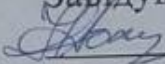


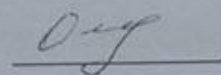
НАЦІОНАЛЬНИЙ ТЕХНІЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ УКРАЇНИ
«КИЇВСЬКИЙ ПОЛІТЕХНІЧНИЙ ІНСТИТУТ
імені ІГОРЯ СІКОРСЬКОГО»

Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

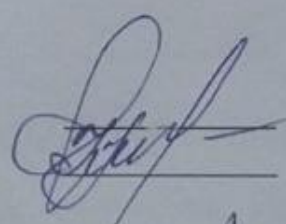
До захисту допущено:
Завідувач кафедри
 Наталія ГОЛУБ
« 3 » серпня 2025 р.

Дипломна робота
на здобуття ступеня бакалавра
за освітньо-професійною програмою «Біотехнології»
спеціальності 162 «Біотехнології та біоінженерія»
на тему: «Вплив легованих металами наногідроксиапатитів на гемоліз
еритроцитів»

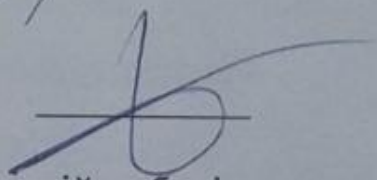
Виконала:
студентка IV курсу, групи ББ-12
Онищенко Карина Сергіївна



Керівник:
Доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики
та екобіотехнології, к.б.н., с.н.с.,
Гринюк Ірина Іванівна



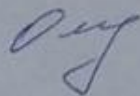
Рецензент:
Асистент кафедри промислової біотехнології
та біоінформації Хабленко Анна Дмитрівна



Засвідчую, що у цій дипломній роботі немає
запозичень з праць інших авторів без
відповідних посилань.

Студентка Онищенко Карина Сергіївна

Київ – 2025 року



Національний технічний університет України
«Київський політехнічний інститут імені Ігоря Сікорського»
Факультет біотехнології і біотехніки
Кафедра біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології

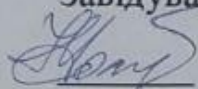
Рівень вищої освіти – перший (бакалаврський)

Спеціальність – 162 «Біотехнології та біоінженерія»

Освітньо-професійна програма «Біотехнології»

ЗАТВЕРДЖУЮ

Завідувач кафедри

 Наталія ГОЛУБ

«21» квітня 2025 р.

ЗАВДАННЯ

на дипломну роботу студенту

Онищенко Карині Сергіївні

1. Тема роботи «Вплив легованих металами наногідроксиапатитів на гемоліз еритроцитів», керівник роботи к.б.н., с.н.с., доцент кафедри біоенергетики, біоінформатики та екобіотехнології Гринюк Ірина Іванівна, затверджені наказом по університету від «29» травня 2025 р. № 1838-с
2. Термін подання студентом роботи 3 червня 2025 року _____
3. Вихідні дані до роботи: водні суспензії наночастинок гідроксиапатитів, модифікованих мікроелементами (магній, натрій, цинк), ферум та карбонат-аніоном та їх композитів з феритами двовалентних металів, еритроцити барана
4. Зміст роботи:
 - Здійснити літературний огляд за темою роботи.
 - Оцінити стійкість еритроцитів до гемолізу за умови преінкубації їх із наногідроксиапатитами, легованими Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} .

- Встановити вплив карбонатвмісних наногідроксиапатитів, легованими Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} на гемоліз еритроцитів *in vitro*.
- Дослідити вплив композитів наногідроксиапатитів з феритами на гемоліз еритроцитів *in vitro*.
- Охарактеризувати заходи охорони праці та безпеки в лабораторії.

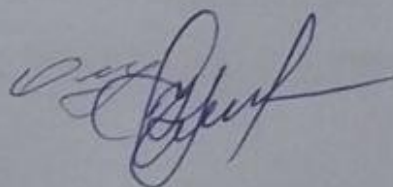
5. Перелік ілюстративного матеріалу (із зазначенням плакатів, презентацій тощо):
Презентація (А4).

6. Дата видачі завдання 21 квітня

Календарний план

| № з/п | Назва етапів виконання дипломної роботи | Термін виконання етапів роботи | Примітка |
|-------|--|--------------------------------|----------|
| 1 | Формування мети, завдань та обґрунтування актуальності теми. Опрацювання наукової літератури з теми дослідження. | 15.04.25 – 18.04.25 | виконано |
| 2 | Визначення стійкості еритроцитів до гемолізу за умови преінкубації із наногідроксиапатитами. | 23.04.25 – 28.04.25 | виконано |
| 3 | Обробка результатів, статистичний аналіз. Обговорення отриманих результатів. | 28.04.25 – 06.05.25 | виконано |
| 4 | Формулювання висновків та написання остаточного тексту. | 06.05.25 – 12.05.25 | виконано |
| 5 | Оформлення тексту дипломної роботи | 12.05.25 – 02.06.25 | виконано |
| 6 | Проведення перевірки дипломної роботи на плагіат та подання її разом із рецензією до екзаменаційної комісії | 02.06.25 – 18.06.25 | виконано |

Студент
Керівник



Карина ОНИЩЕНКО
Ірина ГРИНЮК

РЕФЕРАТ

Дипломна робота: 71 с., 11 рис., 47 посилань.

Об'єкт дослідження: еритроцити крові барана

Предмет дослідження: гемоліз еритроцитів, преінкубованих із наногідроксиапатитами, легованими Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*.

Мета роботи: оцінка впливу легованих Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} наногідроксиапатитів та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*.

Методи дослідження: спектрофотометричні, статистичні.

Результати роботи: Встановлено, що стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу після преінкубації із легованими наногідроксиапатитами залежить від їхнього хімічного складу та кількості. Наногідроксиапати, леговані Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} проявляли мембраностабілізуючий вплив на мембрани еритроцитів. Стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика за умови преінкубації їх із карбонатвмісними наногідроксиапатитами, легованими Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} виражена меншою мірою, порівняно із безкарбонатними. Композити наногідроксиапатитів з феритами (ZnFe_2O_4 , CuFe_2O_4 , MgFe_2O_4) виявили мембраностабілізуючі властивості, що проявлялися зниженням максимального рівня гемолізу еритроцитів. Серед досліджених зразків найефективніше знижував рівень гемолізу наногідроксиапатит, легований Fe^{3+} (1,3 мас.%) у кількості 1 мМ та 2 мМ — на 21,2 % і 22,3 % порівняно з контролем відповідно.

Ключові слова: ЛЕГОВАНІ МЕТАЛАМИ НАНОГІДРОКСИАПАТИТИ, ФЕРИТИ, НАНОЧАСТИНКИ, ЕРИТРОЦИТИ, ГЕМОЛІЗ *IN VITRO*

ABSTRACT

Thesis: 71 p., 11 fig., 47 references.

Object of research: Sheep blood erythrocytes

Subject of research: Hemolysis of erythrocytes preincubated with nanohydroxyapatites doped with Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} and CO_3^{2-} , as well as their composites with divalent metal ferrites, in relation to the degree of erythrocyte hemolysis *in vitro*.

Aim of the study: Evaluation of the effect of nanohydroxyapatites doped with Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , Zn^{2+} and CO_3^{2-} , and their composites with divalent metal ferrites, on the degree of erythrocyte hemolysis *in vitro*.

Research methods: Spectrophotometric, statistical.

Results: It was found that the resistance of erythrocytes to acid-induced hemolysis after preincubation with doped nanohydroxyapatites depends on their chemical composition and concentration. Nanohydroxyapatites doped with Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} , and Zn^{2+} exhibited a membranestabilizing effect on erythrocyte membranes. The resistance of erythrocytes to acid hemolysis after preincubation with carbonate-containing nanohydroxyapatites doped with the same cations was less pronounced compared to carbonate-free samples. Nanohydroxyapatite composites with ferrites (ZnFe_2O_4 , CuFe_2O_4 , MgFe_2O_4) demonstrated membranestabilizing properties manifested by a reduction in the maximum level of erythrocyte hemolysis. Among all tested samples, the most effective reduction in hemolysis was observed with Fe^{3+} -doped nanohydroxyapatite (1.3 wt%) at concentrations of 1 mM and 2 mM — by 21.2% and 22.3% compared to the control, respectively.

Keywords: METAL-DOPED NANOHYDROXYAPATITES, FERRITES, NANOPARTICLES, ERYTHROCYTES, HEMOLYSIS *IN VITRO*

ЗМІСТ

| | |
|---|----|
| ВСТУП..... | 8 |
| 1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД..... | 11 |
| 1.1 Хімічна структура та характеристика наногідроксиапатиту | 11 |
| 1.2 Порівняльна характеристика мікро- та наноформ гідроксиапатиту | 12 |
| 1.3 Методи отримання наногідроксиапатиту | 13 |
| 1.3.1 Отримання наногідроксиапатиту хімічними методами | 13 |
| 1.3.2 Отримання наногідроксиапатиту з природніх джерел..... | 15 |
| 1.4 Біосумісність наногідроксиапатитів | 17 |
| 1.5 Застосування в медицині | 19 |
| 1.5.1 Відновлення кісткової та зубної тканини | 19 |
| 1.5.2 Взаємодія наночастинок гідроксиапатиту з лікарськими речовинами | 20 |
| 1.5.3 Доставка лікарських засобів, вітамінів до органів та клітин | 22 |
| 1.5.4 Доставки великих молекул (ДНК, РНК, ферменти) у генній терапії | 23 |
| 1.6 Токсичність нано-ГАп | 24 |
| 1.7 Вплив наногідроксиапатитів на згортання крові та взаємодію з еритроцитами | 25 |
| 1.8 Гемоліз еритроцитів, як один із підходів оцінки цитотоксичності та динаміки порушення клітинної мембрани клітин | 27 |
| 1.9 Мембрана еритроцитів та її значення в нанотранспорті..... | 29 |
| 1.10 Еритроцити як носії лікарських засобів..... | 31 |
| 3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ..... | 34 |
| 2.1 Отримання модифікованих наночастинок гідроксиапатиту..... | 34 |
| 2.2 Отримання еритроцитів | 35 |
| 2.3 Оцінки гемолізу еритроцитів за дії модифікованих наногідроксиапатитів.... | 36 |
| 2.4 Етичні аспекти проведення досліджень..... | 36 |
| 2.5 Статистична оцінка результатів | 37 |
| 3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ | 38 |
| 3.1 Вплив ферумвмісних та ферумкарбонатвмісних наногідроксиапатитів на стійкість еритроцитів до гемолізу | 38 |

