

МИНИСТЕРСТВО НАУКИ И ВЫСШЕГО ОБРАЗОВАНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ  
Федеральное государственное бюджетное учреждение науки  
**ЛИМНОЛОГИЧЕСКИЙ ИНСТИТУТ СИБИРСКОГО ОТДЕЛЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ АКАДЕМИИ НАУК  
(ЛИН СО РАН)**

*На правах рукописи*

**Стрелова Мария Сергеевна**

**ИССЛЕДОВАНИЕ ВЛИЯНИЯ ПОЛИЭЛЕКТРОЛИТОВ НА ФОРМИРОВАНИЕ  
КАРБОНАТА И ФОСФАТА КАЛЬЦИЯ В ВОДНОЙ СРЕДЕ**

1.4.7 Высокомолекулярные соединения

Диссертация  
на соискание ученой степени кандидата химических наук

**Научный руководитель:**  
Анненков Вадим Владимирович,  
д.х.н., профессор

**Иркутск – 2025 г.**

## ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ .....	4
СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ .....	10
Глава 1 Формирование композитных материалов на основе фосфата и карбоната кальция в живых организмах и в условиях <i>in vitro</i> (обзор литературы) .....	12
1.1 Биоминерализация .....	12
1.2 Состав биоминералов: неорганическая и органическая составляющие.....	16
1.2.1 Минеральная часть.....	16
1.2.2 Органическая часть.....	19
1.3 Образование фосфата и карбоната кальция в водной среде .....	25
1.4 Образование биоминералов на основе фосфата и карбоната кальция в организмах	32
1.4.1 Поглощение ионов из окружающей среды.....	33
1.4.2 Транспорт строительных материалов внутри организма.....	38
1.4.3 Отложение кальциевых композитов под управлением организма .....	42
1.5 Влияние полимеров на образование фосфата и карбоната кальция.....	45
Глава 2 Влияние функциональных полимеров на формирование карбоната и фосфата кальция в водной среде (результаты и обсуждение).....	55
2.1 Функциональные полимеры для моделирования биоминерализации.....	55
2.1.1 Сополимеры винилимидазола с акриловой кислотой .....	55
2.1.2 Сополимеры винилимидазола с виниламином.....	56
2.1.3 Сополимеры виниламина с акриловой кислотой .....	59
2.1.4 Сополимеры винилимидазола с виниламином и акриловой кислотой .....	67
2.1.5 Набор (со)полимеров, используемый для моделирования биоминерализации ...	70
2.2 Синтез карбоната кальция в присутствии полимеров .....	75
2.2.1 Композитные осадки на основе карбоната кальция и полимеров .....	78
2.2.2 Стабильные дисперсии наночастиц на основе карбоната кальция и полимеров.	83
2.3.3 Взаимодействие частиц на основе карбоната кальция и полимеров с противоположно заряженными объектами .....	87
2.3 Синтез фосфата кальция в присутствии полимеров.....	93
2.3.1 Композитные осадки на основе фосфата кальция и полимеров .....	94
2.3.2 Стабильные дисперсии наночастиц на основе фосфата кальция и полимеров ...	98
2.3.3 Взаимодействие противоположно заряженных частиц на основе фосфата кальция и полимеров .....	102

2.4 Возможные области применения композитных частиц на основе карбоната и фосфата кальция .....	106
2.4.1 Хроматографические сорбенты.....	107
2.4.2 Покрытия для выращивания клеток.....	108
2.4.3 Макропористые материалы для заполнения костных дефектов.....	110
2.4.4 Минерализация клеточных стенок динофлагеллят .....	112
Глава 3 Объекты и методы исследования.....	114
3.1 Подготовка исходных веществ.....	114
3.2 Синтез полимеров .....	115
3.3 Получение карбоната кальция в присутствии полимеров .....	123
3.4 Получение фосфата кальция в присутствии полимеров .....	124
3.5 Методы исследования.....	124
3.5.1 Потенциометрическое титрование.....	124
3.5.2 Вискозиметрия .....	125
3.5.3 Спектральные исследования .....	125
3.5.4 Определение содержания кальция и фосфора в композитных осадках .....	126
3.5.5 Микроскопия.....	127
3.5.6 Светорассеяние .....	127
3.5.7 Термогравиметрический анализ.....	127
3.5.8 Порометрия .....	127
3.5.9 Рентгеноструктурный анализ .....	128
3.6 Получение покрытий на основе частиц карбоната кальция, стабилизированных полимерами и культивирование фибробластов .....	128
3.7 Заполнение костных дефектов органо-неорганическими композитами .....	129
3.8 Минерализация поверхности клеток динофлагеллят .....	129
ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	131
СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ.....	133
СПИСОК ИСТОЧНИКОВ.....	135

## ВВЕДЕНИЕ

Значительное количество живых организмов обладает скелетом, либо эндоскелетом (рыбы, птицы, млекопитающие, губки и др.), либо экзоскелетом (диатомовые водоросли, моллюски и др.). Материалы, из которых построены скелеты, содержат различные неорганические компоненты: кремнезём, фосфат и карбонат кальция. Данные соединения не обладают достаточными механическими свойствами для формирования элементов скелета и живые организмы синтезируют на их основе композитные материалы, в которых неорганическая часть ассоциирована с биополимерами на микро- и наноуровнях.

Необходимость исследования процессов образования неорганических и композитных материалов живыми организмами (биоминерализации) обусловлена несколькими факторами:

- скелет и его элементы являются важной частью организма, которую надо учитывать при исследовании систематики, эволюции, физиологии организмов;
- состояние скелетных элементов тесно связано с общим состоянием как отдельного организма, так и популяций, их изменение может являться сигналом об общих изменениях в экосистеме;
- природные органо-неорганические композиты являются уникальными материалами по сочетанию полезных свойств, например, прочности и лёгкости, причём живые организмы создают их без использования высоких температур, опасных реагентов, высокого давления или вакуума;
- понимание строения костной ткани и механизмов её формирования критично для регенеративной медицины.

В последние десятилетия проводятся активные исследования молекулярных механизмов биоминерализации, что связано как с актуальностью данной темы, так и с развитием необходимой инструментальной базы, включая электронную микроскопию, хромато-масс-спектрометрические методы анализа. Несмотря на десятки научных работ, опубликованных в ведущих научных изданиях, существенные пробелы остаются в понимании основных стадий биоминерализации:

- захват исходных, "мономерных" неорганических соединений из окружающей среды;

- накопление прекурсоров скелетных материалов в организме, предотвращение их преждевременного отверждения, состав и структура первичных, вероятно олигомерных, неорганических или органо-неорганических частиц;
- воплощение информации, заложенной в геноме, в упорядоченные на макроуровне скелетные материалы.

Благодаря развитию современных геномных и протеомных методов, новым поколениям аналитических приборов, много информации получено при изучении живых организмов. В то же время, понимание механизмов биоминерализации невозможно без расширения знаний о химии соответствующих процессов. Необходимы исследования в области формирования неорганических материалов (кремнезём, карбонат и фосфат кальция) под контролем водорастворимых полимеров, содержащих различные функциональные группы и близких по свойствам к биополимерам, возможно участвующим в биоминерализации. Использование в подобных работах веществ природного происхождения обычно затруднено неполными данными о структуре агентов биоминерализации, сложностью и высокой стоимостью их выделения или синтеза. Использование синтетических полимеров в качестве модельных объектов позволяет не только верифицировать существующие гипотезы в области биоминерализации и формулировать новые, но и двигаться в сторону биоинспирированных технологий и материалов.

Таким образом, данная работа, посвящённая изучению формирования карбоната и фосфата кальция в присутствии водорастворимых полимеров, является актуальной. В настоящее время в подобных исследованиях используется довольно узкий круг синтетических полимеров, обычно карбоксилсодержащие поликислоты. Практически не уделяется внимание полимерным основаниям и амфолитам. В исследованиях, как правило, используются коммерческие полимерные образцы, работы разных авторов проводятся в разных условиях, что делает невозможным прослеживание связей состав – свойство.

Целью данной работы являлось выявление связи структуры синтетических органических полиэлектролитов с их возможностью влиять на формирование карбоната и фосфата кальция на уровне субмикронных частиц и твёрдых материалов. В этой связи решались следующие задачи:

1. Создание набора синтетических полиэлектролитов, включающего как известные полимерные кислоты и основания, так и новые полиамфолиты на основе акриловой кислоты и виниламина, изучение их свойств в водных растворах.
2. Изучение влияния синтетических полиэлектролитов на образование карбоната и фосфата кальция в водной среде, выявление условий формирования твёрдых материалов различной морфологии и дисперсий композитных наночастиц, моделирующих предполагаемые биогенные прекурсоры минерализации.
3. Поиск условий дестабилизации дисперсий композитных наночастиц с образованием органо-неорганических материалов.
4. Оценка путей практического применения получаемых материалов.

### **Методология и методы исследования**

В работе использовали как известные полимеры, так и образцы, впервые синтезированные радикальной полимеризацией и полимераналогичными реакциями. Охарактеризованы кислотно-основные и гидродинамические свойства полиэлектролитов в водных растворах. Проводили формирование карбоната или фосфата кальция в водной среде в присутствии синтетических полимеров. При образовании осадков их выделяли и исследовали соответствующими методами, а при образовании стабильных дисперсий осуществляли мониторинг методом динамического светорассеяния. Используются следующие методы исследования:  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопия, УФ и ИК спектроскопия, потенциометрическое титрование, сканирующая и просвечивающая электронная микроскопия, энергодисперсионная рентгеновская спектроскопия, флуоресцентная микроскопия, термогравиметрический анализ, газовая порометрия, метод порошковой дифракции, динамическое и статическое светорассеяние, атомно-абсорбционная спектроскопия. Состав синтезированных сополимеров определяли при помощи  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии, УФ спектроскопии и потенциометрического титрования. Состав композитных осадков определяли методом атомно-абсорбционной спектроскопии (кальций) и кальцинированием с последующей ИК спектроскопией с добавлением внутреннего стандарта (фосфор).

### **Научная новизна и теоретическая значимость работы**

Разработаны методы синтеза сополимеров акриловой кислоты и виниламина, а также тройных сополимеров с участием 1-винилимидазола. Обнаружена повышенная кислотность сополимеров акриловой кислоты и виниламина за счёт образования

внутримолекулярных водородных связей. Макромолекулы полиамфолитов склонны к ассоциации в водной среде и образованию осадков при определённых значениях pH, в зависимости от состава сополимера. С использованием набора синтетических полиэлектролитов (26 образцов) выявлена связь строения полимера и его способности влиять на формирование карбоната и фосфата кальция с образованием неорганических (композитных) осадков или стабильных прозрачных дисперсий, содержащих композитные наночастицы из неорганических частиц, стабилизированных функциональным полимером. Данные наночастицы являются синтетической моделью первичных частиц в биоминерализации. Установлено, что дисперсии композитных наночастиц могут быть дестабилизированы взаимодействием с наночастицами противоположного заряда (полимеры или аналогичные композитные наночастицы). При этом образуются материалы, морфология которых сходна с морфологией костной ткани. Подобная дестабилизация первичных наночастиц может происходить и в живой природе путём подачи соответствующих биополимеров под контролем систем организма.

### **Практическая значимость работы**

Разработаны методы синтеза новых полиамфолитов на основе акриловой кислоты и виниламина. Предложен новый тип прекурсоров для синтеза композитных материалов на основе карбоната и фосфата кальция – стабильные дисперсии композитных наночастиц. Использование данных прекурсоров позволяет получать материалы в контролируемых условиях, поскольку органический полимер предотвращает почти мгновенное образование крупных неорганических частиц. Обнаружена возможность управления синтезом кальцита с образованием округлых микрочастиц. Показана перспективность новых материалов и подходов к их формированию для получения хроматографических сорбентов, покрытий для выращивания прикрепляемых клеточных культур, минерализации поверхности живых клеток, макропористых заполнителей костных дефектов.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. Образование системы водородных связей между карбоксильными и аминогруппами может приводить к повышенной кислотности сополимеров акриловой кислоты и виниламина, сопоставимой с кислотами средней силы.

2. Осаждение карбоната или фосфата кальция ингибируется полимерами, содержащими как карбоксильные, так и аминогруппы.

3. Стабильные дисперсии композитных наночастиц являются моделью первичных частиц при биоминерализации и новыми прекурсорами для получения композитных материалов.

### **Личный вклад**

Личный вклад автора в работах, выполненных в соавторстве и включенных в диссертацию, заключается в сборе и анализе литературных данных, проведении экспериментальной работы, обработке, интерпретации и обобщении полученных результатов. Молекулярные массы сополимеров винилформамида с акриловой кислотой определены к.х.н. Захаровой Н.В., ИВС РАН. Полиакриловая кислота с привитым полиамином (ПАКХ-N3), фракции поливиниламина и флуоресцентный краситель QA2 предоставлены сотрудниками лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН. Часть аналитических работ (спектроскопия ЯМР, термогравиметрический и рентгеноструктурный анализ) выполнены в ЦКП г. Иркутска. Культивирование клеточных культур осуществлено Савиным А.М., НИУ ИТМО (Санкт-Петербург), динофлагеллят – к.х.н., с.н.с. Даниловцевой Е.Н., ЛИН СО РАН.

### **Степень достоверности и апробация результатов**

Результаты настоящей работы обсуждались на 6-м Международном симпозиуме «Frontiers in Polymer Science» (Будапешт, Венгрия, 2019 г.), 15-й международной конференции «Современные проблемы науки о полимерах» (Санкт-Петербург, 2019 г.), на 19-й международной научно-практической конференции «Новые полимерные композиционные материалы» (п. Эльбрус, Кабардино-Балкарская Республика, 2023 г.), на 9-й Всероссийской Каргинской конференции «Полимеры — 2024» (Москва, 2024 г.).

По результатам исследования опубликовано 5 статей в журналах, индексируемых в рекомендованных ВАК при Минобрнауки России международных базах данных Scopus и Web of Science.

### **Благодарности**

Автор выражает благодарность своему научному руководителю д.х.н., профессору Анненкову Вадиму Владимировичу и сотрудникам лаборатории биомолекулярных систем Лимнологического института СО РАН к.х.н. Даниловцевой Елене Николаевне, к.х.н. Зелинскому Станиславу Николаевичу, к.х.н. Пальшину Виктору Александровичу и Судакову Максиму Станиславовичу за всестороннюю поддержку.

Автор признателен за помощь в проведении экспериментов к.х.н. Захаровой Наталье Владимировне, Лопатиной Ирине Николаевне, Савину Артемию, к.г.-м.н. Каневой Екатерине Владимировне, Страхову Василию Олеговичу.

Автор благодарит сотрудников ЦКП «Ультрамикрoанализ» (ЛИН СО РАН) за помощь в проведении работ по микроскопии.

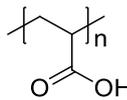
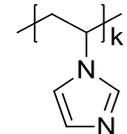
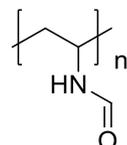
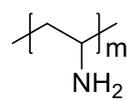
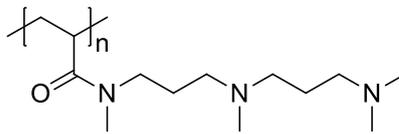
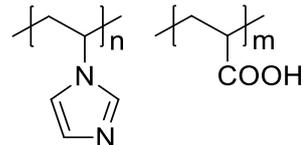
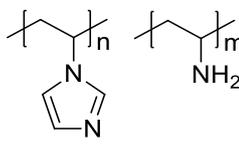
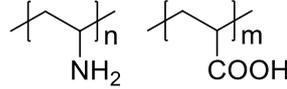
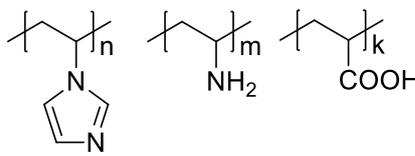
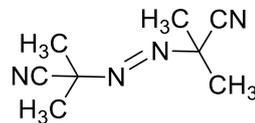
### **Поддержка**

В диссертационной работе использованы результаты, полученные при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования РФ (тема № 122012600070-9) и РФФИ (проект № 19-04-00926).

### **Объем и структура диссертации**

Диссертационная работа состоит из введения, 3 глав, выводов, библиографии, изложена на 155 страницах машинописного текста, включая 26 таблиц, 71 рисунок и 291 литературную ссылку.

## СПИСОК ОСНОВНЫХ СОКРАЩЕНИЙ

ПАК	Полиакриловая кислота	
ПВИ	Поли-1-винилимидазол	
ПВФА	Поливинилформамид	
ПВА	Поливиниламин	
ПАКХ-N3	Полиакриловая кислота с привитым полиамином	
ВИ-АК	Сополимер 1-винилимидазола с акриловой кислотой	
ВИ-ВА	Сополимер 1-винилимидазола с виниламином	
ВА-АК	Сополимер виниламина с акриловой кислотой	
ВИ-ВА-АК	Сополимер 1-винилимидазола с виниламином и акриловой кислотой	
ДАК	2,2'-Азобисизобутиронитрил	
СаР	Фосфат кальция	
ГА	Гидроксиапатит	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$
ОФК	Октакальций фосфат	
АКК	Аморфный карбонат кальция	
АФК	Аморфный фосфат кальция	
ММ	Молекулярная масса	

$R_h$	Гидродинамический радиус
$\zeta$	Дзета-потенциал
$\alpha$	Степень ионизации кислотных групп, включая сопряжённые кислоты в случае оснований
$\beta$	Степень нейтрализации кислотных групп, включая сопряжённые кислоты в случае оснований
СЭМ	Сканирующая электронная микроскопия
ПЭМ	Просвечивающая электронная микроскопия
DLS	Динамическое рассеяние света
EDAX	Метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии

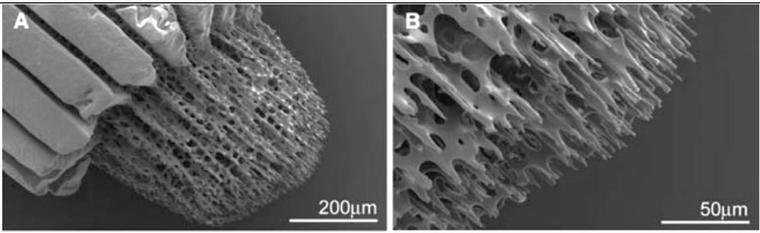
## Глава 1 Формирование композитных материалов на основе фосфата и карбоната кальция в живых организмах и в условиях *in vitro* (обзор литературы)

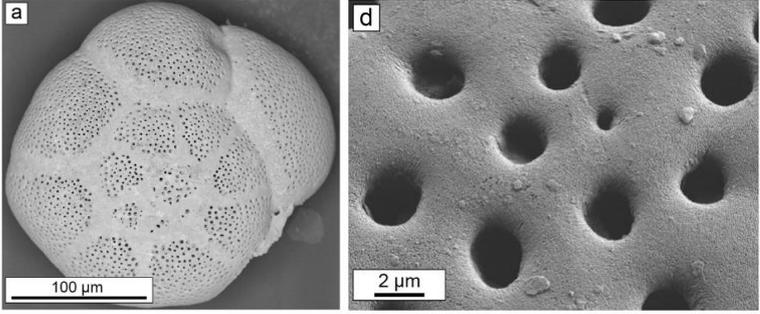
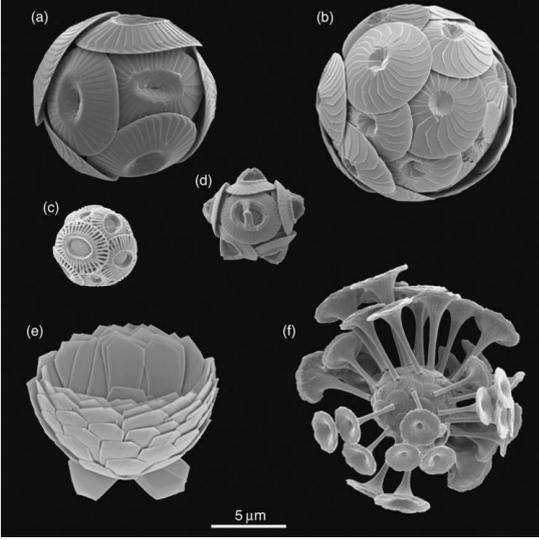
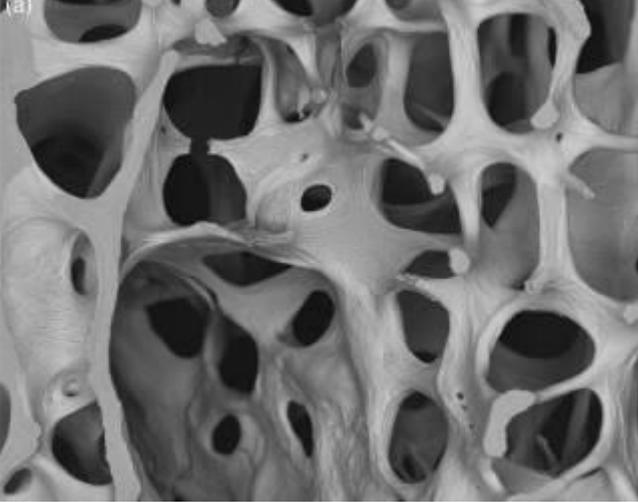
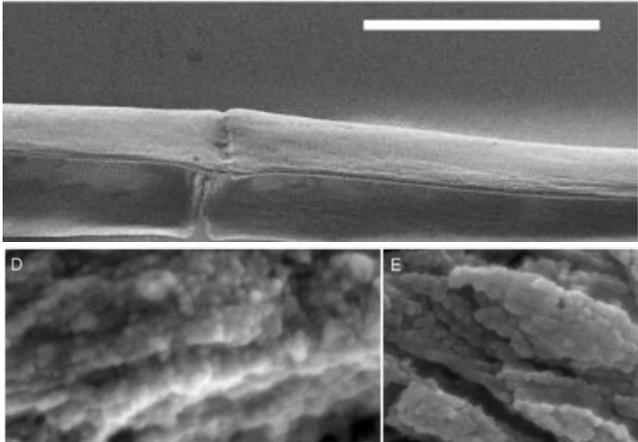
Данная работа посвящена изучению влияния структуры синтетических полиэлектролитов на образование фосфата и карбоната кальция. Этот процесс моделирует формирование неорганических и композитных материалов в живых организмах, в связи с чем в обзоре литературы представлены исследования в области биоминерализации и её изучения *in vitro* с использованием синтетических аналогов биополимеров.

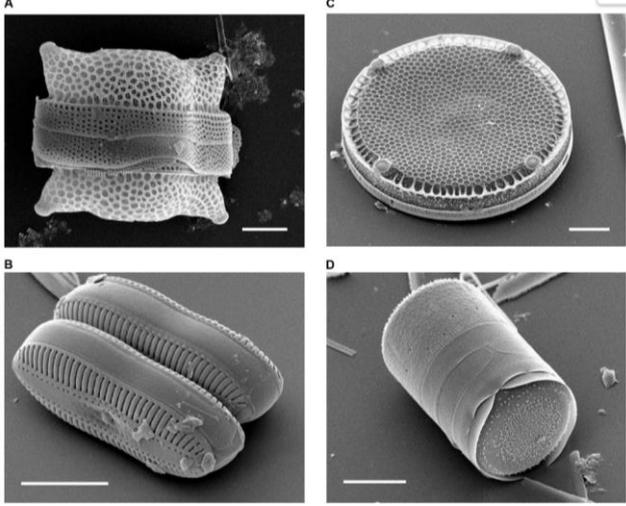
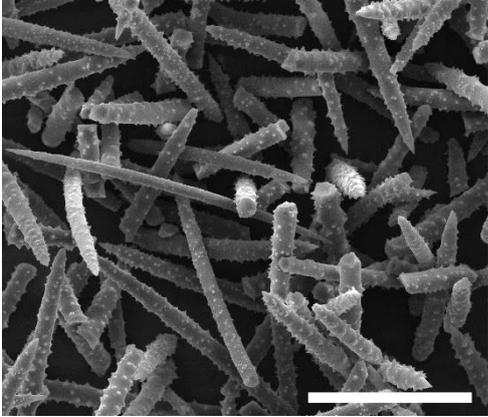
### 1.1 Биоминерализация

Многие организмы производят минеральные материалы различного функционала, и этот процесс называется биоминерализацией. Самыми распространенными среди таких минералов являются фосфат и карбонат кальция, силикаты (Таблица 1). Ионы кальция, карбонат- и фосфат-ионы участвуют в жизненно важных процессах в организмах, таких как метаболизм, передача сигналов. Минералы карбоната кальция распространены в земной коре в виде отложений известняка и мрамора и используются в производстве пластмасс, бумаги, красок. Минералы фосфата кальция – апатиты – широко используются для производства фосфорных удобрений, стекла и зубных паст. Силикаты и кремнезем являются основой пород, из которых состоит земная кора, и применяются в производстве стекла, керамики, абразивов, сорбентов для хроматографии. Однако минералы, которые формируются живыми организмами, по структуре и свойствам отличны от минералов, получаемых из горных пород или в лабораторных условиях. Живые организмы управляют процессом минерализации, в результате чего создаются необычайно упорядоченные конструкции, совершенно отличные от минералов, известных неорганической химии.

Таблица 1 – Организмы и образуемые ими биоминералы

<b>Карбонат кальция</b>	
<p>Регенерирующая игла морского ежа [1]. Масштаб: А – 200 <math>\mu\text{m}</math>, В – 50 <math>\mu\text{m}</math>.</p>	

<p>СЭМ изображения фораминиферы <i>Ammonia</i> sp. [2]. Масштаб: А – 100 <math>\mu\text{м}</math>, В – 2 <math>\mu\text{м}</math>.</p>	
<p>Основные виды кокколитофорид – морских одноклеточных водорослей, создающих детали панциря из карбоната кальция [3]. Масштаб 5 <math>\mu\text{м}</math>.</p>	
<p><b>Фосфат кальция</b></p>	
<p>Срез человеческого позвонка [4]. Ширина поля 4.45 мм.</p>	
<p>Сегмент плавниковой кости (вверх) и формирующаяся кость (низ) рыбки <i>Danio rerio</i>. Масштаб: А - 200 <math>\mu\text{км}</math>, D, E – 100 нм [5].</p>	

<b>Кремнезем</b>	
<p>Фотографии диатомей – одноклеточных организмов, живущих в кремнеземных панцирях [6]. Масштаб: А, В, D – 10 мкм, С – 20 мкм</p>	
<p>Спикулы губки <i>Lubomirskia baicalensis</i>, масштаб 100 мкм [7].</p>	

Биоминералы состоят из двух основных компонентов: минеральной и органической частей. Минеральная часть определяет твердость, прочность, термостабильность биоминерала. Органические компоненты представлены молекулами, которые связываются с минеральной частью или же служат матрицей для ее формирования. Органическая часть определяет форму, размер, ориентацию и распределение минеральных кристаллов в биоминерале. Органические соединения также участвуют в регуляции роста, ремоделирования и резорбции биоминерала. Самыми распространенными органическими молекулами в биоминералах являются белки, полисахариды и липиды. Присутствие органических молекул, окружающих или включенных в минералы, придает хрупким неорганическим частицам устойчивость к разрушению [8, 9].

Биоминералы на основе кремнезема ( $\text{SiO}_2$ ) распространены среди морских обитателей, представителями которых являются как одноклеточные организмы - диатомовые водоросли, радиолярии, так и многоклеточные организмы – губки. Эти

организмы имеют структурные элементы скелета, состоящие из кремнезема или композитного материала на его основе. Для построения элементов скелета они используют кремний, аккумулированный из воды или почвы. В водах кремний присутствует в виде кремниевой кислоты  $\text{Si}(\text{OH})_4$  в концентрациях, не превышающих 100  $\mu\text{M}$  [10]. Как организмы концентрируют кремниевую кислоту из столь разбавленного раствора – вопрос, который все еще остается без ответа.

Кальцифицирующие организмы живут и на суше, и в воде, и окружающая среда является основным источником строительных материалов для биоминералов. Процессы поглощения ионов и осаждения минеральных фаз изучаются в течение десятилетий, но основные моменты все еще не раскрыты до конца. Так, для морского моллюска источником ионов кальция и карбоната является окружающая морская вода. Морская вода содержит около 10 мМ кальция, и около 5 мМ углерода, а также 450 мМ натрия, 550 мМ хлоридов, 53 мМ магния, 28 мМ сульфатов [11]. Моллюск, который живет практически в растворе поваренной соли, и из всех окружающих его ионов вынужден отбирать необходимые для роста его раковины кальций и карбонат-ионы. Как он отличает кальций от похожего на него магния, которого больше в 5 раз? Кроме того, как он вообще из такого разбавленного раствора производит практически чистый (практически, так как содержит до 5% органических макромолекул) безводный карбонат кальция?

Еще один интересный момент заключается в том, что не известно, каким образом организмы транспортируют ионы к месту образования твердого материала. Здесь нужно иметь в виду, что концентрации ионов внутри клеток достаточно строго контролируются, и, например, внутриклеточная концентрация ионов кальция составляет 100-200 нМ [12-14]. Выходит, что поглощаемый кальций нужно как-то отделять от внутренней среды клетки. Здесь немного более понятны способы, которыми пользуются организмы, чтобы не нарушать внутриклеточный ионный баланс – это может быть эндоцитоз, и тогда захваченные ионы заключены в вакуоль; транспорт конденсированных форм, и здесь ионы находятся в связанном виде; образование комплекса с макромолекулами и т.д.

Процессы биоминерализации вдохновляют на создание композитных материалов, сочетающих свойства своих составляющих и применимых в медицине, инженерии, электронике и других областях человеческой жизнедеятельности. Стремясь повторить структуру биоминералов, люди исследуют влияние природных и синтетических органических веществ на разные стадии формирования минерала, от

зародышеобразования до конечного продукта [7, 15, 16]. Использование природных принципов построения минеральных материалов привлекательно для получения систем с заданными свойствами и обуславливает научный интерес к биоминерализации и удивительным результатам этого процесса.

Исходя из целей данной работы далее в обзоре будет рассмотрена биоминерализация на основе карбоната и фосфата кальция.

## **1.2 Состав биоминералов: неорганическая и органическая составляющие**

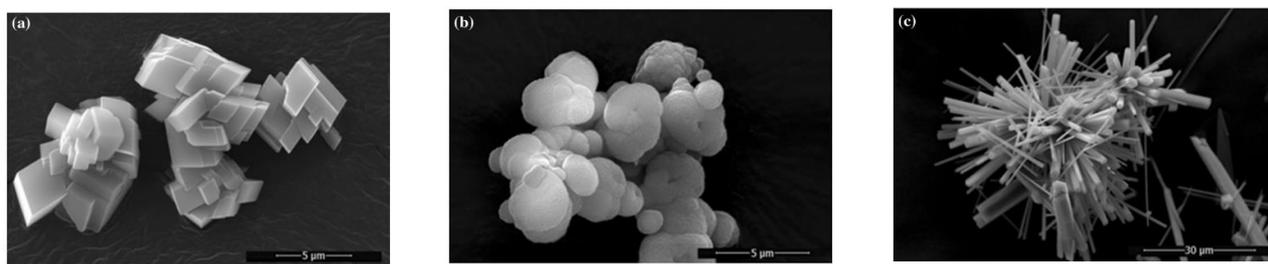
### **1.2.1 Минеральная часть**

Основная масса экзо- и эндоскелета приходится на неорганическую составляющую. Минеральная часть определяет твердость, прочность, упругость и термостабильность биоминерала и может быть подвержена резорбции в зависимости от физиологических потребностей организма. Самыми распространенными минералами в биоминералах являются карбонат и фосфат кальция.

Карбонат кальция составляет бóльшую часть – до 95% - раковин моллюсков, скелетов кораллов, эндоскелетов некоторых птиц и рептилий. Карбонат кальция в природе представлен тремя формами разной стабильности: кальцит, арагонит и ватерит. Кальцит образует ромбоэдрические или скаленоэдрические кристаллы, арагонит – призматические или игольчатые кристаллы. Ватерит образует сферические или эллипсоидальные частицы. Кальцит является наиболее твердым и устойчивым полиморфом, а ватерит - наименее твердым и устойчивым. Наряду с кристаллическими полиморфами, в природе встречается и некристаллическая, аморфная форма карбоната кальция, или АКК.

Все три формы карбоната кальция – кальцит, арагонит и ватерит – представлены в раковинах моллюсков. Некоторые моллюски могут образовывать раковины из одной формы карбоната кальция, например, только из кальцита или только из арагонита. Другие моллюски могут образовывать раковины из разных форм карбоната кальция в разных слоях или частях раковины. Например, у некоторых брюхоногих моллюсков (гастропод) внешний слой раковины состоит из кальцита, а внутренний слой - из арагонита [17, 18]. У некоторых двустворчатых моллюсков внешний слой раковины состоит из арагонита, а внутренний слой - из кальцита. Ватерит является наименее стабильной формой карбоната кальция и обычно появляется в местах повреждения раковины, где он может служить временным заполнителем, пока не будет заменен более устойчивой формой [19]. Форма

карбоната кальция в раковинах моллюсков определяется не только генетически, но и физико-химическими условиями среды, в которой живет моллюск. Важную роль играют температура и соотношение ионов магния и кальция в воде. В целом, при более высокой температуре и более высоком содержании ионов магния вероятно образование арагонита, а при более низкой температуре и более низком содержании ионов магния – кальцита [20]. Скелет кокколитофорид, фораминифер и иглы морского ежа представлены кальцитом. В растущих спикулах эмбрионов морского ежа, а также на регенерирующих частях раковин моллюсков, наряду с кальцитом обнаруживается АКК в качестве переходной фазы.



Кальцит

Ватерит

Арагонит

Рисунок 1 - СЭМ изображения форм карбоната кальция [21]

Фосфат кальция в природе встречается в нескольких формах (Таблица 2 [22]). Неорганическая часть кальций-фосфатных биоминералов представлена в основном гидроксиапатитом ( $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$ , или  $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ ), в котором часть ионов кальция и фосфат-ионов может быть замещена другими ионами (например, карбонат-ионы,  $\text{Mg}^{2+}$  и др. [23]). Гидроксиапатит имеет самую низкую растворимость в нейтральной среде из группы минералов фосфата кальция.

Таблица 2 – Состав и растворимость фосфатов кальция в нейтральной среде

Соединение	Формула	Ca/P	Растворимость, мг/л
Дигидроортофосфат кальция моногидрат	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$	0.5	66204.3
Дигидроортофосфат кальция безводный	$\text{Ca}(\text{H}_2\text{PO}_4)_2$	0.5	61477.3
Гидроортофосфат кальция дигидрат (брушит)	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	1.0	85.2

Соединение	Формула	Ca/P	Растворимость, мг/л
Гидроортофосфат кальция безводный (монетит)	$\text{CaHPO}_4$	1.0	41.1
Октакальций фосфат	$\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	1.33	0.5
$\alpha$ -ортофосфат кальция	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	2.5
$\beta$ -ортофосфат кальция	$\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	1.5	0.4
Гидроксиапатит	$\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$	1.67	0.2

Некоторая часть кальция в биогенном гидроксиапатите замещена магнием и натрием, а часть фосфат-ионов может быть замещена карбонат-ионами, что приводит к отклонению соотношения Ca/P от стехиометрического значения в гидроксиапатите (1.67). Гидроксиапатит является основной составляющей костей и зубов позвоночных животных: кости человека содержат до 70% гидроксиапатита, остальное приходится на органические вещества и воду [24], зубная эмаль на 95% состоит из карбонат-замещенного гидроксиапатита. Кристаллы костного гидроксиапатита имеют размеры 30-50 нм в длину и около 3 нм в толщину, кристаллы гидроксиапатита зубной эмали до 1 мкм в длину и 50 нм в ширину (рисунок 2) [25]. Биогенный гидроксиапатит демонстрирует слабую кристалличность [26, 27]. Несмотря на многолетние исследования, процесс образования костного гидроксиапатита не понятен до конца. Предполагается, что этот процесс включает в себя формирование промежуточных соединений – аморфного фосфата кальция (АФК) и октакальций фосфата (ОКФ). Существует гипотеза, что первоначально сформировавшийся аморфный фосфат кальция может превращаться в октакальций фосфат (Ca/P = 1.33), который затем подвергается гидролизу с образованием биогенного гидроксиапатита с недостатком кальция (Ca/P <1.67) [28-32]. Структурное сходство октакальций фосфата и гидроксиапатита, а также нестехиометрическое соотношение Ca/P в биогенном гидроксиапатите позволяет считать октакальций фосфат потенциальным прекурсором костного минерала [28, 33]. Подтверждено, что аморфный фосфат кальция присутствует в формирующихся костях рыб [5, 34] и курицы [35] в качестве переходной фазы. Однако октакальций фосфат в основном обнаруживается при патологической кальцификации (камни в мочевом пузыре, кариес), где pH часто ниже физиологического значения 7.4 [36, 37]. Однако, авторы работы [38] показали, что в формирующемся черепном шве мышцы образовывалась фаза, напоминающая октакальций

фосфат, а в 2018 году было обнаружено первое свидетельство наличия ОКФ в кости человека [39], что может служить подтверждением гипотезы о ОКФ как прекурсоре костной ткани.

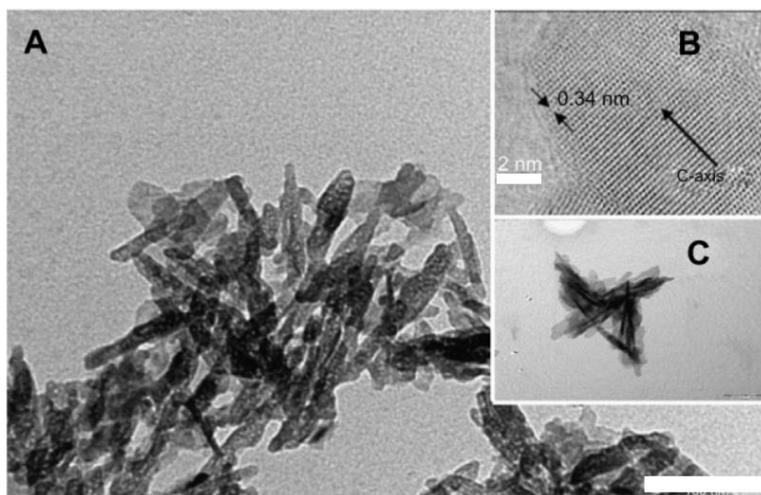


Рисунок 2 – Изображения кристаллов синтетического гидроксиапатита (А) и кристаллов костного гидроксиапатита (В и С) [40]. Масштаб: А – 100 нм, В – 2 нм

### 1.2.2 Органическая часть

Живые организмы синтезируют огромное количество органических соединений, необходимых для формирования биоминералов. Содержание органических веществ в конечном биоминерале варьируется от 5% для кальций-карбонатных до 30-50% для кальций-фосфатных биоминералов, и эти вещества определяют размер и направление роста неорганических кристаллов, придавая скелету необходимые механические характеристики (прочность, упругость) [41]. Обнаружен и изучен ряд органических молекул, участвующих в формировании кальциевых биоминералов, тем не менее у большинства из них есть одна общая характеристика – они содержат кислотные группы. Это связано с тем, что кислотные центры способны взаимодействовать с ионами кальция, а также с частицами карбоната кальция и гидроксиапатита и таким образом участвовать в их дальнейшей судьбе, будь то растворение, нуклеация, или транспорт. Далее мы подробнее рассмотрим конкретные органические соединения, обнаруженные в биоминералах.

Функции этих органических молекул в организмах недостаточно ясны. Исследования в этой области в большей степени сосредоточены на выделении органических веществ из природных объектов и изучении их взаимодействия с неорганическими соединениями в лабораторных условиях. Поэтому о функциях, которые

выполняют те или иные органические молекулы в ходе биоминерализации, на данный момент времени можно судить по их поведению *in vitro*.

### **Кальций-карбонатные биоминералы: органическая составляющая**

Органические матрицы раковин моллюсков содержат различные белки, которые участвуют в регуляции процесса биоминерализации карбоната кальция. Белок **Pif** (pearl-associated nacre protein) был впервые идентифицирован в 2009 году командой Suzuki и др. [42] в перламутровом слое раковины морского моллюска *Pinctada fucata*. Авторы показали, что он влияет на образование карбоната кальция, связываясь с кристаллами арагонита и регулируя их рост и ориентацию. Белок Pif имеет высокое содержание аспартатных остатков, а также содержит мотивы Gly-X-Asn (где X - любая аминокислота), которые способствуют формированию наночастиц карбоната кальция, потому что они образуют анионные домены. Мотивы **Gly-X-Asn** также могут стабилизировать неустойчивую форму карбоната кальция - аморфный карбонат кальция (АКК) и предотвращать его переход в более термодинамически устойчивые формы. Белок **Nacrein** охарактеризовали Miyamoto и др. в 1996 году [43], выделив его из перламутрового слоя раковины морского моллюска *Pinctada fucata* (как и **Pif**). Nacrein содержит два функциональных домена: карбоангидразу (фермент, катализирующий обратимую гидратацию  $\text{CO}_2$ ) и повторяющиеся фрагменты Gly-X-Asn (где X - аспарагиновая кислота, аспарагин или глутаминовая кислота). Предположительно, фрагменты Gly-X-Asn отвечают за связывание ионов кальция, а фрагменты карбоангидразы катализируют образование ионов  $\text{HCO}_3^-$ , участвующих в формировании раковины.

Органическая часть кокколита - составных частей экзоскелета кокколитофорид<sup>1</sup> - представлена нерастворимой пластиной, по краю которой растут кристаллы карбоната кальция, и растворимыми полисахаридами, участвующими в росте кристаллов. Marsh и соавторы выделили из кокколитофорид *Pleurochrysis carterae* полисахариды трех типов, названные PS-1, PS-2 и PS-3 [44]. Они определили структуру PS-2 (Рисунок 3), описав его как самый кислый из уже известных полианионов, ассоциированных с минералом [45]. Полисахарид PS-1 присутствовал в гораздо меньшем количестве, чем PS-2, был менее

---

<sup>1</sup> Кокколитофориды - морские одноклеточные водоросли, покрытые пластинками на основе карбоната кальция - кокколитами.

кислым и содержал глюкуроновую и галактуоновую кислоты и небольшое количество незаряженных гликозидных остатков. Полисахарид PS-3 составил всего 2% от общего количества полианионов и содержал большее количество серы. PS-1 и PS-2 синтезируются в аппарате Гольджи и в присутствии ионов кальция образуют частицы размерами около 25 нм. Такие частицы локализуются вокруг нерастворимой базовой пластины, и впоследствии трансформируются в твердые продукты, захватывая в массу полисахариды. В работе [46] описывается агрегация кальцийсодержащих частиц, наблюдаемая по краям нерастворимых органических пластинок кокколитофитов *Pleurochrysis haptonemofera*. Авторы показали, что основную роль в локализации агрегатов играет полисахарид PS-2, тогда как PS-1 и PS-3 могут ингибировать осаждение карбоната кальция.

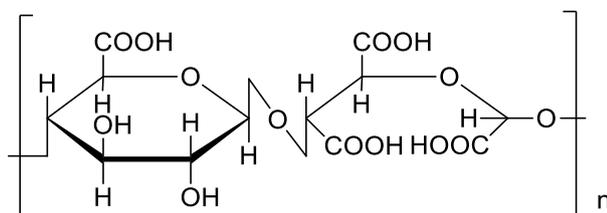


Рисунок 3 – Структура PS-2 [44]

В кокколитофоридах *Hymenomonas carterae* P. van der Wal и соавторами [47] обнаружены два полисахарида, связанные с ионами кальция. Из *Emiliania huxleyi* был выделен полисахарид, содержащий остатки галактуоновой кислоты и ксилозы в боковых цепях [48, 49]. Все эти полимеры содержат большое количество кислотных остатков, и предполагается, что именно они отвечают за транспорт  $\text{Ca}^{2+}$  к месту кальцификации.

Органический матрикс скелетов морских ежей и спикул их личинок представлен в основном белками и гликопротеинами [50]. Белки богаты кислотными группами [51]. Авторы [52] выделили органический матрикс из эмбрионов морского ежа, показали, что он состоит из гликопротеинов, богатых остатками аспарагина, глутамина, глицина, серина и аланина. Эти протеины способны связывать ионы кальция в количестве 2.4 иона кальция на моль протеина. Матрикс, описанный авторами [52], похож по составу на кислые белки и полисахариды, обнаруженные Weiner в минерализованных структурах двустворчатых моллюсков [53]. Краткая характеристика основных органических полимеров, обнаруженных в биоминералах на основе карбоната кальция, представлена в таблице 3.

Таблица 3 – Основные макромолекулы, обнаруженные в кальций-карбонатных биоминералах

Название	Состав	Предполагаемые функции и исследования <i>in vitro</i>	Организм	Источник
Pif, Asprich, N16, N19	Белки с высоким содержанием аспаргатовых и глутаминовых кислот	Образуют анионные домены и способствуют связыванию катионов кальция	Морской моллюск <i>Pinctada fucata</i>	[42, 54, 55]
Lustrin A, Nacrein, MSI60	Белки с высоким содержанием глицина и серина	Участвуют в формировании наночастиц карбоната кальция	Морской моллюск <i>Pinctada fucata</i>	[43, 56, 57]
Prisilkin 39, Perlucin, Pearlin	Белки с высоким содержанием цистеина	Образуют дисульфидные мостики и участвуют в стабилизации органической матрицы	Морской моллюск <i>Halotis laevigata</i>	[58, 59, 60]
Perlwapin, Periostracin	Белки с высоким содержанием пролина	Образуют коллагеноподобные структуры и участвуют в формировании перламутрового слоя раковины	Двустворчатый моллюск <i>Mytilus edulis</i> ; морской моллюск <i>Halotis laevigata</i>	[61, 62]
Aspein	Остатки аспарагиновой кислоты (60%), глицина (16%), серина (13%)	Связывает преимущественно Ca, чем Mg	Перламутровый слой раковины <i>Pinctada fucata</i>	[63]
Asprich 20-30 кДа	7 белков, содержат 57-68% кислотных остатков, в основном аспарагиновую кислоту	Иницирует и ускоряет рост кристаллов	Двустворчатый моллюск <i>Atrina rigida</i>	[64, 65]
Группа растворимых белков массой 30 кДа	Аспараниновая кислота (35%), глутаминовая кислота (15%), серин (до 24%), глицин (до 18%)	Вызывают осаждение арагонита, а не кальцита	Перламутровый слой раковины <i>Atrina rigida</i>	[66]
Nacrein 60 кДа	Домен карбоксиангидразы и домен Gly-Xaa-Asn (Xaa = Asp, Asn, или Glu)	Участвует в производстве $\text{CO}_3^{2-}$ в клетке, и связывает $\text{Ca}^{2+}$	Жемчуг <i>P. fucata</i>	[43]
N-, O-гликопротеины	Имеют пентасахарид в ядре (чаще – маноза), остатки сиаловых кислот	Способен связываться с $\text{Ca}^{2+}$	Спикула эмбриона морского ежа	[67]

Название	Состав	Предполагаемые функции и исследования <i>in vitro</i>	Организм	Источник
PS-1	Полисахарид содержит кислоты глюконовую и галактуроновую кислоты	Ингибирует осаждение CaCO <sub>3</sub>	Кокколиты <i>Pleurochrysis carterae</i>	[45]
PS-2	Полисахарид содержит остатки глюкуроновой, винной, гликоксиловой кислоты	Направляет кальций к месту осаждения		
PS-3	Полисахарид, богатый серой	Ингибирует осаждение CaCO <sub>3</sub>		

### Кальций-фосфатные биоминералы: органическая составляющая

Скелет позвоночных на 70% состоит из неорганического минерала – гидроксиапатита, 5-10% приходится на воду, 20-25% составляют органические вещества [24]. Органическая составляющая скелетов позвоночных представлена коллагеном типа I (85-90%) и неколлагеновыми белками (10-15%).

Коллаген типа I – это белок молекулярной массой около 300 кДа, представляющий собой спираль из трех цепей, две из которых одинаковы и называются альфа1, третья, отличная от них, называется альфа2. Всего описано 28 типов коллагена, отличающихся друг от друга аминокислотной последовательностью и степенью гидроксирования или гликозилирования. В органическом матриксе кости доминирует коллаген I типа, однако некоторые количества коллагена других типов могут встречаться на разных стадиях формирования кости [24]. Цепи характеризуются повторяющейся последовательностью аминокислот Gly-X-Y, где X – обычно пролин, Y – чаще гидроксипролин. Предполагается, что функция коллагена состоит в создании каркаса, на котором осаждается гидроксиапатит, а также в связывании других белков, управляющих осаждением.

Неколлагеновые белки кости — это группа белков, которые не входят в состав коллагеновых волокон, но связаны с ними и с минеральными компонентами костной ткани. Они синтезируются остеобластами (молодые клетки кости, участвующие в ее росте) и остеоцитами (osteoblastы, замурованные в межклеточном веществе кости). Неколлагеновые белки кости включают гликопротеиды и гликофосфопротеиды, описанные в таблице 4, а основными их представителями являются:

- а. Остеокальцин — белок, который содержит три остатка гамма-карбоксихлутамата и способен связывать кальций. Он прочно ассоциирован с апатитом и участвует в росте кристаллов.
- б. Костный сиалопротеин — белок, который содержит трипептид аргинин-глицин-аспарагиновая кислота (R-G-D), который способен связываться с другими клетками, макромолекулами и рецепторами клеточных мембран.
- в. Костный кислый гликопротеин — белок, который участвует в минерализации костной ткани.
- г. Остеопонтин — белок, который также содержит трипептид R-G-D и связывается с кальцием. Он прочно ассоциирован с апатитом и участвует в регуляции ремоделирования костной ткани.
- д. Остеонектин — белок, богатый цистеином, имеет кальций-связывающий домен, хотя в нем нет гамма-карбоксихлутамата. Он связывается с коллагеном и апатитом и участвует в минерализации костной ткани.
- е. Тромбоспондин — белок, который, как и костный сиалопротеин, содержит трипептид R-G-D и связывается с поверхностями клеток и другими белками костной ткани.

Таблица 4 – Макромолекулы, обнаруженные в кальций-фосфатных биоминералах

Название	Основные составляющие	Предполагаемые функции и исследования <i>in vitro</i>	Источник
Белки сыворотки			
$\alpha_2$ -HS-гликопротеин	Последовательности Ala-Ala (Ala - аланин) и Pro-Pro (Pro – пролин). Содержит дисульфидные связи, цистеиновый домен и олигосахариды	Ингибирует кальцификацию	[68, 69]
Протеогликаны – макромолекулы, содержащие кислые полисахаридные боковые цепи, связанные с центральным белковым ядром			
Версикан, 1000 кДа	Последовательности Gly-Ala-Gly	Компонент внеклеточного матрикса, участвует в клеточной адгезии и пролиферации	[70]
Декорин, 90 – 140 кДа	Содержит повторяющиеся остатки лейцина, боковые цепи: хондроитин сульфат и дерматансульфат	Связывается с коллагеновыми фибриллами	[71]
Эпификан, 46 кДа	Содержит повторяющиеся остатки лейцина, боковые цепи –остатки цистеина	Может играть роль в оптимизации диаметра коллагеновых фибрилл, может отсрочить начало кальцификации	[72, 73]

Название	Основные составляющие	Предполагаемые функции и исследования <i>in vitro</i>	Источник
<b>Гликолизированные белки</b>			
Щелочная фосфатаза, 86 кДа	Содержит остатки глутаминовой кислоты, аспарагиновой кислоты, фенилаланина	Имеет центры связывания для цинка, магния и кальция. Потенциальный переносчик $Ca^{2+}$ , гидролизует ингибиторы кальцификации, такие как пирофосфат, увеличивает локальную концентрацию фосфатов	[74]
Остеонектин, 40 кДа	Содержит остатки цистеина, аспарагиновой кислоты, глутаминовой кислоты, тирозина	Имеет сродство к коллагену и гидроксиапатиту. Предполагается, что имеет отношение к образованию зародышевых кристаллов гидроксиапатита	[75, 76]
<b>Белки, связывающиеся с поверхностью клеток</b>			
Остеопонтин	Содержит мотив RGD (аргинин-глицин-аспарагин)	Участвует в связывании клеток с гидроксиапатитом во внеклеточном пространстве	[77]
<b>Белки, содержащие карбоксиглутаминовую кислоту</b>			
Остеокальцин, 5 кДа	Содержит остатки карбоксиглутаминовой кислоты, дисульфидные связи	Ингибирует минерализацию. Может регулировать активность остеокластов, управлять растворением минерала	[75]
Аннексин V	Содержит остатки глутаминовой, аспарагиновой кислот, аргинина	Управляет осаждением минерала. Может связываться с коллагеном, участвовать в переносе ионов $Ca^{2+}$	[78-81]

### 1.3 Образование фосфата и карбоната кальция в водной среде

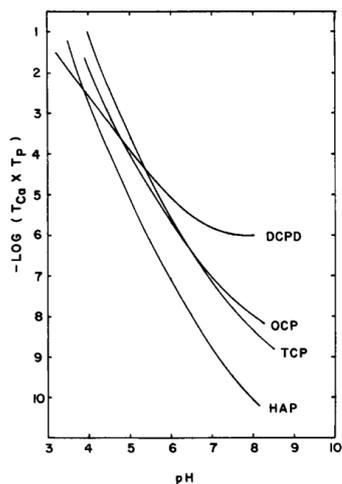
Фосфат и карбонат являются анионами ортофосфорной и угольной кислот соответственно, которые в воде подвергаются ступенчатой диссоциации. Степень диссоциации определяет соотношение между формами аниона, и следовательно – количество формы, способной активно взаимодействовать с катионами кальция. При 25°C в воде существует равновесие между разными формами фосфат-иона [82, 83] и карбонат-иона. Используя уравнение Гендерсона-Хассельбаха [84] и исходя из констант диссоциации (Таблица 5), можно оценить доли разных анионов в зависимости от pH среды.

Таблица 5 – Константы диссоциации ортофосфорной и угольной кислот

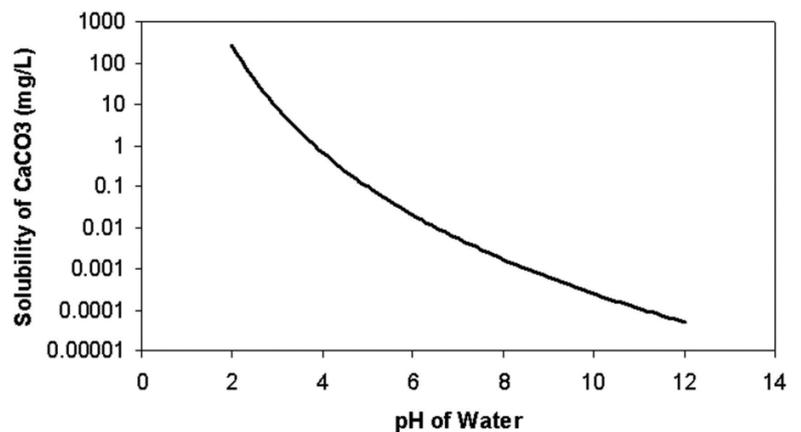
Уравнение	K	pK <sub>a</sub>	Источник
$H_3PO_4 \rightleftharpoons H_2PO_4^- + H^+$	$7.6 \times 10^{-3}$	2.1	[85-87]

Уравнение	K	pK <sub>α</sub>	Источник
$\text{H}_2\text{PO}_4^- \rightleftharpoons \text{HPO}_4^{2-} + \text{H}^+$	$6.2 \times 10^{-8}$	7.2	[88]
$\text{HPO}_4^{2-} \rightleftharpoons \text{PO}_4^{3-} + \text{H}^+$	$4.3 \times 10^{-13}$	12.4	[82]
$\text{CO}_2 \cdot \text{H}_2\text{O} \rightleftharpoons \text{HCO}_3^- + \text{H}^+$	$4.5 \times 10^{-7}$	6.4	[89]
$\text{HCO}_3^- \rightleftharpoons \text{CO}_3^{2-} + \text{H}^+$	$4.8 \times 10^{-11}$	10.3	

При физиологическом рН 7.4 в водном растворе в примерно одинаковом количестве находятся формы  $\text{HPO}_4^{2-}$  и  $\text{H}_2\text{PO}_4^-$ , способные взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$ . Ввиду существования такого равновесия изменения рН вызывают изменения относительных концентраций форм фосфат-ионов, что в свою очередь вызывает изменения в составе и характеристиках продукта осаждения [22]. Так, например, в более кислой среде образуются фосфаты кальция с  $\text{Ca/P} = 0.5$  и большей растворимостью. Напротив, в основной среде соотношение  $\text{Ca/P}$  увеличивается до 1.67, и растворимость продуктов осаждения значительно снижается. В зависимости от рН среды можно получать фосфаты кальция различного состава [22]. В случае с карбонатом при взаимодействии с  $\text{Ca}^{2+}$  в зависимости от рН среды возможно образование двух форм –  $\text{CaCO}_3$  и  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ , однако из водных растворов осаждается только карбонат кальция. Гидрокарбонат кальция существует только в растворах и при нагревании он разлагается, образуя карбонат кальция. Растворимость карбоната и фосфатов кальция ухудшается с ростом рН (Рисунок 4) [90, 91].



