

МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКИЕ ПРОБЛЕМЫ ПОВЕРХНОСТИ

УДК 615 + 544.7:546.284.31

НАНОСТРУКТУРИРОВАННЫЕ КОМПОЗИТЫ НА ОСНОВЕ БЕЛКОВ КОСТНОЙ ТКАНИ, ВЫСОКОДИСПЕРСНОГО КРЕМНЕЗЕМА И ГИДРОКСИАПАТИТА

**А.П. Головань, В.В. Туров, В.Н. Барвинченко, В.М. Мищенко,
П.П. Горбик, Ю.Б. Шевченко**

*Институт химии поверхности им. А.А. Чуйко Национальной академии наук Украины
ул. Генерала Наумова, 17, 03164 Киев-164*

Адсорбционными методами изучено взаимодействие препарата белкового гидролизата «Геоссен», полученного из оссеина костей крупного рогатого скота, с поверхностью высокодисперсного кремнезема. Методом ЯМР-спектроскопии в условиях вымораживания жидкой фазы определялись параметры взаимодействия белкового гидролизата с частицами нанодисперсного гидроксиапатита, самоассоциация молекул «Геоссена» и изменение величины гидратации, обусловленное взаимодействием белковых молекул с гидроксиапатитом. Молекулы белкового гидролизата «Геоссен» практически необратимо адсорбируются на поверхности высокодисперсного кремнезема и слабо взаимодействуют с наноразмерными частицами гидроксиапатита, что может быть одной из главных причин биологической инертности гидроксиапатитов. Взаимодействие оссеина с частицами кремнезема происходит путем формирования водородносвязанных комплексов с силанольными группами. Большинство силанольных групп оказываются в связанном состоянии даже при условии заполнения поверхности кремнезема молекулами белка существенно ниже толщины монослойного покрытия.

The interaction between protein hydrolyzate “Geossen”, which was obtained from bone protein ossein, with surface of high dispersed silica was investigated by adsorption methods. Parameters of interplay between protein hydrolyzate with particles of nanodispersed hydroxyapatite, self-association of “Geossen” molecules and change the value of hydration, in cause the cooperation between protein molecules with hydroxiapatite were determined by ¹H NMR spectroscopy method with layer-by-layer freezing-out of liquid faze. It was shown that molecules of protein hydrolyzate practically irreversible adsorbed on the high dispersed silica surface and weakly reaction with hydroxiapatite nanopaticles. This is may be caused the one of the important reasons of biological inertly hydroxiapatite. The interaction between ossein with silica particles take place with formation hydrogen bounded complexes with silanols groups. The most part of silanols groups are obtained in bounded states when covering the silica surface by protein molecules lower the thickness of monolayer even.

Введение

Одной из важных задач травматологии является создание искусственных органов и биологически инертных имплантов, пригодных для вживления в организм. При решении этой проблемы большое внимание уделяется использованию синтетического гидроксиапатита, являющегося аналогом минеральной составляющей костной ткани [1, 2]. Строение минеральной и белковой составляющей костной ткани изучалось многими

экспериментальными методами [3 – 5]. Гидроксиапатит в матрице коллагена образует нанокристаллы размером 2 – 5 нм. Основой нанокристалла составляют ионы OH^- , расположенные в вершинах параллелепипеда, каждый из которых окружен шестью ионами кальция и шестью группами PO_4^{3-} [6]. Коллагеновые волокна образуют сложную систему пор и капилляров [7], которые вместе с нанокристаллами гидроксиапатита служат биоактивной матрицей для синтеза эритроцитов, стволовых и некоторых других типов клеток. Искусственное создание подобных матриц позволит существенно улучшить используемые в настоящее время костные импланты, а также создать новые схемы репродукции клеток в биотехнологических циклах.

В качестве минеральных наполнителей биоактивных матриц, кроме гидроксиапатита, могут использоваться и другие наноразмерные частицы, в частности некоторые типы высокодисперсных кремнеземов. В последние годы высокодисперсные кремнеземы стали применяться в качестве энтеросорбентов широкого спектра адсорбционного действия для выведения из организма токсических, балластных и других патогенных веществ и микроорганизмов [8]. Одним из основных свойств, которое определяет возможность эффективного использования этого типа адсорбентов, является их высокое сродство к белковым молекулам. Кроме этого, биометрическое тестирование высокодисперсных кремнеземов выявило их способность стимулировать жизненные процессы клеток и ускорять процесс деления [9 – 11], что определяет возможность их использования в биотехнологии. Для создания биоактивных матриц на основе гидроксиапатита, кремнезема и белков костной ткани должны быть определены параметры взаимодействия наночастиц с водой и белковыми молекулами коллагенового ряда. Для изучения подобных взаимодействий удобным и очень информативным методом оказался метод ^1H ЯМР-спектроскопии в сочетании с методикой послойного вымораживания жидкой фазы [12 – 14]. Метод основан на понижении температуры замерзания межфазной воды под влиянием адсорбционных сил. С его помощью можно измерять толщину гидратной оболочки белковых молекул или дисперсных частиц. Поскольку при контакте белковых молекул с поверхностью или между собой из их гидратных оболочек должна удаляться значительная часть связанной воды, то по понижению гидратированности композитных частиц можно судить об эффективности взаимодействий белок/поверхность, а по изменению свободной энергии слоя связанной воды – об энергии такого взаимодействия.