| | |
|--|----|
| 3.2. Вплив Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , - вмісного апатиту та Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту на стійкість еритроцитів до гемолізу..... | 45 |
| 3.3 Вплив композиту Na^+ , Mg^{2+} , композиту Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} та композиту Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 з 25% ZnFe_2O_4 на стійкість еритроцитів до гемолізу..... | 49 |
| 3.4 Вплив композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 та композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4 на стійкість еритроцитів до гемолізу..... | 55 |
| 4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ..... | 59 |
| 4.1 Ризики при роботі з хімічними речовинами..... | 59 |
| 4.2 Заходи безпеки при роботі з HCl включають:..... | 60 |
| 4.3 Біологічна безпека при роботі з еритроцитами..... | 60 |
| 4.4 Екологічні аспекти дослідження..... | 62 |
| ВИСНОВКИ..... | 64 |
| ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ..... | 66 |

ВСТУП

У зв'язку з інтенсивним розвитком нанотехнологій та зростанням їхнього значення в біології та медицині значна увага приділяється вивченню взаємодії наноструктур з клітинами організму, зокрема з елементами крові. Серед різноманітних наноструктур особливий інтерес викликають нанорозмірні кальцій фосфати апатитового типу або наногідроксиapatити (нано-ГАп), що характеризується високою біоактивністю та біосумісністю. Завдяки своїй структурній подібності до мінеральної фази кісткової тканини, нанорозмірні гідроксиapatити знайшли широке застосування у стоматології, ортопедії, а також у тканинній інженерії. Окрім того нано-ГАп становлять значний інтерес як транспортні системи для доставки лікарських препаратів завдяки їхній здатності до прицільного впливу на патологічно змінені тканини та зниження системної токсичності препаратів. Поверхня нано-ГАп містить біологічно активні іони (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^-), за допомогою яких вони можуть взаємодіяти з терапевтичними агентами [1]. Поширеним підходом щодо впливу на функціональні властивості та біологічну активність синтетичних матеріалів на основі кальцій фосфатів є їх легування катіонами різної природи. Модифікація наногідроксиapatитів катіонами (Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} , Zr^{4+}), карбонат-іонами та феритовими частинками (ZnFe_2O_4 , MgFe_2O_4 , CuFe_2O_4) дає змогу регулювати властивості матеріалу, покращувати їх біологічні властивості. 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 створення нових модифікованих наногідроксиapatитів передбачає і необхідність оцінки їх цитотоксичності у тому числі і за умови комплексного модифікування або розробки композитів на їх основі. Ефективною моделлю *in vitro* для оцінки цитотоксичності різних нанокомпозитних матеріалів є еритроцити [2]. Насьогодні також розробляються різні біотехнологічні підходи для

транспортування наночастинок за допомогою еритроцитів. Адсорбція наночастинок на поверхні еритроцита або їх інкапсуляція всередині цих клітин дозволяє «маскувати» наночастинок від імунної системи, продовжує час їхньої циркуляції в організмі та спрямовує до конкретних тканин [13, 37]. Тому дослідження впливу на еритроцити нових модифікованих зразків нано-ГАп є актуальним для оцінки їхньої безпечності та подальшого біомедичного застосування.

Мета роботи: оцінка впливу легованих Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} наногідроксиапатитів та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*.

Для досягнення мети поставлені наступні **завдання**:

1. Здійснити літературний огляд за темою роботи.
2. Оцінити стійкість еритроцитів до гемолізу за умови преінкубації їх із наногідроксиапатитами, легованими Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} .
3. Встановити вплив карбонатвмісних наногідроксиапатитів, легованими Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} на гемоліз еритроцитів *in vitro*.
4. Дослідити вплив композитів наногідроксиапатитів з феритами на гемоліз еритроцитів *in vitro*.
5. Охарактеризувати заходи охорони праці та безпеки в лабораторії.

Об'єкт дослідження: еритроцити крові барана

Предмет дослідження: гемоліз еритроцитів, преінкубованих із наногідроксиапатитами, легованими Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*.

Наукова новизна: Вперше досліджено вплив наногідроксиапатитів, легованими Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} та композитів на їх основі з феритами двовалентних металів на ступінь гемолізу еритроцитів *in vitro*. Встановлено, що стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика за умови преінкубації їх із

наногідроксиапатиами, легованими Na^+ , Mg^{2+} , Fe^{3+} та Zn^{2+} виражена більшою мірою, порівняно з наногідроксиапатитами такого складу, які додатково леговані CO_3^{2-} .

Практичне значення: результати дослідження можуть сприяти накопиченню нових знань щодо впливу легованих іонами різних металів, карбонат-аніоном наногідроксиапатитів та композитами на їх основі з феритами двовалентних металів на стійкість еритроцитів до гемолізу, а також можуть бути корисними у розробці безпечних наносистем для доставки лікарських препаратів.

Апробація

Онищенко К.С., Котляр А.М., Гринюк І.І., Комащенко Є.О., Струтинська Н.Ю. Вплив модифікованих кальцій фосфатів апатитового типу та їх композитів з феритами на гемоліз еритроцитів. Матеріали XIX Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 16 травня 2025. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025, с. 153 - 155.

Котляр А.М., Онищенко К.С., Струтинська Н.Ю. Цитотоксичність легованих металами кальцій фосфатів апатитового типу. Матеріали XIX Міжнародної науково-практичної конференції «Біотехнологія XXI століття» 16 травня 2025. Київ: КПІ ім. Ігоря Сікорського, 2025, 373 с.

1. ЛІТЕРАТУРНИЙ ОГЛЯД

1.1 Хімічна структура та характеристика наногідроксиапатиту

Гідроксиапатит є неорганічною сполукою і належить до групи кальцій-фосфатів. Назва походить від присутнього в структурі гідроксид-іону (OH^-). Якщо гідроксид замінити на інші іони, зокрема фторид, хлорид, бромід або карбонат, утворюються відповідні мінерали, такі як фторапатит, хлорапатит тощо.

На структурному рівні нано-ГАп належить до родини апатитів із загальною формулою $\text{M}_{10}(\text{ZO}_4)_6\text{X}_2$, де M, Z і X можуть бути представлені такими йонами: Ca, Sr, Ba, Cd, Pb; P, V, As, S, Si, Ge; F, Cl, OH, O, Br. У біологічних умовах структура нано-ГАп часто піддається йонному заміщенню, тому його формулу коректніше записувати як $(\text{Ca}, \text{Z})_{10}(\text{PO}_4, \text{Y})_6(\text{OH}, \text{X})_2$, де $\text{Z} = \text{Na}^+$, Mg^{2+} , K^+ , Sr^{2+} ; $\text{Y} = \text{CO}_3^{2-}$, HPO_4^{2-} ; $\text{X} = \text{Cl}^-$, F^- . Таке йонне заміщення суттєво впливає на фізико-хімічні та біологічні властивості нано - ГАп. Наприклад, карбонатовані форми (із заміною фосфатних груп на карбонатні CO_3^{2-}) мають підвищену розчинність та здатність стимулювати остеогенез, завдяки вищій локальній концентрації Ca^{2+} та PO_4^{3-} . Включення іонів CO_3^{2-} або SiO_4^{4-} також знижує кристалічність наногідроксиапатиту, що додатково покращує його біоактивність і резорбцію в тканинах [2, 34].

Він відіграє ключову роль у формуванні кісток та зубної емалі, надаючи їм міцність і стабільність. У природі цей мінерал входить до складу фосфатних руд — ущільнених мас, що складаються з мінералів і органічних речовин. Його можна добувати з природних джерел (наприклад, кістки риб і великої рогатої худоби, морські мушлі, корали, яєчна шкаралупа) або синтезувати в лабораторних умовах. Синтетичний гідроксиапатит може містити сторонні іони та мати нижчий вміст кальцію, що певною мірою впливає на його властивості, однак він зберігає високу біосумісність і безпечність для організму [22, 23].

1.2 Порівняльна характеристика мікро- та наноформ гідроксиapatиту

Гідроксиapatит представлений двома основними формами — наногідроксиapatитом та мікрогідроксиapatитом, кожна з яких має значний терапевтичний потенціал, обумовлений морфологічними та функціональними характеристиками. Наногідроксиapatит характеризується наявністю стрижнеподібних нанокристалічних частинок розміром від 20 до 100 нанометрів, які імітують структуру природної емалі, що забезпечує високий ступінь біосумісності, підвищену біологічну активність та ефективну інтеграцію з тканинами. Завдяки значно збільшеній питомій площі поверхні, дрібнокристалічній структурі та відповідності розмірів кислотній ерозії емалі, нано-ГАп демонструє покращену здатність до адсорбції білків, взаємодії з клітинними структурами, що сприяє ремінералізації, остеокондукції та зменшенню гіперестезії. Крім того, наночастинки можуть проникати у мікропори та дентинні каналці, а також взаємодіяти з бактеріальними мембранами завдяки своїм розмірам, що менші за розмір більшості мікроорганізмів, тим самим виявляючи здатність до регуляції біоплівки в ротовій порожнині та зниження бактеріального навантаження. На відміну від цього, мікрогідроксиapatит має частинки розміром 5–10 мікрометрів, які значно перевищують розміри дентинних каналців і не можуть проникати у глибокі шари емалі, обмежуючи його ремінералізувальну дію переважно до поверхневого шару. Мікро-ГАп отримують з природних джерел, таких як кісткова тканина, або шляхом осадження з кальцієвих та фосфатних солей у водно-етанольному середовищі, що забезпечує стабільну кристалічну структуру та природне співвідношення іонів кальцію і фосфату. Попри нижчу біоактивність у порівнянні з нано-ГАп, мікро-ГАп демонструє добру стабільність у водних середовищах, низький ризик системної абсорбції та пролонговане вивільнення іонів, що сприяє поступовій ремінералізації, утворенню захисного шару на поверхні

емалі та загальному зміцненню твердих тканин зуба. Також мікро-ГАп виявляє здатність до регуляції мікробного біоценозу та входить до складу засобів для догляду за ротовою порожниною, у тому числі з метою відбілювання зубів. Враховуючи вищевикладене, слід зазначити, що хоча обидві форми наногідроксиапатиту мають позитивний терапевтичний ефект, наногідроксиапатит значно перевершує мікрогідроксиапатит у аспектах глибокої ремінералізації, біодоступності та антимікробної активності [29, 32].

