

О.Б. БРИК <sup>1</sup>, О.В. ФРАНК-КАМЕНЕЦЬКА <sup>4</sup>, Н.О. ДУДЧЕНКО <sup>1</sup>,  
Д.І. ЗАБОЛОТНИЙ <sup>2</sup>, В.А. ДУБОК <sup>3</sup>, О.А. КАЛІНІЧЕНКО <sup>1</sup>

<sup>1</sup> Інститут геохімії, мінералогії та рудоутворення ім. М.П. Семененка НАН України, Україна  
03680, м. Київ, пр-т Акад. Палладіна, 34  
E-mail: ndudchenko@igmof.gov.ua

<sup>2</sup> Інститут отоларингології ім. проф. О.С. Коломійченка АМН України, Україна  
03057, м. Київ, вул. Зоологічна, 3  
E-mail: dubok@ipms.kiev.ua

<sup>3</sup> Інститут проблем матеріалознавства ім. І.М. Францевича НАН України, Україна  
03680, м. Київ, вул. Кржижанівського, 3  
E-mail: dubok@ipms.kiev.ua

<sup>4</sup> Санкт-Петербурзький державний університет, Росія  
199034, м. Санкт-Петербург, Університетська набережна, 7/9  
E-mail: ofrank-kam@mail.ru

## ФАЗОВИЙ СКЛАД І СИНТЕТИЧНІ АНАЛОГИ МІНЕРАЛЬНОЇ КОМПОНЕНТИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ

---

*Методом електронного парамагнітного резонансу (ЕПР) досліджено зразки біогенного та синтетичного гідроксиапатиту. Розроблено нові підходи до визначення фазового складу біомінералів і наномінералів на основі методу ЕПР. Оскільки метод має високу чутливість, за його допомогою можна визначати домішкові фази, кількість яких становить 0,1–1 % маси зразка. За допомогою метода ЕПР показано, що мінеральна компонента кісток крім фази гідроксиапатиту містить домішкові мінеральні фази – кальцит, доломіт, магнезит, вітлокіт. ЕПР-дослідження нативних радикалів і карбонатних радикалів дають унікальну інформацію про механізми взаємодії органічної і неорганічної матерії в кістковій тканині, яка може бути використана для оцінки процесів засвоєння імплантованого матеріалу живою кісткою.*

*Ключові слова:* біомінерали, гідроксиапатит, електронний парамагнітний резонанс, синтетичні аналоги гідроксиапатиту.

---

**Вступ.** Відомо, що в організмі людини, як і більшості живих істот, формуються різного роду мінеральні (неорганічні) часточки, які називають біомінералами. Типовим прикладом біомінералів є наночастинки апатиту, які формують мінеральну компоненту кісток і зубів [1, 4]. Інтерес до вивчення біомінералів пов'язаний з вирішенням широкого кола фундаментальних і прикладних проблем [5, 10, 11], серед яких можна зазначити такі: дослідження генезису і механізмів взаємодії мінеральної та органічної матерії; з'ясування ролі мінеральної речовини у функціонуванні як високо-, так і слабомінералізованих біологічних тканин; вивчення механізмів змін властивостей мінеральних часточок, локалізованих у біологічних тканинах, під час захворювання людини; розробка наукових основ технологій створення синтетичних аналогів біомінералів, зокрема виготовлення синтетичних аналогів кісткової тканини, які використовують для лікування кісток і зубів.

© О.Б. БРИК,  
О.В. ФРАНК-КАМЕНЕЦЬКА,  
Н.О. ДУДЧЕНКО,  
Д.І. ЗАБОЛОТНИЙ,  
В.А. ДУБОК,  
О.А. КАЛІНІЧЕНКО, 2012

Слід зауважити, що біомінералогія фізіогенних мінеральних утворень у живих організмах суттєво пов'язана з наномінералогією. Це зумовлено тим, що розміри мінеральних часточок, які мають фізіогенне походження, принципово знаходяться в діапазоні нанометрів. Високомінералізовані біологічні тканини складаються з органічної матриці та нанорозмірних мінеральних (неорганічних) частинок, занурених в цю матрицю. Такі тканини слід розглядати як мінерально-органічні наноасоційовані композиційні системи, які мають особливі властивості. Найбільш високомінералізованими біологічними тканинами є зубна емаль і кістки. Мінеральна компонента емалі становить 93—97, а кісток 55—75 % їх маси [1, 4]. Дослідження об'єктів біомінералогії є суттєвим для розвитку наномінералогії, нанофізики, нанотехнології, наномедицини, наноматеріалознавства, біоміметики та інших галузей сучасної науки. Зокрема, інформація про властивості та структуру кісток і зубів відіграє значну роль при розробці методів лікування біологічних тканин, уражених різними хворобами [2, 7, 9], а також є важливою для виготовлення синтетичних матеріалів, аналогів кісткової тканини, які використовують як імплантати в ортопедії, травматології та стоматології.

