

# ВПЛИВ МОДИФІКОВАНИХ КАЛЬЦІЙ ФОСФАТІВ АПАТИТОВОГО ТИПУ ТА ЇХ КОМПОЗИТІВ З ФЕРИТАМИ НА ГЕМОЛІЗ ЕРИТРОЦИТІВ

Онищенко К.С.<sup>1</sup>, Котляр А.М.<sup>1</sup>, Гринюк І.І.<sup>1</sup>, Комащенко Є.О.<sup>2</sup>,  
Струтинська Н.Ю.<sup>2</sup>

<sup>1</sup>КПІ ім. Ігоря Сікорського, karinaonyshchenko@gmail.com

<sup>2</sup>Київський національний університет імені Тараса Шевченка

## Abstract

*The effect of apatite-type phosphates modified with trace elements ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ), iron and calcium carbonate anion and their composites with ferrites of divalent metals on the degree of hemolysis of erythrocytes in vitro was studied. It was found that the resistance of sheep erythrocytes to acid hemolytic after preincubation with the studied samples differed and depended on the composition and amount of the sample.*

**Keywords:** nanohydroxyapatite, erythrocytes, hemolysis, cytotoxicity, biocompatibility, nanoparticles.

**Вступ.** У зв'язку з інтенсивним розвитком нанотехнологій та зростанням їхнього значення в біології та медицині значна увага приділяється вивченню взаємодії наноматеріалів з клітинами організму, зокрема з елементами крові. Серед різноманітних наноструктур особливий інтерес викликають нанорозмірні кальцій фосфати апатитового типу або наногідроксиапатити (нано-ГАп), що характеризується високою біоактивністю та біосумісністю. Завдяки своїй структурній подібності до мінеральної фази кісткової тканини, нано-ГАп знайшли широке застосування у ортопедії, стоматології, а також у тканинній інженерії. Нано-ГАп також застосовуються у медицині, наприклад, як носії хіміотерапевтичних препаратів у цільовій терапії раку [1]. Поширеним підходом щодо впливу на функціональні властивості синтетичних матеріалів на основі кальцій фосфатів є їх легування катіонами різної природи (натрій, магній, цинк), що також передбачає необхідність оцінки їх цитотоксичності у тому числі і за умови комплексного модифікування або розробки композитів на їх основі. Ефективною моделлю *in vitro* для оцінки ефективності різних нанокompозитних матеріалів є еритроцити [2]. Одним із потенційних ризиків є здатність нано-ГАп викликати гемоліз еритроцитів — руйнування клітинної мембрани з подальшим вивільненням гемоглобіну, що може негативно впливати на гомеостаз організму [3, 4]. Тому, попри численні переваги, питання безпечності цих синтетичних наноматеріалів при контакті з кров'ю залишається актуальним.

**Метою роботи** була оцінка впливу модифікованих мікроелементами (магній, цинк, натрій), ферум та карбонат-аніоном кальцій фосфатів апатитового типу та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*.

**Матеріали та методи.** Зразки нано-ГАп було синтезовано на кафедрі неорганічної хімії КНУ імені Тараса Шевченка. Наночастинки модифікованих гідроксиапатитів та композитів на їх основі з феритом синтезували при кімнатній температурі шляхом змішування водних розчинів нітратів кальцію, двовалентного металу і феруму (III) та фосфату амонію чи його суміші з

гідрокарбонатом амонію (у випадку карбонатвмісних систем). Далі отриману суспензію перемішували 5 хв та додавали розчин амоніаку до значення рН вище 10. Отриману суміш нагрівали на піщаній бані до отримання твердого залишку з наступним його перетиранням, нагріванням до 500 °С протягом 2 годин. Отриманий порошок ретельно перетирали. Аніонний склад фосфатів підтверджено методом ІЧ-спектроскопії. Інфрачервоні спектри зареєстровані у діапазоні 400-4000 см<sup>-1</sup> з використанням спектрометра PerkinElmer Spectrum BX для зразків запресованих в таблетки з KBr [5].

Для оцінки цитотоксичної дії модифікованих нано-ГАп та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів було досліджено динаміку гемолізу еритроцитів барана, як описано в [6]. Отримані з гепаринізованої крові барана еритроцити розводили у 0,85% NaCl до екстинції 0,700 оп. од. при 630 нм на спектрофотометрі ULAB (Китай). Отриману суспензію еритроцитів інкубували упродовж 30 хв при 25 °С без добавок, або у присутності досліджуваних сполук у кількості 1–4 мМ. Гемоліз еритроцитів спричиняли внесенням у пробу HCl у кінцевій концентрації 0,001 н. Кінетику гемолізу вимірювали спектрофотометрично ( $\lambda = 630$  нм) упродовж 2 хв через кожні 10 с. Відсоток гемолізованих еритроцитів з отриманого ряду екстинцій розраховували за формулою:

$$G = \frac{D_i - D_{i-1}}{D_0 - D_\infty} \cdot 100\%,$$

де  $D$  – оптична густина,  $D_0$  та  $D_\infty$  – її початкові та кінцеві значення,  $i$  – порядковий номер вимірювання.

