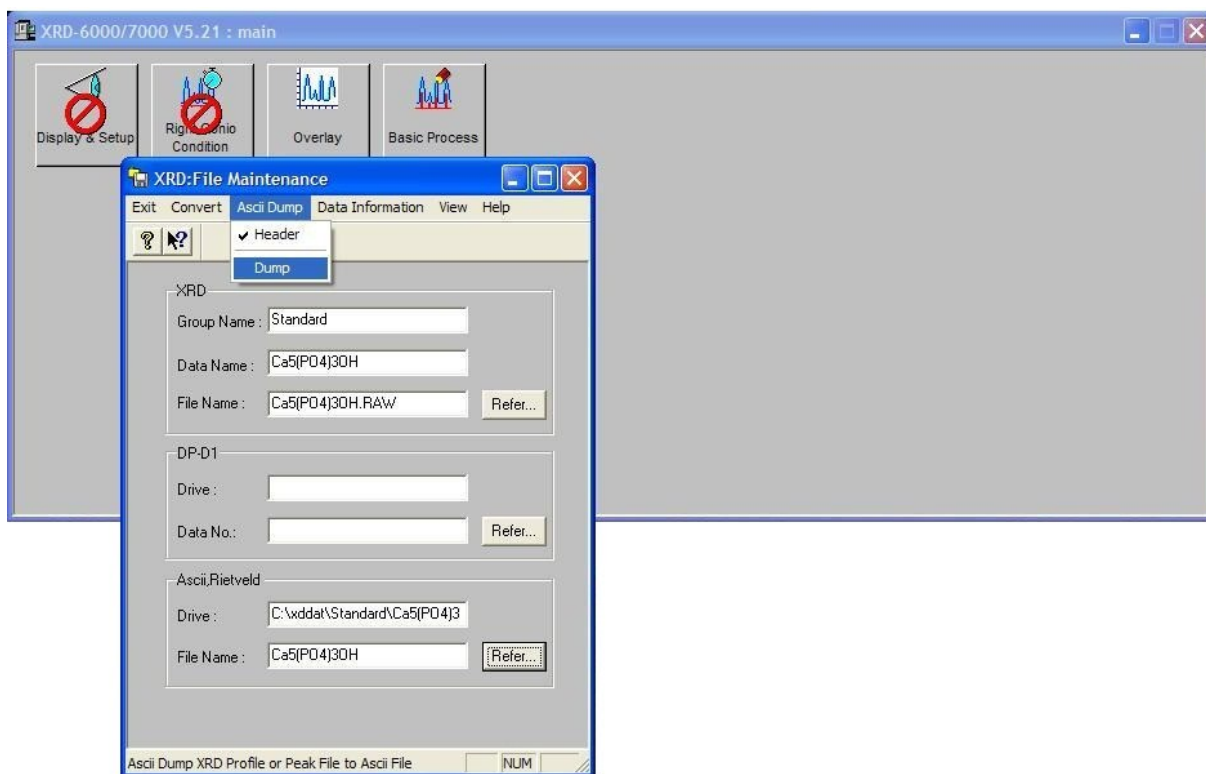


Рис. IV.14. Конвертирование формата файла данных (продолжение)

После идентификации вещества определяют его параметры элементарной ячейки с помощью метода аналитического индицирования. Сущность метода заключается в приписывании отражениям на рентгенограмме индексов hkl , которые равны долям периодов элементарной ячейки, отсекаемым ближайшей к началу координат плоскостью из семейства плоскостей в кристаллическом пространстве.

Среди большого разнообразия программного обеспечения для аналитического индицирования наиболее простой является программа Indexing and least-squares powder diffraction program (Appelman/Evans). Для работы в данной программе необходим файловый менеджер (Far, Total Commander). Входные данные формируются в файле «INDATA» (рис. IV.15), где указываются название файла, ожидаемые параметры элементарной ячейки, ее сингония, длина волны рентгеновского излучения (для рентгеновской трубки с

медным анодом $\lambda=1,5406 \text{ \AA}$), а также список углов 2θ , соответствующих отражениям на рентгенограмме, и их индексов hkl , взятых из базы данных (рис. IV.16).

```

edit INDATA.FOR - Far 2.0.1807 x86 Administrator
K:\..\..\OHtv\1\INDATA.FOR * 1251 Line 1/35 Col 8 48
CaPOH-600
TITLE
PARAM 9.420000 9.420000 6.880000 90 .00090 .00120 .000 0.2.0000.00000
SYSEXTHEXAG 701.5406000000000000000000000000000000000000000000
1 0 0 .0000001.540600 10.82000 1.00000
1 0 1 .0000001.540600 16.84000 1.00000
1 1 0 .0000001.540600 18.80000 1.00000
2 1 1 .0000001.540600 21.80000 1.00000
1 1 1 .0000001.540600 22.86000 1.00000
2 0 0 .0000001.406000 25.36000 1.00000
2 0 1 .0000001.540600 25.90000 1.00000
1 0 0 .0000001.540600 28.12000 1.00000
1 1 1 .0000001.540600 28.94000 1.00000
1 1 1 .0000001.540600 31.78000 1.00000
1 1 2 .0000001.540600 32.20000 1.00000
2 0 0 .0000001.540600 32.90000 1.00000
2 0 0 .0000001.540600 34.08000 1.00000
2 0 1 .0000001.540600 35.44000 1.00000
1 1 1 .0000001.540600 39.20000 1.00000
1 1 2 .0000001.540600 39.80000 1.00000
2 2 1 .0000001.540600 40.44000 1.00000
2 1 1 .0000001.540600 42.02000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 43.88000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 46.72000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 48.10000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 48.60000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 49.48000 1.00000
3 1 1 .0000001.540600 50.50000 1.00000
4 1 0 .0000001.540600 51.24000 1.00000
4 1 1 .0000001.540600 52.06000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 53.08000 1.00000
2 1 2 .0000001.540600 55.90000 1.00000
3 1 1 .0000001.540600 57.14000 1.00000
END
FINISH
1Help 2Save 3 4Quit 5 6View 7Search 8OEM 9 10Quit

```

Рис. IV.15. Вид файла «INDATA» для Indexing and least-squares powder diffraction program

После формирования файла исходных данных запускается приложение «XRAY», в результате работы которого в той же директории формируется файл выходных данных с названием, введенным в первой строке файла «INDATA» (рис. IV.17). В конце файла с результатами расчетов приводятся значения параметров элементарной ячейки в стандартном виде и погрешность их определения.

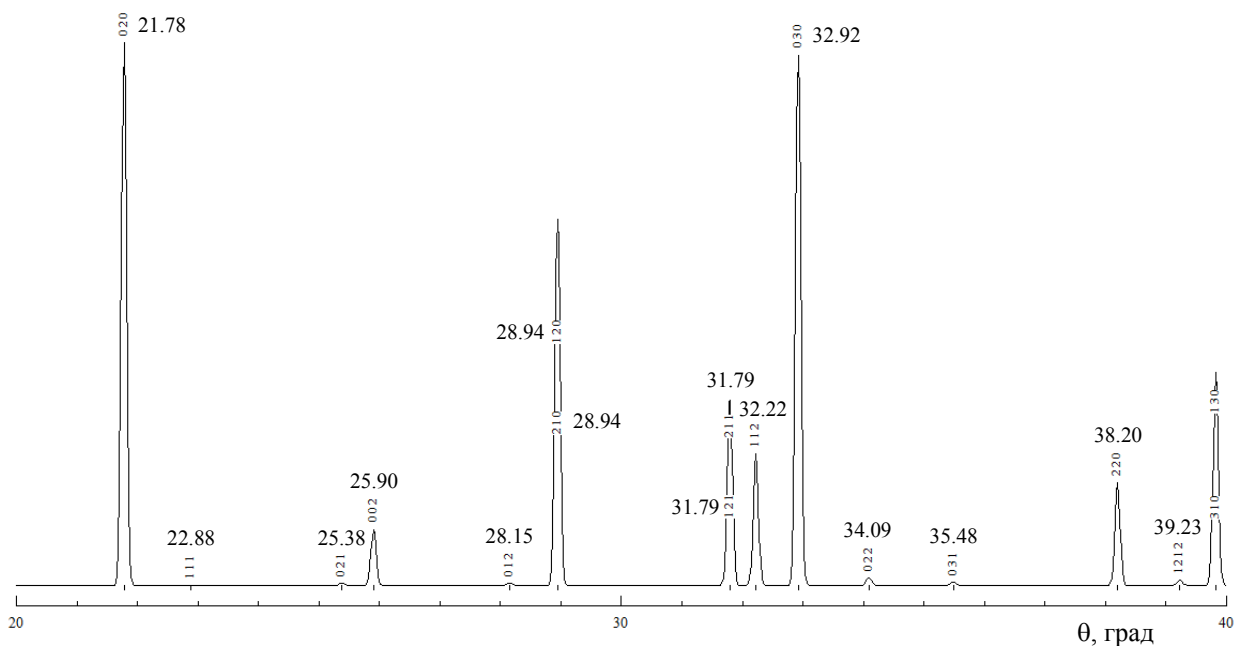


Рис. IV.16. Фрагмент рентгенограммы гидроксиапатита с указанием углов 2θ отражений и соответствующих индексов hkl