А



Б

Рисунок 4 – Растворимость фосфатов (А) [90] и карбоната кальция (Б) [91] в зависимости от рН. Обозначения на А:  $T_{\text{Ca}}$  и  $T_{\text{P}}$  – общие молярные концентрации кальция и фосфора, соответственно

## Теории кристаллизации

Формирование новой фазы, в нашем случае – твердого кристалла, начинается с образования зародышей, и, пожалуй, эта стадия является самой плохо изученной на данный момент времени. Случайность процесса зародышеобразования (нуклеации) затрудняет его описание, хотя в последние десятилетия опубликовано множество работ, направленных на теоретическое моделирование и экспериментальную проверку теорий [92].

Стандартом для описания нуклеации является классическая теория нуклеации (classical nucleation theory, CNT). Классический механизм кристаллизации описывает формирование кристалла в гомогенном растворе через взаимодействие ионов, которые формируют первичные частицы – кластеры [93]. Такие кластеры могут расти или распадаться, в зависимости от соотношения поверхностной энергии образовавшейся поверхности и энергией, полученной при формировании кристаллической решетки (КР). Кластеры со временем достигают такого размера, при котором вышеупомянутые энергии уравниваются. Когда энергия образования КР компенсирует потерю поверхностной энергии, дальнейший рост частиц становится выгодным. Данный размер называется критическим размером зародыша. Далее со временем путем присоединения **ионов** из раствора образуются первичные наночастицы, которые растут, в результате образуя монокристалл. Кристаллообразование может происходить в объеме раствора (считается гомогенным) или же на границе раздела разных фаз – стенка сосуда, пыль или формирующийся кристалл (и считается гетерогенным) [92]. Зародышеобразование – процесс случайный, зародыши спонтанно возникают и распадаются до тех пор, пока какой-нибудь из них не образуется настолько большим, что расти дальше будет энергетически выгодней, чем распаться. Спонтанность процесса (или же упорядоченность, которую мы пока что не понимаем) приводит к тому, что в двух параллельных опытах нуклеация может происходить в разное время.

Классическая теория гомогенной нуклеации может давать относительно точные предсказания по времени и скорости роста кристаллов, а также позволяет вычислить критический размер зародышей, однако она не может с той же точностью прогнозировать параметры гетерогенной нуклеации, а также кристаллизации сложных молекул из раствора, а именно это и происходит при формировании биоминералов. Изучение

биоминералов и кристаллизации карбоната и фосфата кальция в лабораторных условиях привело к обнаружению переходных аморфных фаз [1, 94-96], которые могли впоследствии трансформироваться в более стабильные кристаллические полиморфы. Этот факт не соответствовал классической теории нуклеации, согласно которой образующаяся фаза имеет ту же кристаллическую решетку, что и конечный кристалл. Назрела необходимость теории, в которой главная роль была бы отведена переходным формам.

В течение последних десятилетий активно изучается и обсуждается неклассический механизм биоминерализации, где промежуточным звеном между ионами и кристаллами считаются частицы малостабильных аморфных фаз, не обладающие кристаллической структурой. Такие частицы представляют собой более концентрированный материал, чем раствор солей, и ввиду своей мобильности (в отличие от кристаллов) могут транспортироваться организмом к месту непосредственного образования скелета. В отличие от классического механизма, здесь рост происходит за счет направленного присоединения **наночастиц** к поверхности кристалла. Наночастицы имеют высокую энергию поверхности, и их слияние термодинамически выгодно. Ориентированное присоединение происходит за счет слияния двух поверхностей с наивысшей энергией. Такой механизм предполагает образование бездефектного монокристалла. Образование наночастиц и формирование твердого материала может быть разделено в пространстве, что устраняет необходимость наличия повышенной концентрации и определенных условий в месте осаждения.

### **Аморфные формы карбоната и фосфата кальция**

Критерий, по которому аморфную фазу отличают от кристаллической – это отсутствие дифракционной картины. Аморфными формами называют такие, которые не дают дифракционной картины кристалла [97]. Аморфные формы малостабильны по сравнению с кристаллическими, и в свое время это вызывало трудности в их обнаружении и характеристике [97, 98].

Хотя сами по себе аморфные фазы карбоната и фосфата кальция обнаружены еще во второй половине 20 века [99, 100], именно результаты работ Dey [101], Wang [102], Gebauer [103], Pouget [104] и соавторов продемонстрировали наличие предзародышевых

кластеров карбоната и фосфата кальция в пересыщенных растворах и подтвердили возможность альтернативного механизма кристаллизации с участием переходных фаз.

В случае с карбонатом кальция существование предзародышевых кластеров подтверждено в 2008 году командой Gebauer и др. [103]. Авторы работы измеряли концентрацию ионов кальция в растворе, содержащем хлорид кальция и карбонат натрия, и судили о начале нуклеации по резкому падению концентрации кальция. В растворе, пересыщенном относительно  $\text{CaCO}_3$ , на стадии, предшествующей нуклеации, они зафиксировали кластеры размерами в диапазоне 2-6 нм. Изменение начального pH в диапазоне 9-10 приводило к изменению относительной концентрации гидрокарбонат-ионов, и в случае ее повышения приводило к ускорению зародышеобразования во времени. Следом за ними, в 2009 году, Rouget и др. [104] методом криоэлектронной микроскопии наблюдали наличие кластеров 0.6-1.1 нм наряду с фракцией частиц размером 4 нм в свежеприготовленном 9 мМ растворе  $\text{Ca}(\text{HCO}_3)_2$ . По прошествии от 2 до 6 минут после начала эксперимента, авторы наблюдали частицы размерами около 30 нм. Дальнейшая агрегация приводит к частицам размерами до 500 нм, не имеющих кристаллической структуры [100]. Эти частицы представляют собой самый нестабильный из всех полиморфов  $\text{CaCO}_3$  - аморфный карбонат кальция (АКК). АКК, полученный в лаборатории, в водном растворе быстро трансформируется путем растворения-пересадения в более стабильные кристаллические формы – арагонит, ватерит или кальцит, или смеси этих форм. Температура, pH среды, присутствие иных ионов или молекул оказывают влияние на стабильность АКК и кристаллическую структуру конечного продукта [104].

Аморфная форма фосфата кальция (АФК) впервые наблюдалась при осаждении гидроксиапатита из пересыщенных растворов при pH 10.5 [99] и по истечении нескольких часов (6-7 часов) трансформировалась в плохо закристаллизованный гидроксиапатит. Позднее АФК наблюдали в нейтральных растворах [105, 106]. Отношение Ca/P в некристаллической форме было близко к 1.5. Десятилетие спустя Posner [107], основываясь на примерных размерах атомов, предложил формулу структурного звена АФК – предзародышевого кластера, который в настоящее время известен как кластер Познера (Рисунок 5). Кластер Познера имеет размеры 0.9-1.0 нм, формулу  $\text{Ca}_9(\text{PO}_4)_6$ , соотношение  $\text{Ca/P} = 1.5$  и окружен 3-5 молекулами воды. Первой работой, где авторы подтвердили существование кластеров Познера, была работа Deu и др. [101] в 2010 году.

Авторы наблюдали за осаждением на монослое арахидиновой кислоты (предельная карбоновая кислота,  $C_{19}H_{39}COOH$ ) в жидкости, моделирующей по составу плазму крови человека, и показали, что образование кристалла фосфата кальция начинается с формирования предзародышевых кластеров размерами 0.87 нм, что близко к размерам кластера Познера. Предзародышевые кластеры уплотняются на поверхности монослоя, со временем образуя аморфные частицы размерами 50-80 нм, которые в конечном итоге трансформируются в гидроксиапатит. Wang и др. [102] представили доказательства существования кластеров фосфата кальция, близких по размерам к кластерам Познера, на поверхности кальцита, погруженного в фосфатсодержащий раствор.

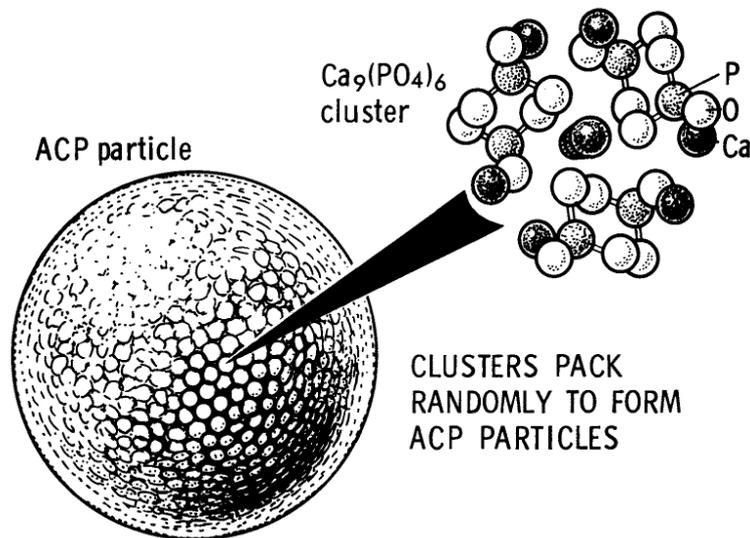


Рисунок 5 – Структура кластера Познера [107]

Определение характеристик АКК и АФК, например растворимости, является нетривиальной задачей, ввиду малых размеров частиц, их нестабильности и изменением состава в процессе созревания, а также влияния на свойства частиц состава окружающей среды [108].

Основная часть работ по получению АКК в водной среде для изучения его характеристик проводится при рН 9-12. Это связано с тем, что при рН <9 доля карбонат-ионов в растворе мала, и почти пропадает при рН 8.5, уступая место гидрокарбонат-ионам [109], а при более низких рН (рН <7) карбонат кальция в значимой степени растворяется. Повышение рН раствора увеличивает концентрацию карбонат-ионов, и это способствует большему связыванию ионов кальция, показывают авторы [103]. Так, около 35% добавленных ионов кальция связываются при рН = 9 (~4% карбонат-ионов), тогда как

~75% добавленных ионов кальция связываются при  $\text{pH} = 10$  (~25% карбонат-ионов). Это показывает, что концентрация карбонат-ионов влияет на связывание  $\text{Ca}^{2+}$  и образование кластеров  $\text{CaCO}_3$ . Авторы работы [110] показали, что осаждение при  $\text{pH} 12.7$  приводит к АКК, стабильному в течение 6 минут, тогда как при  $\text{pH} 10.5$  частицы АКК не обнаруживаются уже после первой минуты после начала реакции. Частицы АКК, полученные из насыщенного раствора осаждением этанолом, были более стабильны при  $\text{pH}$  исходного раствора 9.8, чем при  $\text{pH} 8.8$  [111].

Кроме  $\text{pH}$ , температура оказывает влияние на скорость трансформации АКК в более стабильные формы карбоната кальция. С ростом температуры растворимость частиц АКК уменьшается [112]. Авторы работы [113] получали АКК смешением растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  в диапазоне температур  $14\text{-}80^\circ\text{C}$  и наблюдали за его трансформацией в арагонит, ватерит и в более стабильную форму кальцита. Они обнаружили, что с нагреванием время, необходимое для трансформации АКК в метастабильные арагонит и ватерит уменьшается с 10 минут при  $14^\circ\text{C}$  до 1 минуты при  $80^\circ\text{C}$ . Температура также влияла на полиморфизм кристаллов: кристаллы ватерита получали при  $<40^\circ\text{C}$ , арагонита при  $>50^\circ\text{C}$  [113].

Эксперименты по влиянию соотношения  $\text{Ca}/\text{C}$  проводят при высоком  $\text{pH}$  ( $>10$ ), где большая часть карбонат-ионов существует в форме  $\text{CO}_3^{2-}$ . Максимальная скорость роста кристаллов карбоната кальция наблюдается при эквивалентном соотношении  $\text{Ca}^{2+}:\text{CO}_3^{2-}$ , а при избытке одного из компонентов кристаллы растут медленнее, вместе с тем изменяется их форма. Так, при избытке карбонат-ионов у кристаллов кальцита наблюдается появление закругленных краев, а при избытке  $\text{Ca}^{2+}$  - рваных. Авторы [114] связывают изменение форм с адсорбцией избыточных ионов на поверхностях кристаллов, что препятствует нормальному их росту. Недостаток  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к большему падению скорости, чем недостаток  $\text{CO}_3^{2-}$ . О несимметричном падении скорости при нестехиометрическом соотношении  $\text{Ca}/\text{C}$  докладывали и авторы работы [115].

Для изучения свойств частиц аморфного фосфата кальция (АФК) его трансформацию в более стабильные формы (например, гидроксиапатит) обычно тормозят повышением  $\text{pH}$  среды от 9 и выше [116, 117, 118], а также добавлением ионов магния [119, 120]. В работе [121] описывается кинетика превращения АФК в гидроксиапатит при  $\text{pH} 10\text{-}11$ . Авторы показали, что образование АФК при смешивании растворов  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  происходит очень быстро, а последующий переход в гидроксиапатит в

зависимости от температуры среды происходит от 24 часов при 25°C до 10 минут при 60°C. Причем сперва АФК трансформируется в гидроксиапатит, имеющий отношение Са/Р меньше стандартного для него 1.67:  $\text{Ca}_{10-z}(\text{HPO}_4)_z(\text{PO}_4)_{6-z}(\text{OH})_{2-z} \cdot n\text{H}_2\text{O}$ , а также имеющий примесь фосфата кальция формулой  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ . Добавление ионов магния и/или цитрат-ионов позволяет получать стабильный АФК при рН 6.0-6.5 [122].

Авторы работы [123] охватили широкий диапазон начальных значений рН и Са/Р, изучая как условия осаждения влияют на состав осадков. Они показали, что размер частиц, образующихся в течение 5 минут реакции, увеличивался с 0.9 нм до 6.3 нм при увеличении Са/Р с 0.2 до 5.0 соответственно. Вместе с тем росла скорость трансформации аморфной фазы в кристаллические. При низких Са/Р образовывался гидроксиапатит, при высоких - смесь гидроксиапатита и брушита ( $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ ). Авторы отмечают, что скорость кристаллизации максимальна при эквимольном соотношении Са/Р, и в контексте изучения свойств аморфной фазы можно использовать недостаток ионов кальция для предотвращения кристаллизации. В области физиологических рН 6-7 и при Са/Р = 0.2 АФК трансформировался в гидроксиапатит без следов брушита. В области рН 10-11, где большая часть фосфат-ионов существует в виде  $\text{HPO}_4^{2-}$ , АФК более стабилен и медленнее превращается в гидроксиапатит. Одним из выводов работы является то, что для стабилизации аморфной фазы, кроме повышения рН до значений, выходящих за физиологическую область, можно уменьшать соотношение Са/Р.

Формирование кристаллов – сложный процесс, включающий определенные стадии, на каждой из которых параметры окружающей среды могут влиять на характеристики конечного продукта. В биологических средах присутствует множество органических и неорганических соединений, которые вносят свой вклад в образование биогенных минералов. В связи с этим важно иметь представление о стадиях образования и роста кристаллов и о том, каким образом изменение условий среды скажется на этих процессах.

#### **1.4 Образование биоминералов на основе фосфата и карбоната кальция в организмах**

Несмотря на то, что предполагаемые и наблюдаемые механизмы могут отличаться у разных животных, можно представить следующую общую схему формирования биоминерала:

поглощение ионов → транспорт ионов/частиц к месту осаждения → осаждение.

### 1.4.1 Поглощение ионов из окружающей среды

Источником строительных блоков – ионов кальция, карбоната и фосфата – для живых организмов является среда обитания. Основным источником ионов кальция и карбоната для морских кальцифицирующих организмов является морская вода. В ее составе доминируют ионы натрия (10.5 г/кг – 0.46 М), хлорид (19 г/кг – 0.54 М), и в гораздо меньших количествах присутствуют магний (0.05 М), кальций (0.4 г/кг – 0.01 М) и бикарбонат (0.14 г/кг – 0.002 М) (Таблица 6) [11]. В зависимости от солености, содержание кальция в морской воде достигает 10 мМ. Общая концентрация растворенных неорганических форм углерода -  $\text{CO}_2$ ,  $\text{H}_2\text{CO}_3$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$  - в морской воде достигает 5 мМ. Концентрация карбонат-ионов для вод с рН 8.2 составляет около 0.3 мМ или 6% от общей концентрации растворимых неорганических форм углерода, основная часть углерода в таких условиях существует в виде  $\text{HCO}_3^-$ . Растворимость  $\text{CaCO}_3$  – 0.013 г/л или 0.13 мМ, получается, что морская вода насыщена по отношению к карбонату кальция, но его осаждению препятствуют другие молекулы и ионы в воде, например,  $\text{Mg}^{2+}$ , фосфаты. В пресной воде содержание упомянутых ионов значительно меньше (Таблица 6). Учитывая тот факт, что кальций-карбонатные экзоскелеты морских и пресноводных организмов имеют очень небольшой процент примесей магния [124, 125], возникает вопрос: каким образом организм селективно поглощает необходимые ему ионы, а также как он отличает ионы кальция от схожих по своей природе ионов магния?

Таблица 6 – Сопоставление концентраций ионов в морской и пресной воде

Ион	Концентрация, мМ	
	Морская вода [11]	Пресная вода (на примере оз. Байкал) [126]
$\text{HCO}_3^{2-}$	2	1.1
$\text{Cl}^-$	540	0.01
$\text{Ca}^{2+}$	10	0.4
$\text{Na}^+$	460	0.15
$\text{Mg}^{2+}$	50	0.12

Способы поглощения необходимых ионов у одноклеточных организмов можно обобщить в таком виде:

- а. эндоцитоз – поглощение веществ клеткой путем образования везикул;

- б. активный транспорт через мембрану – поглощение вещества из области низкой его концентрации в область высокой концентрации, необходимы затраты энергии организма;
- в. пассивный транспорт через мембрану - поглощение вещества из области высокой его концентрации в область низкой концентрации внутри клетки.

Активный и пассивный транспорт могут осуществляться с участием специальных молекул, связывающих транспортируемое вещество и осуществляющих его перенос через клеточную мембрану – белков-переносчиков. В кальцифицирующих организмах в отношении ионов кальция и карбонат-ионов реализуются разные пути поглощения.

### **Кальций-карбонатные организмы**

Фораминиферы являются наиболее распространенной группой кальцифицирующих организмов, и в зависимости от вида могут производить кальцит как с низким (1-20 мМ Mg на 1 моль Ca) [127], так и с высоким (100-150 мМ Mg на 1 моль Ca) содержанием магния. Ионы магния препятствуют осаждению карбоната кальция (они связывают карбонат-ионы, а также замещают кальций в кристаллах  $\text{CaCO}_3$  и повышают их растворимость), предполагается, что фораминиферы управляют концентрацией магния в ходе кальцификации [128].

Zeebe и Sanyal изучали при каких значениях pH и концентрации ионов магния скорость образования кальцита *in vitro* будет сопоставимой со скоростью образования биогенного кальцита фораминиферами [129]. Концентрация ионов кальция была 10 мМ, а концентрация магния изменялась от 0 до 53 мМ, что типично для морской воды. При полном отсутствии ионов магния требуемая скорость кальцификации достигается уже при pH 8.2, что соответствует pH морской воды. Авторы обнаружили, что с повышением содержания магния образование кальцита с требуемой скоростью начинается при больших значениях pH: pH 8.5 для 13 ммоль магния, pH 9.95 для 54 ммоль магния; кальцификация также сопровождается небольшим понижением pH. Вместе с этим с ростом концентрации магния растет концентрация карбонат-ионов, необходимая для требуемой скорости образования кальцита. Авторы предположили, что фораминиферы могут инициировать кальцификацию путем удаления ионов магния и протонов. По их расчетам, стратегия с удалением протонов из среды кальцификации энергетически более выгодна, чем удаление  $\text{Mg}^{2+}$ , что подразумевает, что фораминиферы могут использовать

стратегию повышения рН в области кальцификации для осаждения кальцита в присутствии ионов магния.

В 2009 году Ventov и др. исследовали процесс кальцификации у фораминифер, предварительно декальцинировав их и поместив на стеклянные подложки [130]. Авторы обнаружили, что в цитоплазме вблизи области кальцификации присутствует множество вакуолей размерами как менее 1 мкм, так и десятки микрон. Используя флуоресцентный декстран, не проходящий через клеточные мембраны, авторы показали, что появление этих вакуолей является результатом эндоцитоза окружающей воды. Флуоресцентный рН-зонд показал, что в течение 30 минут рН в вакуолях повышается примерно на 0.5 единиц от рН окружающей воды. Авторы предположили, что этими же вакуолями доставляется и карбонат-ион для кальцификации, т.к. повышение рН ведет к: а) относительному повышению концентрации  $\text{CO}_3^{2-}$ ; б) диффузии растворенного в относительно нейтральной цитоплазме (рН 7.2-7.5)  $\text{CO}_2$  в щелочную вакуоль, что еще больше увеличит количество карбонат-ионов.

Кроме фораминифер, еще одним из объектов изучения биоминерализации стали одноклеточные водоросли кокколитофориды. Это распространенная группа морских фотосинтезирующих водорослей. Они образуют на поверхности своих клеток пластинки из карбоната кальция – кокколиты, которые вероятно могут служить защитой от хищных видов. Процесс минерализации, в ходе которого кокколитофорами используется углерод из окружающей среды, оказывает влияние на глобальный цикл углерода, а сами пластинки - кокколиты – входят в состав донных отложений и используются для определения возраста пород. Кокколиты состоят из основания – органической пластинки, по краю которой находятся кристаллы карбоната кальция. Кокколиты формируются внутри клетки при участии аппарата Гольджи, а затем вытесняются на ее поверхность, образуя коккосферу. Размеры коккосфер варьируются от 3 до 30 мкм, а количество кокколитовых пластинок в одной коккосфере – от 6 до нескольких сотен, которые могут быть уложены в несколько рядов (Рисунок 6).

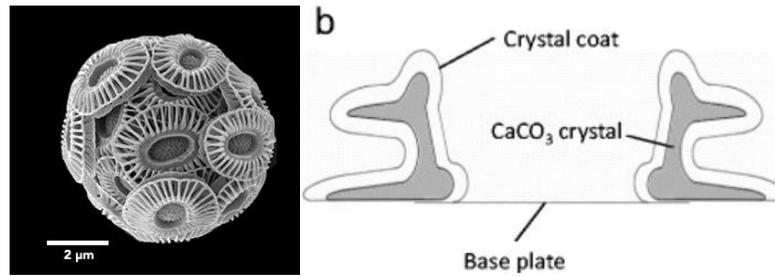


Рисунок 6 – Схематический рисунок кокколита *Pleurochrysis haptonemofera* в разрезе [46]

Формирование кокколита происходит в везикулах аппарата Гольджи, так называемых кокколитовых везикулах, и начинается с образования органического основания (base plate) – богатый глюкозой полимер, предположительно целлюлоза. Карбонат кальция формируется по краю основания и по завершению процесса вытесняется на поверхность клетки. Органические вещества тонким слоем покрывают сформировавшийся кокколит. Предполагается, что ионы кальция доставляются к месту кальцификации совместно с полисахаридами, необычно богатыми кислотными остатками [45]. Причем, эти макромолекулы не являются универсальными для всех видов кокколитофорид, и отличаются структурой. Далее рассмотрим эти полимеры более подробно.

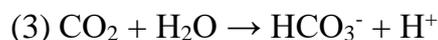
Поглощение карбоната кокколитофоридами тесно связано с фотосинтезом. Реакцию осаждения карбоната кальция можно записать так:



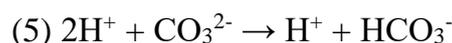
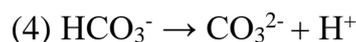
В воде в большей концентрации, чем  $\text{CO}_3^{2-}$ , присутствуют ионы  $\text{HCO}_3^-$ , тогда реакция будет выглядеть так:



Поглощение  $\text{CO}_2$  водой происходит следующим образом:



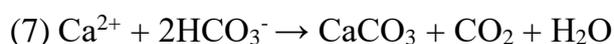
Гидрокарбонат-ион может депротонироваться:



Суммируя (3) и (5), получим:



В присутствии кальция реакция будет выглядеть так:



Получается, что при образовании кокколитов потребляется карбонат и в то же время увеличивается содержание  $\text{CO}_2$  в организме. Образовавшийся в ходе кальцификации  $\text{CO}_2$  может использоваться для фотосинтеза, дополняя  $\text{CO}_2$ , полученный из внешней среды [131].

Интересно, что ингибирование кальцификации путем добавления НЕВР (оксиэтилидендифосфоновая кислота, ингибитор минерализации [132]) в среду не вызывает значительного ингибирования клеточного роста [133]. Авторы отмечают, что кислые полисахариды, участвующие в формировании кокколитов, вырабатывались клетками как контроля, так и опытными, однако опытные клетки формировали незавершенные кокколиты или не формировали их вовсе.

Авторы [131] показали, что основная часть углерода входит в клетки кокколитофорид *C. huxleyi* в виде  $\text{HCO}_3^-$ . Соотношение между  $\text{CO}_2$  и карбонат- и гидрокарбонат-ионами регулируется ферментом карбоангдиразой (КА). Исследование участия КА показало, что ингибирование КА тормозит кальцификацию и фотосинтез в клетках. Подобные наблюдения описаны и в работе [134]: фиксация углерода у кокколитофорид может быть подавлена ингибитором КА. В то же время добавление КА в среду к клеткам привело к значительному (на треть) усилению фотосинтеза и никак не повлияло на кальцификацию. И первое, и второе исследования показывают, что активность КА в клетках низка, и по-видимому, КА не оказывает значительного эффекта на кальцификацию.

Установлено, что личинки морского ежа получают кальций, необходимый для построения скелета, путем эндоцитоза морской воды. Авторы работы [135] добавляли в среду с личинками морских ежей красители – кальцеин и декстран, которые имеют большие размеры и не проходят через клеточные мембраны, и одновременно с этим блокировали кальциевые каналы. Блокирование активности кальциевых L-каналов предотвращало образование нормальных спикул, но в то же время не препятствовало образованию небольших минеральных отложений в сердцевине спикул. Добавление водорастворимых веществ, непроницаемых для клеточных мембран, таких как флуоресцентный краситель кальцеин, привело к появлению флуоресценции у эпителиальных клеток, а также у растущей спикулы [135, 136]. Тем же образом получают основную часть кальция и фораминиферы [130]. Предположение о том, что личинки морского ежа могут использовать  $\text{CO}_2$  в качестве источников  $\text{HCO}_3^-$  с участием

карбоангидразы, нашло подтверждение в работах [137, 138]. Интересно, что в фораминиферах такого пути накопления карбоната не обнаружено [139].

### **Кальций-фосфатные организмы**

Источниками строительных материалов для костной минерализации являются пища и вода. Поглощение фосфат-ионов и ионов кальция, необходимых для построения костей, происходит в желудочно-кишечном тракте, откуда кальций попадает во внеклеточную жидкость и далее используется для минерализации [140]. 99% кальция присутствует в виде гидроксиапатита, остальное – в крови и жидкостях организма. Около 50% кальция в крови связаны с противоионами, включая фосфаты, и белками. Общая концентрация кальция в крови составляет 2-2.6 мМ. Большая часть фосфора в организме находится в виде костного гидроксиапатита, а около 15% распределены в фосфопротеинах, фосфолипидах и нуклеиновых кислотах. В крови фосфор существует в виде фосфат-ионов в концентрациях 0.8-1.5 мМ.

Жидкости организма – кровь, слюна – перенасыщены относительно гидроксиапатита, и спонтанное осаждение предотвращается присутствием ингибиторов минерализации – других ионов и органических молекул. Кровь содержит такие ингибиторы минерализации, как фетуин-А и матричный Gla-протеин.

Матричный Gla-протеин – белок молекулярной массой 14 кДа, изначально выделенный из деминерализованной кости [141]. Именно наличие Gla-остатков с двумя боковыми карбоксильными группами делает возможным связывание ионов кальция и предотвращение осаждения гидроксиапатита, а в случае их отсутствия возникает риск кальцификации сосудов [142]. Фетуин-А – гликопротеин, богатый кислотными остатками, образует с кальцием и фосфатом коллоидные частицы размерами 30-150 нм, называемые «calciprotein particles» [143].

## **1.4.2 Транспорт строительных материалов внутри организма**

### **Кальций-карбонатные организмы**

Разные организмы используют разные стратегии для доставки ионов к месту кальцификации. Эмбрион морского ежа стали первым организмом, для которого получены доказательства того, что АКК является переходной стадией в образовании кристаллов кальцита [94]. Авторы наблюдали, что растущая спикула представляла собой смесь кальцита и АКК, а во время созревания – только кальцит. АСС может доставляться

к месту кальцификации в виде везикул, о чем свидетельствует обнаружение сфер 0.5-1.5 мкм [136] в спиккулообразующих клетках эмбрионов – РМС (primary mesenchymal cells). Эти сферы имеют аморфную структуру и богаты кальцием.

Авторы [144] использовали рентгеновскую микроскопию для наблюдения за личинками морского ежа. Они обнаружили в клетках сферические тела, богатые кальцием размером 100-500 нм. При помощи рентгеновской спектроскопии они определили три фазы, присутствующие в этих частицах как АКК·Н<sub>2</sub>О, АКК и кальцит, причем аморфные фазы составляли большую часть. Авторы оценили концентрацию кальция в частицах, которая составила от 1 до 15 М, в среднем 4-7 М. Эти значения значительно превышают концентрацию кальция в морской воде, в то же время они меньше, чем концентрация кальция в кальците (27 М) и безводном АКК (19 М). Объяснением этому может быть сосуществование безводного АКК с АКК·Н<sub>2</sub>О.

У кокколитофорид транспорт ионов внутри организма осуществляется, по-видимому, пузырьками аппарата Гольджи размерами около 20 нм. Полисахариды и ионы кальция находятся в этих пузырьках [145, 146, 147] и на снимках СЭМ они выглядят электронно-плотными. Outka и Williams назвали эти пузырьки **кокколитосомами** [47, 148]. Кокколитосомы были обнаружены у водорослей *Hymanomonas carterae* [47, 148], а также у *Pleurochrysis carterae* [133, 146]. Концентрация ионов кальция в кокколитосомах оценивается в 6 М [45, 47]. Концентрация кальция в цитоплазме клеток поддерживается на низком уровне, около 100 нМ [12, 13, 14], что накладывает ограничение на прямой транспорт кальция через цитоплазму. Показано, что кокколитосомы сливаются с кокколитовой везикулой, в которой формируется новая кальцитовая пластинка [148]. Однако работа van der Wal и др., 1983 [47] показала, что кокколитосомы исчезают в самом начале кальцификации. Не известно, в какой форме находится кальций внутри кокколитосомы. Доказательств присутствия аморфной фазы на какой-либо стадии образования кокколита нет. Авторы работы [149] при использовании электронной микроскопии наблюдали в клетках *E. huxleyi* сферы размерами около 1 мкм, которые содержали большое количество кальция (10 М) и фосфора. По данным XRD, количество фосфора в сферах превышает количество кальция в 2 и более раз, и это позволяет предположить, что кальций в сферах связан с богатыми фосфором макромолекулами. Авторы полагают, что, поскольку содержание фосфора в сферах превышает количество

углерода, это могут быть не фосфорилированные биополимеры, а полифосфаты, которые могут предотвращать преждевременную кальцификацию.

Гипотеза о том, что в кокколитофоридах к месту кальцификации доставляется концентрированная форма  $\text{CaCO}_3$  – аморфный карбонат кальция (АКК), как это происходит у морских ежей, не нашла подтверждения в современных исследованиях. Van der Wal и др. [47] показали, что в то время как кокколитосомы сливаются с везикулами-предшественниками кокколитовой везикулы, кокколитосомы исчезают в начале кальцификации. В системах беспозвоночных, таких как развивающаяся спикула морского ежа, сначала закладывается полная структура, включающая АКК, за которой следует переход к кристаллическому  $\text{CaCO}_3$ . Однако в исследованиях с помощью электронной микроскопии рост кристаллов кокколита, по-видимому, происходит без какой-либо явной АКК фазы, даже на самых ранних стадиях формирования минерала.

### **Кальций-фосфатные организмы**

У позвоночных организмов транспорт фосфата и кальция происходит в сосудистой системе, и именно из нее остеобласты – клетки костной ткани, отвечающие за образование новой кости – получают необходимые ионы. Остеобласты способны транспортировать ионы во внеклеточный матрикс (неклеточная структура, состоящая из белков и полисахаридов, выделяемых клетками [150]) для дальнейшей минерализации. Коллаген, синтезированный остеобластами, формирует волокна, которые укладываются в шахматном порядке. На такой коллагеновой матрице откладываются кристаллы гидроксиапатита, занимая пространство между волокнами и внутри них [151].

Внеклеточный транспорт кальция и фосфора управляется градиентом ионов. Внутриклеточный транспорт кальция осуществляется с участием группы белков, которая включает кальмодулин и кальбиндин (содержат отрицательно заряженные аспаргат и глутамат в боковых цепях [152]), щелочную фосфатазу, причем экспрессия последних двух зависит от витамина D [153]. Не обнаружено белков, связывающих фосфор, и предполагается, что его транспорт регулируется градиентом концентрации.

Предполагается, что в остеобластах транспорт кальция и фосфора, необходимых для минерализации, происходит с участием двух органелл клетки – митохондрий и эндоплазматического ретикулума [151]. Транспорт осуществляется из эндоплазматического ретикулума в митохондрии, где образуются предзародышевые

частицы, которые в дальнейшем транспортируются во внеклеточный матрикс, инициируя минерализацию.

Предзародышевые частицы — это электроноплотные, аморфные частицы размерами около 30 нм [154, 155]. Исследование 2012 года показывает, что электроноплотные частицы, представляющие собой АФК, могут переноситься из митохондрии во внутриклеточную среду внутри матриксных везикул [156] — покрытых мембраной везикул размерами 100-200 нм. Матриксные везикулы содержат 2 мМ кальция и 1-2 мМ фосфата, карбоангидразу, а также и фосфатазы, участвующие в регуляции пирофосфата — ингибитора минерализации [157], а также фосфатидилсерин, инициирующий образование кристаллов ГА [158]. Матриксные везикулы накапливают кальций — путем связывания его с отрицательно заряженной внутренней поверхностью мембраны [159], и фосфат-ион — с участием ферментов и мембранных переносчиков, а также посредством гидролиза пирофосфата [151]. Впервые матриксные везикулы были идентифицированы в 1960-70х г при помощи просвечивающей электронной микроскопии в кальцифицирующих тканях [160, 161, 162, 163]. Согласно работам [164, 165], бóльшая доля кальция и фосфора — до 92% — внутри везикул находится в форме АФК. Остальные 8% существуют в виде комплекса кальция, фосфата и фосфатидилсерина (Рисунок 7).

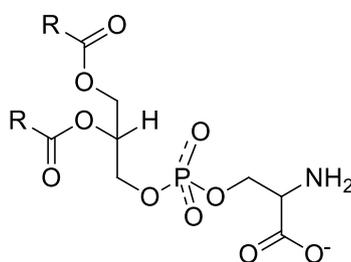


Рисунок 7 – Структурная формула фосфатидилсерина

Механизм транспорта предзародышевых частиц из митохондрий в матриксные везикулы на данный момент не выяснен. Предполагается, что матриксные везикулы могут образовываться в виде апоптотических телец вследствие апоптоза — запрограммированной гибели клеток [166]. Также возможен процесс разрушения митохондрий путем аутофагии (разрушение внутренних компонент клетки в лизосомах или вакуолях) [167]. В обоих процессах формируются ограниченные мембраной тела, содержащие предзародышевые частицы фосфата кальция. Кроме того, нет подтвержденных данных о том, каким образом зародыши или иная форма фосфата

кальция попадают из матриксных везикул во внеклеточный матрикс, где происходит минерализация на коллагеновых волокнах [151].

### 1.4.3 Отложение кальциевых композитов под управлением организма

#### Кальций-карбонатные организмы

Конечный продукт кальций-карбонатной минерализации у живых организмов представляет собой стабильные формы карбоната кальция – кальцит, арагонит и ватерит. Предположения относительно наличия аморфного карбоната кальция как промежуточной фазы нашли подтверждения для морских ежей [1, 136], моллюсков [168, 169] и ракообразных [170, 171].

Авторы [172] изучали процесс трансформации АКК в кальцит методами молекулярно-динамического моделирования и показали, что процесс перехода через растворение-пересадение энергетически более выгоден, чем твердофазная трансформация.

Politi и др. изучали образование спикул у личинок морского ежа и установили, что первоначально минерал спикул представляет собой в основном гидрат аморфного карбоната кальция  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , а трансформация его в кальцит происходит через переходную обезвоженную фазу АКК [173]. Politi показал, что свежие регенерированные части сломанных шипов покрыты слоем аморфного карбоната кальция, содержащего небольшое (до 15%) количество воды (что соответствует гидрату АКК), и в течение 3 недель трансформирующегося в кальцит [1]. Переходную безводную фазу АКК наблюдали и в растущем перламутровом слое раковины двустворчатого моллюска [169].

Авторы [174] выделили кокколиты из клеток *Pleurochrysis carterae*, растворили кальцит и выделили растворимую фракцию полисахаридов, отделив нерастворимые пластинки-основания. Они изучали способность выделенных органических пластинок образовывать зародыши карбоната кальция, используя метод диффузии  $\text{CO}_2$ . Раствор  $\text{CaCl}_2$  насыщали газом, образующимся при термическом разложении  $(\text{NH}_4)_2\text{CO}_3$ , и по мере насыщения раствора относительно  $\text{CaCO}_3$  выпадали кристаллы кальцита, независимо от присутствия органических пластинок. Добавление в раствор растворимой фракции полисахаридов изменило ход реакции, и осаждения кристаллов не наблюдалось. Однако на краях пластинок-оснований были обнаружены частицы размерами около 20 нм, богатые кальцием, но не содержащие карбонат-ионов. В отсутствие диффузии  $\text{CO}_2$

при участии пластинок и полисахаридов агрегаты частиц также образовывались по краю пластинок. Выделенные полимеры управляли локализацией процесса еще до начала осаждения карбоната кальция. Анализ растворимой фракции показал, что выделенная фракция по содержанию моносахаридов подобна ранее идентифицированным полисахаридам PS-1, PS-2, PS-3 [44]. В работе [46] описывается агрегация кальцийсодержащих частиц, наблюдаемая по краям органических пластинок кокколитов *Pleurochrysis haptonemofera*. Кристаллическая структура частиц не подтвердилась. Авторы показали, что основную роль в локализации агрегатов играет кислый полисахарид PS-2, тогда как PS-1 и PS-3 могут ингибировать осаждение карбоната кальция.

Не только кислые макромолекулы способны управлять кристаллизацией карбоната кальция. Белок N25, выделенный из раковин моллюсков, отличается от группы кислых белков органического матрикса. N25 содержит остатки аминокислот аспарагина, глутамина и лизина, каждая из которых имеет боковую аминогруппу, также незначительное количество кислых остатков. Несмотря на это, N25 способен изменять морфологию кристаллов кальцита, а также способствовать формированию кристаллов менее стабильного ватерита [175]. Авторы работы полагают, что аминогруппы, способные образовывать водородные связи, взаимодействуют с поверхностями растущих кристаллов  $\text{CaCO}_3$  и ингибируют переход ватерита в кальцит, который вероятно происходит по механизму Оствальда (растворение-осаждение). Авторы [176] показали, что белок SM50 – основной белок спикул эмбрионов морских ежей [177], не относится к кислым белкам – способен стабилизировать аморфный карбонат кальция в виде гидрата  $\text{CaCO}_3 \cdot \text{H}_2\text{O}$ , хотя механизм стабилизации не понятен. В работе [178] показано, что домен SM50, богатый глицином, способствует образованию предпочтительно АКК, чем стабильных полиморфов карбоната кальция.

### **Кальций-фосфатные организмы**

Исследователями предлагались различные механизмы формирования костного минерала:

А) заряженные неколлагеновые белки взаимодействуют с коллагеновыми фибриллами, в этих зонах в дальнейшем концентрируются ионы кальция и фосфата и осаждаются минерал [26].

Б) процесс контролируется клетками кости, которые выделяют матричные везикулы, содержащие фосфат кальция, во внеклеточную среду, где минерал высвобождается и осаждается на волокнах коллагена [179, 180].

В) фосфат кальция в виде АФК откладывается внутри коллагеновых волокон, где в дальнейшем трансформируется в гидроксиапатит [5, 181].

Согласно исследованиям последних 15 лет, в формировании твердой костной ткани у позвоночных участвуют матричные везикулы, в которых происходит первоначальное формирование твердой фазы [182-184]. Остеобласты управляют синтезом матричных везикул и процессами внутри них посредством мембранных переносчиков и ферментов [185].

Первоначально сформированные частицы аморфного фосфата кальция обнаруживаются у внутренней поверхности мембраны матричной везикулы [186]. Ионы кальция связываются с внутренней поверхностью мембраны, богатой фосфатидилсерином [164]. Предполагается [158, 187-189], что в везикуле образуется комплекс фосфатидилсерин-кальций-фосфат, который в дальнейшем трансформируется в кристаллы гидроксиапатита внутри везикулы. Такие структуры называют нуклеационным ядром (nucleation core, NC). Они состоят из некристаллических кластеров размерами около 1 нм, содержащих  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфат в аморфной форме, а также комплекс фосфатидилсерина с  $\text{Ca}^{2+}$  и фосфатом [164]. По данным исследования [189], где авторы изучали минерализацию в смеси фосфатидилсерин-кальций-фосфат при рН 7.0-8.6, образование минерала наблюдается в области рН 7.4 – 8.0. Авторы добавляли кальций к смеси фосфатидилсерина с фосфат-ионами, моделируя процесс в матричной везикуле, где до начала образования минерала присутствует большое количество фосфата и малое количество кальция. Основным минералом твердой фазы являлся ГА. Авторы [190] отмечали, что небольшое повышение рН в области 7.5-8.0 приводит к более полному гидролизу пирофосфата – ингибитора минерализации, АТФ, АДФ и АМФ, чем при физиологическом рН 7.4, и, как следствие, увеличению содержания фосфата, способного взаимодействовать с кальцием. Дальнейшее повышение рН до 9 и выше напротив ухудшает минерализацию ГА, так как образуется малорастворимый пирофосфат кальция.

Авторы работ [5, 34] обнаружили доказательства существования аморфного предшественника скелета у рыбок вида *Danio rerio*. Они продемонстрировали наличие аморфного фосфата кальция в зоне роста плавниковых костей, причем зрелая кость

состояла из гидроксиапатита. Частицы АФК представляли собой сферы размерами 10-20 нм, а соотношение Са/Р составляло в среднем 1.34. Для минеральных частиц соотношение Са/Р составило 1.64, что близко к стехиометрическому соотношению в гидроксиапатите ( $\text{Са/Р} = 1.67$ ). Аморфная фаза составляла около 50% всех минеральных частиц, наблюдаемых на окончаниях растущих костей [5].

Аморфные частицы-предшественники размерами 80-90 нм обнаруживаются и в формирующихся костях куриного эмбриона [35], большей частью на поверхности растущих костных структур. В этих областях частицы АФК являются основным компонентом твердой фазы, и присутствуют как во внеклеточном коллагеновом матриксе, так и внутри клеток. Авторы предполагают, что частицы АФК транспортируются из клеток во внеклеточную среду без растворения, однако прямого доказательства такого транспорта нет.

В общем, предполагаются следующие механизмы минерализации коллагеновых волокон с участием матричных везикул.

(а) Внутри везикул в результате действия фосфатаз на АТФ образуется пирофосфат, который снижает транспорт кальция из везикулы. Вместе с ростом количества кальция внутри везикулы, растет и количество фосфат-ионов, образующихся из пирофосфата под действием пирофосфатазы. В итоге кристаллы гидроксиапатита осаждаются на внутренней части мембраны матричной везикулы, разрушают ее, высвобождаясь во внеклеточное пространство, где они осаждаются на волокнах коллагена с участием неколлагеновых белков [151, 157, 191].

(б) В инициировании минерализации волокон коллагена участвуют не кристаллы гидроксиапатита, а частицы АФК, которые высвобождаются из матричных везикул, осаждаются на волокнах коллагена и впоследствии трансформируются в гидроксиапатит [5, 192, 193].

### **1.5 Влияние полимеров на образование фосфата и карбоната кальция**

Биоминералы обладают прочностью, упругостью и сложной организацией на наноуровне, отличающим их от природных и синтетических минералов. Значительную роль в биоминерализации играют органические молекулы, участвующие, по-видимому, на каждой стадии процесса. Белки, полисахариды и фосфолипиды участвуют в транспорте необходимых ионов, управляют осаждением, ингибируя или иницируя процесс образования минерала в нужном месте в нужное время, и влияют на форму

образующихся кристаллов. Попытки воссоздания процесса биоминерализации в лабораториях приводит не только к получению сведений о влиянии тех или иных условий эксперимента на финальный продукт, но и к созданию гибридных материалов, сочетающих в себе уникальные свойства, не характерные для неорганических синтетических минералов. Такие материалы могут находить самостоятельное применение в качестве агентов доставки лекарственных соединений, генной терапии, восстановлении костных тканей организма, сорбентов [194-196].

Моделирование процессов биоминерализации в лабораторных условиях часто проводят с использованием синтетических полимеров, которые могут имитировать биополимеры. Делается это ввиду малой доступности биологических соединений, так как процесс их выделения и очистки трудоемкий, а для полноценного исследования необходимы достаточные количества веществ. При этом, учитывая анионный характер большинства макромолекул, обнаруженных в биоминералах и участвующих в кальцификации, имеет смысл проводить моделирование с использованием поликислот, но, естественно, не ограничиваться этим.

Исследования влияния полимерных добавок на процесс формирования  $\text{CaCO}_3$  и фосфата кальция привели к выводу, что наличие анионных фрагментов в полимере (карбоксильные, фосфатные, сульфо-группы) увеличивает его способность ингибировать осаждение солей кальция. Типичным примером полианиона является полиакриловая кислота (ПАК). Карбоксильные группы ПАК связываются с ионами  $\text{Ca}^{2+}$ , затрудняя их взаимодействие с противоионами, и тем самым ингибируют осаждение карбоната и фосфата кальция [197-205]. Взаимодействие ионов  $\text{Ca}^{2+}$  с функциональными группами полимера приводит к изменению структуры образующихся осадков. Так, при смешивании растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , образуются частицы карбоната кальция ромбоэдрической формы, типичной для кальцита. Добавление ПАК в среду осаждения приводит к образованию осадка, состоящего из стержнеобразных и гантелевидных структур, собранных из ромбоэдрических пластинок [200, 206]. Также в частицах карбоната кальция, сформированных в присутствии ПАК, наблюдается повышение доли ватерита, менее стабильной формы  $\text{CaCO}_3$  [207, 208]. Важное значение имеет молекулярная масса ПАК. Авторы [198] показали, что наибольшую эффективность ингибирования осаждения  $\text{CaCO}_3$  в исследованном интервале ММ от 1000 до 12000 имеют образцы ПАК с ММ 1000-3000. Подобные результаты получены для  $\text{CaCO}_3$  в [209],

где использовали ПАК с ММ 1200, 5000, 25000, и для фосфата кальция в [205]. Сополимеры АК с гидрофильными мономерами также способны к стабилизации солей кальция, причем эффективность ингибирования увеличивается с повышением концентрации сополимера. Так, блок-сополимеры ПАК с полиэтиленоксидом с эффективностью до 80% ингибируют осаждение карбоната и фосфата кальция [210]. При использовании блок-сополимера АК с аллилполиэпоксикарбоксилатом [211] эффективность ингибирования осаждения достигает для фосфата кальция 99%, карбоната кальция — 80%. Соли кальция, осажденные в присутствии сополимера, состоят из частиц меньшего размера в сравнении с осадками, полученными в отсутствие сополимера. Для блок-сополимеров этиленгликоля с акриловой кислотой и бутилакрилатом наблюдается различие в структуре осаждаемого в их присутствии карбоната кальция [212]: при изменении соотношения ПЭГ:ПАК с 3:1 до 6:1 структура осадка изменяется с веретенообразных форм с искривленными гранями до ромбоэдрических кристаллов кальцита с более определенными гранями.

Менее распространены работы, исследующие влияние поликатионов на формирование фосфата кальция. В работе [213] авторы получали фосфат кальция в присутствии полиэтиленimina (ПЭИ) в виде агрегированных игольчатых кристаллов. В работе [214] изучали образование частиц фосфата кальция в присутствии ПЭИ, а также влияние температуры и концентрации ПЭИ на форму частиц. Авторы получали частицы меньшего размера при увеличении концентрации полимера, а их форма изменялась с течением времени реакции от пластинок до наностержней. Авторы [215] показали, что биогенные амины, а именно спермин, спермидин и путресцин, в концентрациях 10 мМ способны ингибировать минерализацию фосфата кальция в растворе с 4 мМ Са и Р в течение 4.5 ч. В работе [216] показано, что полиаллиламин в концентрации 2 мМ стабилизирует частицы фосфата кальция в растворе с 4 мМ Са в течение 5 суток. Других работ, изучающих образование стабильных частиц фосфата кальция в присутствии поликатионов, обнаружено не было.

В таблице 7 приведен перечень работ, исследующих образование фосфата и карбоната кальция в присутствии полимерных добавок. Далее рассмотрим исследования, описывающие образование стабильных в водной среде частиц, и полимеры, ингибирующие осаждение минерала. Такие частицы могут выступать моделями первичных стабилизированных минеральных частиц, образующихся в живых организмах

на начальных стадиях минерализации, и помочь нам приблизиться к пониманию механизмов, происходящих при биоминерализации.

Таблица 7 – Влияние органических молекул на стабильность фосфата и карбоната кальция (CaP – аббревиатура для различных форм фосфат кальция)

Неорг. часть	Полимер	Получение	Примечание	Ссылка
CaP	ПАК	Получали частицы CaP (Ca/P = 1.67) при pH 10 и суспендировали (УЗ) в растворе ПАК концентрацией 0.3-0.7 мг/мл.	ПАК затрудняла трансформацию АФК в ГА и увеличивала время стабильности суспензии до нескольких суток.	[217]
CaP	ПАК	Ca 8 мМ P 4.8 мМ Полимер (ММ = 2, 100, 450 кДа) 0.5-3 мМ pH 8.4	Высокие концентрации ПАК способствовали внутрифибриллярной минерализации коллагена.	[218]
CaCO <sub>3</sub>	ПАК	Смешивали CaCl <sub>2</sub> (0.1М, pH 8.5), Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.1М, pH 10) с ПАК (pH 6, 9 или 11).	Получены частицы размерами 160-500 нм, содержащие 50-55% АКК и 30% ПАК. Редиспергированные частицы стабильны в растворе от 10 дней до 3 месяцев.	[209]
CaCO <sub>3</sub>	ПАК	К смеси CaCl <sub>2</sub> (0.1М), ПАК (0.1М) и доксорубицина (DOX) добавляли Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (0.1М).	Получены частицы размером 62 нм, стабильные в течение месяца при pH 7.4. Изучались в качестве агентов доставки DOX в раковые клетки.	[219]
CaCO <sub>3</sub>	ПАК; ПЭИ	Смешивали растворы 0.05 М CaCl <sub>2</sub> (pH 8.6) с 0.05 М (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> CO <sub>3</sub> (pH 10), через 60 с добавляли ПАК (pH 8, [COO <sup>-</sup> ]/[Ca <sup>2+</sup> ] = 0.62). Частицы отделяли фильтрацией. Для получения ПЭИ-покрытых частиц дисперсию CaCO <sub>3</sub> -ПАК добавляли в раствор ПЭИ с pH 8.5. Частицы очищали диа-	Получены частицы размерами 1 – 1.3 мкм, стабильные в водной среде минимум в течение 504 ч. Поверхность частиц CaCO <sub>3</sub> -ПАК схожа с «чистыми» CaCO <sub>3</sub> . Полимеры включаются в карбонат кальция, но не меняют значительно морфологию его частиц.	[220]

Неорг. часть	Полимер	Получение	Примечание	Ссылка
		лизом и сушкой в вакууме.		
CaP	ПАК, полиаспарагиновая кислота (ПАСП)	Смешивали растворы CaCl <sub>2</sub> (до 43 мМ), NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> , ПАК (ММ 450 кДа), ПАСП (ММ 9-11 кДа) при pH 7.4	Стабилизированные частицы аморфного фосфата кальция (R <sub>h</sub> = 1.4 нм) трансформировались в гидроксипатит в течение 7 суток при 37°C.	[221]
CaP	ПАСП	Смешивали 1 М CaCl <sub>2</sub> с 0.5 М KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> и полимером при pH 7.4	Получены стабильные до 18 недель частицы, наностержни размером R = 27 нм	[202]
CaP	ПАСП	Ca <sup>2+</sup> 4.5 мМ фосфат-ионы 2.1 мМ Полимер 0.1-0.55 мМ	Получены сферические частицы с R <sub>h</sub> = 30-70 нм, стабильные в течение 5 ч. Присутствие ПАСП инициировало минерализацию внутри коллагеновых волокон.	[222]
CaP	ПАСП	Смешивали растворы CaCl <sub>2</sub> 0.5 М, Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 0.3 М и полимера 0.01-1% wt.	При C <sub>полимер</sub> > 0.1% получены стабильные дисперсии с частицами, размер R <sub>h</sub> которых увеличивался с 100 нм до 400 нм к 70 часу.	[223]
CaP	ПАСП	Готовили раствор, содержащий CaCl <sub>2</sub> 50-100 мМ, Ca/P = 2, полимера 0.16-0.26 М при pH 7.4, 37°C	При 50 мМ Ca и 0.2-0.26 М полимера получены стабильные в растворе сферические частицы (4-5 нм), трансформирующиеся в наностержни к 24 часу.	[224]
CaP	хитозан + ДНК/РНК	При pH 9 смешивали 18 мМ CaCl <sub>2</sub> с 11.5 мМ Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> . Через 30 с добавляли ДНК/РНК, еще через 30 с – хитозан. Финальный pH = 7.	Получены частицы с R = 131 нм. Изучались в качестве агентов доставки генов.	[225]
CaP	Гиалуроновая кислота (ГК)	CaCl <sub>2</sub> (36 мМ) + siRNA + Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> (1.5 мМ) + ГК при pH 9	Получены отрицательно заряженные частицы размерами 63 – 278 нм. Размер час-	[203]

Неорг. часть	Полимер	Получение	Примечание	Ссылка
			тиц увеличивался со временем.	
CaP	Триблок-сополимер поли(этиленгликоль-пропиленгликоль-этиленгликоль) (Pluronic F127)	Смешивали полимер с раствором $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ и $\text{H}_3\text{PO}_4$ ( $\text{Ca}^{2+}$ 0.84 М, рН 0.37) и бутанолом, сшивали при помощи УФ излучения в гель. Минерализацию внутри геля вызывали повышением рН путем пропускания газообразного $\text{NH}_3$ .	Первоначально образующиеся частицы АФК размерами 50-100 нм в ходе созревания формируют пластинки гидроксиапатита.	[192]
CaP	Полиаллилами н гидрохлорид	Получали раствор, содержащий $\text{Ca}^{2+}$ 4.5 мМ, $\text{HPO}_4^{2-}$ 2.1 мМ, полимера 12.5-400 мкг/мл с рН 7.4	Получены частицы с $R_h = 18$ нм, стабильные в течение 5 суток	[216]
$\text{CaCO}_3$	Сополимер ПЭГ-ПАСП	Раствор с рН 8, содержащий $\text{CaCl}_2$ (0.95 ммоль), полимер (0.018 ммоль) и хлорин Е6 (фотосенсибилизатор), смешивали с раствором $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (0.95 ммоль). Частицы очищали диализом и сушили лиофильно.	Получены частицы размером 354 нм, стабильные в фосфатном буферном растворе с рН 7.4.	[226]
$\text{CaCO}_3$	Поливинилсульфоновая кислота	Смешивали $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (20 мМ) с $\text{CaCl}_2$ (20 мМ) и полимером, частицы отделяли центрифугированием при 10000 g, промывали, редиспергировали в буферном растворе с рН 9.	Получены частицы размерами 100-500 нм, стабильны до 5 месяцев в буферном растворе с рН 9. Увеличение концентрации полимера не влияло значительно на размер частиц.	[227]

Неорганические наночастицы, содержащие фосфат и карбонат кальция, активно исследуются в качестве агентов доставки различных веществ в клетки. Карбонат и фосфат кальция биосовместимы, стабильны в физиологической области рН и растворяются в кислых средах, что может использоваться для высвобождения нагрузки в определенных условиях. Способность ионов кальция связываться с кислотными группами делает такие частицы потенциальными рН-чувствительными агентами трансфекции. Недостатками таких частиц являются их большой размер и склонность к агрегации. В связи с этим для

повышения стабильности и регулирования размера частиц возможно применять различные полимерные добавки.