Втім, незважаючи на велику кількість досліджень, існує багато питань, які вивчені недостатньо. Наприклад, це питання, що пов'язані з існуванням у складі мінеральної компоненти кісток наночастинок домішкових фаз, які неможливо виявити за допомогою методу рентгенівської дифрактометрії. Дуже важливим є також питання щодо процесів біотрансформації синтетичного мінерального матеріалу, що був імплантований у живу кістку. Ці проблеми можна вирішувати за допомогою методу електронного парамагнітного резонансу (ЕПР).

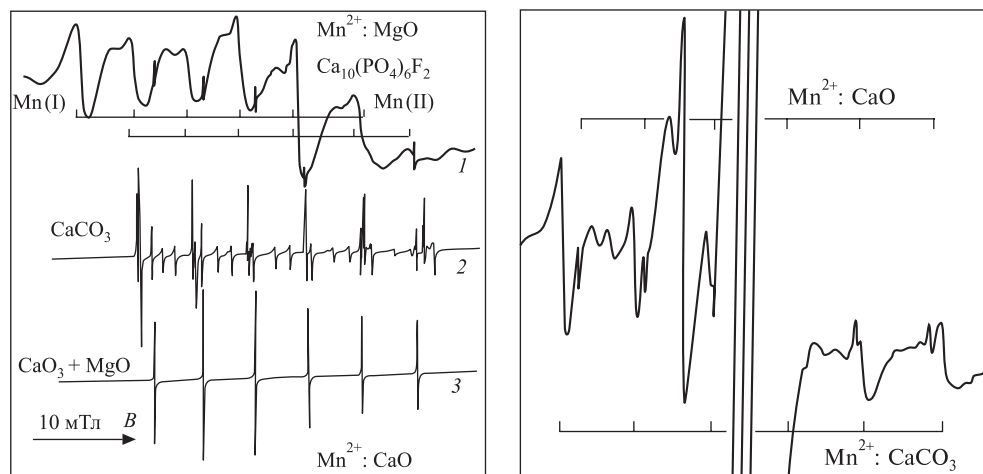
**Мета статті** — дослідження за допомогою методу ЕПР домішкових мінеральних фаз у складі мінеральної компоненти кісток, а також процесів асиміляції імплантатів, виготовлених на основі синтетичного гідроксиапатиту, живою кістковою тканиною.

**Досліджувані зразки та експериментальні методи.** Досліджено зразки кісток корови, а також синтетичні матеріали, виготовлені на основі гідроксиапатиту (імплантати). Кістки попередньо було відварено протягом тижня при 100 °С для видалення залишків органічної компоненти. Після цього зразки подрібнювали в ступці з нержавіючої сталі. Імплантати були виготовлені у вигляді гранул синтетичного гідроксиапатиту (розмір гранул 0,8—1,2 мм, пористість  $\approx 80\%$ ) і у вигляді керамічних блоків на основі апатиту (пористість  $\approx 52\%$ ). Синтетичний гідроксиапатит був отриманий за допомогою технології так званого мокрого синтезу [3]. Як піддослідних тварин використовували кроликів. Імплантати були введені у гомілкові кістки тварин і перебували там від декількох діб до кількох місяців.

Спектри ЕПР реєстрували за кімнатної температури за допомогою спектрометра PS-100X, який працює у трисантиметровому діапазоні довжин хвиль. Частота модуляції магнітного поля для цього спектрометра дорівнює 100 кГц, амплітуда модульовального поля — 0,1 мТл. Максимальна потужність мікрохвильового поля 80 мВт.

Відпал зразків проводили у муфельній печі в атмосфері повітря. Зразки відпалювали послідовно в інтервалі температур 70—800 °С. Час відпалу за кожної температури 1 год. Для реєстрації спектрів ЕПР від радикалів  $\text{CO}_2^-$  зразки були піддані  $\gamma$ -опромінюванню від джерела  $^{60}\text{Co}$  дозою  $1,5 \cdot 10^5$  Гр.

**Результати експерименту. Домішкові мінеральні фази.** Основна мінеральна фаза кісток — гідроксиапатит. Найважливішою домішкою у складі біогенного гідроксиапатиту є карбонатна речовина. Крім того, у досліджених



**Рис. 1.** ЕПР-спектри іонів  $Mn^{2+}$ , локалізованих у різних природних мінералах.  $B$  — індукція магнітного поля: 1 — спектр природного апатиту; внизу спектра — секстети ліній (I, II), зумовлених іонами Mn, що локалізовані в різних позиціях кальцію; зверху — вузькі лінії еталонного зразка ( $Mn^{2+}:MgO$ ); 2 — спектр природного кальциту; лінії еталонного зразка ( $Mn^{2+}:MgO$ ) розташовані між основними лініями спектра; 3 — спектр механічної суміші оксидів кальцію і магнію; внизу — лінії іонів  $Mn^{2+}$ , локалізованих у фазі оксиду кальцію, остання лінія цього спектра зміщена вліво відносно лінії іона  $Mn^{2+}$  в оксиді магнію

