

ВЛИЯНИЕ ВОДЫ, РАЗЛИЧНЫХ ВКЛЮЧЕНИЙ И ЗАМЕЩЕНИЙ НА ФИЗИКО-ХИМИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА БИОАПАТИТА И МЕХАНИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА МИНЕРАЛИЗОВАННЫХ ТКАНЕЙ

А.С. Аврунин¹, Ю.И. Денисов-Никольский², А.А. Докторов², Ю.С. Кривосенко³,
Д.О. Самойленко³, А.А. Павлычев³, И.И. Шубняков¹

¹ ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России,

ул. Ак. Байкова, д. 8, Санкт-Петербург, Россия, 195427

² ФБНУ «Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений», ул. Грина, д. 7, стр. 1, Москва, Россия, 117216

³ ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет», Университетская наб., д. 7-9, Санкт-Петербург, Россия, 199034

Реферат

На основе результатов собственных исследований и данных литературы охарактеризованы влияние на физико-химические и механические свойства биоапатита, инкорпорации в его структуру и абсорбции на его поверхности различного рода ионов и воды, а также определены дальнейшие пути изучения механизмов межкритсталлитных взаимодействий в наномасштабе.

Внутренняя структура кристаллитов апатита более гибкая, чем у большинства других минералов, и относительно легко приспосабливается к химическим замещениям, которые и определяют его биологически значимые характеристики, такие как размер, растворимость, твердость, хрупкость, деформируемость и тепловая стабильность. В этих условиях молекулы воды, включенные в структуру кристаллита и адсорбированные на его поверхности, являются стабилизирующим фактором. При сближении поверхностей кристаллитов на расстоянии <10 нм они связываются между собой через адсорбированную на их поверхности воду. Эта связь лежит в основе механических свойств костной ткани. Высказано предположение, что исследования с использованием сверхярких источников рентгеновского излучения (синхротроны и рентгеновские лазеры на свободных носителях) позволят измерять локально ближнюю тонкую структуру рентгеновских спектров поглощения с высоким энергетическим разрешением. Это даст возможность на основе современных теоретических методов описания взаимодействия рентгеновского излучения с веществом представить характеристики электронной и атомной структуры, в том числе зарядов атомов, межатомные расстояния, координацию атомов, потенциалы межатомного взаимодействия и в результате сформировать общую наноуровневую модель с морфологически обоснованной структурой минерального матрикса с учетом механизмов его механического контроля.

Ключевые слова: гидроксиапатит, минеральный матрикс, кость, иерархическая организация.

Природа «выбрала» апатит основным минеральным элементом, включаемым в тканевые структуры живых организмов при их минерализации в физиологических условиях [3, 4, 10, 11, 33, 36, 37, 44, 57]. Биологическая целесообразность подобного «решения», по-видимому, связана с тем, что внутренняя структура апатита более гибкая, чем у большинства других минералов, и относительно легко приспосабливается к химическим замещениям. Последние, меняя электронную и атомную структуры кристаллической решетки, определяют такие биологически значимые характеристики минерала, как растворимость, твердость, хрупкость, деформируемость,

тепловая стабильность и размер кристаллита [10, 37, 57]. Организм позвоночных способен инициировать биологически требуемые замещения путем формирования необходимой биохимической среды в зоне минерализации. Так, при формировании минерала в костной ткани происходящие замещения ионов фосфата ионами карбоната приводят к таким деформациям кристаллической решетки, которые, увеличивая растворимость минерала, ограничивают размеры его частиц [37, 57]. В этих условиях молекулы воды, включенные в структуру кристаллита и адсорбированные на его поверхности, могут играть роль стабилизирующего фактора [18, 57].

Аврунин А.С., Денисов-Никольский Ю.И., Докторов А.А., Кривосенко Ю.С., Самойленко Д.О., Павлычев А.А., Шубняков И.И. Влияние воды, различных включений и замещений на физико-химические свойства биоапатита и механические свойства минерализованных тканей. *Травматология и ортопедия России*. 2015; (3):37-50.

Аврунин Александр Самуэлевич. Ул. Ак. Байкова, д. 8, Санкт-Петербург, Россия, 195427; e-mail: a_avrunin@mail.ru

Рукопись поступила: 26.05.2015; принята в печать: 14.09.2015

Цель – на основе результатов собственных исследований и данных литературы оценить влияние на физико-химические и механические свойства биоапатита инкорпорации в его структуру и адсорбции на его поверхности различных ионов и воды, а также определить дальнейшие пути изучения механизмов взаимодействия между кристаллитами в наномасштабе как теоретической базы создания новых остеозамещающих материалов с заданными динамическими и кинематическими характеристиками.

При решении данной задачи необходимо ответить на следующие вопросы:

– Как влияет инкорпорация химических соединений, элементов и воды на физико-химические свойства минерального матрикса?

– Какова роль воды и различного рода растворенных ионов в формировании иерархически организованной структуры минерального матрикса?

– Каково влияние воды на механические свойства костных структур?

Иерархическая организация минерального матрикса. Согласно морфологической модели, предложенной ранее, частицы костного минерала располагаются в основном в виде вне- и внутрифибрилярно [11] (рис. 1). В межфибрил-

лярных пространствах кристаллиты и копланарные объединения, прилегающие к коллагеновым фибриллам, окружают их, формируя манжетки, и контактируют с внутрифибрилярными объединениями. На отдалении от коллагеновых фибрилл кристаллиты образуют конгломераты, в которых они ориентированы в одном направлении. По отношению друг к другу эти конгломераты расположены под разными углами. Внутрифибрилярные объединения кристаллитов образуют ряд параллельных, спирально закрученных пластов, которые ориентированы под углом 8–25° к оси фибрилл. Отдельные объединения минералов связывают соседние пласты, обеспечивая непрерывность минерального компонента матрикса после удаления органической составляющей.

Такая структура минерализованного матрикса кости имеет четырехуровневую иерархическую организацию (рис. 2, 3) [3, 4]:

- 1) первый уровень: трехмерная периодическая атомная структура апатита;
- 2) второй уровень: кристаллиты минерала;
- 3) третий уровень: копланарное объединение кристаллитов минералов;
- 4) четвертый уровень: макроструктурное объединение частиц минералов в единый комплекс внутри каждого костного органа.

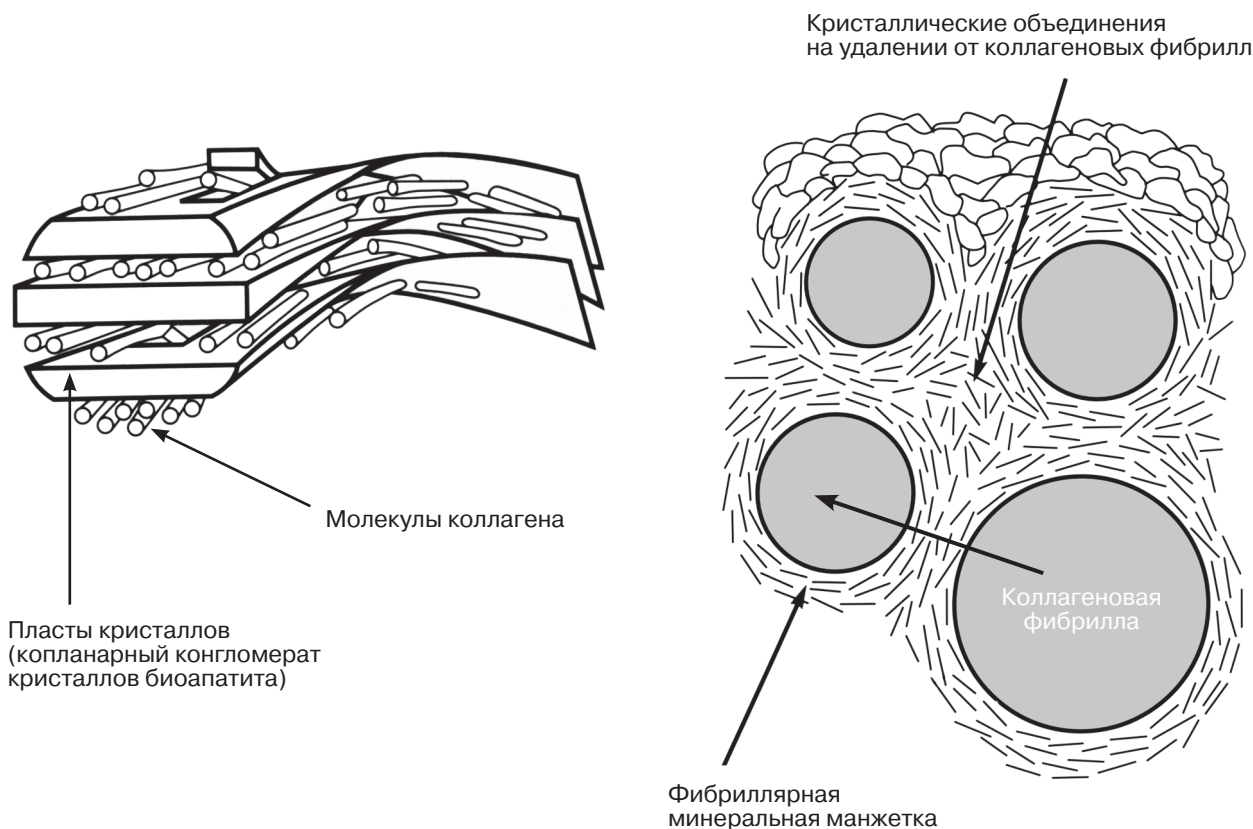


Рис. 1. Распределение объединений кристаллитов в костном матриксе [11] (объяснения в тексте)