В работе [228] наночастицы фосфата кальция применялись для трансфекции. Частицы CaP-РНК, полученные смешиванием раствора, содержащего ионы кальция и РНК с фосфат-содержащим раствором, имели размеры 149 нм, отрицательный заряд (-13.6 мВ) и незначительную степень трансфекции. Для повышения эффективности наночастицы фосфата кальция, нагруженные РНК, объединяли с липосомами на основе модифицированного полиэтиленгликолем (ПЭГ) холестерина. Полученные наночастицы имели почти нейтральный поверхностный заряд (0.3 мВ) и размер 260 нм. Включение в состав внешнего слоя полиэтиленгликоля, способного к протонированию, улучшало эндосомальный выход и эффективность трансфекции. Также, такие комбинированные наночастицы показали меньшую цитотоксичность в сравнении с ПЭГ 25 кДа, коммерческим трансфекционным реагентом, что, как авторы предполагают, связано с нейтральным зарядом поверхности.

Авторы [203] использовали наночастицы фосфата кальция, стабилизированные модифицированной допамином гиалуроновой кислотой для доставки миРНК в клетки. Частицы получали смешиванием раствора, содержащего  $\text{CaCl}_2$  и siRNA с буферным раствором, содержащим  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , при pH 9, с последующим добавлением модифицированной гиалуроновой кислоты. С увеличением содержания модифицированной ГК размер частиц уменьшался с 278 до 63 нм, а их стабильность, оцененная по величине зета-потенциала, увеличивалась. Авторы показали, что наличие фрагментов пирокатехина (Рисунок 8) в полимере способствует меньшей полидисперсности частиц и в большей степени предотвращает образование кристаллов фосфата кальция, по сравнению с немодифицированной гиалуроновой кислотой. Полученные частицы обеспечили защиту siRNA от деградации в присутствии нуклеаз *in vitro*. Стабилизированные модифицированной гиалуроновой кислотой частицы в большей степени накапливались в опухолях в сравнении с частицами без полимерного стабилизатора.

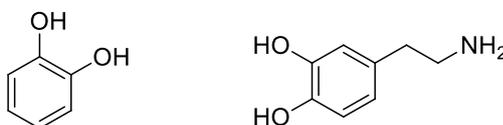


Рисунок 8 – Структурные формулы пирокатехина (слева) и допамина (справа)

В работе [225] для стабилизации комплексов кальций-фосфатных частиц с ДНК использовали хитозан и его модификацию, содержащую пирокатехиновые фрагменты. Связывание ДНК обеспечивалось наличием ионов кальция и аминогрупп в хитозане. Авторы показали, что введение пирокатехина в молекулу, а также увеличение соотношения модифицированный хитозан/ДНК от 2.5 до 25 уменьшало размеры ( $R_h$ ) получаемых частиц с нескольких микрон до 131 нм. Такие частицы показали лучшую стабильность при нахождении в сыворотке крови по сравнению с частицами без полимерных добавок: более 24 часов против 4 часов соответственно. Композитные частицы на основе модифицированного хитозана и фосфата кальция показали отсутствие цитотоксичности, а эффективность трансфекции была сопоставима с ПЭИ, широко известным агентом трансфекции.

Участие пирокатехиновых фрагментов обсуждалось в работе [229], где авторы исследовали кристаллизацию фосфата кальция на изготовленном из полидопамина покрытии. Пирокатехиновые фрагменты связывают ионы кальция, и инициируют образование кристаллов фосфата кальция на покрытии. Авторы [230] изучали, насколько хорошо пирокатехин адсорбируется на гидроксиапатите, и показали, что пирокатехин и молекулы, содержащих пирокатехиновый фрагмент, имеют более высокие скорости и энергии адсорбции в сравнении с гексановой кислотой, гексиламином и гексанолом.

Авторы работы [219] получали загруженные доксорубицином (цитостатический препарат) наночастицы на основе карбоната кальция, используя полиакриловую кислоту в качестве стабилизатора. ПАК связывается с ионами кальция за счет электростатических взаимодействий и с доксорубицином за счет образования водородных связей. Полученные частицы размером 62 нм разрушались при  $pH < 7$ , высвобождая препарат. Замена 10% ионов кальция ионами стронция и магния позволило повысить  $pH$  разрушения частиц и высвобождения доксорубицина до 7.7. Композитные частицы, загруженные доксорубицином, показали большую эффективность лечения в сравнении с чистым препаратом на примере раковых опухолей рыбок *Danio rerio* и голых мышей.

Авторы работы [226] изготовили наночастицы на основе карбоната кальция, загруженные фотосенсибилизатором (хлорин Е6) и стабилизированные карбоксилсодержащим полимером, для фотодинамической терапии. В качестве стабилизирующего полимера использовали блок сополимер полиэтиленгликоля и полиаспарагиновой кислоты. Полученные частицы имели размер около 300 нм, а

минеральная часть представляла собой ватерит – метастабильную модификацию карбоната кальция. В физиологических условиях (рН 7.4) частицы ингибировали высвобождение фотосенсибилизатора, в то время как при внеклеточном рН опухолевых тканей (6.4-7.2) минеральная часть из  $\text{CaCO}_3$  растворялась, высвобождая препарат. Образование пузырьков  $\text{CO}_2$  при разложении  $\text{CaCO}_3$  позволило идентифицировать опухолевые ткани при помощи УЗ в режиме реального времени. Фототоксичность наночастиц была выше, чем у свободного препарата. Высвобождение фотосенсибилизатора одновременно с образованием пузырьков газа делает такие наночастицы перспективными агентами в области терапии раковых опухолей.

Применение частиц карбоната кальция в качестве сорбентов для добычи урана из океанов обсуждалось в работе [220]. Авторы получали частицы чистого ватерита (метастабильного полиморфа карбоната кальция), а также гибридные частицы, последовательно покрытые слоями полиэлектролитов – ПАК и ПЭИ. По данным СЭМ, покрытые полиэлектролитами частицы имели схожую форму и размер с частицами чистого ватерита. Частицы, покрытые ПАК, имели размеры 1.3 мкм и  $\zeta$ -потенциал -28 мВ, что свидетельствует о их коллоидной стабильности. Нанесение на частицы  $\text{CaCO}_3$ -ПАК следующего слоя из ПЭИ изменило  $\zeta$ -потенциал до +28 мВ. Частицы, суспендированные в воде, не изменяли свой размер и поверхностный заряд в течение 3 недель. Чистый  $\text{CaCO}_3$  и  $\text{CaCO}_3$ -ПАК-ПЭИ показали лучшую способность адсорбировать уран при его естественных концентрациях из искусственной морской воды, а при сильном «загрязнении» воды ураном все три типа частиц были в равной степени эффективны. Несмотря на то, что эффективность экстракции урана коммерческими сорбентами выше, чем предложенными авторами частицами ватерита, такие композитные частицы недороги, просты в использовании и более экологичны.

---

В целом, обзор литературы показывает важность изучения влияния функциональных водорастворимых полимеров на формирование карбоната и фосфата кальция. Эти знания необходимы для понимания фундаментальных механизмов образования неорганических и композитных материалов в живой природе. С другой стороны, в процессе этих работ и на их основе возможно создание новых биоинспирированных материалов и методов. Синтетические полимеры, особенно поликислоты, активно влияют на формирование карбоната и фосфата кальция в водной

среде. В то же время, складывается впечатление, что большинство работ по изучению влияния полимеров на минерализацию выполнено на известных, коммерчески доступных или синтезированных для других целей полимерах. Исследования разных авторов проведены в разных условиях, что не способствует выявлению связей строения полимеров с их поведением в рассматриваемых реакциях. В этой связи представляется актуальным исследование с использованием целенаправленно подготовленной коллекции гомо- и сополимеров, содержащих как кислотные, так и основные и условно нейтральные группы.

## Глава 2 Влияние функциональных полимеров на формирование карбоната и фосфата кальция в водной среде (результаты и обсуждение)

### 2.1 Функциональные полимеры для моделирования биоминерализации

Для моделирования биоминерализации синтезирован набор полиэлектролитов, включающий полиоснования, поликислоту и полиамфолиты, в том числе ранее неизвестные полимеры виниламина с акриловой кислотой, винилимидазола с виниламином и акриловой кислотой. В данном разделе обсуждаются их синтез и поведение в водных растворах.

#### 2.1.1 Сополимеры винилимидазола с акриловой кислотой

Сополимеры ВИ с АК получены радикальной сополимеризацией ВИ с акрилатом натрия в соответствии с [231]. Сополимеры обогащены акрилатными звеньями в сравнении с мономерной смесью, константы сополимеризации составили  $0.54 \pm 0.06$  для ВИ и  $1.3 \pm 0.3$  для АК-Na. Гидролиз звеньев  $-\text{COONa}$  в ходе очистки диализом относительно дистиллированной воды приводит к частичному образованию звеньев  $\sim\text{COOH}$  в сополимерах, количество которых рассчитано по данным потенциометрического титрования. Сополимеры с 15 и 35% АК растворимы в диапазоне pH от 2.5 до 11.5. Сополимеры ВИ-АК при содержании АК 56-96% нерастворимы в кислой области (Рисунок 9). Сополимеры с 56-85% АК склонны к ассоциации в водном растворе, о чем свидетельствует бимодальное распределение частиц по размерам со второй модой 100 нм и более (Рисунок 10).

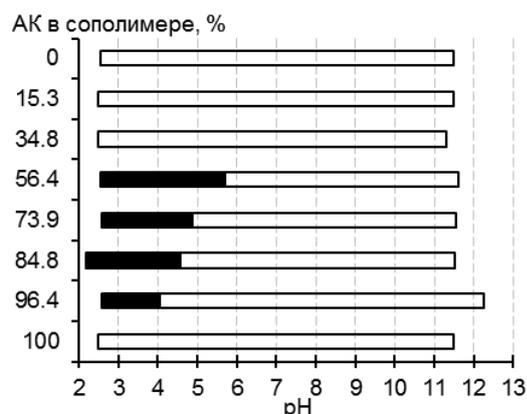


Рисунок 9 – Области нерастворимости сополимеров ВИ-АК. Концентрация сополимеров 1.5 мг/мл, NaCl 0.1M

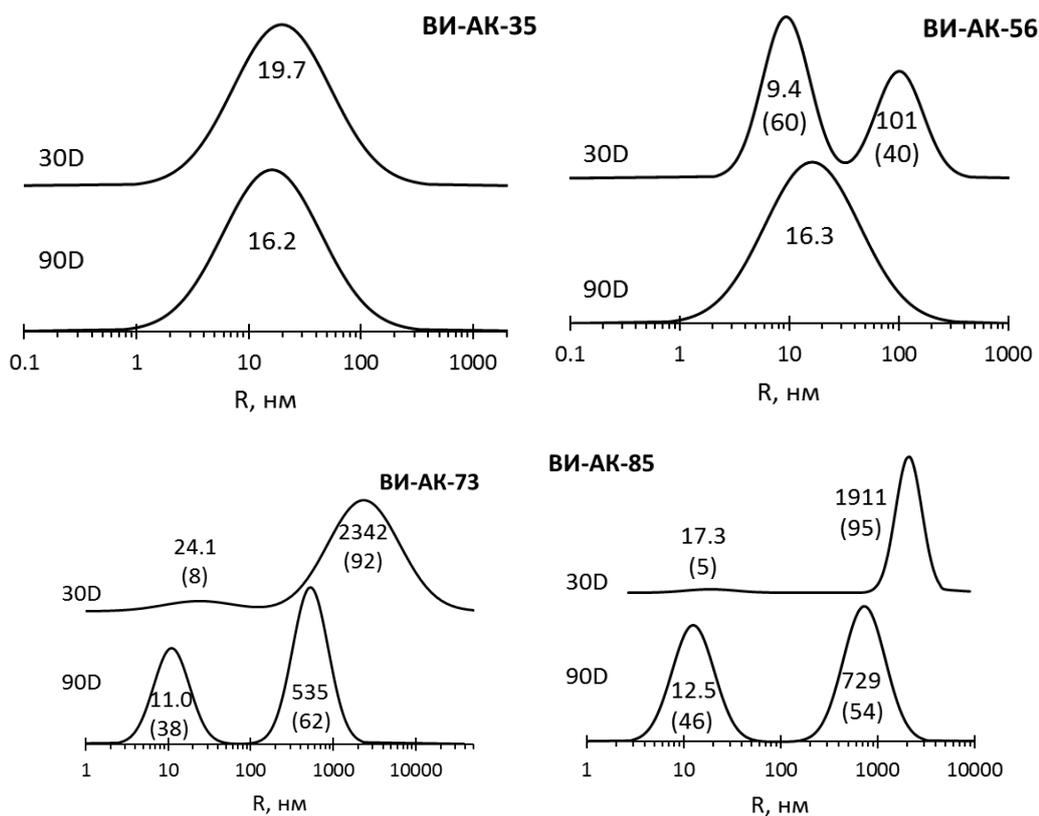


Рисунок 10 – Данные динамического светорассеяния растворов сополимеров VI-AK. Концентрация сополимеров 10 мМ, NaCl 20 мМ, pH 9.5, 20°C

### 2.1.2 Сополимеры винилимидазола с виниламином

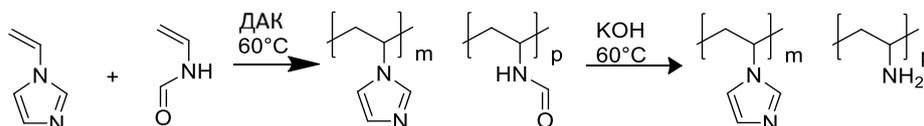


Рисунок 11 – Получение сополимеров VI-BA

На первой стадии синтезировали сополимеры винилимидазола с винилформамидом (ВИ-ВФА) в условиях радикального иницирования в присутствии ДАК в воде при pH 7 (Рисунок 11). Состав сополимеров, определённый с помощью УФ-спектроскопии, близок к составу мономерных смесей (Таблица 8). Константы сополимеризации ВИ и ВФА, рассчитанные по интегральному методу [232, 233], модифицированному в соответствии с [234], составили  $0.56 \pm 0.05$  и  $0.54 \pm 0.04$  соответственно, что согласуется с литературными данными ( $r_{ВИ} = 0.77 \pm 0.04$ ,  $r_{ВФА} = 0.76 \pm 0.04$ , сополимеризация в диоксане [235]) и указывает на тенденцию к чередованию мономерных звеньев. Молекулярные массы сополимеров вычисляли на основе вискозиметрических констант для обоих гомополимеров и усредняли с учётом состава

сополимера. Можно отметить понижение молекулярной массы сополимера с уменьшением количества звеньев ВФА (Рисунок 12).

Таблица 8 – Сополимеры ВИ-ВФА

Шифр	ВИ в мон. смеси, %	Время реакции, ч	Выход, %	% ВИ в сополимере	[ $\eta$ ], дл/г	ММ, кДа
ПВИ	100	12	20.8	100	0.4043	64.8
SP5-90	90.0	14.5	30.2	86.7	0.4523	77.4
SP5-70	69.9	14.5	32.5	70.4	0.5203	94.8
SP5-30	30.0	14.5	59.5	29.9	0.8563	176.9
SP5-10	10.0	14.5	81.3	4.9	1.8377	411.1
PV20-06	80.3	24	45.9	82.2	0.5204	99.0
PV20-02	49.7	24	52.3	52.7	0.6457	128.1
PV20-05	25.4	24	76.5	25.3	1.1567	273.7
SP4-30	26.1	4	8.8	31.2	-	-
SP4-70	65.5	4	4.6	61.5	-	-
ПВФА	0	2.3	93.6	0	2.4612	545.8

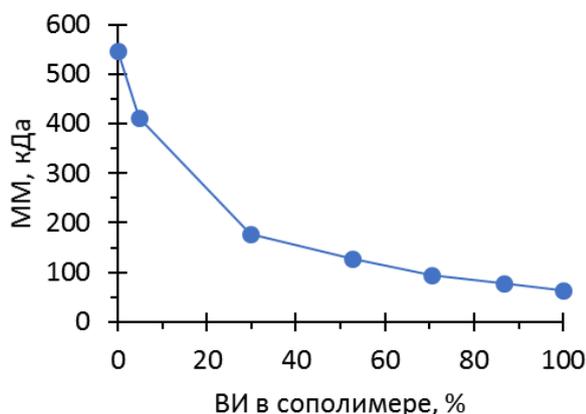


Рисунок 12 – Зависимость молекулярной массы сополимеров ВИ-ВФА от содержания ВИ, % мольный

Сополимеры винилимидазола с виниламином (ВИ-ВА) получали щелочным гидролизом соответствующих сополимеров ВИ-ВФА с выходом порядка 80-90% (Таблица 9; выход рассчитан с учетом потери массы звена ВФА). Далее в тексте будут использоваться аббревиатуры ВИ-ВА-Х, где Х означает содержание звеньев ВА (% мольный).

Таблица 9 – Получение сополимеров ВИ-ВА

Шифр	Образец ВИ-ВФА	*Выход, %	ВИ в сополимере, %
ВИ-ВА-13	SP5-90	56.9	86.7
ВИ-ВА-18	PV20-06	88.0	82.2
ВИ-ВА-30	SP5-70	83.1	70.4
ВИ-ВА-38	SP4-70	89.7	61.5
ВИ-ВА-47	PV20-02	86.6	52.7
ВИ-ВА-69	SP4-30	93.4	31.2
ВИ-ВА-75	PV20-05	78.5	25.3
ВИ-ВА-95	SP5-10	93.5	4.9

\*с учетом потери массы звена ВФА

Полученные сополимеры ВИ-ВА растворимы во всем исследованном диапазоне рН (от 2.5 до 11.5). Звенья ВА являются типичными основаниями, и рК сопряженной кислоты для них близко к 10 (Рисунок 13). Протонирование ПВА приводит к падению значений рК вследствие электростатического эффекта, при котором присоединение каждого последующего протона к макромолекуле затруднено возрастающим положительным зарядом цепи [236]. Звенья имидазола проявляют меньшую основность по сравнению с аминогруппами, и кривая рК- $\alpha$  ПВИ располагается ниже, чем ПВА. Значения рК сополимеров ВИ-ВА определяются соотношением звеньев и располагаются между ПВИ и ПВА.

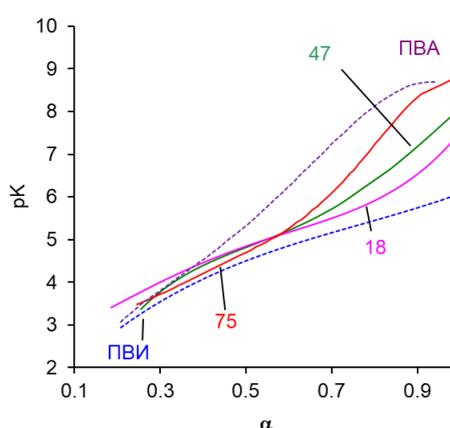


Рисунок 13 – Зависимость рК от степени ионизации  $\alpha$  сопряженной кислоты сополимеров ВИ-ВА. Указано содержание ВА в сополимере, мол. %. Концентрация полимера составила 1 мг/мл, NaCl 0.1M, температура 20°C, титрант HCl 0.1M

По данным динамического светорассеяния, в водных растворах ПВИ, ПВА и сополимеров присутствуют частицы радиусами менее 20 нм и более 300 нм, что свидетельствует о склонности сополимеров к ассоциации (Рисунок 14). Можно отметить уменьшение размеров ассоциатов с ростом pH.

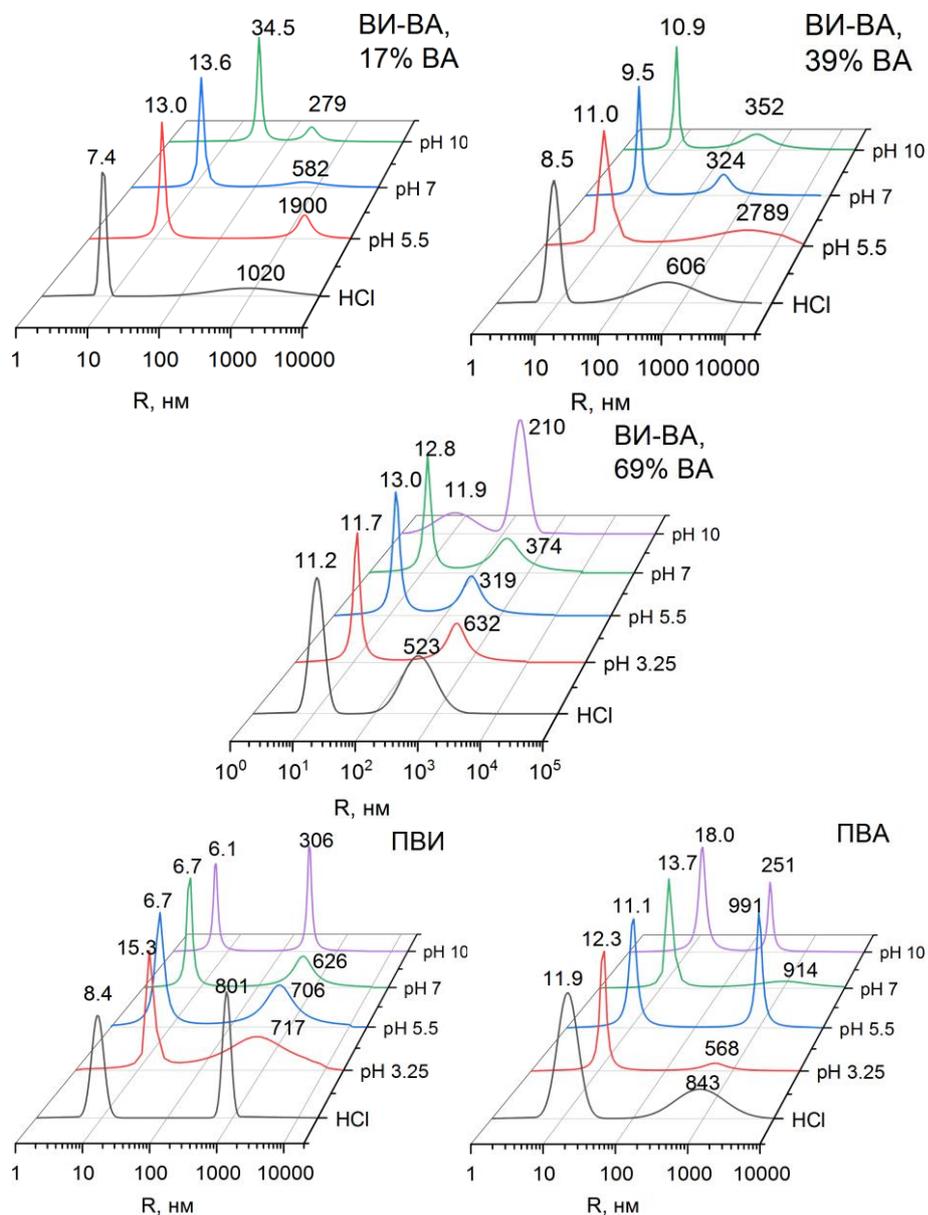


Рисунок 14 – Данные динамического светорассеяния растворов сополимеров ВИ-ВА, гомополимеров ПВА и ПВИ при разных pH. Концентрация 2 мг/мл, лазер 540 нм

### 2.1.3 Сополимеры виниламина с акриловой кислотой

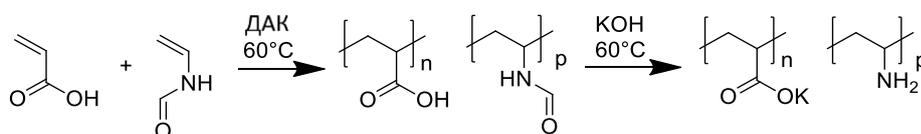


Рисунок 15 – Получение сополимеров ВА-АК

Сополимеры виниламина с акриловой кислотой (ВА-АК) получены гидролизом соответствующих сополимеров винилформамида с акриловой кислотой (ВФА-АК). Сперва сополимеры ВФА-АК получали радикальной сополимеризацией в диоксане (все образцы, кроме MS3Z) или смеси вода/ИПС (MS3Z) (Таблица 10, Рисунок 15). Содержание АК в сополимерах ВФА-АК определяли потенциометрическим титрованием. Константы сополимеризации рассчитывали по интегральному методу [232, 233], модифицированному в соответствии с [234]. Константы сополимеризации ВФА и АК в диоксане (рассчитаны в данной работе) и изопропанол [237] (Таблица 11) указывают на склонность к чередованию мономерных звеньев и наличие точки азеотропа при 47.3% АК (Рисунок 16).

Таблица 10 – Сополимеризация АК и ВФ

Шифр	АК в мон. смеси, мол.%	ДАК, % от массы мон.	Время, мин	Выход, %	АК в сопол., мол. %	$M_w$ , кДа
МС-320-1	3.1	0.25	107	17.1	12.1	14.6
PV20-14	9.9	0.25	73	31.3	32.2	16.3
МС-3419	72.6	1	60	57.8	61.4	-
МС-3319	89.8	1	60	21.7	74.1	8.1
MS1423	5.0	0.25	150	31.6	15.1	10.9
MS1623	15.1	0.25	80	32.0	34.8	12.1
MS822	56.4	0.25	120	81.0	48.5	8.1
MS922	80.6	0.25	150	88.6	62.2	8.0
MS3Z	90.8	0.5	1800	53.4	79.6	-

Таблица 11 – Константы сополимеризации ВФА и АК

$M_1$	$M_2$	Условия	$r_1$	$r_2$	Источник
ВФА	АК	Диоксан, 60°C	0.23±0.01	0.31±0.01	Данная работа
ВФА	АК	Изопропанол, 60°C	0.15±0.03	0.19±0.09	[237]
ВФА	АК-Na	Вода, 45°C	0.29±0.11	0.65±0.03	[238]

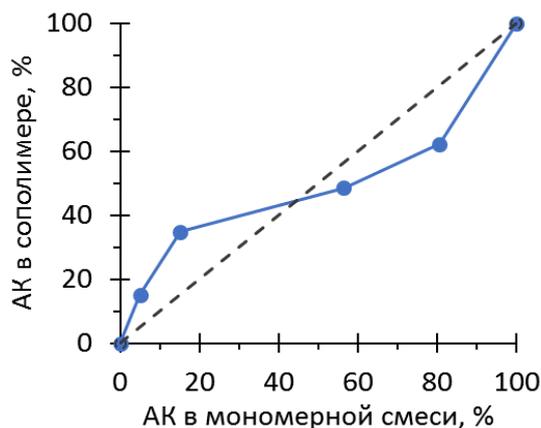


Рисунок 16 – Зависимость содержания АК в сополимерах ВФА-АК от содержания АК в мономерных смесях, % мольный

Сополимеры ВА-АК получали гидролизом ВФА-АК в КОН. Это привело к образованию звеньев АК-К, которые частично перешли в АК в ходе очистки сополимеров диализом. Соотношение звеньев АК-К и АК-Н определяли потенциометрическим титрованием. Состав сополимеров ВА-АК определяли при помощи  $^1\text{H}$  ЯМР спектроскопии по соотношению сигналов протонов СН-Н аминогрупп при 2.7-4 м.д. и протонов основной цепи в области 1-2.7 м.д. (Таблица 12, Рисунок 17). Состав ВА-АК отличается от соответствующих ВФА-АК, что может быть связано с потерями в ходе очистки после гидролиза. Далее в тексте будут использоваться аббревиатуры ВА-АК-Х, где Х суммарное содержание звеньев АК в солевой и кислотной формах (% мольный).

Таблица 12 – Получение сополимеров ВА-АК

Шифр	Образец ВФА-АК	Выход, %	Состав сополимера, %		
			АК	АК-К	ВА
ВА-АК-40	PV19-10	76.4	2.0	37.8	60.2
ВА-АК-61	МС-3419	85.1	0.3	61.1	38.6
ВА-АК-74	МС-3319	89.9	0.7	73.5	25.8
ВА-АК-32	PV20-14	63.4	2.8	29.4	67.8
ВА-АК-48	PV20-03	91.5	0	48.4	51.6
ВА-АК-21	MS1423	66.2	10.1	10.6	79.3
ВА-АК-45	MS1623	67.4	0	44.6	55.4
ВА-АК-58	MS822	69.2	4.6	52.9	42.5
ВА-АК-78	MS922	43.5	2.2	75.4	22.4
ВА-АК-95	MS3Z	59.5	28.6	65.9	5.5

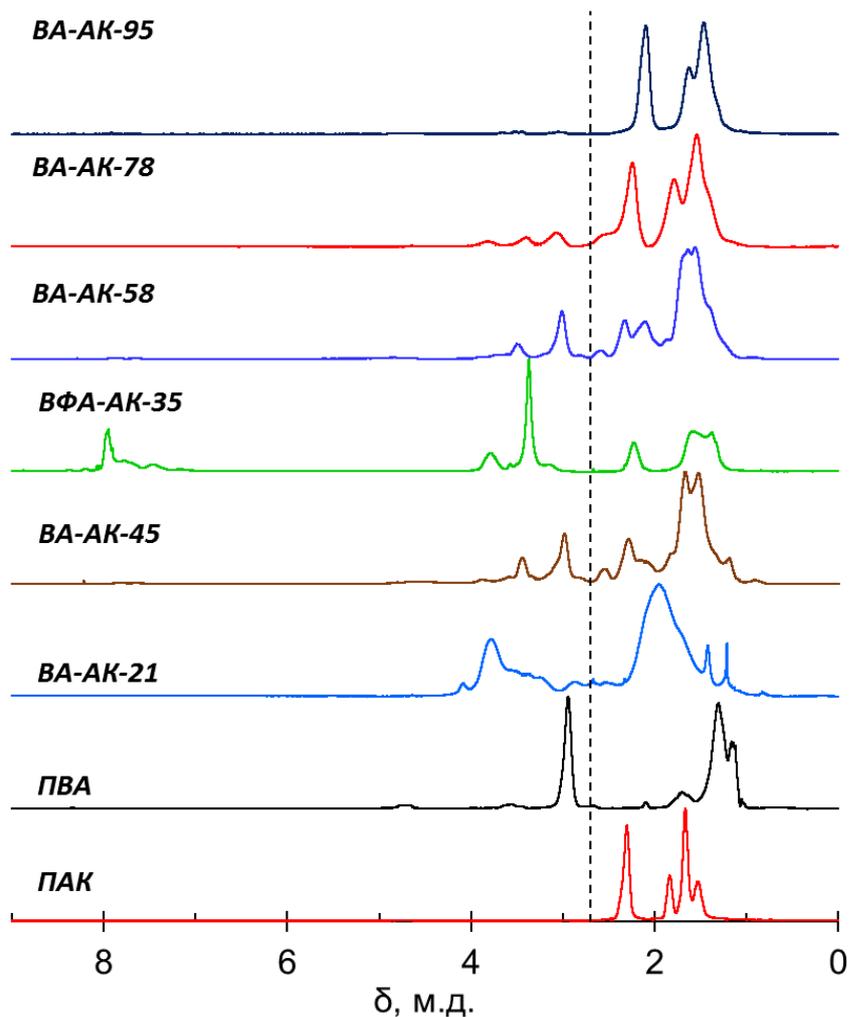


Рисунок 17 –  $^1\text{H}$  ЯМР спектры сополимеров ВА-АК, ПВА и ПАК в  $\text{D}_2\text{O}$

Сополимеры ВА-АК являются полиамфолитами и нерастворимы в определенных областях рН (Рисунок 18). С увеличением содержания звеньев АК характерно смещение интервала нерастворимости в сторону меньших значений рН.

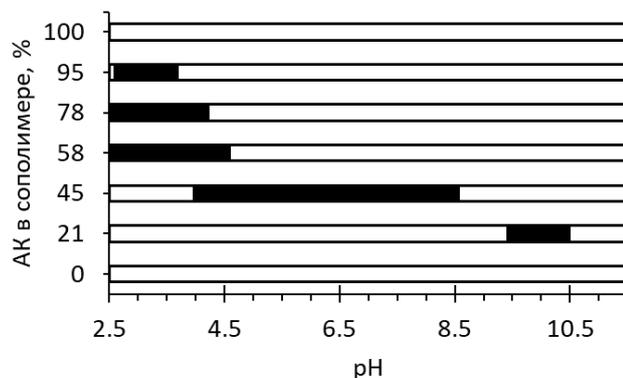


Рисунок 18 – Области нерастворимости (закрашенные черным) сополимеров ВА-АК. Концентрация полимера составила 0.5 мг/мл,  $\text{NaCl}$  0.03М, температура  $20^\circ\text{C}$ , титрант  $\text{HCl}$  0.1М

Кислотно-основные свойства полимеров изучали потенциометрическим титрованием. В случае ПАК, кислотность снижается при уменьшении степени ионизации из-за электростатических эффектов. Наклон кривой рК- $\alpha$  для ПВА больше, чем для ПАК, поскольку при добавлении кислоты к ПВА между звеньями образуются связи  $\sim\text{NH}_3^+\cdots\text{NH}_2\sim$  [239], которые значительно уменьшают основность ПВА в ходе протонирования. Подобное поведение наблюдалось для полиэтиленимина [240] и интерпретировалось как увеличение основности некоторых аминогрупп вследствие образования водородных связей  $\sim\text{H}_2\text{N}\cdots\text{H}_3\text{N}\sim$ . Дальнейшее протонирование звеньев может быть термодинамически невыгодным из-за разрушения водородных связей.

Сополимеры ВА-АК демонстрируют еще меньшие, чем у ПВА и ПАК, значения рК (Рисунок 19). Такая необычная кислотность сополимеров может быть связана с образованием связей между звеньями  $\sim\text{COOH}\cdots\text{H}_2\text{N}\sim$  и  $\sim\text{H}_2\text{N}\cdots\text{H}_3\text{N}\sim$  (Рисунок 20). В результате даже в кислой среде (рН 2.5) звенья макромолекул протонированы лишь частично. Включение всего 5% звеньев ВА в полимер приводит к понижению значений рК сополимера в сравнении с ПАК. Значения рК сополимеров, содержащих 21-58% АК, ниже 2.5, что характерно для кислот средней силы.

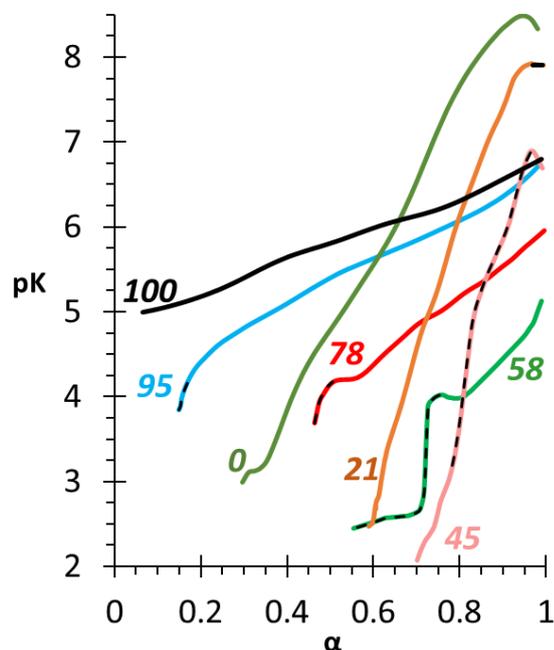


Рисунок 19 – Зависимость рК от степени ионизации  $\alpha$  АК и сопряженной кислоты ВА для сополимеров ВА-АК. Черная штрихованная часть кривой – область нерастворимости сополимера. Число указывает содержание АК, мол. %. Концентрация полимера составила 0.5 мг/мл, NaCl 0.03М, температура 20°C, титрант HCl 0.1М

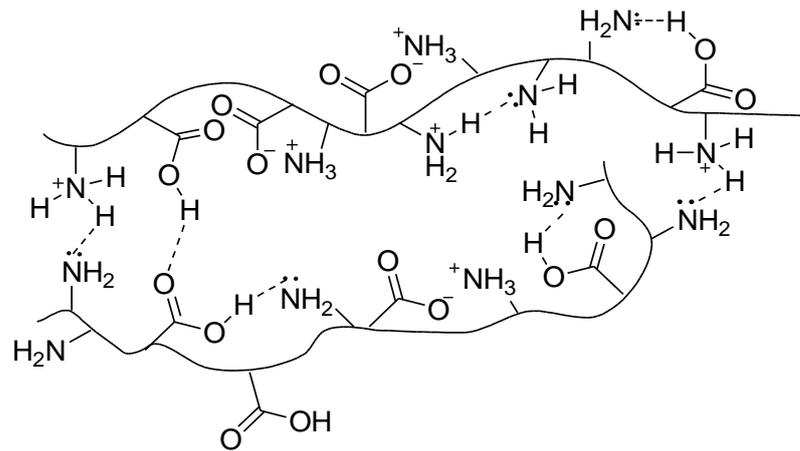


Рисунок 20 – Образование ионных и водородных связей в сополимерах ВА-АК

Необычные кислотно-основные свойства сополимеров ВА-АК проявляются в характере зависимости степени ионизации  $\alpha$  от степени нейтрализации ( $\beta$ ), которая соответствует добавлению щелочи к полимеру в кислой форме (Рисунок 21). Обычно значения  $\alpha$  и  $\beta$  равны друг другу с небольшими отклонениями из-за гидролиза или самоионизации при  $\beta = 0$  или 1, и для ПАК это соблюдается. Однако для ПВА при  $\beta = 0$  степень ионизации составляет около 0.3, что соответствует наличию 30% непротонированных звеньев. Отклонения от ПАК становятся еще более заметными для сополимеров.

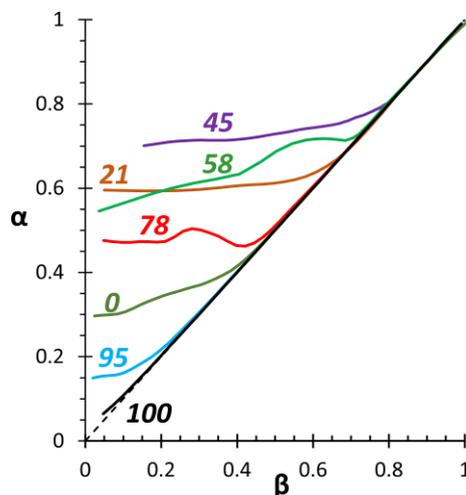


Рисунок 21 – Зависимость степени ионизации  $\alpha$  от степени нейтрализации ( $\beta$ ) звеньев АК и звеньев сопряженной кислоты ВА. Указано содержание АК звеньев в полимере

Сополимеры ВА-АК нерастворимы в определённых областях рН, и вязкость сополимеров уменьшается при приближении к области нерастворимости (Рисунок 22). Исходя из данных вискозиметрии, сополимеры можно разделить на две группы: образцы с 58-95% и 21-45% АК звеньев. Первая группа демонстрирует поведение, типичное для

полимерных кислот: низкая вязкость в области рН 4-5, резкое увеличение при увеличении рН и выход значений вязкости на плато при рН 7-8. Поведение второй группы близко к полимерным основаниям: вязкость уменьшается с ростом рН, и в случае ВА-АК-45 возрастает после рН 10, когда сополимер становится растворимым. Подобные закономерности можно наблюдать на рисунках 19 и 21. Увеличение содержания ВА в группе «поликислот» (58-100% АК) расширяет область аномальной зависимости  $\alpha$  от  $\beta$  (Рисунок 21) и сдвигает кривые рК- $\alpha$  в более кислую область (Рисунок 19). Поведение второй группы полимеров (0-45% АК) противоположно первой, а граница между ними находится в области 50% АК.

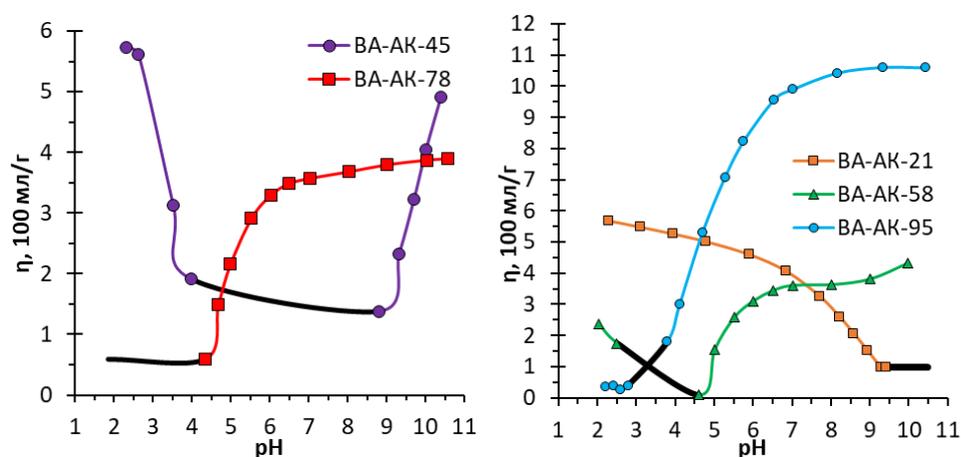


Рисунок 22 – Зависимость вязкости сополимеров ВА-АК от рН. Черные линии – области нерастворимости сополимеров. Концентрация полимеров 10 мМ, NaCl 30 мМ

По данным DLS, в растворах гомополимеров ПАК и ПВА присутствуют частицы размерами 1-20 нм (свободные макромолекулы) и более 100 нм (ассоциаты макромолекул) (Рисунок 23). Такое поведение типично для полиэлектролитов, например, для ПАК и полиметакриловой кислоты наблюдалось бимодальное распределение частиц по размерам при различных рН [241-244]. Сополимеры ВА-АК содержат частицы с  $R_h$  20-80 нм, которые могут относиться к агрегатам макромолекул, а также примесь частиц большего размера. Частицы размерами 20-80 нм могут быть стабилизированы благодаря системе водородных связей. Стоит упомянуть, что интенсивность рассеянного света пропорциональна радиусу частиц в шестой степени [245], и агрегаты частиц с  $R_h > 400$  нм присутствуют в малых количествах.  $\zeta$ -потенциал частиц уменьшается с увеличением содержания кислотных звеньев в сополимере и ростом рН (Таблица 13).

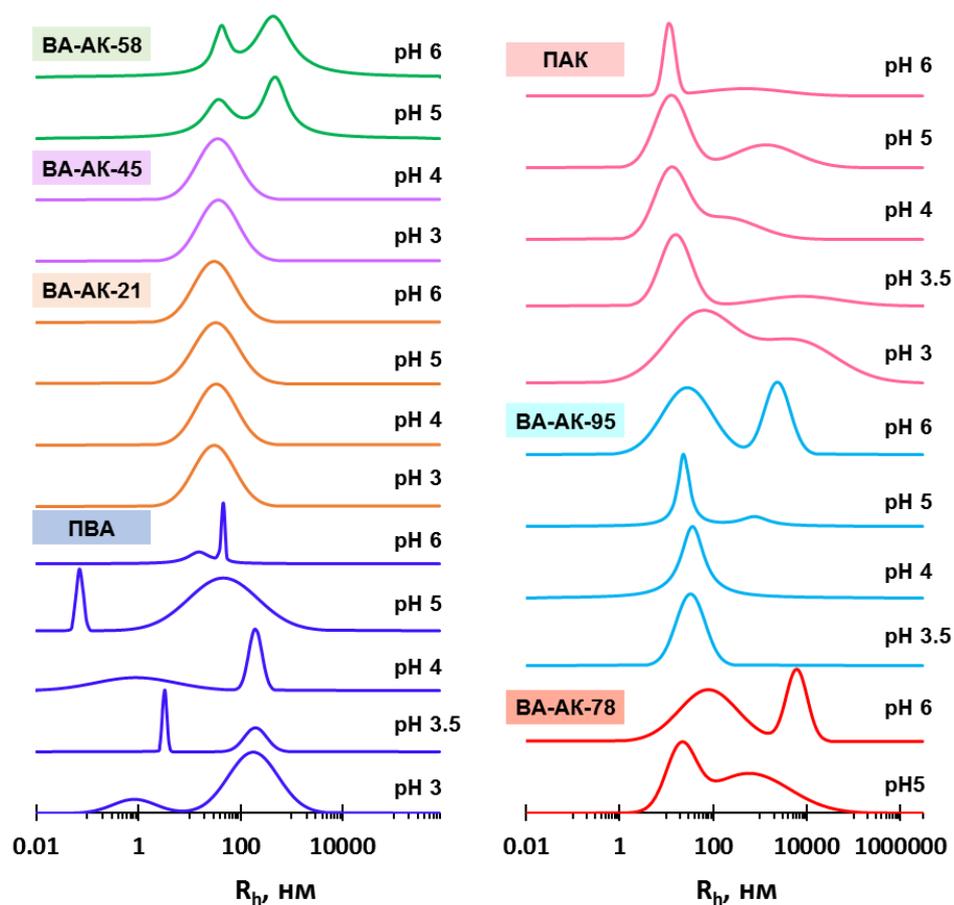


Рисунок 23 – Распределение частиц по размерам в растворах ПАК, ПВА и сополимеров ВА-АК при различных рН

Таблица 13 – Размер и  $\zeta$ -потенциал частиц ПАК, ПВА и сополимеров ВА-АК в 30 мМ NaCl при 20°C

Полимер	рН	$R_h$ , нм	$\zeta$ -потенциал, мВ
ПВА	3.0	0.8(15), 180(85)	12.0
	3.5	3.3(35), 200(65)	8.0
	4.0	0.9(55), 200(45)	5.0
	5.0	3.1(10), 170(90)	7.0
	6.0	480	23.5
ВА-АК-21	3.0	30	16.5
	4.0	34	7.0
	5.0	33	4.5
	6.0	31	19.0
ВА-АК-45	3.0	37	4.5
	3.5	36	-1.0
ВА-АК-58	5.0	39(40), 440(60)	-3.0
	6.0	45(25), 440(75)	-7.5
ВА-АК-78	5.0	20(35), 580(65)	-7.5
	6.0	72(57), 3300(43)	-7.5

Полимер	pH	R <sub>h</sub> , нм	ζ-потенциал, мВ
ВА-АК-95	3.5	32	-13.0
	4.0	36	-13.0
	5.0	25(75), 760(25)	-20.0
	6.0	28(65), 2300(35)	-23.0
ПАК	3.0	12.5(29), 96(71)	-7.0
	3.5	25(43), 344(57)	-10.5
	4.0	12(60), 160(40)	-13.0
	5.0	13(63), 1300(37)	-17.5
	6.0	11(58), 470(40)	-19.0

#### 2.1.4 Сополимеры винилимидазола с виламином и акриловой кислотой

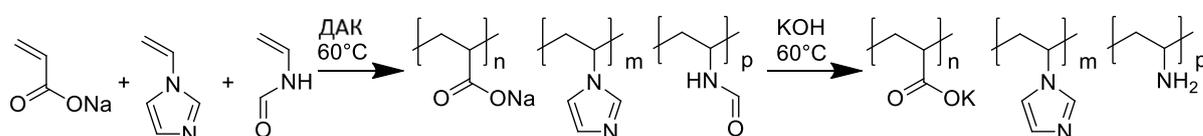


Рисунок 24 – Получение сополимеров винилимидазола с виламином и акриловой кислотой (ВИ-ВА-АК)

Тройные сополимеры винилимидазола с виламином и акриловой кислотой (ВИ-ВА-АК) получали гидролизом соответствующих сополимеров винилимидазола с винилформамидом и акриловой кислотой (ВИ-ВФА-АК), синтезированных в условиях радикального инициирования в присутствии ДАК в воде при pH 7 (Рисунок 24, Таблица 14). Состав сополимеров ВИ-ВФА-АК определяли при помощи <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии (Рисунок 25), используя сигналы протонов имидазольного кольца (NCHNH, 6.4–7.1 ppm; NHCH, 7.1–8.1 ppm), протонов формамидной группы (NHCH[O], 7.9–8.1 ppm) и протонов основной цепи (CH<sub>2</sub> 1.0–2.5 ppm, CH 2.6–4.5 ppm). В связи с перекрыванием сигнала формамидной группы сигналом протоном имидазола, долю ВФА вычисляли следующим образом: вклад протона ВИ в область 7.1-8.1 м.д. (один протон имидазола + один протон формамидной группы), рассчитанный как ½ интеграла при 6.4-7.1 м.д. (два протона имидазола), вычитали из интеграла области 7.1-8.1 м.д.

Таблица 14 – Синтез сополимеров ВИ-ВФА-АК

Шифр	Состав мономерной смеси, мол. %			Время реакции, ч	Выход, %	Состав сополимера, мол. %		
	АК+АК-Na	ВИМ	ВФА			АК+АК-Na	ВИМ	ВФА
МС220-1	65.5	19.8	14.7	5	40.2	75.5	11.2	13.2

Шифр	Состав мономерной смеси, мол. %			Время реакции, ч	Выход, %	Состав сополимера, мол. %		
	АК+АК-Na	ВИМ	ВФА			АК+АК-Na	ВИМ	ВФА
МС220-2	44.8	27.9	27.3	6	62.2	65.3	17.4	17.3
МС220-3	10.1	44.6	45.3	6	41.6	37.0	37.0	26.0
МС3919	20.2	37.3	42.5	6	86.8	24.8	39.0	36.2

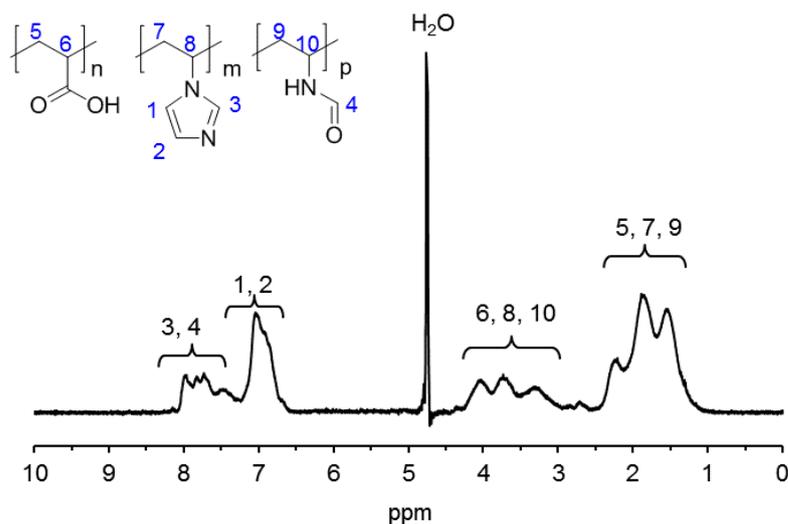


Рисунок 25 – Типичный  $^1\text{H}$  ЯМР спектр сополимера ВИ-ВФА-АК. Растворитель –  $\text{D}_2\text{O}$

Гидролиз сополимеров ВИ-ВФА-АК проводили в КОН. Как и в случае с сополимерами ВА-АК, в тройных сополимерах также образовывались звенья АК в форме калийной соли, которые частично перешли в форму АК-Н в ходе очистки диализом. Содержание АК-Н и АК-К рассчитывали по данным потенциметрического титрования (Таблица 15).

Таблица 15 – Состав тройных сополимеров ВИ-ВА-АК

Аббревиатура	АК, мол. %	Время, ч	Выход, %	Состав сополимера, мол. %			
				ВИ	ВА	АК-К	АК
ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>	74.7	24	71.6	11.2	13.3	65.5	10.0
ВИ <sub>17</sub> ВА <sub>17</sub> АК <sub>66</sub>	65.7	24	55.6	17.4	17.3	46.9	18.4
ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	37.0	24	61.5	36.8	26.3	15.2	21.7
ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>	24.8	48	71.5	39.0	36.2	18.7	6.1

Полученные сополимеры ВИ-ВА-АК являются полиамфолитами и при определенных рН нерастворимы (Рисунок 26). Тройные сополимеры демонстрируют пониженные в сравнении с гомополимерами значения рК (Рисунок 27), что может быть

связано со взаимодействием кислотных групп с основными, подобно сополимерам ВА-АК.

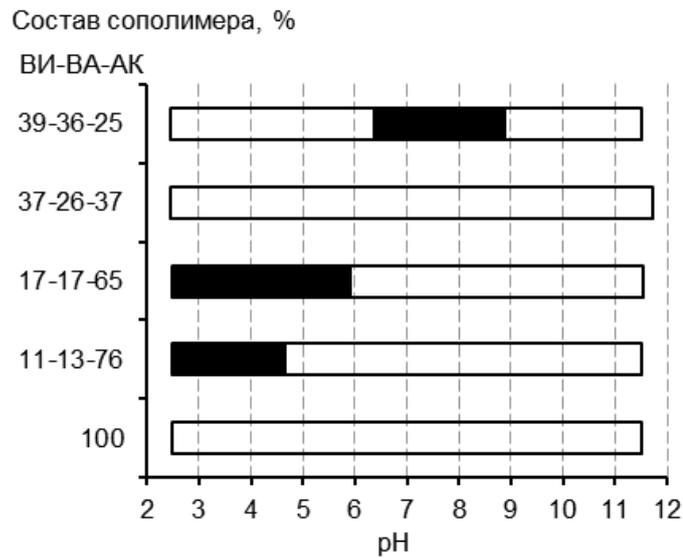


Рисунок 26 – Области нерастворимости (закрашенные прямоугольники) сополимеров ВИ-ВА-АК в воде. Концентрация полимера составила 1.5 мг/мл, NaCl 0.1М, титрант HCl 0.1М, температура 25°C

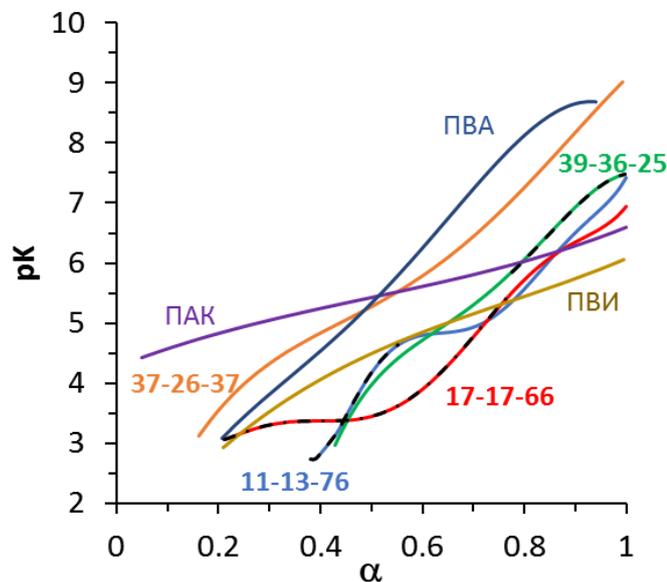


Рисунок 27 – Зависимость  $pK$  от степени ионизации  $\alpha$  сопряженной кислоты сополимеров ВИ-ВА-АК. Указано содержание ВИ/ВА/АК в сополимерах, мол. %. Области нерастворимости полимеров обозначены черными пунктирными линиями. Концентрация полимера составила 1.5 мг/мл, NaCl 0.1М, титрант HCl 0.1М, температура 25°C

В водных растворах сополимеров как в нейтральной, так и в щелочной области присутствуют ассоциаты макромолекул радиусами 10-50 нм и >100 нм (Рисунок 28).