**Fig. 1.** EPR spectra of  $Mn^{2+}$  ions, localized in different natural minerals.  $B$  — magnetic field induction: 1 — spectrum of natural apatite, at the bottom of the spectrum — lines sextet (I, II), caused by the Mn ions, which are localized in different calcium positions; above — narrow lines of etalon sample ( $Mn^{2+}:MgO$ ); 2 — spectrum natural calcite; lines of etalon sample ( $Mn^{2+}:MgO$ ) located between the main lines of the spectrum; 3 — spectrum of mechanical mixture of calcium and magnesium oxides; at the bottom — lines of  $Mn^{2+}$  ions, localized in the phase of calcium oxide, the last line of the spectrum displaced to the left relative to the line of  $Mn^{2+}$  ion in magnesium oxide

**Рис. 2.** Сигнали ЕПР іонів  $Mn^{2+}$ , локалізованих у домішкових мінеральних фазах кісткової тканини

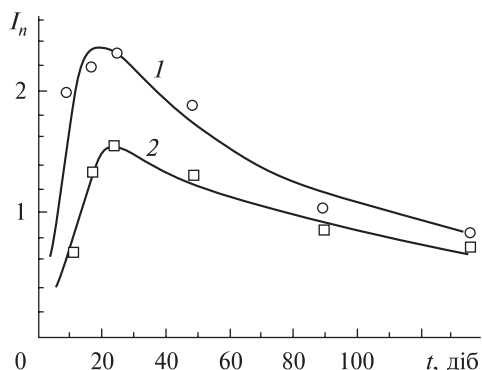
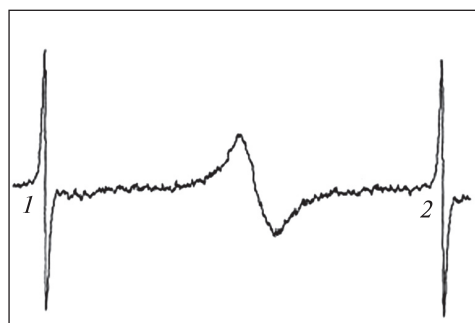
**Fig. 2.** EPR spectra of  $Mn^{2+}$  ions, licalized in impurity mineral phases of bone tissue

біогенних і синтетичних матеріалах можна зареєструвати ЕПР-сигнали, які пов'язані також з іншими мінеральними фазами. Оскільки кількість інших мінеральних фаз, крім фази гідроксиапатиту, в досліджених зразках невелика, називатимемо ці фази домішковими мінеральними фазами.

Спектри ЕПР іонів  $Mn^{2+}$  у зразках природних мінералів — фторапатиту, кальциту та оксидів кальцію і магнію показано на рис. 1.

Відомо, що для іонів  $Mn^{2+}$  електронна конфігурація відповідає  $3d^5$ , електронний спін дорівнює  $5/2$ . Ядерний спін ізотопу  $^{55}Mn$  дорівнює  $5/2$ , а його поширеність — 100 %. Спектри на рис. 1 відповідають електронному переходу  $+1/2 \leftrightarrow -1/2$ . Поява шести ліній у спектрі зумовлена надтонкою взаємодією електрона з ядром  $^{55}Mn$ . Положення ліній ЕПР іонів  $Mn^{2+}$  визначається симетрією кристалічної ґратки та іншими особливостями ближнього оточення цього іона. Завдяки наявності квадрупольного моменту ядра спектри ЕПР іонів  $Mn^{2+}$ , крім основних шести ліній, зазвичай мають додаткову структуру.

Отже, сигнали ЕПР іонів  $Mn^{2+}$  у різних мінералах є різними. Це дає змогу використовувати метод ЕПР для вивчення різних мінеральних фаз у біомінералах і матеріалах імплантатів. Так, у досліджених зразках біогенних карбонат-апатитів (кістки) вдається зареєструвати сигнали ЕПР від іонів  $Mn^{2+}$ , локалізованих у фазах  $CaCO_3$  і  $CaO$  (рис. 2).



**Рис. 3.** Спектр ЕПР нативних радикалів кісткової тканини: 1, 2 — сигнали ЕПР від еталонного зразка ( $\text{MgO} : \text{Mn}^{2+}$ )

**Fig. 3.** EPR spectrum of native radicals in bone tissue: 1, 2 — EPR signals of reference specimen ( $\text{MgO} : \text{Mn}^{2+}$ )

**Рис. 4.** Залежності інтенсивностей сигналів ЕПР  $I_n$ , зумовлених нативними радикалами, від кількості днів перебування імплантату в кістці тварини: 1, 2 — гідроксиапатит у вигляді гранул і керамічних блоків відповідно

**Fig. 4.** Native radicals EPR signal intensities  $I_n$  versus time interval (days) of implant location in the animal bone: 1, 2 — hydroxyapatite in form of granules and ceramic blocks, respectively