1.3 Методи отримання наногідроксиапатиту

1.3.1 Отримання наногідроксиапатиту хімічними методами

Синтез наногідроксиапатиту здійснюється переважно двома основними методами: сухим та мокрим. Сухий метод полягає у змішуванні тонкодисперсних прекурсорів із подальшою термічною обробкою, що забезпечує високий рівень кристалічності кінцевого продукту. Проте він вимагає суворого контролю чистоти реагентів та застосування високих температур, які можуть спричинити зниження пористості порошку. Мокрі методи синтезу, включаючи золь-гель, вологе хімічне осадження, гідротермальний синтез, емульсійні системи та мікрохвильовий синтез, проводяться у водних або органічних середовищах. Ці методи дозволяють більш детально контролювати морфологічні та структурні характеристики наночастинок, а також підвищувати вихід продукту. Однак, їх застосування іноді супроводжується утворенням побічних фосфатних фаз і зниженням кристалічності [20,21].

Ключовим параметром при синтезі наногідроксиапатиту є співвідношення кальцію до фосфату (Ca/P), яке у стехіометричного ГА дорівнює 1,67. Відхилення від цього значення призводить до формування домішкових фаз, зокрема β -трикальційфосфату та оксиду кальцію (CaO). Концентрація реагентів визначає кількість зародкових частинок і розмір зерен: при високих концентраціях утворюється дрібнодисперсний матеріал. Температура є ключовим фактором, що

впливає на розмір і морфологію зерен гідроксиапатиту, оскільки визначає швидкість хімічних реакцій, нуклеації та кристалізації. Зі зростанням температури підвищується реакційна здатність системи, однак одночасно посилюється ріст зерен, що сприяє агрегації наночастинок. У дослідженні Юньцзін та співавт. Нано-ГАп отримували з використанням термічної обробки при 200–900°C. Встановлено, що при 200°C продукт мав низьку кристалічність, а морфологія частинок відповідала голчастим або стрічкоподібним формам. Ляньфен з колегами досліджували синтез нано-ГАп при 25, 40, 60 та 90°C і відзначили, що з підвищенням температури кристалічність та розмір частинок зростали (в межах 25–60°C), а при 90°C формувалися наночастинки стрижневої морфології. Згідно з даними Родрігеса-Лоренцо та Валле-Регі, зі збільшенням температури в межах 25–90°C розмір зерен зростав від 20 до 80 нм, тоді як питома поверхня зменшувалась. Зерна, синтезовані при 25°C, мали розміри, співставні з кістковою тканиною людини, тоді як при 90°C – з емаллю зубів [20].

Серед мокрих методів найбільш поширеним є метод вологого хімічного осадження, який відзначається простотою, економічністю та екологічною безпекою (водою як єдиним побічним продуктом). Даний метод дозволяє регулювати умови синтезу (температуру, рН, час реакції), що істотно впливає на морфологію і кристалічність отриманого гідроксиапатиту. Гідротермальний синтез забезпечує формування висококристалічних порошків із однорідним складом без необхідності використання поверхнево-активних речовин. Контроль рН та концентрації іонів дозволяє формувати різноманітні морфології, такі як нанодропи, нанострижні та мікросфери. Цей метод є перспективним для отримання легованих апатитових матеріалів із покращеними властивостями для медичного застосування. Емульсійні та мікроемульсійні методи базуються на використанні двофазних систем, у яких дисперсна фаза утворює сприятливі умови для синтезу наночастинок з однорідним розміром і великою площею поверхні. Особливо мікроемульсійний метод забезпечує термодинамічну стабільність, контроль морфології та запобігання

агрегації частинок, що є важливим для отримання сферичних наночастинок, актуальних у біомедицині. Золь-гель метод цінується за можливість отримання високочистих керамічних порошків із дрібнозернистою мікроструктурою за відносно низьких температур. Він широко застосовується для формування тонкоплівкових покриттів біомедичних імплантатів, забезпечуючи альтернативу традиційним технологіям наплення. Цей метод характеризується високою реакційною здатністю, можливістю роботи при кімнатній температурі та відсутністю потреби у подрібненні продукту. Мікрохвильовий синтез являє собою швидкий та енергоефективний підхід, що забезпечує внутрішній та об'ємний нагрів, сприяючи утворенню висококристалічних матеріалів за короткий час. Контроль параметрів, таких як потужність, тривалість експозиції та температура, дозволяє отримувати наноматеріали з однорідною структурою, що робить цей метод перспективним для масштабного виробництва [20,21,35].

1.3.2 Отримання наногідроксиапатиту з природних джерел

Наногідроксиапатит може бути ефективно отриманий з природних джерел, що є актуальним з огляду на екологічну доцільність і високу біосумісність матеріалу. Одним із найпоширеніших джерел є кістки тварин (велика рогата худоба, свині, птахи, риби), які після видалення органічних компонентів і термічної обробки (600–1000 °C) забезпечують отримання нано-ГАп з високим ступенем кристалічності. Такий матеріал містить мікроелементи, зокрема магній і натрій, що можуть покращувати остеокондуктивні властивості. Шкаралупа курячих яєць, багата на карбонат кальцію, також є ефективним джерелом. Після хімічної реакції з фосфатами вона трансформується у гідроксиапатит з високою чистотою та стабільністю. Перспективними є також риб'ячі кістки, луска і морські раковини (мідії, устриці), з яких шляхом термічної чи хімічної обробки отримують нано-ГАп з добрими біоактивними властивостями. Корали, завдяки природній пористості,

після модифікації можуть слугувати джерелом гідроксиапатиту для тканинної інженерії [30, 31].

Легування наночастинок гідроксиапатиту (нано-ГАп) є ефективним способом подолання його обмежень і поліпшення властивостей, особливо для інтеграції з полімерними матрицями та іншими біоматеріалами. Це підвищує стабільність дисперсії та оптимізує взаємодію між наночастинками і середовищем, що важливо у композитних системах. Сучасні дослідження зосереджені на поверхневих модифікаціях нано-ГАп за допомогою полімерів та органічних сполук, таких як силанові агенти, стеаринова кислота, хітозан, пептиди RGD, що покращує сумісність і біоактивність матеріалу. Легування іонами металів, зокрема сріблом (Ag^+), цинком (Zn^{2+}), магнієм (Mg^{2+}) і стронцієм (Sr^{2+}), сприяє покращенню регенерації кісткової тканини та метаболізму, підвищуючи остеоіндуктивність і антимікробні властивості. Наприклад, Sr^{2+} стимулює диференціацію остеобластів та ангиогенез, а Ag^+ забезпечує захист від інфекцій, що робить ці леговані нано-ГАп особливо перспективними для імплантатів. Стронцій, хімічно близький до кальцію, сприяє формуванню і ремоделюванню кісток, хоча його надлишок може порушувати процеси метаболізму. Легування Sr^{2+} покращує біоактивність нано-ГАп, підвищує адгезію клітин і стимулює утворення кісткової тканини. Цинк, необхідний для багатьох ферментів, підтримує синтез колагену та активність лужної фосфатази, сприяючи остеогенезу та пригнічуючи резорбцію кісток. Zn-ГАп демонструє антибактеріальні властивості, але ефект залежить від концентрації іонів цинку. Іони Zn^{2+} також стимулюють клітинний поділ і знижують оксидативний стрес [21].

Магній є ключовим елементом для розвитку та підтримки кісток, де його дефіцит викликає зниження міцності тканини. Mg-ГАп підвищує мінералізацію і остеointegraцію імплантатів, а також покращує антибактеріальні властивості за рахунок зміни шорсткості поверхні і пористості. Срібло відоме своєю антимікробною активністю завдяки впливу на бактеріальні мембрани та

порушенню енергетичних процесів у мікроорганізмів. Ag-ГАп ефективно бореться з різними бактеріями, а контрольовані концентрації іонів Ag^+ мінімізують цитотоксичність. Йони міді в легованому наногідроксиапатиті сприяють підвищенню остеогенезу (утворення кісткової тканини) та ангіогенезу (утворення нових кровоносних судин), що значно покращує регенерацію кісткових дефектів завдяки стимуляції проліферації клітин та експресії відповідних генів і білків. Наногідроксиапатит, легований наночастинками оксиду заліза, стимулює остеогенез, пригнічує остеокластогенез, проявляє протизапальні властивості та демонструє підвищену ефективність у магнітному полі, що робить його перспективним матеріалом для відновлення кісткової тканини при остеопорозі. [21, 26].