Измерение светорассеяния при  $30^\circ$  более чувствительно к крупным частицам, чем при  $90^\circ$ . В связи с этим в некоторых случаях на кривых распределения при  $90^\circ$  наблюдается одна мода, а при  $30^\circ$  – две моды (например,  $VI_{37}VA_{26}AK_{37}$  и  $VI_{17}VA_{17}AK_{66}$  при pH 9.5). Также, размер частиц крупной фракции, рассчитанный для  $30^\circ$ , выше такового для  $90^\circ$ .

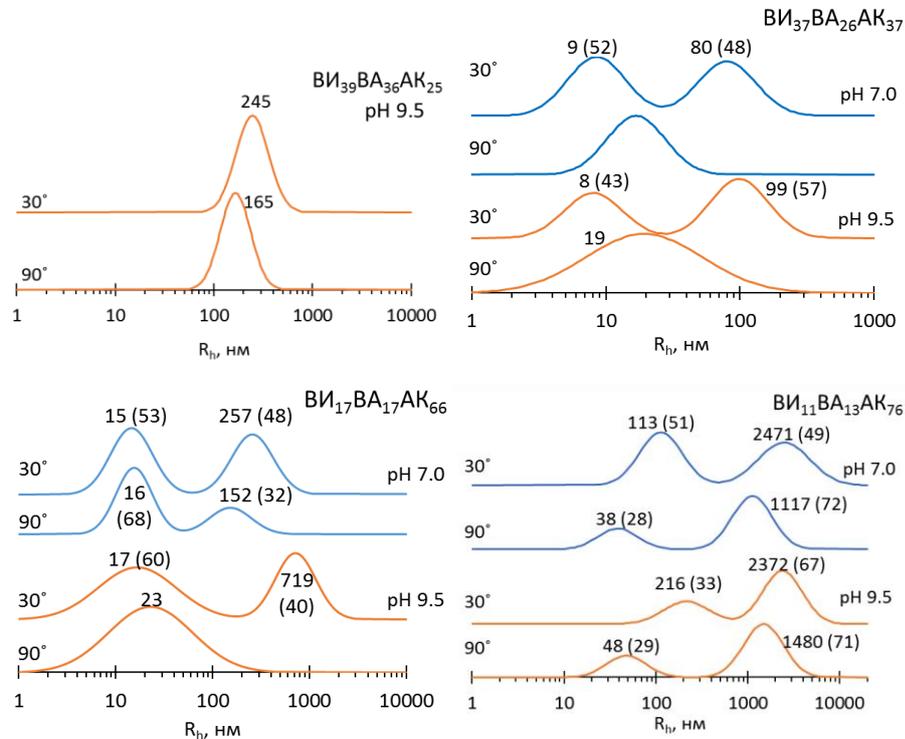


Рисунок 28 – Распределение частиц по размерам в водных растворах тройных сополимеров, полученное при углах рассеивания  $30^\circ$  и  $90^\circ$ . Для пиков указаны радиус частиц и интенсивность, %

### 2.1.5 Набор (со)полимеров, используемый для моделирования биоминерализации

Полимеры, используемые в экспериментах по получению карбоната и фосфата кальция (Таблица 16), содержат кислотные карбоксильные, основные аминные и гидрофильные слабоосновные имидазольные группы, способные выступать в качестве анионов и электронодонорных агентов при взаимодействии с ионами металлов. Эксперименты по получению карбоната и фосфата кальция в присутствии упомянутых полимеров проводились при pH 9 и 10 соответственно, где все полимеры растворимы и практически полностью ионизованы ( $\alpha \approx 0.9-1.0$ ).

Таблица 16 – Состав гомополимеров и сополимеров, используемых для экспериментов по получению карбоната и фосфата кальция

№	Наименование*	Структурная формула	Состав	ММ, кДа	Размер частиц в растворе (угол рассеяния 90°, λ = 637 нм); R <sub>n</sub> , нм (I, %)			ζ-потенциал			α при рН 9	Источ-ник
					рН 8	рН 9	рН 10	рН 8	рН 9	рН 10		
1	ПАК-1816		-	1816	-	-	-	-	-	-	-	-
2	ПАК-255		-	255	20 (70), 190 (30)	10 (67), 203 (33)	18 (61), 230 (39)	-15.1	-35.0	-35.2	0.98	-
3	ПАК-160		-	160	-	-	-	-	-	-	-	-
4	ПАК-20		-	20	3 (54), 114 (46)	3 (46), 74 (54)	5 (48), 79 (52)	-6.0	-13.8	-15.8	-	[246]
5	ПВА-7		-	7	1 (100)	3 (100)	5 (100)	7.5	3.1	0.6	-	[247]
6	ПВА-15		-	15	21 (100)	23 (100)	22 (100)	5.5	2.2	2.2	0.83	
7	ПВА-470		-	470	28 (100)	60 (100)	31 (100)	25.6	12.0	9.6	-	
8	ПВИ		-	160	4 (50), 182 (50)	3 (100)	5 (100)	3.4	-1.8	-2.3	1.00	[248]
9	ВИ-ВА-75		n:m = 25:75	274	17 (100)	18 (100)	18 (100)	17.9	10.9	13.6	0.88	**
10	ВИ-ВА-47		n:m = 53:47	128	12 (100)	12 (100)	12 (100)	7.5	0.8	-0.4	0.95	**
11	ВИ-ВА-18		n:m = 82:18	99	11 (100)	11 (100)	10 (100)	0.1	0.5	-1.3	0.98	**
12	ВА-АК-32		n:m = 68:32	16.3***	57 (6), 202 (94)	22 (3), 618 (97)	15 (7), 123 (93)	7.1	-1.3	-11.2	1.00	**
13	ВА-АК-40		n:m = 60:40	14.3***	8 (8), 67 (92)	16 (30), 152 (70)	18 (30), 225 (70)	-8.0	-9.8	-18.8	1.00	**
14	ВА-АК-48		n:m = 52:48	12.0***	12 (44), 149 (56)	22 (67), 306 (33)	21 (60), 268 (40)	-13.4	-15.4	-24.0	1.00	**
15	ВА-АК-62		n:m = 38:62	10.1***	12 (52), 167 (48)	11 (48), 185 (52)	14 (53), 195 (47)	-12.4	-19.5	-25.3	1.00	**

№	Наименование*	Структурная формула	Состав	ММ, кДа	Размер частиц в растворе (угол рассеяния 90°, λ = 637 нм); R <sub>n</sub> , нм (I, %)			ζ-потенциал			α при рН 9	Источник
					рН 8	рН 9	рН 10	рН 8	рН 9	рН 10		
16	ВА-АК-74		n:m = 26:74	8.1***	-	-	-	-	-	-	0.99	**
17	ВИ-АК-96		n:m = 4:96	-	18 (48), 496 (52)	20 (46), 627 (54)	14 (30), 567 (70)	-22.0	-24.0	-31.6	0.97	[231]
18	ВИ-АК-85		n:m = 15:85	2520	13 (80), 157 (20)	19 (100)	23 (100)	-23.9	-26.4	-30.8	0.97	
19	ВИ-АК-73		n:m = 27:73	-	9 (51), 50 (49)	6 (45), 39 (55)	13 (70), 185 (30)	-21.6	-30.4	-35.7	0.97	
20	ВИ-АК-56		n:m = 44:56	1060	16 (100)	15 (100)	14 (100)	-15.3	-17.3	-27.8	0.98	
21	ВИ-АК-35		n:m = 65:35	-	6 (44), 33 (56)	2 (20), 19 (80)	7 (47), 68 (53)	-12.8	-17.6	-33.2	0.98	
22	ВИ-АК-15		n:m = 85:15	280	11 (100)	11 (100)	14 (100)	-1.4	-3.9	-8.2	0.99	
23	ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>		n:m:k = 11:13:76	-	6 (10), 372 (90)	10 (21), 366 (79)	14 (23), 664 (77)	-19.9	-22.0	-24.9	0.98	**
24	ВИ <sub>17</sub> ВА <sub>17</sub> АК <sub>66</sub>		n:m:k = 17:17:66	-	20 (100)	19 (100)	13 (65), 209 (35)	-6.2	-13.9	-17.9	1.00	**
25	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>		n:m:k = 37:26:37	-	14 (100)	15 (100)	19 (100)	-0.7	-11.1	-12.2	0.89	**
26	ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>		n:m:k = 39:36:25	-	-	153 (100)	20 (33), 103 (67)	не раств.	-13.6	-20.0	0.96	**

\*Цифра в наименовании означает: молекулярную массу в кДа (гомополимеры), содержание звеньев (% мольный) виниламина (сополимеры ВИ-ВА) или акрилатных звеньев (сополимеры ВА-АК, ВИ-АК); в случае тройных полимеров индексы означают содержание звеньев каждого мономера.

\*\*Сополимеры, синтезированные в рамках данной работы.

\*\*\*Оценены по данным для сополимеров АК-ВФА.

В водных растворах используемые полимеры склонны к образованию ассоциатов макромолекул с радиусом около 30 нм и более. Для ПАК и большинства АК-содержащих сополимеров характерно наличие двух типов частиц при рН 8-10 – это ассоциаты макромолекул 30-700 нм и частицы размерами 2-10 нм, которые можно отнести к мономолекулярным клубкам. В некоторых случаях наблюдается рост размеров ассоциатов при увеличении рН среды до 10. Для полиоснований (образцы ПВА, ВИ-ВА, ПВИ) наблюдалось мономодальное распределение частиц по размерам. В растворе ПВИ при рН 8 наряду с мономолекулярными клубками присутствуют ассоциаты размерами 182 нм. Стоит отметить, что интенсивность рассеяния пропорциональна радиусу частицы в шестой степени, поэтому числовая доля крупных частиц мала. В таблице 8 доля частиц соответствующего размера (I, %) указана без учета размера частиц.

Заряд полимерных частиц определяется как соотношением кислотных и основных групп в макромолекуле, так и рН среды. Ионизированные группы акриловой кислоты придают отрицательный заряд, протонированные аминогруппы – положительный. С ростом рН степень ионизации групп АК увеличивается, а степень протонирования групп ВА уменьшается. Имидазольные фрагменты имеют слабую основность по сравнению с аминогруппами, и в условиях экспериментов гомополимер ПВИ демонстрирует близкие к нулю значения  $\zeta$ -потенциалов.

При оценке  $\zeta$ -потенциалов образцов ПВА и ПАК обнаружено, что при увеличении молекулярной массы данных гомополимеров увеличивается абсолютное значение  $\zeta$ -потенциала (Рисунок 29).  $\zeta$ -потенциал представляет собой величину, зависящую от электрофоретической подвижности макромолекул, которая, в свою очередь определяется не только зарядом полимерных клубков, но их конформацией и проницаемостью, что вероятно и приводит к зависимости  $\zeta$ -потенциала от молекулярной массы. ПВИ имеет меньшие значения дзета-потенциалов, чем ПВА, ввиду его меньшей основности. Отрицательный заряд ПВИ при рН 9 и 10 может быть обусловлен способностью имидазольных взаимодействовать с анионами [249].

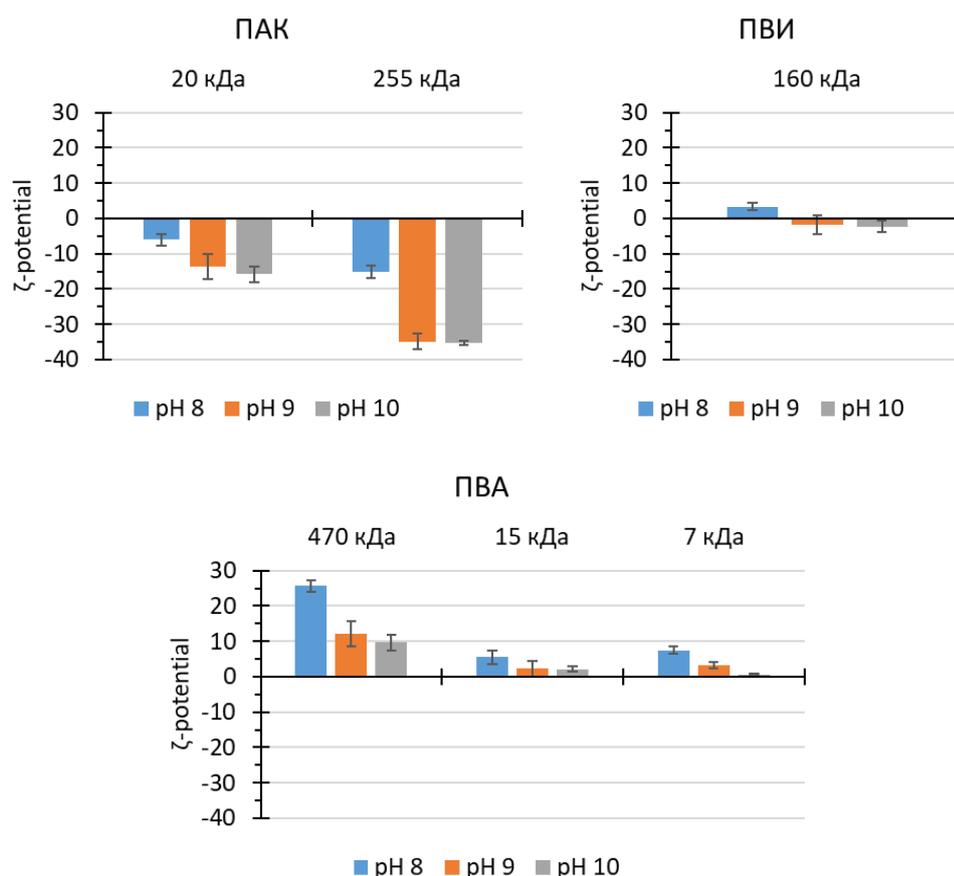


Рисунок 29 – Дзета-потенциалы частиц гомополимеров в водных растворах. Концентрация полимера 10 мМ, NaCl 20 мМ, 20°С

АК-содержащие сополимеры при pH 8-10 имеют в основном (за исключением ВА-АК-32) отрицательные значения дзета-потенциалов, что обусловлено наличием  $-\text{COO}^-$  групп (Рисунок 30). В случае сополимера ВА-АК-32 вклад аминогрупп, способных протонироваться в данных условиях, в общий заряд полимерных частиц превышает таковой от карбоксильных групп, что приводит к нулевому заряду при pH 9 и положительному при pH 8. В рядах АК-содержащих сополимеров значения дзета-потенциалов уменьшаются при увеличении содержания карбоксильных групп. Образец  $\text{ВИ}_{39}\text{ВА}_{36}\text{АК}_{25}$  имеет большую величину  $\zeta$ -потенциала, чем  $\text{ВИ}_{37}\text{ВА}_{26}\text{АК}_{37}$ , что может быть связано с близостью условий исследования к области нерастворимости сополимера  $\text{ВИ}_{39}\text{ВА}_{36}\text{АК}_{25}$ . Положительное значение  $\zeta$ -потенциала у  $\text{ВИ}_{37}\text{ВА}_{26}\text{АК}_{37}$  при pH 7.0 обусловлено большим содержанием звеньев ВА по сравнению с  $\text{ВИ}_{11}\text{ВА}_{13}\text{АК}_{76}$  и  $\text{ВИ}_{17}\text{ВА}_{17}\text{АК}_{66}$ .

Заряд частиц ВИ-ВА увеличивается с ростом содержания ВА в сополимере. Образец ВИ-ВА-18, обогащенный звеньями винилимидазола, имеет практически нулевой заряд при pH 8-10 (Рисунок 30).

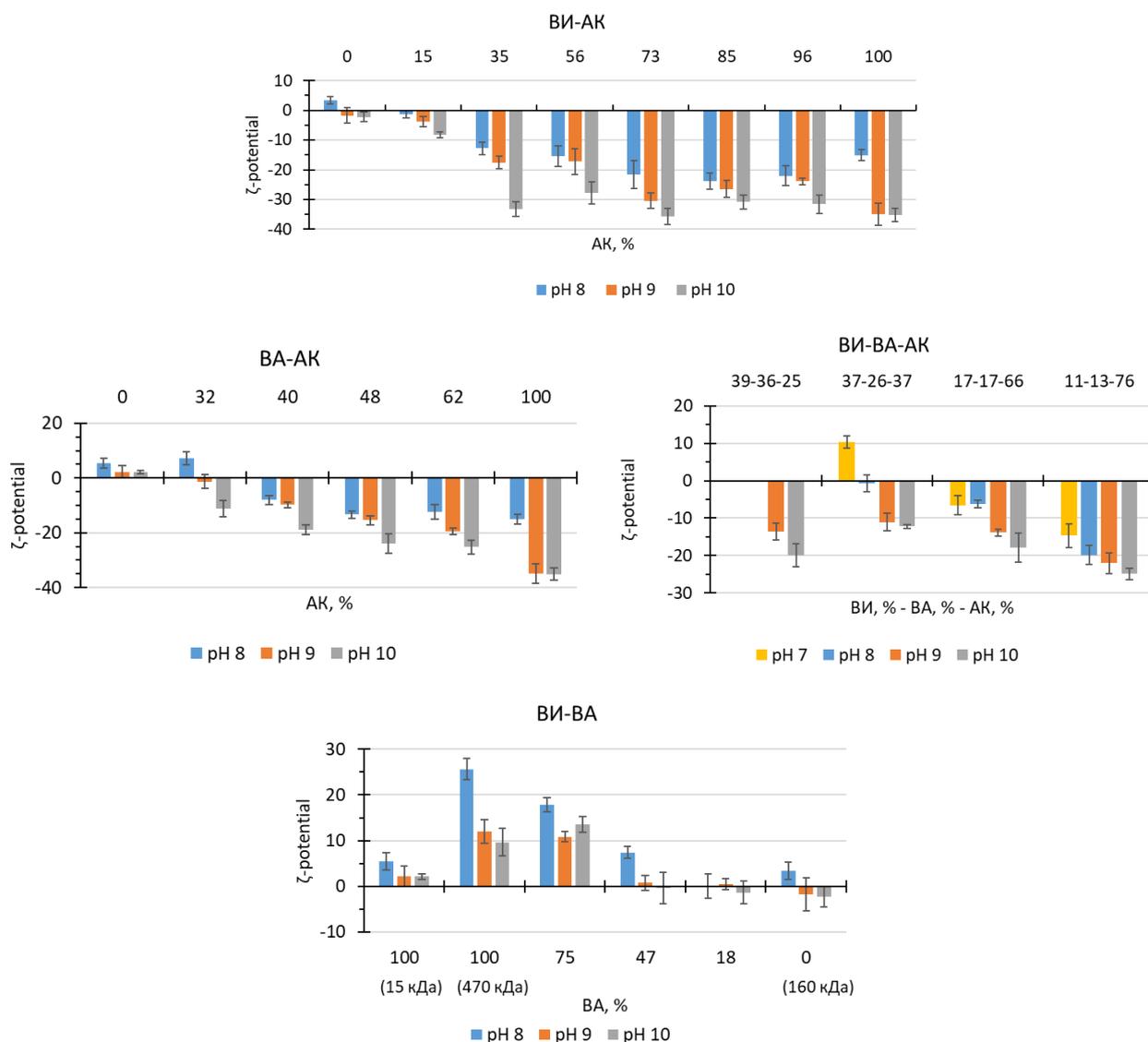


Рисунок 30 - Дзета-потенциалы частиц сополимеров в водных растворах. Концентрация полимера 10 мМ, NaCl 20 мМ, 20°C

Основные результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в работах [250, 251].

## 2.2 Синтез карбоната кальция в присутствии полимеров

Эксперименты по получению карбоната кальция в присутствии полимеров проводили в щелочной среде при pH 9, где растворимость карбоната кальция мала и составляет около 1 мкг/л [91]. Смешивание растворов хлорида кальция и карбоната натрия в соотношении 1: 1 при pH 9 сопровождается образованием осадка карбоната кальция. Добавление к этой системе различных полимеров приводило к получению как осадков, так и прозрачных или опалесцентных растворов, стабильных в течение 3 и более часов. Так, в присутствии ПАК-20 и ПВА-15 образовывались стабильные дисперсии

частиц, и осаждения карбоната кальция не наблюдалось. Увеличение ММ полимеров ухудшало стабилизирующий эффект, так ПАК-255 стабилизирует карбонат кальция при двойном избытке полимера по отношению к  $\text{Ca}^{2+}$ , а ПВА-470 образует осадки при двух соотношениях. Сополимер ВИ-АК-96 имеет большую ММ, чем ПАК-255, и не способен стабилизировать частицы  $\text{CaCO}_3$  в растворе при исследуемых соотношениях полимер/ $\text{Ca}^{2+}$ . ПВИ, сополимеры ВИ-ВА и сополимеры ВИ-АК с содержанием АК менее 70% приводят к осаждению карбоната кальция. Сополимеры ВА-АК и ВИ-ВА-АК стабилизировали образующийся карбонат кальция в большем диапазоне составов (Рисунок 31).

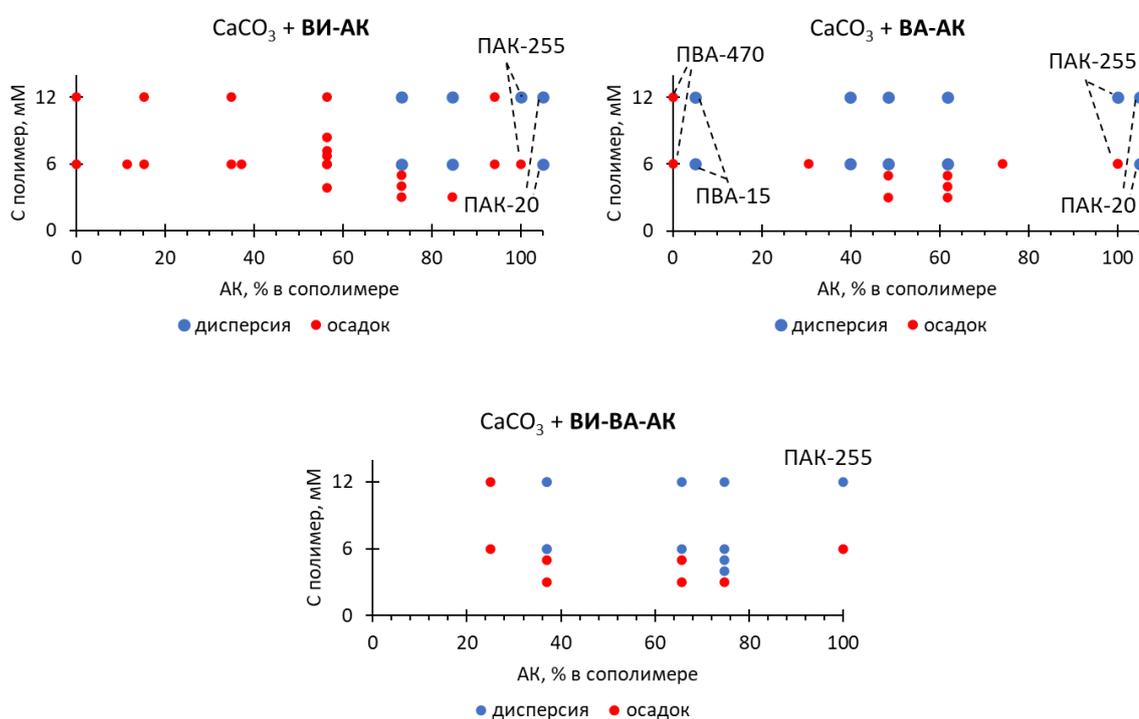


Рисунок 31 – Образование  $\text{CaCO}_3$  в присутствии сополимеров. Красные круги – осадок, синие круги – дисперсия, стабильная минимум 3 часа. Концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{CO}_3^{2-}$  составляли 6 мМ

Проведена оценка связи величины дзета-потенциала полимера с его стабилизирующей способностью. При рассмотрении случаев образования дисперсий частиц (когда стабильность  $> 0$ ) можно отметить тенденцию к увеличению стабильности образующихся композитных частиц при увеличении значения (по модулю) дзета-потенциала полимера (Рисунок 32). В то же время некоторые полимеры, имеющие потенциал в области -10 – -35 мВ (ВИ-АК-96, ВИ-АК-56, ВИ-АК-35, ВИ<sub>39</sub>ВА<sub>36</sub>АК<sub>25</sub>), не стабилизировали карбонат кальция в растворе в условиях эксперимента. Таким образом,

величина дзета-потенциала стабилизирующего полимера не является единственной определяющей характеристикой стабильности композитных частиц. Вероятно, вклад в стабилизирующую способность вносят сразу несколько характеристик полимера – доля способных взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$  функциональных групп, молекулярная масса полимера, поверхностный заряд макромолекулярного клубка.

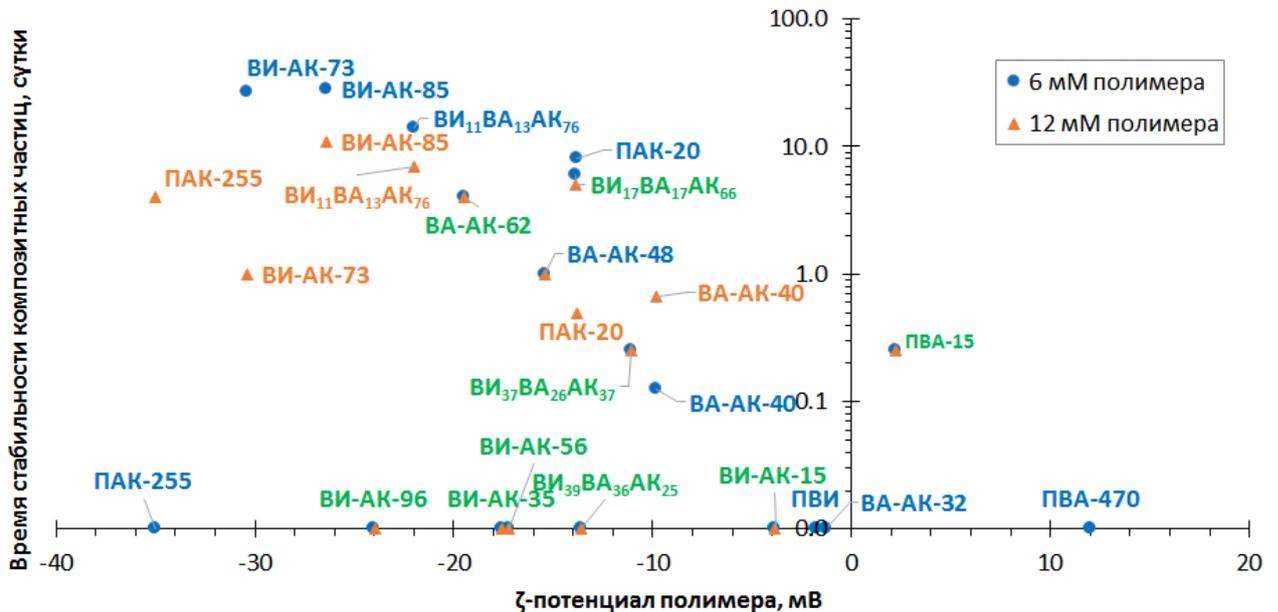


Рисунок 32 – Зависимость времени стабильности дисперсий композитных частиц в водном растворе от  $\zeta$ -потенциала стабилизирующего полимера. Синим цветом отмечены опыты с начальными концентрациями полимер:  $\text{Ca}^{2+} : \text{CO}_3^{2-} = 6 : 6 : 6$  мМ, оранжевым цветом -  $12 : 6 : 6$  мМ. Наименование полимера указано возле точек. Зеленый цвет подписи указывает на наложение точек с разной концентрацией одного и того же полимера друг на друга

Дальнейшее исследование реакционных смесей проводили в зависимости от стабилизирующей способности полимера. В случае образования видимого невооруженным глазом осадка после смешения компонентов, реакцию смесь оставляли на 24 часа при комнатной температуре и затем отделяли осадок центрифугированием, промывали и лиофильно сушили. Содержание кальция в осадках определяли атомно-абсорбционной спектроскопией, и на основании полученных данных оценивали содержание  $\text{CaCO}_3$  в образце. Структуру и морфологию осадка изучали методами XRD и SEM. В случае образования прозрачных или опалесцентных растворов, реакцию смесь пропускали через мембрану с размером пор 0.45  $\mu\text{m}$  для обеспыливания, и исследовали полученную дисперсию частиц при помощи методов

динамического рассеяния света (DLS) и просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

### 2.2.1 Композитные осадки на основе карбоната кальция и полимеров

Данные о составе осадков позволяют рассчитать долю ионов кальция, оставшихся в растворе (Таблица 17). Все полимеры ингибируют полное осаждение кальция, однако наибольший эффект наблюдается у ПВА и АК-содержащих полимеров и усиливается с ростом содержания АК в полимере. С ростом содержания кислотных звеньев в полимере уменьшается доля осажденного кальция, что хорошо заметно в рядах сополимеров ВИ-АК и ВА-АК. Так, в присутствии сополимеров с высоким содержанием АК – ВИ-АК-96 и ВА-АК-74 – после образования осадка значительная доля кальция (95% и 84%, соответственно) остается в растворе. Содержание  $\text{CaCO}_3$  в осадках (Таблица 17) уменьшается с увеличением содержания АК в сополимерах ВИ-АК, что связано со способностью карбоксильных групп взаимодействовать с  $\text{Ca}^{2+}$  и ингибировать осаждение. Увеличение концентрации полимера усиливает ингибирующий эффект, что выражается в уменьшении выхода осадка и доли неорганической фазы в нём. ИК спектры осадков с содержанием карбоната кальция, близким к 100%, аналогичны спектру  $\text{CaCO}_3$ , полученному в отсутствие полимеров, и имеют характерные полосы 712, 875 и 1418  $\text{cm}^{-1}$  (Рисунок 33). При содержании  $\text{CaCO}_3$  80% и менее в спектрах присутствуют сигналы, характерные для полимеров в области 600-1000  $\text{cm}^{-1}$ . Включение 50% и более полимера в осадок значительно изменяет его ИК спектр по сравнению с «чистым»  $\text{CaCO}_3$ . Так, в спектре Са-52 наблюдаются сильные полосы, характерные для ПАК (1640, 1550  $\text{cm}^{-1}$ , C=O и COO<sup>-</sup> соответственно).

Таблица 17 – Состав композитных осадков на основе карбоната кальция

Шифр	Полимер	*Концентрация полимера, мМ	Выход, %	** $\text{CaCO}_3$ , %	Выход по $\text{Ca}^{2+}$ , %
Blank	нет		100	100	100
Са-3	ПВИ	6	44.5	93.3	80.5
Са-52	ПАК-255	6	64.5	51.3	56.9
СаPVA-2	ПВА-470	6	23.5	80.3	27.0
Са-5	ВИ-АК-15	6	49.8	96.2	90.5
Са-32	ВИ-АК-15	12	30	99.0	85.5
Са-15	ВИ-АК-35	6	29.2	100	64.4
Са-33	ВИ-АК-35	12	31.9	73.3	67.3
Са-25	ВИ-АК-37	6	33.3	76.5	49.4
Са-14	ВИ-АК-56	3.84	45.8	77.7	56.9

Шифр	Полимер	*Концентрация полимера, мМ	Выход, %	**CaCO <sub>3</sub> , %	Выход по Ca <sup>2+</sup> , %
Ca-7	ВИ-АК-56	6	47.6	97.3	89.8
Ca-11	ВИ-АК-56	6.72	30.9	82.0	52.0
Ca-12	ВИ-АК-56	7.2	33.4	82.0	58.3
Ca-13	ВИ-АК-56	8.4	37.3	80.0	69.1
Ca-34	ВИ-АК-56	12	29.3	67.0	56.5
Ca-23	ВИ-АК-78	6	30.6	93.8	55.6
Ca-56	ВИ-АК-96	6	43.4	32.7	27.5
Ca-57	ВИ-АК-96	12	12.1	14.7	5.1
Ca-22	ВА-АК-32	6	41.2	86.3	58.1
***Ca-21	ВА-АК-40	6	34.5	99.7	
***Ca-20	ВА-АК-62	6	32.5	95.0	56.9
***Ca-19	ВА-АК-74	6	27.5	81.3	43.1
М-19	ВА-АК-74	12	11.1	50.7	16.0
Ca-50	ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>	6	36.8	85.5	55.8
Ca-51	ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>	12	28.8	84.0	61.6

\* Концентрации Ca<sup>2+</sup> и CO<sub>3</sub><sup>2-</sup> составили 6 мМ.

\*\* Содержание кальция пересчитано на содержание CaCO<sub>3</sub>.

\*\*\* Реакционная смесь была прозрачной в течение 2 часов после смешивания компонентов.

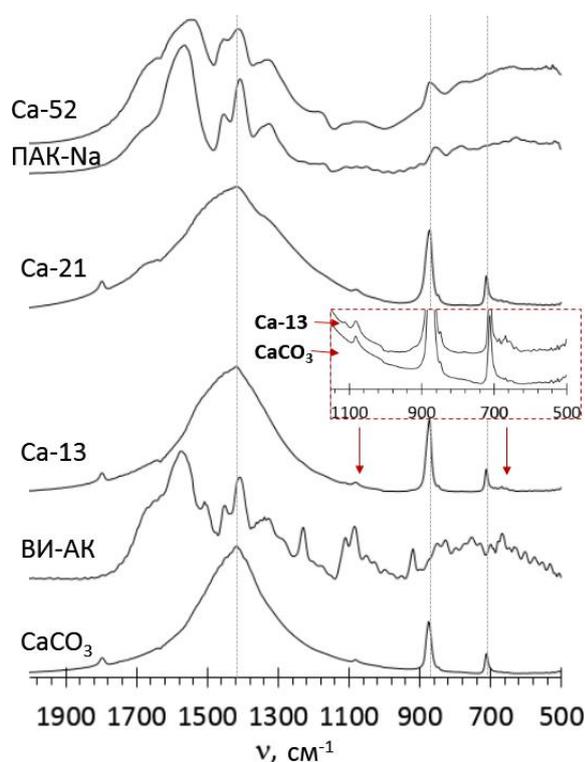


Рисунок 33 – ИК спектры CaCO<sub>3</sub>, композитных осадков и полимеров. Шифры соответствуют таблице 17

Карбонат кальция, полученный в отсутствие полимеров, состоит из кубических структур (Рисунок 34 А), что характерно для кальцита. Осаждение CaCO<sub>3</sub> в присутствии

ПВИ или ВИ-АК с низким содержанием АК (Рисунок 34 F-H) приводит к получению подобных кальциту кубических частиц. Увеличение содержания АК в сополимерах ВИ-АК приводит к образованию округлых частиц, а ПАК способствует формированию стержнеобразных структур (Рисунок 34 B-D), характерных для ватерита. При двукратном избытке полимера по отношению к  $\text{CaCO}_3$  не наблюдалось изменений в морфологии частиц (Рисунок 35). В случае сополимеров ВА-АК и тройных полимеров, влияние на форму частиц обнаруживается при меньшем содержании АК, чем в случае ВИ-АК. Сополимер ВА-АК-32 способствует формированию сферических структур, состоящих из ромбоэдрических пластин (Рисунок 36 F). Для ВА-АК-74 наблюдаются структуры с гладкой внешней оболочкой (Рисунок 36, A) и кристаллической внутренней структурой (Рисунок 36 B, C). Частицы  $\text{CaCO}_3$ , образующиеся в присутствии  $\text{VI}_{39}\text{VA}_{36}\text{AK}_{25}$ , имеют кубическую форму со сглаженными углами и пластинчатую структуру (Рисунок 37). Об образовании округлых краев карбоната кальция при  $\text{Ca}/\text{C} < 1$  докладывали авторы работы [114]. Это может объяснить образование округлых частиц  $\text{CaCO}_3$  в присутствии карбоксил- и аминокислотных полимеров. Возможно, в нашем случае взаимодействие функциональных групп полимеров с  $\text{Ca}^{2+}$  приводит к недостатку количества кальция ( $\text{Ca}/\text{C}$  становится меньше единицы), доступного для образования  $\text{CaCO}_3$ , что вызывает скругление края частицы. Таким образом, присутствие групп АК и  $-\text{NH}_2$  в полимере оказывает большее влияние на морфологию образующихся частиц, в отличие от полимеров, обогащенных имидазольными группами.

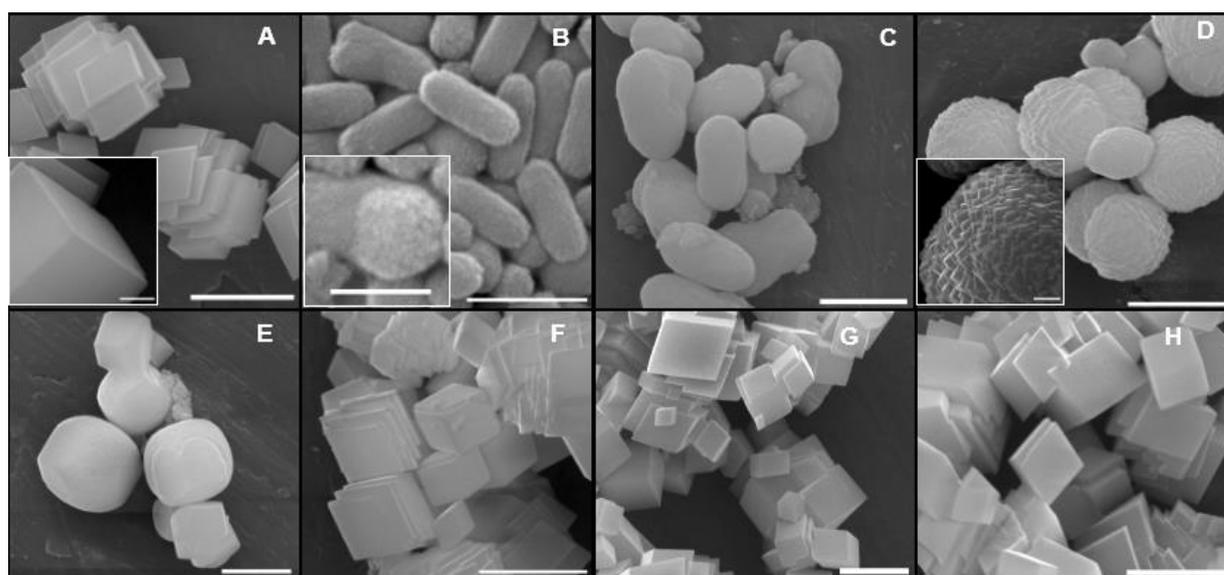


Рисунок 34 – СЭМ фотографии карбоната кальция, полученного в присутствии сополимеров ВИ-АК (полимер:  $\text{Ca}^{2+} = 1$ ). А - в отсутствие полимера, В – Са-52, С – Са-

56, D – Ca-7, E – Ca-25, F – Ca-15, G – Ca-5, H – Ca-3. Масштаб: А, С-Н – 5  $\mu\text{м}$ , В, врезка в А и D – 1  $\mu\text{м}$ , врезка в В – 500 нм. Шифры соответствуют таблице 17

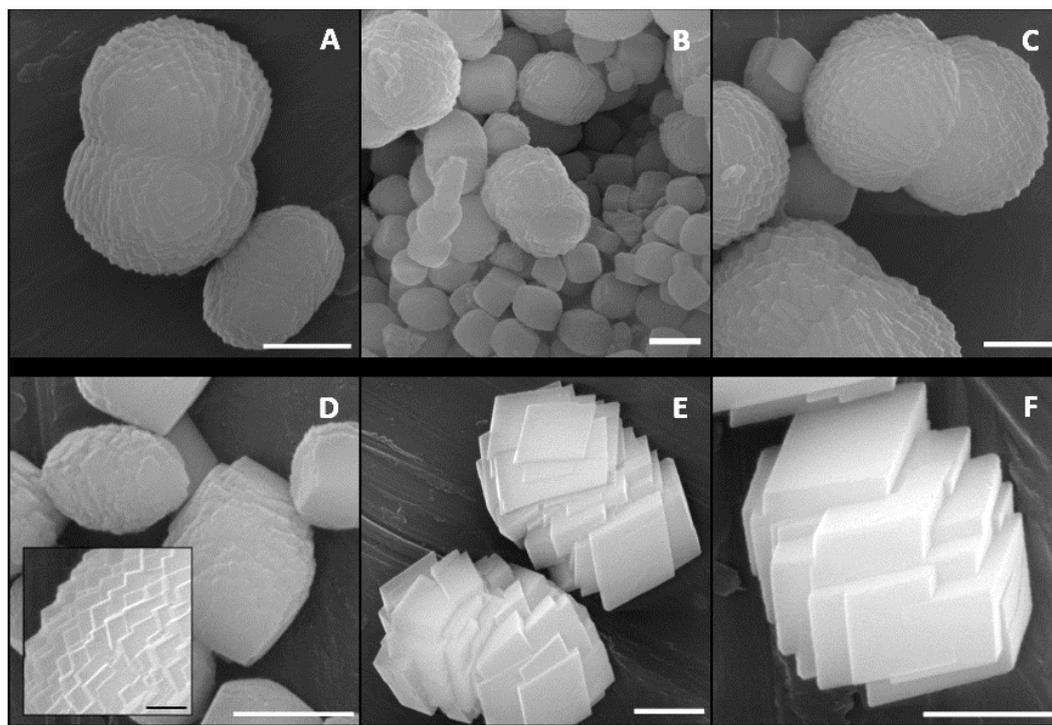


Рисунок 35 – СЭМ фотографии карбоната кальция, полученного в присутствии сополимеров ВИ-АК при соотношении полимер/ $\text{Ca}^{2+}$ , отличном от 1. А – Ca-11, В – Ca-12, С – Ca-13, D – Ca-34, E – Ca-33, F – Ca-32. Масштаб: 2  $\mu\text{м}$ , врезки – 500 нм. Шифры соответствуют таблице 17

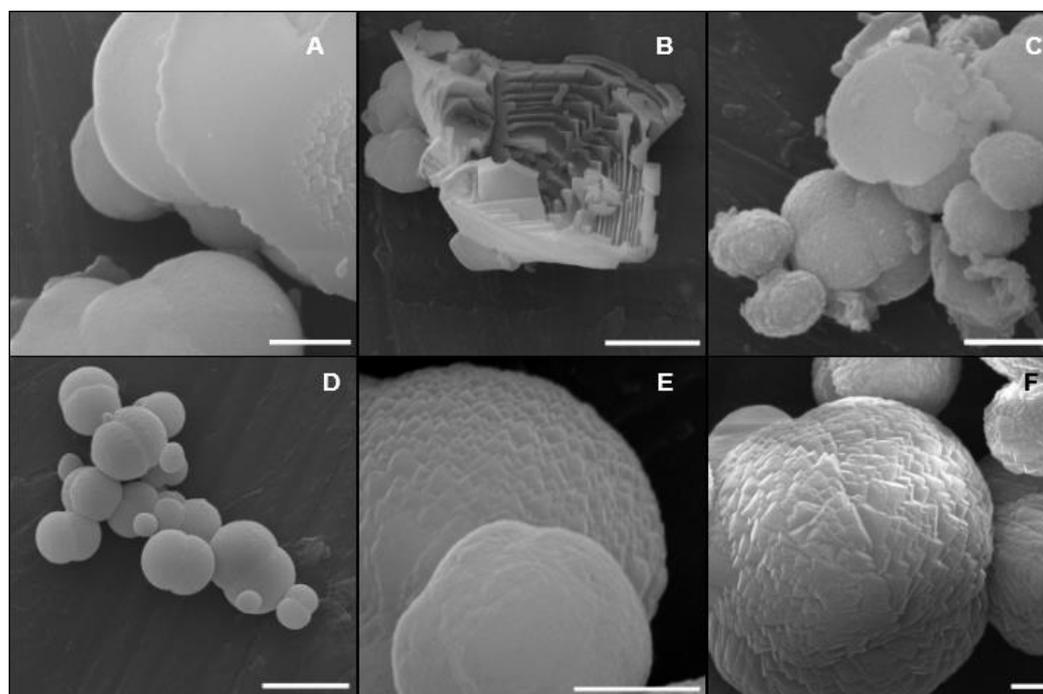


Рисунок 36 – СЭМ фотографии карбоната кальция, полученного в присутствии сополимеров ВА-АК. А, В – Ca-19, С – Ca-20, D, E – Ca-21, F – Ca-22. Масштаб: 2  $\mu\text{м}$  – А-С, Е, F и 10  $\mu\text{м}$  – D. Шифры соответствуют таблице 17

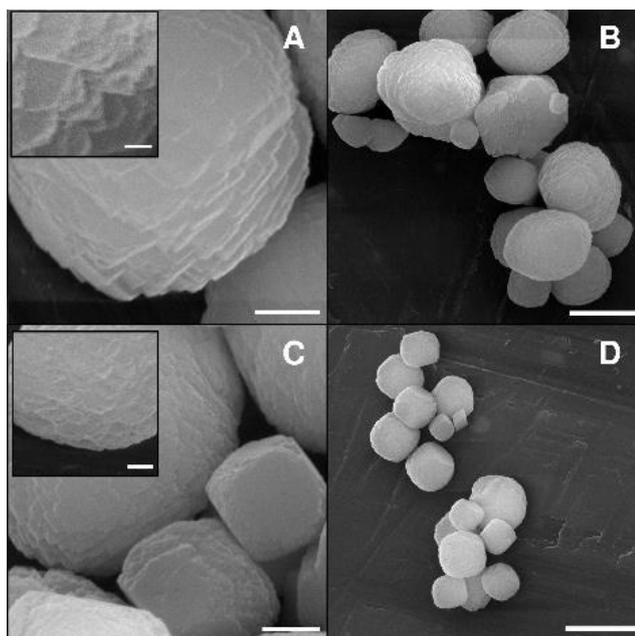


Рисунок 37 – СЭМ фотографии карбоната кальция, полученного в присутствии сополимера ВИ<sub>39</sub>ВА<sub>36</sub>АК<sub>25</sub>. А и В – Са-50, С и D – Са-51. Масштаб: А и С - 1  $\mu\text{м}$ , В и D - 5  $\mu\text{м}$ , вставка – 200 нм. Шифры соответствуют таблице 17

Для композитных осадков Са-7 ( $\text{CaCO}_3$  – ВИ-АК-56) и Са-21 ( $\text{CaCO}_3$  – ВА-АК-40), демонстрирующих морфологию частиц ватерита, и чистого  $\text{CaCO}_3$  получены рентгеновские спектры. Данные показали, что все образцы по кристаллической структуре представляют собой кальцит (Рисунок 38). Размеры кристаллитов композитных осадков, оцененные по площади когерентного рассеяния, значительно меньше, чем у чистого карбоната кальция (Таблица 18). Таким образом, полимеры не влияют на полиморфизм карбоната кальция, однако на микроуровне способны определять морфологию образующихся частиц. При рН 9 карбоксильные группы практически полностью ионизованы и способны взаимодействовать с ионами кальция. Аминогруппы в этих условиях проявляют высокую основность и могут связываться с кальцием посредством донорно-акцепторных взаимодействий. Возможно, именно взаимодействие функциональных групп полимера с поверхностью образующихся частиц карбоната кальция ограничивает их рост, что выражается в уменьшении размеров кристаллитов в композитных осадках. Можно предположить, что усиление взаимодействия полимеров с первичными частицами карбоната кальция при переходе от ПВИ к (со)полимерам, содержащим звенья ВА и, особенно АК, препятствует росту больших кристаллов кальцита и осадки формируются за счёт агрегации мелких кристаллов в шарообразные структуры.

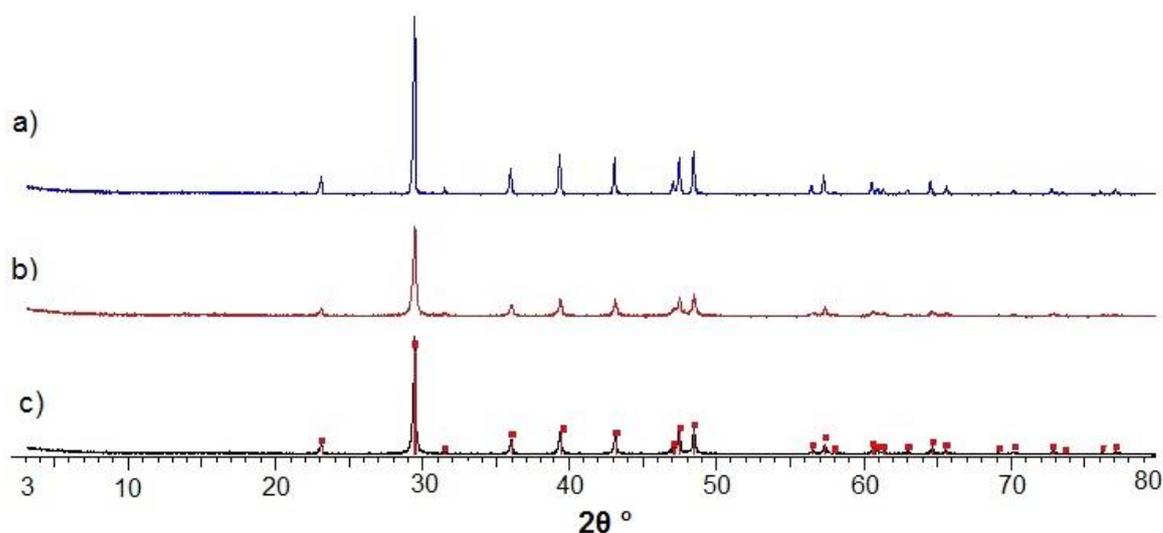


Рисунок 38 – Спектры рентгеновской порошковой дифракции для карбоната кальция (а; синий), Са-21 (b; красный), Са-7 (с; черный). Красными квадратами обозначены пики, соответствующие кальциту (из базы данных PDF № 00-047-1743). Шифры образцов соответствуют таблице 17

Таблица 18 – Данные рентгеновской порошковой дифракции

№	Фазовый состав	CSA, нм	Параметры элементарной ячейки, нм	Объем элементарной ячейки (нм <sup>3</sup> )
Са-21	Кальцит, 100%	34 (±5)	$a = 0.4980(3)$ $c = 1.7024(9)$	36.56(5)
Са-7	Кальцит, 100%	46 (±2)	$a = 0.4982(2)$ $c = 1.7035(7)$	36.61(3)
Са-0	Кальцит, 100%	75 (±2)	$a = 0.4989(1)$ $c = 1.7035(4)$	36.73(2)

### 2.2.2 Стабильные дисперсии наночастиц на основе карбоната кальция и полимеров

Образование дисперсий частиц, стабильных длительное время (от нескольких часов до нескольких суток) при смешивании  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , сополимера и  $\text{CaCl}_2$  наблюдалось при использовании ПАК-20 и карбоксилсодержащих сополимеров. По данным DLS, в большинстве дисперсий присутствуют два типа частиц с радиусом 10-100 нм, что близко к размерам первичных частиц, обнаруженных в карбонатных системах [252] и с радиусом >1000 нм, соответствующие агрегатам частиц (Таблица 19). Со временем размеры частиц увеличиваются, вплоть до образования видимого глазом осадка (Рисунок 39). Увеличение содержания АК в полимере приводит к большей стабильности частиц (Таблица 19). Наибольший период стабильности демонстрируют дисперсии на основе ПАК-20, ВИ-АК с 73 и 85% АК и тройных сополимеров с содержанием АК 66 и 75%. Дисперсии с соотношением полимер/ $\text{Ca}^{2+} = 1$  более стабильны, чем с полимер/ $\text{Ca}^{2+} = 2$ . Относительно

высокомолекулярная ПАК-255 ингибирует осаждение карбоната кальция при соотношении полимер/ $\text{Ca}^{2+} = 2$ , образуя частицы 100-200 нм, стабильные в течение 4 суток (Рисунок 39). Низкомолекулярная ПАК-20 при соотношении полимер/ $\text{Ca}^{2+} = 2$  образует дисперсию 400-700 нм частиц, стабильную в течение 12 часов, а при эквимольном соотношении дисперсия стабильна в течение 8 суток. Уменьшение содержания карбоксильных звеньев в полимерах ВИ-АК, ВА-АК и ВИ-ВА-АК приводит к увеличению размера образующихся частиц. Катионный полимер ПВА-15 ингибирует осаждение карбоната кальция, образуя 1000 нм частицы, стабильные в течение 6 часов. В данном случае стабилизация может обеспечиваться образованием донорно-акцепторных связей между аминогруппой и катионами кальция (Рисунок 40), однако такие дисперсии стабильны значительно меньшее время, чем дисперсии на основе карбоксилсодержащих полимеров. Частицы, стабилизированные карбоксилсодержащими полимерами, имеют отрицательный заряд.