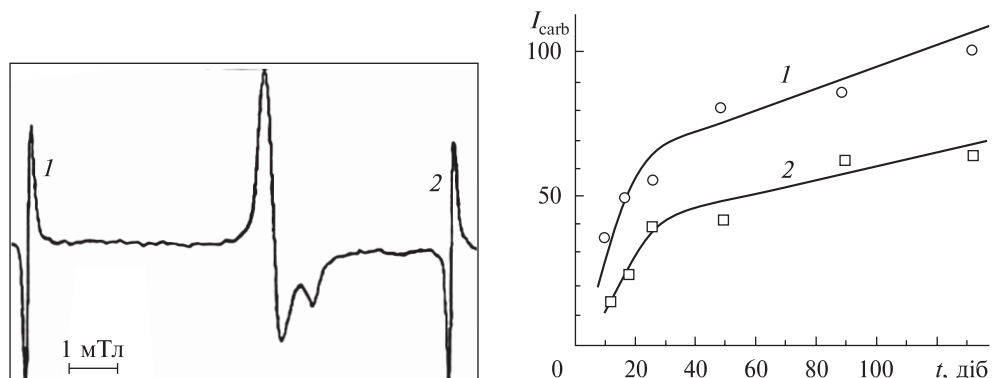
У разі захворювання таких високомінералізованих тканин, як кістки, найбільше змінюється склад домішкових кристалічних фаз. Добре відомо, що демінералізація кісткової тканини виникає через остеопороз і найшвидша демінералізація кісток відбувається під час космічних польотів. Тому інформація щодо наявності / відсутності домішкових фаз може бути важливою для розробки стратегії лікування. Зокрема, для виготовлення імплантатів, які застосовують під час лікування кісток, необхідно знати реальний склад кісток, який можна визначати методом ЕПР.

**Процеси асиміляції імплантатів. Нативні радикали.** Відомо, що кісткова тканина та інші біомінерали містять так звані нативні радикали  $R_n$ , що формуються в процесі життєдіяльності біологічного об'єкта. Нативні радикали асоційовані з органічною речовиною в мінералізованих тканинах. Приклад сигналу ЕПР від нативних радикалів у кістковій тканині показано на рис. 3. Для нативних радикалів, зареєстрованих у кістковій тканині, фактор спектроскопічного розщеплення ( $g$ -фактор) дорівнює  $2,0045 \pm 0,0003$ , ширина ліній —  $0,9 \pm 0,1$  мТл.

У вихідних матеріалах імплантатів сигнали ЕПР від нативних радикалів відсутні, оскільки вихідний матеріал не містить органічної речовини. Однак в імплантатах, які були видалені з кісток експериментальних тварин, зареєстровані сигнали ЕПР від таких радикалів (рис. 4).

Для нативних радикалів у матеріалі імплантату фактор спектроскопічного розщеплення ( $g$ -фактор) дорівнює  $2,0045 \pm 0,0005$ , ширина ліній —  $0,8 \pm 0,12$  мТл. Таким чином, характеристики нативних радикалів у кістковій тканині та в матеріалі імплантатів є подібними. Радикали  $R_n$  утворюються в процесі асиміляції імплантату і локалізовані в органічній речовині, що проникла в імплантат.

Як видно з рис. 4, за час 15—20 днів інтенсивність  $I_n$  максимальна. З подальшим збільшенням часу  $t$  кількість радикалів  $R_n$  у матеріалі імплантату зменшується. Слід зазначити, що у кістковій тканині інтенсивність сигналів  $I_n$



**Рис. 5.** Спектр ЕПР радикалів  $\text{CO}_2$  у кістковій тканині: 1, 2 — сигнали від еталонного зразка ( $\text{MgO} : \text{Mn}^{2+}$ ). Вказано масштаб квазіпостійного поля у мілітеслах

**Fig. 5.** EPR spectrum of  $\text{CO}_2$  radicals in bone tissue: 1, 2 — EPR signals of reference specimen ( $\text{MgO} : \text{Mn}^{2+}$ ). The scale of the permanent magnetic field is indicated in mT

**Рис. 6.** Залежності інтенсивностей сигналів ЕПР  $I_{carb}$ , зумовлених  $\text{CO}_2$ -радикалами, від кількості діб перебування імплантату в кістці тварини: 1, 2 — гідроксиапатит у вигляді гранул і керамічних блоків відповідно

**Fig. 6.**  $\text{CO}_2$  radicals EPR signal intensities  $I_{carb}$  versus time interval (days) of implant location in the animal bone: 1, 2 — hydroxyapatite in the form of granules and ceramic blocks, respectively

становить приблизно 0,3 відносних одиниць. Відповідно до рис. 4, інтенсивність сигналів  $I_n$  у матеріалі імплантату набагато перевищує інтенсивність такого самого сигналу в кістковій тканині. Разом з тим кількість органічної речовини в імплантаті менша, ніж у кістковій тканині.