Рис. IV.17. Результаты расчета параметров элементарной ячейки в программе Indexing and least-squares powder diffraction program

Помимо прямого расчета по рентгенограммам параметров элементарной ячейки метод порошковой рентгенографии является косвенным методом

определения среднего размера частиц полученного гидроксиапатита. Вычисления проводятся по формуле Селякова-Шеррера:

$$D = n\lambda/\beta \cdot \cos\theta$$

D – размер области когерентного рассеяния (ОКР) в ангстремах, λ – длина волны излучения, θ – угол рассеяния, β – физическое уширение линии на дифрактограмме в радианах (в шкале 2θ), n – коэффициент, зависящий от формы частицы и близкий к 1. Практически определить размеры ОКР по этой формуле можно в пределах от ~ 1500 - 2000 \AA до 15 - 20 \AA , причем в различных кристаллографических направлениях. Фактически, данная методика позволяет определить размер ОКР. Таким образом, можно оценить размер кристаллита в поликристалле, или размер зерна в порошке, если последние представляют собой монокристаллы. Используя линии с разными индексами, можно оценить форму кристаллитов, сравнивая получившиеся размеры вдоль выбранного направления.

Таким образом, важнейшими задачами на этапе рентгенографического исследования полученных порошкообразных образцов гидроксиапатита является определение их состава с помощью рентгенографических баз данных, расчет параметров элементарных ячеек и оценка среднего размера частиц. Также следует провести сравнение результатов, полученных с соединений, синтезированных разными методами, для выяснения влияния условий синтеза на свойства целевого продукта.

IV.2. Лабораторная работа №2

Синтез гидроксипапатита золь-гель методом в реакторе периодического действия

Получение наноразмерного гидроксиапатита из доступных реактивов перспективно с точки зрения промышленности. Разумеется, в данном случае речь идет о получении не граммовых, а килограммовых количеств вещества.

Поэтому целесообразно адаптировать методику получения гидроксиапатита золь-гель методом для промышленных нужд, т.е. выполнить ее масштабирование.

Адаптацию методики проводят на *реакторе периодического действия модели JR-S20EX* (рис. IV. 18). Циркуляция воды в рубашке осуществляется с помощью термостата Alpha A-24 Lauda. Температура процесса $t = 37^{\circ}\text{C}$. Для полного термостатирования реактора необходимо 90 мин. Загрузка растворов нитрата кальция и фосфорной кислоты производится через клапан в крышке (1) реактора. Добавление раствора щелочи осуществляется через капельную воронку объемом 1л (2). Скорость вращения мешалки регулируется вручную (3).

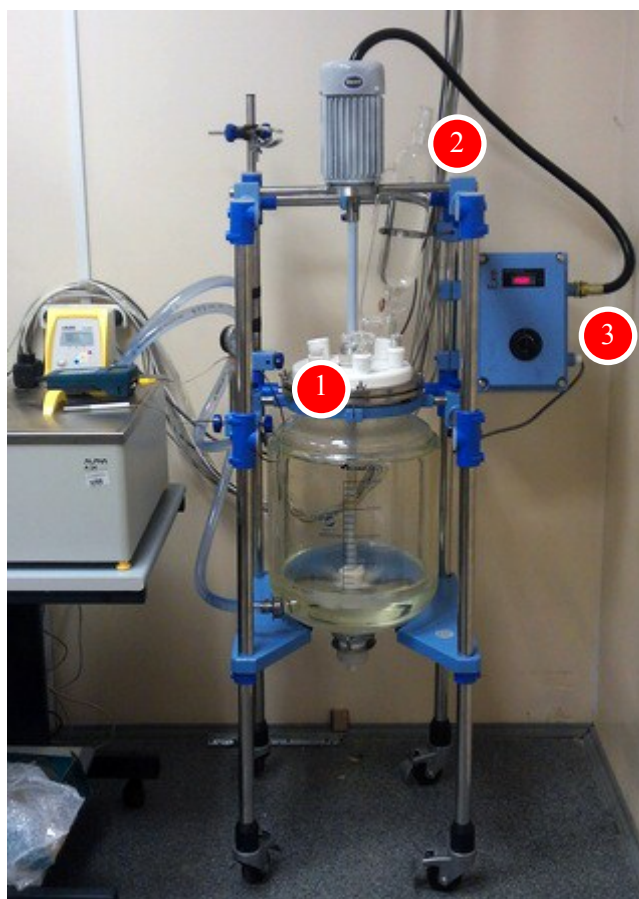


Рис. IV.18. Реактор периодического действия JR-S20EX

Основная задача данной лабораторной работы состоит в подборе оптимальных значений времени синтеза и скорости перемешивания реакционной смеси, поскольку при масштабировании химических процессов временной и диффузионный факторы будут играть лимитирующую роль.

Полученное соединение идентифицируется методом рентгенофазового анализа, а результаты расчетов сравниваются с результатами, полученными при выполнении лабораторной работы №1.

IV.3. Лабораторная работа №3

Спектроскопическое исследование гидроксиапатита, полученного твердофазным и золь-гель методами

Метод ИК-спектроскопии является основным методом проверки наличия гидроксогрупп в гидроксиапатите. При получении гидроксиапатита перегрев образцов может привести к термораспаду соединения до смеси различных фосфатов кальция или образованию оксоапатита $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{O}_2$. Продукты термораспада не обладают необходимой биоактивностью, поэтому очень важно контролировать сохранение гидроксогрупп в веществе. Данная лабораторная работа заключается в записи ИК-спектров гидроксиапатита, полученного в лабораторных работах 1-2 с помощью *ИК-фурье-спектрометра FTIR-8400S Shimadzu* (рис. IV.19).

Для записи ИК-спектров существует два основных метода подготовки образцов. Первый заключается в спрессовывании вещества с оптически прозрачным материалом, чаще всего KBr. Второй метод – приготовление суспензии вещества в вазелиновом масле. Полученная суспензия помещается между двумя стеклами из селенида цинка. Подготовленные образцы помещаются в соответствующие держатели (рис. IV.20-1 и 2,3) и устанавливаются в спектрометр таким образом, чтобы ИК-излучение беспрепятственно проходило через образец (рис. IV.20-4).



Рис. IV.19. ИК-фурье-спектрометр FTIR-8400S Shimadzu

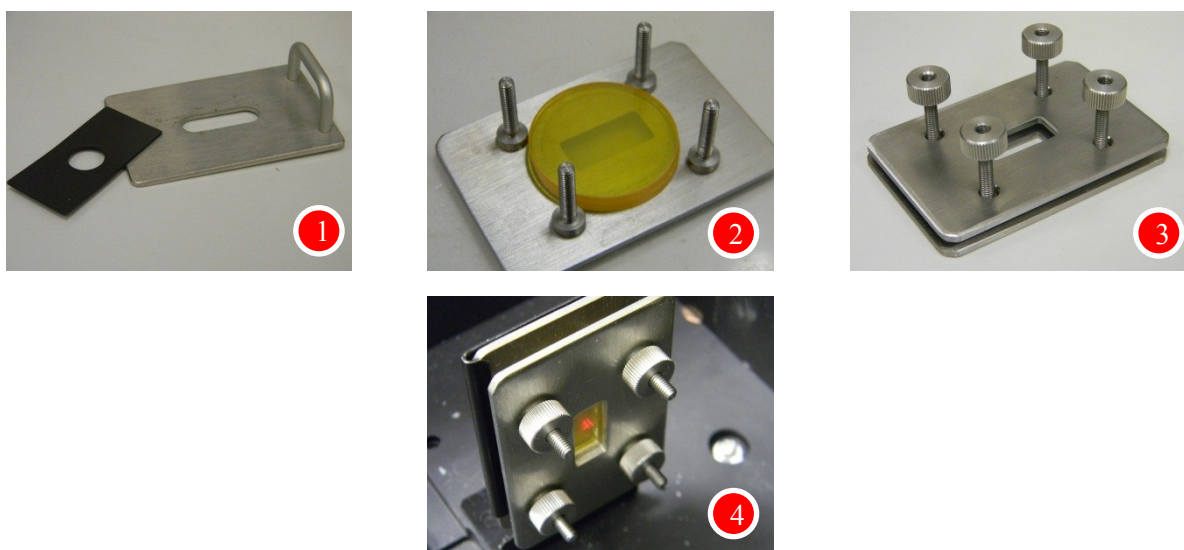


Рис. IV.20. Держатели образцов для записи ИК-спектров: 1 – для образцов в виде таблеток с KBr; 2 – суспензия гидроксиапатита в вазелиновом масле между стеклом из селенида цинка; 3 – держатель стеклом из селенида цинка; 4 – установка держателя образца внутри спектрометра

Управление спектрометром осуществляется с помощью программы IRsolution. Перед тем, как приступить к записи ИК-спектров, необходимо провести операцию инициализации прибора (рис.IV.21).