Таблица 19 – Характеристики дисперсий частиц карбоната кальция

№	Полимер			Стабильность	R, нм (I, %)		ζ, мВ
	Аббр.	ζ, мВ рН 9	C, мМ		1 час	последнее измерение	
Ca30	ПАК-20	-13.8	6	8 суток	25 (58), 1220 (42)	27 (39), 659 (61) - 8 день	-
Ca31			12	12 ч	406	423 - 12 ч	-
Ca53	ПАК-255	-35.0	12	4 суток	135	142 нм - 4 день	-
PV21-R82-2	ПВА-15	2.2	6	6 ч	1328	1085 - 6 ч	-
PV21-R83-2			12	6 ч	20 (12), 1063 (88)	17 (7), 894 (93) - 6 ч	-
Ca58	ВИ-АК-85	-26.4	6	28 суток	86 (32), 6300 (68)	25 (4), 148 (96) - 28 день	-15.35
Ca59			12	11 суток	18 (18), 1000 (82)	21 (20), 1134 (80) - 11 день	-
Ca54	ВИ-АК-73	-30.4	6	27 суток	21 (34), 792 (66)	44 (32), 947 (68) - 27 день	-3.3
Ca55			12	24 ч	26 (37), 731 (63)	1200 (24 ч)	-
Ca-28	ВА-АК-40	-9.8	6	3 ч	44	971 (3 ч)	-
Ca-29			12	16 ч	41 (80), 4200 (20)	1415 - 16 ч	-
Ca86	ВА-АК-48	-15.4	6	24 ч	18 (13), 767 (87)	1130 - 24 ч	-3.9
Ca87			12	24 ч	14 (12), 577 (88)	22 (32), 661 (68) - 24 ч	-

№	Полимер			Стабильность	R, нм (I, %)		ζ, мВ
	Аббр.	ζ, мВ рН 9	C, мМ		1 час	последнее измерение	
Ca84	ВА-АК-62	-19.5	6	4 суток	68	86 - 96 ч	-15.0
Ca85			12	4 суток	23 (10), 109 (90)	901 - 4 день	-
Ca62	ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>	-22.0	6	14 суток	28 (31), 780 (69)	870 - 14 день	-15.3
Ca63			12	7 суток	26 (30), 794 (70)	1469 - 7 день	-
Ca64	ВИ <sub>17</sub> ВА <sub>17</sub> АК <sub>66</sub>	-13.9	6	6 суток	22 (16), 1040 (84)	23 (19), 804 (81) - 6 день	-0.2
Ca65			12	5 суток	14 (22), 545 (79)	40 (19), 910 (81) - 5 день	-
Ca66	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	-11.1	6	6 ч	19 (13), 1269 (87)	14 (5), 1221 (95) - 6 ч	-5.9
Ca67			12	6 ч	13 (22), 1154 (78)	14 (50), 1368 (50) - 6 ч	-

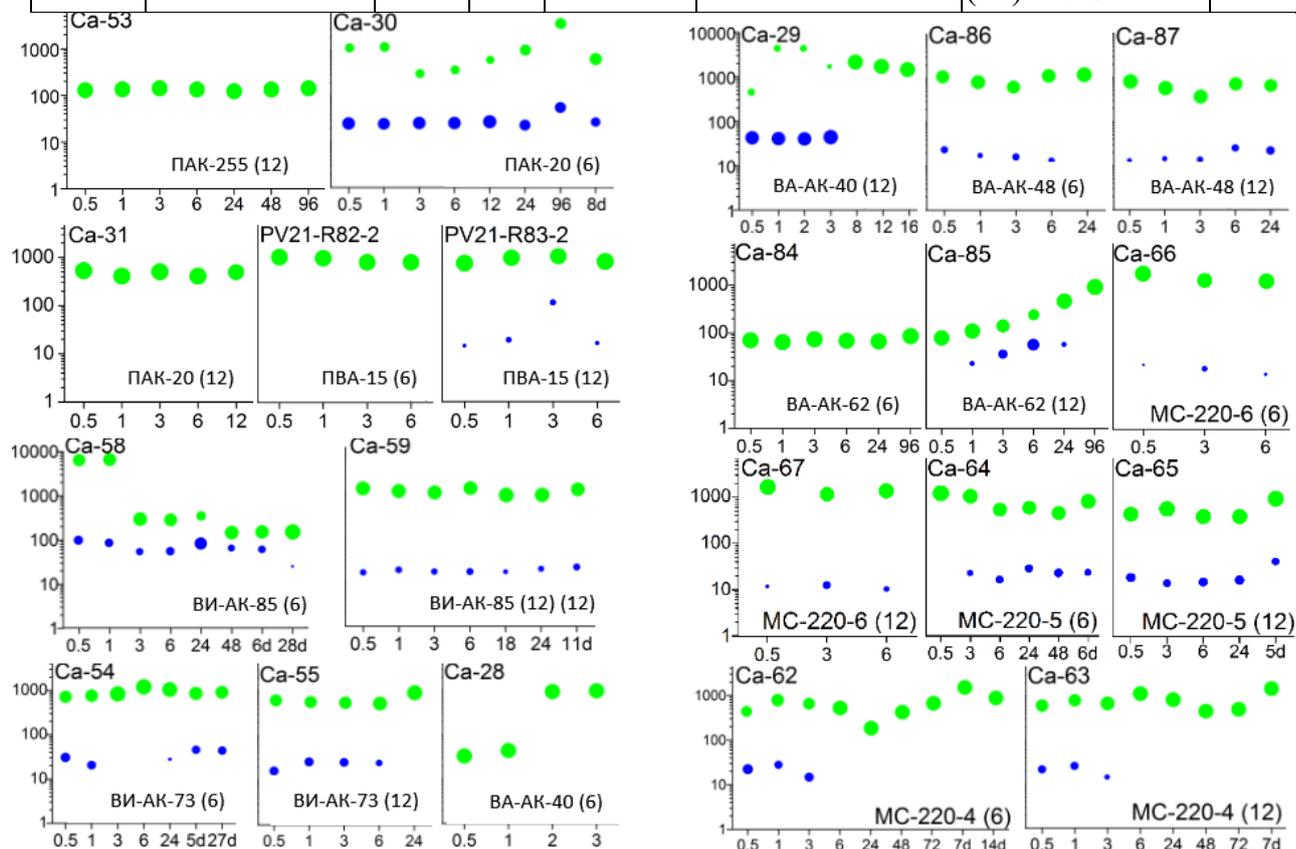


Рисунок 39 – Размер частиц (радиус, нм) в дисперсиях, полученных на основе карбоната кальция и полимеров. По оси абсцисс – время жизни дисперсии, часы или дни. Надпись в левом верхнем углу графиков – аббревиатура дисперсии (см. таблицу 19), надпись в правом нижнем углу – аббревиатура и концентрация полимера (мМ, в скобках). Концентрации  $\text{Ca}^{2+}$  и  $\text{CO}_3^{2-}$  составляли 6 мМ. Площадь кругов пропорциональна интенсивности рассеяния от частиц соответствующего размера

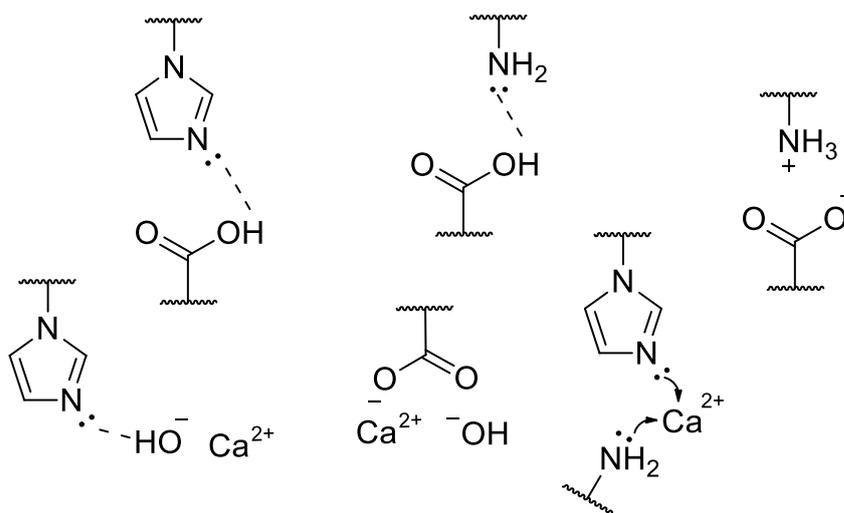


Рисунок 40– Возможные взаимодействия функциональных групп полимеров друг с другом и с неорганическими ионами

По данным ПЭМ (Рисунок 41), частицы карбоната кальция, полученные в присутствии полимеров, имеют неоднородную структуру с более электроплотными участками, вероятно относящимися к неорганической фазе, окруженными менее электроплотными участками – органическими полимерами. Карбоксильные группы ионизованы в условиях эксперимента (рН 9) и способны связывать ионы кальция за счет образования ионных связей. При уменьшении содержания карбоксильных групп в полимере наблюдается большая неоднородность в структуре частиц, что свидетельствует о меньшем взаимодействии полимера с неорганическими частицами. Таким образом, стабилизирующий эффект полимерных добавок заключается во взаимодействии функциональных групп полимера как с ионами кальция, так и с образующимися первичными частицами карбоната кальция. Размеры частиц соотносятся с данными, полученными методом DLS. Увеличение размеров частиц связано с их агрегацией, что подтверждается изображениями на ПЭМ.

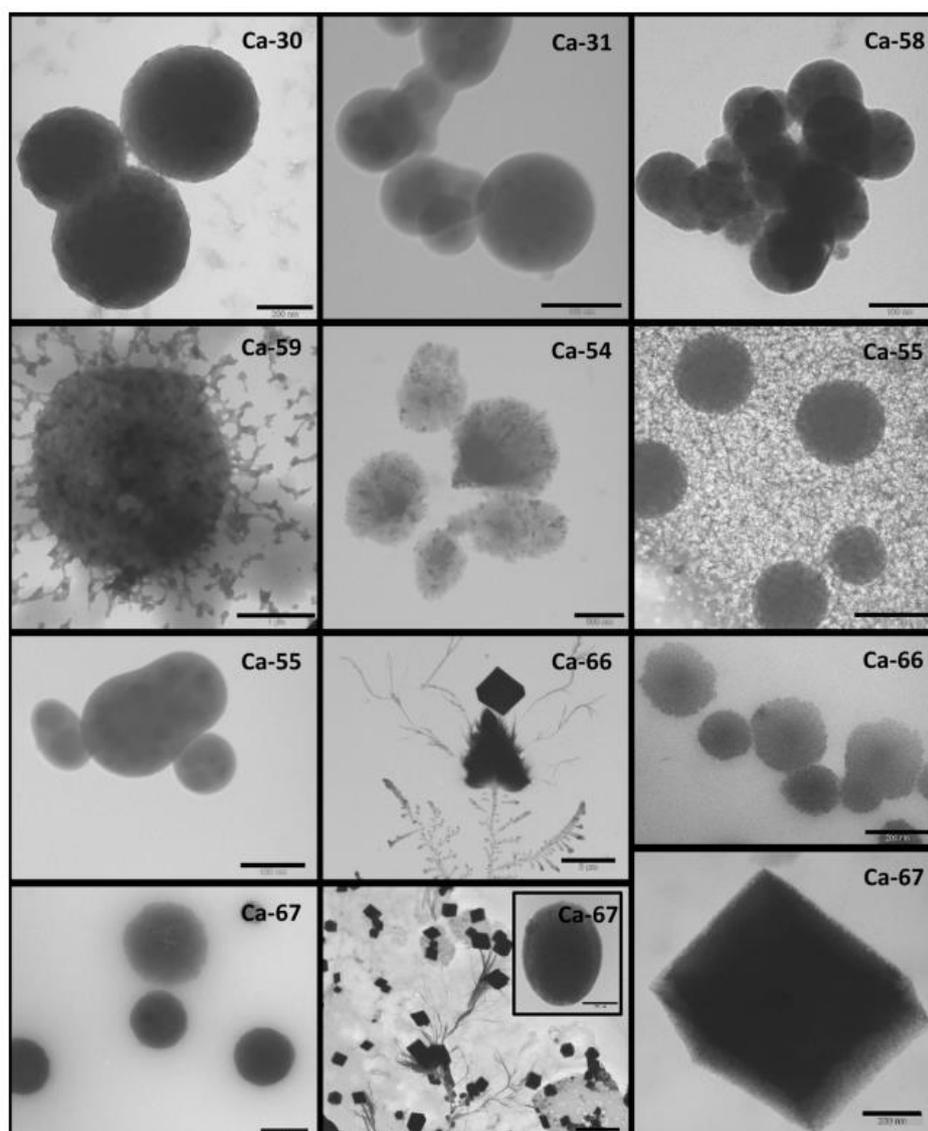


Рисунок 41 – Данные ПЭМ наночастиц карбоната кальция, полученных в присутствии полимеров. Масштаб: 100 (Ca-31, Ca-58 и Ca-55), 200 (Ca30, Ca-66, справа, Ca-67 слева и справа), 500 (Ca-54, Ca-55, и Ca-67, центр, врезка), 1000 (Ca-59) и 5000 (Ca-66, слева и Ca-67, центр) нм. Шифры соответствуют таблице 19

### 2.3.3 Взаимодействие частиц на основе карбоната кальция и полимеров с противоположно заряженными объектами

Первичные неорганические наночастицы, стабилизированные органическим полимером, должны высвободить стабилизатор при переходе в твердое состояние. Обсуждается несколько вариантов трансформации первичных частиц в твердый материал, состоящий в основном из неорганического вещества. Так, повышение концентрации может сместить равновесие в сторону конденсации неорганической фазы, сопровождающейся высвобождением органического материала [253]. Образцы Ca-19–21 (Таблица 17) являются примером метастабильного прекурсора, который осаждается в

течение нескольких часов без влияния внешних факторов. Ферментативное расщепление органических веществ является еще одним способом высвобождения неорганической фазы [254, 255]. Это логичный метод управления процессом, поскольку живая клетка способна доставлять ферменты к месту минерализации. Однако ферменты – не единственные вещества, которые клетка может использовать для управления формированием твердых материалов из первичных частиц. Дестабилизация коллоидных частиц противоположно заряженными полимерами широко известна [256]. Композитные кремнеземсодержащие наночастицы, стабилизированные полиаминными белками, рассматриваются в качестве предшественников кремнезема в диатомовых водорослях [247, 257, 258]. Взаимодействие таких наночастиц с полимерными анионами, например фосфорилированными белками, может приводить к образованию упорядоченного твердого материала [259].

Проведены эксперименты по взаимодействию дисперсий композитных частиц на основе карбоната кальция и полимеров с поликатионами. В качестве поликатионов использовали ПВИ, ПВА и ПАКХ-N3. Скрининговые опыты показали, что в присутствии ПВИ не происходит осаждения, что связано с низкой основностью имидазольных звеньев (Рисунок 42). Напротив, ПВА и ПАКХ-N3 осаждают частицы карбоната кальция, причем при использовании ПАКХ-N3 требуется меньшее соотношение поликатион: дисперсия. ПАКХ-N3 имеет две третичные аминогруппы в каждом полимерном звене, что обуславливает большую эффективность во взаимодействии с композитными наночастицами. Взаимодействие отрицательно заряженных частиц карбоната кальция с поликатионами приводит к осаждению материалов различной структуры (Таблица 20). Используемые поликатионы способны связываться со стабилизирующими карбоксилсодержащими полимерами, образуя нерастворимые интерполимерные комплексы, что уменьшает долю карбоната кальция в образующемся осадке. Продукты осаждения содержат менее 60% неорганической фазы, и их ИК спектры значительно отличаются от «чистого» карбоната кальция наличием сигналов полимеров (Рисунок 43).

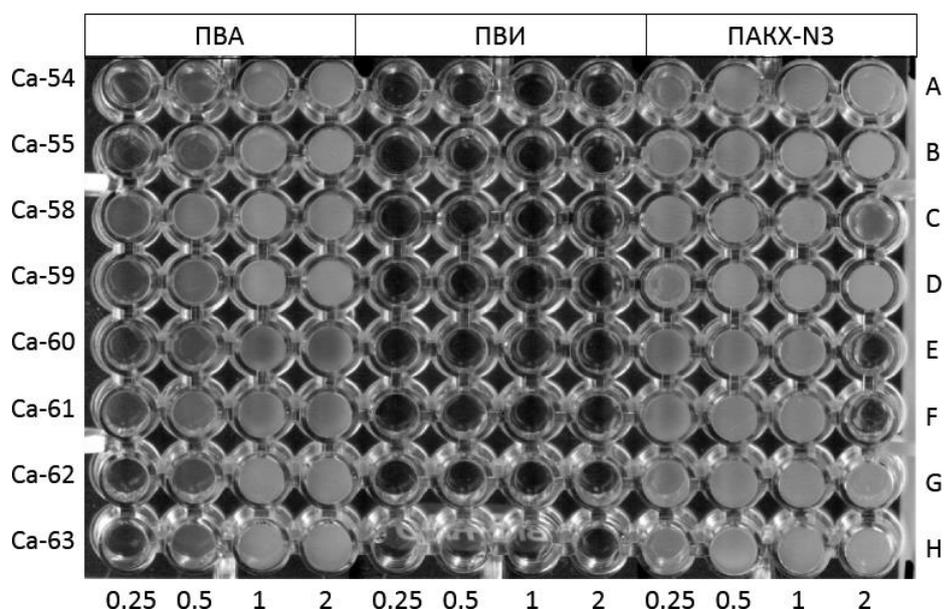


Рисунок 42 – Скрининговые эксперименты по осаждению дисперсий на основе карбоната кальция и полимеров взаимодействием с полимерными основаниями – ПВА, ПВИ, ПАКХ-N3. Соотношение полимерное основание/дисперсия указано в нижней части рисунка. Шифры дисперсий соответствуют таблице 19

Таблица 20 – Дестабилизация дисперсий композитных частиц действием агентов с противоположным зарядом. Шифры дисперсий соответствуют таблице 19

№ опыта	Дисперсия		Поликатион	Поликатион: полимер в дисперсии	CaCO <sub>3</sub> , %	Выход, %
	№	сополимер				
CaP90	Ca54	ВИ-АК-73	ПВА	1:1	6.5	71.2
CaP91			ПАКХ-N3	0.5:1	56.5	46.8
CaP92	Ca58	ВИ-АК-85	ПВА	1:1	24.3	75.8
CaP93			ПАКХ-N3	0.25:1	30.3	61.2
CaP94	Ca60	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	ПВА	1:1	-	76.3
CaP95			АКХ N3	0.5:1	-	15.1
CaP96	Ca62	ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>	ПВА	1:1	20.3	81.7
CaP97	Ca63	ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>	ПАКХ-N3	0.5:1	11.2	52.7
CaP98	Ca64	ВИ <sub>17</sub> ВА <sub>17</sub> АК <sub>66</sub>	ПВА	2:1	50.3	63.7
CaP99			ПАКХ-N3	0.5:1	1.5	48.6
CaP100	Ca66	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	ПАКХ-N3	0.5:1	-	15.1
CaP101	Ca67	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	ПАКХ-N3	0.25:1	24.5	29.8
CaP102	Ca84	ВА-АК-62	ПВА	1:1	9.5	53.7
CaP103			ПАКХ-N3	0.25:1	-	22.5
CaP104	Ca86	ВА-АК-48	ПВА	1:1	1.3	55.6

№ опыта	Дисперсия		Поликатион	Поликатион: полимер в дисперсии	CaCO <sub>3</sub> , %	Выход, %
	№	сополимер				
CaP105			ПАКХ-N3	0.5:1	6.8	31.6

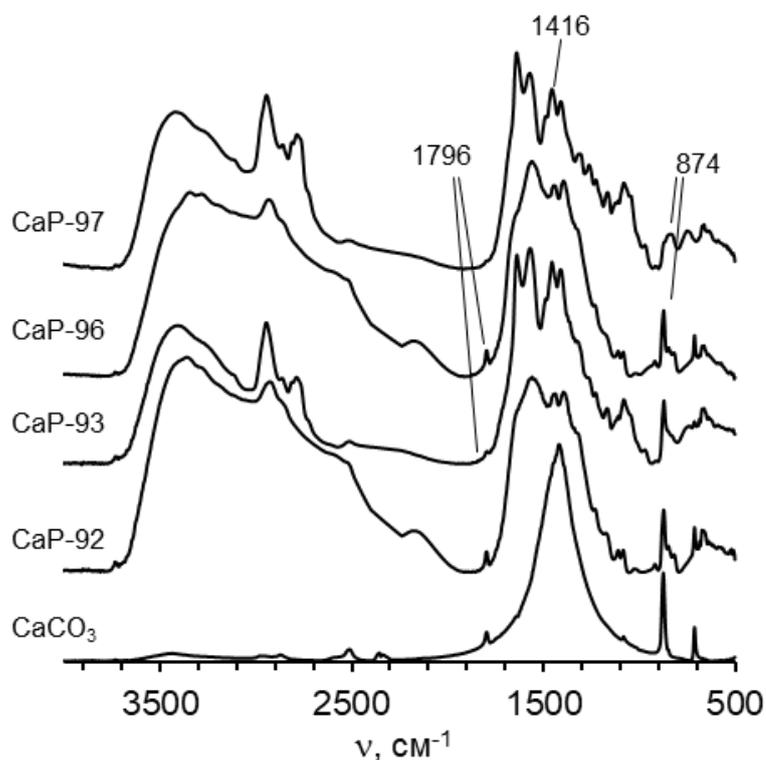


Рисунок 43 – ИК спектры карбоната кальция и композитных осадков. Шифры соответствуют таблице 20

Морфологию полученных осадков исследовали методом СЭМ (Рисунок 44). Осадки с содержанием CaCO<sub>3</sub> более 20% состоят из шарообразных частиц со сглаженной поверхностью и покрывающего их пленкообразного материала. Осадки, содержащие менее 10% CaCO<sub>3</sub>, представляют собой пористый материал с вкраплениями частиц (Рисунок 44, М-Р). Пленкообразный материал со сглаженной поверхностью вероятно является продуктом взаимодействия поликатиона со стабилизирующим полимером, и в некоторых случаях это взаимодействие приводит к нарушению связи между полимером и неорганическим компонентом. В таких случаях образуются пористые структуры, содержащие малые вкрапления частиц карбоната кальция.

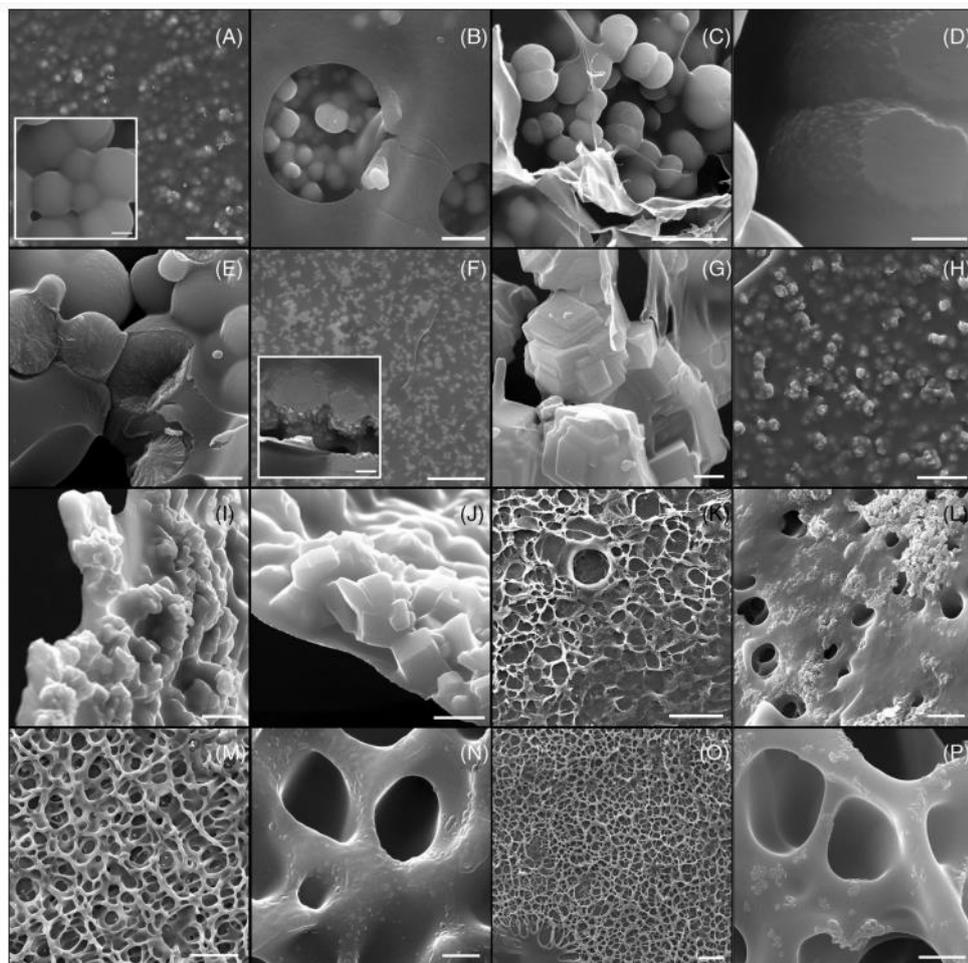


Рисунок 44 – СЭМ изображения композитных осадков, полученных взаимодействием поликатионов с дисперсиями частиц на основе карбоната кальция: (A, B) CaP91, (C–E) CaP98, (F) CaP93, (G) CaP101, (H) CaP92, (I, J) CaP96, (K) CaP97, (L) CaP102, (M) CaP105, (N) CaP104, (O, P) CaP103. Масштаб: 1  $\mu\text{м}$ —D, 2  $\mu\text{м}$ —E, G врезки в A, F, 5  $\mu\text{м}$ —J, N, P, 10  $\mu\text{м}$ —B, C, I, L, 50  $\mu\text{м}$ —A, H, 100  $\mu\text{м}$ —K, M, O. Шифры осадков соответствуют таблице 20

В целом, первичные частицы карбоната кальция и полимерное основание могут конкурировать между собой при взаимодействии с карбоксилсодержащим полимером (Рисунок 45). Положительно заряженный полимер может осаждать частицы на основе карбоксилсодержащего полимера, приводя к формированию более крупных частиц карбоната кальция. С другой стороны, полимерное основание может взаимодействовать с полимером в дисперсии с высвобождением карбоната кальция в водную фазу. Такой процесс контролируется структурой полимеров и может выступать как модель нормального и аномального формирования костной ткани.

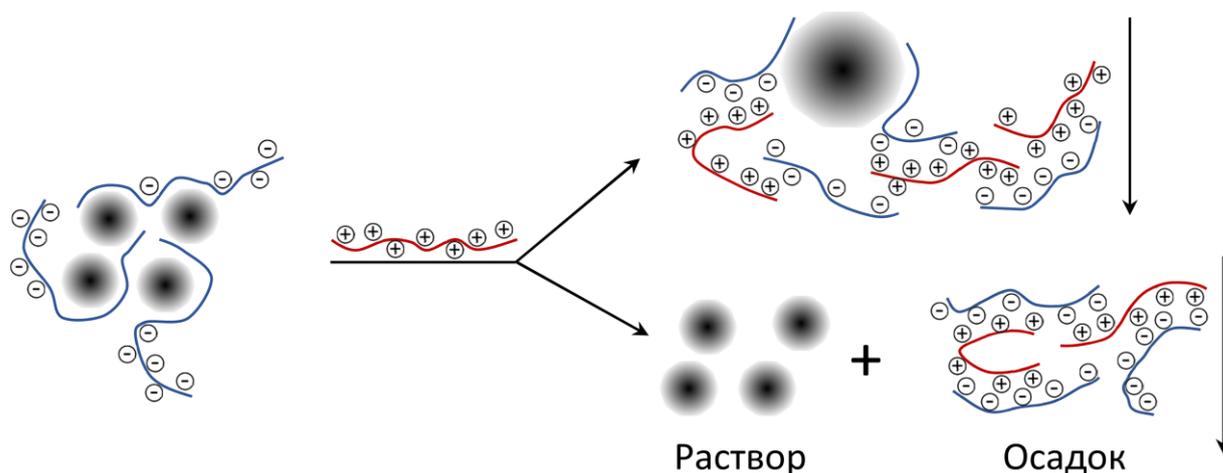


Рисунок 45 – Взаимодействие стабильной дисперсии частиц полимер - CaCO<sub>3</sub> с положительно заряженным полимером. Возможно образование двух типов осадков: а) композит, состоящий из карбоната кальция и положительно и отрицательно заряженных полимеров; б) интерполимерный комплекс с высвобождением частиц карбоната кальция в водную фазу

Таким образом, получение карбоната кальция в присутствии водорастворимых функциональных полимеров, содержащих звенья АК, ВИ и ВА, приводит к получению двух типов продуктов: стабильные в водных растворах частицы и композитные осадки различной морфологии. Полимеры определяют морфологию частиц на нано- и микроуровнях, но не влияют на полиморфизм кристаллов и в малой степени включаются в состав конечного продукта. Обогащенные кислотными звеньями полимеры ингибируют осаждение карбоната кальция из раствора, образуя частицы размерами 10-200 и более 1000 нм. Кроме того, полиоснование ПВА также способен стабилизировать частицы карбоната кальция, что ранее не было показано в мировой литературе. Стабилизированные полимерами частицы имеют отрицательный заряд и способны взаимодействовать с положительными объектами, такими как поликатионы, образуя твердые материалы, состоящие из покрытых полимерными пленками композитных частиц.

Основные результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в работе [250].

### 2.3 Синтез фосфата кальция в присутствии полимеров

Синтез фосфата кальция в присутствии полимеров проводили при рН 10, ввиду того что при меньших рН возможно образование одновременно нескольких форм фосфата кальция [22, 260, 261, 262]. Смешивание водных растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в соотношении 1.67: 1 при рН 10 сопровождалось образованием рыхлого осадка фосфата кальция. Добавление водорастворимых полимеров, содержащих карбоксильные, аминные и имидазольные функциональные группы, приводило в некоторых случаях к образованию дисперсий частиц, которые оставались стабильными более 6 часов (Рисунок 46). Такими полимерами, способными более 6 часов стабилизировать частицы фосфата кальция в водной среде, являлись ПАК-255, ПВА-7 и ПВА-15, карбоксилсодержащие сополимеры с АК  $\geq 37\%$ , и сополимер ВИ-ВА с 75% ВА. Поливинилимидазол давал осадки с фосфатом кальция. Увеличение ММ полимеров негативно влияет на взаимодействие полимерных групп с ионами кальция и фосфата, ухудшая стабилизирующий эффект. ПАК-1816 имеет в 7 раз большую массу, чем ПАК-255 и не стабилизирует фосфат кальция, что может быть обусловлено сильной ассоциацией макромолекул. Полимер ВИ-АК-96 близок к ПАК-1816 по значению характеристической вязкости (4.28 дл/г для ПАК-1816, 4.32 дл/г для ВИ-АК-96), и также образует осадки с фосфатом кальция. Подобный эффект наблюдался и при получении карбоната кальция в присутствии полимеров (раздел 2.2).

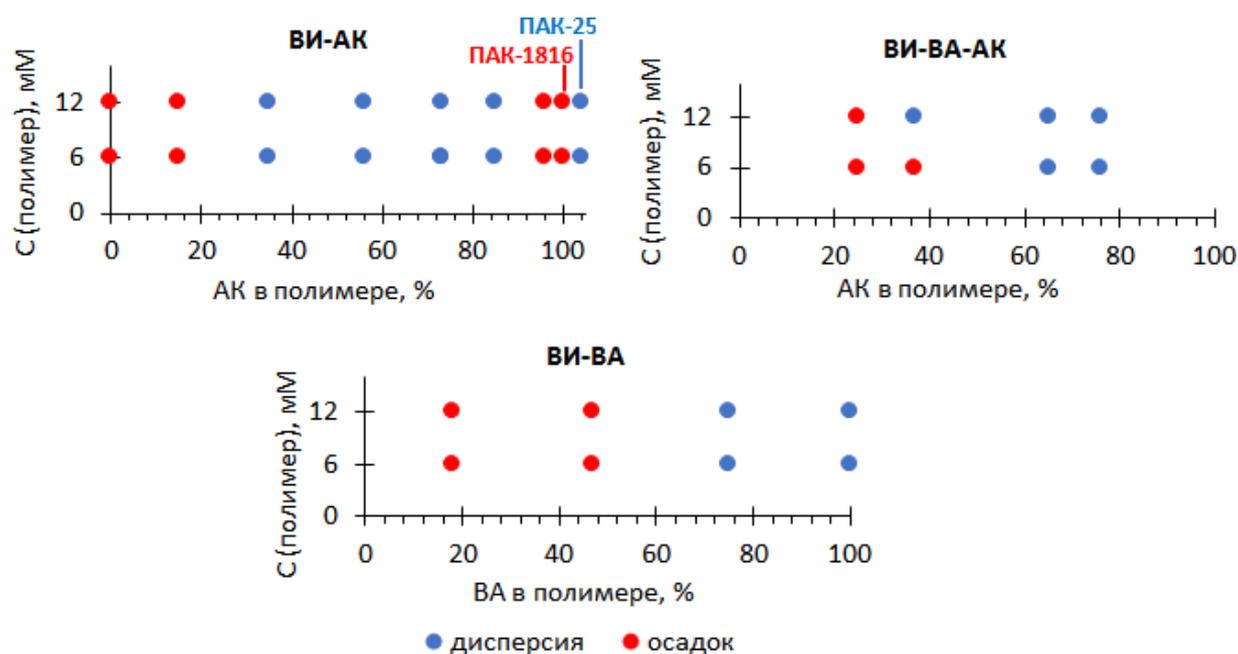


Рисунок 46 – Формирование фосфата кальция в присутствии (со)полимеров.  $C(\text{Ca}^{2+}) = 6$  мМ,  $C(\text{HPO}_4^{2-}) = 3.6$  мМ

Явной зависимости стабильности композитных кальций-фосфатных частиц от  $\zeta$ -потенциала стабилизирующего полимера не наблюдалось (Рисунок 47). Однако, подобно кальций-карбонатным частицам (см. раздел 2.2), наблюдается некоторая тенденция к росту стабильности частиц при увеличении модуля  $\zeta$ -потенциала полимера-стабилизатора. Можно отметить, что в условиях эксперимента (рН 10) полимеры, богатые группами 1-винилимидазола (в частности, ПВИ, ВИ-ВА-18, ВИ-ВА-47, ВИ-АК-15) имеют значение  $\zeta$ -потенциала близкое к нейтральному, и стабильность композитных частиц на основе таких полимеров невысока. Опираясь на представленные данные, сложно сказать, какая из характеристик полимера (соотношение групп,  $\zeta$ -потенциал, молекулярная масса) является определяющей для его способности стабилизировать фосфат кальция. В многокомпонентной системе (полимер, растворенные соли, растущие неорганические частицы) множество факторов могут оказывать влияние на ее состояние.

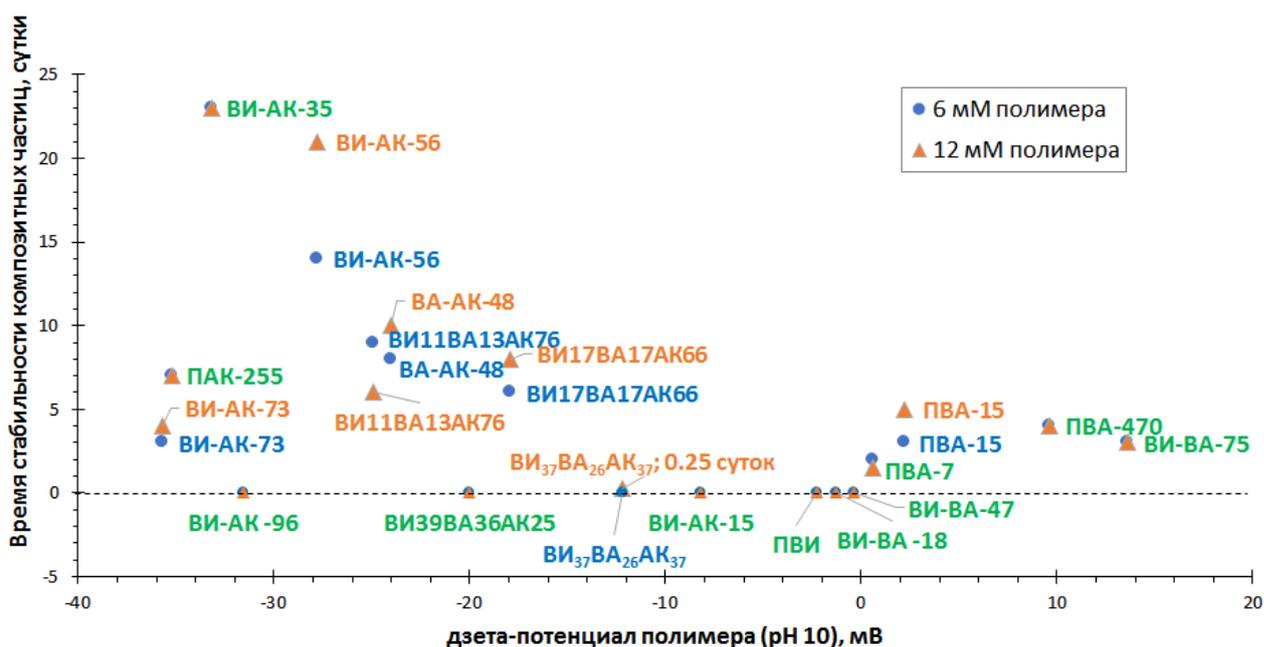


Рисунок 47 – Зависимость времени стабильности дисперсий композитных частиц в водном растворе от  $\zeta$ -потенциала стабилизирующего полимера. Синим цветом отмечены опыты с начальными концентрациями полимер:  $\text{Ca}^{2+} : \text{HPO}_4^{2-} = 6 : 6 : 3.6$  мМ, оранжевым цветом -  $12 : 6 : 3.6$  мМ. Наименование полимера указано возле точек. Зеленый цвет подписи указывает на наложение точек с разной концентрацией одного и того же полимера друг на друга

### 2.3.1 Композитные осадки на основе фосфата кальция и полимеров

После смешения компонентов, реакционные смеси оставляли при комнатной температуре на 24 часа, после чего образовавшиеся осадки отделяли

центрифугированием, промывали водой и сушили лиофильно. Тем же образом выделяли осадки, образовавшиеся в дисперсиях в ходе их хранения. Выход осадка рассчитывали, исходя из общей массы исходного полимера и фосфата кальция в форме гидроксиапатита (Таблица 21). Содержание кальция в осадке определяли атомно-абсорбционной спектроскопией, для чего осадки растворяли в 0.1М HCl. К анализируемым растворам добавляли LaCl<sub>3</sub> для устранения мешающего влияния фосфат-ионов. Для определения фосфата была отработана методика, заключающаяся в отжиге образцов при 700°C и последующем анализе ИК спектроскопией с добавлением внутреннего стандарта – гексацианоферрата калия. По соотношению пиков фосфата (1034-1045 см<sup>-1</sup>) и CN<sup>-</sup> группы (2021 см<sup>-1</sup>) определяли содержание фосфата в образце.

Таблица 21 – Фосфат кальция и композитные осадки, полученные в присутствии полимеров

№	Полимер	Полимер, мМ	Выход*, %	Ca, %	P, %	Ca/P, моль/моль
CaP-0	–	0	99.5	37.9 (39.9**)	16.6 (18.5**)	1.7
CaP-3	ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>	6	79.7	25.9	10.5	1.9
CaP-4	ВИ <sub>39</sub> ВА <sub>36</sub> АК <sub>25</sub>	12	74.1	23.7	7.6	2.4
CaP-1	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	6	46.6	29.8	5.8	4.0
CaP-62	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	12	36.8	30.0	6.2	3.7
CaP-58	ВИ-АК-15	6	59.1	37.6	21.1	1.4
CaP-61	ВИ-АК-15	12	41.5	37.4	19.6	1.5
CaP-68	ВИ-АК-96	6	49.0	27.4	16.0	1.3
CaP-69	ВИ-АК-96	12	27.1	24.4	10.9	1.7
CaP-31	ВИ-ВА-47	6	71.7	35.4	15.0	1.8
CaP-32	ВИ-ВА-47	12	53.1	35.7	19.3	1.4
CaP-33	ВИ-ВА-18	6	59.8	27.4	19.0	1.1
CaP-34	ВИ-ВА-18	12	33.2	30.5	15.8	1.5
CaP-63	ПВИ	6	56.3	36.6	16.1	1.8
CaP-64	ПВИ	12	39.9	41.5	12.1	2.7
CaP-39-2	ПАК-160	6	2.5	-	-	-
CaP-43-2	ПВА-15	6	16.8	29.8	-	-

\*Рассчитан исходя из общей массы полимера и фосфата кальция в реакционной смеси

\*\* Рассчитано исходя из стехиометрии

Морфология осадков, полученных в присутствии полимеров, сходна с морфологией «чистого» фосфата кальция (Рисунок 48). Образцы представляют собой

слипшиеся друг с другом частицы размерами 400-700 нм. В случае композитных осадков поверхность несколько более сглажена по сравнению с осадком, полученным в отсутствие полимера. Таким образом, полимеры не оказали значительного влияния на морфологию твердых продуктов. По данным EDX, в композитных осадках присутствуют Ca, P, C, N, равномерно распределенные в массе осадка. При малом содержании элемента наблюдается низкое соотношение сигнал/шум, что видно на примере азота в композитных осадках и фосфора в осадке CaP-1 (Рисунок 48 С).

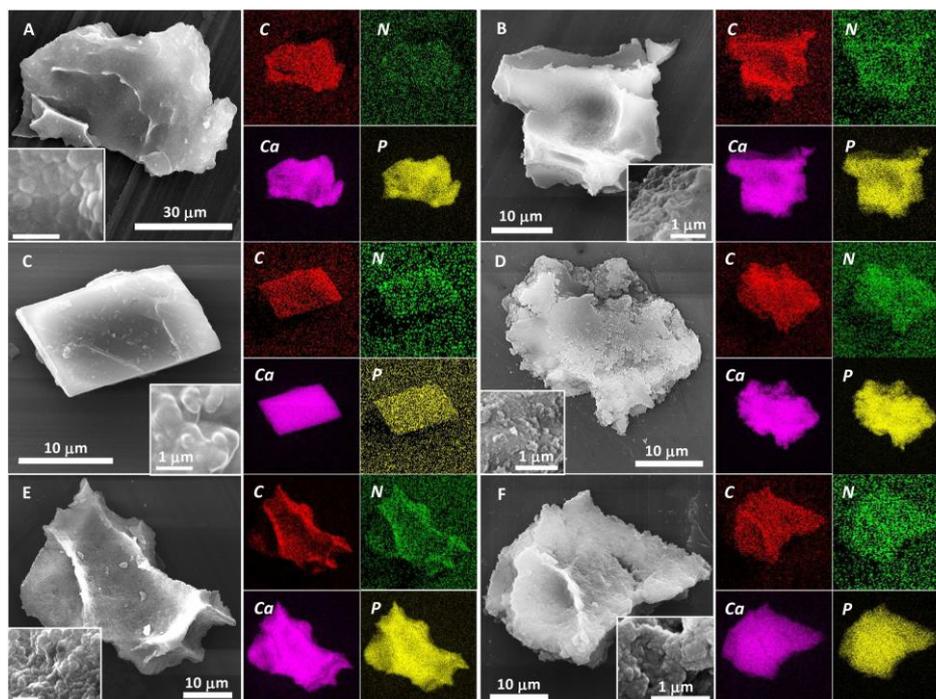


Рисунок 48 – СЭМ изображения и данные элементного анализа EDX для C, N, Ca и P фосфатов кальция, полученных в присутствие (со)полимеров.  $C(\text{Ca}^{2+}) = 6 \text{ mM}$ ,  $C(\text{HPO}_4^{2-}) = 3.6 \text{ mM}$ . А – CaP-0, В – CaP-39-2 (ПАК), С – CaP-1-3 (ВИ-ВА-АК-37), D – CaP-63 (ПВИ), E – CaP-68 (ВИ-АК-96), F – CaP-43-2 (ПВА). Шифры соответствуют таблице 21

В условиях эксперимента (рН 10) возможно образование нескольких форм фосфата кальция: аморфный фосфат кальция (при  $\text{Ca/P} = 1.5$ ), гидроксиапатит ( $\text{Ca/P} = 1.67$ ). Осажденный аморфный фосфат кальция нестабилен и при нахождении в маточном растворе со временем перекристаллизуется в более кристаллический гидроксиапатит. Более кислые формы фосфата кальция, такие как октакальций фосфат, дикальций фосфат и монокальций фосфат не стабильны в щелочной среде и образуются при  $\text{pH} \leq 7$ . Трикальций фосфат,  $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ , не осаждается из водных растворов, а получается путем нагревания других форм фосфата кальция с  $\text{Ca/P} = 1.5$  до  $800^\circ\text{C}$  и выше [22, 263]. ИК спектры осадков (Рисунок 49) содержат сигналы  $\text{PO}_4^{3-}$  в области  $1030\text{-}1050 \text{ cm}^{-1}$ , и сигналы, характерные для гидроксиапатита ( $560, 600 \text{ cm}^{-1}$ ) [264]. Литературные данные в

сочетании с данными ИК спектроскопии позволяют нам сделать вывод о том, что в наших экспериментах мы наблюдаем осаждение именно ГА. Наличие сигналов при  $870\text{ см}^{-1}$  и в области  $1400\text{-}1600\text{ см}^{-1}$  у образца, полученного в отсутствие полимера (CaP-0), свидетельствует о примеси карбонат-ионов, образующихся при растворении атмосферного  $\text{CO}_2$  в ходе синтеза [265]. В случае композитных образцов, эта область перекрываются сигналами групп полимеров: карбоксильные группы  $1550\text{ см}^{-1}$ ,  $\text{C}=\text{O}$  при  $1640\text{ см}^{-1}$ , аминные в области  $1600\text{ см}^{-1}$ . Фосфаты кальция, полученные в присутствии полимеров без карбоксильных звеньев или с малым их количеством (образцы CaP-58, CaP-31, CaP-33, CaP-63), имеют спектры, схожие со спектром «чистого» фосфата кальция (CaP-0). Спектры CaP-63, CaP-58 и CaP-31 содержат слабые сигналы имидазольного кольца при  $1416, 1227, 744\text{ см}^{-1}$ . Спектр CaP-68 содержит сильные полосы, отвечающие карбоксилатным группам при  $1560$  и  $1650\text{ см}^{-1}$ . Спектры CaP-1 и CaP-3 содержат сигналы имидазола ( $1228, 744\text{ см}^{-1}$ ),  $\text{-COO}^-$  ( $1560\text{ см}^{-1}$ ), сигналы при  $2950\text{ см}^{-1}$  соответствуют C-H полимерных цепей.

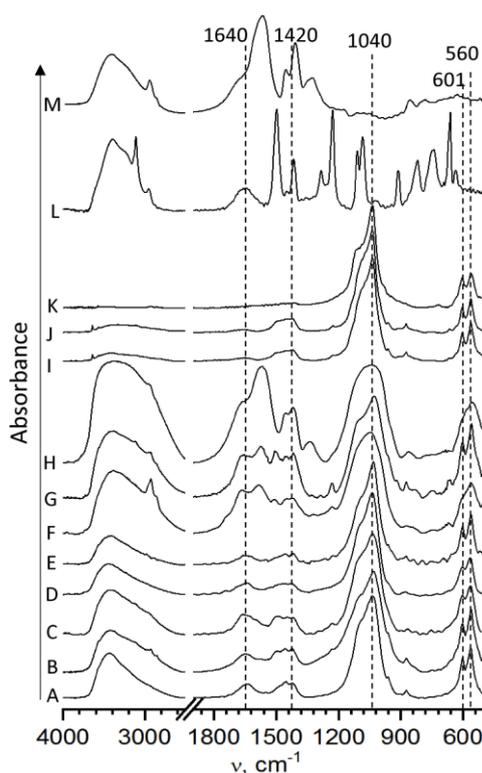


Рисунок 49 – ИК спектры фосфата кальция, полученного в отсутствие (А) и в присутствии полимеров (В-Н), модельной смеси фосфата кальция и ПВИ (I, J), прокаленного фосфата кальция (К) и гомополимеров (L, М); А – без полимера, В - CaP-58, С - CaP-31, D - CaP-33, E - CaP-63, F – CaP-3, G – CaP-1, H - CaP-68, I – модельная смесь фосфата кальция + 5% ПВИ, J - модельная смесь фосфата кальция + 9% ПВИ, К - CaP-0, прокаленный в течение 5 ч при  $700^\circ\text{C}$ , L - ПВИ, М - ПАК-Na. Шифры осадков соответствуют таблице 21

В большинстве образцов соотношение  $\text{Ca/P}$  близко к гидроксиапатиту (1.7). В некоторых случаях значение  $\text{Ca/P}$  композитных осадков значительно отличалось от гидроксиапатита, в сторону большего количества кальция. Осаждение фосфата кальция в присутствии сополимеров может включать взаимодействия между функциональными группами полимера (звенья АК,  $\sim\text{NH}_2$ ,  $\sim\text{NH}_3^+$ , имидазола) и неорганическими ионами – фосфат, кальций, гидроксид-группы, ионы кальция (Рисунок 50). Так, карбоксильные группы способны связывать  $\text{Ca}^{2+}$ , а звенья ВА могут образовывать с фосфат-ионами ионные и водородные связи. В результате таких взаимодействий возможны отклонения соотношения  $\text{Ca/P}$  от стехиометрического значения для гидроксиапатита. В присутствии гомополимера ПВИ ( $\text{CaP-63}$ ,  $\text{CaP-64}$ ) также получены осадки с избыточным содержанием кальция по отношению к фосфору, что объясняется комплексообразующей способностью имидазольной группы как электронодонора. Однако по данным ИК спектроскопии модельных смесей ГА и ПВИ (Рисунок 49 I, J), композиты содержат не более 5-10% ПВИ. Возможно, что «избыточный» кальций находится в форме  $\text{Ca}(\text{OH})_2$ , стабилизированной водородными связями со звеньями ВИ, подобно взаимодействию ПВИ с гидроксидом алюминия [266]. Если предположить, что фосфор присутствует в виде гидроксиапатита, а оставшийся кальций – в виде гидроксида, то содержание ПВИ составит около 5-10%, что согласуется с данными ИК спектроскопии.

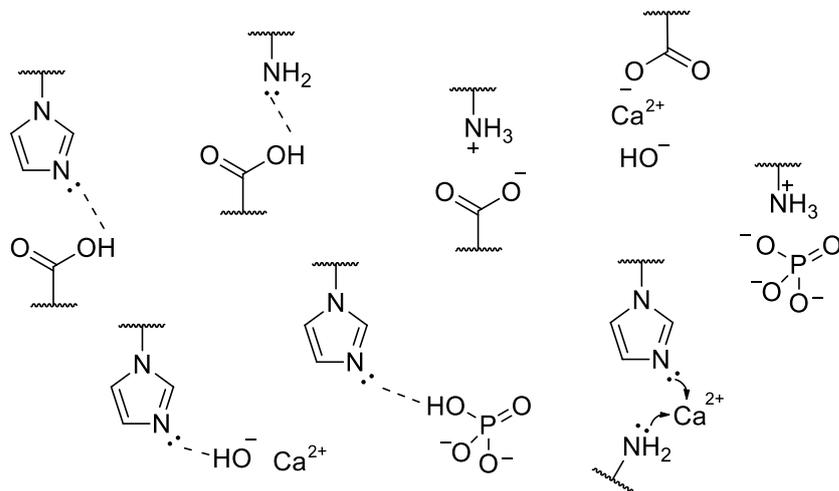


Рисунок 50 – Возможные взаимодействия функциональных групп полимеров друг с другом и с неорганическими ионами

### 2.3.2 Стабильные дисперсии наночастиц на основе фосфата кальция и полимеров

Дисперсии частиц фосфата кальция, полученные в присутствии полимеров, изучены методом динамического светорассеяния (Таблица 22). Радиус частиц в первые часы после приготовления составлял 50-200 нм. Добавление фосфат-ионов и ионов

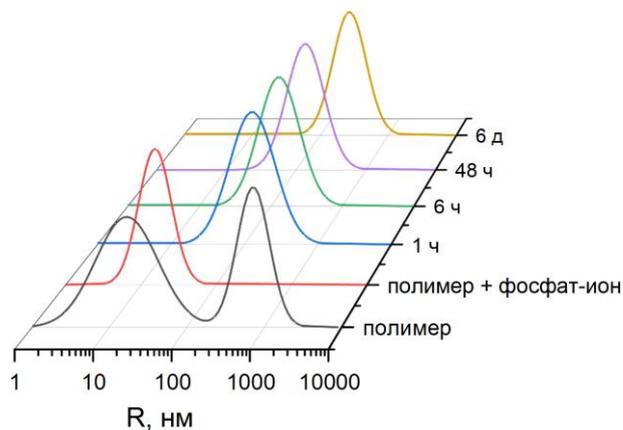
кальция к полимеру вероятно разрушало полимерные ассоциаты, и полученные композитные частицы к первому часу имели меньший размер, чем крупные полимерные агрегаты (Рисунок 51). Во всех дисперсиях размер частиц в той или иной степени увеличивался со временем, вплоть до образования агрегатов, видимым невооруженным взглядом. В некоторых случаях дисперсии содержали два типа частиц радиусом около 100 и 500-1000 нм. В целом, увеличение концентрации полимера увеличивало срок стабильности дисперсии, не оказывая заметного влияния на размер частиц. Не наблюдалось сильной зависимости времени стабильности дисперсии от содержания карбоксильных звеньев в стабилизирующем полимере. Дисперсии на основе поликатионов (ПВА, ВИ-ВА) оставались стабильными в целом меньшее время, чем дисперсии на основе карбоксилсодержащих полимеров. Возможно, что карбоксильные группы образуют сильные ионные связи с катионами кальция, таким образом предотвращая образование нерастворимого фосфата кальция. Напротив, аминогруппы и звенья имидазола могут взаимодействовать с фосфат-ионами и гидроксидом кальция, однако такие взаимодействия будут слабыми и вероятно многоцентровыми с участием первичных неорганических наночастиц. Стабильные в водной среде частицы фосфата кальция имеют различный заряд, зависящий от типа стабилизирующего полимера (Таблица 22). Так, частицы, полученные в присутствии карбоксилсодержащих полимеров, имеют отрицательный заряд, который им придают карбоксильные группы в условиях эксперимента. Стабилизация ПВА и сополимерами ВИ-ВА придает частицам положительный заряд, что обуславливается сильной основностью аминогруппы.

Таблица 22 – Характеристика дисперсий кальций-фосфатных частиц

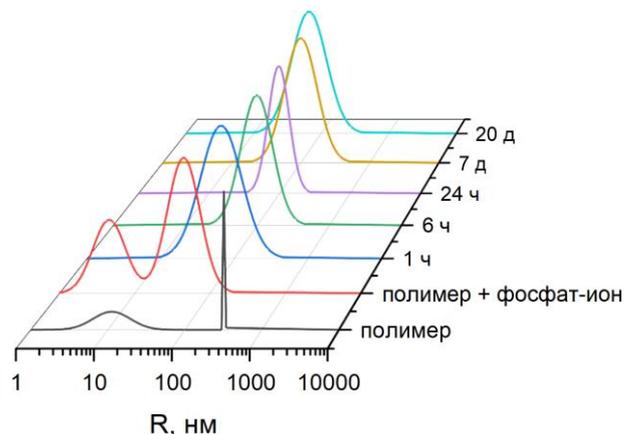
Шифр	Полимер	$\zeta_{\text{полимер}}$ , мВ рН 10	$C_{\text{(полимер)}}$ , мМ	Стабильность дисперсии	R, нм (I, %)		$\zeta$ , мВ
					1 час	последнее измерение	
CaP-2	ВИ <sub>37</sub> ВА <sub>26</sub> АК <sub>37</sub>	-12.2	12	6 часов	80	391 (76), 1200 (24) – 6 часов	-
CaP-5	ВИ <sub>17</sub> ВА <sub>17</sub> АК <sub>66</sub>	-17.9	6	6 суток	128	268 – 6 суток	-32 ± 4
CaP-6			12	8 суток	29 (11), 144 (89)	19 (7), 232 (93) – 8 суток	-7 ± 2
CaP-7	ВИ <sub>11</sub> ВА <sub>13</sub> АК <sub>76</sub>	-24.9	6	9 суток	53 (11), 122 (89)	377 – 9 дней	-30 ± 5
CaP-8			12	6 суток	67 (16), 163 (84)	409 – 6 суток	-39 ± 3

Шифр	Полимер	$\zeta_{\text{полимер}}$ , мВ рН 10	$C_{\text{(полимер)}}$ , мм	Стабиль- ность дисперсии	R, нм (I, %)		$\zeta$ , мВ
					1 час	последнее измерение	
CaP-27	ВИ-АК-35	-33.2	6	23 суток	67	100 – 21 сутки	-23 ± 2
CaP-28			12	23 суток	66	103 – 21 сутки	-19 ± 2
CaP-22	ВИ-АК-56	-27.8	6	14 суток	121	260 (43), 465 (57) – 72 часа	-29 ± 2
CaP-23			12	21 сутки	45 (17), 168 (83)	7 (7), 1208 (93) – 20 суток	-26 ± 2
CaP-20	ВИ-АК-73	-35.7	6	3 суток	151	124 (65), 550 (35) – 72 часа	-29 ± 2
CaP-21			12	4 суток	58 (23), 200 (77)	138 (51), 464 (49) – 48 часов	-22 ± 10
CaP-24	ВА-АК-48	-24.0	6	8 суток	80 (76), 434 (24)	95 – 8 суток	-8 ± 2
CaP-25			12	10 суток	91	90 – 96 часов	-9 ± 4
CaP-26	ВИ-ВА-75	13.6	6	3 суток	86	159 – 24 часа	16 ± 1
CaP-38			12	3 суток	78	269 – 48 часов	13 ± 2
CaP-41	ПВА-7	0.6	6	2 суток	107	180 (27), 1015 (73) – 24 часа	-
CaP-42			12	1.5 дня	92	137 (48), 401 (52) – 24 часа	-
CaP-43	ПВА-15	2.2	6	3 суток	87	61 (22), 151 (78) – 72 ч	34 ± 5
CaP-44			12	5 суток	70	85 – 48 ч	16 ± 4
CaP-45	ПВА-470	9.6	6	4 суток	115	342 – 96 ч	-
CaP-46			12	4 суток	40 (11), 146 (89)	27 (9), 211 (91) – 96 ч	-
CaP-39	ПАК-160	-	6	3 суток	108 (90), 212 (10)	106 – 48 часов	-
CaP-40			12	19 суток	109	14 (21), 1130 (79) – 18 дней	-
CaP-47	ПАК-255	-35.2	6	7 суток	113	57 (49), 187 (51) – 6 дней	-32 ± 4
CaP-48			12	7 суток	3 (5), 183 (95)	19 (49), 566 (51) – 6 день	-29 ± 2

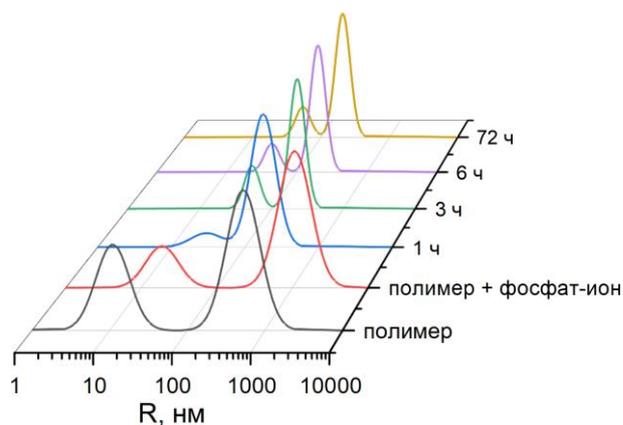
CaP-5



CaP-28



CaP-20



CaP-43

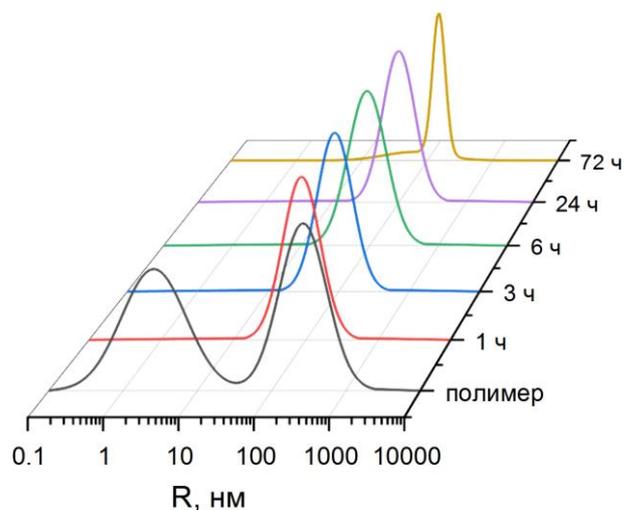


Рисунок 51 – Распределение частиц по размерам в зависимости от времени в полимерных растворах и композитных частицы. «Полимер» – раствор полимера концентрацией 10 мМ, «полимер + фосфат-ион» – смесь раствора полимера и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  в соотношении 10: 6 мМ, R – гидродинамический радиус частиц. Шифры дисперсий соответствуют таблице 22

Согласно ТЭМ, частицы, полученные в присутствии ПАК, имеют однородную структуру (Рисунок 52 С, D), тогда как у частиц с ВИ-АК наблюдаются более электроплотные участки, вероятно относящиеся к неорганической фазе, и менее электроплотные области, отвечающие органическому полимеру (Рисунок 52 А, В). ПВИ не способен стабилизировать фосфат кальция в растворе, и включение звеньев ВИ в карбоксилсодержащий полимер вероятно провоцирует локальное образование неорганических частиц, с поверхностью которых могут связываться группы  $\sim\text{COO}^-$ . С другой стороны, гомополимер ПАК образует частицы с более равномерным распределением плотности (Рисунок 52 С, D). Игольчатые частицы, наблюдаемые на Рисунке 52 В и Н характерны для кристаллов гидроксиапатита. В присутствии ПВА

наблюдаются агрегированные мелкие частицы (Рисунок 52 Е, F). Частицы, сформировавшиеся в присутствии сополимера ВИ-ВА-75 за 6 часов (Рисунок 52 G), представляют собой скопления более мелких частиц с неравномерной внутренней структурой, которые к 24 часу уплотняются и обрастают закристаллизовавшимся гидроксиапатитом (Рисунок 52 H), и после 48 ч образуется осадок.

