

Министерство науки и высшего образования Российской Федерации
Федеральное государственное автономное образовательное
учреждение высшего образования
«КАЗАНСКИЙ (ПРИВОЛЖСКИЙ) ФЕДЕРАЛЬНЫЙ УНИВЕРСИТЕТ»

ИНСТИТУТ ФИЗИКИ

КАФЕДРА МЕДИЦИНСКОЙ ФИЗИКИ

Направление: 03.04.02 – Физика


Профиль: Медицинская физика

МАГИСТЕРСКАЯ ДИССЕРТАЦИЯ

ИССЛЕДОВАНИЕ МАГНИТНЫХ СВОЙСТВ
ТРИКАЛЬЦИЙФОСФАТА С ПРИМЕСЯМИ ИОНОВ ГАДОЛИНИЯ

Студент 2 курса группы 06-019

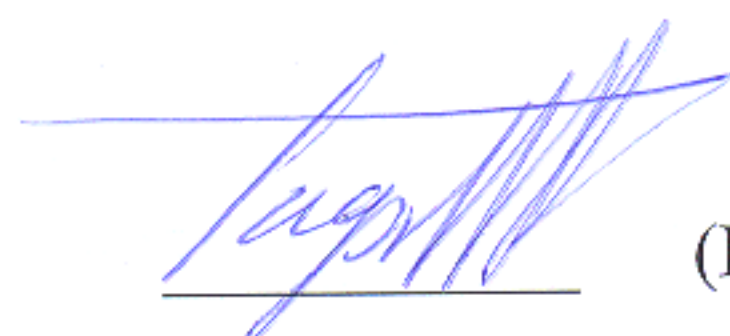
«16» июня 2022 г.

 (Садовникова М.А.)

Научный руководитель

д.ф-м.н., профессор

«16» июня 2022 г.

 (Гафуров М.Р.)

Заведующий кафедрой медицинской физики

д.х.н., профессор

«16» июня 2022 г.

 (Аганов А.В.)

Казань-2022

ОГЛАВЛЕНИЕ

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ	3
ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР	9
1.1 Твердая ткань человека. Строение и особенности	9
1.2 Кальций-фосфатные биоматериалы.....	10
1.3 Тканевая инженерия. Восстановление костных дефектов	11
1.4 Магнитно-резонансная спектроскопия структурно-неупорядоченных систем, допированных гадолинием.....	17
ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ.....	19
2.1 Трикальцийфосфат. Структура материала	19
2.2 Объект исследования. Трикальцийфосфат с примесью гадолиния	22
2.2.1 Практическое использование гадолиния в биомедицине	22
2.2.2 Синтез трикальцийфосфата.....	23
2.3 Метод электронного парамагнитного резонанса	24
2.3.1 Стационарный и импульсный режим.....	24
2.3.2 Анализ электрон-ядерных взаимодействий	27
2.3.3 Двумерный эксперимент электрон-ядерных взаимодействий	28
2.3.4 Динамические характеристики. Времена релаксации.....	30
2.3.6 Параметры оптимальной настройки экспериментов.....	31
2.4 Инвертированный микроскоп.....	32
ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ	34
3.1 Спектроскопия ЭПР в стационарном режиме.....	34
3.1.1 Спектроскопия ЭПР в X-диапазоне	34
3.1.2 Моделирование спектров поглощения	39
3.1.3 Высокочастотная ЭПР спектроскопия.....	40
3.2 Спектры ЭПР, полученные в импульсном режиме с использованием последовательности Хана.....	42
3.2.1 Результаты анализа электрон-ядерных взаимодействий	44
3.2.2 Анализ двумерного эксперимента.....	48
3.3 Радиационно-индуцированные центры	50
3. 4 Результат исследование биологической активности.....	52
ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ	54
СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ	55

ПЕРЕЧЕНЬ ИСПОЛЬЗУЕМЫХ СОКРАЩЕНИЙ

- ДЭЯР – двойной электрон-ядерный резонанс
- КТ – компьютерная томография
- МРТ – магнитно-резонансная томография
- ПЦ – парамагнитный центр
- СТВ – сверхтонкое взаимодействие
- СГ – спиновый гамильтониан
- СТС – сверхтонкая структура
- ТКФ – трикальцийфосфат
- ТКФ-Gd – трикальцийфосфат с примесью ионов гадолиния Gd^{3+}
- ТС – тонкая структура
- ФК – фосфаты кальция
- ХЧ – химически чистый
- ЧДА – чистый для анализа
- ЭПР – электронный парамагнитный резонанс
- ЭСЭ – электронное спиновое эхо
- ЯМР – ядерный магнитный резонанс
- СW – непрерывный режим
- ESEEM – Electron Spin Echo Envelop Modulation (рус. модуляция огибающей электронного спинового эха)
- HYSCORE – Hyperfine Sublevel CORrElation (рус. корреляция сверхтонких подуровней)
- ZFS – zero field splitting (рус. расщепление в нулевом поле)

ВВЕДЕНИЕ

Археологические поиски продемонстрировали, что еще в доисторическое время предпринимались попытки заменить отсутствующие зубы, с помощью материалов из кораллов, раковин, слоновых костей, костей животных, а также человеческих костей. На текущий момент, несмотря на прошествие достаточно длительного промежутка времени, аутотрансплантаты (участки костей, полученные из другой части того же субъекта) продолжают считаться «золотым» стандартом для восстановления твердых тканей, после которых следуют аллотрансплантаты – кости другого субъекта [1].

Спрос на заменители костной ткани во всем мире ежегодно растет, вследствие тяжелых переломов, последствия перенесенных операций, включая онкологические и участвовавших заболеваний (инфекционных) твердых тканей человека. Также создание новых имплантов крайне важно, поскольку по последним исследовательским данным идет улучшение качества жизни пациентов, а за ним и ее средняя продолжительность. Следовательно, важной и необходимой задачей является внедрение новых, современных медицинских технологий и материалов, с улучшенными физико-химическими и биологическими свойствами. Актуальные коммерческие материалы, используемые для замены, восстановления зубов и костных тканей включают природные соединения: полимеры, коллаген, деминерализованный костный матрикс, фосфаты кальция, карбонат кальция, сульфат кальция, биоактивные стекла, которые стимулируют формирование костной ткани, образуя уникально прочный контакт биоматериал-кость. Основным преимуществом разработки биоматериалов на основе фосфатов кальция (ФК) является их подобие по химическому и элементному составу и по свойствам с костным минералом. При этом, первое клиническое применение фосфата кальция привело к успешному замещению костного дефекта в 1920 году [2].

Ключевым материалом для лечения поврежденных твердых тканей и суставов является бета-трикальцийфосфат (β -ТКФ), который обладает

стехиометрией, аналогичный аморфным биологическим предшественникам костного минерала, и имеет молярное соотношение $Ca/P = 1.5$ [3]. Многочисленные исследования, в том числе клинические, показали, что синтетический β -ТКФ – крайне перспективный, остеокондуктивный, остеоиндуктивный материал, имеющий высокую биосовместимость с костной тканью человека. Важно отметить, что замещение катионов кальция в структуре ТКФ на катионы других металлов, способствует росту скорости резорбции ТКФ, вследствие увеличения дефектности его кристаллической решетки, а также позволяет усовершенствовать свойства данных материалов, что позволяет перейти к многофункциональным материалам для персонифицированной современной медицины [3].

Соединения β -ТКФ с примесью ионов гадолиния Gd^{3+} являются многообещающими биоматериалами для костной инженерии, поскольку позволяет контролировать и отслеживать степень регенерации костных тканей с помощью внедренных в медицинскую практику методов визуализации (рентгенография, компьютерная томография (КТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ)). Однако, цементы фосфатов кадмия на основе Gd^{3+} редко используются для заживления костных дефектов, а их биосовместимость и остеогенная активность остаются неизвестными до сих пор. В данной работе были исследованы наноразмерные образцы ТКФ с примесью ионов Gd^{3+} , синтезированные по методике влажного осаждения, применяя спектроскопию электронного парамагнитного резонанса (ЭПР). Спектры ЭПР в стационарном и импульсном режимах регистрировались с помощью спектрометра фирмы Bruker серии Elexsys E580/680 в сверхвысокочастотных (СВЧ) диапазонах $\nu_{СВЧ} = 9.6$ ГГц / 94 ГГц. Метод ЭПР является важным и полезным инструментом для контроля состава и кристаллической структуры материала в процессе изготовления имплантов, а также для понимания механизмов процессов резорбции.

Целью данной работы является исследование синтетических наноразмерных (10 нм) образцов трикальцифосфата с примесями ионов Gd^{3+} методом электронного парамагнитного резонанса.

В ходе выполнения работы решались следующие **задачи**:

1. Изучение материала ТКФ с разными концентрациями примесных ионов Gd^{3+} , с использованием стационарной и импульсной ЭПР спектроскопии в X – диапазоне ($\nu_{СВЧ} = 9.6$ ГГц) и в W – диапазоне ($\nu_{СВЧ} = 94$ ГГц).
2. Анализ и обработка полученных экспериментальных результатов, определение основных спектроскопических показателей и исследование динамических характеристик примесных центров.
3. Выявление особенностей влияния малой концентрации ионов Gd^{3+} на структурные и биологические особенности материала.

Научная новизна работы состоит в следующем:

1. Проведен анализ стационарных и импульсных спектров ЭПР порошкообразных образцов ТКФ-Gd.
2. Впервые для порошкообразных образцов ТКФ-Gd был зарегистрирован и проанализирован двумерный спектр с использованием четырехимпульсной последовательности HUSCORE для анализа электрон-ядерных взаимодействий. Полученные результаты позволили подтвердить наличие двух разных позиций ионов Gd в кристаллической структуре ТКФ.

Практическая значимость:

1. Полученные результаты могут быть полезны для идентификации ТКФ-Gd в различных апатитах и ФК биогенного происхождения.
2. Регистрация импульсного спектра ЭПР облученного рентгеновским источником ТКФ-Gd позволяет контролировать состав и целостность кристаллической структуры данного материала в процессе изготовления имплантов.

Личный вклад автора

Заключается в проведении экспериментов ЭПР-спектроскопии в стационарном и импульсном режимах при различных температурах. Автор принимал активное участие в анализе и обсуждениях полученных результатов, формулировке выводов и написании статьи.

Апробация работы:

Результаты работы докладывались и обсуждались на следующих конференциях:

1. **Садовникова М.А.**, Мурзаханов Ф.Ф., Фадеева И.В., Форысенкова А.А., Гафуров М.Р. Исследование трикальцийфосфата с примесью ионов гадолиния методом электронного парамагнитного резонанса // Международная научная конференция «Ломоносов». Москва, 11 апреля 2022 г.
2. **Садовникова М.А.**, Гафуров М.Р., Мурзаханов Ф.Ф., Фадеева И.В. Индентификация и изучение трикальцийфосфата с ионами гадолиния методом электронного парамагнитного резонанса // Международная студенческая научно-практическая конференция «Белые цветы». КГМУ, 14 апреля 2022 г.
3. **Садовникова М.А.** Исследование трикальцийфосфата с примесью ионов гадолиния методом ЭПР спектроскопии // Итоговая научно-образовательная конференция студентов Казанского Федерального Университета 2022 г.
4. Мурзаханов Ф.Ф., Гольдберг М.А., Авксентьев А.И., **Садовникова М.А.**, Шуртакова Д.В., Орлинский С.Б. Исследование примесных фосфатов кальция (гидроксиапатит и трикальцийфосфат) методом ЭПР/ДЭЯР спектроскопии // Четвёртая международная конференции со школой молодых учёных «Физика — наукам о жизни». Санкт-Петербург, 11-14 октября 2021 г.

Публикации:

1. Fadeeva, I. V., Deyneko, D. V., Barbaro, K., Davydova, G. A., *Sadovnikova, M. A.*, Murzakhanov, F. F., ... & Rau, J. V. (2022). Influence of Synthesis Conditions on Gadolinium-Substituted Tricalcium Phosphate Ceramics and Its Physicochemical, Biological, and Antibacterial Properties. *Nanomaterials*, 12(5), 852; **IF = 5.076**; (Q1: 1. *Physics, Applied*; 2. *General Chemical Engineering*)
2. Kalinnikova, E.; *Sadovnikova, M.*; Rodionov, A.; Murzakhanov, F.; Grishin, P. (2022). Analysis of the Osseointegration Processes of Dental implants by Electron Paramagnetic Resonance: An In Vivo Study. *Dentistry Journal*, 10 (2), 28. **IF = 3.5** (Q2: *General Dentistry*)
3. *М. А. Садовникова*, Ф. Ф. Мурзаханов, И. В. Фадеева, М. Р. Гафуров (2022). Исследование трикальцийфосфата с примесью ионов гадолиния методом электронного парамагнитного резонанса. **Ученые Записки Физического Факультета МГУ – в печати**

ГЛАВА 1 ЛИТЕРАТУРНЫЙ ОБЗОР

1.1 Твердая ткань человека. Строение и особенности

Кость – это часть опорно-двигательного аппарата, выполняющая функцию опоры для мышц и большинства органов, а также участвует в защите тела, движении и поддержке. Костная ткань является местом производства некоторых тканей, например, система кроветворения – костный мозг. Сердце, легкие и другие органы и структуры грудной клетки, главная функция которых – это движение, расширение и сокращение, требуют гибкости и эластичности костей грудной клетки. Наконец, это минеральный резервуар, благодаря которому эндокринная система контролирует и регулирует уровень ионов кальция и фосфата в циркулирующих жидкостях организма [5]. Кость построена преимущественно из костной ткани, относящаяся к соединительной ткани. Снаружи твердая ткань покрыта надкостницей, которая выполняет функцию развития и питания, так как в ней проходит большое количество кровеносных сосудов и нервных волокон. Внутри костной ткани находится костный мозг, выполняющий функцию образования форменных элементов крови (эритроциты, лейкоциты, тромбоциты). Кости образуют скелет, который бывает осевой (позвоночный столп, череп, грудная клетка) и добавочный (верхние и нижние конечности). Итак, костная ткань – это минерализованная матрица, сложный композит биополимера и биоминерала.

Костные клетки включают:

- остеобласты – это костеобразующие клетки, которые отвечают за производство и минерализацию костного матрикса;
- остеокласты – поддерживают костный матрикс, отвечают за резорбцию кости;
- остеоциты и клетки выстилающие кость.

Присоединение, пролиферация и дифференцировка клеток являются главными процессами, участвующие в формировании костей. Важные физико-химические свойства кости – пористость, биоразлагаемость, биоактивность, остеокондуктивность и остеоиндуктивность.

Архитектура и состав твердой ткани позволяют клеткам прикрепляться, мигрировать, пролиферировать и дифференцироваться, способствуя формированию, восстановлению и регенерации кости.

В макроскопическом приближении все кости имеют стандартную двойную структуру [5], значение которой зависит от функции. Внешний слой гладкий, плотный и непрерывный, покрывает кость, а внутри губчатая находится в виде сети пересекающихся пластинок. Эти полости заполнены кровеносными сосудами, костным мозгом либо красным – кроветворным, либо желтым – жировым.

Микроскопически кость представляет собой соединительную ткань, очень сложную и специализированной формы. Данная минерализованная ткань, состоящая из органического матрикса, который усилен отложениями кристаллов фосфатов кальция, то есть кость – это природный композитный материал.