Целью данной работы являлось изучение гидратных свойств частиц наноразмерного гидроксиапатита, белковых молекул, полученных в результате гидролиза коллагена (препарат «Геоссен») и нанокompозитов на их основе, адсорбции оссеина на поверхности кремнезема, а также молекулярных взаимодействий, которые проходят с участием частиц высокодисперсного кремнезема и оссеина.

Материалы и методы исследований

Материалы. Нанодисперсный гидроксиапатит (GAP) (химическая формула кристаллов $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$) с удельной поверхностью $120 \text{ м}^2/\text{г}$ синтезирован осаждением из смеси водных растворов солей $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ и $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ при высоких значениях pH [15, 16]. Для получения тонкодисперсного материала были подобраны условия синтеза. Для этого раствор $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 0,2 моль/л при энергичном перемешивании добавляли по каплям к раствору $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$. В результате реакции образуется объемный осадок. Реакционную смесь кипятили в течение 10 мин, отфильтровывали осадок, дважды промывали его горячей дистиллированной водой и отделяли центрифугированием. Затем после диспергирования в ацетоне, обрабатывали ультразвуком в течение 1 мин и центрифугировали при 6000 об/мин в течение 20 мин. Осадок сушили сначала при комнатной температуре, а затем при 353 – 373 К, для удаления следов ацетона, после чего прокаливали в течение 1 ч при 513 К для удаления следов нитрата аммония.

Высокодисперсный кремнезем (ВДК) марки А-300 с удельной поверхностью 300 м²/г производства Калушского экспериментального завода Института химии поверхности им. А.А. Чуйко НАН Украины.

Адсорбция из растворов: Адсорбцию белкового гидролизата «Геоссен» на поверхности высокодисперсного кремнезема проводили из растворов фосфатного буфера с рН 4,7 и 7,4 при 296 К. Для установления адсорбционного равновесия образцы выдерживали в течение 2 ч. Концентрация белковой компоненты варьировалась в диапазоне 0,4 – 5,6 мг/мл. Спектры электронного поглощения растворов измеряли на спектрофотометре Spekord M-40 (Karl Zeiss Iena, Германия). Адсорбцию определяли по изменению интенсивности поглощения на длине волны $\lambda = 540$ нм.

ИК-спектроскопия: ИК – спектры образцов кремнезема с адсорбированным белковым гидрализатом, количество «Геоссена» на поверхности ВДК от 77 до 180 мг/г сорбента, регистрировали на однолучевом ИК Фурье-спектрометре Thermo Nicolet Nexus FT-IR (Германия) в таблетках с KBr при соотношении компонентов 1 : 5.

ЯМР-спектроскопия: Спектры ЯМР снимали на ЯМР спектрометре высокого разрешения Varian Mercury 400 с рабочей частотой 400 МГц. Температуру регулировали с точностью ± 1 К, используя термодрифтставку Bruker VT-1000. Интенсивности сигналов определяли с точностью ± 10 %. Для предотвращения переохлаждения суспензий спектры ¹H ЯМР незамерзающей воды записывали при нагревании суспензий, предварительно охлажденных до температуры 210 К.

Условием замерзания воды на межфазной границе адсорбент (биополимер)/вода является равенство свободных энергий молекул адсорбированной воды и льда. При этом понижение температуры замерзания адсорбированной воды ($273 - T$) определяется уменьшением свободной энергии воды, вызванным адсорбционными взаимодействиями ($\Delta G = G_0 - G$, где G_0 – свободная энергия льда при $T = 273$ К) [13, 14]. Поскольку свободная энергия льда с понижением температуры изменяется по линейному закону [17], то

$$\Delta G = -0,036 \cdot (273 - T). \quad (1)$$

Площадь под кривой $\Delta G(C_{uw})$ определяет величину межфазной энергии (γ_s), которая равна суммарному понижению свободной энергии воды, обусловленному присутствием границы раздела фаз:

$$\gamma_s = K \int_0^{C_{uw}^{\max}} \Delta G dC_{uw}, \quad (2)$$

где C_{uw}^{\max} – толщина слоя незамерзающей воды при $T \rightarrow 273$ К.