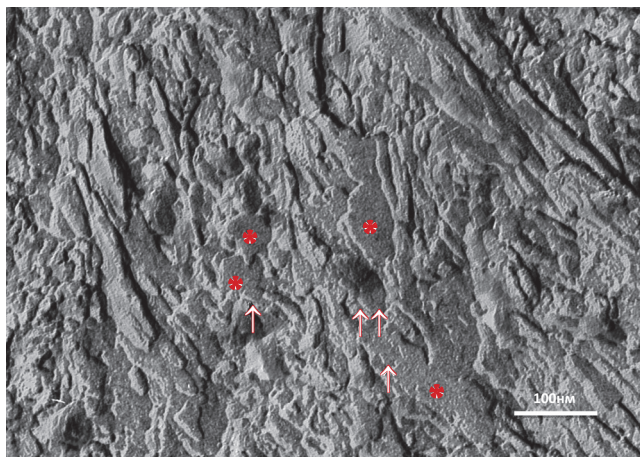


Рис. 2. Кристаллы минерала (↑) и копланарные объединения кристаллов (*) на поверхности скола, проходящего через минерализованный костный матрикс. ТЭМ. Платиноуглеродная реплика. Метка 100 нм

При исследовании этой иерархической организации минерализованных структур в современной остеологии используются, как правило, два взаимно дополняющих методологических подхода – минералогический и медико-биологический. Специалисты в области минералогии применяют в основном методы исследования внутренней трехмерной организации минералов [10, 33, 38, 39, 44, 58], то есть структур первого уровня. В медико-биологических исследованиях преимущественно используются различные микроскопические технологии, позволяющие изучить морфологию минеральных структур (в первую очередь, межфазовые границы) и их иерархию [11, 12, 13, 14, 15]. Последние в основном направлены на изучение второго и последующих уровней организации минерального матрикса.

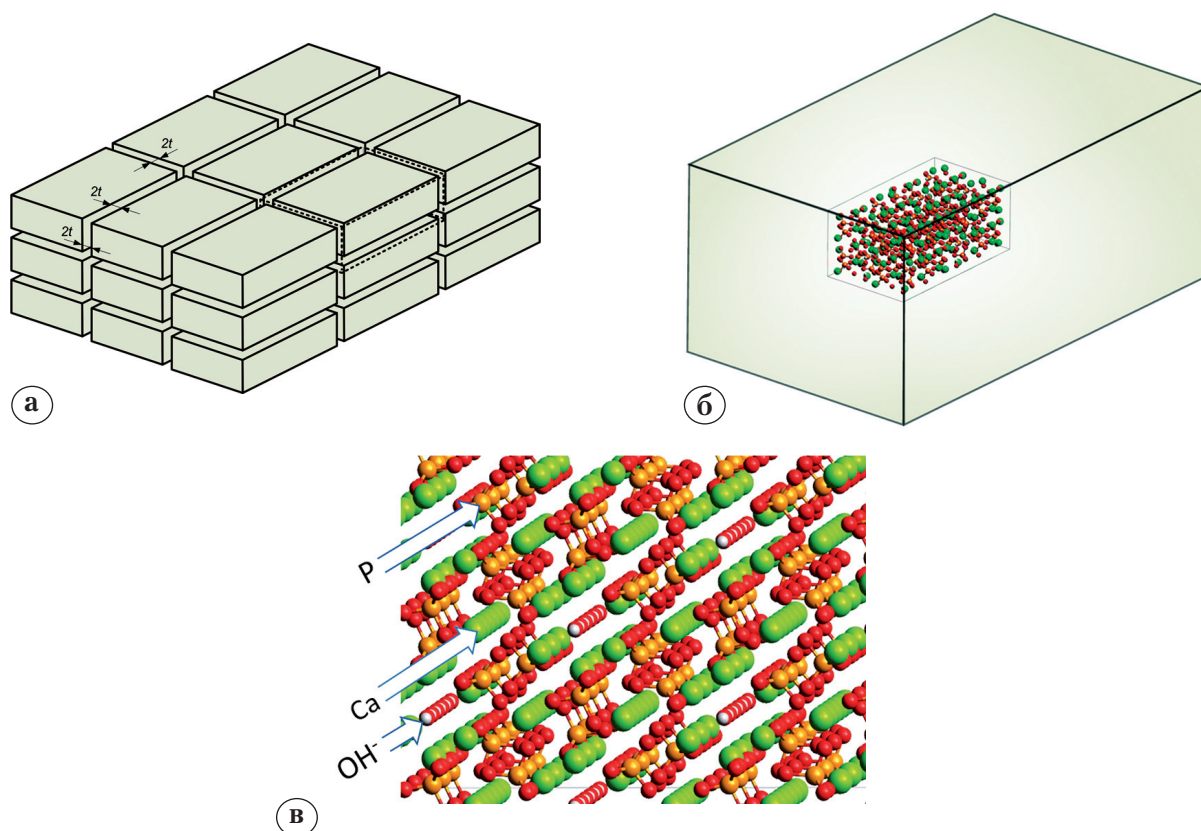


Рис. 3. Схема иерархической организации минеральных структур:

а – копланарное объединение нанокристаллитов, разделенных гидратным слоем;

б – отдельный кристаллит гидроксиапатита и схематическое изображение атомной структуры кристаллита;

в – фрагмент атомной структуры кристаллита.

Обозначения: зеленые и оранжевые элементы соответствуют положению катионов кальция Ca и фосфора P, красные – анионов кислорода, серые – атомам водорода; стрелки указывают на кальциевые, фосфатные и гидроксильные каналы, которые формируются в кристаллите; фосфатные каналы образованы катионами фосфора, заключенными внутри слегка искаженной тетраэдрической клетки, образованной анионами кислорода

Размеры кристаллитов биоапатита, представленные в литературе в значительной степени определяются используемым методом исследования. Так, дифракционные методы дают усредненную информацию о когерентном рассеянии большим количеством кристаллитов, находящихся в зоне облучения, включая и мелкие частички, которые не всегда отчетливо прослеживаются при микроскопических измерениях. Последнее обстоятельство приводит к более высоким средним размерам минералов. Поэтому длина кристаллитов по данным микроскопии существенно больше, чем по результатам рентгенографических исследований [10]. Анализ данных рентгеновской дифракции, малоуглового рентгеновского рассеяния, просвечивающей электронной микроскопии и атомной силовой микроскопии позволяют заключить, что длина, ширина и толщина кристаллитов биоапатита в костной ткани варьируются в пределах: 590–107 Å, 150–30 Å и 35–36 Å соответственно.

Необходимо также учитывать зависимость размера кристаллитов и от особенностей развития тканевых структур. Например, по данным атомной силовой микроскопии, изолированные минералы, извлеченные из молодой постнатальной бычьей кости, имели средний размер $9 \times 6 \times 2$ нм и оказались значительно короче и толще, чем измеренные тем же методом аналогичные образцы, полученные из зрелой бычьей кости [54]. Хрупкие кости старых животных или животных с остеопорозом содержат относительно большие и однородные по размеру кристаллиты, в то время как более прочные молодые кости включают смесь недавно сформированных маленьких и созревших больших кристаллитов [52].

В настоящее время в остеологии общеприняты следующие средние значения размеров биокристаллитов: длина ≈ 20 нм, ширина $\approx 7,5$ нм и толщина $\approx 3,5$ нм [4]. В контексте изложенного интересно мнение В. Wopenka и J.D. Pasteris [57], которые подчеркивают, что наноразмеры биоминерала предполагают не только тот факт, что они в основном формируются при температуре тела, но и то, что эти размеры обеспечивают биологическое преимущество сформированных с их участием тканей.