1.2 Кальций-фосфатные биоматериалы

Биокерамика на основе фосфатов кальция (ФК) обладает наилучшими свойствами для замещения кости по сравнению с другими биоматериалами, так как имеет композиционное сходство с костным минералом. Кальций-фосфатные биоматериалы успешно применяются в стоматологической, черепно-челюстной, черепно-лицевой и ортопедической хирургии. Они бывают синтетического происхождения (получаемые после водного осаждения или спекания) и природного происхождения (заготовленная или лиофилизированная кость) [5].

ФК представляют собой соли ортофосфорной кислоты (H_3PO_4) и поэтому могут образовывать соединения, которые содержат $H_2PO_4^-$, HPO_4^{2-} или PO_4^{3-} . Соли ФК составляют широкую группу соединений, различающиеся по своему составу и кристаллической структуре.

В качестве заменителя костного трансплантата на основе фосфата кальция, чаще всего используют трикальцийфосфат (ТКФ) и гидроксиапатит (ГА), так как данные материалы демонстрируют наибольшее сходство с минералами, содержащиеся в кости [6]. Благодаря этому, ФК являются биосовместимыми, остеоиндуктивными (основано на способности образовывать молекулярное взаимодействие с окружающими тканями и образования слоя апатита), биodeградируемыми. Преимуществом ФК относительно сульфатов кальция является более медленное разрушение при использовании трансплантатов на их основе.

Различные композиты ФК демонстрируют различную скорость деградации (β -ТКФ разлагается быстрее, чем ГА). Первый шаг в механизме ремоделирования кости фосфатом кальция после имплантации – это стимулирование образования остеоида на его поверхности. Далее резорбция кальций-фосфатных биоматериалов происходит после активации остеокластических и многоядерных клеток.

ФК используются также для местной доставки антибиотиков. Для данной цели они обычно производятся в виде гранул, которые способны связывать антибиотики только на их поверхности, в отличие от цементов с фосфатом кальция или сульфатов кальция, которые способны связывать антибиотики по всей структуре.

1.3 Тканевая инженерия. Восстановление костных дефектов

Для восстановления костных дефектов регенерация кости обычно выполняется с использованием аутологичной или аллогенной кости, так как

они наиболее эффективны в стимулировании формирования кости путем остеиндукции и остеокондукции [6]. Однако, эти методы связаны с некоторыми недостатками: ограниченной доступностью и заболеваемостью при процедуре аутотрансплантации; передача заболеваний или бактериальная инфекция при аллотрансплантации. Когда мы говорим о регенерации костной ткани, то важными терминами являются биосовместимость, способность к биологическому разложению и механические свойства.

Биосовместимость – это способность биоматериала реагировать на реакции «хозяина» в конкретных областях применения. Также в рамках биосовместимости важными понятиями является остеоиндукция и остеокондукция. Остеоиндукция – стимуляция примитивных недодифференцированных клеток для дифференцировки в клетке-предшественнике остеопротеина для формирования костной ткани в любой среде. Остеокондукция означает, что биоматериал обладает свойствами для поддержки врастания ткани и стимуляции роста клеток-предшественников остеопротеина для формирования новой кости.

Биоразлагаемость или биодеградация – это широко используемый термин, который не имеет четкого определения, но в основном используется для описания химического распада биоматериалов, происходящий в течение нескольких дней или лет и вызывающий изменение физических свойств тканей окружающей среды. Деградация биоматериалов может происходить по-разному (в зависимости от типа материала): материалы могут растворяться, крошиться, становиться жесткими или эластичными. Деградация также главным образом зависит от химического состава и микроструктуры, то есть ТКФ, ГА, сульфаты кальция в керамике разлагаются довольно быстро, а биоактивные стекла относительно медленно. Пористость этих материалов, с другой стороны, влияет на скорость разложения, полностью плотные материалы разлагаются медленнее по сравнению с высокопористыми.

Различие в скорости деградации наблюдаются в разных местах имплантации, так как возможно они вызваны различной клеточной активностью, фагоцитозом или высвобождением свободных радикалов. Деградация некоторых биоматериалов может вызывать побочные реакции, например, гиперчувствительность и токсичность.

Что касается механических свойств различных биоматериалов, то прочность материала, деформация и ударная вязкость являются отличительными характеристиками, которые определяют конкретную применимость. Прочность материала определяется принципами напряжения и деформации в сочетании с измеренной величиной и типом деформации. Соотношение между напряжением и деформацией определяет эластичность биоматериала, которую можно измерить с помощью модуля упругости Юнга, где чем выше модуль, тем жестче биоматериал. Деформация биоматериалов происходит из-за силы, воздействующей на биоматериал. Она может быть обратимой (упругой) или необратимой (пластической). Другим важным свойством биоматериалов является прочность, определяющая количество энергии на объем, которое биоматериал может поглотить до разрушения. Например, керамика в качестве биоактивного стекла имеет очень высокий модуль Юнга, поскольку она обладает низкой способностью деформироваться до разрушения материала. Эти специфические свойства делают керамику очень хрупким биоматериалом. Металлы, такие как титан, имеют более низкий модуль Юнга, потому что они допускают гораздо большую деформацию по сравнению с керамикой. Это связано с тем, что металлы обладают более высокой способностью к пластической деформации до разрушения биоматериала, что делает такие металлы, как титан, пластичными биоматериалами. В случае заполнения дефектов, несущих нагрузку, заменители костного трансплантата должны обладать хорошей механической нагрузочной способностью, чтобы сохранить прочность и предотвратить перелом. Но биоматериалы должны иметь модуль Юнга сопоставимой с

костью, потому что, когда он намного выше, кость может сломаться, так как не может выдержать нагрузку биоматериала.

Высвобождение ионов кальция и фосфора регулирует активацию остеобластов, способствуя регенерации кости. Поверхностные свойства и пористость ФК отражается на адгезии и росте клеток и регулирует образование минералов в костях. Свойства, влияющие на биологическую активность, различаются в зависимости от типов ФК (ГА, ТКФ); различие в высвобождении ионов, растворимости, стабильности и механической прочности. Для того, чтобы задействовать данные свойства ФК используют вместе, смешиваются с другими материалами, легируются различными анионами и катионами, с целью усовершенствования и компенсировать недостатки [7].

ФК используются для регенерации кости в формах: покрытие, цемент, каркас. Кроме того, были проведены ряд исследований по повышению эффективности ФК в сочетании с различными заживляющими средствами.

Биоматериалы должны быть биологически стабильными и биосовместимыми в организме и не вызывать иммунного ответа. Было обнаружено, что фосфаты кальция биосовместимы, поскольку они могут растворяться в жидкостях организма и присутствуют в больших количествах в твердых формах.

Свойства фосфатов кальция влияют на биологическую активность, такую как адгезия, пролиферация и образование новой кости в остеобластах. Для проявления этих биоактивных свойств важны деградация и высвобождение ионов в фосфатах кальция. Эти явления повышают локальную концентрацию ионов кальция и фосфата и стимулируют образование костных минералов на поверхности ФК. Они также влияют на экспрессию маркеров дифференцировки остеобластов. ФК играют важную роль в клеточной адгезии и формировании тканей, влияя на адсорбцию белков внеклеточного матрикса

на поверхности. Их свойства также влияют на регенерацию кости, воздействуя на новообразованные костные минералы.

Воздействие ионов кальция на клетки и живые системы происходит несколькими способами. Так как кальций является строительным материалом, который образует костную матрицу. Эти ионы кальция вызывают образование и созревание костей посредством кальцификации. Вместе с тем, ионы Ca^{2+} влияют на регенерацию костей посредством передачи клеточных сигналов. Кальций стимулирует зрелые костные клетки путём образования оксида азота и индуцирует клетки-предшественники роста костей для регенерации костной ткани. Ионы Ca^{2+} также стимулируют путь синтеза кости остеобластами, активируя близкие по структуре белки ERK1 и ERK2 (ERK – внеклеточная сигнально-регулируемая киназа, передача сигнала по ERK-пути приводит к пролиферации, выживанию и подвижности клеток) [8], и увеличивают продолжительность жизни остеобластов, активируя сигнальный путь PI3K/Akt (внутриклеточный путь, центральными компонентами которого являются ферменты фосфоинозитид-3-киназа (PI3K) и Akt-киназы, данный путь отвечает за рост и метаболизм клеток) [9]. В дополнение, ионы кальция контролируют образование и резорбтивные функции остеокластов [10].

Ионы фосфора присутствуют в организме человека в больших количествах. Они присутствуют в различных веществах, таких как белки, нуклеиновые кислоты и аденозинтрифосфат, а также оказывают влияние на физиологические процессы. Более 80% ионов фосфора присутствуют в костях в виде ФК вместе с ионами кальция. Фосфор в основном существует в форме фосфата (PO_4^{3-}), который оказывает большое влияние на формирование и рост тканей. PO_4^{3-} регулирует дифференцировку и рост остеобластов через пути IGF-1 (белок из относящийся к инсулиноподобным факторам роста, он очень схож с инсулином по функциям и строению) и ERK1/2 и увеличивает экспрессию BMP (костные морфогенетические белки) [11]. Кроме того, фосфат имеет отрицательное взаимодействие обратной связи между RANK-

лигандом – решающим элементом гомеостаза костной ткани, прямо контролирующим дифференцировку остеокластов и его сигнальным рецептором и регулирует процесс ингибирования дифференцировки остеокластов и резорбции кости [12].

Адгезия клеток сильно зависит от способности адсорбировать белки внеклеточного матрикса. На него влияют характеристики поверхности ФК, такие как ее шероховатость, кристалличность, растворимость, фазовый состав, пористость и поверхностная энергия [13].

Роль шероховатости поверхности ФК определяется размером зерна и размером частиц кристаллической структуры фосфата кальция. Шероховатость влияет на адгезию белка к поверхности фосфата кальция. В целом адгезия белков улучшается при шероховатости менее 100 нм [14].

Пористость ФК также влияет на биологическую активность. Увеличение пористости улучшает контакт с жидкостями организма на площади поверхности, также наличие пор на поверхности влияет на адсорбцию белка. Сообщается, что адсорбция белка возрастает при размере пор 20 – 500 мкм [15]. Также стоит отметить, что размер пор влияет на вращение кости и ангиогенез (процесс образования новых кровеносных сосудов) [16]. Из-за наличия пор ФК проявляет механические свойства, такие как высокая хрупкость, низкая ударопрочность и низкое напряжение растяжения [17]. Однако его прочность на сжатие лучше, чем у натуральной человеческой кости, и он используется в имплантатах, в качестве заполнения дефектов и покрытиях.

Таким образом, ремоделирование кости заключается в резорбции старого костного минерала в сочетании с образованием новой кости. Во время резорбции продукты деградации – ионы кальция и фосфата метаболизируются естественным образом и не влекут за собой повышение уровня Са или Р в органах и тканях.

1.4 Магнитно-резонансная спектроскопия структурно-неупорядоченных систем, допированных гадолинием

Контрастные вещества – это фармацевтические препараты, которые повышают информативность диагностических изображений. Они используются для повышения чувствительности диагностических изображений за счет изменения внутренних свойств тканей. Контрастность изображения – это разница в яркости между интересующей областью и окружающей средой. Чем больше разница в яркости между разными типами тканей, тем легче отличить их друг от друга. Концентрация контрастного агента на основе гадолиния в определенной ткани зависит от фармакокинетики контрастного агента, структуры агента, напряженности магнитного поля, а также от строения исследуемых органов и тканей. Контрастные вещества на основе гадолиния являются парамагнетиками, то есть данные атомы действуют как ферромагнетики и суперпарамагнетики и обладают положительной магнитной восприимчивостью. Большинство контрастных веществ для МРТ представляют собой хелаты редкоземельного элемента гадолиния (например, GBCAs) и дают повышенный сигнал на T_1 -взвешанных изображениях. Отрицательные контрастные вещества для МРТ, например суперпарамагнитный оксид железа, не получил широкого распространения [18]. Многие переходные элементы периодической таблицы используются в качестве легирующих примесей, с целью получения информации о металлическом узле в кристаллической решетке. Гадолий, с наполовину заполненной f -оболочкой и отсутствием орбитального углового момента, ($L = 0$) является единственным трехвалентным лантаноидом которым возможно наблюдать в эксперименте электронного парамагнитного резонанса. Есть много сведений о внедрении ионов Gd^{3+} в монокристаллы, стекла и т. д. [19-21]. Спектр гадолиния используется в качестве зонда для определения окружения с точки зрения симметрии и координации материала.

Спектры ЭПР в стеклах обычно описываются как U-спектры, характерной особенностью которых является наличие трех групп линий с эффективным g-фактором ~ 2.0 ; 2.8 ; 6.0 , и широкой полосой поглощения для магнитных полей с $g < 2$. Впервые происхождение и интерпретация U-спектра обсуждалась несколькими авторами [22], которые приписывали $g = 6$ сильному кубическому полю. В работе [23] считали, что каждая из трех характерных особенностей соответствует определенному типу кристаллического поля:

$g = 2.0$ – слабый кубический или ромбический участок;

$g = 2.8$ – промежуточное кристаллическое поле;

$g = 6.0$ – сильное кубическое поле.

Позже, [24] приписали $g = 6.0$ сильному и четко определенному ромбическому кристаллическому полю, а широкую линию резонанса включающую $g = 2.0$ кластерам ионов гадолиния. Далее [25] причислили $g = 6.0$ как промежуточный участок напряженности кристаллического поля осевой симметрии, а расширенный вид U-спектра изолированным редкоземельным ионам в широком спектре участков.

ГЛАВА 2 МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Трикальцийфосфат. Структура материала

Регенерация костной ткани после травм, хирургических вмешательств или трансплантации является активно совершенствующимся направлением медицины. Синтетические материалы на основе ФК считаются перспективными для применения их в клинической практике. Особо выделяют трикальцийфосфат (ТКФ), который существует в 2 основных кристаллических модификациях: α -ТКФ (высокотемпературный) и β -ТКФ (низкотемпературный). ТКФ является одним из наиболее изученным ФК, с соотношением $\text{Ca/P} = 1.5$. Теоретическая плотность β -ТКФ составляет $3,067 \text{ г/см}^3$, температура разложения 1380°C , α -ТКФ — соответственно $2,18 \text{ г/см}^3$ и 1720°C [26].

β -ТКФ ($\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) является одним из наиболее часто используемых и эффективных синтетических заменителей костных трансплантатов, благодаря своей синтетической природе, остеокондуктивности, остеоиндуктивности и клеточно-опосредованной резорбции, а также он предложен как носитель для местного введения лекарственных препаратов и области стоматологии и ортопедии. β -ТКФ имеет ромбоэдрическую сингонию с пространственной группой $R\bar{3}c$ в тригональной конфигурации и параметрами ячейки: $a = 10,439 \text{ \AA}$; $c = 37,375 \text{ \AA}$; $z = 21$, ($\alpha = \beta = 90^\circ$ и $\gamma = 120^\circ$) элементарная ячейка содержит 21 формульную единицу $[\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2]$ [26]. Структуру можно описать как разрушенные слои тетраэдров PO_4 , в центрах которых находятся ионы кальция (рис. 1).