По зависимостям $\Delta G(C_{uw})$ могут быть рассчитаны также параметры слоев сильно- и слабосвязанной воды. При этом под слабосвязанной водой понимают ту часть незамерзающей воды, свободная энергия которой лишь немного понижена адсорбционными взаимодействиями с поверхностью адсорбентов или биополимеров. Она замерзает при температуре вблизи 273 К. Напротив, сильносвязанная вода может не замерзать даже при сильном охлаждении суспензии [14]. Количественные значения толщины слоев каждого типа воды (C_{uw}^s и C_{uw}^w для сильно- и слабосвязанной воды соответственно) и максимальные величины понижения свободной энергии воды, вызванного адсорбцией (ΔG^s и ΔG^w) могут быть получены экстраполяцией соответствующих участков зависимостей к осям абсцисс и ординат. Таким образом, по способности молекул межфазной

воды образовывать водородные связи со своими соседями она подразделяется на сильно- и слабо ассоциированную, а по энергии взаимодействия с внутриклеточными границами раздела фаз (по понижению температуры замерзания) на сильно- и слабосвязанную. Следует отметить, что слабо ассоциированная вода далеко не всегда является сильно-связанной, а сильносвязанная во многих случаях является в то же время и сильно ассоциированной [14].

Результаты и обсуждение

На рис. 1 приведены изотермы адсорбции препарата «Геоссен» на кремнеземе А-300. Они относятся к изотермам Ленгмюровского типа, что позволяет определить величину предельной адсорбции, которая составляет 180 мг/г при рН 4,7 и 120 мг/г при рН 7,4.

Зависимость величины адсорбции от рН раствора (рис. 2) имеет колоколообразную форму, типичную для адсорбции белковых молекул, у которых взаимодействие с поверхностью частиц высокодисперсного кремнезема контролируется электростатическими взаимодействиями. Максимальная адсорбция отвечает изоэлектрической точке белковых молекул и регистрируется при рН 5 (концентрация исходного раствора белкового гидролизата ($C_{БГ}$) составляла 4,8 мг/мл). Адсорбированные кремнеземом белковые молекулы прочно удерживаются поверхностью и при помещении нагруженного белковым гидролизатом кремнезема в водную среду остаются в связанном состоянии, что позволяет сделать вывод о необратимом характере адсорбции.

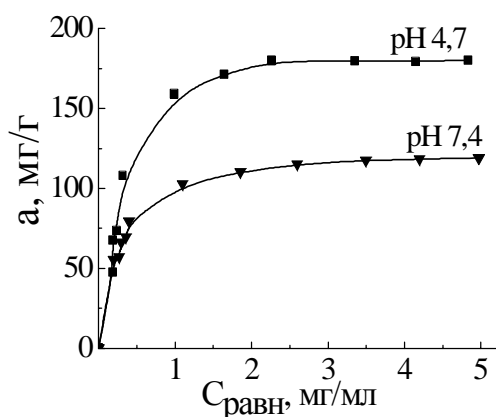


Рис. 1. Изотермы адсорбции белкового гидролизата «Геоссен» при разных значениях рН.

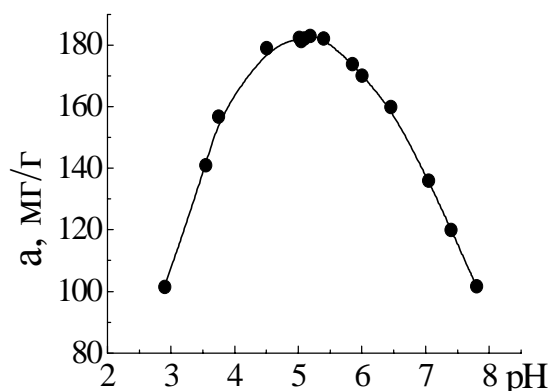


Рис. 2. Зависимость величины адсорбции белкового гидролизата ($C_{БГ} = 4,8$ мг/мл) от рН раствора.

Механизм взаимодействия молекул белкового гидролизата с поверхностью ВДК изучали по изменениям его ИК-спектральных характеристик. В ИК спектрах могут быть идентифицированы полосы валентных и деформационных колебаний молекул белкового гидролизата, а также валентных колебаний свободных силанольных групп (полоса при 3748 см^{-1}).