1.4 Біосумісність наногідроксиапатитів

Наногідроксиапатит є біоактивною, остеопровідною та біосумісною керамічною речовиною, здатною до прямого з'єднання з живими тканинами. У природних тканинах він забезпечує механічну міцність, будучи основним мінеральним компонентом. У порівнянні з полімерними, ліпосомальними та іншими неорганічними носіями, нано-ГАп має кілька важливих переваг: вищу біосумісність, рН-залежну розчинність, стабільність структури та нижчу токсичність. Зокрема, він є стабільнішим за ліпосоми й міцели, які можуть втрачати структурну цілісність при певних концентраціях, та менш токсичним, ніж наночастинки SiO_2 , TiO_2 , квантові точки, вуглецеві нанотрубки та магнітні наночастинки. Незважаючи на певні суперечки щодо безпечності неорганічних наночастинок, нано-ГАп демонструє значно кращу біосумісність і здатність до біорозкладу порівняно з багатьма з них. Завдяки цим властивостям нано-ГАп тривалий час залишається об'єктом активних досліджень у галузі біоматеріалознавства, тканинної інженерії та контролю вивільнення лікарських

засобів. Низька розчинність у фізіологічному середовищі дозволяє використовувати його як носій для локального вивільнення препаратів шляхом хірургічного чи ін'єкційного введення, а його стабільність і безпечність забезпечують тривале перебування в організмі [2].

Дослідження свідчать, що нано-ГАп можуть проникати в клітини, взаємодіяти з біомолекулами та індукувати токсичні ефекти на клітинному, субклітинному та білковому рівнях. Одним із ключових параметрів, що визначає поведінку частинок в організмі, є їх розмір. Зокрема, частинки розміром понад 500 нм осідають поблизу судинних стінок під дією гравітації, тоді як наночастинки менші за 500 нм розподіляються за броунівським рухом. Частинки менші за 10 нм мають здатність до швидкого виведення через нирки, тоді як більші за 200 нм можуть накопичуватись у селезінці або захоплюватися фагоцитами. Таким чином, найбільш придатним для біомедичних цілей є розмірний діапазон 10–100 нм, що забезпечує ефективну циркуляцію в крові та мінімізує ризик небажаного накопичення. Форма наночастинок також суттєво впливає на їхню біологічну активність. Сферичні наночастинки мають кращі гідродинамічні властивості, що сприяє їхній рівномірній дисперсії у кровотоці, однак вони швидше піддаються фагоцитозу. Паличкоподібні та пластинчасті частинки, навпаки, менш активно поглинаються макрофагами, що дозволяє їм довше перебувати в організмі. Іншим важливим параметром є пористість наночастинок. Мезопористі матеріали з розміром пор 2–50 нм мають великий об'єм пор і здатні ефективно утримувати молекули лікарських засобів. Функціоналізація їх поверхні специфічними лігандами покращує цільову доставку та контрольоване вивільнення терапевтичних агентів. Особливий інтерес становлять порожнисті наноструктури гідроксиапатиту, зокрема у формі сфер або нанотрубок, які демонструють вищу ефективність інкапсуляції лікарських засобів. Такі структури зазвичай отримують методом шаблонного синтезу, який дозволяє сформувати внутрішній простір

після видалення матриці. Це забезпечує можливість завантаження значної кількості лікарських речовин, а також контроль за їх вивільненням [3, 43].

1.5 Застосування в медицині

1.5.1 Відновлення кісткової та зубної тканини

Гідроксиапатит відіграє ключову роль у забезпеченні міцності та підтримки кісткової та зубної тканини. У складі зубів він становить 70–80% і представлений великими кристалами, впорядкованими білками матриксу, які формують основу для процесів мінералізації та демінералізації емалі. У кістках гідроксиапатит представлений у вигляді нанокристалів голкоподібної та пластинчастої форми, що впорядковані в сітку з колагену I типу, забезпечуючи механічну стабільність і жорсткість скелета [23].

Гідроксиапатит відіграє ключову роль у процесах регенерація кісток завдяки участі в двох основних механізмах [24]:

- **Остеоіндукція** — механізм, що сприяє утворенню нової кістки шляхом диференціації незрілих клітин у преостеобласти, які беруть участь у побудові кісткової тканини.
- **Остеокондукція** — процес, за якого остеогенні клітини здатні переміщуватись по каркасу або поверхні імплантату, поступово заміщаючи його новоутвореною кісткою.

Таким чином, гідроксиапатит посилює регенерацію кісток, підвищуючи остеокондуктивні й остеоіндуктивні властивості біоматеріалів, до складу яких входить [24, 33].

1.5.2 Взаємодія наночастинок гідроксиапатиту з лікарськими речовинами

Наночастинки гідроксиапатиту (нано-ГАп, або нано-ГАп) активно досліджуються як перспективні носії для доставки лікарських препаратів завдяки їх високій біосумісності, спорідненості до біомолекул (ДНК, білків, ліків) і здатності до контрольованого вивільнення. Адсорбційна здатність нано-ГАп залежить від площі поверхні, пористості, рН середовища та наявності функціональних груп. Особливо ефективними є мезопористі частинки, які забезпечують високу ємність завантаження та пролонговане вивільнення препаратів. Розмір частинок суттєво впливає на ефективність доставки: наночастинки (~100 нм) адсорбують більше біомолекул, ніж мікрочастинки, через більшу питому площу поверхні. Висока пористість і контрольований розмір пор сприяють ефективній взаємодії з біомолекулами через електростатичні та гідрофобні сили. Основні механізми приєднання лікарських речовин включають ковалентне зв'язування та фізичні взаємодії. Вибір механізму залежить від хімічної природи препарату. Крім того, на ефективність зв'язування впливають розчинність нано-ГАп, швидкість його деградації та дзета-потенціал [16, 17].

Мезопориста структура мікросфер нано-ГАп дозволяє ефективно здійснювати контрольоване вивільнення антибіотиків у зоні інфекції. Наприклад, композити на основі коралового нано-ГАп використовуються для доставки аміноглікозидів (амікацин, гентаміцин), які можуть вивільнитися повністю протягом 48 годин. Полімерне покриття, зокрема поліетиленгліколь (PEG), подовжує час дії антибіотиків. Ванкоміцин, глікопептидний антибіотик, застосовується для лікування важких інфекцій кісток і післяопераційних ускладнень. Його доставку реалізують за допомогою PLA-мікрокапсул, які забезпечують вивільнення до 12 тижнів. Пористі блоки нано-ГАп з ванкоміцином

ефективні при лікуванні хронічного остеомієліту, зокрема спричиненого стійкими до антибіотиків бактеріями MRSA [16, 17].

Також досліджується доставка інших антибіотиків:

- Фторхінолони (ципрофлоксацин): вивільнення залежить від розміру мікросфер.
- β -Лактами (ампіцилін, цефалоспорини): ампіцилін інкапсулюється з фосфатидилхоліном, хітозаном, колагеном або PLA, а цефалоспорини іммобілізуються разом із нано-ГАп на титанових імплантатах для антимікробного захисту.

Пориста структура нано-ГАп підходить для доставки нестероїдних протизапальних препаратів (індометацин, аспірин, напроксен, ібупрофен), забезпечуючи їх повільне та контрольоване вивільнення. Ліпосомальне покриття особливо ефективне для покращення розчинності ліпофільного індометацину.

- Вітамін D₃ інкапсулюють у композити нано-ГАп з PLGA, що дозволяє тривалу доставку при лікуванні остеопорозу.
- Вітамін K₂ швидко вивільняється з нано-ГАп у кислому середовищі, що сприяє високій біодоступності.

Наночастинки гідроксиапатиту активно досліджуються як системи контрольованої доставки завдяки своїй біосумісності, біорозкладності та схожості з мінеральним компонентом кісткової тканини. Модифікація їх поверхні полімерними оболонками дозволяє спрямовано впливати на фармакокінетику та біорозподіл препаратів після внутрішньовенного введення. У дослідженні синтезували три типи частинок: немодифіковані нано-ГАп, нано-ГАп з покриттям хітозаном (ГА/Ch) і нано-ГАп з покриттям хітозан–PLGA (нано-ГАп/Ch-PLGA). Характеризація (XRD, FTIR, електронна мікроскопія, ζ -потенціал) підтвердила успішну функціоналізацію наночастинок діаметром ~ 70 – 72 нм. FTIR-аналіз виявив стабілізуючі водневі зв'язки між функціональними групами хітозану та нано-ГАп. Радіомічення ізотопом ¹²⁵I показало стабільність частинок у біологічних

середовищах *in vitro*. *In vivo* дослідження засвідчили, що полімерне покриття впливає на органоспецифічний розподіл: нано-ГАп — в печінку, нано-ГАп/Ch — у селезінку, нано-ГАп/Ch-PLGA — у легені. Покриті частинки затримувались в організмі понад 24 години, свідчачи про пролонговану циркуляцію. Хітозан, як природний біополімер із протимікробними й протипухлинними властивостями, посилює функціональність системи, а додавання PLGA дозволяє спрямувати дію на окремі органи. Таким чином, полімерні покриття на основі нано-ГАп є ефективним підходом для створення систем цільової доставки терапевтичних засобів [18].

1.5.3 Доставка лікарських засобів, вітамінів до органів та клітин

У клінічній практиці нано-ГАп використовують, зокрема, для перенесення нестероїдних протизапальних препаратів (НПЗП), таких як індометацин, аспірин, напроксен та ібупрофен. Їх інкапсулюють у наносфери або таблетовані форми з контролем вивільнення залежно від пористості носія. Наприклад, для зменшення швидкості вивільнення ліпофільного індометацину застосовують ліпосомальне покриття навколо нано-ГАп, що дозволяє продовжити дію препарату та водночас зберегти остеокондуктивний ефект матеріалу. Окрім препаратів, перспективним напрямом є доставка вітамінів до кісткової тканини. Зокрема, композити на основі гідроксиапатиту з полімолочною та гліколевою кислотами, збагачені вітаміном D₃, демонструють пролонговане вивільнення, що важливо для тривалого лікування остеопорозу. Водночас система доставки вітаміну K₂ у вигляді апатит-колагенового композиту сприяє активації остеобластів і відновленню кісткової тканини. У кислому середовищі, характерному для ділянок резорбції кістки, вивільнення вітаміну відбувається швидше, що підвищує ефективність лікування [4].