Биологически важные изменения кристаллической решетки гидроксиапатита. Существуют два типа катионов кальция, различающихся величиной заряда. Однако, согласно расчетам P. Rulis с соавторами, эти различия, крайне незначительны [49], поэтому на рисунке 3 в мы ими пренебрегли. Ориентация группы (ОН) в ячейке, строго говоря, не определена. Известно шесть ее возможных положений [49]. Гидроксиапатит

имеет сильную ионную проводимость, которая обеспечивается высокой подвижностью анионов (ОН).

В апатите существует несколько кристаллографических позиций, в которых происходят биологически важные изменения, связанные с замещением ионов ионами другого сорта. И хотя допустимый состав минерала не фиксирован, происходящие химические изменения обеспечивают полный баланс зарядов и геометрическое соответствие замещающего иона пространству кристаллической решетки. Это сохранение электронейтральности при замене одного иона другим того же знака, но с другой величиной заряда происходит, в том числе, за счет одновременного замещения ионом противоположного заряда в другом месте решетки или возникновения вакансий. Например, при замене иона PO_4^{3-} на ион CO_3^{2-} балансировка заряда может происходить путем образования одной или нескольких ионных вакансий. В этой связи важно, что, несмотря на существенные вариации химического состава биоапатита, он не может меняться так же хаотично и гибко, как химический состав водного раствора или стекла [57]. То есть, несмотря на высокий уровень кристаллических дефектов, кристаллиты биоминерала кости сохраняют структуру кристаллической решетки карбонатгидроксиапатита. Ее стабилизация на поверхности кристаллита обеспечивается взаимодействием с элементами окружающей среды, а в его объеме – влиянием дефектов, занимающих вакантные позиции [38, 56].

Некоторые варианты замещений в биоапатите и их биологическое значение. Атомное строение кристаллитов важно для понимания биологической роли механизмов, определяющих морфологию их роста, механических и физико-химических свойств. Сложность этого строения связана, в том числе, с огромным количеством различных атомов, входящих в состав одного кристаллита. Так, расчеты, учитывающие размер кристаллографической ячейки ($a = b = 9,4302$ Å, $c = 6,8911$ Å, $\alpha = \beta = 90^\circ$ и $\gamma = 120^\circ$), и приведенные выше размеры кристаллита показывают, что он в среднем содержит порядка 4×10^4 атомов. При этом каждый из них может оказывать существенное влияние на его свойства. Например, как отмечают В. Wopenka и J.D. Pasteris, из перечисленных анионов лучше всего вписывается в позицию гидроксильного канала анион F^- [57]. Его малый ионный радиус позволяет F^- занимать сходное положение в канале, и поэтому фторапатит, как и гидроксиапатит, характеризуется гексагональной симметрией. Эти характеристики биологически важны, так как оказывают существенное влияние

на растворимость данных минералов (например, в зубах и костях). С другой стороны, как показывают расчеты электронной структуры апатитов [49], верхняя валентная оболочка гидроксиапатита определяется электронами OH^- , и замена его анионом фтора существенно понижает химическую активность биоапатита, что важно для минеральных структур зубов.

Биоапатит кости включает около 5–8 вес.% CO_3^{2-} , который преимущественно заменяет в кристаллической решетке PO_4^{3-} [39]. По сравнению со стехиометрическим гидроксиапатитом, биоапатит содержит только ≈ 20 моль% ионов гидроксила (OH^-), то есть он на ≈ 80 моль% дефицитен по этому иону, и данный дефицит вызван необходимостью балансировки зарядов в процессе замещения ионами CO_3^{2-} ионов PO_4^{3-} . Дефицит отрицательного заряда возникает также и при замене PO_4^{3-} на HPO_4^{2-} , а суммарная компенсация происходит за счет удаления Ca^{2+} из кристаллической решетки. В процессе этой балансировки зарядов одновременно ограничивается концентрация гидроксильных ионов, и поэтому использование термина «гидроксил» в названии минерала вводит в заблуждение и фактически не соответствует действительности [38, 39, 44, 57].

Ионы CO_3^{2-} могут заменить не только ионы PO_4^{3-} (замена тип В), но и ионы OH^- и F^- в каналах биоапатита (замена тип А) [29, 57]. С биологических позиций, как уже отмечалось выше, инкорпорация иона карбоната в структуру кристалла апатита – крайне важный феномен, так как ион CO_3^{2-} увеличивает растворимость фосфата. Это увеличение растворимости карбонат-содержащего апатита по сравнению с карбонат-свободным частично вызвано тем, что Ca^{2+} - CO_3^{2-} связи более слабые, чем связи Ca^{2+} - PO_4^{3-} [57], а, по данным исследований тонкой структуры рентгеновских спектров поглощения костной ткани, концентрация карбоната у поверхности кристаллитов минерала больше, чем в их объеме, и, наоборот, для ионов фосфата [41]. Следовательно, растворимость поверхностных слоев кристаллита выше, чем внутренних. В этой связи остановимся на теории метастабильной растворимости, которая рассматривает вопросы растворимости биоапатитов.

Концепция метастабильной растворимости, описывающая свойства растворимости и ограничение размеров карбонатапатитов, детально рассмотрена У. Ньюман и М. Ньюман [18], а в дальнейшем развита М.Ж. Olszta с соавторами [36]. Авторы отмечают, что кристаллиты, содержащиеся в минерализованных тканях в виде коллоидных минералов, обладают очень малой растворимостью. При смешивании даже сильно

разведенных растворов соли возможна некоторая агрегация ионов. Твердые частицы стабильны лишь в том случае, если они очень малы (т.е. имеют те же размеры, что димеры и тримеры). При возрастании концентрации ионов в растворе его можно считать метастабильным, так как действительная величина растворимости превышает нормальную растворимость (растворимость «макрокристаллов»). При таких концентрациях часть вещества может находиться в твердой фазе, но радиус частиц должен варьировать от R_1 до R_2 . Эти частицы не будут спонтанно расти, так как более крупные минералы растворяются лучше, чем мелкие. На пике спонтанного осаждения наблюдаются обратные соотношения. Размер частиц R_2 , соответствующий равновесию, настолько велик, что их свойства приближаются к свойствам «бесконечно большого» кристалла. При этих условиях крупные частицы растворяются хуже мелких и растут за их счет. Поэтому с течением времени поведение смеси само приведет к образованию макрокристаллов, и растворимость станет нормальной. Полагаем, что именно этот механизм ограничивает размеры кристаллов в минерализованных тканях, тогда как белковые ингибиторы кристаллообразования, скорее всего, влияют на параметры третьего уровня организации минеральной фазы.

В этой связи важно, что уровень равновесия метастабильной растворимости карбонатапатитов хорошо коррелирует с уровнем микродеформаций и плохо – с размером кристаллита [21]. Следовательно, микродеформации, а не размер кристаллита, являются фактором, контролирующим эффективную растворимость карбонатапатитов.

Перечень химических компонентов, инкорпорируемых в структуру биоапатита. Как уже отмечалось выше, организм, по-видимому, способен через инкорпорацию соответствующих «примесей» в структуру биоапатита регулировать растворимость и размеры частиц апатита в разных структурах скелета (табл.). В пользу этого свидетельствует тот факт, что, например, биоапатит кости относительно легко растворим, в то время как биоапатит эмали резистентен к растворению. Рассмотренный выше механизм контроля величины минералов хорошо объясняет формирование кристаллитов большего размера в эмали, которые имеют половину инкорпорированных ионов карбоната по сравнению с апатитом кости. При этом дентин, имеющий размер кристаллита, близкий костному, содержит ту же концентрацию карбоната, что и кость [57]. Биологически важно, что каждый вариант вакансий и замещений определяет

особенности накопления напряжений в кристаллите и создает непреодолимый энергетический барьер для дальнейшего роста биоминерала при достижении им определенного размера [37].

С медико-биологических позиций, исследование влияния «примесей», входящих в состав биоапатита, и степени его кристалличности

является перспективным направлением, позволяющим дать оценку свойств минерализованных тканей. Данное предположение основывается на том, что, например, фосфат-карбонатный обмен и кристалличность с возрастом увеличиваются [42, 44, 47], а прочностные и функциональные свойства кости снижаются [30, 31].