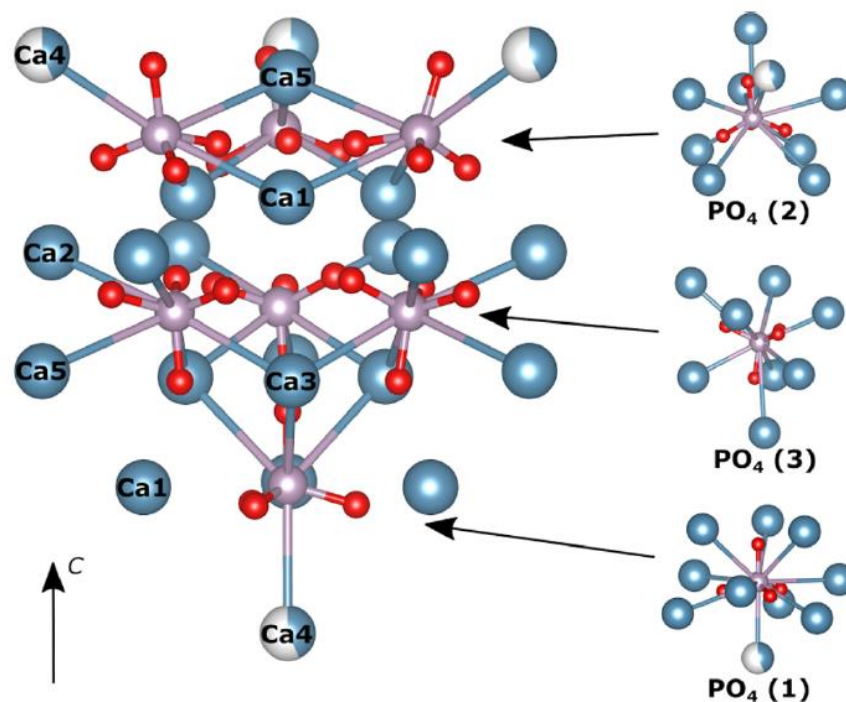


Рисунок 1 – Структура β -ТКФ. Красными шариками обозначен кислород, голубыми – ионы кальция, сиреневыми – ионы фосфора [27]

Растворимость β -ТКФ близка к растворимости костного минерала, таким образом ТКФ не растворяется в физиологических условиях, а резорбируется клетками. К резорбируемым следует отнести фосфаты кальция с соотношением $\text{Ca/P} < 1,67$ – трикальцийфосфат. Одна элементарная ячейка β -ТКФ содержит 63 атома кальция и 42 группы PO_4 . Атомы кальция расположены в 5 разных позициях Ca, отличительной чертой является то, что положение Ca(4) трехкратно координировано атомами кислорода и имеет частичный фактор заполнения кальцием 0,5 [3]. Напротив, каждый из Ca(1), Ca(2), Ca(3) и Ca(5) полностью занят одним атомом кальция, и эти позиции координируются с семью, восемью, восемью и шестью атомами кислорода, соответственно. Структура β -ТКФ состоит из двух плоских повторяющихся доменов, один из которых имеет молярное отношение $\text{Ca/P } 60/42 = 1.429$, а другой $\text{Ca/P } 66/42 = 1.571$ [28].

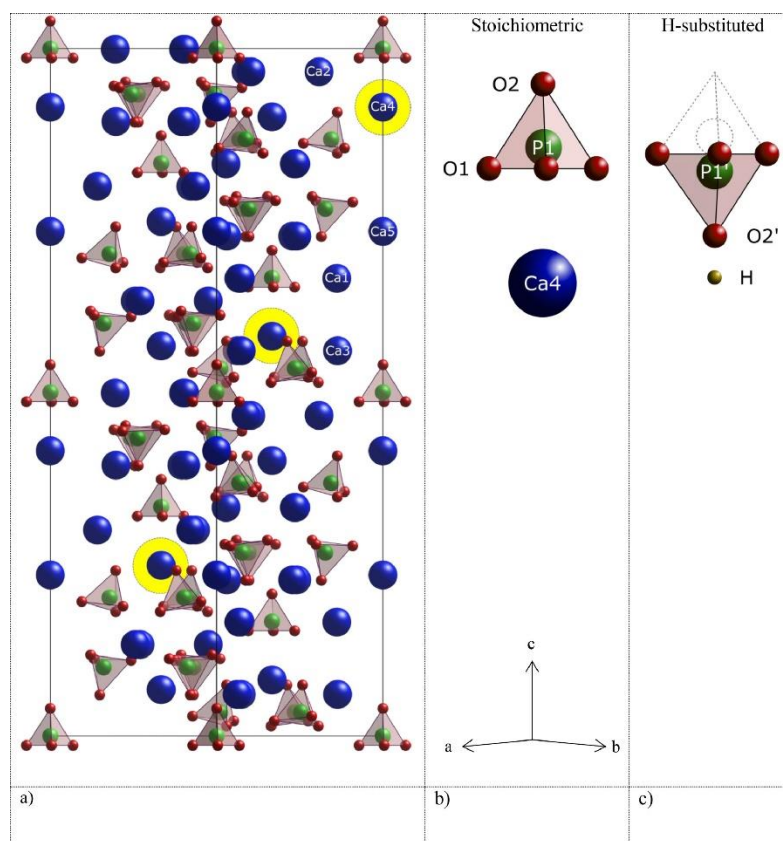


Рисунок 2 – (а) Структура β -ТСР, в которой желтым цветом выделен ряд сайтов Ca(4); атомы Ca выделены синим, атомы P зеленым, атомы O красным; (б) Иллюстрация расположения атомов Ca(4) и P1O4 в стехиометрической модели кристалла β -ТСР и (с) водородзамещенная модель β -ТСР, где $\approx 80\%$ тетраэдров P1O4 инвертированы и протонированы [3]

β -ТКФ способствует пролиферации клеток-предшественников остеогенеза, таких как остеобласты и стромальные клетки костного мозга. Эти свойства обусловлены отличной биоминерализацией и адгезией клеток, благодаря нанопористой структуре β -ТКФ.

2.2 Объект исследования. Трикальцийфосфат с примесью гадолиния

В данной работе исследуется β -ТКФ допированный ионами гадолиния (Gd^{3+}) с различной концентрацией. Известно, что Gd^{3+} является лучшим контрастным веществом, так как он обладает семью неспаренными электронами, что обеспечивает высокий магнитный момент электрона [29]. Обширный спектр катионов – одновалентных, двухвалентных, трехвалентных замещений в структуре β -ТКФ, изучаются с целью их значения в биологических процессах. Это объясняется наличием 5 участков Ca^{2+} , показывающих широкий диапазон размеров и координационных сфер в ромбоэдрической кристаллической структуре. Недавние исследования [30] показали, что Gd^{3+} способен имитировать Ca^{2+} в цикле ремоделирования кости для лечения патологий плотности костной ткани и остеопороза.

2.2.1 Практическое использование гадолиния в биомедицине

В последние годы незначительные количества редкоземельных элементов, таких как гадолиний (Gd), самарий (Sm), лантан (La), европий (Eu) и церий (Ce) обнаружены в организме человека и играют жизненно важную роль в регуляции дифференцировки стволовых клеток, метаболизма и регенерации тканей [31]. Материалы на основе гадолиния применялись в онкотерапии, диагностике рака и в ортопедических имплантах [32]. Таким образом, добавление Gd в импланты на основе магния существенно улучшает механические свойства и коррозионную стойкость ортопедических имплантов [33].

Однако, гадолиний способен накапливаться в тканях человека (кости, почки, головной мозг). Его высокие концентрации вызывают побочные эффекты, во избежании их альтернативной стратегией является изготовление

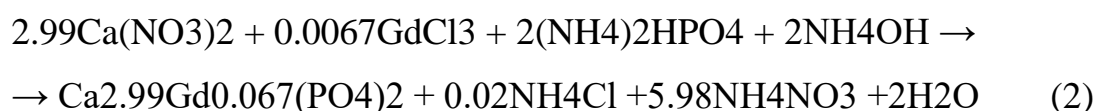
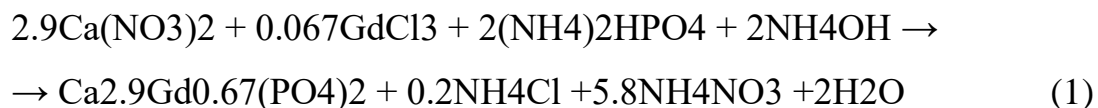
керамик на основе Gd или хелатов Gd. Также в последнее время наночастицы $GdPO_4$ вызывают особый интерес, вследствие хорошей биосовместимости. Также ионы PO_4 после биодegradации поддерживают образование апатита в процессе минерализации костей [34]. Показано, что химический элемент гадолиний обнаруживается в костных тканях и играет критическую роль в метаболизме костей [35]. Биокерамика на основе гадолиния была исследована для биомедицинских применений, таких как противораковая терапия, магнитно-резонансная томография и в качестве костных имплантов [36]. Наноточки Gd/Ru@BSA не только обладают отличной способностью МРТ с T_1 -взвешенным изображением, но также отличаются эффективностью фототермического преобразования для противопухоловой терапии. $Gd@C_{82}(OH)_{22}$ не токсичен для нормальных клеток и может эффективно ингибировать клетки рака молочной железы с помощью блокировки передачи сигналов TGF- β [37,38]. Доказано, что при применении материалов на основе гадолиния для магнитно-резонансной визуализации элемент Gd^{3+} откладывается в костных тканях, а часть ионов Ca^{2+} замещается ионами Gd^{3+} ввиду сходства ионных радиусов [39].

Введение гадолиния в магниевые сплавы значительно улучшает их механические свойства и устойчивость к деградации [40]. Впервые [41] обнаружили положительные остеогенные эффекты добавления Gd^{3+} и разработали каркасы Gd-MCS/CTS на основе Gd^{3+} для заживления костных дефектов. Однако, биоматериалы на основе гадолиния редко применяются для заживления костных дефектов, а их биосовместимость и остеогенная активность остаются до сих пор неизвестными.

2.2.2 Синтез трикальцийфосфата

Трикальцийфосфаты с содержанием гадолиния синтезировали методом осаждением из водных растворов солей [1]. Исходными компонентами для

синтезов осаждением из водных растворов солей служили нитрат кальция ХЧ (химически-чистый), гидрофосфат аммония ЧДА (чистый для анализа), хлорид гадолиния ХЧ, 25% водный раствор аммиака ЧДА. Взаимодействие реагентов происходило в соответствии с реакциями (1) и (2):



Сразу после проведения синтеза в барабаны с реагентами добавляли 200 мл воды и продолжали помол в течение 30 мин.

Осадок отфильтровывали на воронке Бюхнера и сушили в сушильном шкафу при 110°C в течение 12-15 часов.

Керамику из порошков гадолиний-замещенных ТКФ получали спеканием образцов, полученных одноосным двухсторонним прессованием при удельном давлении прессования 100 МПа. Процесс спекания проводили в камерной печи с силитовыми нагревателями в течение 2 часов при температуре 1100°C.

При изготовлении материалов медицинского назначения к исходным материалам предъявляются требования в отношении биологической совместимости исходных компонентов или продуктов (фаз) из них получаемых, химической чистоты и дисперсности [42].

2.3 Метод электронного парамагнитного резонанса

2.3.1 Стационарный и импульсный режим

Метод электронного парамагнитного резонанса выступает в качестве основного способа изучения парамагнитных частиц. Он применяется для систем с ненулевым суммарным электронным спиновым моментом. ЭПР

имеет в своей основе поглощение электромагнитного излучения радиодиапазона неспаренными электронами, которые локализируются в магнитном поле. Известно, что электрон в атоме принимает участие в орбитальном и спиновом движении, характеризующиеся соответствующими механическими и магнитными моментами.

Электронный парамагнитный резонанс - это метод изучения магнитных свойств и симметрии кристаллического поля редкоземельных соединений. Трудно наблюдать спектр ЭПР трехвалентных редкоземельных ионов при комнатной температуре из-за спин-орбитального взаимодействия и быстрого времени релаксации, однако, ион Gd^{3+} с электронной конфигурацией $4f^7$ ($^8S_{7/2}$), является единственным трехвалентным лантанидом, который можно наблюдать при комнатной температуре.

подавляющее большинство спектров ЭПР записываются в СВ (непрерывный режим) режиме, с использованием развертки по магнитному полю, которое создается электромагнитом, при постоянной частоте микроволнового излучения. В СВ эксперименте образец непрерывно облучается монохроматическим микроволновым излучением. Спектры с «развёрткой» поля, как правило, измеряются и представляются в виду производных. Этот метод приводит к увеличению отношения сигнал/шум. Непрерывный режим ограничивается спектральным и временным разрешением.

Важная информация, которую возможно извлечь из спектра СВ-ЭПР – это изотропное значение g (или, основное значение g -тензора) [43]. Для этого должно быть известно микроволновая частота и магнитное поле. Для описания СВ спектра спиновой системы, энергии спиновых состояний вычисляются с помощью спинового гамильтониана (СГ), который содержит сумму членов, описывающих различные взаимодействия в системе, важных в эксперименте. Положение линий в спектре определяется разностью энергий между спиновыми состояниями.

В системах со спином $S > \frac{1}{2}$ значимую роль играет расщепление в нулевом поле (ZFS). Данное взаимодействие определяется диполь-дипольной и спин-орбитальной связью, устраняет вырождение спиновых состояний и не зависит от напряженности магнитного поля. Тензор ZFS может быть записан с использованием осевых и ромбических параметров (D и E). Значение D связано с информацией о межспиновом взаимодействии. Соотношение $\left| \frac{E}{D} \right|$ определяет меру аксиальности тензора тонкой структуры (ТС). Чем больше E, тем сильнее неаксиальность распределения электронного спина. Природа такого расщепления связана с действием электрического кристаллического поля на спиновую систему через спин-орбитальное и магнитное диполь-дипольное взаимодействие между неспаренными электронами. Для иона гадолиния $L = 0$, значит ТС определяется только диполь-дипольной связью. ТС зависит от симметрии дефекта, от спина и от величины этих взаимодействий.

CW эксперименты представляют содержательную информацию о парамагнитных системах, также их плюсом является то, что получить такие спектры можно достаточно быстро. CW-ЭПР остаётся широко распространённой формой ЭПР-спектроскопии. Однако, основное ограничение – это сложность разрешения слабых связей, и, как следствие, уширение линий спектра. Такие слабые взаимодействия могут содержать чрезвычайно важную информацию, особенно для биологических систем.

Применение импульсных методик в ЭПР заметно прибавляет возможности предложенного спектроскопического метода. Использование микроволновых импульсов, можно выборочно манипулировать спином электрона и исследовать взаимодействие между электроном и его окружением. В данных экспериментах спины парамагнитных центров (ПЦ) в образце возбуждаются мощными, короткими микроволновыми импульсами (длина от 10-100 нс) и регистрируется отклик спинов, который поступает за импульсами. Отличительной чертой импульсного ЭПР является то, что метод

позволяет разрешать небольшие взаимодействия (дипольные связи, сверхтонкие связи), расщепления которых не разрешены в СВ-ЭПР. Также, эта технология позволяет распутывать перекрывающиеся сигналы, она может быть использована для измерения времён релаксации (спин-спиновая, спин-решеточная релаксации, время фазовой памяти). Стоит отметить, что благодаря целому ряду различных последовательностей импульсов, данный метод имеет широкий спектр применений.