Наночастинки гідроксиапатиту мають низку переваг для використання в лікуванні раку: вони подібні за хімічним складом і кристалічною структурою до

кісткової тканини, стабільні у різних фізико-хімічних умовах, можуть бути функціоналізовані поверхнево зарядженими молекулами та леговані різними елементами для отримання спеціальних електричних, магнітних та оптичних властивостей. Особливо перспективними є мезопористі наночастинки із розміром пор 2–50 нм, що забезпечують ефективне завантаження і контрольоване вивільнення протипухлинних препаратів. рН-чутливі нано-ГАп, часто у вигляді «ядро-оболонка», демонструють покращену доставку препаратів, таких як доксорубіцин, у ракові клітини. Біополімерні покриття також сприяють покращенню біоактивності і контрольованому вивільненню ліків [20].

Легування нано-ГАп терапевтичними іонами (наприклад, Eu^{3+} , Er^{3+} , Fe , Mn , Se) змінює їх фізико-хімічні властивості, підвищуючи їх терапевтичний і діагностичний потенціал. Леговані нано-ГАп можуть поєднувати лікування і візуалізацію пухлин, що особливо актуально для радіоізотопів (^{89}Sr , ^{32}P , ^{159}Gd), які використовуються для внутрішньої радіотерапії з мінімальним пошкодженням здорових тканин. Спільне легування Eu^{3+} та Gd^{3+} покращує люмінесцентні властивості наночастинок, що забезпечує високу біосумісність і ефективність візуалізації *in vivo*. Функціоналізація поверхні нано-ГАп лігандами, чутливими до рН, дозволяє цілеспрямовану доставку лікарських засобів у пухлинні клітини [19].

1.5.4 Доставка великих молекул (ДНК, РНК, ферменти) у генній терапії

Генна терапія має значний потенціал у лікуванні раку, спадкових захворювань та тканинної інженерії, однак її ефективність обмежується швидким руйнуванням нуклеїнових кислот у фізіологічних рідинах. Вірусні вектори, хоча й ефективні, мають недоліки, зокрема імуногенність і високий ризик канцерогенезу. Невірусні вектори, зокрема на основі ліпідів і полімерів, є альтернативою, але їхня цитотоксичність залишається проблемою. Наночастинки гідроксиапатиту вважаються безпечним і перспективним варіантом для доставки нуклеїнових

кислот завдяки їхній біосумісності та здатності ефективно конденсувати ДНК і РНК. Дослідження останніх десятиліть підтвердили ефективність нано гідроксиапатиту у трансфекції клітин *in vitro* та *in vivo*, що робить їх перспективним вектором для генної терапії [5, 44].

Окрім того, багато терапевтичних засобів, таких як ДНК, РНК та ферменти, є великими та зарядженими молекулами. Ці характеристики ускладнюють їх проникнення через клітинні мембрани. Покращити доставку ліків можна за допомогою наногідроксиапатитів. Відомо, що вони здатні поглинати біоактивні речовини, переносити їх та мають властивість поступового розкладу, що забезпечує тривале вивільнення ліків, покращуючи їх ефективність. Знайним побічним ефектом при використанні протипухлинних препаратів є пошкодження кісткового мозку. При розробці нових методів лікування раку враховуються два ключові аспекти: створення ліків, що спеціально націлені на ракові клітини та підвищення ефективності та зменшення побічних ефектів препаратів, що вже існують. Одним з підходів є цільова доставка протипухлинних засобів, що дозволяє зменшити побічні ефекти за допомогою наногідроксиапатитних матеріалів. Для цього застосовуються апатитозалежні матеріали та їх похідні. Завдяки механічній міцності гідроксиапатити можуть частково видаляти кісткову тканину з наступним її заповненням [6].

1.6 Токсичність нано-ГАп

Попри значний біомедичний потенціал наногідроксиапатиту, важливо враховувати його цитотоксичні властивості, зокрема здатність індукувати гемоліз еритроцитів. нано-ГАп можуть проявляти мембранотоксичну дію, що може обмежувати його застосування без попередньої оцінки біосумісності та відповідної модифікації поверхні наночастинок.

З токсикологічних досліджень відомо, що клітини печінки та нирок здатні поглинати наногідроксиапатити. Було виявлено, що після внутрішньовенного введення мічених радіоактивними ізотопами наночастинок вони поширювалися кровотоком і найбільше накопичувалися в легенях, печінці та селезінці, залишаючись там понад місяць. Інші дослідження засвідчили токсичний вплив на печінку, селезінку й нирки, що оцінювали за рівнем AST, ALT, ALP і азоту сечовини у крові. Дослідження показали, що внутрішньовенне введення паличкоподібних наногідроксиапатитів значно підвищувало ці показники у кроликів. Водночас внутрішньоочеревинне введення наночастинок у щурів не змінювало біохімічних маркерів, але спричиняло апоптоз клітин печінки та ниркового епітелію. Композит наногідроксиапатитів - хітозан викликав підвищення рівнів креатиніну і загального білірубіну в крові щурів, а також апоптоз у тканинах печінки й нирок, але без запалення чи некрозу після восьмижневого введення [4].

Гідроксиапатити значно пригнічують проліферацію та інвазію клітин гліоми, індукує апоптоз і зупинку клітинного циклу G₂/M. Його дія супроводжується зниженням рівня антиапоптотичного білка Bcl-2 та активацією каспаз-3 і -9. Ключовим механізмом є пригнічення сигнального шляху NF-κB, що призводить до зниження експресії онкогенних білків (Cox-2, сурвівін, VEGF) та накопичення активних форм кисню (АФК). Дослідження також показали, що нано-ГАп може підсилювати протипухлинний ефект хіміо- та променевої терапії, а також мати протизапальні властивості [4].

1.7 Вплив наногідроксиапатитів на згортання крові та взаємодію з еритроцитами

Наногідроксиапатити, завдяки своїм фізико-хімічним властивостям — розміру, заряду, форми та хімічного складу — впливають на згортання крові та взаємодію з еритроцитами. Дослідження показали, що наночастинок здатні

проникати в клітини, змінювати їхню функціональність і активувати ферменти згортального каскаду. Зокрема, встановлено, що наногідроксиапатити можуть активувати внутрішній шлях коагуляції, сприяючи тромбоутворенню. Інші дані свідчать, що позитивно заряджені частинки викликають агрегацію еритроцитів через електростатичну взаємодію з їх негативно зарядженою мембраною, утворюючи порожнини в мембрані без розвитку гемолізу. Одним із важливих показників безпеки наноматеріалів є їхній вплив на еритроцити. У разі ушкодження мембрани еритроцитів наночастинками відбувається гемоліз — руйнування клітини з виходом гемоглобіну в навколишнє середовище. На інтенсивність цього процесу впливають розмір, форма, заряд поверхні, концентрація частинок, хімічний склад, а також походження еритроцитів (людські чи тваринні), тип стабілізатора (EDTA, гепарин) та тривалість контакту наночастинок з клітинами. Наприклад, частинки, модифіковані ферумом або цинком, можуть чинити сильніший вплив на мембрани еритроцитів [1].

Всі клітинні мембрани мають схожу будову — основу становить ліпідний бішар, у який інтегровані або на поверхні прикріплені білкові молекули. У складі еритроцитів людини приблизно 49 % припадає на білки і 44 % — на ліпіди. Біологічні мембрани виконують низку важливих функцій: вони слугують бар'єром, забезпечують транспорт іонів (K^+ , Na^+ , Ca^{2+}), підтримують осмотичний баланс, формують потенціали спокою й дії, взаємодіють з гормонами і біологічно активними речовинами, а також беруть участь у внутрішньоклітинній сигнальній передачі. Порушення будь-якої з цих функцій може спричинити зміни у діяльності клітини або навіть її загибель. Оскільки структура мембран у різних клітин подібна, а реакція на хімічні речовини типова, окремі клітини часто використовують як модельні системи для оцінки токсичної дії шкідливих агентів. Еритроцити є зручною моделлю для експериментальних і клінічних досліджень через їхню високу чутливість до хімічних речовин. Це дозволяє не лише визначати специфіку впливу різних агентів, а й вивчати залежність морфофункціональних змін клітин

від рівня токсичності. Пошкодження мембран еритроцитів призводить до порушення їх функціонування і зниження стійкості до фізичних і хімічних факторів. Характер таких змін значною мірою залежить від властивостей токсичної речовини, що робить еритроцити ефективною моделлю для вивчення механізмів токсичності [9, 42].

1.8 Гемоліз еритроцитів, як один із підходів оцінки цитотоксичності та динаміки порушення клітинної мембрани клітин

Одним з підходів для дослідження є вивчення впливу кислотного гемолізу на еритроцити, що дозволяє оцінити динаміку порушення клітинної мембрани.

Гемоліз — це процес порушення цілісності мембрани еритроцитів із подальшим вивільненням внутрішньоклітинного вмісту, зокрема гемоглобіну, у навколишнє середовище. Він може виникати під дією різних чинників, таких як хімічні речовини, фізичні впливи, токсини, імунні реакції або наноматеріали. У токсикологічних дослідженнях гемоліз широко застосовується як модель для оцінки мембранотоксичності різних агентів, включаючи наночастинки. Руйнування еритроцитів з вивільненням гемоглобіну в плазму можна фіксувати за допомогою спектрофотометричного або колориметричного методу. Визначення рівня гемолізу проводять шляхом вимірювання оптичної густини гемоглобіну в супернатанті після центрифугування кров'яної суспензії, інкубованої з тестованою речовиною. Рівень гемолізу відображає ступінь пошкодження мембрани еритроцитів і є важливим показником біосумісності матеріалів, які вводяться в організм. За фізіологічних умов еритроцити мають стабільну мембрану, що забезпечує їх цілісність та основну функцію — транспорт кисню. Пошкодження мембрани призводить до виходу цитозольного вмісту в плазму крові. Основним компонентом, що вивільняється при гемолізі, є гемоглобін — білок, який становить близько 97 % вмісту еритроцита і відповідає за перенесення кисню та вуглекислого газу в організмі. Значний гемоліз

порушує нормальний газообмін і може викликати функціональні розлади тканин, що потенційно загрожує здоров'ю організму [12, 41].