Таблица

Состав минеральной компоненты зубной эмали, дентина и костной ткани* в сравнении с минералами гидроксиапатита (ГА), фторапатитом (ФА) и карбонатапатитом (КА), рассчитанными без и с учетом кристаллической воды (последнее значение дано в скобках), вес. %**

Наименование характеристики	Эмаль	Дентин	Костная ткань	ГА	ФА	КА
Ca ²⁺	37,6	40,3	36,6	39,9 (38,8)	39,7 (38,7)	39,0 (37,8)
P ⁵⁺	18,3	18,6	17,1	18,5 (18,0)	18,4 (17,9)	15,1 (14,6)
Ca/P, ат.	1,59	1,67	1,65	1,67	1,67	2
F ⁻	0,01	0,07	0,1	–	0,038 (0,037)	–
CO ₃ ²⁻	3,5	5,6	7,4	–	–	14,6 (14,2)
Минерал/в ткани	97	72	65–72	100	100	100
Органика/в ткани	1,5	20	20–25	–	–	–
Na ⁺ ***	0,7	0,1	1,0	–	–	–
Mg ²⁺	0,2	1,1	0,6	–	–	–
Cl ⁻	0,4	0,27	0,1	–	–	–
K ⁺	0,05	0,07	0,07	–	–	–
Al ³⁺	0,04	0,015	–	–	–	–
Si ⁴⁺	0,14	0,01	0,05	–	–	–
S	0,005	–	–	–	–	–
Mn ²⁺	0,006	следы	следы	–	–	–
Fe ³⁺	0,08	0,01	0,1	–	–	–
Cu ²⁺	0,008	0,005	0,1	–	–	–
Sr ²⁺	0,03	0,04	0,05	–	–	–
Ba ²⁺	0,02	0,005	0,1	–	–	–
Pb ²⁺	0,1	0,004	0,08	–	–	–
Zn ²⁺	0,12	0,07	0,04	–	–	–
Se ²⁺	0,002	следы	–	–	–	–
Sr ⁺	0,03	0,04	–	–	–	–
Ag ⁺	0,004	0,07	–	–	–	–
Cd ²⁺	0,007	–	–	–	–	–
Sn ²⁺	0,009	следы	–	–	–	–
Ba ²⁺	0,02	0,005	–	–	–	–
Pb ²⁺	0,1	0,004	0,08	–	–	–

* Для эмали, дентина и костной ткани использованы результаты С.Н. Данильченко [10].

** Расчеты ФА и КА проводились на основе структурных формул Ca₁₀[(PO₄)₆](OH)₂ и Ca₈[(PO₄)₄(CO₃)₂] как без учета кристаллической воды, так и с ее учетом Ca₁₀[(PO₄)₆](OH)₂·1,5H₂O и Ca₈[(PO₄)₄(CO₃)₂]·1,5H₂O (см. обсуждение ниже).

*** Для атомов (ионов) включений и замещений (Na⁺ и более тяжелые) приведены максимальные известные значения концентраций.

Биологическая целесообразность замещений и вакансий в структуре биоапатита заключается, прежде всего, в том, что в дополнение к ограничениям размеров кристаллита изменяются его физико-химические свойства соответственно функциональным требованиям. Существенным также является создание оптимальных условий для формирования трехмерной пространственной организации минерализованных тканей [56]. Другими словами, сдвиги, происходящие в кристаллической решетке, формируют нанокристаллиты с физико-химическими свойствами, обеспечивающими не только формирование сильного интерфейса между органическими и неорганическими элементами, но и обеспечивающими локальную потребность в быстром растворении минералов [57] в процессе остеокластно-остеобластного [8, 22] и остеокитарного ремоделирования [6, 7, 8].

Кроме того, с биологических позиций, важно, что не только внутренняя структура минерала контролирует его размер, но и размер биоминерала, в свою очередь, контролирует его внутреннюю структуру. Этот феномен вызван тем, что внутри кристаллита каждый катион окружен удерживающим его полем, создаваемым преимущественно соседними анионами, и, наоборот, каждый анион окружен полем соседних катионов. Однако на поверхности нет полной экранировки ионов, так как внешние поверхности характеризуются прерванными связями. Из-за этого на краю кристаллита нарушается баланс зарядов, и в результате происходит искажение положения соседних атомов. Эти краевые зоны – области деформаций высокой энергии и сильного искажения атомной геометрии. В результате в нанокристаллите объем внешнего деформированного слоя составляет существенную долю объема кристаллита (рис. 4) [18, 57].

Этот деформированный слой при трансмиссионной электронной микроскопии проявляется, по нашему мнению, нерегулярными краями пластинчатых кристаллитов [48]. В данных условиях вода является стабилизатором кристаллической решетки, обеспечивающим сохранение биологически требуемых свойств и предотвращение спонтанной перестройки биоапатита в идеальный гидроксипатит.

Распределение и роль воды в пространстве минерального матрикса. К настоящему времени можно считать законченной длившуюся более 100 лет дискуссию о характере распределения молекулярной воды в минеральных структурах. Установлено, что молекулы воды находятся как внутри кристаллической решетки (структурная вода), так и вне кристаллита – адсорбированные на его поверхности [34, 35, 38, 45, 46, 52, 59]. В последние годы доказано результатами серии термографических исследований, что при нагревании до 200°C удаленная вода является адсорбированной, а выше 200°C – структурно включенной. На этом основании показано, что количество адсорбированной воды очень вариабельно, в то время как доля структурной воды постоянна. В карбонат-гидроксипатите структурная вода составляет около 3 вес.% ($3,08 \pm 0,56$), что эквивалентно $\approx 1,5$ ($1,46 \pm 0,29$) молекулам воды на одну ячейку. Карбонатфторапатит включает близкое количество воды $3,32 \pm 0,63$ вес.% или $2,08 \pm 0,47$ моль на одну ячейку [38, 52, 59]. По данным А.Д. Taylor с соавторами, концентрация структурных молекул воды колеблется от 0,98 до 1,2 моль/мг [52].

Детальные термогравиметрические измерения и исследования с использованием рамановской спектроскопии образцов карбонатапатита, содержащих от 1 до 17 вес.% CO_3 и синтезированных в присутствии H_2O или D_2O , показали

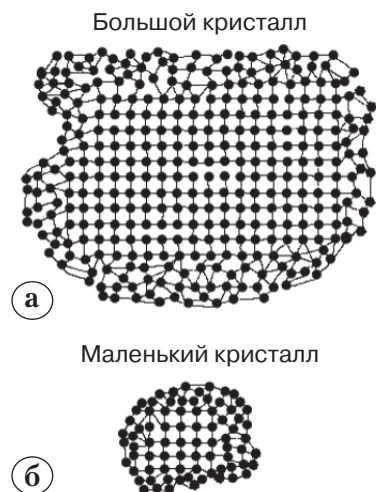


Рис. 4. Схематическое изображение двух идентичных кристаллов разного размера с одинаковой атомарной структурой центральных областей [57]: а – поверхностные связи между ионными единицами не скорректированы, что вызывает модификацию пропорции ионов и (остающихся) углов связи, тонкая корка искажений составляет незначительную часть объема кристалла; б – видны аналогичные искажения деформированного поверхностного слоя, однако из-за чрезвычайно маленького размера кристаллита этот слой искажений составляет значительную долю объема кристаллита

наличие молекулярной воды в кристаллической структуре всех образцов карбонат-апатита, сформированных в водной среде. Независимо от концентрации карбоната в структуру минерала включено ≈ 3 вес.% инкорпорированной воды, а количество адсорбированной воды на поверхности кристаллита кратно больше. Установлено также, что молекулы воды густо инкорпорированы каналы апатита независимо от обилия гидроксильных вакансий. Эти молекулы воды обеспечивают сохранение стабильности каналов апатита, даже когда 80% гидроксильных участков свободны (типично для кости), не только мешая ионам карбоната замещать гидроксильные ионы в каналах, но и регулируют проход через каналы (например, ионный обмен и вход маленьких молекул) [59].

Высказано предположение, что у позвоночных именно эти каналы, заполненные молекулами воды, обеспечивают обмен ионов кальция, фосфата, карбоната и гидроксила в кристаллите биоапатита сообразно изменению регуляторно-метаболических требований, происходящих в организме [1, 2, 17, 38]. В этой связи важно, что в высоко карбоксилированном и атомарно разупорядоченном биоапатите кости высокая плотность молекул H_2O обеспечивает стабилизацию OH^- - и Ca^{2+} -обедненных каналов [38].

J.D. Pasteris с соавторами считают, что апатит кости является не «дефектным гидроксипатитом», а минералогическим объектом, названным ими комбинированной гидратированно-гидроксилированной фазой фосфата кальция, которая приближенно может быть представлена в виде $Ca_{10-x}[(PO_4)_{6-x}(CO_3)_x](OH)_{2-x} \cdot nH_2O$, где $n \approx 1,5$ [38]. Поэтому вода – не случайный элемент, а скорее основной компонент костного минерала и других природных и синтетических низкотемпературных фаз карбонатгидроксипатита.