Досліди на тваринах проводили з дотримання вимог Європейської конвенції з захисту хребетних тварин, яких використовують з експериментальною та науковою метою (Страсбург, 1986), Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», прийнятий парламентом 21 лютого 2006 року в новій редакції, положення Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухваленого на Першому національному конгресі з біоетики (Київ, 2001) та Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (2010).

Статистичну обробку даних проводили з використанням програми Excel. Вірогідною вважали різницю середніх значень при  $p < 0,05$  за  $t$  критерієм Стьюдента.

**Результати та обговорення.** Одним з підходів оцінки цитотоксичності та гемотоксичності сполук є кислотний гемоліз еритроцитів. Резистентність еритроцитів до кислотного гемолізу дозволяє робити висновки про стан мембран еритроцитів. Дослідження резистентності еритроцитів до гемолізу у присутності модифікованих кальцій фосфатів апатитового типу може дати відомості про наявність чи відсутність у їхньому складі компонентів, що ушкоджують мембрану.

Встановлено, що резистентність еритроцитів барана до кислотного гемолітика після преінкубації із досліджуваними зразками відрізнялася та залежала від складу та кількості (1–4 мМ) зразка. Виявлено, що преінкубація

еритроцитів у присутності карбонат-вмісних зразків, зокрема кальцій фосфату апатитового типу складу  $\text{Ca}_{8.75}\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}\text{Zn}_{0.25}\text{Fe}_{0.25}(\text{PO}_4)_{5.5}(\text{CO}_3)_{0.5}(\text{OH})_2$  та композиту на основі  $\text{Ca}_{9.375}\text{Na}_{0.25}\text{Zn}_{0.25}(\text{PO}_4)_{5.5}(\text{CO}_3)_{0.5}(\text{OH})_2$  з 25 мас %  $\text{MgFe}_2\text{O}_4$  та  $\text{Ca}_{9.375}\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}(\text{PO}_4)_{5.5}(\text{CO}_3)_{0.5}(\text{OH})_2 + 25\%\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  не впливала на гемоліз еритроцитів у досліджуваних кількостях. В той час, як преінкубація еритроцитів із безкарбонатвмісними наногідроапатитом  $\text{Ca}_9\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}\text{Zn}_{0.25}\text{Fe}_{0.25}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$  та композитом  $\text{Ca}_{9.625}\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 25\%\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  у кількості 4 мМ призводила до подовження часу гемолізу на 10 с, окрім того за дії 4 мМ композиту  $\text{Ca}_{9.625}\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2 + 25\%\text{ZnFe}_2\text{O}_4$  відсоток гемолізованих еритроцитів знижувався на 16% порівняно з контролею. Такі дані свідчать, що досліджувані безкарбонатвмісні матеріали проявляють стабілізуючий вплив на мембрани еритроцитів та підвищують їх стійкість до гемолізу.

**Висновки.** Таким чином встановлено, що легування кальцій фосфатів комплексом мікроелементів (натрій, магній, цинк) та феруму (III) чи розробка композиту на їх основі з феритом магнію/цинку дозволяє одержувати матеріали, що мають стабілізуючий вплив на мембрани еритроцитів, в той час, як додаткова модифікація структури гідроапатиту карбонат-аніоном дозволяє регулювати активність синтетичного матеріалу без суттєвого впливу на клітини крові (еритроцити).

Отримані дані є важливими для подальших досліджень у галузі наномедицини та біоматеріалів, оскільки підкреслюють необхідність ретельного аналізу взаємодії наночастинок із клітинами крові при створенні медичних виробів, які будуть контактувати з кров'яним руслом — таких як імпланти, судинні протези, гемостатичні матеріали чи нанотранспортні системи для доставки лікарських препаратів.

### Список використаної літератури:

1. Application of nanohydroxyapatite in medicine—a narrative review / A. Lubojański et al. *Molecules*. 2024. Vol. 29, no. 23. P. 5628. URL: <https://doi.org/10.3390/molecules29235628>.
2. Red blood cells as an efficient *in vitro* model for evaluating the efficacy of metallic nanoparticles / R. Wadhwa et al. *Biotech*. 2019. Vol. 9, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1807-4>.
3. Nano bioceramics: properties, applications, hydroxyapatite, nanohydroxyapatite and drug delivery / A. M. Rheima et al. *Case Studies in Chemical and Environmental Engineering*. 2024. Vol. 10. P. 100869. URL: <https://doi.org/10.1016/j.cscee.2024.100869>.
4. Yedgar S., Barshtein G., Gural A. Hemolytic activity of nanoparticles as a marker of their hemocompatibility. *Micromachines*. 2022. Vol. 13, no. 12. P. 2091. URL: <https://doi.org/10.3390/mi13122091>.
5. Комащенко Є. О., Струтинська Н. Ю. Композити на основі  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{CO}_3^{2-}$ -Легованих кальцій фосфатів з феритом магнію. Хімічні Каразінські читання - 2025 (ХКЧ'25): матеріали XVII всеукраїнської наукової конференції студентів та аспірантів. Харків, 29 квітня 2025 року. С.24.
6. Астапович І.О., Коваленко О.В. Гемолітична активність модифікованих кальцій фосфатів апатитового типу та їх композитів з феритами двовалентних металів *in vitro*. *Біофізичний вісник*. 2016. № 36. С. 63–70. URL: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2016-36-08>.