У нормальних умовах еритроцити мають високу стійкість до осмотичних, механічних, хімічних і температурних впливів, але ця стійкість знижується з віком. Коли вона падає нижче критичного рівня, настає гемоліз. Існують різні типи гемолізу, які залежать від конкретного чинника: осмотичний, механічний, хімічний, температурний, імунний та інші. Для оцінки мембранотоксичної дії хімічних речовин ефективним і простим методом є визначення кислотного гемолізу еритроцитів. Цей метод базується на аналізі динаміки гемолізу під впливом слабкої кислоти, визначенні часу до максимального і повного гемолізу, а також розрахунку індексу стійкості клітин. Кислотний гемоліз є одним із поширених методів оцінки стійкості клітинних мембран еритроцитів до дії слабокислого середовища. Суть методу полягає в інкубації еритроцитів у розчині з низьким значенням рН, що спричинює порушення цілісності мембрани та послідовне вивільнення гемоглобіну у зовнішнє середовище. Динаміка гемолізу фіксується шляхом вимірювання оптичної густини, що дає змогу визначити час початку, максимального та повного гемолізу [10, 40].

Оцінка гемолітичної стійкості еритроцитів відображає їх структурно-функціональний стан і чутливість до пошкоджень, широко застосовується як у дослідженнях так і у клінічній практиці. Найпоширенішим методом є тест на кислотний гемоліз, що виявляє порушення мембранної стабільності. Проте традиційна інтерпретація результатів часто складна і має обмежену діагностичну цінність. Перспективним є аналіз кислотних еритрограм — динаміки зміни оптичної густини зразка, що дозволяє виділяти популяції еритроцитів із різною резистентністю і виявляти порушення циркуляції клітин, важливі для оцінки серцево-судинних захворювань. У хворих на ІХС спостерігається зниження гемолітичної стійкості та зміна співвідношення клітин за тривалістю життя, що свідчить про порушення гомеостазу, оксидативний стрес і мембранну

нестабільність. Автоматизація аналізу еритрограм відкриває можливості для впровадження комп'ютеризованих систем підтримки клінічних рішень, лабораторій на чипі та експрес-діагностики у медзакладах. Отже, метод кислотного гемолізу з автоматизованою обробкою є перспективним інструментом для діагностики та моніторингу стану пацієнтів із патологіями крові [11].

Науковий комітет з безпеки споживачів (SCCS) визначив тест на гемоліз як обов'язковий для оцінки безпеки продуктів, призначених для споживання людиною. Цей тест дозволяє виявити здатність речовин чи матеріалів викликати ушкодження еритроцитів, що є ключовим показником їхньої токсичності. Згідно зі стандартами Американського товариства з випробувань і матеріалів (ASTM), рівень гемолізу нижче 5 % вважається відсутнім або незначним. Гемоліз на рівні 5–10 % оцінюється як низький, що свідчить про помірний, але не критичний вплив на мембрани еритроцитів. Значення понад 10 % вказує на виражене руйнування клітинних мембран і підвищену токсичність досліджуваного агента [12].

1.9 Мембрана еритроцитів та її значення в нанотранспорті

Мембрана еритроцита відокремлює клітину від оточення та гарантує її життєздатність. Цілісність цього ліпідно-білкового шару визначає форму, розмір і здатність еритроцита до деформації. Порушення структури мембрани — зокрема внаслідок дефіциту АТФ або змін у складі білків — знижує її еластичність і прискорює руйнування клітини. Характерна дискоїдна форма еритроцита обумовлена надлишком площі мембрани щодо об'єму клітини, що забезпечує високу деформованість та стійкість до змін осмотичного тиску [13, 36].

Основні функції мембрани еритроцита:

- Транспорт глюкози і забезпечення її метаболізму через анаеробний гліколіз;

- Регуляція іонного гомеостазу за допомогою катіонзалежних АТФаз;
- Платформа для взаємодії з наноматеріалами, що дозволяє використовувати еритроцити як носії наночастинок.

1.9.1 Еритроцити як носії наночастинок

Наночастинки розміром 10–100 нм широко застосовують у фармацевтиці для доставки лікарських засобів. Їхні властивості — проникність, стабільність і швидкість вивільнення ліків — можна змінювати, коригуючи розмір і форму. Проте полімерні носії типу PLGA мають обмеження: короткий час циркуляції в крові та потенційну токсичність [13].

Прикріплення наночастинок до еритроцитів або їх інкапсуляція всередині клітини дозволяє «маскувати» частки від імунної системи, продовжувати їхню циркуляцію та спрямовувати до конкретних тканин [13].

1. Адсорбція на поверхні еритроцита
НЧ фіксуються на мембрані за допомогою лігандів, системи авідин–біотин, реакцій антиген–антитіло та інших зв'язувальних механізмів. Це знижує імуногенність і підвищує специфічність доставки.

2. Інкапсуляція всередині еритроцита
Метод захищає наночастинки від зовнішніх чинників, зменшує їхню токсичність і забезпечує контрольоване вивільнення лікарських агентів. Основні підходи включають гіпотонічну обробку, електропорацію, індукований ендоцитоз або злиття з ліпідними везикулами.

Механізми завантаження наночастинок:

- Пасивний транспорт — перенесення за градієнтом концентрації через водні канали мембрани.

- Активний транспорт — енергозалежне включення через мембранні білки.
- Поверхнева взаємодія — зв'язування наночастинок із зовнішнім шаром мембрани [13, 37].

1.10 Еритроцити як носії лікарських засобів

Еритроцити, або червоні кров'яні тільця, є найчисельнішими клітинами крові, основною функцією яких є транспорт кисню. Завдяки своїм фізіологічним властивостям — біосумісності, низькій імуногенності, високій деформованості та здатності до тривалого циркулювання в кров'яному руслі — вони розглядаються як перспективні носії лікарських засобів і наночастинок. Їхня мембрана містить низку функціонально активних білків, задіяних у метаболічних процесах, антиоксидантному захисті, імунній регуляції та транспорті речовин, що робить еритроцити зручною платформою для створення таргетованих систем доставки. Одним із найбільш поширених підходів до завантаження еритроцитів є гіпотонічний метод, за якого створення тимчасових пор у мембрані забезпечує проникнення необхідних речовин усередину клітини. Після цього відновлення ізотонічних умов дозволяє стабілізувати мембрану. Проте цей метод має обмеження: порушення цілісності клітини може спричинити гемоліз і зниження життєздатності еритроцитів. Важливою проблемою при використанні еритроцитів як носіїв є імунна сумісність, пов'язана з наявністю групоспецифічних антигенів на поверхні клітин. Несумісність між донорами й реципієнтами може призвести до аглютинації або гемолізу. Тому доцільно застосовувати аутологічні еритроцити, отримані безпосередньо від пацієнта. Перспективним напрямом є ферментативна модифікація антигенів еритроцитів, наприклад, перетворення клітин групи В на універсальну групу 0. Однак для клітин групи А ефективність такого підходу поки що залишається низькою. Крім гіпотонічного підходу, досліджуються інші методи

завантаження, зокрема гіперосмотичне навантаження, електропорація, а також ендоцитоз, індукований хімічними або фізичними чинниками. Незважаючи на їх потенціал, усі ці методи вимагають ретельного контролю умов через ризик ушкодження клітин, зміни внутрішньоклітинного тиску та можливість мікробного забруднення. Альтернативним підходом є зв'язування лікарських засобів з поверхнею еритроцитів. Це може відбуватись за рахунок неспецифічних фізичних взаємодій або за допомогою лігандної кон'югації. Наприклад, зв'язування препаратів з рецепторами комплементу (CR1) шляхом кон'югації з антитілами, як у випадку молекули scFv-TER119, з'єднаної з тромбомодуліном, дозволяє подовжити час напіввиведення лікарського засобу. Однак така модифікація може знижувати біосумісність і стимулювати імунну відповідь. Інкапсуляція нано-ГАп в еритроцити дозволяє ефективно маскувати їх від імунної системи, продовжити циркуляцію в організмі та зменшити токсичність. Наприклад, при інкапсуляції наноформ доксорубіцину в еритроцити спостерігалось подовження періоду циркуляції препарату в крові. Водночас такі системи можуть бути чутливими до механічного чи осмотичного стресу, а також характеризуватись підвищеною жорсткістю клітинної мембрани, що обмежує їх застосування [15, 38, 39].

Наночастинки гідроксиапатиту (нано-ГАп) також становлять значний інтерес як транспортні системи для доставки лікарських засобів завдяки їхній здатності до прицільного впливу на патологічно змінені тканини та зниження системної токсичності препаратів. Поверхня нано-ГАп містить біологічно активні іони (Ca^{2+} , PO_4^{3-} , OH^-), а також додаткові домішки, такі як F^- і Cl^- , що виконують роль молекулярних пасток для терапевтичних агентів. Це значно підвищує ефективність зв'язування препаратів з носієм. Крім того, морфологічні характеристики, ступінь кристалічності та хімічний склад поверхні наночастинок істотно впливають на механізми фіксації та подальшого вивільнення лікарських речовин у цільових зонах [13].