По мнению Е.Е. Wilson с соавторами, структурная вода, занимая вакансии в дефектах кристаллической решетки карбонатгидроксипатита, обеспечивает структурную стабильность путем формирования водородосвязующих мостиков между соседними ионами [56]. Присутствие этой воды объясняет, почему кристаллиты не разрушаются или спонтанно не перестраиваются в минералогически более совершенные, но биологически менее приспособленные минералы.

В связи с тем, что одной из основных функций костных структур является адекватное противодействие механическим нагрузкам, рассмотрим возможную роль воды минерального матрикса в выполнении механической функции.

Влияние механических воздействий на формирование наноуровневых сдвигов в структуре костного матрикса обеспечивается тем, что определенные химические связи (так называемые жертвенные связи) могут формироваться не только между органическими молекулами и между молекулами полимера и минералами, но и между кристаллитами при сближении их поверхностей на расстояние < 10 нм [24, 27, 53]. То есть минералы могут быть связаны между собой через адсорбированную на их поверхности воду. Кроме этого, результаты исследования костных структур ядерно-магнитным резонансом позволяют предположить, что наноструктурные преобразования, происходящие под влиянием механических воздействий, отражают включение или потерю воды кристаллической решеткой. Это связано с тем, что толщина частиц биоминерала кости соответствует толщине одной или двух элементарных ячеек, и поэтому движение воды в решетку и из неё не является столь же трудным, как в больших кристаллах, и представляет собой вероятный механизм микромеханической деформации [55].

Е.Е. Wilson с соавторами считают, что молекулы воды, входящие в водный слой на поверхности кристаллитов, участвуют в соединении минералов и могут служить амортизатором механического напряжения [56]. Они предлагают следующие механизмы, обеспечивающие эти эффекты:

1) движение воды позволяет кости противостоять напряжению с меньшей величиной деформаций;

2) вода, действуя как «жертвенный слой», защищает коллаген от сдвига при одноосном напряжении.

На этом основании Е.Е. Wilson с соавторами рассматривают воду как один из стандартных фундаментальных блоков, определяющих структуру кости на молекулярном уровне, и указывают, что расчетное моделирование взаимодействия этих стандартных блоков даст возможность более точно понять молекулярное происхождение уникальных механических свойств костных структур [56].

Перспективы использования кристаллографических, микроскопических и расчетных технологий при разработке наноуровневых механических моделей костной структуры. При исследовании наноуровневой организации костных структур, кроме химических методов, при проведении структурного анализа широко используются такие технологические подходы, как рентгеновская и нейтронная дифракция, инфракрасная и рамановская спектроскопия, а также ядерно-магнитная резонансная спектро-

скопия [34, 40, 56]. Эти методы хотя и дополняют данные микроскопических технологий [11, 27, 53], тем не менее не позволили до настоящего времени сформировать общую наноразмерную модель, отражающую морфологически обоснованную структуру минерального матрикса. Поэтому требуются дальнейшие исследования с использованием новых современных методов изучения нативной костной ткани.

Последнее относится к возможности использования современных рентгеноспектральных методов для высокоточного изучения энергетического распределения плотности свободных и занятых электронных состояний в гидратном слое, окружающем кристаллит, и ионов на его поверхности. Обращают на себя внимание методы, ранее не использовавшиеся для исследования нативной костной ткани, в частности, рентгеновская абсорбционная спектроскопия (в первую очередь, XANES-спектроскопия) [9, 19, 28], которая обеспечивает практически точечное и «мгновенное» зондирование объекта [16, 32] и возможность его неразрушающей диагностики. XANES-спектроскопия является технологией, позволяющей зондировать костные структуры и вещества, используемые в качестве имплантатов [20, 26, 41, 50], и в перспективе открывающей путь изучения локального электронного и атомного строения нативной кости. Проведение подобных исследований – необходимый элемент современного подхода к исследованию морфологии костных объектов, позволяющих расширить качественные характеристики нанобъектов, полученные микроскопическими методами.

Использование этих технологий позволит прояснить картину электронного и атомного строения костных структур и на этой основе определить квантово-механическое взаимодействие кристаллитов с участием гидратного слоя при формировании такой сложнейшей иерархической спирально организованной структуры, которой является минеральный матрикс [5, 11]. Именно на основе данных о межатомных связях, обеспечивающих взаимосвязь кристаллитов, можно построить путем расчетного моделирования механически организованную модель структуры минерального матрикса с учетом гидратных слоев, адсорбированных на каждом кристаллите минерала.

В заключение необходимо подчеркнуть, что перспективность этих исследований в том, что полученные данные будут служить теоретиче-

ской основой для создания новых остеозамещающих материалов с заданными динамическими и кинематическими характеристиками, а также управления процессами самоорганизации и механизмами ионного обмена в костной ткани.

Работа выполнена в рамках гранта СПбГУ 11.38.261.2014.

Конфликт интересов: не заявлен.

Литература

1. Аврунин* А.С., Корнилов Н.В. Асимметрия параметров – основа структуры пространственно-временной организации функций. *Морфология*. 2000; (2):80-85.
2. Аврунин А.С., Корнилов Н.В., Суханов А.В., Паршин В.А. Объективное деление посттравматического адаптационного каскада на основе хронобиологических характеристик асимметрии пространственно-временной организации функций. *Травматология и ортопедия России*. 2000; (2-3):20-25.
3. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Аболин А.Б., Щербак И.Г. Лекция по остеологии. Многоуровневый характер структуры минерального матрикса и механизмы его формирования. *Гений ортопедии*. 2005; (2):89-94.
4. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Аболин А.Б., Щербак И.Г., Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования (аналитический обзор). *Морфология*. 2005; (2):78-82.
5. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Паршин Л.А., Мельников Б.Е., Плиев Д.Г. Иерархия спиральной организации структур скелета. Взаимосвязь структуры и функции *Морфология*. 2010; (6):69-75.
6. Аврунин А.С., Тихилов Р.М. Остеоцитарное ремоделирование костной ткани: история вопроса, морфологические маркеры. *Морфология*. 2011; (1):86-94.
7. Аврунин А.С. Остеоцитарное ремоделирование. История вопроса, современные представления и возможности клинической оценки. *Травматология и ортопедия России*. 2012; (1):128-134.
8. Аврунин А.С., Тихилов Р.М., Шубняков И.И., Паршин Л.К., Мельников Б.Е. Критический анализ теории механостата. Часть I. Механизмы реорганизации архитектуры скелета. *Травматология и ортопедия России*. 2012; (2):105-115.
9. Виноградов А.С., Акимов В.Н., Зимкина Т.М., Павлычев А.А. Припороговые резонансы в рентгеновских спектрах поглощения молекул и твердых тел. *Известия АН СССР (серия физ.)*. 1985; 49(8):1458-1462.
10. Данильченко С.Н. Структура и свойства апатитов кальция с точки зрения биоминералогии и биоматериаловедения (обзор). *Вісник СумДУ. Серія Фізика, математика, механіка*. 2007; (2):33-59.
11. Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В. Актуальные проблемы теоретической и клинической остеоартрологии. М. : ОАО «Типография «Новости»; 2005. 336 с.

* С работами автора можно ознакомиться по адресу: <http://library.rniito.org/autrights.html>