Величина взаимодействия между электронным спином и ядерными спинами (СТВ) дает информацию о вероятности того, что электрон находится рядом с этим ядерным спином. Когда частоты ядерных переходов близки к 0 МГц, предпочтительными методами обнаружения сверхтонких взаимодействий являются спектроскопия ESEEM и корреляционная спектроскопия сверхтонких подуровней (HYSCORE). Последовательности импульсов для этих экспериментов включают только микроволновые импульсы.

2.3.2 Анализ электрон-ядерных взаимодействий

ESEEM (electron spin echo envelop modulation – модуляция огибающей электронного спинового эха) – спектроскопия, направленная на обнаружение ядерных взаимодействий в парамагнитных системах. Данный метод служит способом определения анизотропной сверхтонкой структуры по модуляции кривой затухания. Регистрируется интегральная интенсивность электронного спинового эха (ESE) в зависимости от временного интервала (τ) между двумя импульсами в фиксированном магнитном поле (B_0) [44].

В данной работе использовался трехимпульсный ESEEM, последовательность которого показана на Рисунке 3а.

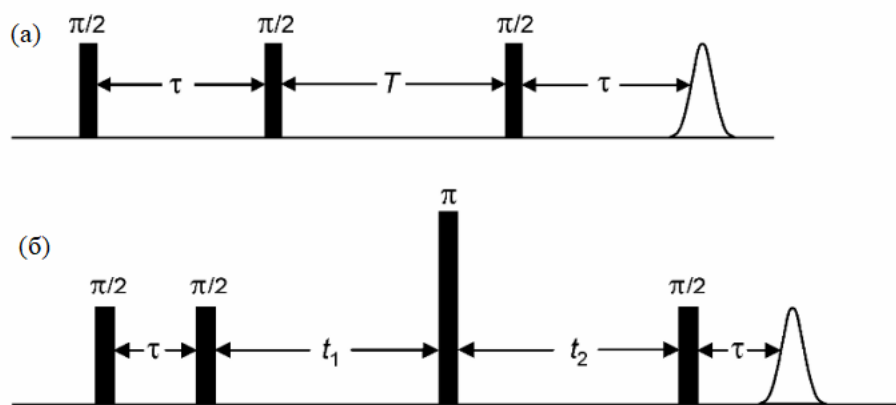


Рисунок 3 – а) Трехимпульсная последовательность ESSEM;
 б) четырехимпульсная последовательность HUSCORE [44]

Первые два $\pi/2$ – импульса создают ядерную когерентность, включающую ядерные частоты. В течении времени эволюции T ядерная когерентность накапливает фазу и затухает с временем поперечной релаксации T_2 . Третий $\pi/2$ – импульс переводит ядерную когерентность обратно в наблюдаемую электронную когерентность, и вызывает модуляцию интенсивности стимулированного эха ядерными частотами, что позволяет их измерить. То есть, модуляция возникает из-за того, что второй π -импульс не только инвертирует фазу электронной когерентности, но и перераспределяет эту когерентность между всеми разрешенными и запрещенными переходами.

Когерентность максимальна для близлежащих ядер, ядерный магнитный момент которых имеет большое магнитное диполь-дипольное взаимодействие с неспаренным электроном [44]. Преобразование Фурье модуляций дает частотный спектр, в котором видны частоты ядерно-спиновых переходов и далее можно интерпретировать СТ взаимодействия.

2.3.3 Двумерный эксперимент электрон-ядерных взаимодействий

Главной трудностью (препятствием) одномерной спектроскопии является скопление и перекрытие спектральных линий из-за взаимодействия

магнитно-неэквивалентных ядер со спином электрона, что существенно затрудняет интерпретацию спектров. Многомерные эксперименты служат способом преодоления данных трудностей [45].

HYSCORE (Hyperfine Sublevel CORrELation) усовершенствованная версия 2D эксперимента, которая базируется на четырехимпульсной последовательности (рис. 3б) предложенная Хёфером и др. [46]. Существуют четыре различных временных области: подготовка, эволюция (в течении времени t_1); смешивание и обнаружение (в течении времени t_2). Подготовка всегда состоит из последовательности из двух импульсов с интервалом между ними τ . Время эволюции (t_1) описывает ту же эволюцию в спин-пространстве, что и в стандартных последовательностях стимулированного эхо-сигнала. Импульс смешивания коррелирует различные переходы подуровня, принадлежащие одному и тому же электронному спину. Период t_2 завершается $\pi/2$ -импульсом, который создает стимулированное эхо, амплитуда которого зависит как и от t_1 , так и от t_2 . Стимулированное эхо записывается для различных значений t_1 и t_2 , в результате чего получается двумерный набор данных [46]. В настоящее время эксперимент HYSCORE – это стандартная двумерная последовательность, применяемая в импульсном ЭПР.

Эксперимент HYSCORE – это двумерный аналог спектроскопии ESEEM. Интенсивность стимулированного эха, инвертированного π -импульсом, измеряется как функция времени t_1 , t_2 , при постоянном τ . Спектры HYSCORE чувствительны к относительным знакам коррелированных частот и обычно представлены двумя квадрантами (++) и (+-) двумерного преобразования Фурье.

После двойного Фурье преобразования получается спектр, аналогичный двумерному ЯМР (ядерный магнитный резонанс), в котором ядерные частоты, происходящие от одного и того же ядра, могут быть сопоставлены вместе. Такой набор огибающих эха дает после комплексного Фурье преобразования

двумерный спектр с одинаковым разрешением в измерениях, определяемых временем продольной релаксации (T_1).

2.3.4 Динамические характеристики. Времена релаксации

Процессы релаксации поддерживают постоянной разность заселенностей энергетических уровней. Механизм: передача электромагнитной энергии кванта решетки или окружающим электронам, и далее происходит возврат электрона на низкоэнергетический уровень. Время, на протяжении которого электрон остается на высоком уровне энергии называется временем релаксации [47].

Время продольной релаксации T_1 характеризует процессы, которые возвращают вектор намагниченности в состояние равновесия. Время T_1 ограничивает максимально возможную длину импульсных последовательностей, и оно определяет минимально возможное время повторений экспериментов (обычно 1 – 100 мс). Прежде чем может начаться новая импульсная последовательность, вращения в образце должны быть восстановлены до теплового равновесия, с целью исключения эффектов насыщения. Таким образом, время повторений больше, чем самая медленная постоянная времени релаксации в спиновой системе ($t_R > 5T_1$) [48].

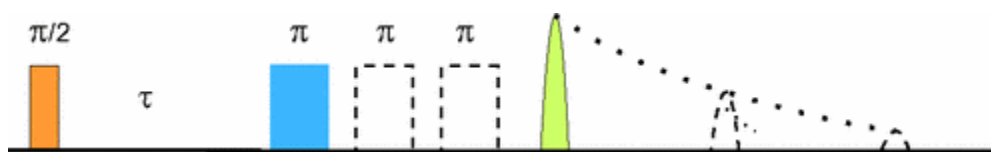


Рисунок 4 – Последовательность первичных эхо-импульсов Хана. Затухание эхо-сигнала измеряется увеличением времени τ между $\pi/2$ и π -импульсом [7]

Время поперечной релаксации T_2 описывает потерю когерентности в поперечной плоскости (x, y) ввиду спин-спиновых взаимодействий. В действительности, это скорость взаимного переворотов спинов электронов

совершаемого оператором взаимодействия со спиновым флип-флоп оператором. Намагниченность, потерянная в результате релаксации не может быть восстановлена. Это приводит к экспоненциальному затуханию эха в зависимости от τ : $\exp\left(-\left(\frac{2\tau}{T_m}\right)^d\right)$. T_m – время фазовой памяти, всегда короче, чем T_2), оно охватывает все процессы, которые нарушают согласованность (фазовую когерентность) намагниченность электрона. Охватываемые процессы: время поперечной релаксации; диффузия ядерного спина; вибрационное движение парамагнитных частиц. Время спиновой диффузии учитывает влияние всех нерезонансных процессов, которые передают намагниченность от одного парамагнитного иона к другому, в итоге создается эффект дополнительного релаксационного механизма [48]. Разные процессы, влияющие на спиновую диффузию – это движение анизотропного парамагнитного центра; обменное взаимодействие между двумя парамагнитными ионами; перекрёстная релаксация между электронным и ядерным спином; флип-флоп перевороты ядерного спина. Таким образом, скорость диффузии ядерного спина – это скорость взаимного флип-флоп процесса ядерного спина, обусловленного взаимодействием между двумя ядерными спинами [48]. Это важно, когда магнитно-разбавленные электронные спины магнитно-концентрированными ядерными спинами. Обмен намагниченностью между электронным и ядерным спином происходит за счет дипольной связи между ними. Кроме того, диффузию ядерного спина называют пространственной диффузией, поскольку взаимные перевороты ядерного спина переносят намагниченность через образец [44].

2.3.6 Параметры оптимальной настройки экспериментов

Спектры ЭПР в CW режиме регистрировались при различных температурах (от 25 К – 297 К) в X-диапазоне ($\nu = 9.6$ ГГц) на спектрометре фирмы Bruker серии Eleksys E580 и Bruker ESP-300. Амплитуда модуляции,

постоянное время ФНЧ и мощность излучения были установлены таким образом, чтобы избежать перемодуляцию, искажение или насыщение сигнала ЭПР, соответственно (амплитуда модуляции $M = 0.1$ Гс, мощность микроволнового излучения $P = 2$ мкВт).

Спектры ЭПР в импульсном режиме были получены также на частоте 9.6 ГГц (X-диапазон) на спектрометре фирмы Bruker серии EleksysE580 при температуре 25 К. Длительность СВЧ $\pi/2$ импульса в импульсных последовательностях составляла 16 нс. Для измерения спектров ЭПР использовалась методика детектирования интегральной интенсивности электронного спинового эха при развёртке магнитного поля B_0 . Для измерения релаксационных процессов применялась последовательность Хана с изменением времени между первым и вторым импульсом от 180 нс до 4276 нс.

Для измерений электрон-ядерных взаимодействий, регистрация спектров проводилась с использованием последовательности HUSCORE, с изменением обеих расстояний (τ и T) от 180 нс до 1204 нс. Для данного эксперимента температура была понижена до 12 К, при которой $T_1 = 160 \pm 8$ мкс достаточно для последовательности HUSCORE. Измерения были проведены при двух значений индукции магнитного поля $B_0 = 344.3$ мТл и $B_0 = 118.2$ мТл.

2.4 Инвертированный микроскоп

Инвертированный микроскоп является одним из самых часто встречающихся аналитических приборов. Его используют в большинстве случаев для исследования толстых образцов, находящиеся на дне наблюдательных сосудов. Например, для изучения живых клеток, тканевых культур в данном микроскопе применяется фазовый контраст, флуоресценция или специальный метод многомерных изображений. Инвертированный микроскоп используется в медицине для различных сфер: вирусология,

иммунология, биотехнология, фармакология, бактериология и т. д. Также этот прибор довольно активно используется в инженерно-технической сфере, для трехмерного анализа металлов, для контроля качества или для анализа микроструктуры поверхностей металлов [49].

Принцип действия инвертированного микроскопа заключается в том, что в отличие от стандартного прямого микроскопа, окуляр и объектив находятся под прозрачным столиком, а исследуемый образец располагается сверху, то есть объект кладется лицом вниз над объективом.

К отличительным особенностям такого микроскопа относятся:

- Обратное расположение оптики;
- Способность исследовать более толстые полупрозрачные образцы;
- Относительно большой предметный стол;
- Небольшое относительное увеличение со стандартным прямым микроскопом.

Жизнеспособность клеток оценивали путем дифференциального флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток. Эксперимент проводился с использованием флуоресцентных красителей SYTO 9, йодистого пропидия и Hoechst 33342. Микротомографии получали с использованием инвертированного микроскопа Axiovert 200 (Zeiss Oberkochen, Германия). Флуоресцентный краситель SYTO в режимах исследования $\lambda_{\text{exc}} = 450 - 490$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 515 - 565$ нм окрашивал ДНК и РНК живых и мертвых клеток в зеленый цвет. Интеркалирующий реагент йодид пропидия (PI) в режимах $\lambda_{\text{exc}} = 456$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 575 - 640$ нм – в красный цвет ядра погибших клеток. Флуоресцентный краситель Hoechst 33342 в режимах $\lambda_{\text{exc}} = 355$ нм и $\lambda_{\text{em}} = 460$ нм – ДНК живых и мертвых клеток в синий цвет.

ГЛАВА 3 ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

3.1 Спектроскопия ЭПР в стационарном режиме

3.1.1 Спектроскопия ЭПР в X-диапазоне

На рисунке 5 приведены спектры ЭПР образца ТКФ-Gd с разными концентрациями гадолиния, зарегистрированные при комнатной температуре ($T = 297$ К). Сигналы ЭПР состоят из асимметричной широкой линии со слабо разрешённой структурой, в которой можно выделить резонансные поглощения, сосредоточенные в магнитных полях, соответствующие эффективному g -фактору $g = 2.8$, и дополнительных неразрешенных низкополевых линий в области $g = 5.9$. Основная составляющая спектра ЭПР сосредоточена на $g = 2.0$, что относится к ионам, обладающим преимущественно спиновым парамагнетизмом.

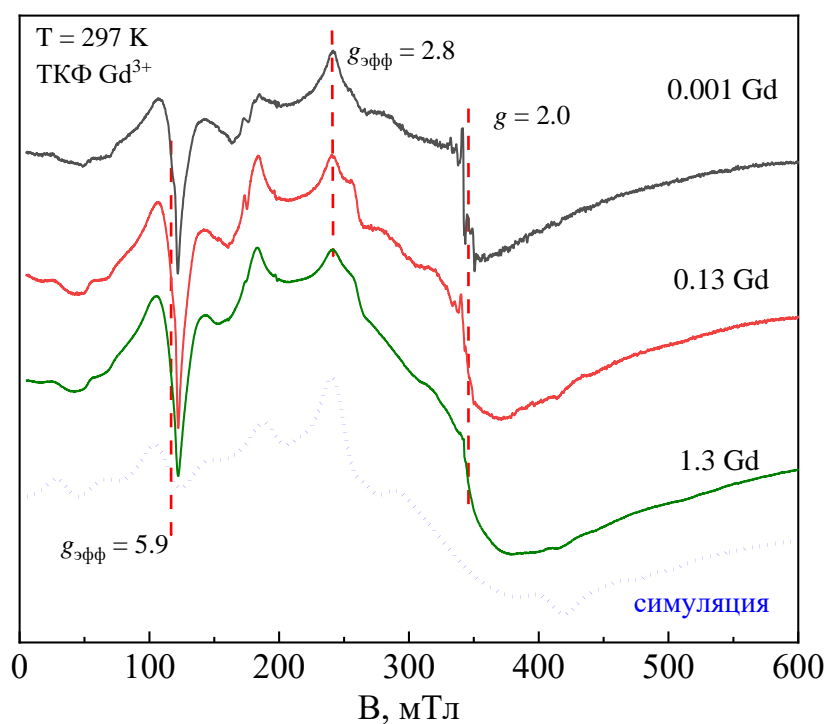


Рисунок 5 – Концентрационная зависимость спектров стационарного ЭПР в X-диапазоне ТКФ-Gd при комнатной температуре

Редкоземельный ион гадолиния Gd^{3+} с $4f_7$ - конфигурацией в основном $^8S_{7/2}$ состоянии является парамагнитным, и обладает электронным спином $S = 7/2$ с нулевым орбитальным моментом $L = 0$. Для данной спиновой системы спектр должен содержать $2*S = 7$ разных переходов, которые дают 7 линий в спектре ЭПР с центром тяжести спектра при $g \approx 2.0$, т.к. орбитальный магнитный момент отсутствует. β -ТКФ кристаллизуется в ромбоэдрической пространственной группе $R\bar{3}c$. Вследствие низкой симметрии образуется градиент внутреннего кристаллического (электрического) поля, что приводит к возникновению «нулевого» расщепления спиновых подуровней. В результате в спектре мы наблюдаем линии тонкой структуры (ТС).