Отже, наногідроксиапатити мають значний потенціал у медицині завдяки високій біосумісності, структурній подібності до кісткової тканини та унікальним фізико-хімічним властивостям. Вони перспективні для імплантатів, покриттів медичних пристроїв і доставки ліків. Сучасні методи синтезу дозволяють контролювати розмір і морфологію наночастинок, оптимізуючи їх біологічні властивості. Водночас біосумісність і вплив наногідроксиапатитів на гемоліз еритроцитів досі потребують додаткових досліджень для гарантії безпеки і ефективності в біомедичних застосуваннях.

3. МАТЕРІАЛИ І МЕТОДИ ДОСЛІДЖЕННЯ

Матеріали та реактиви: HCl = 0,001 н, NaCl 0,9%,

Модифіковані наногідроксиапатити:

1. Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, CO₃²⁻-вмісний апатит
2. Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, -вмісний апатит
3. композит Na⁺, Mg²⁺, CO₃²⁻-вмісний апатит +25% ZnFe₂O₄
4. композит Na⁺, Zn²⁺, CO₃²⁻-вмісний апатит +25% MgFe₂O₄
5. композит Na⁺, Mg²⁺-вмісний апатит +25% ZnFe₂O₄
6. композит Na⁺, Cu²⁺, CO₃²⁻-вмісний апатит +25% ZnFe₂O₄
7. композит Na⁺, Zn²⁺, CO₃²⁻-вмісний апатит +25% CuFe₂O₄
8. Fe³⁺-вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 1,3 мас.%)
9. Fe³⁺-вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас.%)
10. Fe³⁺, CO₃²⁻-вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 1,3 мас.%)
11. Fe³⁺, CO₃²⁻-вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас.%)

Обладнання: центрифуга NANBEI, спектрофотометр PB2201A

2.1 Отримання модифікованих наночастинок гідроксиапатиту

Синтез та характеристизацію зразків наногідроксиапатитів (нано-ГАп) та композитів на їх основі проводився під керівництвом Струтинської Н.Ю. на кафедрі неорганічної хімії Київського національного університету імені Тараса Шевченка. Отримання модифікованих наночастинок гідроксиапатиту здійснювали при кімнатній температурі за допомогою водних реакційних систем, що включали нітрати кальцію, двовалентного металу (наприклад, Cu²⁺, Zn²⁺, Co²⁺) та феруму (III). Як джерело фосфат-іонів використовували фосфат амонію (NH₄)₃PO₄, а у випадку

отримання карбонатвмісних систем — його суміш з гідрокарбонатом амонію (NH_4HCO_3), що дозволяло вводити карбонатні групи в кристалічну решітку апатиту.

Для підтвердження хімічного складу синтезованих матеріалів та наявності функціональних груп у структурі наночастинок проводили інфрачервону спектроскопію (ІЧ-спектроскопію). ІЧ-спектри зразків реєстрували в діапазоні 400–4000 cm^{-1} з використанням спектрометра *PerkinElmer Spectrum BX*. Підготовку зразків здійснювали методом пресування таблеток з бромідом калію (KBr), що є стандартною практикою в спектроскопічних дослідженнях неорганічних порошкових матеріалів. ІЧ-спектри дозволяли виявити характерні смуги поглинання, пов'язані з фосфатними (PO_4^{3-}), гідроксильними (OH^-), карбонатними (CO_3^{2-}) та іншими аніонними фрагментами, присутніми у структурі матеріалів [5].

2.2 Отримання еритроцитів

Для оцінки дії модифікованих наногідроксиapatитів та їх композитів з феритами було обрано модель *in vitro* з використанням еритроцитів барана. Така модель широко застосовується для оцінки біосумісності різних сполук, зокрема і наночастинок.

Еритроцити виділяли з крові, стабілізованої гепарином (антикоагулянт прямої дії), шляхом центрифугування 3000 об/хв, 5 хв та тричі промивали у фізіологічному розчині (0,9% NaCl). Отриману суспензію еритроцитів доводили до стандартної оптичної густини $0,700 \pm 0,005$ од. при довжині хвилі 630 нм, що відповідало уніфікованій концентрації клітин у пробі.

2.3 Оцінки гемолізу еритроцитів за дії модифікованих наногідроксиапатитів

Підготовлену еритроцитарну суспензію інкубували при температурі 25 °С протягом 30 хвилин у різних умовах: без додавання речовин (контроль) або з додаванням досліджуваних наногідроксиапатитів у кількостях 1, 2 та 5 мМ. Після інкубації в усі проби вносили розчин соляної кислоти (HCl) до кінцевої концентрації 0,001 н, що викликало контрольований гемоліз. Така методика дозволяла відстежити вплив наночастинок на стійкість клітинних мембран до кислотного стресу.

Кінетику гемолізу еритроцитів реєстрували спектрофотометрично при довжині хвилі 630 нм. Вимірювання проводили кожні 10 секунд протягом загального часу 2 хвилини. Отримані дані екстинкції дозволяли побудувати кінетичні криві гемолізу та розрахувати відсотковий рівень лізису клітин за формулою:

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

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

2.4 Етичні аспекти проведення досліджень

Всі досліді, пов'язані з використанням крові тварин, були проведені з дотриманням чинного законодавства України та міжнародних норм з біоетики. Зокрема, експерименти відповідали положенням:

- Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та наукових цілях (Страсбург, 1986),

- Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція 2006 р.),
- Загальних етичних принципів експериментів на тваринах, затверджених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001),
- Закону України «Про захист тварин від жорстокого поводження» (редакція 2010 р.).

2.5 Статистична оцінка результатів

Отримані експериментальні дані були піддані статистичній обробці з використанням програми *Microsoft Excel*. Для визначення достовірності відмінностей між середніми значеннями застосовували t-критерій Стьюдента. Всі результати вважали статистично значущими при рівні імовірності $p < 0,05$. Це дозволяло виключити вплив випадкових факторів і підтвердити відтворюваність отриманих закономірностей.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

3.1 Вплив ферумвмісних та ферумкарбонатвмісних наногідроксиapatитів на стійкість еритроцитів до гемолізу

Для аналізу впливу досліджуваних наногідроксиapatитів на стійкість еритроцитів до кислотного гемолізу будували диференціальні криві, які відображають зміну відсотка гемолізованих еритроцитів у часі. Метод кислотного гемолізу еритроцитів можна використовувати як для дослідження цитотоксичності різних сполук, так і для оцінки стану білків та фосфоліпідного бішару мембран, оскільки мембрана еритроцитів відображає особливості будови мембран різних клітин. Тому дослідження резистентності еритроцитів до гемолізу за дії досліджуваних наногідроксиapatитів може дати відомості щодо наявності чи відсутності у їхньому складі компонентів, які здатні ушкоджувати мембрани.

Як видно з рисунка 3.1.1 – 3.1.4 та таблиці 3.1.1 преінкубація еритроцитів крові барана упродовж 30 хв у присутності ферумвмісних та ферумкарбонатвмісних зразків наногідроксиapatитів у кількості 1, 2 та 5 мМ призводила до зміни резистентності еритроцитів до кислотного гемолітика.

Виявлено, що преінкубація еритроцитів з Fe^{3+} -вмісним наногідроксиapatитом (вміст феруму 1,3 мас.%) призводила до зниження частки гемолізованих еритроцитів з 57,9% у контролі до 36,7% та 35,6% за дії зразка у кількості 1 та 2 мМ відповідно. Окрім того преінкубація з 1 мМ Fe^{3+} -вмісним наногідроксиapatитом (вміст феруму 1,3 мас.%) призводила до подовження часу гемолізу на 20 с порівняно з контролем. Такі результати можуть свідчити про мембраностабілізуючу дію цих сполук.