Результаты исследований приведены на рис. 3, из которого видно, что уже при небольших поверхностных концентрациях оссеина интенсивность сигнала Si–ОН групп резко уменьшается, а в дальнейшем с ростом количества адсорбированного белка слабо зависит от величины адсорбции. Следовательно, молекулы белка располагаются на поверхности частиц кремнезема таким образом, что даже при отсутствии мономолекулярного покрытия большая часть силанольных групп, вследствие образования водородносвязанных комплексов оказывается связанной с электронодонорными активными центрами молекул биополимера. Дальнейшее заполнение поверхности кремнезема моле-

кулами белка, вплоть до монослойного, проходит без изменения степени возмущения силанольных групп (рис. 4) и, вероятно, сопровождается поверхностной диффузией, обеспечивающей формирование компактной белковой пленки.

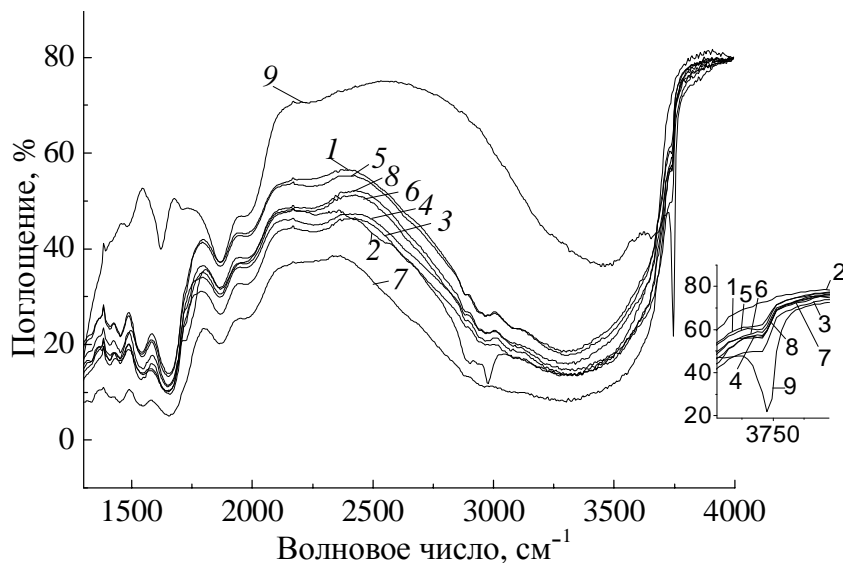


Рис. 3. ИК-спектры аэросила после адсорбции из водного раствора белкового гидролизата «Геосин». Количество адсорбированного белка: 1 – 77,4 мг/г; 2 – 142,7 мг/г; 3 – 144,6 мг/г; 4 – 145,8 мг/г; 5 – 155,2 мг/г; 6 – 161,2 мг/г; 7 – 174,1 мг/г; 8 – 177,3 мг/г; 9 – А-300.

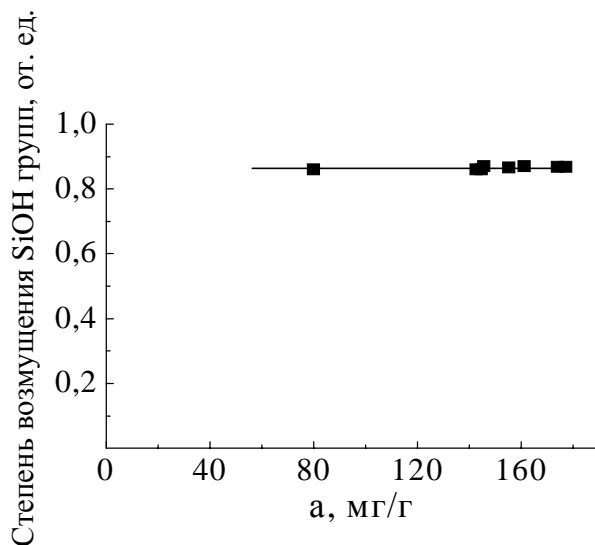


Рис. 4. Зависимость степени возмущения поверхностных силанольных групп ВДК от величины адсорбции препарата „Геосин“.

Полученные результаты хорошо согласуются с данными работ по адсорбции других белков (альбуминов, желатина, γ -глобулина) на поверхности кремнезёмов [17–20]. Относительно низкая (180 мг/г) по сравнению с желатином (350 мг/г [21]) величина предельной адсорбции оссеина может быть обусловлена меньшим размером белковых молекул, что позволяет им сформировать на поверхности частиц кремнезёма более тонкую биополимерную пленку.