Спиновый гамильтониан иона Gd^{3+} [50]:

$$H = H_{ez} + H_{FS} = \mu_{\beta} \mathbf{H} g \mathbf{S} + \sum_{k,q} B_k^q O_k^q, \quad (3)$$

$$k, q = 2, 4, 6 \text{ и } k \geq q = \mu_{\beta} \mathbf{H} g \mathbf{S} + \frac{1}{3} (b_2^0 O_2^0 + b_2^2 O_2^2) + \frac{1}{60} (b_4^0 O_4^0 + b_4^2 O_4^2 + b_4^4 O_4^4) + \frac{1}{1260} (b_6^0 O_6^0 + b_6^2 O_6^2 + b_6^4 O_6^4 + b_6^6 O_6^6),$$

$$\text{где } b_2^q = 3B_2^q, b_4^q = 60B_4^q, b_6^q = 1260B_6^q, D = b_2^q, E = (b_2^2/3).$$

Спиновый гамильтониан иона Gd^{3+} [47]:

$$H = g_0 \beta B S + D \left[S_z^2 - \frac{1}{3} S(S+1) + E(S_x^2 - S_y^2) \right], \quad (4)$$

где g – g -фактор, D и E – параметры расщепления нулевого поля.

Исследуемый образец ТКФ-Gd находится в форме мелкодисперсного порошка, следовательно, в спектре ЭПР присутствуют все равновероятные ориентации нанокристаллов относительно внешнего магнитного поля B_0 . Энергия начального расщепления зависит от взаимного расположения главной оси нанокристалла c с силовыми линиями вектора магнитной индукции внешнего поля B_0 . Таким образом, компоненты ТС обладают угловой зависимостью, что вызывает взаимное наложение и уширение имеющихся резонансных поглощений.

На рисунке 5 предоставлен сравнительный анализ формы линии спектров ЭПР для разных концентраций ионов гадолиния в образце ТКФ.

Кристаллическая решетка беспримесного трикальцийфосфата не содержит ионов с ненулевым электронным спином, соответственно, материал является парамагнитно чистым. Из этого следует, что наблюдаемые линии поглощения на рисунке 5 и 6 относятся к примесному центру Gd^{3+} .

По характерным низкополевым сигналам ЭПР с эффективными g -факторами ($g_{эфф} = 5.9$, $g_{эфф} = 2.8$ и $g = 2$) можно сделать однозначные выводы, что, во-первых, ион гадолиния имеет валентность $3+$, во-вторых, встроен в кристаллическую решетку ТКФ в одну из позиций кальция Ca^{2+} . Стоит отметить, что наблюдения двухвалентного гадолиния невозможно, т.к. для Gd^{2+} с электронным спин $S = 3$ и орбитальным моментом $L = 3$, вследствие сильного спин-орбитального взаимодействия в присутствии кристаллического поля образуется штарковское расщепление между орбитальными подуровнями. Известно, что подобное расщепление Штарка приводит к тому, что величины кванта электромагнитного излучения (9.5 ГГц и 94 ГГц) недостаточно для переноса парамагнитных центров из основного состояния в возбуждённое.

Наличие широких линий ЭПР (от 0 до 800 мТл) связано с тем, что благодаря высокоспиновому состоянию парамагнитного центра и влиянию кристаллического поля решетки ТКФ на примесный ион, возникает так называемая ТС. Действие градиентов электрического поля ионов на примесный парамагнитный центр приводит к образованию нулевого расщепления. Подобная картина возможна, только если Gd^{3+} встроен в структуру ТКФ. Параметры ТС обладают сильной ориентационной зависимостью нанокристалла относительно внешнего магнитного поля B_0 . Благодаря тому, что образец находится в порошкообразном виде, спектр ЭПР содержит резонансные вклады от всех равновероятных положений нанокристалла, что приводит к неоднородному уширению каждой линии ТС.

Образование низкополевых сингулярностей, несмотря на порошковую фазу образца и высокий спин $S = 7/2$ примесного центра, возникает из-за

особенностей поведения уровней линии в зависимости от ориентации порошинок и величины внешнего магнитного поля. В данной работе величины тонкой структуры приблизительно соизмеримы с зеемановской энергией. Данный факт приводит к тому, что спиновые подуровни является запутанными, т.е. представляют из себя суперпозицию двух или более соседних уровней. Для подобных систем характерна ситуация, при которой низкополевые линии поглощения ЭПР слабо, или практически не зависят от ориентации нанокристаллов, что приводит к взаимному наложению и увеличению интенсивности сигнала и выделению его на поле широкой порошковой структуры. Подобная картина с наблюдением низкополевых сверхтонких структур была продемонстрирована аналогично для материала ТКФ, за исключением с внедрённым примесным центром марганца Mn^{2+} . Известны многократные случаи наблюдения сигнала от трехвалентного железа Fe^{3+} в области $g = 4.27$ по схожей причине. При этом могут возникнуть дискуссионные моменты, относительно природы низкополевых структур, возникающих из-за запрещенных спиновых переходов $\Delta M_S = \pm 1, \pm 2$, с нарушением правил отбора $\Delta M_S = 0$. Наблюдение запрещенных переходов в спектрах ЭПР является достаточно нередкое. Однако, вероятность у таких переходов с $\Delta M_S = \pm 1, \pm 2$ и крайне мала (меньше в 10-100 раз от основных спиновых переходов), что представляется невозможным для явного наблюдения в порошковых спектрах ЭПР.

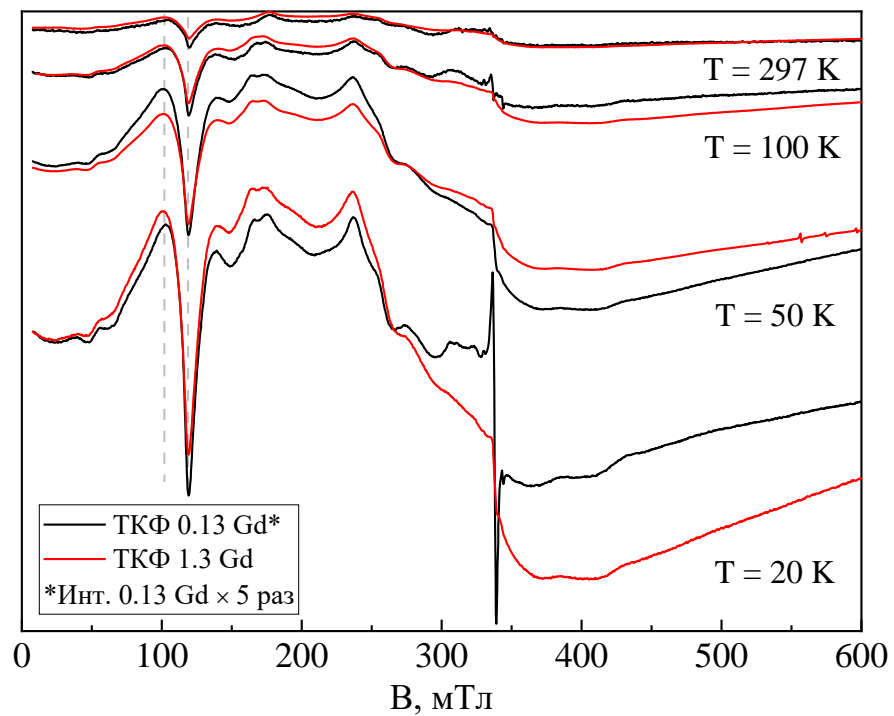


Рисунок 6 – Температурная зависимость спектров стационарного ЭПР в X-диапазоне ТКФ-Gd

Для дополнительного исследования при стационарном режиме была проведена регистрация спектров ЭПР в зависимости от температуры материала (рис. 6). Ион гадолиния обладает сильным спин-решеточным взаимодействием из-за наличия неспаренных электронов на 4f оболочке, что приводит к однородному уширению, из-за чрезвычайно коротких времен продольной релаксации ($T_1 \sim 1/T^n(K)$, где n – степень, зависящий от механизмов релаксации). Исследование интегральной интенсивности спектров поглощения показало, что данная величина интегральной интенсивности растет пропорционально с понижением температуры образца в резонаторе. Подобная зависимость вызвана температурной поляризацией, при котором парамагнитные центры стремятся занять основное невозбужденное состояние. Вследствие поляризации растет разность населенности между спиновыми подуровнями и к соответствующему росту интенсивности поглощения. Для образцов ТКФ-Gd выполняется закон Кюри для парамагнетиков. Стоит отметить, что в спектрах отсутствуют линии,

интенсивность которых зависит от температуры нелинейно с определенным экстремумом, что свойственно для обменно-связанных пар Gd-Gd с энергией обменного взаимодействия ионов, которые не вошли в структуру ТКФ и образовали кластерные соединения. Для подобных также свойственна зависимость интенсивности спектров ЭПР как квадрат от концентрации, что не наблюдается на рисунке 6. Отсутствие таких комплексов Gd-Gd означает о безопасности гадолиния для организма, поскольку находится исключительно в структуре материала. При низких температурах (20 К) возникает одиночная узкая линия на $g = 2.00$, что возможно отнести к дефектному центру вакансионного типа. Отсутствие данного центра при более высоких температурах вызвана короткими временами релаксации, которое через магнитно-дипольную связь приводят к укорочению времени поперечной релаксации дефекта и последующему уширению линий. С увеличением концентрации данная линия на $g = 2.00$ исчезает, что указывает на большее взаимодействие между дефектом и гадолинием.

3.1.2 Моделирование спектров поглощения

Моделирование спектра ЭПР проводилось в среде программирования MatLab, с использованием пакета EasySpin. Спиновый гамильтониан примесного центра гадолиния описывается следующим набором параметров:

$$H = g\beta BS + B_2^0 O_2^0 + B_2^2 O_2^2 + B_4^0 O_4^0 + B_6^0 O_6^0, \quad (5)$$

где g – фактор спектроскопического расщепления, β – магнетон Бора, $S = 7/2$ – электронный спин, B_{kq} – параметры кристаллического поля, O_{kq} – операторы Стивенсона.

Параметры кристаллического поля (ТС) для описания спектров ЭПР, полученных в стационарном режиме:

Таблица 1 – Параметры ТС ТКФ-Gd

	B_2^0	B_2^2	B_4^0	B_6^0
Ca(x)	1.9 ГГц	-	15.2 МГц	0.69 МГц
Ca(4)	530 МГц	50 МГц	-	-

Для того, чтобы описать спектр ЭПР полученные в стационарном режиме, мы предположили, что в кристаллической структуре ТКФ присутствует гадолиний Gd^{3+} и используем соответствующий спиновый гамильтониан (5) и симулирования в режиме порошкового усреднения. Удовлетворительную аппроксимацию удалось получить с использованием двух вкладов с разным набором параметров, что говорит о наличии двух разных позиций ионов Gd в структуре ТКФ. Для одной позиции получился набор параметров, относящийся к аксиальной симметрии – Ca (4) (табл. 1). Ca (x) – более низкая симметрия, так как описывается более высоким порядком параметров кристаллического поля спинового гамильтониана.

3.1.3 Высокочастотная ЭПР спектроскопия

Для улучшения чувствительности по абсолютной концентрации и повышения спектрального разрешения образцы ТКФ-Gd были исследованы в высокочастотном диапазоне (W-диапазон, $\nu = 94$ ГГц) спектрометра Bruker Eleksys E680. Использование высокочастотного ЭПР ($B_0 = 3.4$ Тл) увеличивает зеемановское расщепление в 10 раз по сравнению с экспериментом, проведённым в X-диапазоне. Указанный факт позволяет разделить разные вклады в спектр ЭПР от различных примесных центров с близкими g-факторами, что при низких частотах приводит к неоднородному уширению линий. Полученные спектры ЭПР показаны на рисунке 7, которые были описаны с помощью двух различных вкладов, что говорит о присутствии

двух разных центров с отличающимися параметрами спинового гамильтониана.

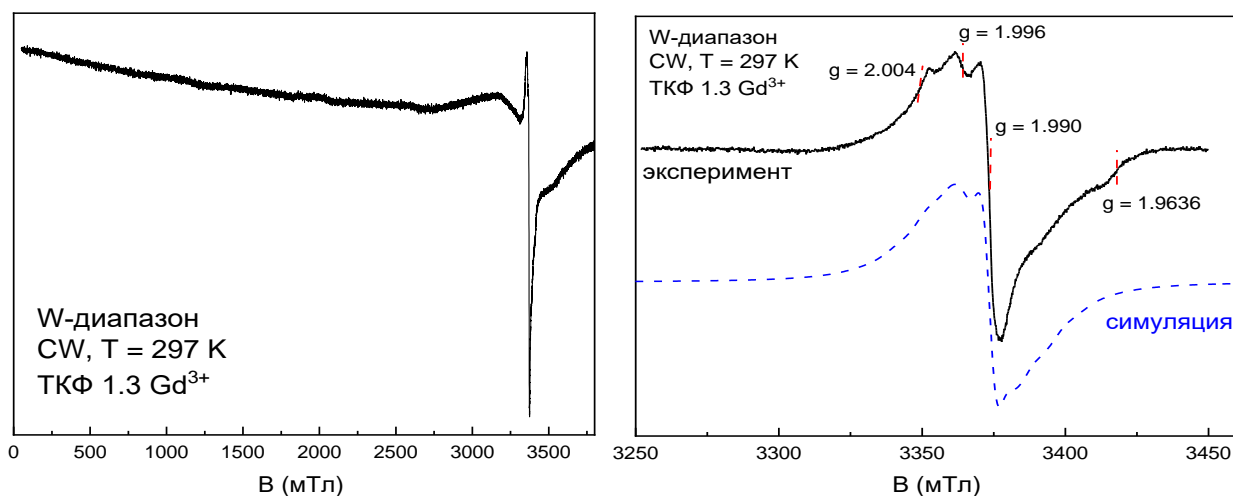


Рисунок 7 – Спектр стационарного ЭПР в W-диапазоне ТКФ-Gd при комнатной температуре. Слева – полная развертка. Справа – центральная часть спектра

Полученный спектр (рис. 7) был также описан в среде программирования MatLab (EasySpin), с использованием соответствующего СГ (4). Аналогично спектр просимулирован двумя наборами параметров тонкой структуры, что подтверждает наличие двух центров. Для первого набора параметров $D = 170$ МГц $E = 5$ МГц, для второго $D = 150$ МГц $E = 50$ МГц.