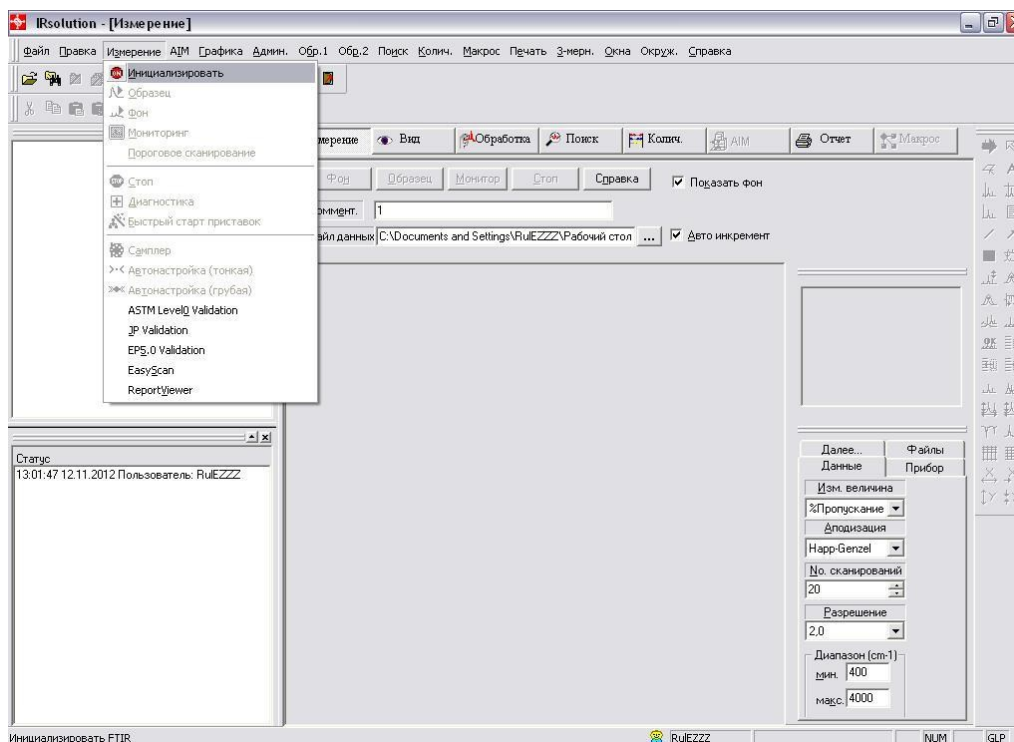


Рис. IV.21. Инициализация ИК-спектрометра

После этого нужно произвести запись ИК-спектра фона. Для этого нужно перейти на вкладку «Измерение» и нажать клавишу «Фон» (рис. IV.22). Здесь же в правом нижнем углу программы устанавливаются параметры записи: измеряемая величина (пропускание или оптическая плотность), число сканирований, разрешение при сканировании и диапазон волновых чисел (обычно $400\text{-}4000\text{ см}^{-1}$).

Затем образец устанавливается в кюветное отделение и записывается ИК-спектр образца (рис. IV.23). Для этого на вкладке «Измерение» нужно нажать клавишу «Образец».

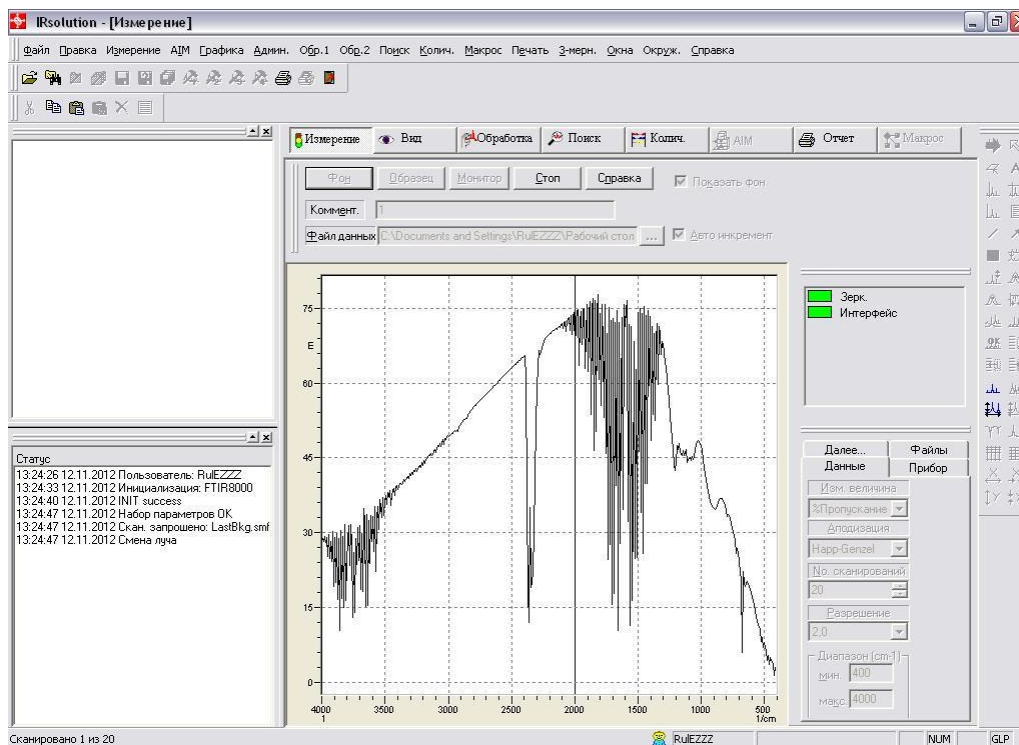


Рис. IV.22. Запись ИК-спектра фона

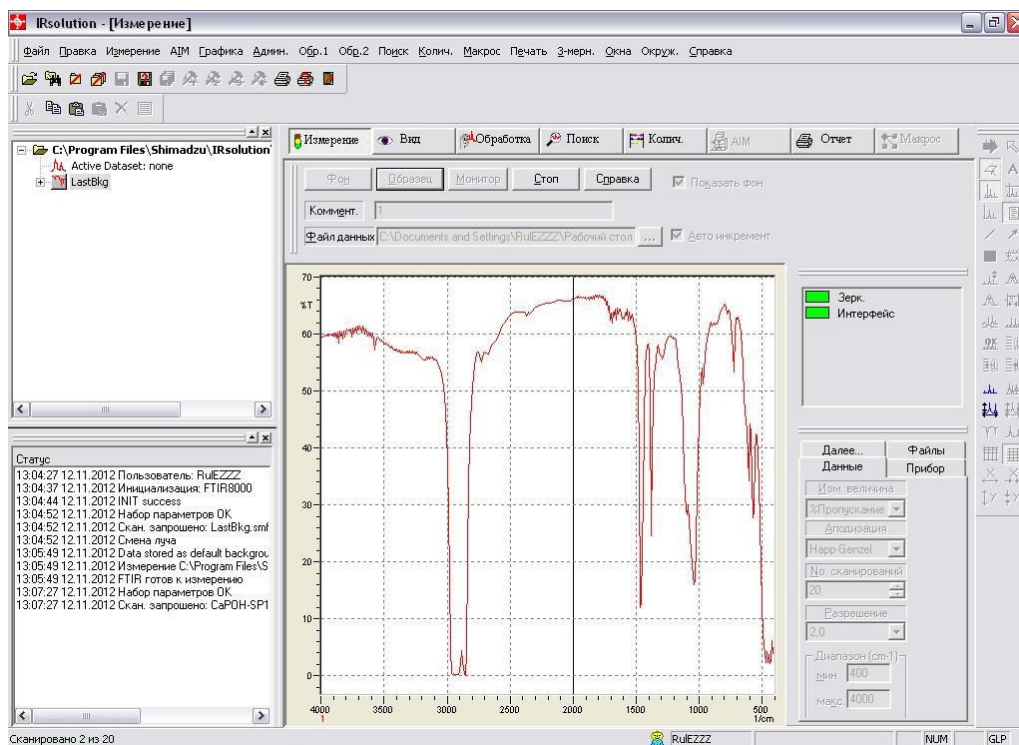


Рис. IV.23. Запись ИК-спектра образца

Если полученный спектр образца удовлетворяет требованиям эксперимента (полосы разрешены, максимальное пропускание составляет не менее 60%), можно переходить к его обработке. Обработка для лучшей визуализации результата эксперимента может осуществляться непосредственно средствами программы IRsolution. Сначала проводится выравнивание базовой линии спектра, как это показано на рис. IV.24.