12. Докторов А.А., Денисов-Никольский Ю.И. Особенности рельефа минерализованной поверхности лакун и канальцев в пластинчатой кости. *Бюл. эксперим. медицины.* 1993; 119(1):61-65.
13. Докторов А.А., Денисов-Никольский Ю.И., Жилкин Б.А. Структурная организация костного минерала. *Бюл. эксперим. медицины.* 1996; 122(12):687-691.
14. Жилкин Б.А., Денисов-Никольский Ю.И., Докторов А.А. Особенности строения пластинчатой кости позвоночного человека при возрастной инволюции и остеопорозе. *Бюл. эксперим. медицины.* 2003; 135(4):476-480.
15. Жилкин Б.А., Денисов-Никольский Ю.И., Докторов А.А., Структурная организация минерального компонента пластинчатой кости и процесс его формирования. *Успехи современной биологии.* 2003; 123(6):590-598.
16. Ключина Е.С., Кривосенко Ю.С., Павлычев А.А. Пространственно-временные динамические системы в фотоионизации внутренней оболочки для свободных молекул, кластеров и твердых тел. *Совр. математика. Фундам. направления.* 2013; 48:61-74.
17. Корнилов Н.В., Аврунин А.С. Причинно-следственная связь характера экстремального воздействия, его силы и структуры пространственно-временной организации функций организма. Процесс адаптации. *Медицинский академический журнал.* 2002; (3):99-103
18. Ньюман У., Ньюман М. Минеральный обмен кости. М., Изд-во иностранной литературы, 1961. 270 с.
19. Павлычев А.А., Виноградов А.С., Степанов А.П., Шулаков А.С. Динамические эффекты формирования локализованных состояний в ультрамягкой рентгеновской области спектра. *Опт. спектроскопия.* 1993; 75:554-578.
20. Aziz E.F., Ottosson N., Faubel M., Hertel I.V., Winter B. Interaction between liquid water and hydroxide revealed by core-hole de-excitation. *Nature.* 2008; 455(7209):89-91.
21. Baig A.A., Fox J.L., Young R.A., Wang Z., Hsu J., Higuchi W.I., Chhetry A., Zhuang H., Otsuka M. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. *Calcif Tissue Int.* 1999; 64(5):437-449.
22. Blair H.C., Simonet S., Lacey D.L., Zaidi M. Osteoclast biology. P.113-139. In book: Fundamentals of Osteoporosis. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London: Elsevier Inc.; 2010. 122 s.
23. Brown M.A., Faubel M., Winter B. X-ray photo- and resonant Auger-electron spectroscopic studies of liquid water and aqueous solutions. *Annu Rep Prog Chem.* 2009; 105:174-212.
24. Currey J. Sacrificial bonds heal bone. *Nature.* 2001; 414(6865):699.
25. Dauphin Y., Cuif J.-P., Salome M., Susini J., Williams C.T. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal Bioanal Chem.* 2006; 386:1761-1771.
26. Eisa M.H., Hao Shen, Yong Mi, Kamarualaziz I., Khalid M.H. Measurement of chemical composition of bone by X-ray absorption fine structure. *J Science Technology.* 2011; 13:109-117.
27. Fantner G.E., Hassenkam T., Kindt J.H., Weaver J.C., Birkedal H., Pechenik L., Cutroni J.A., Cidade G.A.G., Stucky G.D., Morse D.E., Hansma P.K. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat mater.* 2005; 4(8):612-616.
28. Filatova E.O., Pavlychev A.A. X-ray optics and inner-shell electronics of hexagonal BN (series: Biochemistry research trends). New York: Nova Science Publishers; 2011. 108 s.
29. Frank-Kamenetskaya O., Koltsov A., Kuzmina M., Zorina M., Poritskaya L. Ion substitutions and non-stoichiometry of carbonated apatite-(CaOH) synthesised by precipitation and hydrothermal methods. *J Molecular Structure.* 2011; 992(1-3):9-18.
30. Frost H.M. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone.* 1997; 20(5):385-391.
31. Frost H.M. New targets for the studies of biomechanical, endocrinologic, genetic and pharmaceutical effects on bones: bone's »nephron equivalents«, muscle, neuromuscular physiology. *J Musculoskeletal Research.* 2000; 4(2):67-84.
32. Krivosenko Yu.S., Pavlychev A.A. Photoion recoil effect on 1s photoelectron line as a probe of adsorbate-substrate interaction. *Chem Phys Lett.* 2013; 575:107-111.
33. Loong C.-K., Rey C., Kuhn L. T., Combes C., Wu Y., Chen S.-H., Glimch M.J. Evidence of hydroxyl-ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron-scattering study. *Bone.* 2000; 26(6):599-602.
34. Morris M.D., Finney W.F. Recent developments in Raman and infrared. spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy.* 2004; 18:155-159.
35. Nyman J.S., Ni Q., Nicoletta D.P., Wang X. Measurements of mobile and bound water by nuclear magnetic resonance correlate with mechanical properties of bone. *Bone.* 2008; 42:193-199.
36. Olszta M.J., Odom D.J., Douglas E.P., Gower L.B. A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor. *Connective Tissue Research.* 2003; 44(Suppl. 1):326-334.
37. Pasteris J.D., Wopenka B., Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements.* 2008; 4:97-104.
38. Pasteris J.D., Yoder C.H., Wopenka B. Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist.* 2014; 99:16-27.
39. Penel G., Leroy G., Rey C., Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int.* 1998; 63(6):475-481.
40. Rai R.K., Barbhuyan T., Singh C., Mittal M., Khan M.P., Sinha N., Chattopadhyay N. Total water, phosphorus relaxation and inter-atomic organic to inorganic interface are new determinants of trabecular bone integrity. *PLoS One.* 2013; 8(12):e83478:1-10.
41. Rajendran J., Gialanella S., Aswath P.B. XANES analysis of dried and calcined bones. *Materials Science and Engineering C.* 2013; 33(7):3968-3979.
42. Rey C., Renugopalakrishnan V., Collins B., Glimcher M.J. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49(4):251-258.
43. Rey C., Renugopalakrishnan V., Shimizu M., Collins B., Glimcher M.J. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃⁽²⁾ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49(4):259-268.
44. Rey C., Miquel J.L., Facchini L., Legrand A.P., Glimcher M.J. Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone.* 1995; 16(5):583-586.
45. Robinson R.A., Elliott S.R. The Water Content of Bone. I. The mass of water, inorganic crystals, organic matrix, and "CO₂ space" components in a unit volume of dog bone. *J Boneand Joint Surgery Am.* 1957; 39(1):167-188.
46. Robinson R.A. Crystal-Collagen-Water Relationships in Bone Matrix. *Clin Orthopaedics.* 1960; (17):69-76.
47. Roufosse A.H., Aue W.P., Roberts J.E., Glimcher M.J., Griffin R.G. Investigation of the mineral phases of

- bone by solid-state phosphorus-31 magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance. *Biochemistry*. 1984; 23(25):6115-6120.
48. Rubin M.A., Jasiuk I., Taylor J., Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. *Bone*. 2003; 33(3):270-282.
 49. Rulis P., Ouyang L., Ching W.Y. Electronic structure and bonding in calcium apatite crystals: Hydroxyapatite, fluorapatite, chlorapatite, and bromapatite. *Physical Review B*. 2004; 70:155104-1-7.
 50. Sowrey F.E., Skipper L.J., Pickup D.M., Drake K.O., Lin Z., Smith M.E., Newport R.J. Systematic empirical analysis of calcium-oxygen coordination environment by calcium K-edge XANES. *Phys Chem. Chem Phys*. 2004; 6:188-192.
 51. Stöhr J. NEXAFS-spectroscopy. Berlin: Springer; 1992, 404 p.
 52. Taylor A.J., Rendina E., Smith B.J., Zhou D.H. Analyses of mineral specific surface area and hydroxyl substitution for intact bone. *Chemical Physics Letters*. 2013; 588:124-130.
 53. Thompson J.B., Kindt J.H., Drake B., Hansma I.G., Morse D.E., Hansma P.K. Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature*. 2001; 414(13):773-775.
 54. Tong W., Glimcher M.J., Katz J.L., Kuhn L., Eppell S.J. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. *Calcif Tissue Int*. 2003;72(5):592-598.
 55. Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance. *Journal of bone and mineral research*. 2005; 20(4):625-634.
 56. Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal*. 2006; 90:3722-3731.
 57. Wopenka B., Pasteris J.D. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C*. 2005; 25(2):131-143.
 58. Yin X., Stott M.J. Biological calcium phosphates and Posner's cluster. *J Chem Phys*. 2003; 118(8):3717-3723.
 59. Yoder C.H., Pasteris J.D., Worcester K.N., Schermerhorn D.V. Structural water in carbonated hydroxylapatite and fluorapatite: confirmation by solid state ²H NMR. *Calcif Tissue Int*. 2012; 90(1):60-67.