Высокочастотный диапазон, благодаря тому, что зеемановское расщепление многократно превышает энергию тонкой структуры, позволят наблюдать линии поглощения от переходов между чистыми спиновыми подуровнями. Каждая компоненты тонкой структуры Gd³⁺ при чистых волновых функция симметрично относительно $g = 2.00$ зависят от ориентации в магнитном поле как $(3\cos^2\theta - 1)$. Следовательно, в спектрах ЭПР будут отсутствовать низкополевой сингулярности, как это было пронаблюдало в X-диапазоне. Спектры ЭПР на рисунке 7 были описаны приблизительно тем же

набором параметров спинового гамильтониана, что для X-диапазона, что справедливо для описания двух неэквивалентных центров. Отсутствие появления новых переходов указывает на то, что ионов гадолиния нет в двухвалентной конфигурации Gd^{2+} с сильным нулевым расщеплением (штарковским) порядка нескольких десятков ГГц.

3.2 Спектры ЭПР, полученные в импульсном режиме с использованием последовательности Хана

Импульсная спектроскопия благодаря тому, что различные парамагнитные центры обладают собственными динамическими характеристиками, позволяет подбирать оптимальные настройки регистрации спектров ЭПР, выделяя или подавляя по интенсивности сигнал от требуемого иона. В данной работе, спектр ЭПР был записан с помощью двухимпульсной последовательности Хана с различными временами τ между 90 и 180 градусными импульсами с целью определения наличия других разных вкладов. На рисунке 8, спектр ЭПР при минимальном времени между $\pi/2$ и π импульсами $\tau = 0.18$ мкс показан черной линией и соответствует спектру порошкового образца без явно выделенных отдельных линий. Измерения распада поперечной намагниченности выявили два экспоненциальных кривых/процесса с характерными временами $T_2 = 0.19 \pm 0.01$ мкс и 1.0 ± 0.05 мкс. Для проверки присутствия двух процессов разной природы был записан спектр ЭПР при большем времени между $\pi/2$ и π импульсами $\tau = 0.54$ мкс. В случае существования двух типов центров с разными временами релаксации, при увеличении времени τ будет наблюдаться сильное уменьшение компоненты спектра с коротким временем релаксации на фоне компоненты спектра с более длинным временем. Это приведет к трансформации формы спектра ЭПР (перераспределение интенсивностей), что можно увидеть на рисунке 8, как разницу между черной и красной линиями.

Простейшая математическая обработка позволяет разделить спектр на две компоненты с быстрой $T_2 = 0.19 \pm 0.01$ мкс и медленной $T_2 = 1.0 \pm 0.05$ мкс.

Интенсивность каждой из таких линий будет пропорциональна квадрату матричного элемента $S_x = \sqrt{S(S+1) - M_s(1)M_s(2)}$, т.е. максимальна для перехода $-1/2 \leftrightarrow 1/2$ и минимальна для $\pm 7/2 \leftrightarrow \pm 5/2$, что дает возможность сопоставить переходы линиям исходя из их интенсивностей, даже когда спектр усредняется различными ориентациями порошинок в исследуемом образце.

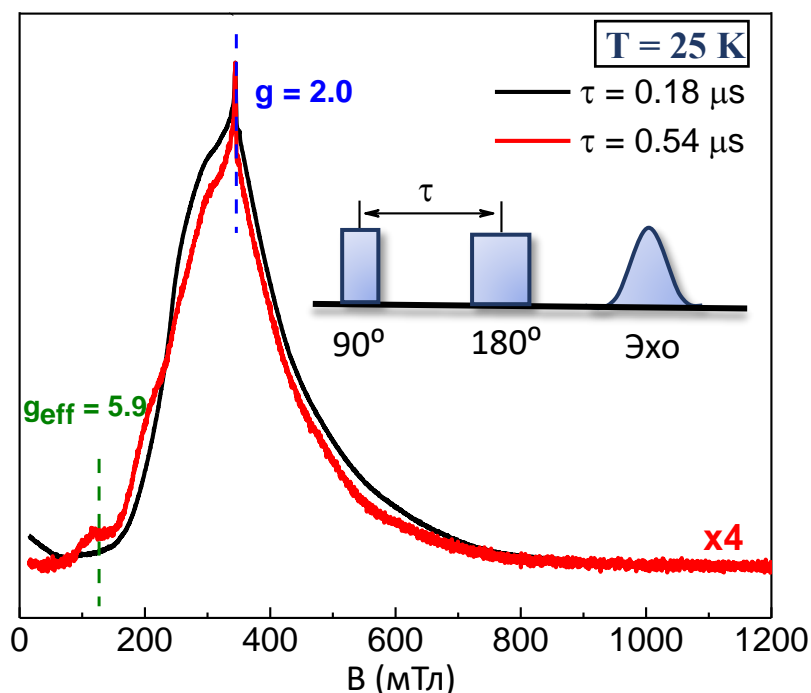


Рисунок 8 – Спектры ЭПР образца ТКФ с 0.001% Gd в импульсном режиме при $T = 25$ К для двух разных значений τ , указанных на рисунке

Известно, ширина линии спектров ЭПР иона гадолиния уширяется с понижением температуры. Данное явление связано со спин-спиновым взаимодействием между ионами Gd-Gd, которое с понижением температуры увеличивает данное взаимодействие и приводит к уширению линий [19-21].

При температуре 25 К была измерена скорость спин-решеточной релаксации для обоих центров, при значении магнитного поля $B_0 = 344.3$ мТл

в которой дают вклады оба типа центра и $B_0 = 118.2$ мТл где присутствует вклад только центра №2. Время скорость спин-решеточной релаксации Gd^{3+} для обоих центров оказалось достаточно короткое $T_1 = 30 \pm 2$ мкс, что соответствует релаксации гадолиния в других кристаллах [51].

Таблица 2 - Времена релаксации полученные при $T = 12$ К

	T_1 (мкс)	T_2 (мкс)
$B_0 = 344$ мТл	157 ± 3	0.2 ± 0.01
$B_0 = 118$ мТл	173 ± 5	1 ± 0.05

По анализу динамических характеристик, приведенных в таблице 2 было установлено наличие двух разных парамагнитных центров. Подобный результат свидетельствует о том, что ион Gd при малых концентрациях занимает как минимум две структурно неэквивалентные позиции Ca. Отличие во временах релаксации для каждого типа центра связано с разным локальным окружением, что отражается на продольную релаксацию, а также различное межатомное расстояние между гадолиниями, приводя изменению времени поперечной (спин-спиновой) релаксации.

3.2.1 Результаты анализа электрон-ядерных взаимодействий

Модуляция ESEEM (гармонические колебания на кривой спада поперечной намагниченности) возникает, когда примесный центр Gd^{3+} связан с окружающим ядром через анизотропное диполь-дипольное взаимодействие. Используемая трехимпульсная эхо-последовательность (рис. 3А), где второй 90° -импульс перемещает часть намагниченности на ось z , при этом она уже затухает только за счет относительно более длинной спин-решеточной релаксации, позволяет регистрировать большее количество колебаний и соответственно увеличивается разрешающая спектральная способность. Когда

эта намагниченность возвращается в поперечную плоскость третьим 90° импульсом, возникает «стимулированное эхо» и оно будет иметь высоту пика больше, чем двухимпульсное эхо Хана при одинаковом τ . Высота эхо-сигнала в системах, где спин электрона связан с магнитным ядром посредством сверхтонкой дипольной связи, вызывает периодическую модуляцию. Анализ частот этих модуляций помогает при идентификации ядер вблизи неспаренного электрона, а также в оценке расстояния между ядром и неспаренным электроном (^{31}P и Gd^{3+}). Величина вышеупомянутого взаимодействия связана с расстоянием через анизотропное диполь-дипольное приближение и выражается формулой:

$$A_{d-d} \sim \frac{g_n g_e \mu_N \mu_e}{r^3}, \quad (6)$$

где $g_n = 2.2632$ ядерный g-фактор фосфора ^{31}P , $g_e = 2.004$ – g-фактор электрона.

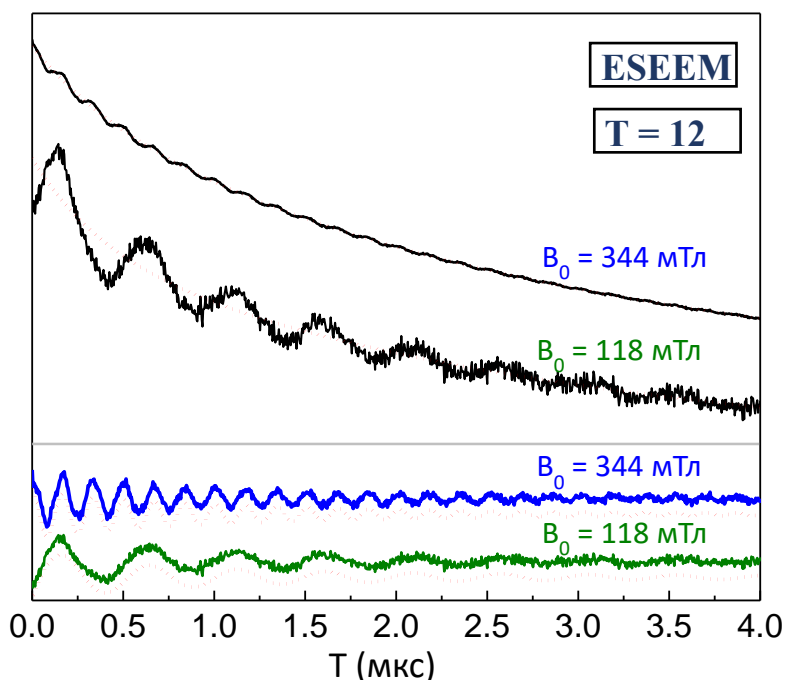


Рисунок 9 – Кривые спада поперечной намагниченности (экспериментальные и расчетные) с наличием ядерной модуляции для двух разных значений магнитных полей до (сверху) и после (снизу) вычитания моноэкспоненциальной составляющей

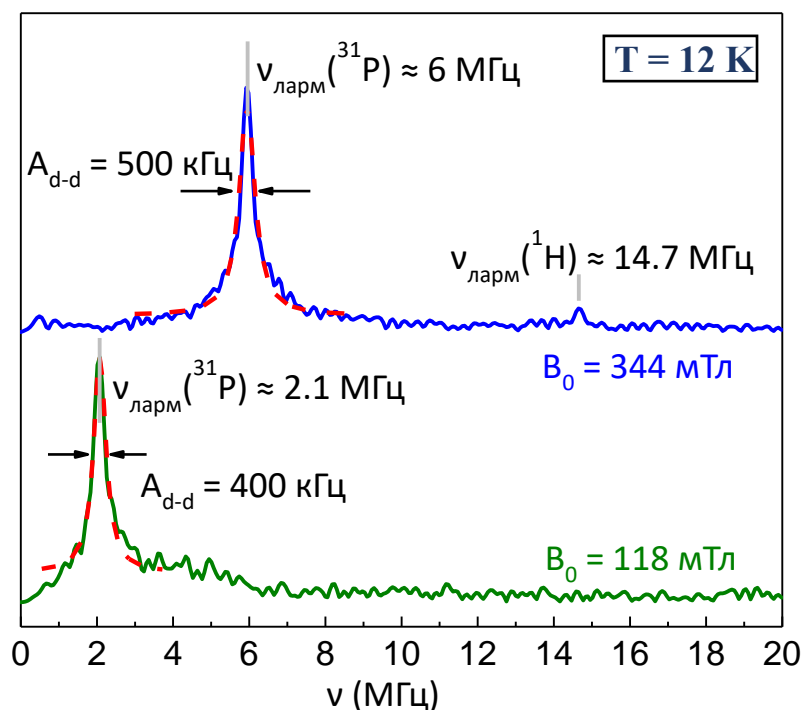


Рисунок 10 - Спектры ядерных переходов в частотном диапазоне при разных значениях B_0

Наличие магнитных ядер в образцах ФК часто приводит к появлению модуляций на кривых затухания поперечной намагниченности. Тип данных модуляции (их частота и величина) зависит от образца и парамагнитного зонда. Такие экспериментальные данные представлены на рисунке 9. Наблюдение модуляций в большинстве случаев сразу указывает на наличие эффекта ESEEM. Этот эффект вызван соседними ядрами, информация о которых может быть получена из преобразования Фурье, связывающий временную характеристику спиновой системы с ее частотным спектром.

Форма модуляции зависит от межатомных расстояний, величины магнитных моментов и степени смещения спиновых волновых функций, что влияет на вероятность запрещенных переходов. Наиболее информативные результаты спектроскопии ESEEM в частотном диапазоне после соответствующей обработки сигнала показаны на рисунке 10. На спектрах наблюдается сигнал ^{31}P , центрированный на частоте Лармора для поля $B_0 = 344$ мТл частота $\nu_{\text{Ларм}}(^{31}\text{P}) = 6$ МГц, а для $B_0 = 118$ мТл, соответственно,

$\nu_{\text{Ларм}}(^{31}\text{P}) = 2.1$ МГц. Однако эта информация уже указывает на то, что парамагнитный центр расположен в структуре образца и может быть успешно использован в качестве спиновой метки в дальнейших исследованиях.

Как мы видим на рисунке 10, внешний вид спектра зависит от величины магнитного поля. Это означает, что спектр ЭПР состоит по меньшей мере из двух различных типов парамагнитных центров, которые, согласно результатам ESEEM, имеют явно различное окружение ядер. В случае, когда $B_0 = 118$ мТл, мы наблюдаем ядра фосфора в ближнем локальном окружении ионов Gd. Изменение значения фиксированного магнитного поля на $B_0 = 344$ мТл привело к тому, что теперь мы обнаружили примесные центры Gd^{3+} в другом положении кристаллической структуры. Таким образом, мы выявили наличие двух структурно неэквивалентных положений Gd^{3+} в кристаллической решетке ТКФ. Благодаря наличию сигнала также, мы предполагаем, что ионы Gd^{3+} были непосредственно введены в кристаллическую структуру образца.

Ширина линии фосфора обусловлена неразрешенной сверхтонкой структурой между гадолинием и фосфором, поэтому не наблюдаем расщепления. По ширине линии на полувысоте было рассчитано расстояние от Gd до P в диполь-дипольном приближении по формуле 6. Результаты представлены в таблице 3.

Таблица 3 - Рассчитанное расстояние между кальцием и фосфором

	$r_{\text{эксп}} (\text{Å})$	$r_{\text{теор}} (\text{Å})$
$B_0 = 344$ мТл	4	4.059
$B_0 = 118$ мТл	4.3	

3.2.2 Анализ двумерного эксперимента

Преобразование последовательности ESEEM приводит к 2D эксперименту – HYSORE. Схема показана на рисунке 3б. Все 2D эксперименты в магнитном резонансе включают 4 периода времени, а именно подготовку (1 импульс или комбинация импульсов для генерации определенной поперечной когерентности), 1-ая эволюция (когерентность развивается в течении периода t_1), период смешивание (π -импульс), 2-ая эволюция (t_2) и обнаружение/детектирование [52]. Спектры ЭПР с использованием последовательности HYSORE (рис. 1б) были проведены при двух значениях индукции магнитного поля $B_0 = 344.3$ мТл и $B_0 = 118.2$ мТл, которые позволяют наблюдать суммарный спектр HYSORE (рис. 11) и спектр только от второго центра (рис. 12).