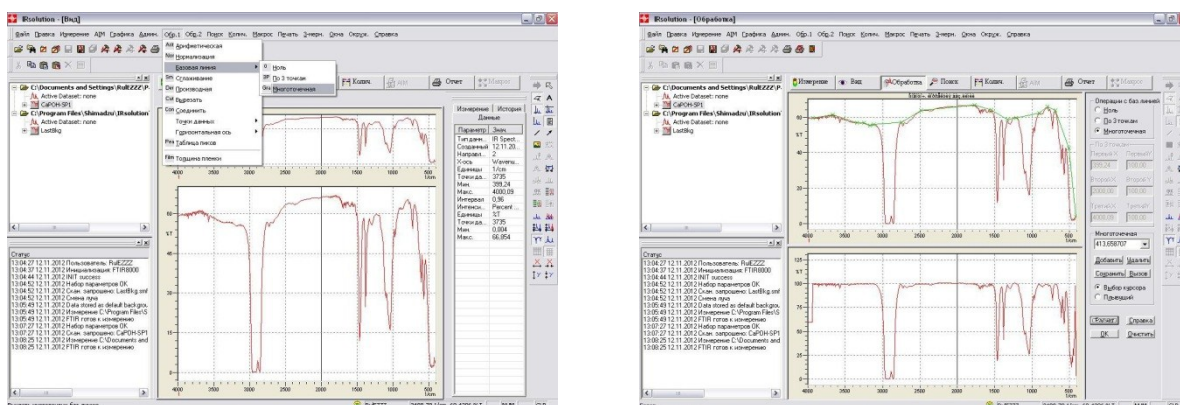


Рис. IV.24. Выравнивание базовой линии спектра

В разделе «Обработка 1» выбирается подраздел «Базовая линия». При сильно изогнутой базовой линии спектра выбирается многоточечная корректировка и затем фиксируются точки, через которые пройдет линия фона.

Полученный спектр часто является зашумленным за счет интерференции. Для того чтобы убрать интерференционные шумы, проводят сглаживание базовой линии спектра, выбрав соответствующий подраздел в разделе «Обработка 1» (рис. IV.25). Оптимальным является сглаживание по 25-30 точкам, что позволяет сохранить разрешенными полосы низкой интенсивности и снизить влияние интерференции на вид спектра.

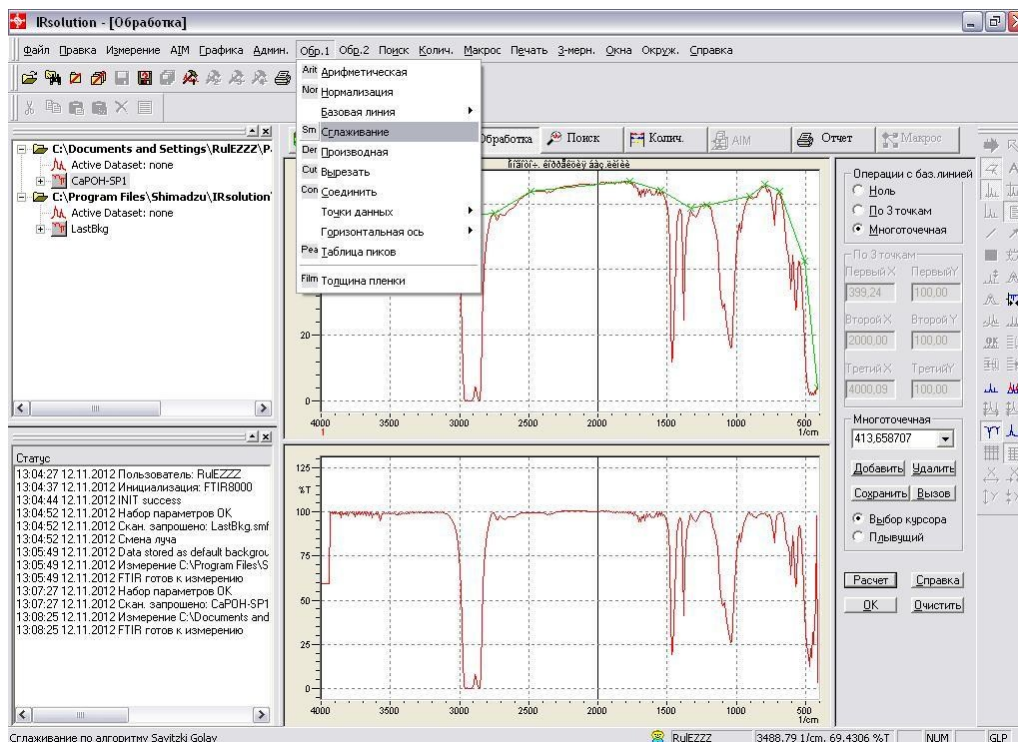


Рис. IV.25. Сглаживание базовой линии ИК-спектра

В подразделе «Таблица пиков» задаются параметры для расчета волновых чисел полос в спектре (рис. IV.26).

Завершающим этапом обработки спектра является его экспорт из программы IRsolution в документ с расширением .txt, для чего выбирается строка «Экспорт» в разделе «Файл» программы (рис. IV.27).