СВЕДЕНИЯ ОБ АВТОРАХ:

Аврнин Александр Самуэлевич – д-р мед. наук старший научный сотрудник ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

Денисов-Никольский Юрий Иванович – д-р мед. наук профессор академик РАН главный научный сотрудник ФГНУ «Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений»

Докторов Александр Альбертович – д-р мед. наук профессор заведующий отделом морфологии ФГНУ «Всероссийский институт лекарственных и ароматических растений»

Кривосенко Юрий Сергеевич – канд. физ.-мат. наук ассистент кафедры электроники твердого тела физического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Самойленко Дмитрий Олегович – студент физического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Павлычев Андрей Алексеевич – д-р физ.-мат. наук профессор кафедры электроники твердого тела физического факультета ФГБОУ ВПО «Санкт-Петербургский государственный университет»

Шубняков Игорь Иванович – канд. мед. наук Ученый секретарь ФГБУ «Российский научно-исследовательский институт травматологии и ортопедии им. Р.Р. Вредена» Минздрава России

THE EFFECT OF WATER, VARIOUS INCORPORATIONS AND SUBSTITUTIONS ON PHYSICAL AND CHEMICAL PROPERTIES OF BIOAPATITE AND MECHANICAL PROPERTIES OF BONE TISSUE

A.S. Avrunin¹, Yu.I. Denisov-Nikolsky², A.A. Doktorov², Yu.S. Krivosenko³, D.O. Samoylenko³, A.A. Pavlychev³, I.I. Shubnyakov¹

¹ Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics, ul. Ak. Baykova, 8, St. Petersburg, Russia, 195427

² All-Russian Research Institute on Medicinal and Aromatic Plants, ul. Grina, d. 7, str. 1, Moscow, Russia, 117216

³ Saint-Petersburg State University, Universitetskaya nab., 7-9, St. Petersburg, Russia, 199034

Abstract

Basing on scientific publications and original research the authors specified the effect of incorporation and adsorption of different ions and water molecules on physical, chemical and mechanical properties of bioapatite and determined new directions for investigations of intercrystallite interactions in nanoscale.


Inner structure of the apatite crystallites more adaptable to chemical substitutions in comparison with other minerals controls their important characteristics such as a size, solubility, hardness, fragility, formability and thermal stability. The water molecules incorporated in crystallites and adsorbed on their surfaces stabilize them. In case the distances between crystallites become shorter than 10 nm the water molecules adsorbed on their surface play dominant role in bonding between the crystallites. This bond determines the main mechanical properties of bones. We bring forward a suggestion that theoretical model developed on the basis of near edge X-ray spectroscopic studies of bones using the contemporary high brilliant sources of X-ray radiation (synchrotrons and X-ray free electrons lasers) will allow to receive new quantitative data on local electronic and atomic structure (coordination numbers, ionic charges, interatomic distances interatomic and intercrystallite forces) of nanoelements in osseous tissue. The investigation results must bring to construction of new morphologically correct model providing deeper understanding of processes occurring in mineral matrix and mechanical properties of bones.

Key words: hydroxyapatite, mineral matrix, bones, hierarchic organization.

Conflict of interest: none.

References

1. Avrunin AS, Kornilov NV [The asymmetry parameter as a background of the structure of spatio-temporal organization functions]. *Morfologiya* [Morphology]. 2000; (2):80-85. [in Rus.]
2. Avrunin AS, Kornilov NV, Suchanov AV, Parshin VA [The objective division of post-traumatic stage adaptation based on chronobiological characteristics of the asymmetry of spatio-temporal organization functions]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and orthopedics of Russia]. 2000; (2-3):20-25. [in Rus.]
3. Avrunin AS, Tikhilov RM, Abolin AB, Shcherback IG [Lecture on osteology. Multilevel character of mineral matrix structure and mechanisms of its formation]. *Geniy ortopedii* [Genius of orthopedics]. 2005;(2):89-94. [in Rus.]
4. Avrunin AS, Tikhilov RM, Abolin AB, Shcherback IG [The levels of the bone mineral matrix organization and the mechanisms determining parameters of its formation]. *Morfologiya* [Morphology]. 2005; (2):78-82. [in Rus.]
5. Avrunin AS, Tikhilov RM, Shubnyakov II, Parshin LK, Melnikov BE, Pliev DG [Hierarchy of spiral organization of skeletal structures. Interrelation between structure and function]. *Morfologiya* [Morphology]. 2010; (6):69-75. [in Rus.]
6. Avrunin AS, Tikhilov RM [History and morfologic markers of osteocyte remodeling]. *Morfologiya* [Morphology]. 2011; (1):86-94. [in Rus.]
7. Avrunin AS [Osteocytic remodeling. Question history, modern representations and possibilities of the clinical estimation]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and orthopedics of Russia]. 2012; (1):128-134. [in Rus.]
8. Avrunin AS, Tikhilov RM, Shubnyakov II, Parshin LK, Melnikov BE [Critical analysis of the mechanostat theory. Part I. Reorganization mechanisms of skeletal architecture]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii* [Traumatology and orthopedics of Russia]. 2012; (2):105-115. [in Rus.]
9. Vinogradov AS, Akimov VN, Zimkina TM, Pavlychev AA [Near edge resonances in X-ray absorption spectra of molecules and solid bodies]. *Izvestiya AN SSSR (seriya*

 **Cite as:** Avrunin AS, Denisov-Nikolsky YuI, Doktorov AA, Krivosenko YuS, Samoylenko DO, Pavlychev AA, Shubnyakov II. [The effect of water, various incorporations and substitutions on physical and chemical properties of bioapatite and mechanical properties of bone tissue]. *Travmatologiya i ortopediya Rossii*. 2015; (3):37-50. [in Russian]

 Avrunin Alexander S. Ul. Ak. Baykova, 8, St. Petersburg, Russia, 195427; e-mail: a_avrunin@mail.ru