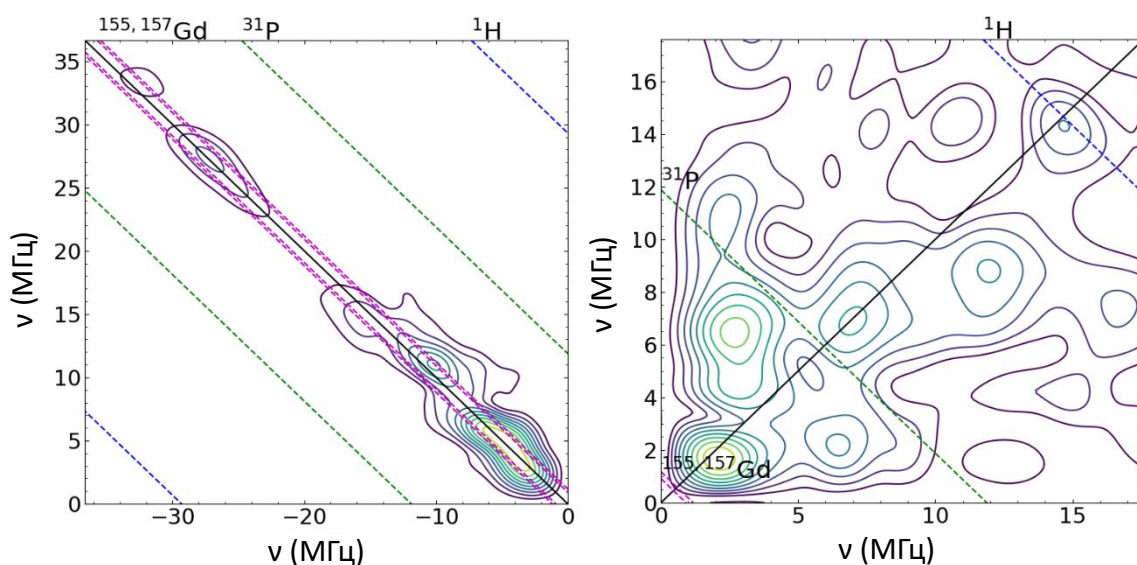


Рисунок 11 - Суммарный спектр HYSORE $B_0 = 344.3$ мТл (справа - слабая СТВ, слева - сильная СТВ). Пунктирными линиями показаны области ожидаемых взаимодействий с ядрами ^1H , ^{31}P и изотопами ^{155}Gd и ^{157}Gd

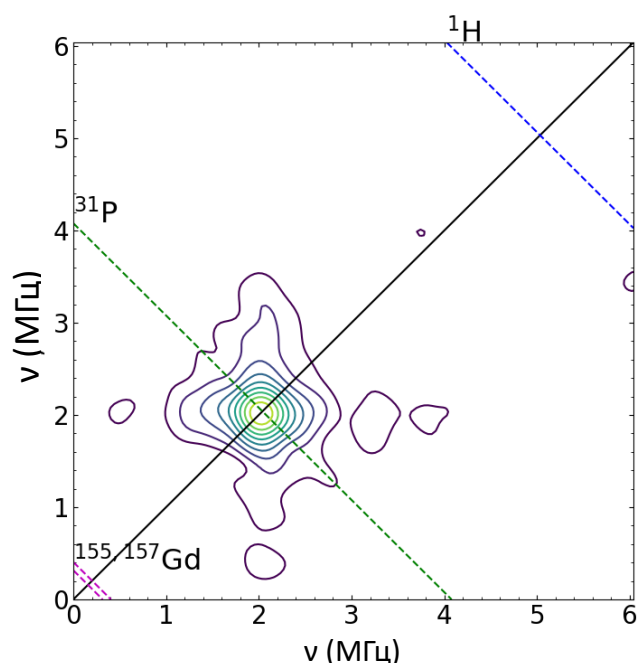


Рисунок 12 - Спектр HYSCORE для второго центра $B_0 = 118.2$ мТл

Далее при последовательном Фурье-преобразовании обнаруженного сигнала получается корреляционная карта, в которой диагональ состоит из спектра ДЭЯР (двойной электрон-ядерный резонанс) с высоким разрешением, а перекрестные пики показывают перенос намагниченности между двумя подуровнями энергии, принадлежащими одному и тому же электрону. Таким образом, когерентности, которые развиваются без «помех» на протяжении всех периодов эксперимента имеют пики вдоль диагонали в двумерной карте, а когерентности, которые обмениваются или передаются между спинами в период смешивания, создают перекрестные (недиагональные) пики, симметрично расположенные по обе стороны от диагонали.

Как можно видеть из рисунка 11 для второго центра наблюдается сильное взаимодействие с ядром фосфора. Пик соответствующий этому взаимодействию узкий, что указывает на отсутствие значительных разбросов в расстояниях Gd-P и малое искажение кристаллической структуры. В случае же суммы двух спектров HYSCORE электрон-ядерное взаимодействие с фосфором размывается, причем существенно сильнее, чем должно быть для

перехода $-1/2 \leftrightarrow 1/2$, что так же указывает на локализацию гадолиния в слабокристаллической фазе.

3.3 Радиационно-индуцированные центры

Исследуемые образцы ТКФ-Gd были облучены рентгеновским источником при комнатной температуре. Спектры ЭПР (рис. 13) записывались в импульсном режиме с использованием последовательности Хана при комнатной температуре ($T = 297 \text{ K}$).

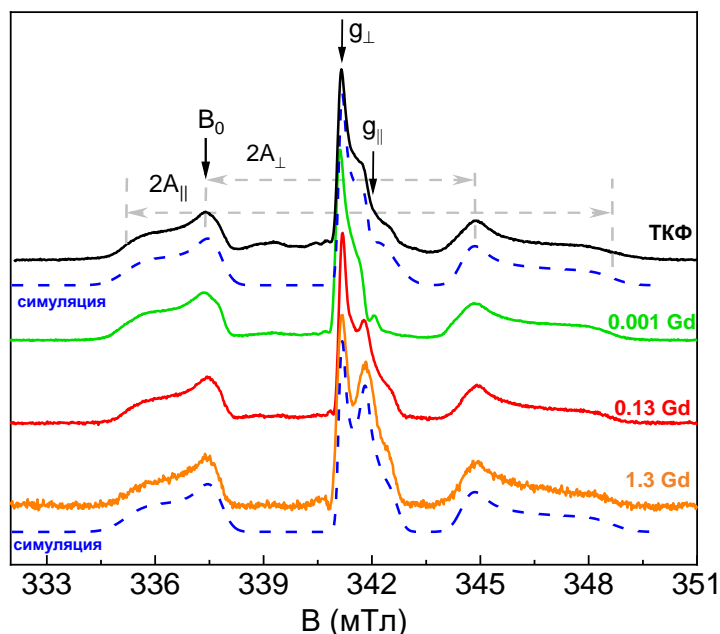


Рисунок 13 - Спектры ЭПР облученного ТКФ в зависимости от концентрации Gd в импульсном режиме. Штриховые линии – симуляции спектров

В ТКФ присутствуют примеси нитратного аниона (побочный продукт). Данный нитратный анион занимает фосфорную позицию. Такой анион используется в качестве зонда для анализа локального окружения [54]. Спиновый зонд является одним из эффективных способов исследования структурных особенностей локального окружения примесного центра. Сам по

себе нитратный анион не является парамагнитным, поэтому мы облучаем исследуемый образец рентгеновским излучением порядка 10 кГр.

При различных концентрациях гадолиния спектр не искажается, поэтому можно сделать вывод, что ТКФ сохраняет свою исходную группу симметрии. Также была проведена симуляция с использованием пакета EasySpin и определены основные спектроскопические показатели.

Спиновый гамильтониан азотного радикала $S=1/2$, $I=1$:

$$H = g_{\parallel}\beta B_z S_z + g_{\perp}\beta(B_x S_x + B_y S_y) + A_{\parallel}S_z I_z + A_{\perp}(S_x I_x + S_y I_y), \quad (7)$$

$$g_{\parallel} = 2.005, g_{\perp} = 2.009, A_{\parallel} = 6.68 \text{ мТл}, A_{\perp} = 3.75 \text{ мТл}.$$

Также были измерены динамические характеристики (времена электронной релаксации T_1 , T_2) азотного радикала при $B=B_0$, которые представлены в Таблице 4:

Таблица 4 – Электронные времена релаксации азотного радикала при $T = 297 \text{ К}$

Материал	T_1 (мкс)	T_2 (мкс)
ТКФ	24.3	4.16
ТКФ + 0.001 Gd	23	2.55
ТКФ + 0.13 Gd	22.6	2.4
ТКФ + 1.3 Gd	38.8	0.8

Время T_2 релаксации уменьшается благодаря тому, что есть связь между ионами гадолиния и азотным радикалом. Азотный радикал чувствует магнитное поле гадолиния, который является редкоземельным элементом и времена релаксации укорачиваются. Эти быстрые релаксации создают сильные флуктуирующие поля. Данный процесс ведет к расфазировке намагниченности радикала [53].

3. 4 Результат исследование биологической активности

Жизнеспособность клеток оценивали методом дифференциального флуоресцентного окрашивания живых и мертвых клеток с применением красителей. Реагент (иодид пропидия) окрашивает в красный цвет ядра погибших клеток. Синий краситель окрашивает ядра живых и мертвых клеток.

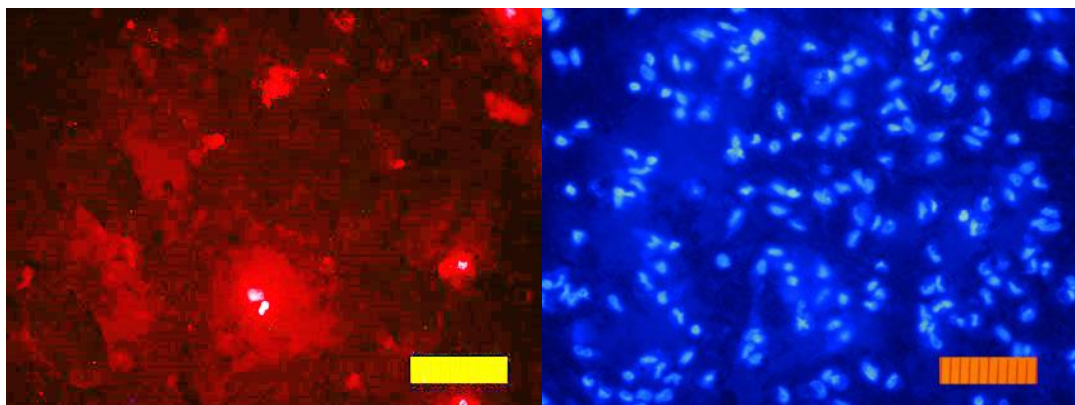


Рисунок 14 - Контрольный образец (100% ТКФ)

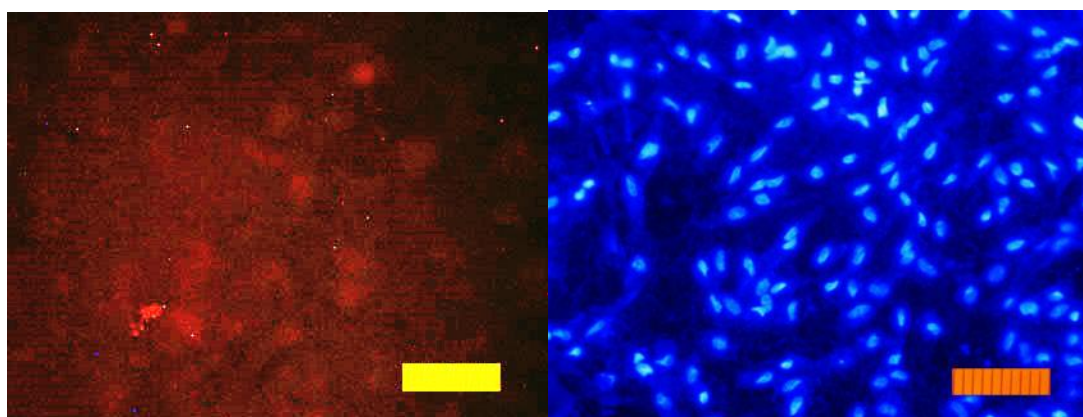


Рисунок 15 - ТКФ с примесью ионов Gd^{3+} (0. 1 моль)

Подсчет жизнеспособных клеток проводили на фиксированной площади поверхности по числу ядер клеток, с использованием микротомографии. Для получения результатов выживаемости клеток для каждой точки делали 8 повторений. Расчет стандартного отклонения выполняли для каждой точки на всех сечениях. Статистический анализ достоверности проводили по U-критерию Манна-Уитни ($p \leq 0,01$).

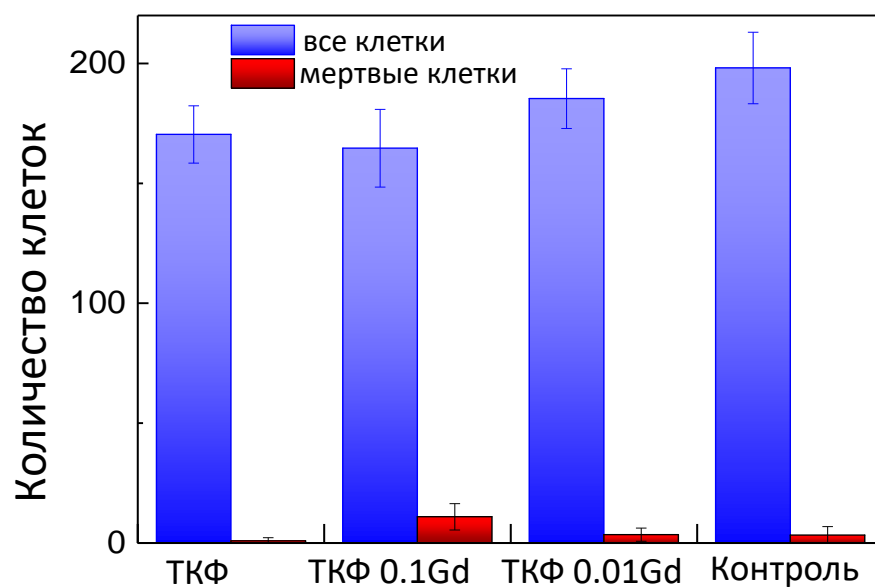


Рисунок 16 - Количество клеток DPSC (стволовые клетки пульпы зуба), посеянных на поверхность образцов. Синий – все клетки, красный – мертвые клетки

Исследование показало, что происходит снижение общего количества клеток на материалах допированных ионами гадолиния по сравнению с контрольным образцом. Однако, количество мертвых клеток на поверхности всех исследованных керамических материалов незначительно, что свидетельствует об отсутствии цитотоксичности этих материалов.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Зарегистрированы и просимулированы спектры ЭПР в стационарном и импульсном режимах X-диапазона и W-диапазона спектрометра Bruker Elexsys E580/E680. Определены основные спектроскопические характеристики (параметры спинового гамильтониана) примесных центров: g-фактор, параметры тонкой структуры (D и E) и времена спин-решеточной (T_1) и спин-спиновой (T_2) релаксации.
2. Однозначно установлено, что Gd^{3+} встраивается в кристаллическую решетку ТКФ и занимает две структурно-неэквивалентные позиции кальция.
3. При внедрении в небольшом количестве ионов Gd^{3+} кристаллическая решетка ТКФ не претерпевает существенных искажений и сохраняет свою пространственную симметрию без образования побочных фаз синтеза (ГА, ОКФ).
4. Установлено, что внедрение парамагнитных ионов Gd^{3+} влияет на динамические характеристики стабильных азотных радикалов. Таким образом, азотные радикалы могут служить чувствительным зондом внедрения ионов гадолиния в структуру ТКФ.