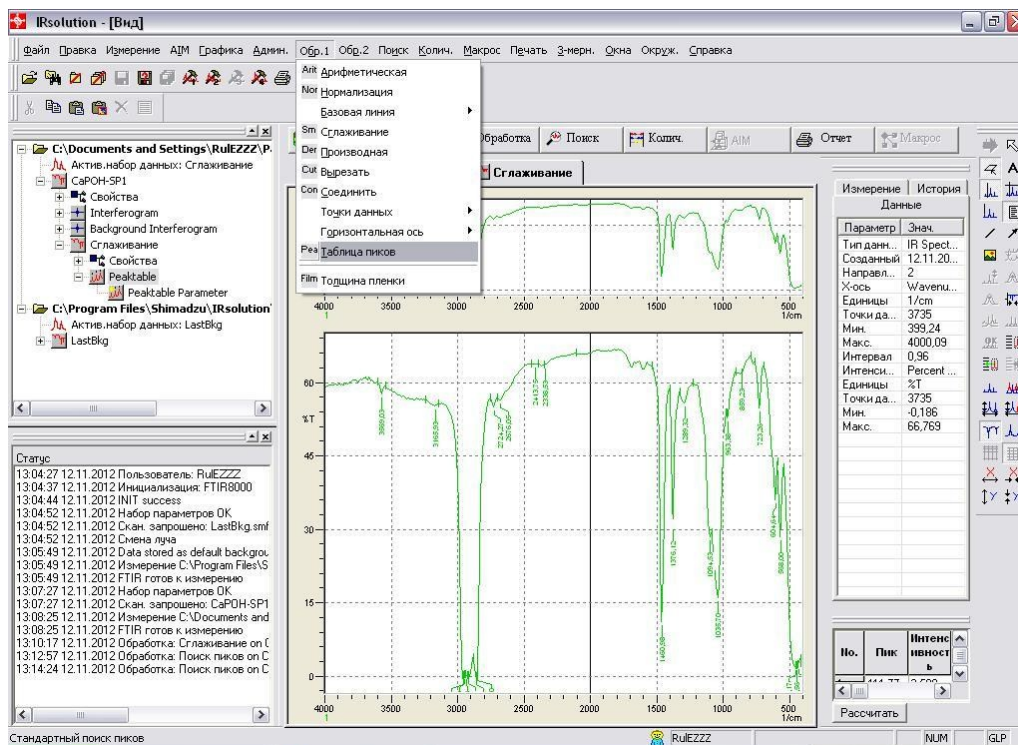


Рис. IV.26. Результат расчета волнового числа полос

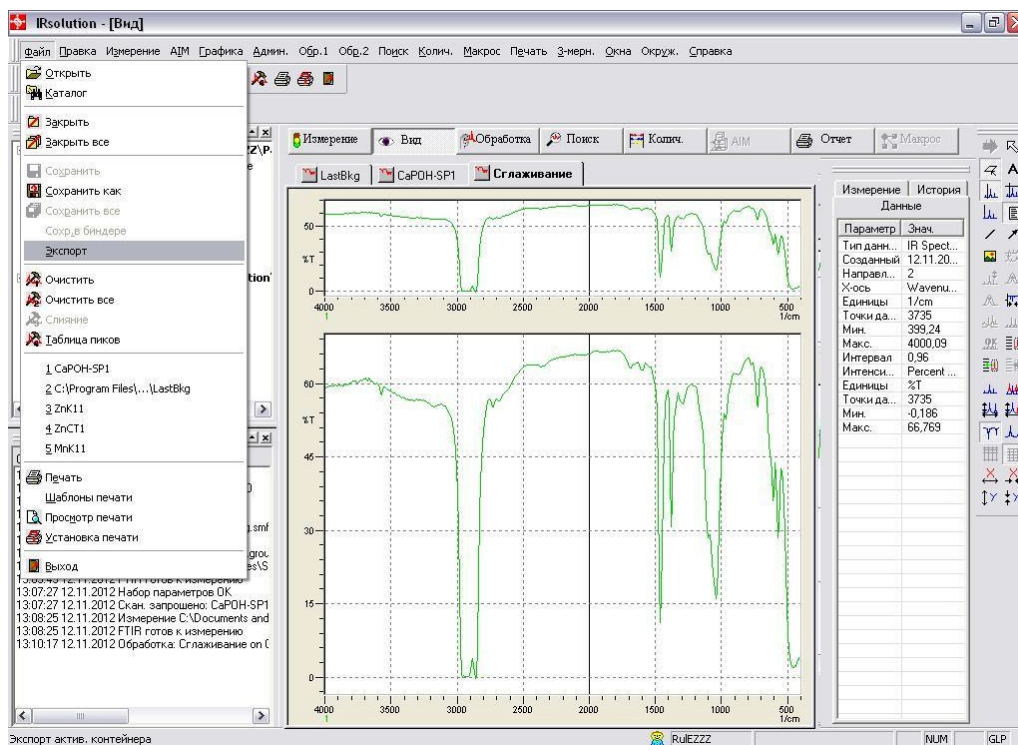


Рис. IV.27. Экспорт спектра из программы IRsolution

По полученным спектрам необходимо при сопоставлении с базами спектроскопических данных определить наличие и степень искажения функциональных групп в гидроксипатите. Также целесообразным является сравнение спектров гидроксипатита, синтезированного различными способами друг с другом, и сравнение методов записи спектров с целью выбора наиболее оптимального для данного соединения.

IV.4. Лабораторная работа №4

Высокотемпературное исследование гидроксипатита, полученного твердофазным и золь-гель методами

Высокотемпературные исследования гидроксипатита необходимы для изучения его фазовых превращений в широком температурном интервале. Как уже упоминалось выше, перегрев может привести к конденсации ОН-групп и переходу соединения в оксопатит или распаду до смеси фосфатов кальция. Существует и другая особенность высокотемпературного поведения соединений со структурой апатита, содержащих в своем составе кальций – возможность полиморфного перехода в моноклинную модификацию, обладающую как правило сверхвысоким тепловым расширением. При полиморфном переходе в апатитах происходят структурные изменения, приводящие в свою очередь к изменению поведения соединения при меняющейся температуре. Учитывая тот факт, что получение гидроксипатитной наноструктурированной керамики связано с нагреванием вещества, необходимо детальное изучение его поведения при росте температуры.

Для высокотемпературных исследований основными являются методы дифференциальной сканирующей калориметрии и высокотемпературной рентгенографии.

4.1. Дифференциальная сканирующая калориметрия.

Исследование гидроксипатита на *дифференциальном сканирующем калориметре LabSys Setaram* (рис. IV.28) позволяет установить температуры фазовых переходов, энтальпию этих процессов, а также возможные потери массы гидроксипатита (например, в случае конденсации ОН-групп).



Рис. IV.28. Дифференциальный сканирующий калориметр LabSys Setaram

Исследуемое вещество помещается в тигель (рис. IV.29), изготовленный из платины (1) или алундовой керамики (2) и устанавливается в ДСК.

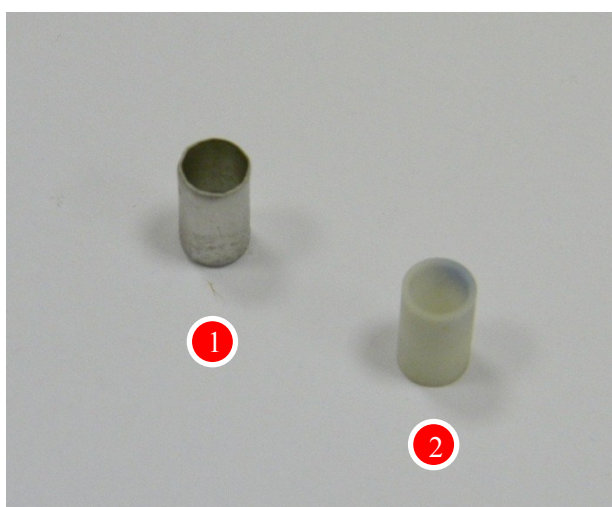


Рис. IV.29. Тигли для дифференциального сканирующего калориметра:
платиновый (1) и алундовый (2)

ДСК управляется программным комплексом SETSOFT 2000 (рис. IV.30). После запуска программы в разделе «Display» выбирается подраздел «Direct Programming», в котором формируется алгоритм нагрева образца.

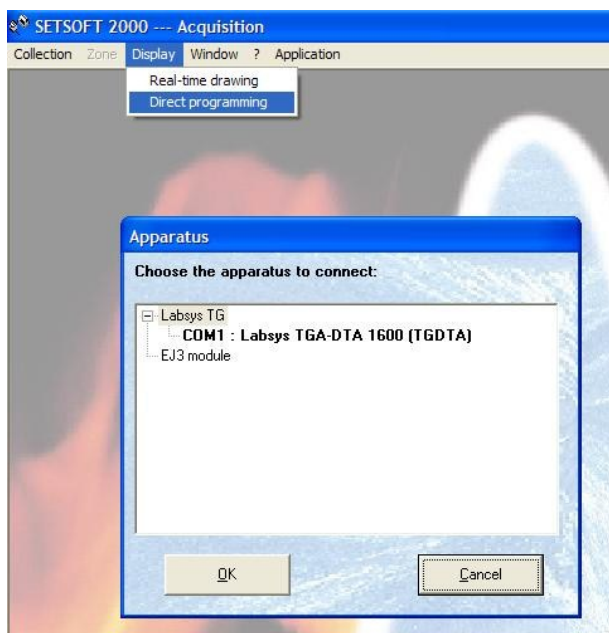


Рис. IV.30. Начало работы с программой SETSOFT 2000

В появившемся окне в разделе «» вводятся имя файла («Experiment name»), масса образца в мг («Mass»), материал тигля («Crucible»), молярная масса вещества («Molar mass») и атмосфера, в которой проходит исследование («Atmosphere») (рис. IV.31).

Затем в левом верхнем окне выбирается вкладка «Standard zone», где устанавливаются параметры температурного режима (рис. IV.32): начальная и конечная температуры этапа, скорость нагрева (обычно устанавливается 10 град/мин).

Эксперимент запускается нажатием клавиши с изображенным бегущим человеком. При нагревании до 700°C в гидроксипатите не должно наблюдаться каких-либо фазовых превращений, сопровождающихся потерей массы и тепловыми эффектами.