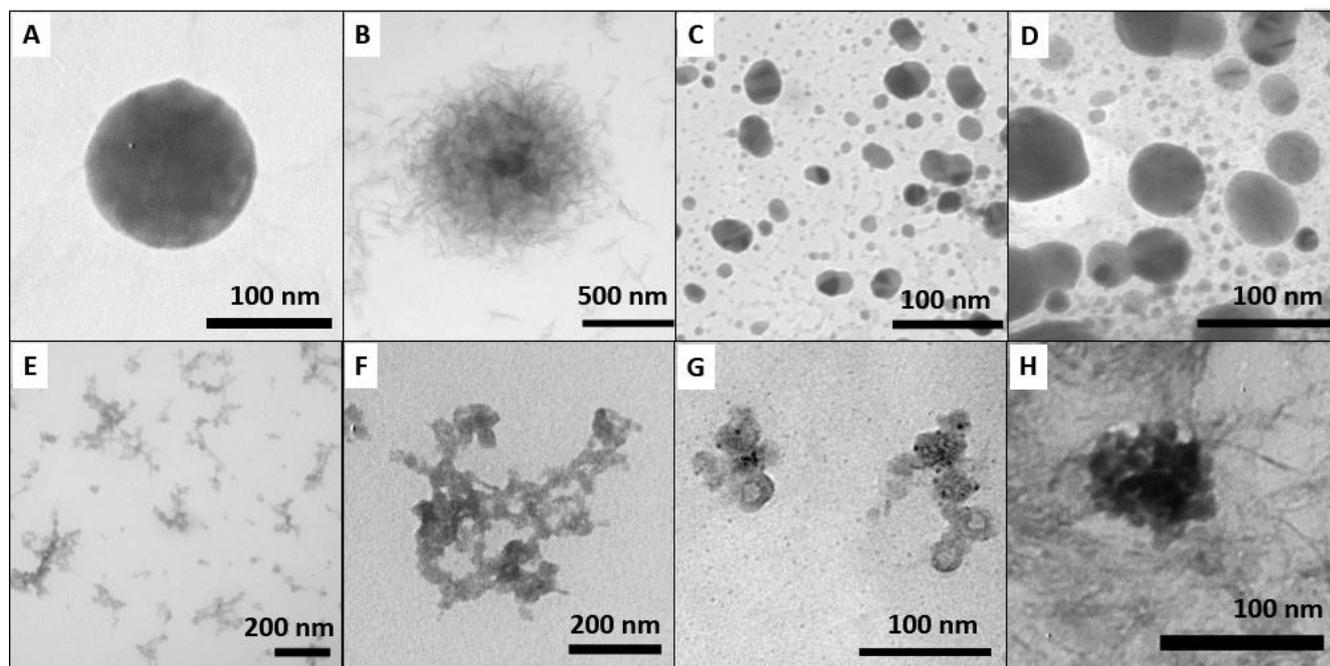


Рисунок 52 – Данные ТЭМ композитных наночастиц. А, В – CaP-28, С, D – CaP-47, Е, F – CaP-4), G – CaP-38, H – CaP-38. А-F, H – 24 часа после приготовления, G – 6 часов после приготовления. Шифры дисперсий соответствуют таблице 22

### 2.3.3 Взаимодействие противоположно заряженных частиц на основе фосфата кальция и полимеров

Неорганические наночастицы, стабилизированные биополимерами, считаются прекурсорами скелетных элементов на основе кремнезема, карбоната и фосфата кальция. Взаимодействие таких частиц с противоположно заряженными агентами, как с белками силацидинами в случае кремнезема, может приводить к трансформации растворимых прекурсоров в твердые материалы [267]. Мы получили отрицательно и положительно заряженные частицы на основе фосфата кальция, и их взаимодействие между собой может являться некой моделью процесса биоминерализации. Смешивание дисперсий, содержащих противоположно заряженные частицы (Рисунок 53), привело к получению пористых осадков различной морфологии – пористые образования, с гладкими (CaPh100, CaPh105) или неровными краями (CaPh96, CaPh97), слипшиеся частицы палочкообразные (CaPh98) и неправильной формы (CaPh101) (Рисунок 54).

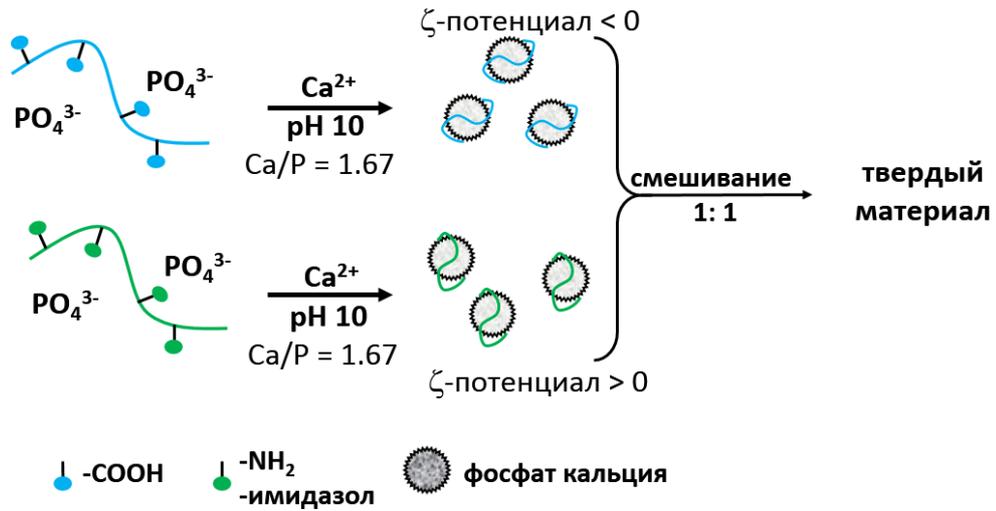


Рисунок 53 – Схема получения твердого осадка из дисперсий противоположно заряженных частиц на основе фосфата кальция и полимеров

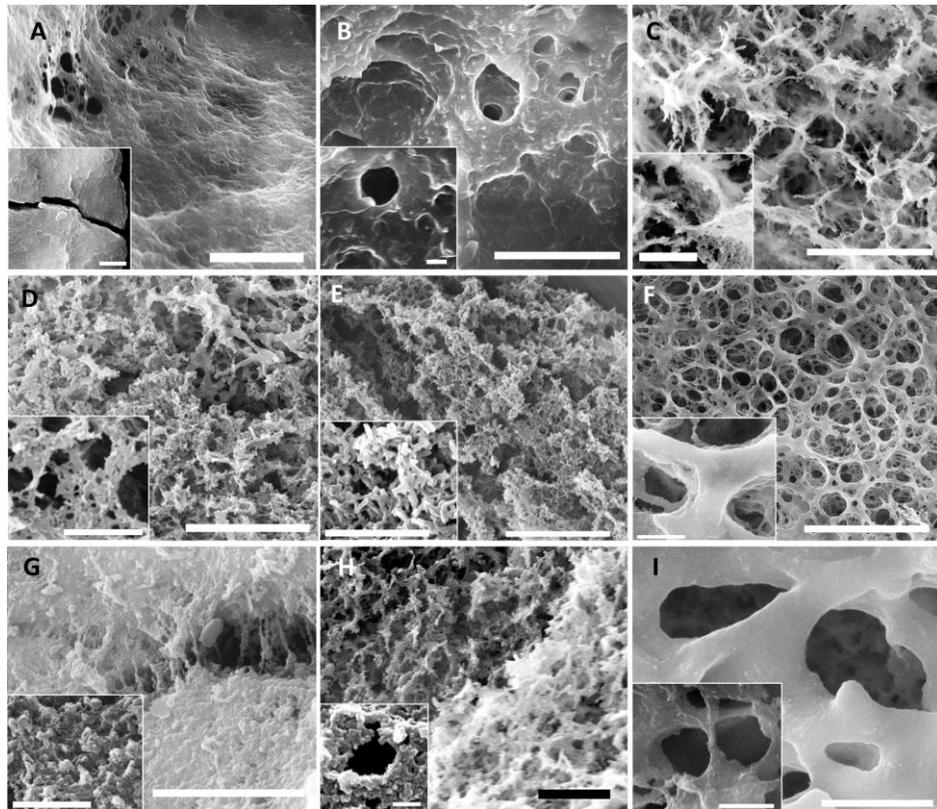


Рисунок 54 – СЭМ изображения продуктов смешения дисперсий, содержащих положительно и отрицательно заряженные наночастицы фосфата кальция: А – CaPh-93 (CaP-38 + CaP-21), В – CaPh-95 (CaP-38 + CaP-23), С – CaPh-96 (CaP-38 + CaP-47), D – CaPh-97 (CaP-38 + CaP-48), Е – CaPh-98 (CaP-43 + CaP-47), F – CaPh-100 (CaP-43 + CaP-22), G – CaPh-101 (CaP-44 + CaP-20), H – CaPh-102 (CaP-43 + CaP-22), I – CaPh-105 (CaP-38 + CaP-28). Масштаб: А, В, С – 10  $\mu$ м, D, Е, H – 5  $\mu$ м, F – 20  $\mu$ м, G, I – 3  $\mu$ м, врезка: А – 2  $\mu$ м, В-Г, I – 1  $\mu$ м, H – 500 нм. Шифры дисперсий (в скобках) соответствуют таблице

Для дальнейших исследований мы отобрали три образца – CaPh-96, CaPh-100 и CaPh-105. Образец CaPh-96 имеет Ca/P близкое к гидроксиапатиту, в то время как остальные обогащены кальцием (Таблица 23). При обсуждении состава этих образцов нужно принимать во внимание как минимум два процесса: конденсация неорганической фазы и взаимодействие органических полимеров. CaPh-96 получен с использованием ПАК и сополимера ВИ-ВА. Полимеры могли образовать эквимольный комплекс, и в этом случае можно ожидать, что все звенья АК связаны со звеньями ВИ и ВА, что в свою очередь высвобождает ионы кальция для взаимодействия с фосфатом. Образцы CaPh-100 и CaPh-105 обеднены фосфатом, подобно осадкам, полученным в присутствии карбоксилсодержащих полимеров (Таблица 21). Возможно, что здесь полимеры, богатые аминогруппами, остаются в растворе и ингибируют осаждение фосфата.

Таблица 23 – Композитные осадки, полученные смешиванием положительно и отрицательно заряженных композитных частиц фосфата кальция

№	Компоненты		Выход, %	Ca, %	P, %	Ca/P, моль/моль
	"+"	"-"				
CaPh-96	CaP-38	CaP-47	81.9	21.0	10.9	1.5
CaPh-100	CaP-43	CaP-22	63.5	19.3	3.4	4.3
CaPh-105	CaP-38	CaP-28	86.3	15.4	5.3	2.3

В ИК спектрах образцов (Рисунок 55) присутствуют интенсивные сигналы от полимеров и гидроксиапатита ( $560, 601 \text{ см}^{-1}$ ). По данным элементного состава (Таблица 23) и термогравиметрического анализа, содержание неорганического компонента составляет 30-55%. Материалы содержат около 15% воды, которая удаляется при нагревании до  $160^\circ\text{C}$ . Органические полимеры разлагаются при  $300-350^\circ\text{C}$  с выделением энергии, и в случае CaPh-105 наблюдается дополнительный пик при  $450^\circ\text{C}$ , который может быть связан с большей стабильностью имидазольных фрагментов (Рисунок 56) [268].

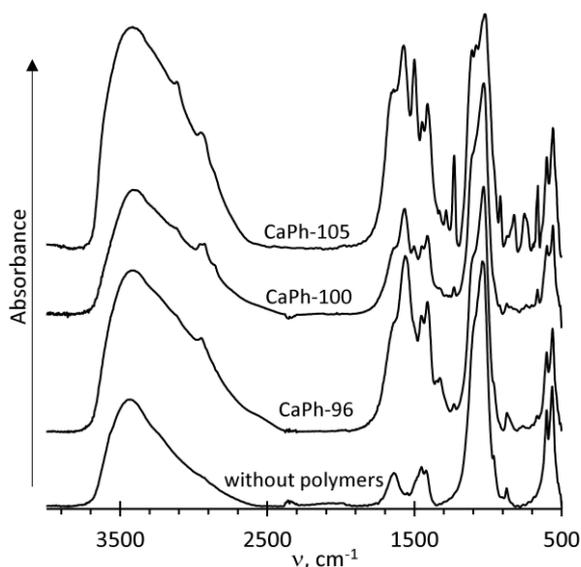


Рисунок 55 – ИК спектры композитных осадков, полученных смешиванием положительно и отрицательно заряженных композитных частиц фосфата кальция. Шифры соответствуют таблице 23

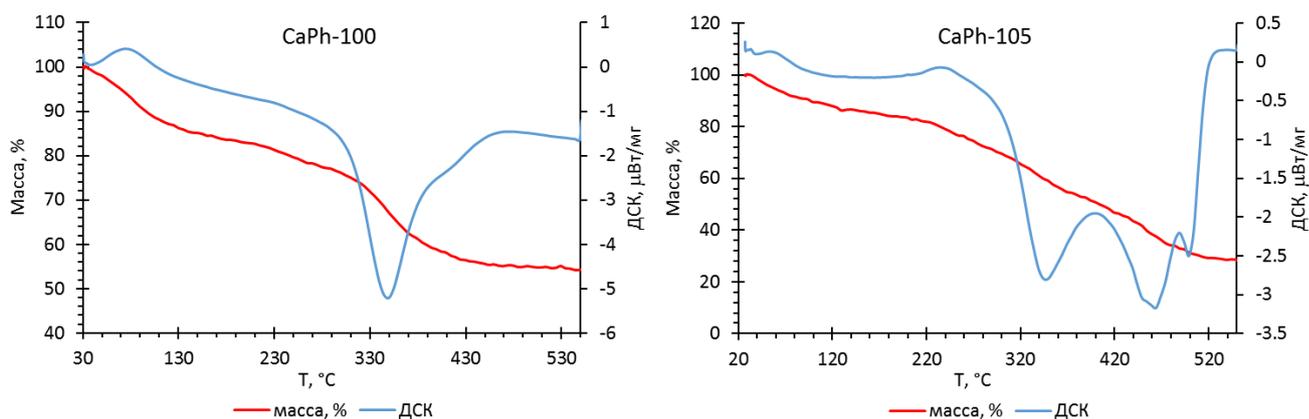


Рисунок 56 – Данные термогравиметрического анализа (красный) и дифференциальной сканирующей калориметрии (ДСК, синий) композитных образцов, полученных смешиванием положительно и отрицательно заряженных композитных частиц фосфата кальция (см. таблицу 23)

По данным метода адсорбционной порометрии, образцы CaPh-96 и CaPh-100 имеют удельную площадь поверхности 80 и 36 м<sup>2</sup>/г и широкое распределение пор по размерам с максимумами 14 и 18 нм соответственно (Рисунок 57). Поверхность образца CaPh-105 оказалась ниже предела измерения прибора (менее 0.1 м<sup>2</sup>/г).

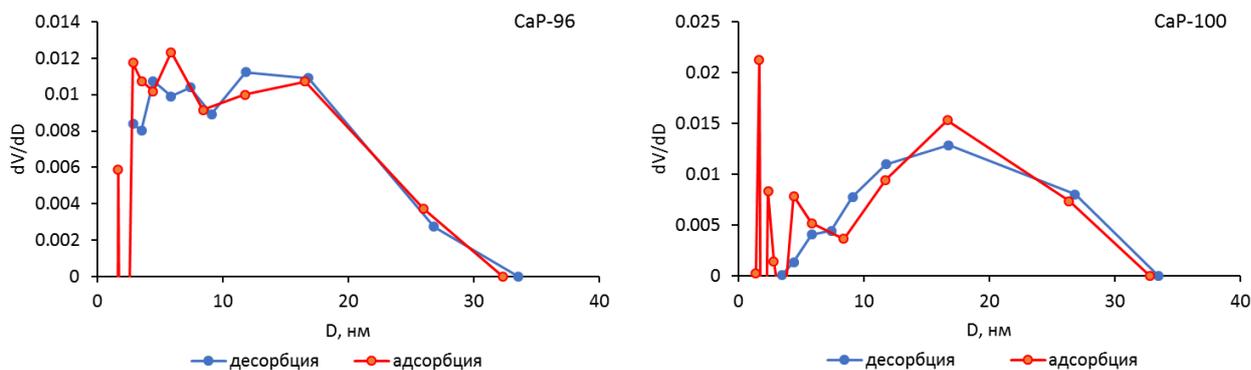


Рисунок 57 – Распределение пор по размерам в композитных осадках, полученных смешиванием положительно и отрицательно заряженных композитных частиц фосфата кальция (см. таблицу 23)

Таким образом, получение фосфата кальция в присутствии функциональных сополимеров приводит к образованию как стабильных от нескольких часов до нескольких недель в водной среде наночастиц, так и композитных осадков. Полимеры не оказывают влияния на морфологию осажденного фосфата кальция на микроуровне. Показано, что наряду с карбоксилсодержащими полимерами, полиоснования (ПВА, сополимер ВИ-ВА с 75% ВА) также способны ингибировать осаждение фосфата кальция из водного раствора. Способность полимера замедлять осаждение фосфата кальция из раствора определяется его составом и ММ: увеличение количества амино- и карбоксильных звеньев и уменьшение ММ благоприятно сказывается на ингибирующую способность. В зависимости от типа стабилизирующего полимера, мы получили отрицательно (на основе карбоксилсодержащих полимеров) и положительно (на основе поликатионов) заряженные частицы фосфата кальция, которые способны взаимодействовать между собой с образованием твердых пористых материалов.

Основные результаты, изложенные в данном разделе, опубликованы в работе [270].

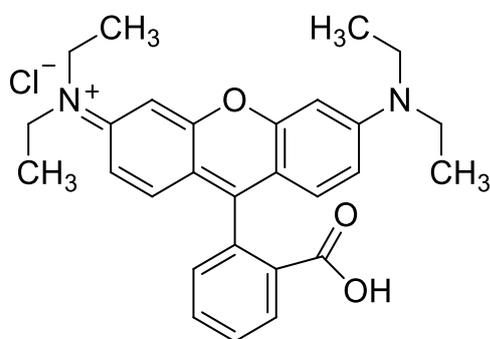
## 2.4 Возможные области применения композитных частиц на основе карбоната и фосфата кальция

Образование неорганических частиц в присутствии водорастворимых органических полимеров может выступать моделью формирования скелетов живых организмов. Варьируя структуру полимера, соотношения реагентов возможно получение композитных материалов как в виде осадков, так в виде дисперсий частиц, стабильных от нескольких часов до нескольких недель. Стабилизированные полимерами

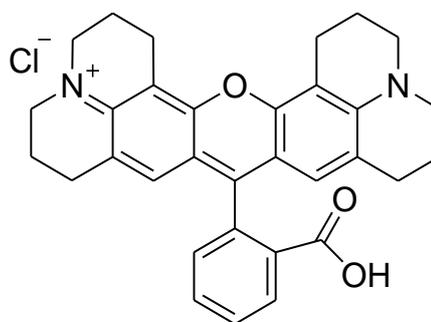
неорганические наночастицы рассматриваются в качестве моделей первичных частиц в процессах биоминерализации, и пути их трансформации в твердые элементы скелета обсуждаются и могут включать в себя различные механизмы (повышение концентрации дисперсии, воздействие ферментов, взаимодействие с противоположно заряженными объектами). Исследование всех этих процессов позволяет приблизиться к пониманию хода биоминерализации, управляемого клетками организма. Также, полученные в экспериментах композитные материалы могут сами по себе представлять интересные объекты для различного применения. В данном разделе обсуждаются различные способы применения композитных материалов.

### 2.4.1 Хроматографические сорбенты

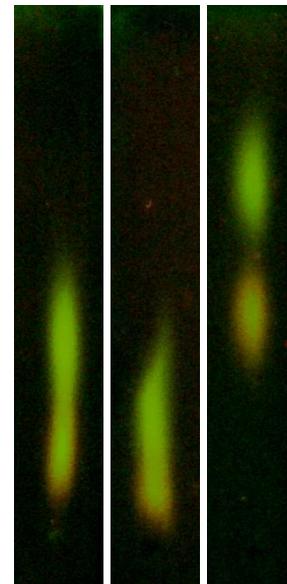
Флуоресцентные красители родамин Б и родамин 101 плохо разделяются в условиях флеш-хроматографии на силикагеле (10-60  $\mu\text{m}$ ) (Рисунок 58, левая пластинка). Последовательная обработка силикагеля поливиниламином и дисперсией отрицательно заряженных композитных частиц на основе фосфата кальция и сополимера ВИ-АК-56 (СаР-22, см. таблицу 22) привела к повышению эффективности разделения смеси родаминов (Рисунок 58).



**Rhod-B**



**Rhod-101**



А

Б

Рисунок 58 – Формулы родаминов (А) и хроматограмма смеси родамина Б и родамина 101 1: 1 (Б). Левая пластинка – 10-60  $\mu\text{m}$  силикагель, центральная пластинка – силикагель, модифицированный поливиниламином, правая пластинка – силикагель, модифицированный поливиниламином и дисперсией композитных наночастиц. Элюент – метанол. Возбуждение светом 365 нм

Осадок на основе карбоната кальция, полученный в присутствии сополимера ВИ-АК-56 (Са-7 в таблице 17), представляет собой микрометровые шарообразные частицы и содержит менее 3% органического вещества. На основе Са-7 мы приготовили пластинки для тонкослойной хроматографии, используя поливиниловый спирт (0.45%) в качестве связывающего агента. Хроматография смеси родамина Б и родамина 101 1: 1 показала возможность разделения таких схожих веществ, на сорбенте, состоящем из композитных частиц Са-7 (Рисунок 59). Результаты исследования опубликованы в работе [272].



Рисунок 59 – Хроматограмма смеси 1: 1 родамина Б и родамина 101 (Б) на композитном сорбенте Са-7: слева – хроматограмма родамина 101, центр – родамина Б, справа – смеси родаминов. Элюент – смесь тетрахлорэтилен: метанол 7.33: 1. Возбуждение светом 365 нм

#### 2.4.2 Покрyтия для выращивания клеток

Частицы карбоната кальция, стабилизированные органическими полимерами, могут применяться для создания покрытий на стеклянных поверхностях. При выдерживании покровных стекол в дисперсиях наночастиц в течение 48 часов на стеклах образуются покрытия, состоящие из шарообразных частиц (Рисунок 60). Частицы имеют схожую морфологию с осадками, получаемыми в присутствии полимеров. Более равномерные покрытия получены при использовании суспензий осадков, полученных добавлением поликатионов к стабильным частицам (Таблица 20). Нанесение суспензий, обработанных УЗ, на стеклянную поверхность приводит к формированию покрытий, состоящих из частиц размерами десятки и сотни нанометров (Рисунок 61). Поверхностная плотность функциональных групп полимера, определенная спектрофотометрией с использованием пикриновой кислоты аналогично [269] составила  $500 \text{ нм}^{-2}$  по

аминогруппам для покрытия на основе CaP-91), что делает такие покрытия перспективными для использования в области разработки сенсорных структур.

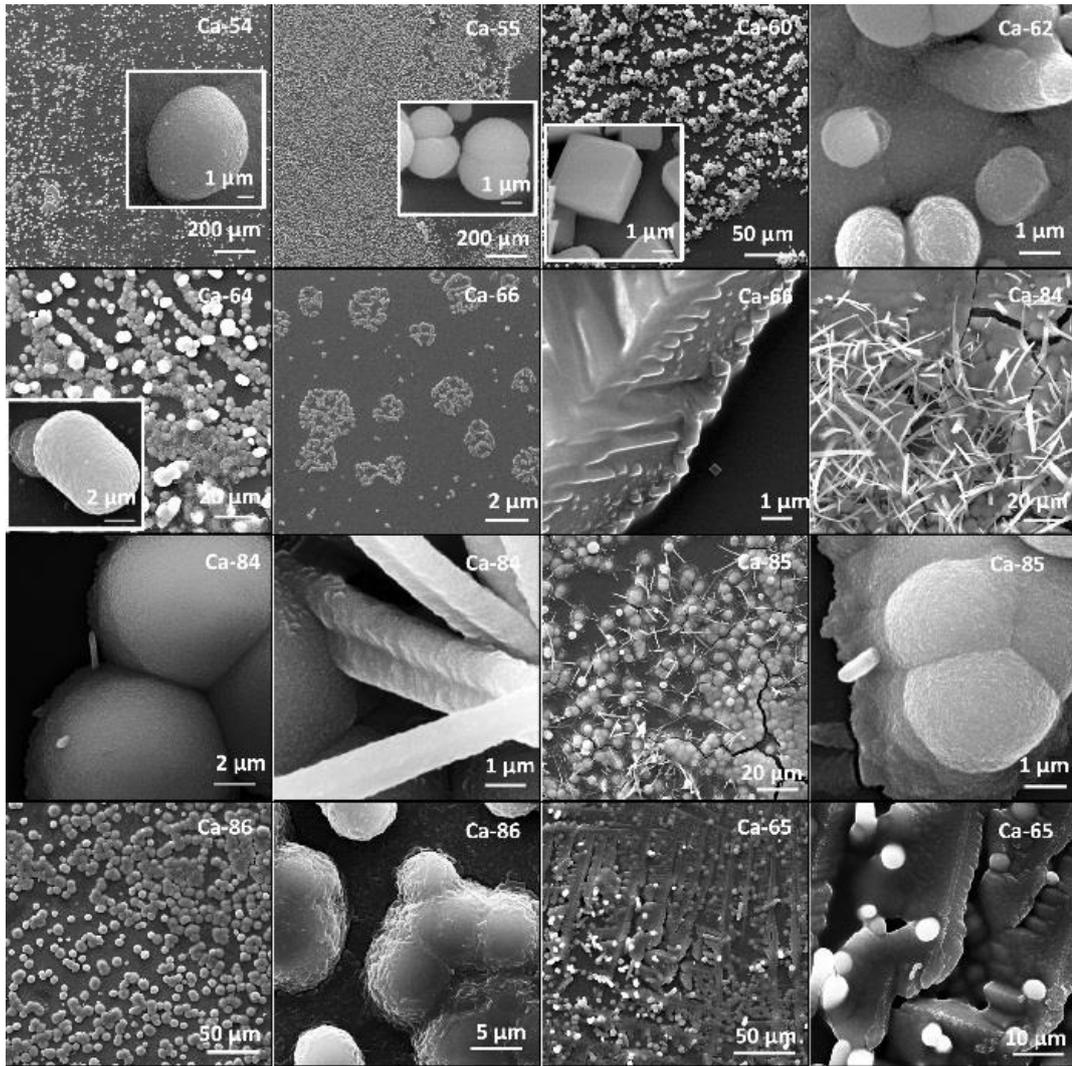


Рисунок 60 – СЭМ изображения покрытий, полученных выдерживанием покровных стекол в дисперсиях композитных частиц на основе карбоната кальция и полимеров.

Шифры соответствуют таблице 19

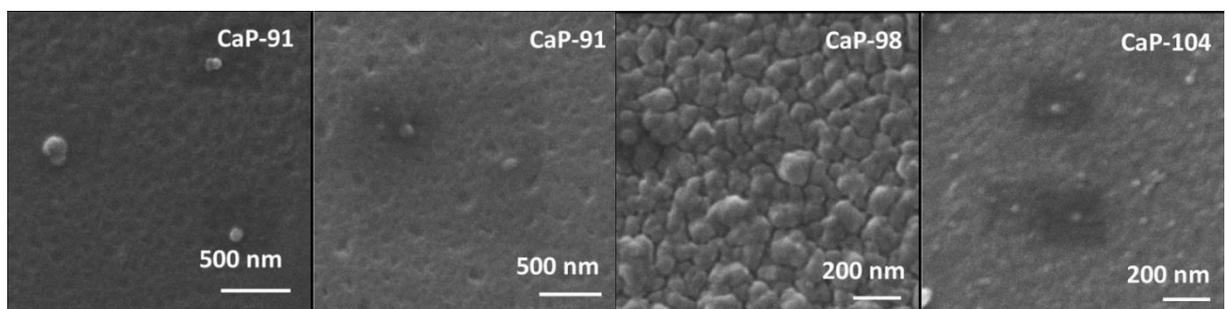


Рисунок 61 – СЭМ изображения покрытий, полученных из суспензий композитных осадков. Шифры (правый верхний угол) соответствуют таблице 20

Неровность поверхности в микромасштабе может быть полезной для прикрепления клеток. Эксперименты с культурой фибробластов показали способность клеток прикрепляться к композитной поверхности и хорошую выживаемость клеток (Рисунок 62).

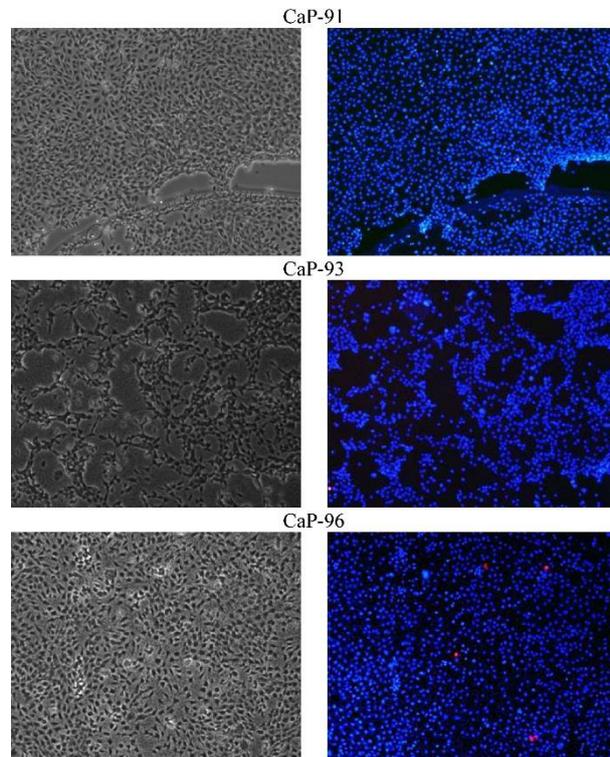


Рисунок 62 – Изображения фибробластов, выращенных на покровных стеклах, покрытых композитными материалами (шифры соответствуют таблице 20). Синяя флуоресценция относится к живым клеткам, окрашенным Hoechst-33342; розовая флуоресценция соответствует мертвым клеткам, окрашенным пропидий йодидом.

Масштаб 100  $\mu\text{m}$

Стабилизированные полимерами частицы имеют отрицательный заряд и способны взаимодействовать с положительными объектами, такими как поликатионы, образуя твердые материалы, состоящие из покрытых полимерными пленками композитных частиц. Мы показали, что твердые композитные материалы могут применяться для создания хроматографических сорбентов и нанощероховатых покрытий с высокой поверхностной плотностью функциональных групп, пригодных для выращивания клеточных культур. Результаты исследования опубликованы в работе [272].

### 2.4.3 Макропористые материалы для заполнения костных дефектов

Синтетический ГА и композиты на его основе применяются в регенеративной медицине для создания искусственных костных каркасов. Полимерные кислоты способны

стабилизировать частицы фосфата кальция в растворе, и такие частицы взаимодействуют с коллагеновыми волокнами как с матрицей для осаждения ГА, в результате образуя макропористые конструкции, прорастающие сосудами и тканями [222, 271]. Недостаток такого метода состоит в неравномерном распределении гидроксиапатита в коллагеновой матрице. Кристаллизация ФК затрудняет диффузию наночастиц ФК внутрь коллагенового матрикса, приводя к образованию более минерализованных внешних областей и менее минерализованных внутренних участков. Мы предлагаем новый способ создания пористых материалов – взаимодействие противоположно заряженных частиц фосфата кальция. Мы попытались заполнить таким пористым материалом дефект в кости (Рисунок 63). Свежеприготовленную суспензию, полученную взаимодействием противоположно заряженных частиц фосфата кальция, помещали в отверстие в кости. При полном высыхании образовались разрывы внутри материала, но не на границе кость/материал. По данным СЭМ, поры в материале имеют размеры 100-200  $\mu\text{m}$ . Результаты исследования опубликованы в работе [270].

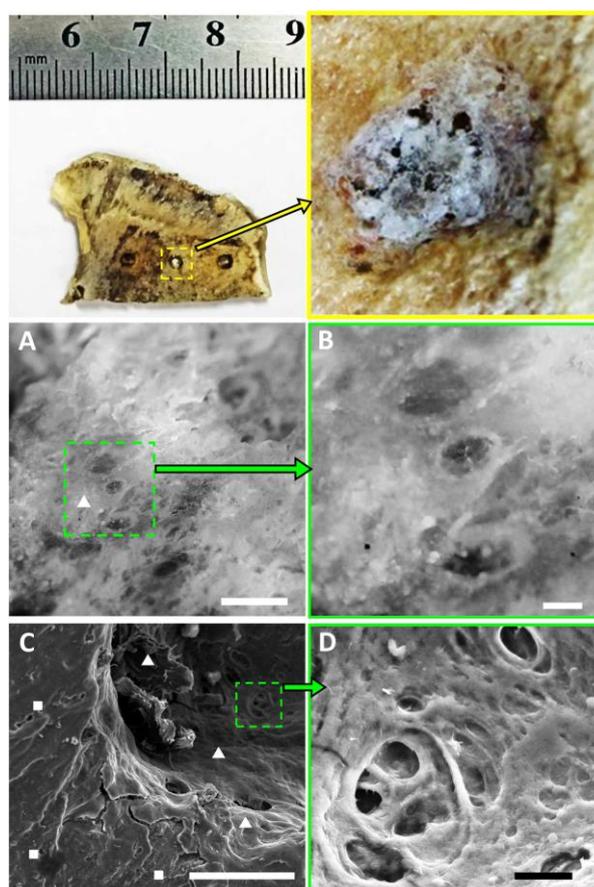


Рисунок 63 – Оптические (А, В) и СЭМ (С, D) изображения композитного материала внутри костного дефекта. А, В – CaPh-105, С, D – CaPh-96 (шифры соответствуют таблице 23). Обозначения: треугольник – композитный материал, квадрат – куриная кость. Масштаб: А, С - 500  $\mu\text{m}$ , В – 200  $\mu\text{m}$ , D - 50  $\mu\text{m}$

#### 2.4.4 Минерализация клеточных стенок динофлагеллят

Покрытие живых клеток твердым органо-неорганическим материалом может быть ещё одной областью применения дисперсий композитных наночастиц. Целями создания такого покрытия являются защита клеток во время хранения и транспортировки, клеточная терапия и 3D-биопринтинг. Минерализация клеток исследуется в качестве возможной противораковой терапии, которая подавляет деление и миграцию клеток [273]. Моделирование биоминерализации, включая кальцификацию кровеносных сосудов, является еще одним направлением исследований по покрытию живых клеток твердыми материалами [274]. Клеточные мембраны не способны в значительной степени связываться с неорганическими веществами (карбонаты и фосфаты кальция, кремнезем), в связи с этим применяются многослойные покрытия. Живые клетки покрывают несколькими слоями органических полимеров, причем последний слой обеспечивает взаимодействие с неорганическими частицами. Например, когда в качестве последнего слоя наносится полиакриловая кислота (ПАК), модифицированная клетка становится способной взаимодействовать с ионами  $Ca^{2+}$ . Добавление фосфат-ионов или карбонат-ионов завершает минерализацию клеток [275]. Этот многоэтапный подход довольно сложен в реализации и может приводить к образованию нерастворимых побочных продуктов. Мы демонстрируем подход к минерализации клеток динофлагеллят *Gymnodinium corollarium* (A. M. Sundström, Kremp et Daugbjerg) с помощью положительно заряженных органо-неорганических наночастиц.

Добавление дисперсии положительно заряженных наночастиц фосфата кальция (CaP-38, Таблица 22) к клеткам динофлагеллят приводит к образованию на отрицательно заряженной клеточной мембране покрытия из композитного материала (Рисунок 64). Для подтверждения наличия фосфата кальция в окружающем клетки слое к среде добавляли краситель с зеленой флуоресценцией QA2, разработанный в лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН для окрашивания кальциевых структур [276]. После минерализации хлоропласты сохраняются (Рисунок 64, красная флуоресценция), что свидетельствует о жизнеспособности клеток. Мембрана неминерализованных динофлагеллят слегка сжалась во время лиофильной сушки для подготовки проб для СЭМ (Рисунок 64 Е), а в случае минерализованных клеток данные СЭМ (Рисунок 64 F) демонстрируют слой некоторого материала на поверхности клетки. По данным EDAX

(Рисунок 64 G и H), этот слой содержит кальций и фосфор. Результаты исследования опубликованы в работе [270].

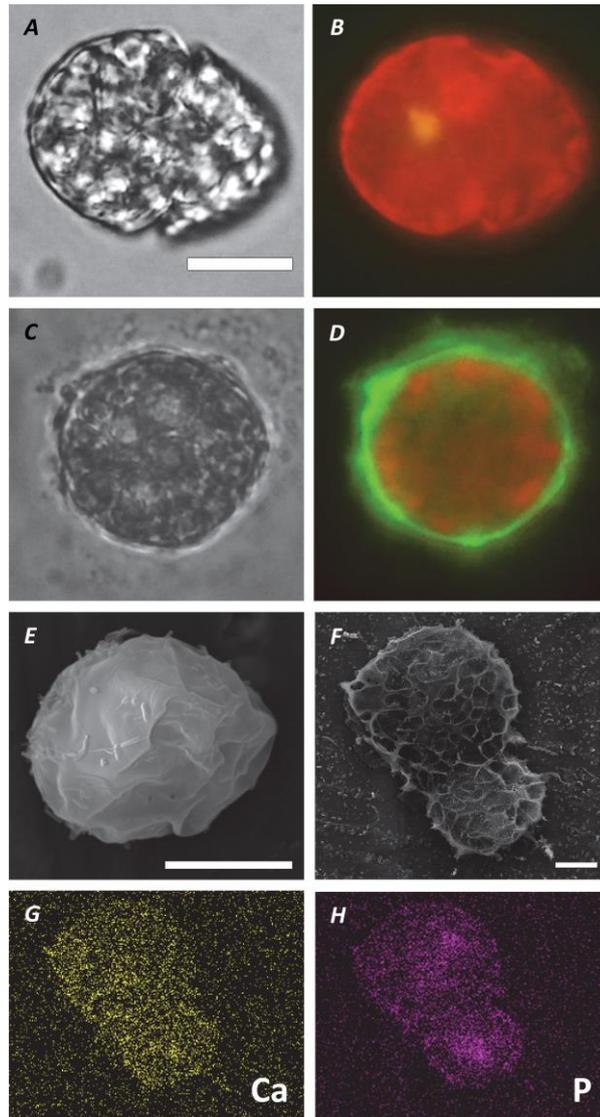


Рисунок 64 – Оптические (A и C), флуоресцентные (возбуждение при 470 нм, B и D) и СЭМ изображения (E-H) клеток динофлагеллят (A, B и E) и минерализованных клеток динофлагеллят, окрашенных флуоресцентным красителем QA2 (C-H). Красная флуоресценция – хлоропласты, зеленая - QA2 в кальций-фосфатном покрытии. G и H – EDAX-картирование кальция и фосфора. Масштаб: 10  $\mu\text{m}$

## Глава 3 Объекты и методы исследования

### 3.1 Подготовка исходных веществ

#### Подготовка мономеров

В работе использовали 1-винилимидазол (ВИ), акриловую кислоту (АК), N-винилформамид (ВФА). ВИ, АК, ВФА очищали перегонкой при пониженном давлении (Таблица 24). Акрилат натрия (АК-Na) получали смешиванием 15% этанольного раствора АК с 10% этанольным раствором NaOH (соотношение АК: NaOH 1: 1 по молям), образовавшийся осадок отделяли фильтрованием, промывали этанолом, сушили в вакууме.

Таблица 24 – Константы используемых мономеров

Мономер	Мол. масса, г/моль	T <sub>кип</sub> , °C/ давление, мм.рт.ст.	Показатель преломления, 20°C
ВИ	94.1	42/2	1.5338
АК	72.06	49/16	1.4224
ВФА	71.1	50/4	1.4940

#### Подготовка растворителей и инициаторов

ДАК перекристаллизовывали из этанола при температуре не выше 40°C. Диоксан, диэтиловый эфир и этанол очищали в соответствии с [277]. ДМФА встряхивали с CuSO<sub>4</sub> (30 минут), фильтровали и очищали перегонкой при 5 мм.рт.ст. Деионизованную воду получали с помощью прибора Millipore Simplicity UV (США).

#### Подготовка солей, кислот и оснований

В работе использовали NaOH, KOH, HCl, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> фирм Sigma-Aldrich, Fisher и Acros Chemicals. Растворы HCl 0.1M и 1M готовили из стандарт-титров. NaOH и KOH предварительно очищали от примесей карбонатов фильтрованием их 50%-ных водных растворов. Хлорид кальция в виде кристаллогидрата CaCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> получали по методикам [278].

Для калибровки рН-метра использовали буферные растворы с рН 3.56 (калий гидротартрат КНС<sub>4</sub>Н<sub>4</sub>О<sub>6</sub>), 6.86 (КН<sub>2</sub>РО<sub>4</sub> + Na<sub>2</sub>НРО<sub>4</sub>) и 9.18 (натрий тетраборат 10-водный Na<sub>2</sub>B<sub>4</sub>O<sub>7</sub>·10H<sub>2</sub>O), приготовленные из стандарт-титров.

## **Синтез флуоресцентного красителя**

Флуоресцентный кумариновый краситель с двумя карбоксильными группами, QA2, получен в лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН в соответствии с [276].

## **3.2 Синтез полимеров**

### **Поливиниламин (ПВА)**

ПВА молекулярной массой 7, 15 и 470 кДа синтезированы в лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН щелочным гидролизом фракций поливинилформамида (ПВФА) [279], полученного осадительной полимеризацией в изопропиловом спирте (для ПВА-7 и ПВА-15) и в воде (для ПВА-470) и последующим фракционированием [280].

### **Полиакриловая кислота (ПАК)**

ПАК молекулярной массой 20 кДа (ПАК-20) получали гидролизом полиакрилоилхлорида [246]. Полиакрилоилхлорид получали радикальной полимеризацией акрилоилхлорида в присутствии азобисизобутиронитрила (ДАК, 2% от массы мономера) в 1,4-диоксане (растворитель: мономер = 4: 1 по массе) в атмосфере аргона при 60°C в течение 72 ч. Затем, для получения ПАК, реакционную смесь выливали в воду, диализовали относительно дистиллированной воды и лиофильно сушили.

ПАК молекулярной массой 255 кДа (ПАК-255) получали радикальной полимеризацией АК в присутствии ДАК (0.5% от мономера, масс.) при перемешивании в кипящем гексане с обратным холодильником, соотношение АК: гексан составляло 1:10 по массе. Полученную порошкообразную ПАК многократно промывали гексаном, диализовали относительно дистиллированной воды, фильтровали (размер пор 0.45 мкм) и лиофильно сушили, выход составил 71.4%.

ПАК молекулярной массой 1816 кДа (ПАК-1816) получали полимеризацией АК в 10% водном растворе окислительно-восстановительным иницированием системой тиомочевина/бромат калия (на 10 мл АК 2 мл 0.1 М  $(\text{H}_2\text{N})_2\text{CS}$ ; 5 мл 0.1 М  $\text{KBrO}_3$ ; 1 мл 0.1 М  $\text{HCl}$ ) в течение 10 дней при комнатной температуре. Реакционную смесь диализовали относительно дистиллированной воды и лиофильно сушили (выход ПАК-1816 73%).

Молекулярную массу образцов ПАК определяли вискозиметрией в 2М NaOH, при 25°C используя константы для уравнения Марка-Куна-Хаувинка ( $K = 0.0422$ ,  $\alpha = 0.64$ ) [281].

### Поливинилимидазол (ПВИ)

ПВИ синтезировали полимеризацией в бензоле при 60°C в присутствии инициатора ДАК в атмосфере аргона согласно [248]. ММ ПВИ, определенная по уравнению Марка-Куна-Хаувинка с  $K$  и  $\alpha$ , взятыми из литературных данных [282], составила 160 кДа.

ПВИ-65 (ММ = 65 кДа) синтезировали в водной среде при рН 7 в присутствии ДАК в количестве 1% от массы мономера в атмосфере аргона при 60°C в течение 12 (мономер: растворитель = 1:4 по массе). Полимер выделяли осаждением в диоксан, сушили в вакууме. Выход составил 21%.

### Полиакриловая кислота с привитым полиамином (ПАКХ-N3)

ПАКХ-N3 получен в лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН согласно [283].

### Синтез сополимеров

#### Сополимеры ВИ-АК

Сополимеры ВИ и АК получали радикальной сополимеризацией ВИ с акрилатом натрия (АК-Na) в воде (мономеры: вода = 1: 3, масс.) при 60°C в присутствии ДАК (Таблица 25) в атмосфере аргона в соответствии с методикой [231]. Содержание звеньев ВИ в сополимерах определяли методом УФ-спектроскопии по рассчитанным калибровочным кривым, полученным при измерении спектров поглощения смесей ПВИ и ПАК (Рисунок 65). Значения, полученные по калибровочным графикам для длин волн 210, 215, 220 нм усредняли, получая содержание звеньев ВИ в сополимере. Соотношение звеньев АК-Na и звеньев АК определяли потенциометрическим титрованием в 0.1 М NaCl. К раствору сополимера (30 мг полимера, 1.5 мг/мл) добавляли 0.1 М NaOH до рН 11.5, титровали 0.1 М HCl. Часть добавленного NaOH расходуется на перевод звеньев АК в АК-Na. В щелочной области (рН 7-9) на кривой наблюдается перегиб, соответствующий титрованию избыточного количества щелочи. По разнице объемов добавленной и избыточной щелочи находили количество АК в Н-форме. Используя данные о содержании ВИ и АК в сополимере, рассчитывали долю звеньев АК-Na.

Таблица 25 – Синтез и состав сополимеров ВИ-АК

Шифр	% АК-Na в мон. смеси	ДАК, % от массы мономеров	Время, ч	Выход, %	Состав сополимера		
					% АК-Na	% АК	% ВИ
РА-2-05	5	2	22	41.2	10.6	4.8	84.7
МС23-19	9.8	1	3.3	10.6	0.5	10.9	88.6

Шифр	% АК-На в мон. смеси	ДАК, % от массы мономеров	Время, ч	Выход, %	Состав сополимера		
					% АК-На	% АК	% ВИ
FML8-09	20	2	17.5	44.0	30.6	4.2	65.2
MC22-19	29.5	1	3.3	19.2	21.9	15.2	62.9
FML9-09	50	2	17.5	91.0	52.2	4.2	43.6
MC-120-3	69.9	1	16	97.3	60.2	13.0	26.8
MC-120-9	79.3	1	3	26.5	76.6	7.9	15.5
MC-120-8	90.0	1	3	41.1	66.5	29.4	4.1

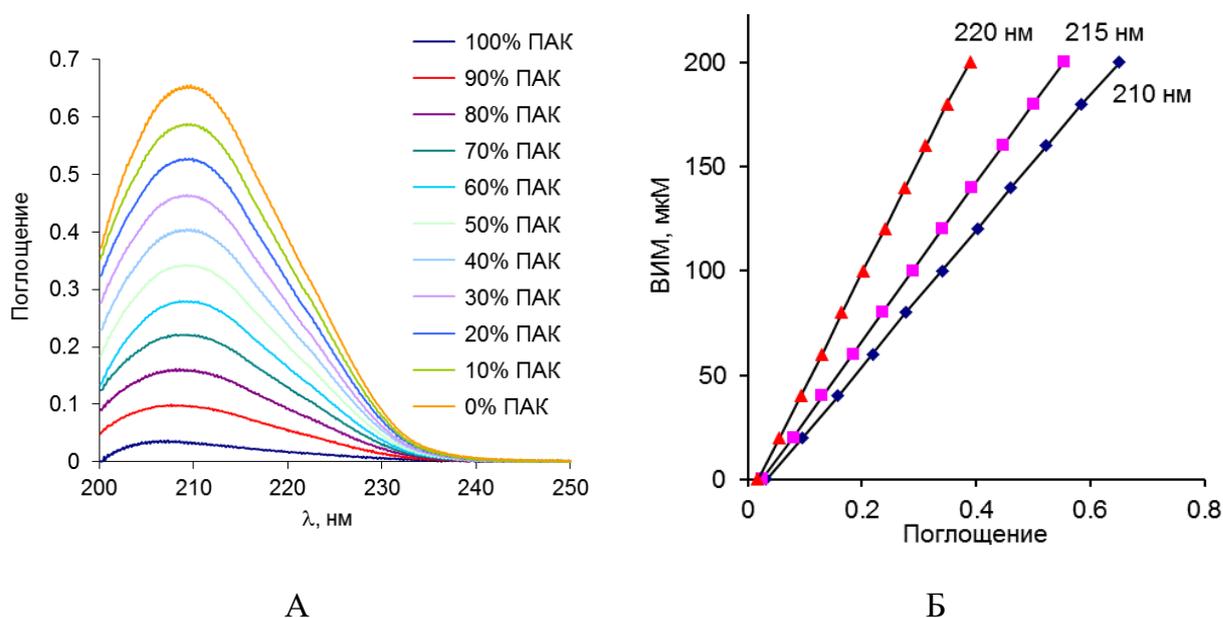


Рисунок 65 – УФ спектры модельных смесей ПВИ с ПАК (А) и калибровочный график (Б)

### Сополимеры ВИ-ВА

Сополимеры ВА-АК получали щелочным гидролизом сополимеров ВИ-ВФА.

Сополимеры ВИ-ВФА получали радикальной сополимеризацией в воде при 60°C при pH 7 (регулировали добавлением HCl) с ДАК (1% от массы мономеров). Полимеры очищали диализом относительно воды, фильтровали (размер пор 0.45 μm) и сушили лиофильно. Содержание звеньев ВИ в сополимере определяли УФ спектроскопией по рассчитанной калибровочной кривой, полученной при измерении спектров поглощения смесей ПВИ и ПВФА (Рисунок 66). Значения, полученные для длин волн 215, 220, 225 нм усредняли.