**Карбонатні радикали.** В усіх зразках кісток після їх опромінення рентгенівськими променями або  $\gamma$ -променями зареєстровані сигнали ЕПР, зумовлені радикалами  $\text{CO}_2^-$  (рис. 5). Значення  $g$ -тензора для радикалів  $\text{CO}_2^-$  у зразках кісток дорівнюють:  $g_{\perp} = 2,0035 \pm 0,0005$ ;  $g_{\parallel} = 1,9974 \pm 0,0005$ . Радикали  $\text{CO}_2^-$  утворюються під час опромінення кісткової тканини  $\gamma$ -променями внаслідок захоплення електронів молекулами  $\text{CO}_2$ , локалізованими на поверхні та всередині нанокристалів мінеральної компоненти кісткової тканини, а також у разі видалення протонів із карбоксильних груп амінокислот, що пов'язані з мінеральною компонентою біомінералів.

Важливо, що опромінювання не продукує  $\text{CO}_2^-$ -радикали у вихідних матеріалах імплантатів. Однак такі радикали з'являються внаслідок опромінення зразків після перебування імплантатів у кістках тварини. В усіх імплантатах, що видаляють із кісток тварин, після їх опромінення вдається зареєструвати сигнали ЕПР від радикалів  $\text{CO}_2^-$ . Зі збільшенням часу перебування імплантату в організмі тварини інтенсивність сигналів ЕПР  $I_{carb}$ , зумовлених радикалами  $\text{CO}_2^-$ , зростає (рис. 6).

Перпендикулярна і паралельна компоненти  $g$ -тензора для радикалів  $\text{CO}_2^-$  в імплантатах становлять  $g_{\perp} = 2,0020 \pm 0,0005$ ;  $g_{\parallel} = 1,9970 \pm 0,0005$ , що близько до відповідних даних для кісткової тканини. Таким чином, установлено, що спектроскопічні й динамічні характеристики  $\text{CO}_2^-$ -радикалів у матеріалах імплантатів подібні до відповідних характеристик  $\text{CO}_2^-$ -радикалів у кістковій тканині.

Залежності інтенсивностей  $I_{carb}$  від часу  $t$  є нелінійними. На кривих рис. 6 можна виділити дві ділянки. На першій (приблизно до 20 діб) кількість радикалів  $\text{CO}_2^-$  збільшується зі значною швидкістю, а на другій (понад 20 діб)

це збільшення сповільнюється. Як видно на рис. 6, кількість  $\text{CO}_2^-$ -радикалів в імплантаті залежить не лише від часу  $t$ , а й від характеристик матеріалу імплантату. Сигнали ЕПР в імплантатах із гранул інтенсивніші, ніж в імплантатах з керамічних блоків, найслабкіші сигнали — в імплантат із щільної кераміки. Отже, для часових інтервалів витримки імплантатів у кістці, використаних у статті, процеси формування радикалів  $\text{CO}_2^-$  ще далекі від насичення. Цей висновок підтверджується і тим фактом, що сигнали ЕПР від радикалів  $\text{CO}_2^-$  у кістковій тканині, приблизно вдвічі інтенсивніші, ніж максимальні сигнали ЕПР у матеріалах імплантатів.

**Обговорення.** *Домішкові мінеральні фази.* Основна ідея ресстрації домішкових мінеральних фаз за допомогою ЕПР ґрунтується на такому. Параметри спектрів ЕПР визначаються локальною симетрією парамагнітних центрів (нанокластерами). При цьому важлива симетрія саме найближчого оточення центрів, вплив другої координаційної сфери не дуже суттєвий. Таким чином, сигнали ЕПР від парамагнітних центрів, локалізованих у різних кристалічних ґратках є різними. Цей факт дає змогу за спектрами ЕПР визначати наявність домішкових мінеральних фаз у досліджуваних об'єктах. Метод ЕПР завдяки високій чутливості реєструє домішкові мінеральні фази, коли їх кількість становить 0,1—1 %. Отже, використовуючи метод ЕПР та інші методи радіоспектроскопії можна одержувати найдетальнішу інформацію про місця локалізації домішок і форми їх входження у біогенні та синтетичні апатити. Багато парамагнітних центрів, які реєструються методом ЕПР, локалізовані на ділянках, що розділяють органічну і мінеральну компоненти високомінералізованих біологічних тканин. Відомо, що найважливіші процеси під час захворювань кісток і за використання синтетичних аналогів кісткової тканини проходять саме на межі, що розділяє мінеральну і органічну речовину. Цей фактор робить дуже важливою роль ЕПР досліджень у вирішенні широкого кола прикладних завдань.

До найпоширеніших домішкових карбонатвмісних мінеральних фаз у біогенних і синтетичних карбонатапатитах слід віднести кальцит  $\text{CaCO}_3$ , доломіт  $(\text{Mg, Ca})\text{CO}_3$  і магнезит  $\text{MgCO}_3$ . Типовою домішковою фазою для біомінералів і відпалених карбонатапатитів є вітлокіт (трикальційфосфат)  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Крім того, під час відпалу зразків за температури 600—800 °С кальцит і доломіт розкладаються з утворенням оксидів, таких як  $\text{CaO}$  і  $\text{MgO}$ . Зазначені вище карбонатні домішкові мінеральні фази (кальцит, доломіт і магнезит) і фази оксидів можуть бути однозначно діагностовані і досліджені за допомогою ЕПР іонів  $\text{Mn}^{2+}$  (див. рис. 1, 2). Фази оксидів можуть бути однозначно діагностовані і досліджені також за допомогою ЕПР іонів  $\text{Cr}^{3+}$ . Фаза вітлокіту може бути діагностована за допомогою фосфорних центрів, які детально описані у статті [8]. Слід додати, що такі домішкові мінеральні фази є нанооб'єктами, чим і зумовлені їх особливі властивості.