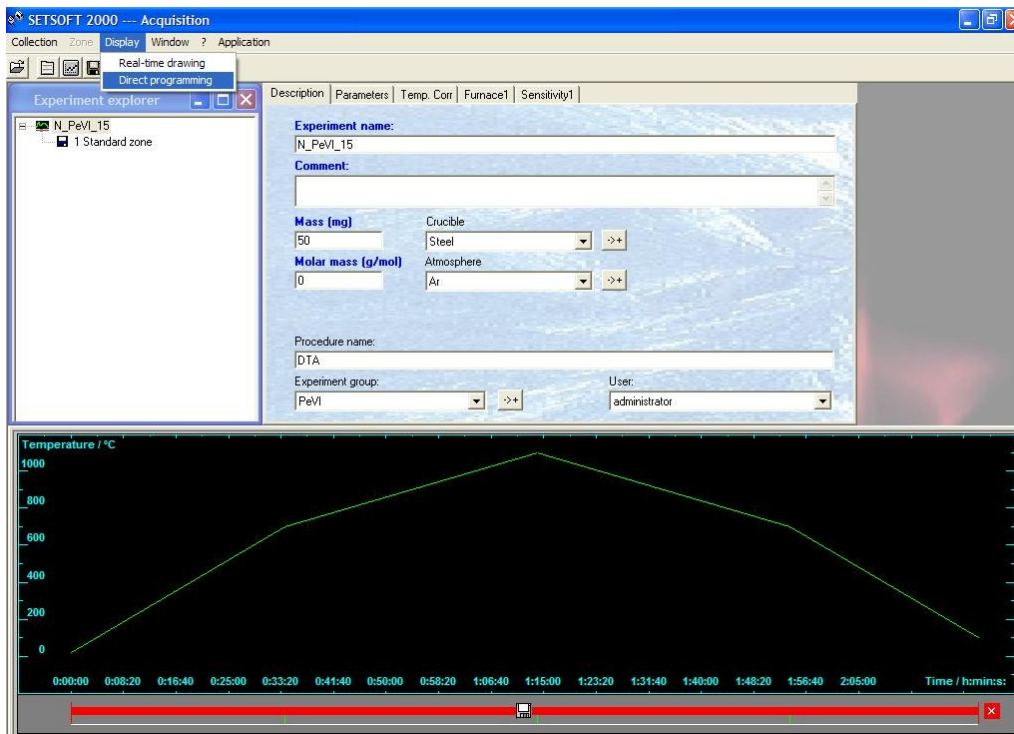


Рис. IV.31. Введение параметров эксперимента

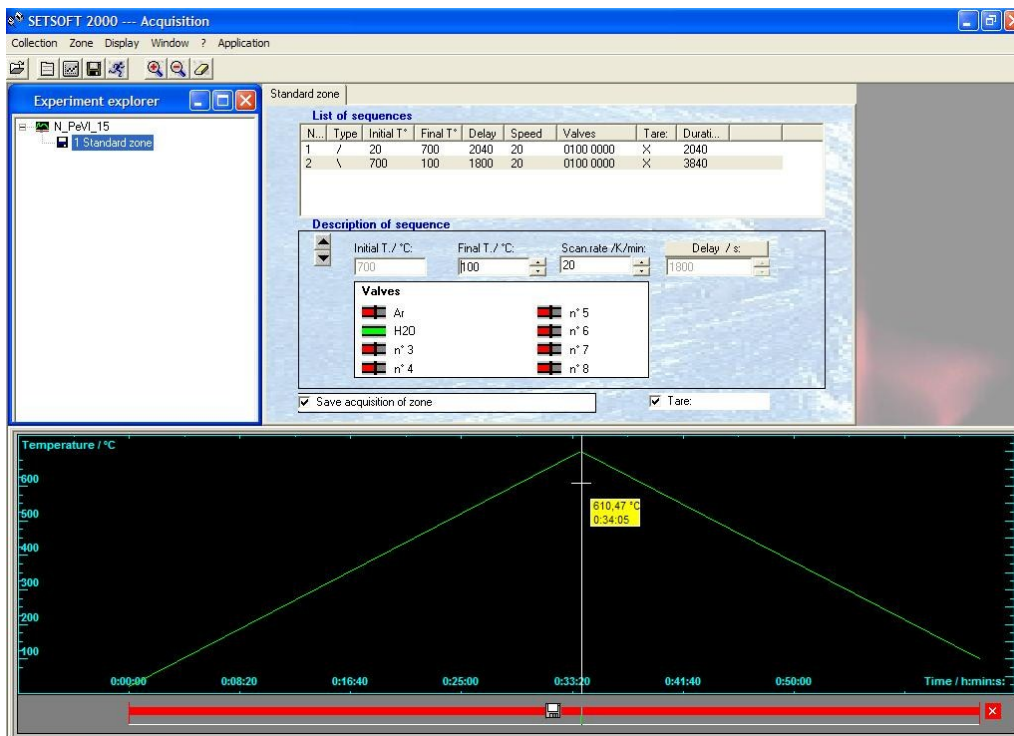


Рис. IV.32. Введение параметров эксперимента (продолжение)

Важно!!! Перед запуском нагрева необходимо убедиться, что включен поток аргона, предотвращающий окисление материала нагревателя, и водяное охлаждение.

4.2. Высокотемпературная порошковая рентгенография

Исследования методом высокотемпературной рентгенографии реализуются посредством *рентгеновского дифрактометра XRD-6000 Shimadzu*, оснащенного *нагревательной приставкой для высокотемпературных исследований HA-1001 Shimadzu* (рис. IV.33). С помощью данного метода можно решить сразу две задачи:

1. в режиме реального времени можно следить за изменением рентгенограммы образца при нагревании, а, значит, за протеканием фазовых превращений;

2. рассчитать коэффициенты теплового расширения вещества на основе данных о параметрах элементарной ячейки, полученных аналитическим индцированием порошковых рентгенограмм, записанных при последовательно увеличивающейся температуре.



Рис. IV.33. Высокотемпературная камера HA-1001 для рентгеновского дифрактометра XRD-6000 Shimadzu

Исследуемое вещество помещается в алундовую кювету (рис. IV.34), которую устанавливают внутри высокотемпературной камеры.

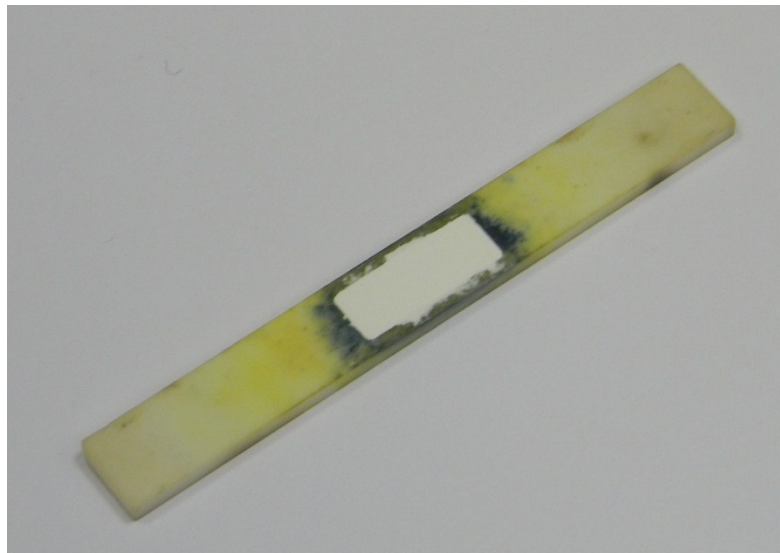


Рис. IV.34. Алундовая кювета для высокотемпературных рентгенографических исследований

Для введения алгоритма нагрева образца после запуска программного обеспечения дифрактометра XRD-6000/7000 V. 5.21 в блоке «Right Gonio Condition» выбирается раздел «ТТТ» (рис. IV.35).

На появившейся вкладке «Temperature Condition Edit» (рис. IV.36) устанавливаются параметры съемки: интервал углов сканирования 2θ («Scan Range (deg)»), шаг сканирования («Step (deg)»), скорость сканирования («Scan Speed (deg/min)»). В подразделе «Index» задается алгоритм нагрева. С помощью клавиши «Insert» добавляются этапы нагрева, в которых задается конечная температура нагрева («Temperature»), скорость нагрева («Speed (deg/min)»), выдержка («Time (min)»).

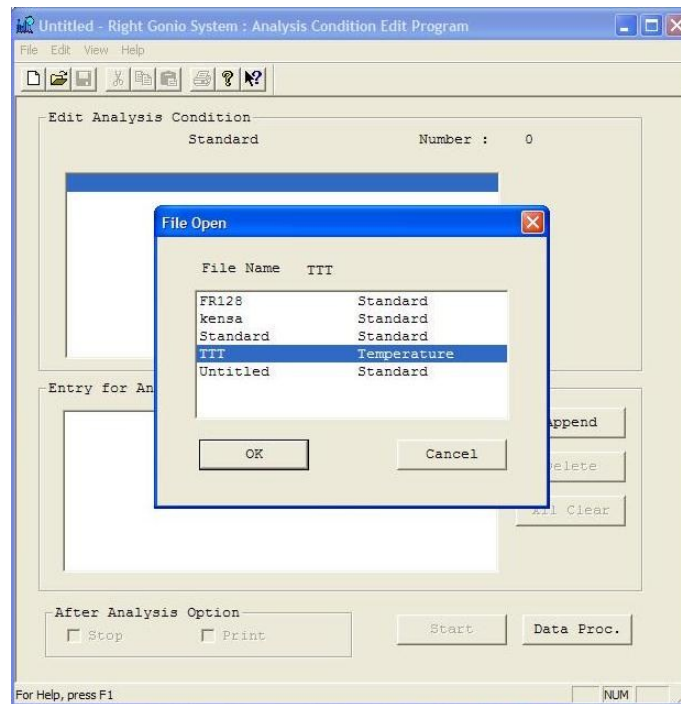


Рис. IV.35. Выбор подраздела «ТТТ»