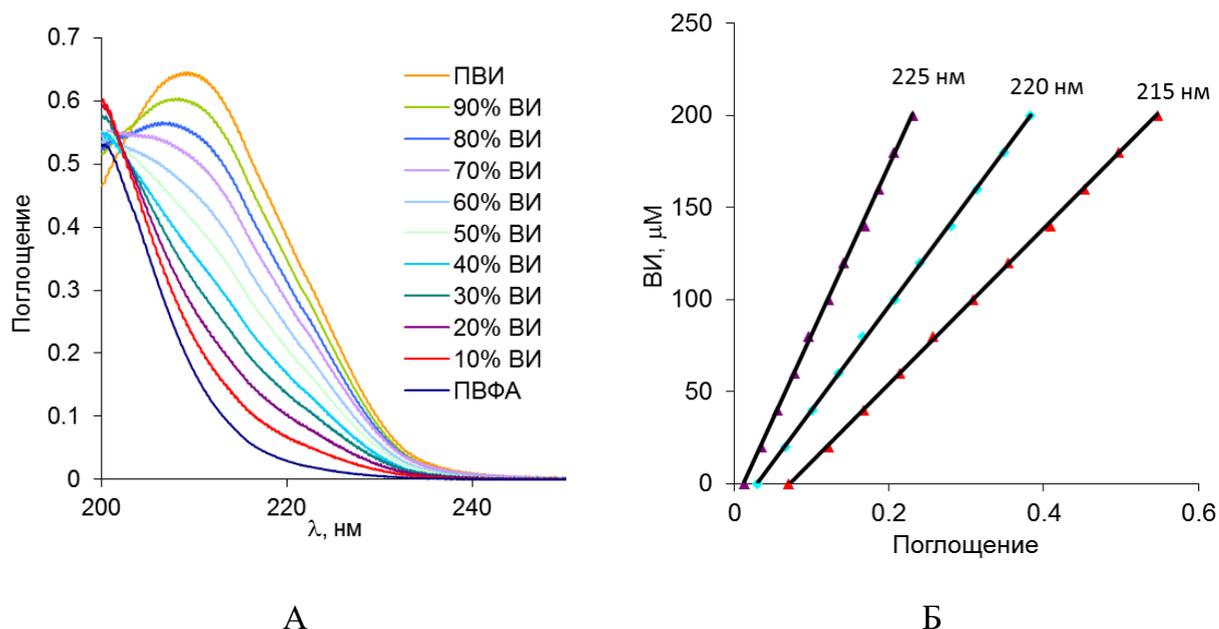
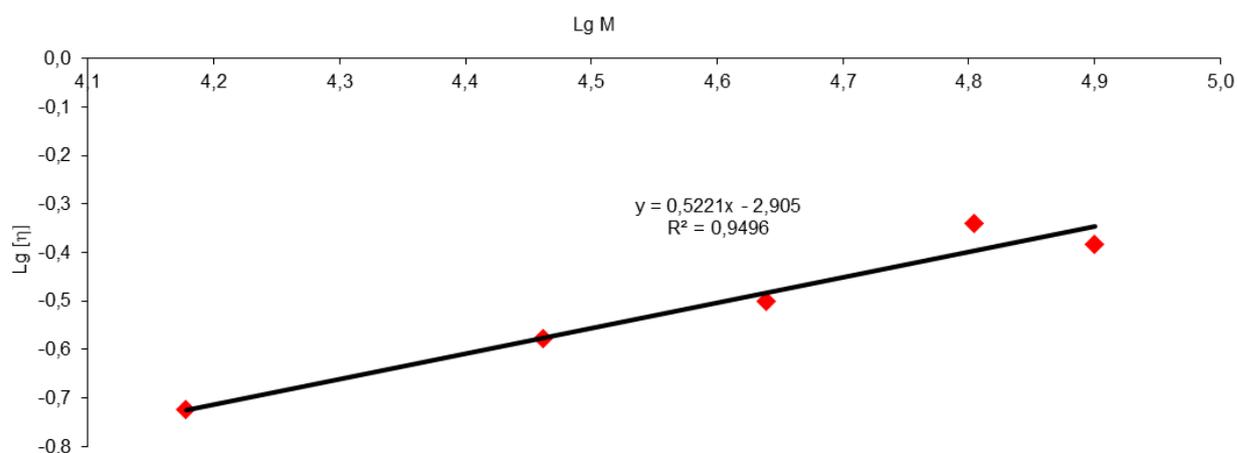


Рисунок 66 – УФ спектры модельных смесей ПВФА с ПВИ (А) и калибровочные графики (Б)

ММ сополимеров ВИ-ВФА оценивали вискозиметрически по уравнению Марка-Куна-Хаувинка. Для оценки ММ сополимеров необходимы значения  $K$  и  $\alpha$  для гомополимеров, определенных в одинаковых условиях. Константы  $K$  и  $\alpha$  для ПВИ [282] и ПВФА [280] определены в разных условиях. В связи с этим,  $K$  и  $\alpha$  для ПВИ определяли в условиях вискозиметрии ПВФА (0.2М NaCl, 20°C) с использованием фракций ПВИ с известными ММ, полученных в соответствии с [284]. Получены следующие значения констант для ПВИ:  $K=0.0012445$ ,  $\alpha=0.522$  (Рисунок 67).



$$\lg[\eta] = \lg K + \alpha \lg M$$

Рисунок 67 - Зависимость  $\lg [\eta]$  от  $\lg M$  для фракций ПВИ в 0.2М NaCl при 20°C

Относительные вязкости сополимеров ВИ-ВФА определяли в 0.2М NaCl при 20°C при помощи вискозиметра Уббелоде (Таблица 26). Значения характеристических вязкостей  $[\eta]$  вычисляли из зависимости произведения  $[\eta]*C$  от величины относительной вязкости [285]. ММ сополимеров вычисляли на основе констант для ПВФА ( $K=0.0001074$  и  $\alpha=0.7$  [245]) и ПВИ ( $K=0.0012445$ ,  $\alpha=0.522$ ) и усредняли с учётом состава сополимера.

Таблица 26 – Определение молекулярной массы ВИ-ВФА

Шифр	% ВИ в сополимере, мольный	$[\eta]$ , дл/г	Мол. масса* кДа, относительно констант для:		Мол. масса с учётом состава, кДа
			ПВИ	ПВФА	
ПВИ-65	100	0.4043	64.8	-	64.8
SP5-90	86.7	0.4523	80.3	58.8	77.4
SP5-70	70.4	0.5203	105.0	70.6	94.8
SP5-30	29.9	0.8563	272.6	136.0	176.9
SP5-10	4.9	1.8377	1177	371.6	411.1
PV20-06	82.2	0.5204	105.0	70.7	99.0
PV20-02	52.7	0.6457	158.8	93.9	128.1
PV20-05	25.3	1.1567	485.0	202.1	273.7
ПВФА	0	2.4612	-	545.8	545.8

\*Используемые константы для ПВФА  $K=0.0001074$  и  $\alpha=0.76$ , для ПВИ  $K=0.001244$  и  $\alpha=0.522$ .

Сополимеры ВИ-ВА получали щелочным гидролизом сополимеров ВИ-ВФА. Гидролиз проводили в КОН (двукратный избыток по отношению к звеньям ВФА, моль) при 60°C в атмосфере аргона в соответствии с [279] в течение 24 ч. Концентрация сополимера составляла 5% (масс.). Реакционную среду нейтрализовали HCl, диализовали относительно дистиллированной воды 2-3 дня, фильтровали (размер пор 0.45 мкм) и сушили лиофильно. Выход сополимеров ВИ-ВА рассчитывали с учетом потери массы звена ВФ.

### Сополимеры ВА-АК

Сополимеры ВА-АК получали щелочным гидролизом сополимеров ВФА-АК. Сополимеры ВФА-АК получали осадительной сополимеризацией ВФА и АК в диоксане (5 г диоксана на 1 г мономерной смеси) при 65°C в атмосфере аргона в присутствии ДАК. Порошкообразные сополимеры промывали диоксаном и гексаном, сушили в вакууме. Образец MS3Z получали сополимеризацией ВФА с АК-На в смеси H<sub>2</sub>O/изопропиловый спирт (1: 1 по объему, 5 г растворителя на 1 г мономерной смеси) в присутствии ДАК при

55°C в атмосфере аргона. Реакционную смесь диализовали относительно дистиллированной воды и лиофильно сушили.

Молекулярные массы сополимеров ВФА-АК определены сотрудником лаборатории молекулярной физики полимеров ИВС РАН (г. Санкт-Петербург) к.х.н. Захаровой Н. В. в воде методом статического светорассеяния по графикам Зимма с помощью метода двойной экстраполяции. Содержание звеньев АК определяли потенциометрическим титрованием навески полимера (20-30 мг), титрант 0.1М NaOH, концентрация полимера составляла 1.5 мг/мл.

Гидролиз сополимеров ВФА-АК проводили в КОН (двукратный избыток по отношению к звеньям ВФА и АК, моль.) при 60°C в атмосфере аргона в соответствии с [279] в течение 24 ч. Концентрация сополимера составляла 5% (масс.). Реакционную среду нейтрализовали HCl, диализовали относительно дистиллированной воды 2-3 дня, фильтровали (размер пор 0.45 мкм) и сушили лиофильно. Выход сополимеров ВА-АК рассчитывали с учетом потери массы звена ВФ. Степень гидролиза контролировали при помощи спектроскопии <sup>1</sup>H ЯМР (Рисунок 68). Состав сополимеров ВА-АК определяли при помощи <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопии в D<sub>2</sub>O по соотношению сигналов протонов СН-N аминогрупп при 2.7-4 м.д. и протонов основной цепи в области 1-2.7 м.д. Соотношение звеньев акрилата калия (АК-К), образовавшихся в ходе гидролиза в КОН, и звеньев АК определяли потенциометрическим титрованием в 0.1 М NaCl. К раствору сополимера (30 мг полимера, 1.5 мг/мл) добавляли 0.1 М NaOH до pH 11.5, титровали 0.1 М HCl. Часть добавленного NaOH расходуется на перевод звеньев АК в АК-Na. В щелочной области (pH 7-9) на кривой наблюдается перегиб, соответствующий титрованию избыточного количества щелочи. По разнице объемов добавленной и избыточной щелочи находили количество АК в Н-форме. Затем, используя данные о содержании ВА и массу титруемого сополимера, рассчитывали содержание звеньев АК-К.

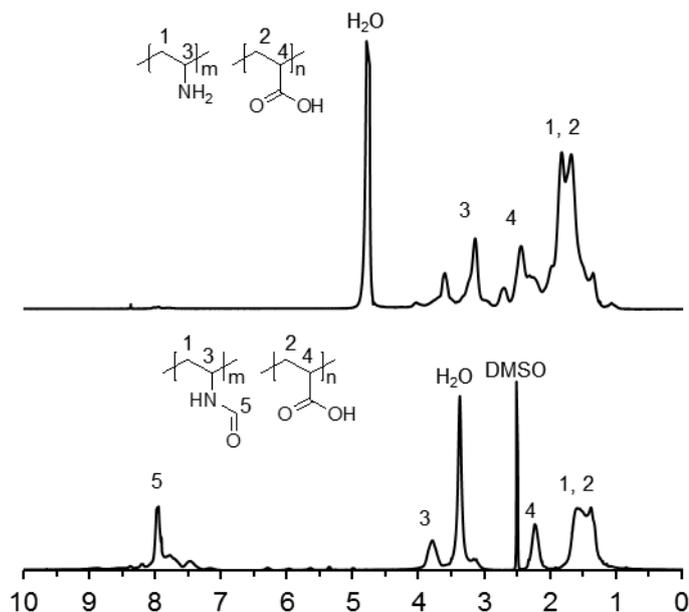


Рисунок 68 – Типичный <sup>1</sup>H ЯМР спектр сополимера ВФА-АК (нижний) и продукта его гидролиза – ВА-АК (верхний). Растворитель: DMSO-d<sub>6</sub> для ВФА-АК, D<sub>2</sub>O для ВА-АК

### Сополимеры ВИ-ВА-АК

Сополимеры ВИ-ВА-АК получали гидролизом сополимеров ВИ-ВФА-АК. Сополимеры ВИ-ВФА-АК синтезировали радикальной сополимеризацией ВИ, ВФА, АК и АК-Na в воде (мономеры: вода = 1: 3, масс.) при pH 7 (pH 7 достигали, регулируя соотношение АК/АК-Na) в присутствии ДАК при 60°C в атмосфере аргона. Сополимеры очищали осаждением в ацетон, растворяли в воде, диализовали относительно дистиллированной воды в течение 7-8 часов, фильтровали (размер пор 0.45 мкм) и сушили лиофильно. Состав сополимеров определяли <sup>1</sup>H ЯМР спектроскопией (Рисунок 69) по сигналам протонов имидазольного кольца (NCHCHNH, 6.4–7.1 ppm; NHCHN, 7.1–8.1 ppm), протонов формамидной группы (NHCH[O], 7.9–8.1 ppm) и протонов основной цепи (CH<sub>2</sub> 1.0–2.5 ppm, CH 2.6–4.5 ppm) по следующим уравнениям:

$$\text{ВИ, \%} = \frac{\text{Int}_{(6.4-7.1)} \cdot 1.5}{\text{Int}_{(1.0-4.5)}} \cdot 100\% \quad (1)$$

$$\text{ВФА, \%} = \frac{(\text{Int}_{(7.1-8.1)} - \text{Int}_{(6.4-7.1)}/2) \cdot 3}{I_{1.0-4.5}} \cdot 100\% \quad (2)$$

$$\text{АК, \%} = \frac{\text{Int}_{(0.8-4.4)} - \text{Int}_{(6.4-7.1)} \cdot 1.5 - (\text{Int}_{(7.1-8.1)} - \text{Int}_{(6.4-7.1)}/2) \cdot 3}{\text{Int}_{(1.0-4.5)}} \cdot 100\% \quad (3)$$

где ВИ, ВФА и АК, % - мольные доли (%) ВИ, ВФА и АК в сополимере;  $\text{Int}_{(A-B)}$  – величина интеграла области от А до В, м.д.

Сигнал протона формамидной группы при 8.0 м.д. перекрывается сигналом протона имидазольного кольца NHCHN в области 7.1-8.1 м.д. В связи с этим, долю ВФА вычисляли вычитанием вклада протонов ВИ в область 7.1-8.1 м.д., который рассчитывали как  $\frac{1}{2}$  интеграла области 6.4-7.1 м.д.

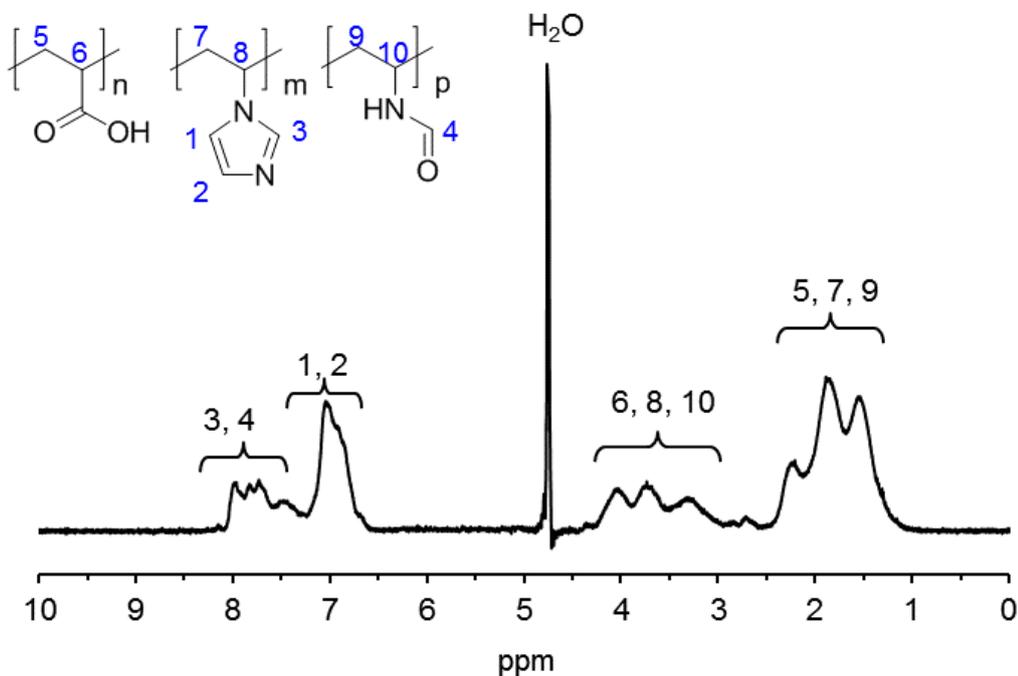


Рисунок 69 – Типичный  $^1\text{H}$  ЯМР спектр сополимера ВИ-ВФА-АК. Растворитель –  $\text{D}_2\text{O}$

Гидролиз сополимеров ВИ-ВФА-АК проводили в КОН (двукратный избыток по отношению к звеньям ВФА и АК по молям) при  $60^\circ\text{C}$  в атмосфере аргона в соответствии с [279]. Концентрация сополимера составляла 5% (масс.). Реакционную среду нейтрализовали HCl, диализовали (мембрана 4 кДа) относительно дистиллированной воды 2 дня, фильтровали (размер пор 0.45 мкм) и сушили лиофильно. Выход сополимеров ВИ-ВА-АК рассчитывали с учетом потери массы звена ВФ. В ходе гидролиза натрий в звеньях АК-Na замещается калием. Соотношение звеньев АК/АК-К рассчитывали по данным потенциометрического титрования (30 мг полимера, 1.5 мг/мл, титрант 0.1M HCl). Перед титрованием к раствору полимера добавляли 0.1M NaOH до pH 11.5. Часть добавленного NaOH расходуется на перевод звеньев АК в АК-Na. При титровании щелочной области (pH 8-10) на кривой наблюдается перегиб, соответствующий титрованию избыточного количества щелочи. По разнице объемов добавленной и избыточной щелочи находили количество АК в Н-форме. Считая содержание звеньев ВА и ВИ равным содержанию ВФ и ВИ в соответствующих сополимерах, и используя массу сополимера, находили содержание звеньев АК-К.

### Расчет констант сополимеризации

Константы сополимеризации мономеров рассчитывали с использованием интегрального метода [232, 233], модифицированного в соответствии с работой [234]:

$$\frac{1}{\sqrt{kx}} - \sqrt{kx} = \sqrt{\frac{k}{x}}r_2 - \sqrt{\frac{x}{k}}r_1$$

$$k = \frac{M_1 m_{20}}{M_2 m_{10}}, \quad x = \frac{m_1}{m_2},$$

где  $m_{i0}$ ,  $m_i$  и  $M_i$  – концентрация звеньев  $i$ -го мономера в мономерной смеси, в реакционной смеси после завершения реакции и сополимере, соответственно.

Для расчета использовали образцы с выходом менее 50%.

### 3.3 Получение карбоната кальция в присутствии полимеров

Композитные частицы получали смешиванием водных растворов  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (24 мМ, рН 9), полимера (24 мМ, рН 9), воды и  $\text{CaCl}_2$  (24 мМ). Концентрации в конечном растворе составляли 6 мМ  $\text{CO}_3^{2-}$ , 6 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 или 12 мМ полимера. Если в течение 1 минуты после смешения компонентов наблюдали мутность или образование осадка, реакционную смесь оставляли на 24 ч при комнатной температуре в закрытой пробирке, после чего образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 5 минут), промывали деионизованной водой и лиофильно сушили. Если после смешения компонентов в течение 1 минуты раствор оставался прозрачным визуально, его пропускали через мембрану с размером пор 0.45  $\mu\text{m}$  в пробирку для исследования методом динамического светорассеяния и других экспериментов.

#### Взаимодействие дисперсий частиц на основе карбоната кальция и полимеров с полиоснованиями

Дисперсии частиц на основе карбоната кальция и полимеров готовили смешиванием водных растворов  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  (24 мМ, рН 9), полимера (24 мМ, рН 9), воды и  $\text{CaCl}_2$  (24 мМ) с получением прозрачного раствора. Концентрации в конечном растворе составляли 6 мМ  $\text{CO}_3^{2-}$ , 6 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 или 12 мМ полимера. Дисперсии частиц на основе карбоната кальция и полимеров смешивали с водными растворами полимерных оснований (ПВИ, ПВА, ПАКХ-N3; 24 мМ, рН 9) в соотношениях полиоснование: полимер в дисперсии = 0.25:1; 0.5:1; 1:1 и 2:1 (моль.), после смешения наблюдали образование осадка. Полученные осадки отделяли центрифугированием (3000 g, 5 минут), промывали деионизованной водой и лиофильно сушили.

### 3.4 Получение фосфата кальция в присутствии полимеров

Композитные частицы получали смешиванием водных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (24 мМ, рН 10), полимера (24 мМ, рН 10), воды и  $\text{CaCl}_2$  (24 мМ). Концентрации в конечном растворе составляли 3.6 мМ  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 6 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 или 12 мМ полимера. Если в течение 1 минуты после смешения компонентов наблюдали мутность или образование осадка, реакцию смесь оставляли на 24 ч при комнатной температуре в закрытой пробирке, после чего образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 5 минут), промывали деионизованной водой и лиофильно сушили. Если после смешения компонентов в течение 1 минуты раствор оставался прозрачным визуально, его пропускали через мембрану с размером пор 0.45  $\mu\text{m}$  в пробирку для исследования методом динамического светорассеяния и других экспериментов.

#### Взаимодействие дисперсий противоположно заряженных частиц на основе фосфата кальция и полимеров

Дисперсии отрицательно или положительно заряженных частиц фосфата кальция готовили смешиванием водных растворов  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  (24 мМ, рН 10), полимера (24 мМ, рН 10), воды и  $\text{CaCl}_2$  (24 мМ) с получением прозрачного раствора. Концентрации в конечном растворе составляли 3.6 мМ  $\text{HPO}_4^{2-}$ , 6 мМ  $\text{Ca}^{2+}$ , 6 или 12 мМ полимера. Дисперсии отрицательно и положительно заряженных стабилизированных полимерами частиц фосфата кальция смешивали между собой в соотношении 1:1, смесь оставляли на 24 ч при комнатной температуре в закрытой таре. Образовавшийся осадок отделяли центрифугированием (3000 g, 5 минут), промывали деионизованной водой и лиофильно сушили.

### 3.5 Методы исследования

#### 3.5.1 Потенциометрическое титрование

Потенциометрическое титрование осуществляли на ионометре МУЛЬТИТЕСТ ИПЛ-113 при  $20 \pm 0.2^\circ\text{C}$ . В качестве титрантов использовали 0.1М  $\text{HCl}$  и  $\text{NaOH}$ .

Значения  $\alpha$  и  $pK$  вычисляли по данным титрования. Титрование вели из области с рН 11.5 (перед титрованием добавляли 0.1М  $\text{NaOH}$ ), используя 0.1М  $\text{HCl}$  в качестве титранта. Часть добавленной перед титрованием щелочи расходуется на ионизацию протонированных звеньев полимера, а ее избыток («свободный»  $\text{NaOH}$ ) в ходе титрования нейтрализуется титрантом, чему соответствует перегиб на кривой титрования в области рН 8-10 (Рисунок 70). Степень нейтрализации полимера в данной точке

принималась за 1. Перегиб на кривой, соответствующий протонированию всех звеньев сополимера, не наблюдался, поэтому соответствующий объем титранта рассчитывали исходя из количества полимерных звеньев. С использованием этих данных рассчитывали степень ионизации полимера по уравнению [286]:

$$a = ([NaOH] + [H^+] - [OH^-])/C_{total}$$

где  $[NaOH]$  - концентрация добавленной щелочи, а  $C_{total}$  - общая концентрация кислотных (включая основные звенья в форме сопряжённых кислот) звеньев.

Значения рК вычисляли по уравнению Хассельбаха-Гендерсона [84]:

$$pH = pK_a + \log_{10} ([A^-]/[HA])$$

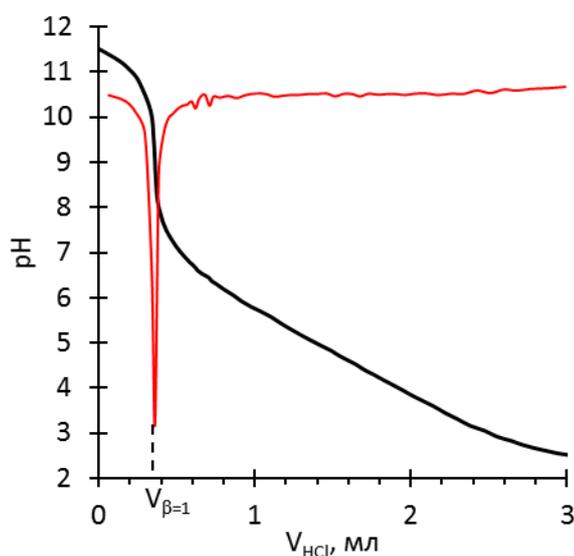


Рисунок 70 – Типичная кривая титрования сополимера ВИ-АК (черный) и ее производная (красный). Объем раствора 14 мл,  $C_{\text{полимер}} = 1.5$  мг/мл,  $C_{\text{HCl}} = 0.1$ М, полимер ВИ-АК с 15% АК

### 3.5.2 Вискозиметрия

Характеристические вязкости полимеров определяли в 0.1М NaCl при 20°C (ВИ-ВФА) и в 2М NaOH при 30°C (ПАК) при помощи вискозиметра Уббелоде.

### 3.5.3 Спектральные исследования

Спектры  $^1\text{H}$  ЯМР записывали в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН на спектрометре DPX-400 фирмы Bruker (с рабочей частотой 400.13 МГц). Сополимеры растворяли в  $\text{D}_2\text{O}$ .

ИК-спектры образцов в виде таблеток с KBr записывали на Фурье-спектрометре "Infracum FT-801".

Спектры поглощения записывали на спектрофлуориметре SM-2203 (Республика Беларусь) в кварцевых кюветах с  $l = 10$  мм.

### 3.5.4 Определение содержания кальция и фосфора в композитных осадках

Содержание кальция в твердых осадках определено вед. инж. лаб. лаборатории гидрохимии и химии атмосферы ЛИН СО РАН Лопатиной И.Н. при помощи атомно-абсорбционной спектроскопии на спектрометре Contr AA800, Analytik Jena AG (Germany). Осадки (2-3 мг) растворяли в 1 мл 0.1М HCl и разбавляли деионизованной водой до концентрации 3 мг/л и 0.01М HCl. Для устранения мешающего влияния фосфат-ионов в анализируемые растворы добавляли  $\text{LaCl}_3$  (0.18М  $\text{La}^{3+}$  в анализируемом растворе).

Для определения содержания фосфора к навеске композитного осадка (5-10 мг) добавляли 100 мг KBr и выдерживали смесь в фарфоровых тиглях при  $700^\circ\text{C}$  в течение 5 часов, после чего тигли остужали до комнатной температуры в эксикаторе над осушителем (хлорид кальция безводный). К озолённым осадкам добавляли 20  $\mu\text{л}$  раствора внутреннего стандарта,  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (250 г/л), сушили в вакууме и снимали ИК спектры полученных смесей в таблетках с KBr. Содержание фосфора определяли при помощи калибровочного графика. Для получения калибровочного графика заданные количества растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $\text{H}_3\text{PO}_4$  помещали в фарфоровые тигли, добавляли 100 мг KBr, высушивали и озоляли при  $700^\circ\text{C}$  в течение 5 часов, после чего в тигли добавляли 20  $\mu\text{л}$  раствора внутреннего стандарта  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$  (250 г/л), сушили в вакууме и записывали ИК спектры. В качестве аналитического сигнала использовались интенсивности полос групп CN при  $2121\text{ см}^{-1}$  и  $\text{PO}_4^{3-}$  при  $1035\text{ см}^{-1}$  (Рисунок 71).

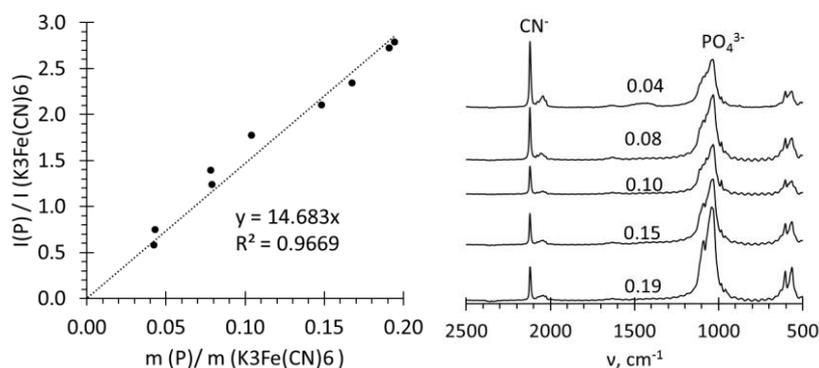


Рисунок 71 – Калибровочный график (слева) и ИК спектры калибровочных смесей (справа; число означает соотношение  $m(\text{P})/m(\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6)$ )

### 3.5.5 Микроскопия

СЭМ и EDAX изображения получали с помощью микроскопа FEI Quanta 200. Высушенные композитные осадки помещали на алюминиевые подложки (осадки диспергировали в диоксане и накапывали на подложку, или помещали на двусторонний скотч), покрывали слоем золота с использованием SDC 004 (BALZERS).

Для получения ТЭМ изображений композитных частиц применяли просвечивающий электронный микроскоп LEO 906E instrument (Zeiss, Oberkochen, Германия). Дисперсию композитных частиц (1-2  $\mu\text{л}$ ) помещали на медные сетки, покрытые формваром.

Флуоресцентные изображения получали с помощью инвертированного микроскопа MOTIC AE-31T с ртутной лампой HBO 103 W/2 OSRAM с синим фильтром (450 нм). использовали объективы CCIS Plan Achromats с увеличением  $\times 4$  (PL4X, N.A. 0.1),  $\times 20$  (LWD, N.A. 0.4),  $\times 40$  (LWD, N.A. 0.6) и AmScope Plan Achromats  $\times 100$  (Oil, N.A. 1.25). для записи изображений использовали камеру Moticam Pro 205A.

### 3.5.6 Светорассеяние

Формирование частиц в прозрачных дисперсиях исследовали методом динамического светорассеяния при 20°C с помощью прибора LAD-079 (Институт Теплофизики, Новосибирск). Измерения проводили с использованием 540-нм твердотельного лазера при угле рассеяния 90°. Дзета-потенциалы композитных частиц и полимеров измеряли при 20°C с помощью прибора Photocor complex Z (Фотокор, Россия), оснащенного диодным лазером (637.4 нм, мощность 1–60 Вт). Перед измерением образцы пропускали через мембрану с размером пор 0.45  $\mu\text{м}$  (Minisart, Sartorius AG, Германия). Корреляционные функции анализировали с использованием программы DynaLS v2.8, входящей в программное обеспечение Photocor, и программы Autocor [287].

### 3.5.7 Термогравиметрический анализ

Термогравиметрический анализ композитных осадков проведен н.с. научно-исследовательской лаборатории катализа и органического синтеза Страховым В.О. в ИРНИТУ (Иркутск) при помощи прибора NETZSCH STA 449F3, в потоке воздуха (20 мл/мин), в интервале температур 35-550°C, скорость нагрева 5°C/мин.

### 3.5.8 Порометрия

Площадь поверхности и пористость композитных осадков измеряли методом адсорбционной порометрии при  $T_{\text{кип}}$  азота (-196°C) при помощи прибора Сорбтометр-М

(ООО «Катакон», Новосибирск, РФ), газ-адсорбат – азот. Данные обрабатывали с использованием метода Брунауэра-Эммета-Теллера [288]. Для определения распределения пор по размеру использовали метод, предложенный Барретом, Джойнеом и Халендой (ВН) [289].

### **3.5.9 Рентгеноструктурный анализ**

Данные рентгеноструктурного анализа получены в лаборатории рентгеновских методов исследования к.г.-м.н. Каневой Е.В. (ИГХ СО РАН) при помощи дифрактометра Bruker D8 ADVANCE, оснащенного сцинтилляционным детектором и зеркалом Гёбеля. Источник излучения – трубка с медным анодом ( $\text{CuK}\alpha$ ), напряжение 40 кВ, ток 40 мА, время экспозиции 1 с, шаг  $0.02^\circ$ . Данные обрабатывали с использованием программного обеспечения DIFFRACplus. Образцы идентифицировали в соответствии с базой данных PDF-2 Powder Diffraction и индексировали в соответствии с программным обеспечением EVA. Для определения относительного содержания фаз и размера кристаллитов использовали программное обеспечение TOPAS 4.

### **3.6 Получение покрытий на основе частиц карбоната кальция, стабилизированных полимерами и культивирование фибробластов**

Покровные стекла выдерживали в смеси конц. $\text{H}_2\text{SO}_4$ :  $\text{H}_2\text{O}_2$  1: 1 в течение 15 минут, промывали проточной и дистиллированной водой, сушили на воздухе.

Композитные покрытия готовили смешиванием стабильных дисперсий частиц карбоната кальция с раствором поликатиона (ПВА, ПАКХ-N3). Дисперсию частиц карбоната кальция, стабилизированную полимером, смешивали с поликатионом в различных соотношениях (полимер в дисперсии: поликатион). Полученные суспензии разбавляли в 4 раза деионизованной водой, наносили на подготовленные покровные стекла и оставляли на ночь в закрытой чашке Петри.

Эксперименты по культивированию клеточных культур на композитных покрытиях проводились Савиным А.М. в лаборатории SCAMT Национального исследовательского университета ИТМО (Санкт-Петербург). Для экспериментов была выбрана клеточная линия иммортализованных фибробластов.

Покровные стёкла с композитными покрытиями обрабатывались этанолом (96%) и помещались в 6-ти луночные планшеты и стерилизовались в течение 30-40 минут под воздействием УФ излучения. Во избежание цитотоксического действия остатков этанола, лунки планшета промывали раствором фосфатного буфера.

В лунке с препаратами были посажены фибробласты в количестве 100.000 на каждую лунку, где эти клетки инкубировались при 37 °С, во влажной атмосфере при содержании CO<sub>2</sub> 5%. Среда для фибробластов: модифицированная минимальная среда Игла Дульбеко (DMEM), 50 мкг/мл гентамицина, 10% эмбриональной бычьей сыворотки (FBS). Через 4 дня для оценки пролиферации и цитотоксичности плёнок, клетки были окрашены прижизненным красителем клеточных ядер Hoechst и пропидий йодидом, окрашивающим только мёртвые клетки.

### **3.7 Заполнение костных дефектов органо-неорганическими композитами**

В качестве модельного объекта использовали фрагмент кости курицы (грудина), очищенный от мяса и пленок, промытый проточной водой, перекисью водорода (10% водный раствор) и этанолом, высушенный в вакууме масляного насоса в течение 2 суток. В кости делали 3 отверстия сверлом  $d = 2$  мм. Для «залечивания» дефектов использовали суспензии композитных частиц, приготовленные из стабилизированных полимерами частиц фосфата кальция. Растворы, содержащие противоположно заряженные частицы, смешивали в соотношении 1:1. Образовавшуюся суспензию концентрировали центрифугированием (100 г, 3 минуты) с получением пасты, которую помещали в костный дефект. Участок обрабатывали диэтиловым эфиром (около 1 мл) для обезвоживания. Процедуру заполнения/обезвоживания повторяли еще 4 раза, после чего костный фрагмент сушили на воздухе. Изображения получали при помощи инвертированного микроскопа MOTIC AE-31T и сканирующего электронного микроскопа FEI Quanta 200. Для этого фрагмент кости закрепляли на алюминиевой подложке с помощью двустороннего скотча и покрывали слоем золота.

### **3.8 Минерализация поверхности клеток динофлагеллят**

Эксперименты по культивированию динофлагеллят проводились к.х.н., с.н.с. лаборатории биомолекулярных систем ЛИН СО РАН Даниловцевой Е.Н. Использовали штамм SCCAP K-0983 *Gymnodinium corollarium* из Балтийского моря, Швеция [290]. Клетки культивировали в f2-Si среде [291], моделирующей состав природной морской воды (соленость 11), в 25-50-мл пластиковых емкостях при 4°C при освещении 13–21  $\mu\text{моль} \cdot \text{м}^{-2} \cdot \text{с}^{-1}$  с интервалами день: ночь 12: 12 ч.

Для минерализации клеточной стенки динофлагеллят использовали дисперсию положительно заряженных частиц фосфата кальция, стабилизированных полимером ВИ-ВА-75 (CaP-38, таблица 21). Дисперсию (250  $\mu\text{л}$ , 4°C) и 0.43 мМ раствор флуоресцентного

красителя QA2 в ацетонитриле (5  $\mu$ л) добавляли к среде, содержащей клетки (250  $\mu$ л, 4°C). Через 5 минут клетки наблюдали с помощью инвертированного микроскопа MOTIC AE-31T.

Для получения СЭМ изображений раствор, содержащий клетки, помещали на охлажденную в жидком азоте алюминиевую подложку и лиофильно сушили.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведённых исследований сформулированы следующие выводы:

1. Разработаны методы синтеза сополимеров акриловой кислоты и виниламина, а также тройных сополимеров с участием 1-винилимидазола. Обнаружена повышенная кислотность (на уровне кислот средней силы) сополимеров акриловой кислоты и виниламина за счёт образования внутримолекулярных водородных связей.

2. Карбоксил- и аминоксодержащие полимеры способны ингибировать осаждение карбоната и фосфата кальция с образованием дисперсий наночастиц, стабильных в течение часов и суток в зависимости от состава полимера.

3. Введение звеньев 1-винилимидазола в полимерные цепи понижает их способность стабилизировать карбонат и фосфат кальция в дисперсном состоянии, но оказывает влияние на состав и морфологию осадков.

4. Стабильные композитные наночастицы имеют различный заряд, определяемый природой органического полимера. Взаимодействие этих частиц с частицами противоположного знака приводит к твёрдым продуктам с различной морфологией, в том числе близкой к костной ткани.

5. Композитные наночастицы, содержащие карбонат или фосфат кальция и органический полимер, являются моделью первичных частиц при биоминерализации и новыми прекурсорами для получения композитных материалов, включая хроматографические сорбенты, покрытия для выращивания клеток, макропористые материалы для заполнения костных дефектов и средства для минерализации клеточных стенок живых клеток.

Полученные в работе полимерные кислоты, основания и амфолиты, а также способы их синтеза представляют интерес в качестве основы для создания биологически активных препаратов, например, средств доставки нуклеиновых кислот в клетки, гидрофилизирующих агентов для водонерастворимых препаратов. Соплимеры акриловой кислоты с виниламином варьируемого состава являются удобной моделью для фундаментальных работ в области химии и физики полиэлектролитов. Созданная коллекция полимеров перспективна для различных исследований, предполагающих моделирование биополимеров синтетическими аналогами.

Результаты, полученные при изучении влияния синтетических полимеров на формирование карбоната и фосфата кальция, могут стать основой для работ по синтезу многокомпонентных композитных материалов. Особый интерес представляет использование стабильных композитных наночастиц в качестве прекурсоров при формировании твёрдой фазы в результате взаимодействия с аналогичными наночастицами на основе оксидов кремния, алюминия, циркония и др. При кальцинировании полученных продуктов можно ожидать образования перспективных пористых нанокерамических материалов. Установленная способность полученных в работе материалов формировать макропористые композитные структуры, имеющие сродство к костной ткани, обуславливает необходимость исследования их в качестве матриц в регенеративной медицине при восстановлении костных дефектов

**СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ**

Статьи в рецензируемых журналах:

1. Danilovtseva E.N., Palshin V.A., **Strelova M.S.**, Lopatina I.N., Kaneva E.V., Zakharova N.V., Annenkov V.V. Functional polymers for modeling the formation of biogenic calcium carbonate and the design of new materials. *Polym Adv Technol.*, 2022, V. 33, P. 2984-3001. DOI: 10.1002/pat.5764.

2. **Strelova, M.S.**, Palshin, V.A., Zelinskiy, S.N., Savin, A.M., Danilovtseva, E.N., Annenkov, V.V. Bioinspired composite materials: sorbents for chromatography, bone-like structures and substrates for cell cultures. *Limnology and Freshwater Biology*, 2022, V. 6, P. 1675-1680. DOI:10.31951/2658-3518-2022-A-6-1675

3. Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N., **Strelova M.S.**, Pal'shin V.A., Annenkov V.V. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles. *Limnology and Freshwater Biology*, 2023, V. 6, P. 244-252. (*Зелинский С.Н., Даниловцева Е.Н., Стрелова М.С., Пальшин В.А., Анненков В.В. Кислотный краситель на основе кумарина для флуоресцентного окрашивания частиц карбоната кальция. Limnology and Freshwater Biology 2023 V. 6, 244-252*)

4. Annenkov V.V., Sudakov M.S., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N., **Strelova M.S.**, Danilovtseva E.N. Acrylic acid and vinylamine copolymers: Anomalous acidity and association with short polyacids. *Polymer*, 2024, V. 302. №127057. DOI: 10.1016/j.polymer.2024.127057

5. **Strelova M.S.**, Danilovtseva E.N., Zelinskiy S.N., Pal'shin V.A., Annenkov V.V. Biomimetic calcium phosphate nanoparticles: biomineralization models and precursors for composite materials. *Langmuir*, 2024, V. 40, P. 18016–18027. DOI: 10.1021/acs.langmuir.4c01576

Тезисы докладов:

6. **Strelova M.S.**, Pal'shin V.A., Salnik P.A., Danilovtseva E.N., Annenkov V.V. Imidazole and amine containing polyelectrolytes. 15th International Saint Petersburg Conference of Young Scientists «Modern Problems of Polymer Science» Institute of Macromolecular Compounds of the Russian Academy of Sciences Saint Petersburg. October 28–31, 2019. 1-P-32.

7. Annenkov V.V., Strelova M.S., Pal'shin V.A., Zelinskiy S.N., Danilovtseva E.N. Transformations of organosiliceous nanoparticles. Proceedings of Sixth International symposium «Frontiers in Polymer Science». Elsevier. Budapest, Hungary, 2019.

8. Пальшин В.А., Даниловцева Е.Н., Зелинский С.Н., Савин А.М., Захарова Н.В. **Стрелова М.С.**, Анненков В.В. Термолабильные полимеры и нанокompозиты в качестве покрытий для биомедицинских приложений. XIX Международная научно-практическая конференция «Новые полимерные композиционные материалы», 3-8 июля 2023 г, Нальчик, Российская Федерация, С. 308. <https://npcm-conference.ru/wp-content/uploads/2023/07/sbornik-tezisev-2023.pdf>

9. **Стрелова М.С.**, Даниловцева Е.Н., Пальшин В.А., Зелинский С.Н., Анненков В.В. Дисперсии композитных наночастиц: моделирование биоминерализации и новые материалы. Девятая Всероссийская Каргинская Конференция «Полимеры — 2024», 1-3 июля 2024 г, Москва.

## СПИСОК ИСТОЧНИКОВ

1. Sea urchin spine calcite forms via a transient amorphous calcium carbonate phase / Y. Politi, T. Arad, E. Klein [et al.] // *Science*. – 2004. – Vol. 306. – № 5699. – P. 1161-1164.
2. Rapid grain boundary diffusion in foraminifera tests biases paleotemperature records / A. Adams, D. Daval, L. P. Baumgartner [et al.] // *Communications Earth & Environment*. – 2023. – Vol. 4. – № 1. – P. 144.
3. Tyrrell, T. Coccolithophores / T. Tyrrell, J. R. Young // *Encyclopedia of Ocean Sciences*. – Elsevier, 2009. – P. 606-614.
4. Boyde, A. The real response of bone to exercise / A. Boyde // *Journal of Anatomy*. – 2003. – Vol. 203. – № 2. – P. 173-189.
5. Amorphous calcium phosphate is a major component of the forming fin bones of zebrafish: Indications for an amorphous precursor phase / J. Mahamid, A. Sharir, L. Addadi, S. Weiner // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 35. – P. 12748-12753.
6. Bradbury, J. Nature's nanotechnologists: Unveiling the secrets of diatoms / J. Bradbury // *PLoS Biology*. – 2004. – Vol. 2. – № 10. – P. e306.
7. Silicic acid condensation under the influence of water-soluble polymers: from biology to new materials / V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, V. A. Pal'shin [et al.] // *RSC Advances*. – 2017. – Vol. 7. – № 34. – P. 20995-21027.
8. Currey, J. Mechanical properties of mother of pearl in tension / J. Currey // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1977. – Vol. 196. – № 1125. – P. 443-463.
9. Jackson, A. The mechanical design of nacre / A. Jackson, J. Vincent, R. Turner // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B. Biological Sciences*. – 1988. – Vol. 234. – № 1277. – P. 415-440.
10. The probable mechanism for silicon capture by diatom algae: assimilation of polycarbonic acids with diatoms—is endocytosis a key stage in building of siliceous frustules? / V. V. Annenkov, R. Gordon, S. N. Zelinskiy, E. N. Danilovtseva // *Journal of Phycology*. – 2020. – Vol. 56. – № 6. – P. 1729-1737.
11. Barnes, H. Some tables for the ionic composition of sea water / H. Barnes // *Journal of Experimental Biology*. – 1954. – Vol. 31. – № 4. – P. 582-588.
12. Gennaro, R. Monitoring of cytosolic free Ca<sup>2+</sup> in C5a-stimulated neutrophils: loss of receptor-modulated Ca<sup>2+</sup> stores and Ca<sup>2+</sup> uptake in granule-free cytoplasts. / R. Gennaro, T. Pozzan, D. Romeo // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1984. – Vol. 81. – № 5. – P. 1416-1420.
13. Gangola, P. Maintenance of intracellular calcium in *Escherichia coli*. / P. Gangola, B. P. Rosen // *Journal of Biological Chemistry*. – 1987. – Vol. 262. – № 26. – P. 12570-12574.
14. Batiza, A. F. Yeast respond to hypotonic shock with a calcium pulse / A. F. Batiza, T. Schulz, P. H. Masson // *Journal of Biological Chemistry*. – 1996. – Vol. 271. – № 38. – P. 23357-23362.

15. Sommerdijk, N. A. J. M. Biomimetic CaCO<sub>3</sub> mineralization using designer molecules and interfaces / N. A. J. M. Sommerdijk, G. de With // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 11. – P. 4499-4550.
16. Skeffington, A. W. Exploiting algal mineralization for nanotechnology: bringing coccoliths to the fore / A. W. Skeffington, A. Scheffel // *Current Opinion in Biotechnology*. – 2018. – Vol. 49. – P. 57-63.
17. Unusual micrometric calcite–aragonite interface in the abalone shell *Haliotis* (Mollusca, Gastropoda) / Y. Dauphin, J.-P. Cuif, H. Castillo-Michel [et al.] // *Microscopy and Microanalysis*. – 2014. – Vol. 20. – № 1. – P. 276-284.
18. The role of gastropod shell composition and microstructure in resisting dissolution caused by ocean acidification / K. M. Barclay, M. K. Gingras, S. T. Packer, L. R. Leighton // *Marine Environmental Research*. – 2020. – Vol. 162. – P. 105105.
19. Spann, N. The unusual mineral vaterite in shells of the freshwater bivalve *Corbicula fluminea* from the UK / N. Spann, E. M. Harper, D. C. Aldridge // *Naturwissenschaften*. – 2010. – Vol. 97. – № 8. – P. 743-751.
20. Balthasar, U. Aragonite-calcite seas—Quantifying the gray area / U. Balthasar, M. Cusack // *Geology*. – 2015. – Vol. 43. – № 2. – P. 99-102.
21. Ševčík, R. Physical and nanomechanical properties of the synthetic anhydrous crystalline CaCO<sub>3</sub> polymorphs: vaterite, aragonite and calcite / R. Ševčík, P. Šašek, A. Viani // *Journal of Materials Science*. – 2018. – Vol. 53. – № 6. – P. 4022-4033.
22. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates / S. V. Dorozhkin // *Biomatter*. – 2011. – Vol. 1. – № 2. – P. 121-164.
23. Dorozhkin, S. V. Calcium orthophosphates (CaPO<sub>4</sub>): occurrence and properties / S. V. Dorozhkin // *Progress in Biomaterials*. – 2016. – Vol. 5. – № 1. – P. 9-70.
24. Boskey, A. L. The Composition of Bone / A. L. Boskey, P. G. Robey // *Primer on the Metabolic Bone Diseases and Disorders of Mineral Metabolism*. – Wiley, 2013. – P. 49-58.
25. The hidden structure of human enamel / E. Beniash, C. A. Stifler, C.-Y. Sun [et al.] // *Nature Communications*. – 2019. – Vol. 10. – № 1.
26. Glimcher, M. Recent studies of the mineral phase in bone and its possible linkage to the organic matrix by protein-bound phosphate bonds / M. Glimcher // *Philosophical Transactions of the Royal Society of London. B, Biological Sciences*. – 1984. – Vol. 304. – № 1121. – P. 479-508.
27. Asscher, Y. Variations in atomic disorder in biogenic carbonate hydroxyapatite using the infrared spectrum grinding curve method / Y. Asscher, S. Weiner, E. Boaretto // *Advanced Functional Materials*. – 2011. – Vol. 21. – № 17. – P. 3308-3313.
28. Brown, W. E. Crystal growth of bone mineral. / W. E. Brown // *Clinical orthopaedics and related research*. – 1966. – Vol. 44. – P. 205-220.
29. LeGeros, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials / R. Z. LeGeros // *Chemical Reviews*. – 2008. – Vol. 108. – № 11. – P. 4742-4753.
30. Suzuki, O. Biological role of synthetic octacalcium phosphate in bone formation and

- mineralization / O. Suzuki // *Journal of Oral Biosciences*. – 2010. – Vol. 52. – № 1. – P. 6-14.
31. Suzuki, O. Octacalcium phosphate (OCP)-based bone substitute materials / O. Suzuki // *Japanese Dental Science Review*. – 2013. – Vol. 49. – № 2. – P. 58-71.
32. A contribution to the understanding of the formation of calcium phosphates / J. Christoffersen, M. R. Christoffersen, W. Kibalczyk, F. A. Andersen // *Journal of Crystal Growth*. – 1989. – Vol. 94. – № 3. – P. 767-777.
33. Effects of F- on apatite-octacalcium phosphate intergrowth and crystal morphology in a model system of tooth enamel formation / M. Iijima, H. Tohda, H. Suzuki [et al.] // *Calcified Tissue International*. – 1992. – Vol. 50. – № 4. – P. 357-361.
34. Mapping amorphous calcium phosphate transformation into crystalline mineral from the cell to the bone in zebrafish fin rays / J. Mahamid, B. Aichmayer, E. Shimoni [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2010. – Vol. 107. – № 14. – P. 6316-6321.
35. Bone mineralization pathways during the rapid growth of embryonic chicken long bones / M. Kerschnitzki, A. Akiva, A. Ben Shoham [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2016. – Vol. 195. – № 1. – P. 82-92.
36. Suvorova, E. I. Pathological mineralization of cardiac valves: causes and mechanism / E. I. Suvorova, P. A. Buffat // *Journal of Long-Term Effects of Medical Implants*. – 2005. – Vol. 15. – № 4. – P. 355-368.
37. Urine pH is an indicator of dietary acid–base load, fruit and vegetables and meat intakes: results from the European Prospective Investigation into Cancer and Nutrition (EPIC)-Norfolk population study / A. A. Welch, A. Mulligan, S. A. Bingham, K. Khaw // *British Journal of Nutrition*. – 2008. – Vol. 99. – № 6. – P. 1335-1343.
38. Raman spectroscopic evidence for octacalcium phosphate and other transient mineral species deposited during intramembranous mineralization / N. J. Crane, V. Popescu, M. D. Morris [et al.] // *Bone*. – 2006. – Vol. 39. – № 3. – P. 434-442.
39. First evidence of octacalcium phosphate-osteocalcin nanocomplex as skeletal bone component directing collagen triple–helix nanofibril mineralization / P. Simon, D. Grüner, H. Worch [et al.] // *Scientific Reports*. – 2018. – Vol. 8. – № 1. – P. 13696.
40. Biological activity of lactoferrin-functionalized biomimetic hydroxyapatite nanocrystals / M. Lelli, N. Nocerino, A. Fulgione [et al.] // *International Journal of Nanomedicine*. – 2014. – Vol. 9. – № 1. – P. 1175-1184.
41. Currey J. D. Mechanical properties of mollusc shell / Currey J. D. // *Symp. Soc. Exp. Biol.* . – 1980. – Vol. 34. – P. 75-97.
42. An acidic matrix protein, Pif, is a key macromolecule for nacre formation / M. Suzuki, K. Saruwatari, T. Kogure [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 325. – № 5946. – P. 1388-1390.
43. A carbonic anhydrase from the nacreous layer in oyster pearls. / H. Miyamoto, T. Miyashita, M. Okushima [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 1996. – Vol. 93. – № 18. – P. 9657-9660.
44. Marsh, M. E. Isolation and characterization of a novel acidic polysaccharide containing tartrate and glyoxylate residues from the mineralized scales of a unicellular

coccolithophorid alga *Pleurochrysis carterae*. / M. E. Marsh, D. K. Chang, G. C. King // Journal of Biological Chemistry. – 1992. – Vol. 267. – № 28. – P. 20507-20512.

45. Marsh, M. E. Polyanion-mediated mineralization - assembly and reorganization of acidic polysaccharides in the Golgi system of a coccolithophorid alga during mineral deposition / M. E. Marsh // Protoplasma. – 1994. – Vol. 177. – № 3-4. – P. 108-122.

46. Involvement of acidic polysaccharide Ph-PS-2 and protein in initiation of coccolith mineralization, as demonstrated by in vitro calcification on the base plate / S. Sakurada, S. Fujiwara, M. Suzuki [et al.] // Marine Biotechnology. – 2018. – Vol. 20. – № 3. – P. 304-312.

47. Polysaccharide localization, coccolith formation, and golgi dynamics in the coccolithophorid *Hymenomonas carterae* / P. van der Wal, E. W. de Jong, P. Westbroek [et al.] // Journal of Ultrastructure Research. – 1983. – Vol. 85. – № 2. – P. 139-158.

48. Structural studies of the methylated, acidic polysaccharide associated with coccoliths of *Emiliania huxleyi* (lohmann) kamptner / A. M. J. Fichtinger-Schepman, J. P. Kamerling, C. Versluis, J. F. G. Vliegthart // Carbohydrate Research. – 1981. – Vol. 93. – № 1. – P. 105-123.

49. Emburg, P. R. van. Immunochemical localization of a polysaccharide from biomineral structures (coccoliths) of *Emiliania huxleyi* / P. R. van Emburg, E. W. de Jong, W. T. Daems // Journal of Ultrastructure and Molecular Structure Research. – 1986. – Vol. 94. – № 3. – P. 246-259.

50. Ultrastructural localization of proteins involved in sea urchin biomineralization / L. Ameye, R. Hermann, C. Killian [et al.] // Journal of Histochemistry and Cytochemistry. – 1999. – Vol. 47. – № 9. – P. 1189-1200.

51. Killian, C. E. Characterization of the proteins comprising the integral matrix of stronglylocentrotus purpuratus embryonic spicules / C. E. Killian, F. H. Wilt // Journal of Biological Chemistry. – 1996. – Vol. 271. – № 15. – P. 9150-9159.

52. Benson, S. C. The organic matrix of the skeletal spicule of sea urchin embryos. / S. C. Benson, N. C. Benson, F. Wilt // The Journal of cell biology. – 1986. – Vol. 102. – № 5. – P. 1878-1886.

53. Weiner, S. Mollusk shell formation: isolation of two organic matrix proteins associated with calcite deposition in the bivalve *Mytilus californianus* / S. Weiner // Biochemistry. – 1983. – Vol. 22. – № 17. – P. 4139-4145.

54. A new matrix protein family related to the nacreous layer formation of *Pinctada fucata* / T. Samata, N. Hayashi, M. Kono [et al.] // FEBS Letters. – 1999. – Vol. 462. – № 1-2. – P. 225-229.

55. A novel nacre protein N19 in the pearl oyster *Pinctada fucata* / M. Yano, K. Nagai, K. Morimoto, H. Miyamoto // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2007. – Vol. 362. – № 1. – P. 158-163.

56. Molecular cloning and characterization of Lustrin A, a matrix protein from shell and pearl nacre of *Haliotis rufescens* / X. Shen, A. M. Belcher, P. K. Hansma [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 1997. – Vol. 272. – № 51. – P. 32472-32481.

57. Structures of mollusc shell framework proteins / S. Sudo, T. Fujikawa, T. Nagakura

[et al.] // Nature. – 1997. – Vol. 387. – № 6633. – P. 563-564.

58. Cloning and characterization of Prsilkin-39, a novel matrix protein serving a dual role in the prismatic layer formation from the oyster *Pinctada fucata* / Y. Kong, G. Jing, Z. Yan [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2009. – Vol. 284. – № 16. – P. 10841-10854.

59. Purification and Characterization of Perlucin and Perlustrin, Two New Proteins from the Shell of the Mollusc *Haliotis laevigata* / I. M. Weiss, S. Kaufmann, K. Mann, M. Fritz // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2000. – Vol. 267. – № 1. – P. 17-21.

60. Complementary DNA Cloning and Characterization of Pearlin, a New Class of Matrix Protein in the Nacreous Layer of Oyster Pearls / T. Miyashita, R. Takagi, M. Okushima [et al.] // Marine Biotechnology. – 2000. – Vol. 2. – № 5. – P. 409-418.

61. Perlwapin, an abalone nacre protein with three four-disulfide core (whey acidic protein) domains, inhibits the growth of calcium carbonate crystals / L. Treccani, K. Mann, F. Heinemann, M. Fritz // Biophysical Journal. – 2006. – Vol. 91. – № 7. – P. 2601-2608.

62. Herbert Waite, J. Periostracin - a soluble precursor of sclerotized periostracum in *Mytilus edulis* L. / J. Herbert Waite, A. S. M. Saleuddin, S. O. Andersen // Journal of Comparative Physiology ? B. – 1979. – Vol. 130. – № 4. – P. 301-307.

63. Tsukamoto, D. Structure and expression of an unusually acidic matrix protein of pearl oyster shells / D. Tsukamoto, I. Sarashina, K. Endo // Biochemical and Biophysical Research Communications. – 2004. – Vol. 320. – № 4. – P. 1175-1180.