На рис. 5 приведены температурные зависимости спектров ^1H ЯМР водного раствора оссеина (а), порошка гидроксиапатита, содержащего массовую долю воды 25 % на воздухе (б) и массовую долю воды 40 % в среде CDCl_3 (в). Наиболее интенсивным сигналом в спектрах является сигнал воды с химическим сдвигом $\delta = 5$ м.д., который совпадает с химическим сдвигом жидкой воды. Следовательно, подавляющая часть воды в

гидратных оболочках твердых частиц гидроксиапатита и молекул оссеина находится в сильно ассоциированном состоянии, в котором каждая молекула воды участвует в образовании примерно 2,5 водородных связей [12]. Для раствора оссеина регистрируется также слабоинтенсивные сигналы с химическими сдвигами 1 – 2 и 7 м.д. Наиболее вероятно, что эти сигналы обусловлены протонами аминокислотных остатков белковых молекул, однако определенный вклад в сигнал при высоких полях может вносить и слабо ассоциированная форма воды, связанная с белковыми молекулами по механизму гидрофобной гидратации [22]. Кроме того, на левом крыле сигнала воды наблюдается сигнал с химическим сдвигом 5,5 м.д. По-видимому, это также сигнал воды, но ассоциированной несколько в большей степени, чем остальная вода. В отличие от гидратированных порошков кремнезема в среде слабополярных органических растворителей в спектрах не наблюдается заметного уменьшения химического сдвига воды с понижением температуры, обусловленного смещением равновесия в сторону слабо ассоциированных форм воды [23]. Аналогичные приведенные на (рис. 5, б и в) температурные зависимости спектров ^1H ЯМР воды наблюдаются и для композитных материалов, приготовленных на основе высокодисперсного гидроксиапатита и растворов белка. Это позволяет заключить, что в выбранной серии материалов их поверхность стабилизирует только сильно ассоциированные формы воды.

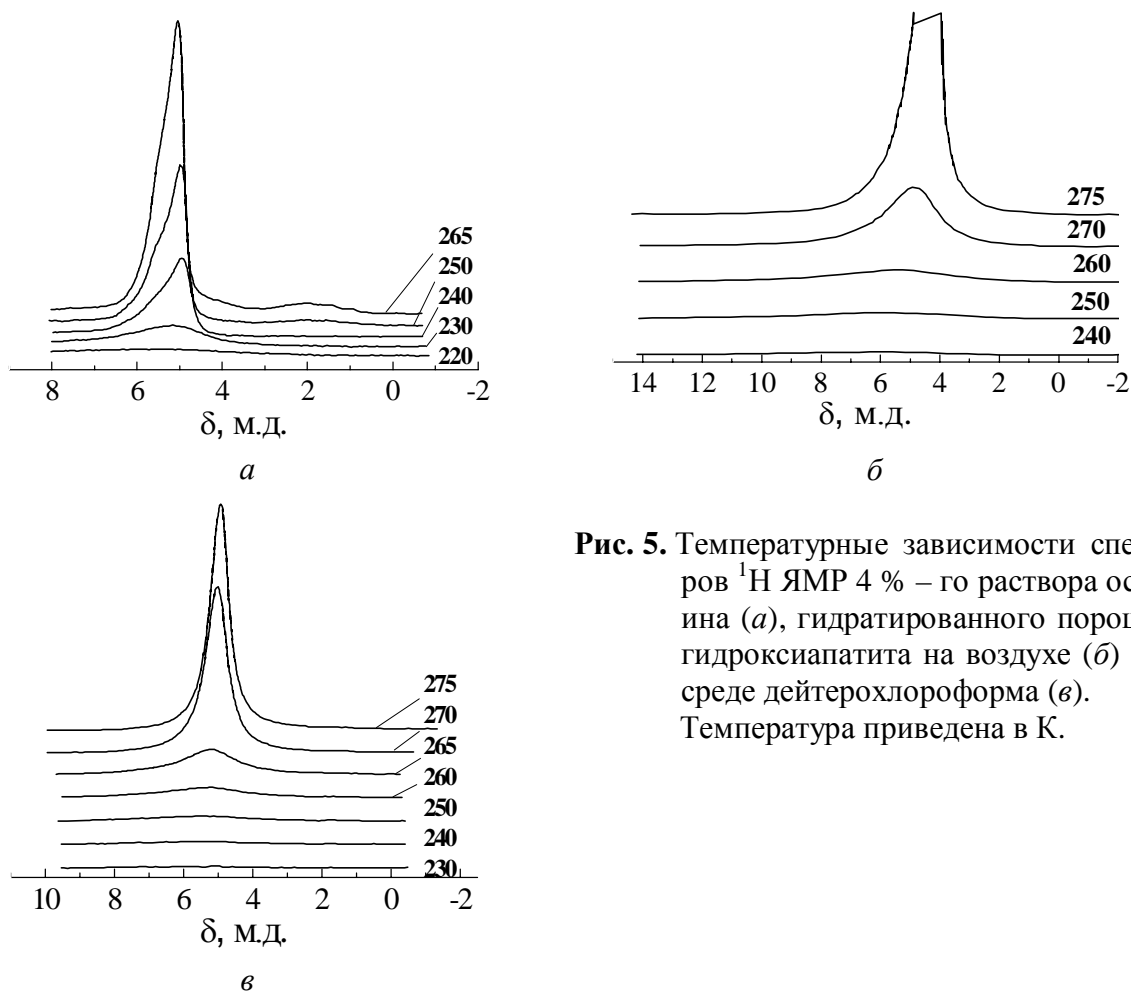


Рис. 5. Температурные зависимости спектров ^1H ЯМР 4 % – го раствора оссеина (а), гидратированного порошка гидроксиапатита на воздухе (б) и в среде дейтерохлороформа (в). Температура приведена в К.