*Процеси асиміляції імплантатів.* З експериментальних даних (див. рис. 4) випливає, що органічні речовини, які проникають у матеріал імплантату, містять аномально високі концентрації нативних радикалів. У публікаціях [2, 6] описано три механізми утворення вільних радикалів в органічній матриці кісткової тканини: клітинний, біоокиснювальний і радіаційно-стимульований. Якщо припустити, що досліджені радикали  $R_n$  утворені за клітинним механізмом, то експериментальні результати можна проінтерпретувати так. Клітини, які з'являються на поверхні і всередині імплантату, продукують у матеріалі імплантату органічні речовини з великою кількістю неспарених електронів. Такі органічні речовини з великою кількістю радикалів  $R_n$  можна назвати «активним колагеном». На основі експериментальних даних можна припустити,

що «найактивніший колаген» клітки продукують у перший період (15—20 діб) перебування імплантату в кістці тварини.

«Активний колаген» проникає в пори імплантату, і його кількість в матеріалі імплантату спочатку швидко збільшується (рис. 4). «Активний колаген» вступає в хімічний зв'язок з поверхнею гідроксиапатиту, що веде до зменшення кількості вільних радикалів в органічній речовині, яка перебуває всередині імплантату. Конкуренція двох процесів — збільшення кількості колагену в матеріалі імплантату і зменшення його активності (внаслідок зв'язування вільних радикалів з поверхнею гідроксиапатиту) зумовлює наявність екстремуму на кривих, показаних на рис. 4. Слід зазначити, що зі зменшенням кількості вільних радикалів, утворених за клітинним механізмом, у матеріалі імплантату може збільшуватися кількість вільних радикалів, утворених у результаті біоокиснювального механізму. У зрілій нативній кістковій тканині домінують вільні радикали, утворені за біоокиснювальним механізмом, а кількість вільних радикалів, утворених за клітинним механізмом, очевидно є невеликою і пов'язана з постійними процесами ремоделювання кісткової тканини.

Ефективність процесів формування єдиної органо-мінеральної системи (або спорідненість матеріалу імплантату до кісткової тканини) істотно залежить від властивостей імплантату. Ці властивості можна змінювати в широких межах залежно від особливостей технології синтезу і подальшої обробки матеріалу імплантату. Швидкість асиміляції імплантату кістковою тканиною суттєво залежить від адсорбційних характеристик поверхні частинок імплантату і від домішкових кристалічних фаз у матеріалі імплантату. Різні характеристики імплантатів і спорідненість матеріалу імплантату до кісткової тканини можуть бути вивчені за допомогою ЕПР, тому цей метод може бути використаний як для формулювання науково обґрунтованих вимог до матеріалу імплантатів, так і для контролю технології виготовлення імплантатів.

Початкова ділянка кривих на рис. 4 (де кількість радикалів  $R_n$  зростає) і початкова ділянка кривих на рис. 6 (з максимальною швидкістю утворення радикалів  $\text{CO}_2^-$ ) відповідають одним і тим самим інтервалам часу перебування імплантату в організмі тварини (15—20 діб). Цей факт вказує, що формування нативних радикалів  $R_n$  і передцентрів карбонатних радикалів  $\text{CO}_2^-$  є відображенням взаємопов'язаних біостимульованих процесів у матеріалі імплантату. Разом з тим нативні радикали  $R_n$  і карбонатні радикали  $\text{CO}_2^-$  мають різну природу і локалізовані в різних підсистемах кісткової тканини, тому за допомогою цих двох типів радикалів можна досліджувати незалежно процеси асиміляції імплантатів кістковою тканиною.

Наявність екстремуму на кривих залежності кількості радикалів  $R_n$  від часу  $t$  (див. рис. 4) і наявність кількох ділянок, що відповідають різній швидкості формування  $\text{CO}_2^-$  радикалів (див. рис. 6) вказують на те, що процеси асиміляції матеріалу імплантату кістковою тканиною можна поділити на декілька етапів. На першому етапі (15—20 діб) відбувається описане вище з'єднання колагену з поверхнею частинок гідроксиапатиту, на другому (понад 20 діб) — повільна резорбція апатиту і формування мінерально-органічної матерії. Оскільки молекули колагену мають значний електричний дипольний момент, то електричне поле цього диполя істотно впливає на процеси резорбції гідроксиапатиту. Електричне поле молекул колагену стимулює перерозподіл у просторі слабозв'язаних іонів. Перерозподіл у просторі позитивних і негативних іонів веде до локальної зміни рН середовища, стимулює локальне розчинення гідроксиапатиту і сприяє проникненню протеїнів у матеріал імплантату.