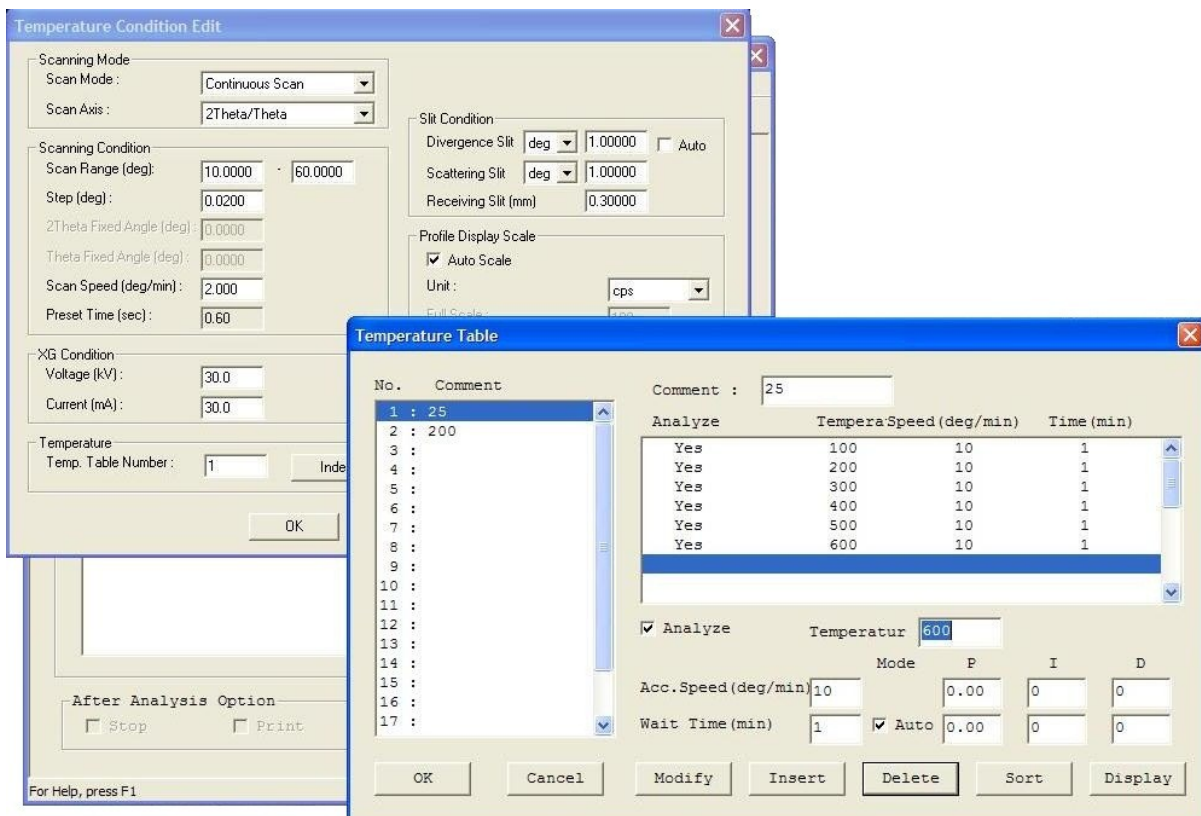


Рис. IV.36. Формирование алгоритма съемки рентгенограмм при нагреве

Далее проводится аналитическое индцирование полученных рентгенограмм и определяются параметры элементарной ячейки гидроксиапатита. Полученные температурные зависимости параметров элементарной ячейки аппроксимируются квадратичными функциями вида

$$a = p_2 T^2 + p_1 T + p_0.$$

Расчет коэффициентов теплового расширения производится в программе DTC (рис. IV.37) на основе коэффициентов p_i .

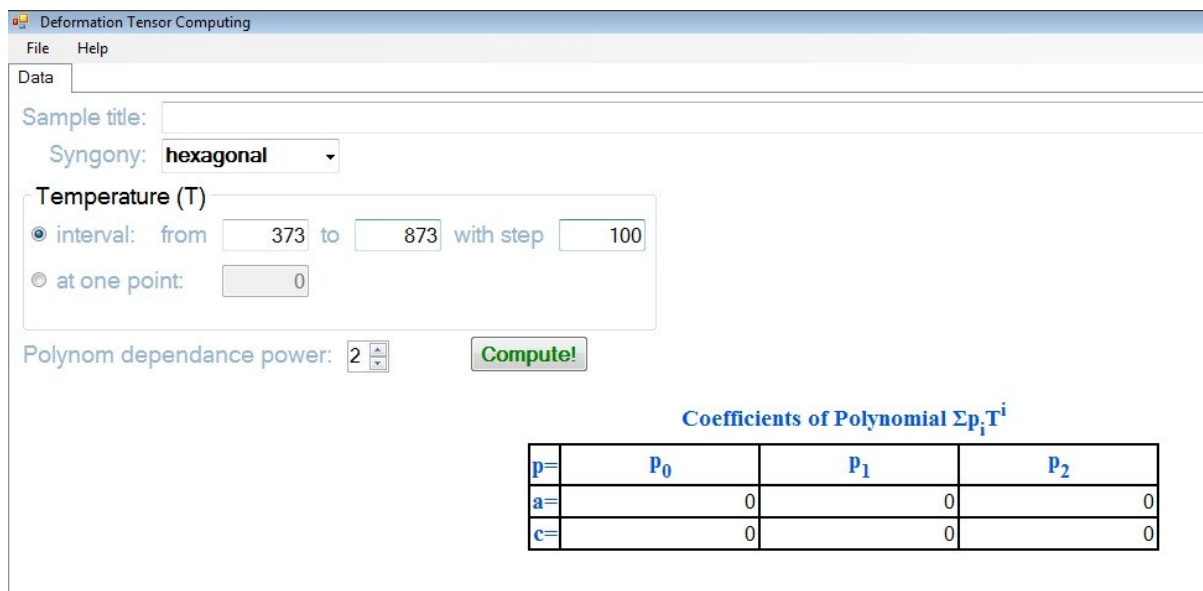


Рис. IV.37. Интерфейс программы «Deformation Tensor Computing»

После нажатия кнопки «Compute» появляется вкладка с результатами расчетов, в которой содержатся значения объемных и линейных коэффициентов теплового расширения при заданных температурах.

По полученным коэффициентам при помощи алгоритма КТР-В2 (рис. IV.38) строятся фигуры теплового расширения, наглядно демонстрирующие его анизотропию. Для этого в ячейки « α_x » и « α_y » вводятся значения коэффициентов теплового расширения гидроксиапатита вдоль кристаллографических осей a и c соответственно. Таким образом, величина

коэффициента теплового расширения в данном направлении соответствует длине радиус-вектора, проведенного из начала координат в этом направлении до границы фигуры расширения.

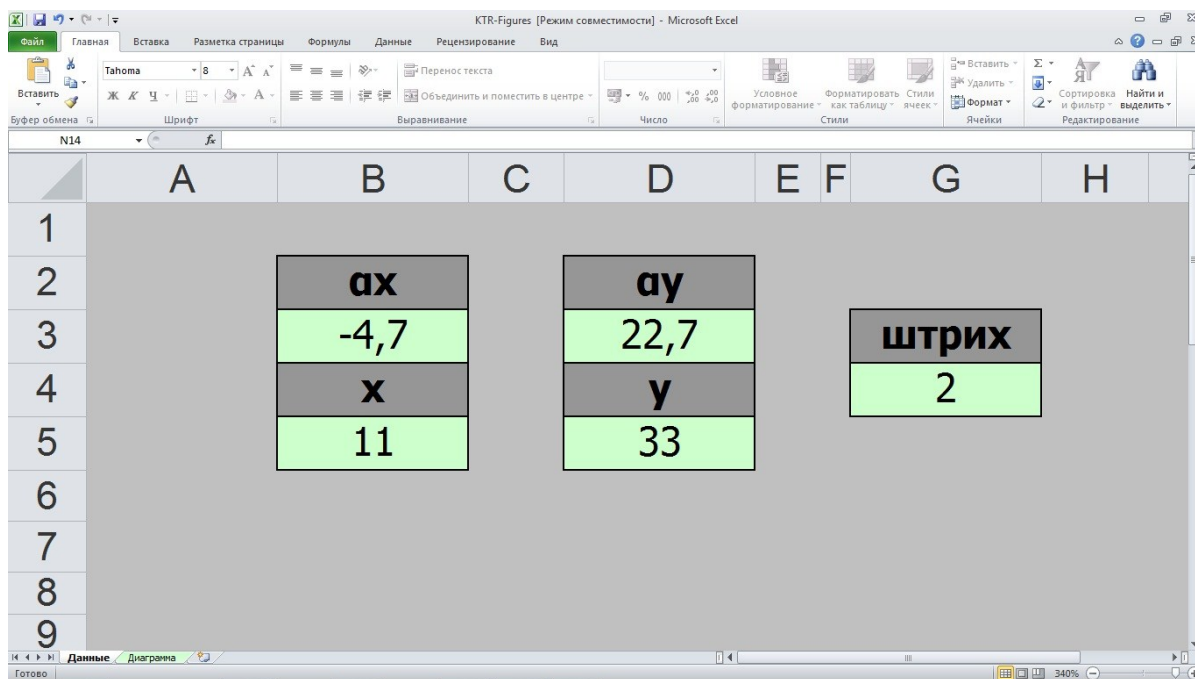


Рис. IV.38. Ввод данных для построения фигур коэффициентов теплового расширения

Методом высокотемпературной рентгенографии исследуются образцы гидроксиапатита, полученные в лабораторных работах №№ 1 и 2. По полученным данным делается вывод о влиянии способа синтеза и размера частиц на высокотемпературные характеристики гидроксиапатита.