64. Asprich: A novel aspartic acid-rich protein family from the prismatic shell matrix of the bivalve *Atrina rigida* / B. A. Gotliv, N. Kessler, J. L. Sumerel [et al.] // ChemBioChem. – 2005. – Vol. 6. – № 2. – P. 304-314.

65. Nakahara, H. Fine structure and amino acid composition of the organic “envelope” in the prismatic layer of some bivalve shells / H. Nakahara, M. Kakei, G. Bevelander // Jap. Jour. Malac. – 1980. – Vol. 39. – № 3. – P. 7-177.

66. Gotliv, B. Mollusk shell acidic proteins: in search of individual functions / B. Gotliv, L. Addadi, S. Weiner // ChemBioChem. – 2003. – Vol. 4. – № 6. – P. 522-529.

67. Proteins and saccharides of the sea urchin organic matrix of mineralization: characterization and localization in the spine skeleton / L. Ameye, G. De Becker, C. Killian [et al.] // Journal of Structural Biology. – 2001. – Vol. 134. – № 1. – P. 56-66.

68. The serum protein  $\alpha 2$ -Heremans-Schmid glycoprotein/fetuin-A is a systemically acting inhibitor of ectopic calcification / C. Schäfer, A. Heiss, A. Schwarz [et al.] // Journal of Clinical Investigation. – 2003. – Vol. 112. – № 3. – P. 357-366.

69. Lee, C. C. Human alpha 2-HS-glycoprotein: the A and B chains with a connecting sequence are encoded by a single mRNA transcript. / C. C. Lee, B. H. Bowman, F. M. Yang // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 1987. – Vol. 84. – № 13. – P. 4403-4407.

70. Sotoodehnejadnematalahi, F. Structure, function and regulation of versican: the most abundant type of proteoglycan in the extracellular matrix / F. Sotoodehnejadnematalahi, B. Burke // Acta Med Iran. – 2013. – Vol. 51. – № 11. – P. 740-750.

71. Targeted disruption of the biglycan gene leads to an osteoporosis-like phenotype in mice / T. Xu, P. Bianco, L. W. Fisher [et al.] // *Nature Genetics*. – 1998. – Vol. 20. – № 1. – P. 78-82.
72. Phenotypic characterization of epiphycan-deficient and epiphycan/biglycan double-deficient mice / S. Nuka, W. Zhou, S. P. Henry [et al.] // *Osteoarthritis and Cartilage*. – 2010. – Vol. 18. – № 1. – P. 88-96.
73. Characterization of epiphycan, a small proteoglycan with a leucine-rich repeat core protein / H. J. Johnson, L. Rosenberg, H. U. Choi [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 30. – P. 18709-18717.
74. Sharma, U. Alkaline phosphatase: an overview / U. Sharma, D. Pal, R. Prasad // *Indian Journal of Clinical Biochemistry*. – 2014. – Vol. 29. – № 3. – P. 269-278.
75. Неколлагеновые белки кости / Н. Е. Кушлинский, Н. Н. Трапезников, П. В. Бабкина [et al.] // *ВЕСТНИК РОНЦ им. Н. Н. Блохина РАМН*. – 1997. – Vol. 3. – P. 81-86.
76. Hohenester, E. Basement Membrane Protein <sc>BM</sc> -40 / E. Hohenester, R. Timpl // *Handbook of Metalloproteins*. – Wiley, 2004.
77. Zhu, W. The regulatory role of matrix proteins in mineralization of bone / W. Zhu, P. G. Robey, A. L. Boskey. – 2008.
78. Characterization, cloning and expression of the 67-kDa annexin from chicken growth plate cartilage matrix vesicles / X. Cao, B. R. Genge, L. N. Y. Wu [et al.] // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. – 1993. – Vol. 197. – № 2. – P. 556-561.
79. Establishment of the primary structure of the major lipid-dependent Ca<sup>2+</sup> binding proteins of chicken growth plate cartilage matrix vesicles: Identity with anchorin cii (annexin V) and annexin II / B. R. Genge, X. Cao, L. N. Y. Wu [et al.] // *Journal of Bone and Mineral Research*. – 1992. – Vol. 7. – № 7. – P. 807-819.
80. Mark, K. von der. Annexin V interactions with collagen / K. von der Mark, J. Mollenhauer // *Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)*. – 1997. – Vol. 53. – № 6. – P. 539-545.
81. Huber, R. The crystal and molecular structure of human annexin V, an anticoagulant protein that binds to calcium and membranes. / R. Huber, J. Römisch, E. P. Paques // *The EMBO Journal*. – 1990. – Vol. 9. – № 12. – P. 3867-3874.
82. Vanderzee, C. E. The third dissociation constant of orthophosphoric acid / C. E. Vanderzee, A. S. Quist // *Journal of Physical Chemistry*. – 1961. – Vol. 65. – № 1. – P. 118-123.
83. Feenstra, T. . Formation of strontium phosphates in supersaturated solutions / T. Feenstra, H. Van Straten, P. De Bruyn // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 1981. – Vol. 80. – № 1. – P. 255-270.
84. Po, H. N. The Henderson-Hasselbalch equation: Its history and limitations / H. N. Po, N. M. Senozan // *Journal of Chemical Education*. – 2001. – Vol. 78. – № 11. – P. 1499.
85. Nims, L. F. The first dissociation constant of phosphoric acid from 0 to 50° / L. F. Nims // *Journal of the American Chemical Society*. – 1934. – Vol. 56. – № 5. – P. 1110-1112.
86. Bates, R. G. First dissociation constant of phosphoric acid from 0°C to 60°C;

Limitations of the electromotive force method for moderately strong acids / R. G. Bates // *Journal of Research of the National Bureau of Standards*. – 1951. – Vol. 47. – № 3. – P. 127.

87. Лурье, Ю. Ю. Справочник по аналитической химии / Ю. Ю. Лурье. – Химия. – Москва, 1971. – 456 p.

88. Nims, L. F. The second dissociation constant of phosphoric acid from 20 to 50° / L. F. Nims // *Journal of the American Chemical Society*. – 1933. – Vol. 55. – № 5. – P. 1946-1951.

89. Harneo, H. S. The ionization constant of carbonic acid in water and the solubility of carbon dioxide in water and aqueous salt solutions from 0 to 50° / H. S. Harneo, R. Davis // *Journal of the American Chemical Society*. – 1943. – Vol. 65. – № 10. – P. 2030-2037.

90. Johnsson, M. S.-A. The role of brushite and octacalcium phosphate in apatite formation / M. S.-A. Johnsson, G. H. Nancollas // *Critical Reviews in Oral Biology & Medicine*. – 1992. – Vol. 3. – № 1. – P. 61-82.

91. Hart, P. W. Application of carbon dioxide to reduce water-side lime scale in heat exchangers / P. W. Hart, G. W. Colson, J. Burris // *Pulp and Paper Canada*. – 2013. – Vol. 114. – № 1. – P. 21-24.

92. Sear, R. P. Quantitative studies of crystal nucleation at constant supersaturation: experimental data and models / R. P. Sear // *CrystEngComm*. – 2014. – Vol. 16. – № 29. – P. 6506-6522.

93. Cölfen, H. Bio-inspired mineralization using hydrophilic polymers. Vol. 271 / H. Cölfen. – 2006.

94. Amorphous calcium carbonate transforms into calcite during sea urchin larval spicule growth / E. Beniash, J. Aizenberg, L. Addadi, S. Weiner // *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*. – 1997. – Vol. 264. – № 1380. – P. 461-465.

95. A Quasi-Time-Resolved CryoTEM study of the nucleation of CaCO<sub>3</sub> under Langmuir monolayers / B. P. Pichon, P. H. H. Bomans, P. M. Frederik, N. A. J. M. Sommerdijk // *Journal of the American Chemical Society*. – 2008. – Vol. 130. – № 12. – P. 4034-4040.

96. Structural development of mercaptophenol self-assembled monolayers and the overlying mineral phase during templated CaCO<sub>3</sub> crystallization from a transient amorphous film / J. R. I. Lee, T. Y.-J. Han, T. M. Willey [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2007. – Vol. 129. – № 34. – P. 10370-10381.

97. Boskey, A. L. Amorphous calcium phosphate: the contention of bone / A. L. Boskey // *Journal of Dental Research*. – 1997. – Vol. 76. – № 8. – P. 1433-1436.

98. Pre-nucleation clusters as solute precursors in crystallisation / D. Gebauer, M. Kellermeier, J. D. Gale [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* – 2014. – Vol. 43. – № 7. – P. 2348-2371.

99. Eanes, E. D. Intermediate states in the precipitation of hydroxyapatite / E. D. Eanes, I. H. Gillessen, A. S. Posner // *Nature*. – 1965. – Vol. 208. – № 5008. – P. 365-367.

100. Brečević, L. Solubility of amorphous calcium carbonate / L. Brečević, A. E. Nielsen // *Journal of Crystal Growth*. – 1989. – Vol. 98. – № 3. – P. 504-510.

101. The role of prenucleation clusters in surface-induced calcium phosphate crystallization / A. Dey, P. H. H. Bomans, F. A. Müller [et al.] // *Nature Materials*. – 2010. –

Vol. 9. – № 12. – P. 1010-1014.

102. Posner's cluster revisited: direct imaging of nucleation and growth of nanoscale calcium phosphate clusters at the calcite-water interface / L. Wang, S. Li, E. Ruiz-Agudo [et al.] // *CrystEngComm*. – 2012. – Vol. 14. – № 19. – P. 6252.

103. Gebauer, D. Stable prenucleation calcium carbonate clusters / D. Gebauer, A. Völkel, H. Cölfen // *Science*. – 2008. – Vol. 322. – № 5909. – P. 1819-1822.

104. The initial stages of template-controlled CaCO<sub>3</sub> formation revealed by cryo-TEM / E. M. Pouget, P. H. H. Bomans, J. A. C. M. Goos [et al.] // *Science*. – 2009. – Vol. 323. – № 5920. – P. 1455-1458.

105. Walton, A. G. Nucleation and mineralization of organic matrices / A. G. Walton, B. A. Friedman, A. Schwartz // *Journal of Biomedical Materials Research*. – 1967. – Vol. 1. – № 3. – P. 337-354.

106. Termine, J. D. Calcium phosphate formation in vitro / J. D. Termine, A. S. Posner // *Archives of Biochemistry and Biophysics*. – 1970. – Vol. 140. – № 2. – P. 307-317.

107. Posner, A. S. Synthetic amorphous calcium phosphate and its relation to bone mineral structure / A. S. Posner, F. Betts // *Accounts of Chemical Research*. – 1975. – Vol. 8. – № 8. – P. 273-281.

108. Combes, C. Amorphous calcium phosphates: synthesis, properties and uses in biomaterials / C. Combes, C. Rey // *Acta Biomaterialia*. – 2010. – Vol. 6. – № 9. – P. 3362-3378.

109. Uncovering the role of bicarbonate in calcium carbonate formation at near-neutral pH / Y. Huang, A. Rao, S. Huang [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2021. – Vol. 60. – № 30. – P. 16707-16713.

110. Effect of pH on amorphous calcium carbonate structure and transformation / D. J. Tobler, J. D. Rodriguez Blanco, H. O. Sørensen [et al.] // *Crystal Growth & Design*. – 2016. – Vol. 16. – № 8. – P. 4500-4508.

111. Proto-calcite and proto-vaterite in amorphous calcium carbonates / D. Gebauer, P. N. Gunawidjaja, J. Y. P. Ko [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2010. – Vol. 49. – № 47. – P. 8889-8891.

112. Brečević, L. Solubility of amorphous calcium carbonate. Vol. 98 / L. Brečević, A. E. Nielsen. – 1989. – 504-510 p.

113. Ogino, T. The formation and transformation mechanism of calcium carbonate in water / T. Ogino, T. Suzuki, K. Sawada // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 1987. – Vol. 51. – № 10. – P. 2757-2767.

114. An atomic force microscopy study of the growth of a calcite surface as a function of calcium/total carbonate concentration ratio in solution at constant supersaturation / C. Perdikouri, C. V. Putnis, A. Kasiotas, A. Putnis // *Crystal Growth and Design*. – 2009. – Vol. 9. – № 10. – P. 4344-4350.

115. A series of lanthanide-organic frameworks based on 2-propyl-1H-imidazole-4,5-dicarboxylate and oxalate: syntheses, structures, luminescence, and magnetic properties / X.

Feng, J. Zhao, B. Liu [et al.] // *Crystal Growth and Design*. – 2010. – Vol. 10. – № 3. – P. 1409-1413.

116. Termine, J. D. Comparative chemistry of amorphous and apatitic calcium phosphate preparations / J. D. Termine, E. D. Eanes // *Calcified Tissue Research*. – 1972. – Vol. 10. – № 1. – P. 171-197.

117. Betts, F. An X-ray radial distribution study of amorphous calcium phosphate / F. Betts, A. S. Posner // *Materials Research Bulletin*. – 1974. – Vol. 9. – № 3. – P. 353-360.

118. Eanes, E. D. Amorphous calcium phosphate. / E. D. Eanes // *Monographs in oral science*. – Basel : KARGER, 2001. – Vol. 18. – P. 130-147.

119. Blumenthal, N. C. Stabilization of amorphous calcium phosphate by Mg and ATP / N. C. Blumenthal, F. Betts, A. S. Posner // *Calcified Tissue Research*. – 1977. – Vol. 23. – № 1. – P. 245-250.

120. The effect of magnesium ions on the precipitation of calcium phosphates / W. Kibalczyk, J. Christoffersen, M. R. Christoffersen [et al.] // *Journal of Crystal Growth*. – 1990. – Vol. 106. – № 2-3. – P. 355-366.

121. Kinetics of hydroxyapatite precipitation at pH 10 to 11. Vol. 22 / C. Liu, Y. Huang, W. Shen, J. Cui. – 2001. – 301-306 p.

122. Amorphous calcium phosphates prepared at pH 6.5 and 6.0 / C. Holt, M. J. J. M. Van Kemenade, L. S. Nelson [et al.] // *Materials Research Bulletin*. – 1989. – Vol. 24. – № 1. – P. 55-62.

123. Impacts of initial Ca/P on amorphous calcium phosphate / A. J. Hoehner, S. T. Mergelsberg, O. J. Borkiewicz, F. M. Michel // *Crystal Growth & Design*. – 2021. – Vol. 21. – № 7. – P. 3736-3745.

124. Grospietsch, T. Comparison of calcium storage between a Baikalian gastropod and holarctic relatives / T. Grospietsch, T. Y. Sitnikova, I. Zerst-Boroffka // *Comparative Biochemistry and Physiology Part A: Molecular & Integrative Physiology*. – 2000. – Vol. 125. – № 2. – P. 273-283.

125. Extraction and characterization of snail shell waste hydroxyapatite / Z. Zuliantoni, W. Suprpto, P. H. Setyarini, F. Gapsari // *Results in Engineering*. – 2022. – Vol. 14. – P. 100390.

126. Current chemical composition of Lake Baikal water / T. V. Khodzher, V. M. Domysheva, L. M. Sorokovikova [et al.] // *Inland Waters*. – 2017. – Vol. 7. – № 3. – P. 250-258.

127. Evaluation of Mg/Ca thermometry in foraminifera: Comparison of experimental results and measurements in nature / T. Toyofuku, H. Kitazato, H. Kawahata [et al.] // *Paleoceanography*. – 2000. – Vol. 15. – № 4. – P. 456-464.

128. Zeebe, R. E. Comparison of two potential strategies of planktonic foraminifera for house building: Mg<sup>2+</sup> or H<sup>+</sup> removal? / R. E. Zeebe, A. Sanyal // *Geochimica et Cosmochimica Acta*. – 2002. – Vol. 66. – № 7. – P. 1159-1169.

129. Nooijer, L. J. de. Foraminifera promote calcification by elevating their

intracellular pH / L. J. de Nooijer, T. Toyofuku, H. Kitazato // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – № 36. – P. 15374-15378.

130. Bentov, S. The role of seawater endocytosis in the biomineralization process in calcareous foraminifera / S. Bentov, C. Brownlee, J. Erez // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2009. – Vol. 106. – № 51. – P. 21500-21504.

131. Sikes, C. S. Photosynthesis and coccolith formation: Inorganic carbon sources and net inorganic reaction of deposition / C. S. Sikes, R. D. Roer, K. M. Wilbur // Limnology and Oceanography. – 1980. – Vol. 25. – № 2. – P. 248-261.

132. Beertsen, W. Effects of 1-hydroxyethylidene-1, 1-bisphosphonate (HEBP) on the formation of dentin and the periodontal attachment apparatus in the mouse / W. Beertsen, A. Niehof, V. Everts // American Journal of Anatomy. – 1985. – Vol. 174. – № 1. – P. 83-103.

133. Okazaki, M. Inhibition of crystal growth in coccolith formation of *pleurochrysis carterae* by a potent scale inhibitor, (1-hydroxyethylidene) bisphosphonic acid (HEBP) / M. Okazaki, M. Asahina // Thalassas An international journal of marine sciences. – 2004. – Vol. 20. – № 1. – P. 51-58.

134. Sikes, C. S. Carbonic anhydrase and carbon fixation in coccolithophorids 1 / C. S. Sikes, A. P. Wheeler // Journal of Phycology. – 1982. – Vol. 18. – № 3. – P. 423-426.

135. Calcium transport into the cells of the sea urchin larva in relation to spicule formation / N. Vidavsky, S. Addadi, A. Schertel [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2016. – Vol. 113. – № 45. – P. 12637-12642.

136. Initial stages of calcium uptake and mineral deposition in sea urchin embryos / N. Vidavsky, S. Addadi, J. Mahamid [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2014. – Vol. 111. – № 1. – P. 39-44.

137. Chow, G. Carbonic anhydrase activity in developing sea urchin embryos / G. Chow, S. C. Benson // Experimental Cell Research. – 1979. – Vol. 124. – № 2. – P. 451-453.

138. Carbonic anhydrase activity in developing sea urchin embryos with special reference to calcification of spicules / K. Mitsunaga, K. Akasaka, H. Shimada [et al.] // Cell Differentiation. – 1986. – Vol. 18. – № 4. – P. 257-262.

139. Kuile, B. ter. Competition for inorganic carbon between photosynthesis and calcification in the symbiont-bearing foraminifer *Amphistegina lobifera* / B. ter Kuile, J. Erez, E. Padan // Marine Biology. – 1989. – Vol. 103. – № 2.

140. Shaker, J. L. Calcium and phosphate homeostasis / J. L. Shaker, L. Deftos // ed. K. R. Feingold. – South Dartmouth (MA), .

141. Unexpected role of matrix Gla protein in osteoclasts: inhibiting osteoclast differentiation and bone resorption / Y. Zhang, L. Zhao, N. Wang [et al.] // Molecular and Cellular Biology. – 2019. – Vol. 39. – № 12.

142. Vascular calcification and osteoporosis—from clinical observation towards molecular understanding / L. C. Hofbauer, C. C. Brueck, C. M. Shanahan [et al.] // Osteoporosis International. – 2007. – Vol. 18. – № 3. – P. 251-259.

143. Structural basis of calcification inhibition by  $\alpha$ 2-HS Glycoprotein/Fetuin-A / A.

Heiss, A. DuChesne, B. Denecke [et al.] // Journal of Biological Chemistry. – 2003. – Vol. 278. – № 15. – P. 13333-13341.

144. Cellular pathways of calcium transport and concentration toward mineral formation in sea urchin larvae / K. Kahil, N. Varsano, A. Sorrentino [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2020. – Vol. 117. – № 49. – P. 30957-30965.

145. Intracellular nanoscale architecture as a master regulator of calcium carbonate crystallization in marine microalgae / Y. Kadan, F. Tollervey, N. Varsano [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences. – 2021. – Vol. 118. – № 46.

146. In situ electron microscopy characterization of intracellular ion pools in mineral forming microalgae / Y. Kadan, L. Aram, E. Shimoni [et al.] // Journal of Structural Biology. – 2020. – Vol. 210. – № 1. – P. 107465.

147. Calcification in the coccolithophorid alga *Hymenomonas carterae*. / P. Van Der Wal, L. De Jong, P. Westbroek, W. C. De Bruijn // Environmental biogeochemistry. Proc. 5th international symposium, Stockholm, 1981. – 1983. – Vol. 35. – P. 251-258.

148. Outka, D. E. Sequential coccolith morphogenesis in *Hymenomonas carterae* / D. E. Outka, D. C. Williams // The Journal of Protozoology. – 1971. – Vol. 18. – № 2. – P. 285-297.

149. A vacuole-like compartment concentrates a disordered calcium phase in a key coccolithophorid alga / S. Sviben, A. Gal, M. A. Hood [et al.] // Nature Communications. – 2016. – Vol. 7. – № 1. – P. 11228.

150. The bone extracellular matrix in bone formation and regeneration / X. Lin, S. Patil, Y. G. Gao, A. Qian // Frontiers in Pharmacology. – 2020. – Vol. 11.

151. The mechanism of biomineralization: Progress in mineralization from intracellular generation to extracellular deposition / X. Yan, Q. Zhang, X. Ma [et al.] // Japanese Dental Science Review. – 2023. – Vol. 59. – P. 181-190.

152. Gifford, J. L. Structures and metal-ion-binding properties of the Ca<sup>2+</sup>-binding helix-loop-helix EF-hand motifs / J. L. Gifford, M. P. Walsh, H. J. Vogel // Biochemical Journal. – 2007. – Vol. 405. – № 2. – P. 199-221.

153. Favus, M. J. Disorders of bone and mineral metabolism / M. J. Favus, F. L. Coe. – Raven Pres. – New York, 1992. – 1080 p.

154. Biomineral precursor formation is initiated by transporting calcium and phosphorus clusters from the endoplasmic reticulum to mitochondria / C. Tang, Y. Wei, L. Gu [et al.] // Advanced Science. – 2020. – Vol. 7. – № 8.

155. Landis, W. J. Electron diffraction and electron probe microanalysis of the mineral phase of bone tissue prepared by anhydrous techniques / W. J. Landis, M. J. Glimcher // Journal of Ultrastructure Research. – 1978. – Vol. 63. – № 2. – P. 188-223.

156. The role of intracellular calcium phosphate in osteoblast-mediated bone apatite formation / S. Boonrungsiman, E. Gentleman, R. Carzaniga [et al.] // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2012. – Vol. 109. – № 35. – P. 14170-14175.

157. Matrix vesicles from chondrocytes and osteoblasts: Their biogenesis, properties, functions and biomimetic models. Vol. 1862 / M. Bottini, S. Mebarek, K. L. Anderson [et al.]. – Elsevier B.V., 2018.
158. Phosphatidylserine controls calcium phosphate nucleation and growth on lipid monolayers: A physicochemical understanding of matrix vesicle-driven biomineralization / M. A. E. Cruz, C. R. Ferreira, C. B. Tovani [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2020. – Vol. 212. – № 2.
159. STOECKENIUS, W. Structure of the plasma membrane / W. STOECKENIUS // *Circulation*. – Sunderland (MA), 1962. – Vol. 26. – P. 1066-1069.
160. Anderson, H. C. Vesicles associated with calcification in the matrix of epiphyseal cartilage. / H. C. Anderson // *The Journal of cell biology*. – 1969. – Vol. 41. – № 1. – P. 59-72.
161. Anderson, H. C. Pyrophosphate stimulation of calcium uptake into cultured embryonic bones. Fine structure of matrix vesicles and their role in calcification / H. C. Anderson, J. J. Reynolds // *Developmental Biology*. – 1973. – Vol. 34. – № 2. – P. 211-227.
162. Arsenault, A. L. Vectorial sequence of mineralization in the turkey leg tendon determined by electron microscopic imaging / A. L. Arsenault, B. W. Frankland, F. P. Ottensmeyer // *Calcified Tissue International*. – 1991. – Vol. 48. – № 1. – P. 46-55.
163. Bernard, G. W. Ultrastructural observations of initial calcification in dentine and enamel / G. W. Bernard // *Journal of Ultrastructure Research*. – 1972. – Vol. 41. – № 1-2. – P. 1-17.
164. Physicochemical characterization of the nucleational core of matrix vesicles / L. Y. Wu, B. R. Genge, D. G. Dunkelberger [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 1997. – Vol. 272. – № 7. – P. 4404-4411.
165. Wuthier, R. E. Partition of inorganic ions and phospholipids in isolated cell, membrane and matrix vesicle fractions: Evidence for Ca-Pi-acidic phospholipid complexes / R. E. Wuthier, S. T. Gore // *Calcified Tissue Research*. – 1977. – Vol. 24. – № 1. – P. 163-171.
166. The role of mitochondria in vascular calcification / P. Wang, N. Zhang, B. Wu [et al.] // *Journal of Translational Internal Medicine*. – 2020. – Vol. 8. – № 2. – P. 80-90.
167. Contribution of mitophagy to cell-mediated mineralization: revisiting a 50-year-old Conundrum / D. Pei, J. Sun, C. Zhu [et al.] // *Advanced Science*. – 2018. – Vol. 5. – № 10.
168. Mollusc larval shell formation: Amorphous calcium carbonate is a precursor phase for aragonite / I. M. Weiss, N. Tuross, L. Addadi, S. Weiner // *Journal of Experimental Zoology*. – 2002. – Vol. 293. – № 5. – P. 478-491.
169. Nanoscale Transforming mineral phases in fresh nacre / R. T. Devol, C. Y. Sun, M. A. Marcus [et al.] // *Journal of the American Chemical Society*. – 2015. – Vol. 137. – № 41. – P. 13325-13333.
170. Structural characterisation of X-ray amorphous calcium carbonate (ACC) in sternal deposits of the crustacea *Porcellio scaber* / A. Becker, U. Bismayer, M. Epple [et al.] // *Dalton Transactions*. – 2003. – № 4. – P. 551-555.

171. Amorphous and crystalline calcium carbonate distribution in the tergite cuticle of moulting *Porcellio scaber* (Isopoda, Crustacea) / F. Neues, S. Hild, M. Epple [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2011. – Vol. 175. – № 1. – P. 10-20.
172. Freeman, C. L. The transformation of amorphous calcium carbonate to calcite and classical nucleation theory / C. L. Freeman, J. H. Harding // *Journal of Crystal Growth*. – 2023. – Vol. 603. – P. 126978.
173. Transformation mechanism of amorphous calcium carbonate into calcite in the sea urchin larval spicule / Y. Politi, R. A. Metzler, M. Abrecht [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2008. – Vol. 105. – № 45. – P. 17362-17366.
174. Macromolecular recognition directs calcium ions to coccolith mineralization sites / A. Gal, R. Wirth, J. Kopka [et al.] // *Science*. – 2016. – Vol. 353. – № 6299. – P. 590-593.
175. A basic protein, N25, from a mollusk modifies calcium carbonate morphology and shell biomineralization / D. Yang, Y. Yan, X. Yang [et al.] // *Journal of Biological Chemistry*. – 2019. – Vol. 294. – № 21. – P. 8371-8383.
176. Phase transitions in biogenic amorphous calcium carbonate / Y. U. T. Gong, C. E. Killian, I. C. Olson [et al.] // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2012. – Vol. 109. – № 16. – P. 6088-6093.
177. The corrected structure of the SM50 spicule matrix protein of *Strongylocentrotus purpuratus* / Y. Katoh-Fukui, T. Noce, T. Ueda [et al.] // *Developmental Biology*. – 1991. – Vol. 145. – № 1. – P. 201-202.
178. Roles of larval sea urchin spicule SM50 domains in organic matrix self-assembly and calcium carbonate mineralization / A. Rao, J. Seto, J. K. Berg [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2013. – Vol. 183. – № 2. – P. 205-215.
179. Anderson, H. C. Molecular Biology of matrix vesicles / H. C. Anderson // *Clinical Orthopaedics and Related Research*. – 1995. – № 314. – P. 266-280.
180. Hoshi, K. Matrix vesicle calcification in bones of adult rats / K. Hoshi, H. Ozawa // *Calcified Tissue International*. – 2000. – Vol. 66. – № 6. – P. 430-434.
181. Bone structure and formation: A new perspective / M. J. Olszta, X. Cheng, S. S. Jee [et al.] // *Materials Science and Engineering: R: Reports*. – 2007. – Vol. 58. – № 3-5. – P. 77-116.
182. Bone mineralization proceeds through intracellular calcium phosphate loaded vesicles: A cryo-electron microscopy study / J. Mahamid, A. Sharir, D. Gur [et al.] // *Journal of Structural Biology*. – 2011. – Vol. 174. – № 3. – P. 527-535.
183. Biomimetic mineralization using matrix vesicle nanofragments / Y. Kunitomi, E. S. Hara, M. Okada [et al.] // *Journal of Biomedical Materials Research Part A*. – 2019. – Vol. 107. – № 5. – P. 1021-1030.
184. Matrix vesicle-mediated mineralization and osteocytic regulation of bone mineralization / T. Hasegawa, H. Hongo, T. Yamamoto [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2022. – Vol. 23. – № 17. – P. 9941.
185. Ultrastructural and biochemical aspects of matrix vesicle-mediated

mineralization / T. Hasegawa, T. Yamamoto, E. Tsuchiya [et al.] // *Japanese Dental Science Review*. – 2017. – Vol. 53. – № 2. – P. 34-45.

186. Ozawa, H. Current concepts of bone biomineralization / H. Ozawa, K. Hoshi, N. Amizuka // *Journal of Oral Biosciences*. – 2008. – Vol. 50. – № 1. – P. 1-14.

187. Role of lipids in calcification of cartilage / B. D. Boyan, Z. Schwartz, L. D. Swain, A. Khare // *The Anatomical Record*. – 1989. – Vol. 224. – № 2. – P. 211-219.

188. Boskey, A. L. The role of synthetic and bone extracted Ca-phospholipid-PO<sub>4</sub> complexes in hydroxyapatite formation / A. L. Boskey, A. S. Posner // *Calcified Tissue Research*. – 1977. – Vol. 23. – № 1. – P. 251-258.

189. Wu, L. N. Y. Analysis and molecular modeling of the formation, structure, and activity of the phosphatidylserine-calcium-phosphate complex associated with biomineralization / L. N. Y. Wu, B. R. Genge, R. E. Wuthier // *Journal of Biological Chemistry*. – 2008. – Vol. 283. – № 7. – P. 3827-3838.

190. Effects of pH on the production of phosphate and pyrophosphate by matrix vesicles' biomimetics / A. M. S. Simão, M. Bolean, M. F. Hoylaerts [et al.] // *Calcified Tissue International*. – 2013. – Vol. 93. – № 3. – P. 222-232.

191. The role of matrix-bound extracellular vesicles in the regulation of endochondral bone formation / B. D. Boyan, N. C. Asmussen, Z. Lin, Z. Schwartz // *Cells*. – 2022. – Vol. 11. – № 10. – P. 1619.

192. Transformation of amorphous calcium phosphate to bone-like apatite / A. Lotsari, A. K. Rajasekharan, M. Halvarsson, M. Andersson // *Nature Communications*. – 2018. – Vol. 9. – № 1. – P. 4170.

193. Edén, M. Structure and formation of amorphous calcium phosphate and its role as surface layer of nanocrystalline apatite: Implications for bone mineralization / M. Edén // *Materialia*. – 2021. – Vol. 17. – P. 101-107.

194. Dhama, N. K. Biomineralization of calcium carbonates and their engineered applications: a review / N. K. Dhama, M. S. Reddy, A. Mukherjee // *Frontiers in Microbiology*. – 2013. – Vol. 4.

195. Calcium-based biomineralization: a smart approach for the design of novel multifunctional hybrid materials / E. Campodoni, M. Montanari, C. Artusi [et al.] // *Journal of Composites Science*. – 2021. – Vol. 5. – № 10. – P. 278.

196. Biomineralization of bone tissue: calcium phosphate-based inorganics in collagen fibrillar organic matrices / M.-H. Hong, J. H. Lee, H. S. Jung [et al.] // *Biomaterials Research*. – 2022. – Vol. 26. – № 1.

197. Preparation of amorphous calcium carbonate nanoparticles from impure dolomitic marble with the aid of poly(acrylic acid) as a stabilizer / M. M. M. G. P. G. Mantilaka, R. M. G. Rajapakse, D. G. G. P. Karunaratne, H. M. T. G. A. Pitawala // *Advanced Powder Technology*. – 2014. – Vol. 25. – № 2. – P. 591-598.

198. Inhibition of homogenous formation of calcium carbonate by poly (acrylic acid). The effect of molar mass and end-group functionality / A. A. Al-Hamzah, C. P. East, W. O. S. Doherty, C. M. Fellows // *Desalination*. – 2014. – Vol. 338. – P. 93-105.

199. Investigation of calcium carbonate scaling inhibition and scale morphology by AFM / Q. Yang, Y. Liu, A. Gu [et al.] // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2001. – Vol. 240. – № 2. – P. 608-621.
200. Experimental and theoretical studies of carboxylic polymers with low molecular weight as inhibitors for calcium carbonate scale / Y. Zuo, W. Yang, K. Zhang [et al.] // *Crystals*. – 2020. – Vol. 10. – № 5. – P. 406.
201. Amjad, Z. Precipitation of calcium phosphate in the presence of anionic polymers: the influence of cationic polymeric flocculant / Z. Amjad // *Phosphorus Research Bulletin*. – 1999. – Vol. 9. – № 0. – P. 31-40.
202. Krogstad, D. V. Kinetics of aggregation and crystallization of polyaspartic acid stabilized calcium phosphate particles at high concentrations / D. V. Krogstad, D. Wang, S. Lin-Gibson // *Biomacromolecules*. – 2015. – Vol. 16. – № 5. – P. 1550-1555.
203. Target-specific delivery of siRNA by stabilized calcium phosphate nanoparticles using dopa-hyaluronic acid conjugate / M. S. Lee, J. E. Lee, E. Byun [et al.] // *Journal of Controlled Release*. – 2014. – Vol. 192. – P. 122-130.
204. Polyelectrolyte-calcium complexes as a pre-precursor induce biomimetic mineralization of collagen / Z. Zhou, L. Zhang, J. Li [et al.] // *Nanoscale*. – 2021. – Vol. 13. – № 2. – P. 953-967.
205. Amjad, Z. Influence of polyelectrolytes on the precipitation of amorphous calcium phosphate / Z. Amjad // *Colloids and Surfaces*. – 1990. – Vol. 48. – P. 95-106.
206. Liu, Y. Synthesis of calcite superstructures using water reducer as adjuster / Y. Liu, H. Xu, G. Wu // *ChemistrySelect*. – 2020. – Vol. 5. – № 31. – P. 9709-9713.
207. Zheng, T. Spherical vaterite microspheres of calcium carbonate synthesized with poly (acrylic acid) and sodium dodecyl benzene sulfonate / T. Zheng, X. Zhang, H. Yi // *Journal of Crystal Growth*. – 2019. – Vol. 528. – P. 125275.
208. Bioinspired selective synthesis of liquid-crystalline nanocomposites: formation of calcium carbonate-based composite nanodisks and nanorods / M. Nakayama, S. Kajiyama, A. Kumamoto [et al.] // *Nanoscale Advances*. – 2020. – Vol. 2. – № 6. – P. 2326-2332.
209. Huang, S. C. A carbonate controlled-addition method for amorphous calcium carbonate spheres stabilized by poly(acrylic acid)s / S. C. Huang, K. Naka, Y. Chujo // *Langmuir*. – 2007. – Vol. 23. – № 24. – P. 12086-12095.
210. Carboxylate-terminated double-hydrophilic block copolymer as an effective and environmental inhibitor in cooling water systems / L. Ling, Y. Zhou, J. Huang [et al.] // *Desalination*. – 2012. – Vol. 304. – P. 33-40.
211. A multicarboxyl antiscalant for calcium phosphate and calcium carbonate deposits in cooling water systems / K. Cao, J. Huang, Y. Zhou [et al.] // *Desalination and Water Treatment*. – 2014. – Vol. 52. – № 37-39. – P. 7258-7264.
212. Facile synthesis of elongated calcite superstructure by triblock copolymers with precisely designed block length / Y. Su, D. Wang, H. Yang, D. Wang // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. – 2009. – Vol. 342. – № 1-3. – P. 122-126.

213. Poly(ethylene imine)-controlled calcium phosphate mineralization / A. Shkilnyy, A. Friedrich, B. Tiersch [et al.] // *Langmuir*. – 2008. – Vol. 24. – № 5. – P. 2102-2109.
214. Bio-Inspired degradable polyethylenimine/calcium phosphate micro-/nanocomposites for transient ultrasound and photoluminescence imaging. Vol. 34 / T. He, D. G. Bradley, M. Xu [et al.]. – 2022. – 7220-7231 p.
215. Idubition of calcium hydroxyapatite / R. C. Crowther, C. M. Pritchard, S.-M. Ijju [et al.] // *Liver*. – 1993. – Vol. 13. – P. 141-145.
216. Collagen intrafibrillar mineralization as a result of the balance between osmotic equilibrium and electroneutrality / L. N. Niu, S. E. Jee, K. Jiao [et al.] // *Nature Materials*. – 2017. – Vol. 16. – № 3. – P. 370-378.
217. Controllable synthesis of poly(acrylic acid)-stabilized nano-hydroxyapatite suspension by an ultrasound-assisted precipitation method / D. Yan, Y. Lou, Y. Han [et al.] // *Materials Letters*. – 2018. – Vol. 227. – P. 9-12.
218. Molecular weight and concentration of poly (acrylic acid) dual-responsive homogeneous and intrafibrillar collagen mineralization using an in situ co-organization strategy / L. Shen, H. Bu, Y. Zhang [et al.] // *Polymer Composites*. – 2021. – Vol. 42. – № 9. – P. 4448-4460.
219. Biodegradable nanoparticles of polyacrylic acid–stabilized amorphous CaCO<sub>3</sub> for tunable pH-responsive drug delivery and enhanced tumor inhibition / C. Xu, Y. Yan, J. Tan [et al.] // *Advanced Functional Materials*. – 2019. – Vol. 29. – № 24.
220. Bare and polyelectrolyte-coated calcium carbonate particles for seawater uranium extraction: an eco-friendly alternative / J. Courtois, B. Wang, I. N. Abonee [et al.] // *Sustainable Energy & Fuels*. – 2020. – Vol. 4. – № 10. – P. 5301-5312.
221. Calcium phosphate nanocluster-loaded injectable hydrogel for bone regeneration / S. Yao, Y. Xu, Y. Zhou [et al.] // *ACS Applied Bio Materials*. – 2019. – Vol. 2. – № 10. – P. 4408-4417.
222. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors / F. Nudelman, K. Pieterse, A. George [et al.] // *Nature Materials*. – 2010. – Vol. 9. – № 12. – P. 1004-1009.
223. Calcium phosphate colloids with hierarchical structure controlled by polyaspartates / A. Peytcheva, H. Cölfen, H. Schnablegger, M. Antonietti // *Colloid and Polymer Science*. – 2002. – Vol. 280. – № 3. – P. 218-227.
224. Krogstad, D. V. Polyaspartic acid concentration controls the rate of calcium phosphate nanorod formation in high concentration systems / D. V. Krogstad, D. Wang, S. Lin-Gibson // *Biomacromolecules*. – 2017. – Vol. 18. – № 10. – P. 3106-3113.
225. Stabilized calcium phosphate nano-aggregates using a dopa-chitosan conjugate for gene delivery / K. Lee, M. H. Oh, M. S. Lee [et al.] // *International Journal of Pharmaceutics*. – 2013. – Vol. 445. – № 1-2. – P. 196-202.
226. Photosensitizer-loaded bubble-generating mineralized nanoparticles for ultrasound imaging and photodynamic therapy / D. J. Park, K. H. Min, H. J. Lee [et al.] // *Journal of Materials Chemistry B*. – 2016. – Vol. 4. – № 7. – P. 1219-1227.

227. Nagaraja, A. T. Poly (vinylsulfonic acid) assisted synthesis of aqueous solution stable vaterite calcium carbonate nanoparticles / A. T. Nagaraja, S. Pradhan, M. J. McShane // *Journal of Colloid and Interface Science*. – 2014. – Vol. 418. – P. 366-372.
228. Polycation liposomes combined with calcium phosphate nanoparticles as a non-viral carrier for siRNA delivery / J. Zhang, X. Sun, R. Shao [et al.] // *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. – 2015. – Vol. 30. – P. 1-6.
229. Mussel-inspired polydopamine coating as a universal route to hydroxyapatite crystallization / J. Ryu, S. H. Ku, H. Lee, C. B. Park // *Advanced Functional Materials*. – 2010. – Vol. 20. – № 13. – P. 2132-2139.
230. Chiridon, W. M. Adsorption of catechol and comparative solutes on hydroxyapatite / W. M. Chiridon, W. J. O'Brien, R. E. Robertson // *Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials*. – 2003. – Vol. 66B. – № 2. – P. 532-538.
231. Copolymers of 1-vinylimidazole and (meth)acrylic acid: Synthesis and polyelectrolyte properties / V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, H. Tenhu [et al.] // *European Polymer Journal*. – 2004. – Vol. 40. – № 6. – P. 1027-1032.
232. Kuo, J. A method of calculating copolymerization reactivity ratios / J. Kuo, C. Chen // *Journal of Applied Polymer Science*. – 1981. – Vol. 26. – № 4. – P. 1117-1128.
233. Synthesis and polyelectrolyte properties of carboxyl-containing copolymers of 1-vinyl-4,5,6,7-tetrahydroindole / V. V. Annenkov, O. V. Lebedeva, E. N. Danilovtseva, A. I. Mikhaleva // *Polym. Sci., Ser. B*. – 2001. – Vol. 43. – P. 247-250.
234. Езриелев, А. И. Аналитический метод вычисления констант сополимеризации / А. И. Езриелев, Э. Л. Брохина, Е. С. Роскин // *Высокомолекулярные соединения А*. – 1969. – Vol. 11. – № 8. – P. 1670-1680.
235. Водорастворимые сополимеры алифатических и циклических п-виниламидов с п-винилимидазолом как эффективные экстрагенты гистидина / М. С. Лавлинская, В. А. Кузнецов, Д. В. Быковский, Г. В. Шаталов // *Конденсированные Среды И Межфазные Границы*. – 2017. – Vol. 19. – № 1. – P. 80.
236. Katchalsky, A. SECTION II: Polybase properties of polyvinylamine / A. Katchalsky, J. Mazur, P. Spitnik // *Journal of Polymer Science*. – 1957. – Vol. 23. – № 104. – P. 513-532.
237. Nesterova, N. A. Radical copolymerization of N-vinylformamide with unsaturated carboxylic acids / N. A. Nesterova, I. I. Gavrilova, E. F. Panarin // *Russian Journal of Applied Chemistry*. – 2009. – Vol. 82. – № 4. – P. 618-621.
238. Kathmann, E. E. Water-soluble copolymers. 67. Polyelectrolytes of N - vinylformamide with sodium 3-acrylamido-3-methylbutanoate, sodium 2-acrylamido-2-methylpropanesulfonate, and sodium acrylate: synthesis and characterization / E. E. Kathmann, L. A. White, C. L. McCormick // *Macromolecules*. – 1996. – Vol. 29. – № 16. – P. 5268-5272.
239. Carbon-13 and nitrogen-15 NMR pH titration of poly(vinylamine): a two-stage process sensitive to polymer tacticity / C. Chang, F. Fish, D. D. Muccio, T. St. Pierre // *Macromolecules*. – 1987. – Vol. 20. – № 3. – P. 621-625.
240. Treslong, C. J. B. van. Poly(ethylenimine) II. Potentiometric titration behaviour

in comparison with other weak polyelectrolytes / C. J. B. van Treslong, A. J. Staverman // *Recueil des Travaux Chimiques des Pays-Bas*. – 1974. – Vol. 93. – № 6. – P. 171-178.

241. Schmitz, K. S. On the electrostatic contribution to the persistence length of flexible polyelectrolytes / K. S. Schmitz, J. W. Yu // *Macromolecules*. – 1988. – Vol. 21. – № 2. – P. 484-493.

242. Sedlak, M. Domain structure of polyelectrolyte solutions: is it real? / M. Sedlak // *Macromolecules*. – 1993. – Vol. 26. – № 5. – P. 1158-1162.

243. Mishra, B. Transition in solution dynamics of polyacrylic acid: An interplay between nonergodicity and triple mode relaxation / B. Mishra, S. S. Jena // *Journal of Polymer Science*. – 2024. – Vol. 62. – № 7. – P. 1394-1410.

244. Sitar, S. Differences in association behavior of isotactic and atactic poly(methacrylic acid) / S. Sitar, V. Aseyev, K. Kogej // *Polymer*. – 2014. – Vol. 55. – № 3. – P. 848-854.

245. Chong, C. S. Light scattering and turbidity measurements on lipid vesicles / C. S. Chong, K. Colbow // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*. – 1976. – Vol. 436. – № 2. – P. 260-282.

246. Buruiana, E. C. Preparation and characterization of new optically active poly(N-acryloyl chloride) functionalized with (S)-phenylalanine and pendant pyrene / E. C. Buruiana, T. Buruiana, L. Hahui // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. – 2007. – Vol. 189. – № 1. – P. 65-72.

247. Poly(vinyl amine)–silica composite nanoparticles: models of the silicic acid cytoplasmic pool and as a silica precursor for composite materials formation / V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, V. A. Pal'shin [et al.] // *Biomacromolecules*. – 2011. – Vol. 12. – № 5. – P. 1772-1780.

248. Pekel, N. Investigation of complex formation between poly(N-vinyl imidazole) and various metal ions using the molar ratio method / N. Pekel, O. Güven // *Colloid & Polymer Science*. – 1999. – Vol. 277. – № 6. – P. 570-573.

249. Acid-base properties of poly(1-vinylazoles) in aqueous solution / N. L. Mazyar, V. V. Annenkov, V. A. Kruglova [et al.]. – 2000.

250. Functional polymers for modeling the formation of biogenic calcium carbonate and the design of new materials / E. N. Danilovtseva, V. A. Palshin, M. S. Strelova [et al.] // *Polymers for Advanced Technologies*. – 2022. – Vol. 33. – № 9. – P. 2984-3001.

251. Acrylic acid and vinylamine copolymers: Anomalous acidity and association with short polyacids / V. V. Annenkov, M. S. Sudakov, V. A. Pal'shin [et al.] // *Polymer*. – 2024. – Vol. 302. – P. 127057.

252. Homeijer, S. J. Polymer-induced liquid-precursor (PILP) process in the non-calcium based systems of barium and strontium carbonate / S. J. Homeijer, R. A. Barrett, L. B. Gower // *Crystal Growth & Design*. – 2010. – Vol. 10. – № 3. – P. 1040-1052.

253. Composite nanoparticles: A new way to siliceous materials and a model of biosilica synthesis / V. V. Annenkov, V. A. Pal'shin, O. N. Verkhovzina [et al.] // *Materials Chemistry and Physics*. – 2015. – Vol. 165. – P. 227-234.

254. On biomineralization: enzymes switch on mesocrystal assembly / A. Rao, T. Roncal-Herrero, E. Schmid [et al.] // *ACS Central Science*. – 2019. – Vol. 5. – № 2. – P. 357-364.
255. Margolis, H. C. Role of macromolecular assembly of enamel matrix proteins in enamel formation / H. C. Margolis, E. Beniash, C. E. Fowler // *Journal of Dental Research*. – 2006. – Vol. 85. – № 9. – P. 775-793.
256. Hocking, M. B. Polymeric flocculants and flocculation / M. B. Hocking, K. A. Klimchuk, S. Lowen // *Journal of Macromolecular Science, Part C: Polymer Reviews*. – 1999. – Vol. 39. – № 2. – P. 177-203.
257. Sumper, M. Biomimetic patterning of silica by long-chain polyamines / M. Sumper // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2004. – Vol. 43. – № 17. – P. 2251-2254.
258. Towards an understanding of (bio)silicification: the role of amino acids and lysine oligomers in silicification / D. Belton, G. Paine, S. V. Patwardhan, C. C. Perry // *Journal of Materials Chemistry*. – 2004. – Vol. 14. – № 14. – P. 2231.
259. Silacidins: highly acidic phosphopeptides from diatom shells assist in silica precipitation in vitro / S. Wenzl, R. Hett, P. Richthammer, M. Sumper // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Vol. 47. – № 9. – P. 1729-1732.
260. LeGeros, R. Z. Dense hydroxyapatite / R. Z. LeGeros, J. P. LeGeros // *An Introduction to Bioceramics*. – WORLD SCIENTIFIC, 1993. – P. 139-180.
261. Lazić, S. Microcrystalline hydroxyapatite formation from alkaline solutions / S. Lazić // *Journal of Crystal Growth*. – 1995. – Vol. 147. – № 1-2. – P. 147-154.
262. Tung, M. S. An intermediate state in hydrolysis of amorphous calcium phosphate / M. S. Tung, W. E. Brown // *Calcified Tissue International*. – 1983. – Vol. 35. – № 1. – P. 783-790.
263. Chair, H. Synthesis of  $\beta$ -tricalcium phosphate / H. Chair, H. Labjar, O. Britel // *Morphologie*. – 2017. – Vol. 101. – № 334. – P. 120-124.
264. Synthesis of hydroxyapatite,  $\beta$ -Tricalcium phosphate and biphasic calcium phosphate particles to act as local delivery carriers of curcumin: Loading, release and in vitro studies / D. Xidaki, P. Agrafioti, D. Diomatari [et al.] // *Materials*. – 2018. – Vol. 11. – № 4.
265. Ślósarczyk, A. FTIR and XRD evaluation of carbonated hydroxyapatite powders synthesized by wet methods / A. Ślósarczyk, Z. Paszkiewicz, C. Paluszkiwicz // *Journal of Molecular Structure*. – 2005. – Vols. 744-747. – P. 657-661.
266. Complexes of Poly(1-vinylimidazole) with Aluminum Ions in Aqueous Media / V. V. Annenkov, E. A. Filina, E. N. Danilovtseva [et al.] // *Polymer Science, Ser. A*. – 2002. – Vol. 44. – № 10. – P. 1088-1093.
267. Nanopatterned protein microrings from a diatom that direct silica morphogenesis / A. Scheffel, N. Poulsen, S. Shian, N. Kröger // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. – 2011. – Vol. 108. – № 8. – P. 3175-3180.
268. Thermal behavior, stability, and decomposition mechanism of poly( N -

vinylimidazole) / C. Fodor, J. Bozi, M. Blazsó, B. Iván // *Macromolecules*. – 2012. – Vol. 45. – № 22. – P. 8953-8960.

269. Functionalized nanocomposite coating of a glass surface for oligonucleotide immobilization / V. V. Annenkov, A. S. Levina, E. N. Danilovtseva [et al.] // *Russian Journal of Bioorganic Chemistry*. – 2006. – Vol. 32. – № 5. – P. 460-467.

270. Biomimetic calcium phosphate nanoparticles: biomineralization models and precursors for composite materials / M. S. Strelava, E. N. Danilovtseva, S. N. Zelinskiy [et al.] // *Langmuir*. – 2024.

271. Oosterlaken, B. M. In vitro mineralization of collagen / B. M. Oosterlaken, M. P. Vena, G. de With // *Advanced Materials*. – 2021. – Vol. 33. – № 16.

272. Bioinspired composite materials: sorbents for chromatography, bone-like structures and substrates for cell cultures / M. S. Strelava, V. A. Palshin, S. N. Zelinskiy [et al.] // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2022. – № 6. – P. 1675-1680.

273. Inhibiting cell viability and motility by layer-by-layer assembly and biomineralization / Y. Wei, H. Xu, S. Xu [et al.] // *ACS Omega*. – 2020. – Vol. 5. – № 28. – P. 17118-17128.

274. The role of apoptosis and oxidative stress in a cell spheroid model of calcific aortic valve disease / C. W. Coutts, A. M. Baldwin, M. Jebeli [et al.] // *Cells*. – 2023. – Vol. 13. – № 1. – P. 45.

275. Yeast cells with an artificial mineral shell: protection and modification of living cells by biomimetic mineralization / B. Wang, P. Liu, W. Jiang [et al.] // *Angewandte Chemie International Edition*. – 2008. – Vol. 47. – № 19. – P. 3560-3564.

276. Coumarin-based acid dye for fluorescent staining of calcium carbonate particles / S. N. Zelinskiy S.N., E. N. Danilovtseva E.N., M. S. Strelava M.S. [et al.] // *Limnology and Freshwater Biology*. – 2023. – № 6. – P. 244-252.

277. Кейл, Б. Лабораторная техника органической химии / Б. Кейл. – Мир. – Москва, 1966. – 752 p.

278. Карякин, Ю. В. Чистые химические вещества / Ю. В. Карякин, И. И. Ангелов. – Химия. – Москва, 1974. – 408 p.

279. Gu, L. Acidic and basic hydrolysis of poly(N-vinylformamide) / L. Gu, S. Zhu, A. N. Hrymak // *Journal of Applied Polymer Science*. – 2002. – Vol. 86. – № 13. – P. 3412-3419.

280. Hydrodynamic behavior, molecular mass, and conformational parameters of poly(vinylformamide) molecules / G. M. Pavlov, E. V. Korneeva, C. Ebel [et al.] // *Polymer Science Series A*. – 2004. – Vol. 46. – № 10. – P. 1063-1067.

281. Takahashi, A. Molecular weight determination of sodium polyacrylate by osmotic method / A. Takahashi, N. Hayashi, I. Kagawa // *The Journal of the Society of Chemical Industry, Japan*. – 1957. – Vol. 60. – № 8. – P. 1059-1061.

282. Светорассеяние, вязкость и динамическое двойное лучепреломление растворов поли-н-винилимидазола / В. Е. Эскин, С. Я. Магарик, У. Б. Жураев, Г. Д.

Рудковская // Высокомолекулярные соединения, Серия А. – 1978. – Vol. 20. – № 10. – P. 2219–2223.

283. Polymeric amines and ampholytes derived from poly(acryloyl chloride): synthesis, influence on silicic acid condensation and interaction with nucleic acid / E. Danilovtseva, U. Maheswari Krishnan, V. Pal'shin, V. Annenkov // *Polymers*. – 2017. – Vol. 9. – № 11. – P. 624.

284. Controlled stabilisation of silicic acid below pH 9 using poly(1-vinylimidazole) / V. V. Annenkov, E. N. Danilovtseva, Y. V. Likhoshway [et al.] // *J. Mater. Chem.* – 2008. – Vol. 18. – № 5. – P. 553-559.

285. Берлин, А. А. Об определении характеристической вязкости растворов полимеров / А. А. Берлин // *Высокомолекулярные соединения*. – 1966. – Vol. 8. – № 8. – P. 1336-1341.

286. Strauss, U. P. Analysis of ionization equilibriums of polyacids in terms of species population distributions. Examination of a “two-state” conformational transition / U. P. Strauss, B. W. Barbieri, G. Wong // *The Journal of Physical Chemistry*. – 1979. – Vol. 83. – № 22. – P. 2840-2843.

287. Annenkov, V. V. Study of nanoparticles by dynamic light scattering: processing challenges / V. V. Annenkov // *Preprints*. – 2023. – № 2023081929.

288. Brunauer, S. Adsorption of gases in multimolecular layers / S. Brunauer, P. H. Emmett, E. Teller // *Journal of the American Chemical Society*. – 1938. – Vol. 60. – № 2. – P. 309-319.

289. Barrett, E. P. The Determination of Pore Volume and Area Distributions in Porous Substances. I. Computations from Nitrogen Isotherms / E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda // *Journal of the American Chemical Society*. – 1951. – Vol. 73. – № 1. – P. 373-380.

290. *Gymnodinium corollarium* Sp. Nov. (Dinophyceae) - A new cold-water dinoflagellate responsible for cyst sedimentation events in the baltic sea / A. M. Sundström, A. Kremp, N. Daugbjerg [et al.] // *Journal of Phycology*. – 2009. – Vol. 45. – № 4. – P. 938-952.

291. GUILLARD, R. R. Studies of marine planktonic diatoms. I. *Cyclotella nana* Hustedt, and *Detonula confervacea* (cleve) Gran. / R. R. GUILLARD, J. H. RYTHER // *Canadian journal of microbiology*. – 1962. – Vol. 8. – № 2. – P. 229-239.