На рис. 6 приведены температурные зависимости изменения концентрации незамерзающей воды (а) и рассчитанные на их основе в соответствии с формулой (1) зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (б) для растворов оссеина с массовой долей 1 и 4 %; водной суспензии гидроксиапатита,

содержащей массовую долю твердой фазы 45,6 %; суспензии 1:3 гидроксиапатита в 4 %-ном растворе оссеина; гидратированных порошков гидроксиапатита, содержащих массовые доли 22 и 42 % воды в среде дейтерохлороформа; композита, приготовленного путем высушивания суспензии гидроксиапатита в 4 %-ном растворе оссеина и содержащего массовую долю белковой компоненты 15 % и массовую долю воды 10 % в среде дейтерохлороформа. Для водных суспензий на зависимостях $\Delta G(C_{uw})$ легко идентифицируются участки, отвечающие слабосвязанной и сильно-связанной воде [13]. Характеристики слоев связанной воды и величины межфазной энергии системы частица/вода, рассчитанные по формуле (2), суммированы в таблице.

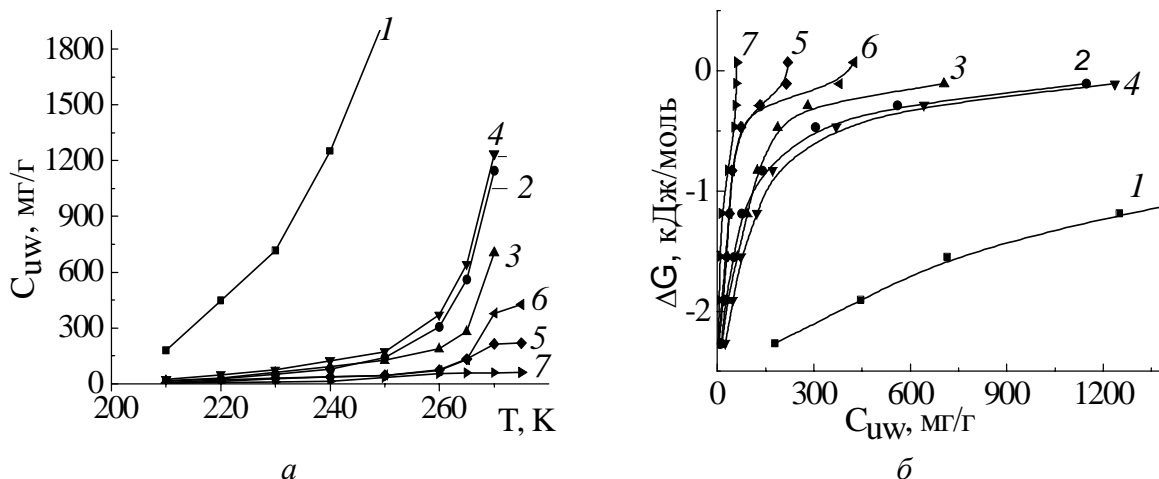


Рис. 6. Температурные зависимости изменения концентрации незамерзающей воды (а) и зависимости изменения свободной энергии Гиббса от концентрации незамерзающей воды (б): 1 – GOS 1 %, 2 – GOS 4 %, 3 – GAP; 4 – GAP + GOS 4 %, 5 – GAP, содержащий 22 % H₂O в CDCl₃, 6 – GAP, содержащий 42 % H₂O в CDCl₃, 7 – GAP + GOS 15 % в CDCl₃.

Таблица. Характеристики слоев связанной воды в растворах оссеина и суспензиях гидроксиапатита в воде и в 4 %-ном растворе оссеина

Система	Среда	C_{uw}^s , г/г	C_{uw}^w , г/г	ΔG^s , кДж/моль	ΔG^w , кДж/моль	γ_s , Дж/г
1 % GOS	Вода	1,7	16,3	- 2,5	- 0,5	392
4 % GOS	Вода	0,1	1,1	- 2,5	- 0,6	28
GAP	Вода	0,2	0,55	- 2,4	- 0,6	19,7
GAP+4 %GOS	Вода	0,22	1,08	- 2,5	- 0,7	34,4
GAP+22 % H ₂ O	CDCl ₃	0,085	0,135	- 2,5	-	-
GAP+42 % H ₂ O	CDCl ₃	0,085	0,335	- 2,5	-	-
GAP/GOS	CDCl ₃	0,03	0,03	- 2,5	-	-