Використання імплантатів з парамагнітними маркерами, які можуть бути введені у структуру гідроксиапатиту під час синтезу, відкриває можливість для

експериментального вивчення різних схем резорбції імплантатів. До таких парамагнітних маркерів, які можуть бути зареєстровані методом ЕПР, належать іони  $Mn^{2+}$ , локалізовані в позиціях іонів  $Ca^{2+}$ , і карбонатні іони  $CO_3^-$  у позиціях фосфорних тетраедрів структури гідроксиапатиту. Специфіка іонів  $Mn^{2+}$  полягає в тому, що вони легко входять у структуру синтетичного і природного апатиту, проте повністю відсутні в біогенному гідроксиапатиті. Карбонатні іони  $CO_3^-$  можуть бути заздалегідь переведені опромінюванням у парамагнітний стан  $CO_3^-$ , що дає змогу вивчати динаміку карбонатної речовини в матеріалі імплантату. Визначення за допомогою методу ЕПР механізмів резорбції імплантатів і процесів формування регенерату кісткової тканини відкриває можливості для створення імплантатів з різними властивостями, орієнтованими на лікування конкретних захворювань кісткової тканини.

Імплантат, розміщений у кістці, спочатку є суто мінеральною (неживою) матерією. Проте в результаті біостимульованих процесів на місці імплантату формується жива кісткова тканина, тобто нежива мінеральна матерія імплантату перетворюється в мінерально-органічну біологічну матерію. Отримані дані дають змогу робити висновки щодо процесів перетворення мінеральної матерії імплантату в мінералізовану біологічну тканину, що важливо для виготовлення імплантатів і розв'язання медичних проблем, пов'язаних з лікуванням кістки.

**Висновки.** Розроблено нові підходи до визначення фазового складу біомінералів і наномінералів на основі методу ЕПР. Розмір мінеральної фази, яка може бути зафіксована цим методом, має діапазон одиниці нанометрів. Оскільки метод ЕПР має високу чутливість, за його допомогою можна визначати домішкові фази, кількість яких становить 0,1—1 % маси зразка.

За допомогою методу ЕПР встановлено, що мінеральна компонента кісток крім фази гідроксиапатиту містить домішкові мінеральні фази, кількість яких є невеликою. Ці фази мають велике значення для вирішення багатьох прикладних завдань, зокрема є суттєвими для розуміння процесів метаболізму і розвитку хвороб кісток. Показано, що карбонатна речовина в кістках, крім вуглець-вмісних молекул та іонів, наявна у формі таких домішкових мінеральних фаз, як кальцит, доломіт, вітлокіт і магнезит. Кількість цих фаз невелика, тому вони можуть бути зафіксовані тільки методом ЕПР.

Розроблено методики вивчення механізмів асиміляції імплантатів, виготовлених на основі гідроксиапатиту, живою кістковою тканиною. Процеси асиміляції імплантатів кістковою тканиною досліджено за допомогою нативних вільних радикалів  $R_n$  і карбонатних радикалів  $CO_3^-$ . Зазначено, що ЕПР дослідження цих радикалів дає унікальну інформацію про механізми взаємодії органічної і неорганічної матерії в кістковій тканині. Динаміка  $R_n$  та  $CO_3^-$  радикалів відображає процеси засвоєння імплантованого матеріалу живою кісткою. Інформація про процеси асиміляції імплантатів сприяє розробці технологій створення ефективних імплантатів для лікування захворювань кісток.

*Робота виконана за часткової підтримки проекту ДФФД № Ф40.7/041 та проекту РФФД № 11—05—90425-Укр\_ф\_а.*

#### СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Боровский Е.В., Грошиков М.И., Патрикеев В.К. и др. Терапевтическая стоматология. — М.: Медицина, 1982. — 560 с.
2. Брик А.Б., Дубок В.А., Розенфельд Л.Г. и др. Применения ЭПР для изучения процессов ассимиляции имплантатов живой костной тканью // Актуальные проблемы современной медицины. — 2007. — Т. 7, вып. 1—2. — С. 262—266.