По результатам данных дифференциальной сканирующей калориметрии и высокотемпературной рентгенографии необходимо сделать вывод о наиболее оптимальных условиях получения гидроксиапатитной керамики.

IV.5. Лабораторная работа №5

Получение керамических наноструктурированных материалов из гидроксиапатита.

Для получения керамики высушенный порошок гидроксиапатита сначала диспергируют в агатовой ступке, используя для создания дополнительного расклинивающего давления ацетон. Затем порошок подвергается более тщательному измельчению в *варио-планетарной мельнице Pulverizette-4 Fritsch* (рис. IV.39).



Рис. IV.39. Варио-планетарная мельница Pulverizette-4 Fritsch

Далее измельченный порошок прессуется на гидравлическом прессе AE&T T-61250 при давлении 20 атм в 13 мм пресс-форме (рис. IV.40). Полученную заготовку в форме таблетки отжигали при температуре 873 К,

поднимая температуру в течение 12 часов до указанного значения, чтобы избежать растрескивания керамики при быстром нагреве.



Рис. IV.40. Гидравлический пресс AE&T T-61250 и пресс-форма ($d = 13$ мм)

Для увеличения пористости керамики исходный порошок гидроксиапатита смешивают с так называемым порогеном, в качестве которого использовали NaCl и поливиниловый спирт. Базовый порошок диспергируют с каждым из порогенов в присутствии ацетона. Далее смесь для формовки подвергалась вышеописанным процедурам. От порогена избавляются с помощью отжига (в случае ПВС) или отмывания готовой керамики в горячей дистиллированной воде (в случае NaCl). Полученная керамика будет иметь сложную внутреннюю структуру каналов, которая в дальнейшем будет обеспечивать проникновение коллагена внутрь имплантата. К числу преимуществ полученной керамики можно также отнести возможность ее

обработки скальпелем непосредственно на месте использования для получения элемента необходимой формы и размеров.

Для полученных керамик рассчитывают плотность по формуле

$$\rho = \frac{m}{V} = \frac{4m}{\pi d^2 h},$$

где m – масса керамики, d , h – диаметр и высота керамики. Затем рассчитывается относительная плотность керамики (по отношению к рентгенографической), чтобы косвенно определить ее пористость. Цель состоит в том, чтобы по величинам относительной плотности определить интервал содержания порогена, в котором возможно получение керамики.

Литература

1. Сергеев Г.Б. Нанохимия: учебное пособие. / М.: КДУ, 2007. – 336 с.
2. Нанотехнологии. Азбука для всех. / Под ред. Ю.Д. Третьякова. – М.: Физматлит, 2008. – 368 с.
3. Кобаяси Н. Введение в нанотехнологию. / М.: Бином. Лаборатория знаний, 2008. – 134 с.
4. Dorozhkin S.V. Nanodimensional and Nanocrystalline Apatites and Other Calcium Orthophosphates in Biomedical Engineering, Biology and Medicine. // *Materials*. – 2009. – Vol. 2. – P. 1975-2045.
5. Dorozhkin S.V. Calcium Orthophosphates: Occurrence, properties, biomineralization, pathological calcification and biomimetic applications. // *Biomatter*. – 2011. – Vol. 1:2. – P. 121-164.
6. Князев А.В., Буланов Е.Н., Алейник Д.Я., Чарыкова И.Н., Земсков А.Е., Калентьев А.В. Синтез и исследование нано-размерного гидроксиапатита на модели *in vitro*. // *Вестник Нижегородского государственного университета им. Н.И. Лобачевского*. – 2012. – №5. В печати.
7. Knyazev A.V., Bulanov E.N., Vlasova E.V. Synthesis of Hydroxyapatite Whiskers. // *Inorganic Materials: Applied Research*. – 2012. – Vol. 3. – No. 3. – P. 417-420.
8. Sternlieb M.P., Brown H.M., Schaeffer Jr. C.D., Yoder C.H. The synthesis of apatites with an organophosphate and in nonaqueous media. // *Polyhedron*. – 2009. – Vol. 28, № 4. – P. 729-732.
9. Соин А.В., Евдокимов П.В., Вересов А.Г., Путляев В.И. Синтез и исследование анионмодифицированных апатитов. // *Алтернативная энергетика и экология*. – 2007. – № 45. – С. 130-132.

10. Yasukawa A.H., Matsuura T., Nakajima M., Kandori K., Ishikawa T. Preparation of nonstoichiometric calcium hydroxyapatite using formamide. // Materials Research Bulletin. – 1999. – Vol. 34. – № 4. – P. 589-601.
11. Черноруков Н.Г., Князев А.В., Буланов Е.Н. Изучение фазовых переходов и теплового расширения некоторых соединений со структурой апатита. // Неорганические материалы. – 2011. – Том 47. – № 2. – С. 215-220.
12. Knyazev A.V., Chernorukov N.G., Bulanov E.N. Apatite-structured compounds: synthesis and high-temperature investigation. // Materials Chemistry and Physics. – 2012. – V. 132. – P.773-781.
13. <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/balances/5iqj1d0000002onc.pdf>
14. <http://1.snol-term.ru/catalog/19>
15. http://www.labochema.lt/documents/iranga/katalogai/Lauda_Alpha_engl_final_08-10-31.pdf
16. http://catalog.aquilab.ru/good.php?cur_ctgr=143&gid=118
17. <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/xray/xrd-6000.pdf>
18. Пахомов Л.Г., Кирьянов К.В., Князев А.В. Физические методы в химических исследованиях: Учебное пособие. / Нижний Новгород: Изд-во Нижегородского госуниверситета, 2007. – 286 с.
19. <http://www.icdd.com>
20. Smith D.K., Jenkins R. The Powder Diffraction File: Past, Present, and Future. // Journal of Research of the National Institute of Standards and Technology. – 1996. – Vol. 101. – P. 259-271.
21. Ковба Л.М., Трунов В.К. Рентгенофазовый анализ. / М.: Изд-во Московского университета, 1976. – 184 с.
22. <http://www.yiqicity.com/goods-8059.html>
23. <http://www.antteknik.com/documents/catalogs/FTIR-8400S.pdf>

24. Вилков Л.В., Пентин Ю.А. Физические методы исследования в химии. Структурные методы и оптическая спектроскопия. / М.: Высш. шк., 1987. – 367 с.
25. Плюснина И.И. Инфракрасные спектры минералов. / М.: Изд-во Моск. ун-та, 1976. – 175 с.
26. Fowler В.О. Infrared studies of apatites. I. Vibrational assignments for calcium, strontium, and barium hydroxyapatites utilizing isotopic substitution. // Inorganic Chemistry. – 1974. – Vol. 13. – P. 194-207.
27. Уэндландт У. Термические методы анализа. / М.: Мир, 1978г. – 526 с.
28. Резницкий Л.А. Калориметрия твердого тела (структурные, магнитные, электронные превращения). / М.: Изд-во МГУ, 1981 г. – 184 с.
29. <http://www.setaram.com/LABSYS-evo.htm>
30. Филатов С.К. Высокотемпературная кристаллохимия. Теория, методы и результаты исследований. / Л.: Недра, 1990. – 288 с.
31. Белоусов Р.И., Филатов С.К. Алгоритм расчета тензора и построения фигур коэффициентов теплового расширения в кристаллах. // Физика и химия стекла. – 2007. – Т. 33. – № 3. – С. 377-382.
32. <http://www.asi-team.com/asi%20team/fritsch/Fritsch%20data/pulverisette4-1.pdf>

ПОЛУЧЕНИЕ И ИССЛЕДОВАНИЕ НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫХ БИОСОВМЕСТИМЫХ МАТЕРИАЛОВ НА ОСНОВЕ ГИДРОКСИАПАТИТА

Евгений Николаевич Буланов

Электронное учебно-методическое пособие

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение
высшего профессионального образования
«Нижегородский государственный
университет им. Н.И. Лобачевского».
603950, Нижний Новгород, пр. Гагарина, 23