Как следует из приведенных в таблице данных, величины максимального понижения свободной энергии в слоях сильно- и слабосвязанной воды оказались близкими для всех изученных водных суспензий (растворов) (- 2,5 и - 0,6 кДж/моль для сильно- и слабосвязанной воды соответственно). Поскольку величина ΔG_{\min}^s отвечает изменению свободной энергии монослоя воды, граничащего с поверхностью [13, 14], можно заключить, что независимо от типа нанодисперсных частиц (белковые молекулы, частицы гидроксиапатита или нанокомпозита) строение воды в гидратной оболочке оказалось близким. При увеличении массовых долей оссеина от 1 до 4 %, регистрируется резкое

уменьшение величины межфазной энергии (от 392 до 28 кДж/моль), что характерно для многих белковых молекул [24]. Оно обусловлено формированием полиассоциатов белковых молекул, в результате которого значительная часть связанной воды удаляется из межмолекулярного зазора. Разность величин межфазной энергии растворов разной концентрации позволяет оценить энергию межмолекулярных взаимодействий в системе белок/белок. Для оссеина она составляет 264 кДж/г.

Из сопоставления кривых зависимостей $\Delta G(C_{ув})$ для 4 % -ной водной суспензии оссеина и гидроксиапатита в 4 % - ном растворе оссеина видно, что они различаются слабо. Величина межфазной энергии для композитной системы имеет промежуточное значение между величинами межфазной энергии раствора белка и суспензии гидроксиапатита. Следовательно, гидроксиапатит слабо взаимодействует с белковой составляющей композита. Вероятно, слабое взаимодействие гидроксиапатита с белковыми молекулами в значительной степени определяет его биологическую инертность.

Кривые, относящиеся к гидратированным порошкам гидроксиапатита или композита на его основе, в среде слабополярного органического растворителя – дейтерохлороформа (рис. 6, б) – расположены существенно ниже кривых для водных суспензий. Следовательно, в среде хлороформа происходит значительное (в несколько раз) уменьшение концентрации сильносвязанной воды. По-видимому, в изученных образцах, как и в других наноструктурированных системах [24], под влиянием слабополярных молекул хлороформа происходит замещение части воды у поверхности частиц гидроксиапатита или находящихся во внутренних полостях белковых молекул молекулами хлороформа. Для белковых молекул под влиянием слабополярной среды возможно также такое изменение конформации молекул, при котором с органической фазой контактируют преимущественно гидрофобные фрагменты биополимерных цепей.

Заключение

В результате комплексных физико-химических исследований установлено, что белковый гидролизат «Геоссен» практически необратимо адсорбируется на поверхности ВДК и слабо взаимодействует с наноразмерными частицами гидроксиапатита. Это может быть одной из основных причин биологической инертности гидроксиапатитов. Взаимодействие оссеина с частицами кремнезема происходит путем формирования водородносвязанных комплексов с силанольными группами. Большинство силанольных групп оказываются в связанном состоянии даже при условии заполнения поверхности кремнезема молекулами белка существенно ниже толщины монослойного покрытия. Это может быть связано с относительно высокой подвижностью молекул белкового гидролизата, находящихся на поверхности частиц кремнезема в условиях слабого заполнения.

Работа выполнена при поддержке фонда CRDF (NUKP2 - 2854 - KV - 07).

Литература

1. Saito T., Kin Y., Koshino T. Osteogenic response of hydroxyapatite cement implanted into the femur of rats with experimentally induced osteoporosis // *Biomaterials* – 2002. – V. 23. – P. 2711 – 2716.
2. Shigeru M., Oku T., Takai S. Hydraulic property of hydroxyapatite thermal decomposition product and its application as biomaterial // *J. Ceram. Soc. Jpn. Int. Ed.* – 1989. – V. 97. – P. 96 – 101.
3. Faulkner K.G., Pocock N. Future methods in the assessment of bone mass and structure // *Best Practice & Research Clinical Rheumatology* – 2001. – V. 15, №3. – P. 359 – 383.
4. Nuclear magnetic resonance spin-spin relaxation of the crystals of bone, dental enamel, and synthetic hydroxyapatite / Y. Wo, J.L. Ackerman, H-M. Kim, C. Rey, A. Barroug, M.J. Climcher // *J. Bone and Mineral Reas.* – 2002. – V. 17, № 3. – P. 472 – 480.