3. Дубок В.А., Брик О.Б., Шинкарук О.В. та ін. Фізико-хімічні основи синтезу біокерамічних структурованих матеріалів із керованою біоактивністю для відтворення функції кісток і інших органів // Фундаментальні орієнтири науки. — К.: Академперіодика, 2005. — С. 239—259.
4. Кораго А.А. Введение в биоминералогію. — СПб.: Недра, 1992. — 280 с.
5. Радчук В.В. Структура та властивості радіаційно-активованих центрів в кварці та емалі зубів у зв'язку з ретроспективною дозиметрією людини та доквілля: Дис. ... д-ра геол. наук. — Львів, 2011. — 298 с.
6. Розенфельд Л.Г., Дубок В.А., Брик А.Б., Шинкарук А.В. Биоактивный композит синтезность и перспективы его применения для пластики костной ткани // Мистецтво лікування. — 2008. — № 50. — С. 68—71.
7. Розенфельд Л.Г., Дубок В.А., Брик А.Б., Шинкарук А.В. Биоактивные керамики — имплантаты, нанопрекурсоры кости, носители генов и лекарств // Вісн. фармакології та фармацевції. — 2008. — № 5. — С. 2—10.
8. Brik A.B., Bagmut N.N., Kalinichenko A.M. et al. Characteristics of phosphate paramagnetic centers in natural apatites, biominerals and their synthetic analogues // Mineral. J. — 2000. — Vol. 22, N 4. — P. 8—18.
9. Brik A., Ulyanchich N., Kenner G. et al. EPR of impurity crystal phases in biominerals and their synthetic analogues // Ibid. — 2001. — Vol. 23, N 1. — P. 23—37.
10. Ikeya M. New applications of electron spin resonance. Dating, dosimetry and microscopy. — Singapore: World Sci., 1993. — 500 p.
11. Provenza D.V., Seibel W. Ed. Oral Histology. — Philadelphia: Lea and Febiger, 1986. — 58 p.

Надійшла 29.02.2012

А.Б. Брик, О.В. Франк-Каменецкая, Н.А. Дудченко,  
Д.И. Заболотный, В.А. Дубок, Е.А. Калиниченко

#### ФАЗОВЫЙ СОСТАВ И СИНТЕТИЧЕСКИЕ АНАЛОГИ МИНЕРАЛЬНОЙ КОМПОНЕНТЫ КОСТНОЙ ТКАНИ

Методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР) исследовались образцы биогенного и синтетического гидроксипатита. Разработаны новые подходы к определению фазового состава биоминералов и наноминералов на основе метода ЭПР. Поскольку метод имеет высокую чувствительность, с его помощью можно определять примесные фазы, количество которых составляет 0,1—1 % массы образца. С помощью метода ЭПР показано, что минеральная компонента костей кроме фазы гидроксипатита включает примесные минеральные фазы — кальцит, доломит, магнезит, витлокит. ЭПР-исследования нативных радикалов и карбонатных радикалов дают уникальную информацию о механизмах взаимодействия органической и неорганической материи в костной ткани, которая может быть использована для оценки процессов усвоения имплантированного материала живой костью.

*Ключевые слова:* биоминералы, гидроксипатит, электронный парамагнитный резонанс, синтетические аналоги гидроксипатита.

A.B Brik, O.V. Frank-Kamenetskaya, N.O. Dudchenko,  
D.I. Zabolotnyy, V.A. Dubok, O.A. Kalinichenko

#### PHASE COMPOSITION AND SYNTHETIC ANALOGUES OF BONE MINERAL COMPONENT

The highly mineralized biological tissues (for example, tooth enamel and bones) could be considered as special mineral-organic nanoassociated (MONA) systems, which have special structure and properties. The main crystal phase in bone corresponds to hydroxyapatite. However, there are many impurity crystal phases in the bone structure. These impurity crystal phases play an important role in the functioning of highly mineralised biological tissues. The quantity and type of such phases are changed due to aging and bone diseases. The method of electron paramagnetic resonance (EPR) has unique possibilities for studying of impurity crystal phases in biominerals and their synthetic analogues. These possibilities are based on high sensitivity of EPR method and

on sensitivity of EPR signal parameters to the symmetry of crystal lattice, where paramagnetic ions are localized. Small changes of crystal structure near the paramagnetic ion generate essential changes of the EPR spectra. It is possible to determine impurity crystal phases in a quantity of 1—0.1 % by the EPR method.

It was shown, by means of EPR method, that the mineral component of the bone, besides hydroxyapatite phase, includes admixture of such mineral phases: calcite, dolomite, magnesite, whitlockite, oxides of calcium and magnesium. Information about interaction mechanisms of organic and mineral matter and about assimilation process of implants by bone tissue could be obtained by registering of native free radicals and carbonate radicals. It was shown that EPR researches of these radicals give unique information about the mechanisms of interaction of organic and inorganic matter in the bone tissue, that can be used for the estimation of processes of implanted material assimilation by a living bone. The information about assimilation processes promotes the creation of physical models of bone tissues and serves for improving the resorbed implant materials, which are used for treatment of bone diseases. The EPR research promotes understanding of the processes of implant material transformation into live biological tissue.

The results, described in the paper open new possibilities for solving fundamental problems related to functioning and diseases of the mineralized biological tissue. The described new approaches for studying of nanoscale mineral particles localized in biological tissues, open new possibilities for solution of applied problems by non-traditional methods. Research of such objects of biomineralogy, as hydroxyapatite, is essential for development of nanomineralogy, nanophysics, nanotechnology, nanomedicine and nanomaterial science.

*Keywords:* biominerals, hydroxyapatite, electron paramagnetic resonance, synthetic analogues of hydroxyapatite.