СПИСОК ИСПОЛЬЗУЕМЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. LeGeros, R. Z. Calcium phosphate-based osteoinductive materials / R. Z. LeGeros. – Текст : непосредственный // Chemical reviews. – 2008. – № 4(1). – P. 24 – 47.
2. Albee, F. H. Studies in bone growth: an experimental attempt to produce pseudarthrosis / F. H. Albee, H. F. Morrison. – Текст : непосредственный // The American Journal of the Medical Sciences. – 1920. – № 159 (1). – P. 40.
3. Bohner, M. β -tricalcium phosphate for bone substitution: Synthesis and properties / M. Bohner, B. G. Santoni, N. Döbelin. – Текст : непосредственный // Acta biomaterialia. – 2020. – № 113. – P. 23-41.
4. Gadolinium-doped mesoporous calcium silicate/chitosan scaffolds enhanced bone regeneration ability / F. Liao, X. Y. Peng, F. Yang [et al.]. – Текст : непосредственный // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – № 104. – P. 109999.
5. Barrere, F. Bone regeneration: molecular and cellular interactions with calcium phosphate ceramics / F. Barrere, C. A. van Blitterswijk, K. de Groot. – Текст : непосредственный // International journal of nanomedicine. – 2006. – № 1 (3). – P. 317.
6. Arts, J. C. Management of Periprosthetic Joint Infections (PJIs) Biomaterials in treatment of orthopedic infections / J. J. Arts, J. A. P. Geurts. – United Kingdom: Woodhead publishing, 2017. – 41–68 p. – Текст : непосредственный.
7. Bioactive calcium phosphate materials and applications in bone regeneration / J. Jeong, J. H. Kim, J. H. Shim [et al.]. – Текст : непосредственный // Biomaterials research. – 2019. – № 23 (1). – P.1-11.
8. Activation of extracellular-signal regulated kinase (ERK1/2) by fluid shear is Ca^{2+} -and ATP-dependent in MC3T3-E1 osteoblasts / D. Liu, D. C.

- Genetos, Y. Shao [et al.]. – Текст : непосредственный // Bone. – 2008. – № 42 (4). – P. 644-652.
9. Calcium regulates the PI3K-Akt pathway in stretched osteoblasts / T. E. Danciu, R. M. Adam, K. Naruse [et al.]. – Текст : непосредственный // FEBS Lett. – 2003. – № 536 (3). – P. 193-197.
10. Asagiri, M. The molecular understanding of osteoclast differentiation / M. Asagiri, H. Takayanagi. – Текст : непосредственный // Bone. – 2007. – № 40 (2). – P. 251–264.
11. Phosphate increases bone morphogenetic protein-2 expression through cAMP-dependent protein kinase and ERK1/2 pathways in human dental pulp cells / H. Tada, E. Nemoto, B. L. Foster [et al.]. – Текст : непосредственный // Bone. – 2011. – № 48 (6). – P. 1409–1416.
12. Unique roles of phosphorus in endochondral bone formation and osteocyte maturation / R. Zhang, Y. Lu, L. Ye [et al.]. – Текст : непосредственный // Bone Miner Res. – 2011. – № 26 (5). – P. 1047–1056.
13. Samavedi, S. Calcium phosphate ceramics in bone tissue engineering: a review of properties and their influence on cell behavior / S. Samavedi, A. R. Whittington, A. S. Goldstein. – Текст : непосредственный // Acta biomaterialia. – 2013. – № 9 (9). – P. 8037–8045.
14. Surface energy of hydroxyapatite and β -tricalcium phosphate ceramics driving serum protein adsorption and osteoblast adhesion / E. A. Dos Santos, M. Farina, G. A. Soares, K. Anselme. – Текст : непосредственный // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2008. – № 19 (6). – P. 2307–2316.
15. Effect of phase composition and microstructure of calcium phosphate ceramic particles on protein adsorption / X. D. Zhu, H. J. Zhang, H. S. Fan [et al.]. – Текст : непосредственный // Acta biomaterialia. – 2010. – № 6 (4). – P. 1536–1541.

16. Sakamoto, M. Development and evaluation of superporous hydroxyapatite ceramics with triple pore structure as bone tissue scaffold / M. Sakamoto. – Текст : непосредственный // Journal of the Ceramic Society of Japan. – 2010. – № 118 (1380). – P. 753–757.
17. Ambard, A. J. Calcium phosphate cement: review of mechanical and biological properties / A. J. Ambard, L. Mueninghoff. – Текст : непосредственный // Prosthodont. – 2006. – № 15 (5). – P. 321–328.
18. Gadolinium Magnetic Resonance Imaging. – Текст : электронный // National Library of Medicine : [сайт]. – URL: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29494094/> дата обращения: 21.02.2022).
19. EPR study of selected gadolinium complexes: β -diketonates and polycarboxylates / A. Szyzewski, R. Krzyminiewski, S. Lis [et al.]. – Текст : непосредственный // Radiation Physics and Chemistry. – 1995. – № 45 (6). – P. 935–938.
20. Gadolinium(III) cryptates investigated by multifrequency EPR / A. Szyzewski, S. Lis, J. Krzystek [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of alloys and compounds. – 2008. – № 451 (1). – P. 182–185.
21. Electron Paramagnetic Resonance study of chosen gadolinium(III) sandwiched- and encapsulated-polyoxometalate complexes / A. Szyzewski, S. Lis, Z. Kruczynski [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of alloys and compounds. – 1998. – № 275. – P. 349–352.
22. Chepeleva, I. V. On the lines of Gd^{3+} ESR spectra in glasses with high g-factors / I. V. Chepeleva, V. N. Lazukin. – Текст : непосредственный // Doklady Akademii Nauk SSSR. – 1976. – № 226 (2). – P. 311–314.
23. Electron spin resonance of Gd^{3+} in glasses of the soda-silica-yttria system / R. C. Nicklin, J. K. Johnstone, R. G. Barnes, D. R. Wilder. – Текст : непосредственный // The Journal of Chemical Physics. – 1973. – № 59 (4). – P. 1652–1668.

24. Cugunov, L. EPR of Gd³⁺ with $g \approx 6.0$ in glasses: a reinterpretation / L. Cugunov, J. Kliava. – Текст : непосредственный // Journal of Physics C: Solid State Physics. – 1982. – № 15 (26). – P. 933.
25. EPR study of selected gadolinium complexes: β -diketonates and polycarboxylates / A. Szyzewski, R. Krzyminiewski, S. Lis [et al.]. – Текст : непосредственный // Radiation Physics and Chemistry. – 1995. – Vol. 45, №. 6. – P. 935-938.
26. Сравнительное исследование замещения дефектов костной ткани остеопластическими материалами на основе α - и β -трикальцийфосфата / А. Н. Гурин, В. С. Комлев, И. В. Фадеева [и др.]. – Текст : непосредственный // Стоматология. – 2012. – № 91 (6). – С. 16-21.
27. Sic Parvis Magna: Manganese-substituted tricalcium phosphate and its biophysical properties / J. V. Rau, I. V. Fadeeva, A. S. Fomin [et al.]. – Текст : непосредственный // ACS Biomaterials Science & Engineering. – 2019. – № 5 (12). – P. 6632-6644.
28. First-principles calculations of divalent substitution of Ca²⁺ in tricalcium phosphates / K. Matsunaga, T. Kubota, K. Toyoura, A. Nakamura. – Текст : непосредственный // Acta Biomaterialia. – 2015. – № 23. – P. 329-337.
29. 3D-printed polycaprolactone scaffold mixed with β -tricalcium phosphate as a bone regenerative material in rabbit calvarial defects / H. C. Pae, J. H. Kang, J. K. Cha [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Biomedical Materials Research Part B: Applied Biomaterials. – 2019. – № 107 (4). – P. 1254-1263.
30. Hydrothermal synthesis and photoluminescence properties of Ca₉Eu(PO₄)₇ nanophosphors / J.S.X. Mi, L. Lei, X. Pan [et al.]. – Текст : непосредственный // CrystEngCommun. – 2015. – № 17 (41). – P. 7888–7895.

31. Accumulation of rare earth elements in human bone within the lifespan / S. Zaichick, V. Zaichick, V. Karandashev, S. Nosenko. – Текст : непосредственный // Metallomics. – 2011. – № 3 (2). – P. 186-194.
32. Gadolinium phosphate/chitosan scaffolds promote new bone regeneration via Smad/Runx2 pathway / P. P. Zhao, H. R. Hu, J. Y. Liu [et al.]. – Текст : непосредственный // Chemical Engineering Journal. – 2019. – № 359. – P. 1120-1129.
33. In vitro and in vivo studies on biomedical magnesium low-alloying with elements gadolinium and zinc for orthopedic implant applications / D. Bian, J. Deng, N. Li [et al.]. – Текст : непосредственный // ACS applied materials & interfaces. – 2018. – № 10 (5). – P. 4394-4408.
34. Hyperbranched polymer mediated size-controlled synthesis of gadolinium phosphate nanoparticles: colloidal properties and particle size-dependence on MRI relaxivity / C. Frangville, M. Gallois, Y. Li [et al.]. – Текст : непосредственный // Nanoscale. – 2016. – № 8 (7). – P. 4252-4259.
35. Gd accumulation in tissues of healthy mice upon repeated administrations of Gadodiamide and Gadoteridol / E. Di Gregorio, R. Iani, G. Ferrauto [et al.]. – Текст : непосредственный // Journal of Trace Elements in Medicine and Biology. – 2018. – № 48. – P. 239-245.
36. Ultra-small albumin templated Gd/Ru composite nanodots for in vivo dual modal MR/thermal imaging guided photothermal therapy / P. Xu, H. Wu, D. Wang [et al.]. – Текст : непосредственный // Advanced Healthcare Materials. – 2018. – № 7 (19). – P. 1800322.
37. Gd-metallofullerenol nanomaterial as non-toxic breast cancer stem cell-specific inhibitor / Y. Liu, C. Chen, P. Qian [et al.]. – Текст : непосредственный // Nature communications. – 2015. – № 6 (1). – P. 1-18.

38. Molecular mechanism of GdC82(OH)22 increasing collagen expression: implication for encaging tumor / J. Liu, S.G. Kang, P. Wang [et al.]. – Текст : непосредственный // Biomaterials. – 2018. – № 152. – P. 24-36.
39. Coherent normalization for in vivo measurements of gadolinium in bone / Z. Keldani, M. L. Lord, F. E. McNeill [et al.]. – Текст : непосредственный // Physiological measurement. – 2017. – № 38 (10). – P. 1848.
40. Kubasek, J. Structural characteristics and corrosion behavior of biodegradable Mg–Zn, Mg–Zn–Gd alloys / J. Kubasek, D. Vojtech. – Текст : непосредственный // Journal of Materials Science: Materials in Medicine. – 2013. – № 24 (7). – P. 1615-1626
41. Gadolinium-doped mesoporous calcium silicate/chitosan scaffolds enhanced bone regeneration ability / F. Liao, X. Y. Peng, F. Yang [et al.]. – Текст : непосредственный // Materials Science and Engineering: C. – 2019. – № 104. – P. 109999.
42. Сафронова, Т.В. Медицинское неорганическое материаловедение в России: кальцийфосфатные материалы / Т.В. Сафронова, В.И. Путляев. – Текст : непосредственный // НАНОСИСТЕМЫ: ФИЗИКА, ХИМИЯ, МАТЕМАТИКА. – 2013. – № 4 (1). – С. 24 – 47.
43. Harris, R. K. Continuous-Wave EPR / R. K. Harris, R. L. Wasylshen – Текст : непосредственный // eMagRes. – 2016. – № 5. – P. 1411–1422.
44. Van Gastel, M. Pulsed EPR spectroscopy / M. van Gastel. – Текст : непосредственный // Photosynthesis research. – 2009. – № 102 (2). – P. 367-373.
45. Dikanov, S. A. Influence of Hyperfine Coupling Strain on Two-Dimensional ESEEM Spectra from I= 1/2 Nuclei / S. A. Dikanov, A. T. Taguchi. – Текст : непосредственный // Applied Magnetic Resonance. – 2020. – №. 51 (9). – P. 1177-1200.

46. Hyperfine sublevel correlation (hyscore) spectroscopy: a 2D ESR investigation of the squaric acid radical / P. Höfer, A. Grupp, H. Nebenführ, M. Mehring. – Текст : непосредственный // Chemical physics letters. – 1986. – № 132 (3). – P. 279-282.
47. Альтшулер, С. А. Электронный парамагнитный резонанс соединений элементов промежуточных групп / С. А. Альтшулер, Б. М. Козырев. – 2-е изд., перераб. – Москва : «Наука» Физматлит., 1972. – 672 с. – Текст : непосредственный.
48. D. Goldfarb, EPR Spectroscopy: Fundamentals and Methods / D. Goldfarb, S. Stoll – John Wiley & Sons, Ltd. – UK, 2018. – 650 p. – ISBN: 978-1-119-16299-5. – Текст : непосредственный.
49. Methods of sputum processing for cell counts, immunocytochemistry and in situ hybridization / Q. Hamid, M. M. Kelly, M. Linden [et al.]. – Текст : непосредственный // European Respiratory Journal. – 2002. – № 20 (37). – P. 19-23.
50. Nakashima, K. Magnetic properties of gadolinium-doped tricalcium phosphate / K. Nakashima, J. Yamauchi. – Текст : непосредственный // Journal of Alloys and Compounds. – 2006. – № 406. – P. 761–765.
51. Thorp, J. S. Spin-lattice relaxation in gadolinium-doped calcium tungstate / J. S. Thorp, E. A. E. Ammar. – Текст : непосредственный // Journal of Materials Science. – 1976. – № 11 (7). – P. 1215-1219.
52. Misra, S. K. Multifrequency electron paramagnetic resonance: theory and applications / S. K. Misra – John Wiley & Sons, Ltd. – UK, 2014. – 313 p. – Текст : непосредственный.
53. Nitrogen-containing species in the structure of the synthesized nano-hydroxyapatite / M. Gafurov, T. Biktagirov, B. Yavkin [et al.]. – Текст : непосредственный // JETP letters. – 2014. – № 99 (4). – P. 196-203.

54. Hahn, E. L. Nuclear induction due to free Larmor precession / E. L. Hahn.
– Текст : непосредственный // *Physical Review*. – 1950. – № 77 (2). – P.
297.