5. Shape and size of isolated bone minerals measured using atomic force microscopy / S.J. Eppell, W. Tong, J.L. Katz, L. Kuhn, M.J. Glimcher // *J. Orthopedic Reas.* – 2001. – V. 19. – P. 1027 – 1034.
6. Adaptive physico-chemistry of bio-related calcium phosphates / S. Cazalbou, C. Combes, D. Eichert, C. Rey // *J. Mater. Chem.* – 2004. – V. 14. – P. 2148 – 2153.
7. Weiner S., Traub W., Wagner H.D. Lamelar bone: structure-functional relation // *J. Struct. Biology.* – 1999. – V. 126. – P. 241 – 255.
8. Кремнезёмы в медицине и биологии / Ред. А.А. Чуйко. – Киев; Ставрополь. – 1993. – 259 с.
9. Цимберг Е.А., Титова Л.В., Курдиш И.К. Влияние высокодисперсных материалов на рост дрожжей *Candida* // *Микробиол. журн.* – 1991. – № 4. – С. 55 – 58.
10. Влияние дисперсных кремнезёмов на рост дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* / И.К. Курдиш, Е.А. Цимберг, В.Л. Бихтунов // *Микробиол. журн.* – 1991. – № 2. – С. 41 – 44.
11. Harley J.D., Margolis J. Hemolytic activity of colloidal silica // *Nature* – 1961. – V. 189. – P. 1010 – 1011.
12. Unusual properties of water at hydrophilic/hydrophobic interfaces / V.M. Gun'ko, V.V. Turov. V.M. Bogatyrev, V.I. Zarko, R. Leboda, E.V. Goncharuk, A.A. Novza, A.V. Turov, A.A. Chuiko // *Adv. Colloid Interface Sci.* – 2005. – V. 118. – P. 125 – 172.
13. Turov V.V., Leboda R. Application of ^1H NMR spectroscopy method for determination of characteristics of thin layers of water adsorbed on the surface of dispersed and porous adsorbents // *Adv. Colloid Interf. Sci.* – 1999. – V. 79. – P. 173 – 211.
14. Туров В.В. Слои связанной воды и поверхностные силы в водных суспензиях высокодисперсных оксидов. В кн. *Химия поверхности кремнезема*. Ред. А.А. Чуйко. – Киев: Изд. УкрИНТЭИ. – Т. 1. – 2001. – С. 510 – 607.
15. Petroff A., Posner A.S. Crystalline basic calcium orthophosphate (Hydroxyapatite) // *Inorg. Synth.* – 1960. – V. 66. – P.16 – 18.
16. Hayek E. Newsely pentacalcium monohydroxyorthoposphate (Hydroxyapatite) // *Inorg. Synth.* – 1963. – V. 7. – P. 63 – 65.
17. Effect of mineral content on the nanoindentation properties / S.J. Eppel, W. Tong, J.L. Katz, L. Kuhn, M.J. Glimcher // *J. Orthop. Res.* – 2001. – V. 19. – P. 1027 – 1035.
18. Тарасевич Ю.И., Смирнова В.А., Монахова Л.И., Адсорбция альбумина на кремнеземе // *Коллоид. журн.* – 1978. – Т. 40, № 6. – С. 1214 – 1216.
19. Медицинская химия и клиническое применение диоксида кремния / Ред. А.А. Чуйко. – Киев: Наук. думка – 2003. – 415 с.
20. Braithwaite G.J.C., Luckham P.F., Howe A.M. Study of solvated adsorbed gelatine layer using a modified force microscope // *J. Colloid Interf. Sci.* – 1999. – V. 213. – P. 525 – 545.
21. Влияние дисперсного кремнезема на гидратацию коллагена / В.В. Туров, В.К. Погорелький, Л.А. Сыч, В.Н. Барвинченко, А.А. Чуйко / *Докл. АН Украины.* – 2000. – № 9. – С. 152 – 156.
22. Слабо ассоциированная вода в биологических объектах и на межфазной границе кремнезёмов / В.М. Гунько, С.П. Туранская, О.В. Нечипор, Е.В. Юхименко, В.В. Туров, А.А. Чуйко. // *Химия, физика и технология поверхности.* – 2006. – Вып. 11-12. – С. 397 – 430.
23. Gun'ko V.M., Turov V.V. Structure of hydrogen bonds and ^1H NMR spectra of water at the interface of oxides // *Langmuir* – 1999. – V. 15, № 19. – P. 6405 – 6415.
24. Супрамолекулярные структуры с участием белков крови и частиц высокодисперсного кремнезема. / В.В. Туров, А.А. Ругаль, В.М. Гунько, В.Н. Барвинченко, Н.П. Галаган, П.П. Горбик // *Физико-химия наноматериалов и супрамолекулярных структур.* – Киев: Наук. думка, 2007. – Т. 2. – С. 357 – 391.