 Received: 26.05.2015; Accepted for publication: 14.09.2015

- fiz.) [Proceedings of the Academy of Sciences of the USSR (series phys.)]. 1985; 49(8):1458-1462. [in Rus.]
10. Danilchenko SN [Structure and properties of calcium apatites from point of view of biomineralogy and biomaterial science]. *Visnik SumDU. Seriya Fizika, matematika, mekhanika* [Proceedings of SumDU. Series of Physics, Mathematics, Mechanics] 2007; (2):33-59. [in Ukr.]
 11. Denisov-Nikolski YuI, Mironov SP, Omeljanenko NP [Actual problems of theoretical and clinical osteoartrology]. M: Novosti; 2005. 336 p. [in Rus.]
 12. Doktorov AA, Denisov-Nikolski YuI [Peculiarities of the relief of mineralized surface of lacune and canaliculi in lamellar bone] *Byulleten' eksperimental'noy meditsiny* [Bulletin of Experimental Medicine]. 1993; 119(1):61-65. [in Rus.]
 13. Doktorov AA, Denisov-Nikolski YuI, Zhilkin BA [Structural organization of bone mineral]. *Byulleten' eksperimental'noy meditsiny* [Bulletin of Experimental Medicine]. 1996; 122(12):687-691. [in Rus.]
 14. Zhilkin BA, Denisov-Nikolski YuI, Doktorov AA [Structure of human vertebral lamellar bone in age-associated involution and osteoporosis.] *Byulleten' eksperimental'noy meditsiny* [Bulletin of Experimental Medicine]. 2003; 135(4):476-480. [in Rus.]
 15. Zhilkin BA, Denisov-Nikolski YuI, Doktorov AA [Structural organization of lamellar bone mineral component and process of its formation]. *Uspekhi sovremennoy biologii* [Advance in modern biology]. 2003; 123(6): 590-598. [in Rus.]
 16. Klyushina ES, Krivosenko JuS, Pavlychev AA [Spatio-temporal dynamical systems in inner-shell photoionization of free molecules, clusters and solids]. *Sovremennaya matematika. Fundamental'nyye napravleniya* [Contemporary mathematics. Fundamental trends]. 2013; 48:61-74. [in Rus.]
 17. Kornilov NV, Avrunin AS. [The causal relation between the type strength of extreme external forces and the structure of time-space organization of organism functions]. *Meditsinskiy akademicheskiy zhurnal* [Medical academic journal]. 2002; (3):99-103. [in Rus.]
 18. Neuman WF, Neuman MW [The chemical dynamics of bone mineral]. M.: Izdatel'stvo inostrannoy literatury; 1961. 270 p. [in Rus.]
 19. Pavlychev AA, Vinogradov AS, Stepanov AP, Shulakov AS [Dynamics effects in forming localized electronics states of polyatomic systems in ultrasoft x-ray region]. *Opticheskaya spektroskopiya* [Optical spectroscopy]. 1993; 75:327-341. [in Rus.]
 20. Aziz EF, Ottosson N, Faubel M, Hertel IV, Winter B. Interaction between liquid water and hydroxide revealed by core-hole de-excitation. *Nature*. 2008; 455(7209):89-91.
 21. Baig AA, Fox JL, Young RA, Wang Z, Hsu J, Higuchi WI, Chhetry A, Zhuang H, Otsuka M. Relationships among carbonated apatite solubility, crystallite size, and microstrain parameters. *Calcif Tissue Int*. 1999; 64(5):437-449.
 22. Blair HC, Simonet S, Lacey DL, Zaidi M. Osteoclast biology. P.113-139. In book: *Fundamentals of Osteoporosis*. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London: Elsevier Inc.; 2010. 122 s.
 23. Brown MA, Faubel M, Winter B. X-ray photo- and resonant Auger-electron spectroscopic studies of liquid water and aqueous solutions. *Annu Rep Prog Chem*. 2009; 105:174-212.
 24. Currey J. Sacrificial bonds heal bone. *Nature*. 2001; 414(6865):699.
 25. Dauphin Y, Cuif J-P, Salome M, Susini J, Williams CT. Microstructure and chemical composition of giant avian eggshells. *Anal Bioanal Chem*. 2006; 386:1761-1771.
 26. Eisa MH, Hao Shen, Yong Mi, Kamarualaziz I, Khalid MH. Measurement of chemical composition of bone by X-ray absorption fine structure. *J Science Technology*. 2011; 13:109-117.
 27. Fantner GE, Hassenkam T, Kindt JH, Weaver JC, Birke-dal H, Pechenik L, Cutroni JA, Cidade GAG, Stucky GD, Morse DE, Hansma PK. Sacrificial bonds and hidden length dissipate energy as mineralized fibrils separate during bone fracture. *Nat mater*. 2005; 4(8):612-616.
 28. Filatova EO, Pavlychev AA. X-ray optics and inner-shell electronics of hexagonal BN (series: Biochemistry research trends). New York: Nova Science Publishers; 2011. 108 s.
 29. Frank-Kamenetskaya O, Koltsov A, Kuzmina M, Zorina M, Poritskaya L. Ion substitutions and non-stoichiometry of carbonated apatite-(CaOH) synthesised by precipitation and hydrothermal methods. *J Molecular Structure*. 2011; 992(1-3):9-18.
 30. Frost HM. Defining osteopenias and osteoporoses: another view (with insights from a new paradigm). *Bone*. 1997; 20(5):385-391.
 31. Frost HM. New targets for the studies of biomechanical, endocrinologic, genetic and pharmaceutical effects on bones: bone's»nephron equivalents», muscle, neuromuscular physiology. *J Musculoskeletal Research*. 2000; 4(2):67-84.
 32. Krivosenko YuS, Pavlychev AA. Photoion recoil effect on 1s photoelectron line as a probe of adsorbate-substrate interaction. *Chem Phys Lett*. 2013; 575:107-111.
 33. Loong C-K, Rey C, Kuhn LT, Combes C, Wu Y, Chen S-H, Glimch MJ. Evidence of hydroxyl-ion deficiency in bone apatites: an inelastic neutron-scattering study. *Bone*. 2000; 26(6):599-602.
 34. Morris MD, Finney WF. Recent developments in Raman and infrared. spectroscopy and imaging of bone tissue. *Spectroscopy*. 2004; 18:155-159.
 35. Nyman JS, Ni Q, Nicoletta DP, Wang X. Measurements of mobile and bound water by nuclear magnetic resonance correlate with mechanical properties of bone. *Bone*. 2008; 42:193-199.
 36. Olszta MJ, Odom DJ, Douglas EP, Gower LB. A new paradigm for biomineral formation: mineralization via an amorphous liquid-phase precursor. *Connective Tissue Research*. 2003; 44(Suppl. 1):326-334.
 37. Pasteris JD, Wopenka B, Valsami-Jones E. Bone and tooth mineralization: why apatite? *Elements*. 2008; 4:97-104.
 38. Pasteris JD, Yoder CH, Wopenka B. Molecular water in nominally unhydrated carbonated hydroxylapatite: The key to a better understanding of bone mineral. *American Mineralogist*. 2014; 99:16-27.
 39. Penel G, Leroy G, Rey C, Bres E. MicroRaman spectral study of the PO₄ and CO₃ vibrational modes in synthetic and biological apatites. *Calcif Tissue Int*. 1998; 63(6):475-481.
 40. Rai RK, Barbhuyan T, Singh C, Mittal M, Khan MP, Sinha N, Chattopadhyay N. Total water, phosphorus relaxation and inter-atomic organic to inorganic interface are new determinants of trabecular bone integrity. *PLoS One*. 2013; 8(12):e83478:1-10.
 41. Rajendran J, Gialanella S, Aswath PB. XANES analysis of dried and calcined bones. *Materials Science and Engineering C*. 2013; 33(7):3968-3979.
 42. Rey C, Renugopalakrishnan V, Collins B, Glimcher MJ. Fourier transform infrared spectroscopic study of the carbonate ions in bone mineral during aging. *Calcif Tissue Int*. 1991; 49(4):251-258.

43. Rey C, Renugopalakrishnan V, Shimizu M, Collins B, Glimcher MJ. A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopic study of the environment of the CO₃⁽²⁻⁾ ion in the mineral phase of enamel during its formation and maturation. *Calcif Tissue Int.* 1991; 49(4):259-268.
44. Rey C, Miquel JL, Facchini L, Legerand AP, Glimcher MJ. Hydroxyl groups in bone mineral. *Bone.* 1995; 16(5):583-586.
45. Robinson RA, Elliott SR. The Water Content of Bone. I. The mass of water, inorganic crystals, organic matrix, and "CO₂ space" components in a unit volume of dog bone. *J Boneand Joint Surgery Am.* 1957; 39(1):167-188.
46. Robinson RA. Crystal-Collagen-Water Relationships in Bone Matrix. *Clin Orthopaedics.* 1960; (17):69-76.
47. Roufosse AH, Aue WP, Roberts JE, Glimcher MJ, Griffin RG. Investigation of the mineral phases of bone by solid-state phosphorus-31 magic angle sample spinning nuclear magnetic resonance. *Biochemistry.* 1984; 23(25):6115-6120.
48. Rubin MA, Jasiuk I, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian RP. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. *Bone.* 2003; 33(3):270-282.
49. Rulis P, Ouyang L, Ching WY. Electronic structure and bonding in calcium apatite crystals: Hydroxyapatite, fluorapatite, chlorapatite, and bromapatite. *Physical Review B.* 2004; 70:155104-1-7.
50. Sowrey FE, Skipper LJ, Pickup DM, Drake KO, Lin Z, Smith ME, Newport RJ. Systematic empirical analysis of calcium-oxygen coordination environment by calcium K-edge XANES. *Phys. Chem Chem Phys.* 2004; 6:188-192.
51. Stöhr J. NEXAFS-spectroscopy. Berlin: Springer; 1992, 404 p.
52. Taylor AJ, Rendina E, Smith BJ, Zhou DH. Analyses of mineral specific surface area and hydroxyl substitution for intact bone. *Chemical Physics Letters.* 2013; 588:124-130.
53. Thompson JB, Kindt JH, Drake B, Hansma IG, Morse DE, Hansma PK. Bone indentation recovery time correlates with bond reforming time. *Nature.* 2001; 414(13):773-775.
54. Tong W, Glimcher MJ, Katz JL, Kuhn L, Eppell SJ. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. *Calcif Tissue Int.* 2003;72(5):592-598.
55. Wilson EE., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. Highly ordered interstitial water observed in bone by nuclear magnetic resonance. *Journal of bone and mineral research.* 2005; 20(4):625-634.
56. Wilson E.E., Awonusi A., Morris M.D., Kohn D.H., Tecklenburg M.M.J., Beck L.W. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal.* 2006; 90:3722-3731.
57. Wopenka B., Pasteris J.D. A mineralogical perspective on the apatite in bone. *Materials Science and Engineering C.* 2005; 25(2):131-143.
58. Yin X., Stott M.J. Biological calcium phosphates and Posner's cluster. *J Chem Phys.* 2003; 118(8):3717-3723.
59. Yoder C.H., Pasteris J.D., Worcester K.N., Schermerhorn D.V. Structural water in carbonated hydroxylapatite and fluorapatite: confirmation by solid state 2H NMR. *Calcif Tissue Int.* 2012; 90(1):60-67.

INFORMATION ABOUT AUTHORS:

Aurunin Alexander S. – senior researcher of the scientific department of the diagnosis and treatment of musculoskeletal system diseases and injuries, Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics

Denisov-Nikolsky Yuriy I. – professor, the member of the Russian Academy of Sciences, chief researcher of All-Russian Research Institute on Medicinal and Aromatic Plants

Doctorov Alexander A. – professor the head of morphology department of All-Russian Research Institute on Medicinal and Aromatic Plant

Krivosenko Yuriy S. – assistant, solid state electronics department, faculty of physics, Saint-Petersburg State University

Samoylenko Dmitriy O. – graduate student, faculty of physics, Saint-Petersburg State University

Pavlychev Andrey A. – professor, solid state electronics department, faculty of physics, Saint-Petersburg State University

Shubnyakov Igor I. – academic secretary, Vreden Russian Research Institute of Traumatology and Orthopedics