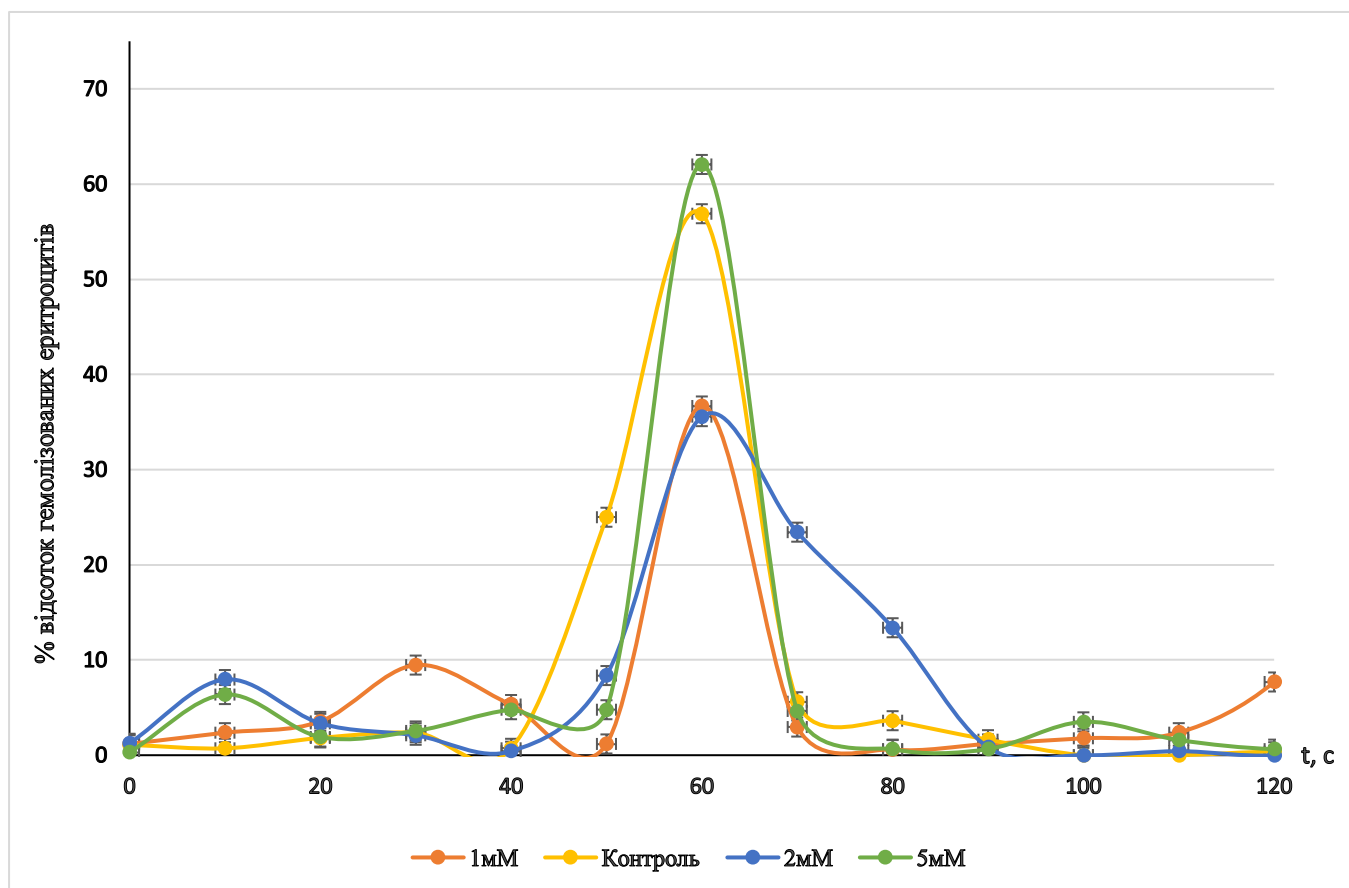


Рисунок 3.1.1 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії Fe^{3+} -вмісним наногідроксиапатитом (вміст феруму 1,3 мас.%) (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

За умови преінкубації з 5 мМ Fe^{3+} -вмісним наногідроксиапатитом (вміст феруму 1,3 мас.%) мембраностабілізуючий ефект був виражений у меншій мірі, хоч гемоліз і розпочинався пізніше, на 50-й секунді, однак, тривалість процесу залишалася на рівні контролю, а максимальний рівень гемолізу підвищувався незначно – до 62,06 % (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.1).

За умови преінкубації з Fe^{3+} -вмісним наногідроксиапатитом (вміст феруму 2,6 мас.%) у кількості 1 та 2 мМ, подібно до дії Fe^{3+} -вмісного наногідроксиапатиту (вміст феруму 1,3 мас.%) на кривих гемолізу спостерігали зсув вправо, пік гемолізу зміщувався на 70-ту секунду, що вказує на певний мембраностабілізуючий ефект,

проте тривалість процесу залишалась такою ж, як у контролі — 100 секунд (таблиця 3.1.1).

Таблиця 3.1.1

Параметри гемолізу еритроцитів за умови преінкубації з ферумвмісними та ферумкарбонатвмісними наногідроксиапатитами

| | | Час настання максимуму, с | Тривалість гемолізу, с | Максимум гемолізу, % |
|---|-----|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Контроль | | 60 | 100 | 57,88 |
| Fe ³⁺ -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 1,3 мас.%) | 1мМ | 60 | 120 | 36,69* |
| | 2мМ | 60 | 100 | 35,56* |
| | 5мМ | 60 | 100 | 62,06 |
| Fe ³⁺ -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас.%) | 1мМ | 70 | 100 | 52,46 |
| | 2мМ | 70 | 100 | 56,89 |
| | 5мМ | 60 | 90 | 49,95* |
| Fe ³⁺ , CO ₃ ²⁻ -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 1,3 мас.%) | 1мМ | 60 | 90 | 41,61* |
| | 2мМ | 50 | 90 | 53,42 |
| | 5мМ | 60 | 100 | 55,81 |
| Fe ³⁺ , CO ₃ ²⁻ -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас.%) | 1мМ | 50 | 80 | 48,84* |
| | 2мМ | 60 | 80 | 46,77* |
| | 5мМ | 60 | 110 | 53,43 |

*p < 0,05 порівняно з контролем

Максимальний рівень гемолізу порівняно з контролем вірогідно не змінився (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.2). Ймовірно, а такої дії Fe^{3+} -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас %) взаємодіє з клітинною оболонкою на рівні, який не викликає ушкодження, але активує фізіологічні процеси, що впливають на час настання гемолізу (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.2).

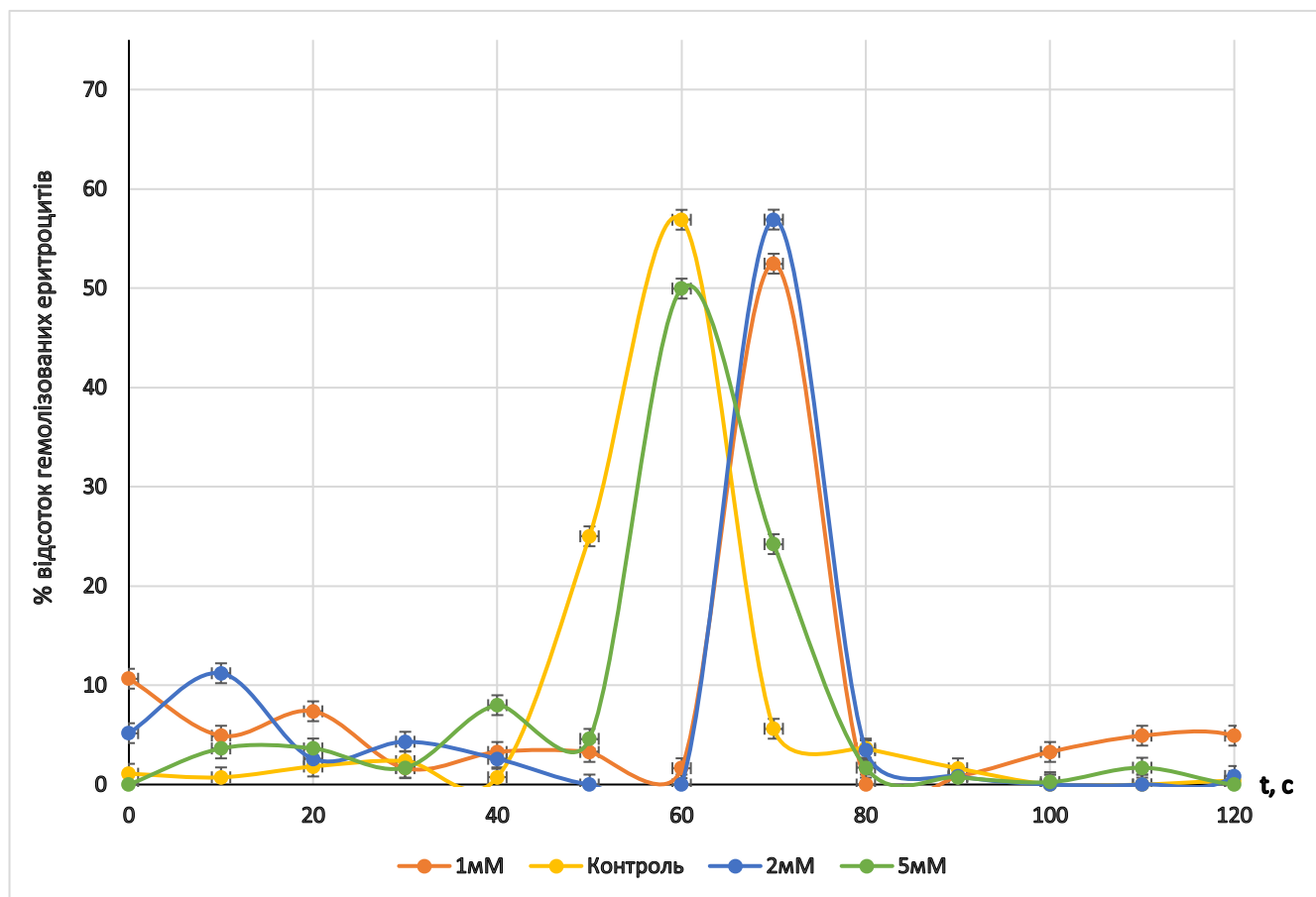


Рисунок 3.1.2 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії Fe^{3+} -вмісного наногідроксиапатиту (вміст феруму 2,6 мас.%) (1, 2 та 5 мМ). n=3

За умови преінкубації з 5 мМ Fe^{3+} -вмісним наногідроксиапатитом (вміст феруму 2,6 мас.%) — тривалість процесу скорочувалась до 90 секунд, а максимум гемолізу фіксувався на 60-й секунді, як і в контролі. Рівень максимального гемолізу знижувався та становив 49,95 % (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.2). Така дія Fe^{3+} -вмісного наногідроксиапатиту (вміст феруму 2,6 мас.%) може свідчити про

специфічну взаємодію наночастинок із поверхнею клітини, що на початковому етапі чинить захисний ефект, але надалі не запобігає поступовому ушкодженню. Це може свідчити про біосумісність зразка Fe^{3+} - вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 2,6 мас.%) та його потенціал для подальшого застосування в біомедичних системах, що вимагають збереження клітинної цілісності.

При застосуванні $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 1,3 мас.%) у кількості 1 мМ та 5 мМ спостерігали зсув кривої гемолізу вправо порівняно з контролем. Окрім того за умови преінкубації з 1 мМ кількістю зразка тривалість процесу скорочувалась до 90 секунд, при збереженні часу досягнення піку гемолізу на 60-й секунді, а рівень максимального гемолізу знижувався на 16% порівняно з контролем, що вказує на зниження інтенсивності ушкодження мембран. Такий результат може свідчити про потенційний мембраностабілізуючий ефект при низькій дозі (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.3).

При використанні 5 мМ зразка параметри гемолізу практично збігалися з контрольними: тривалість становила 100 секунд, пік досягався на 60-й секунді, а рівень максимального гемолізу трохи перевищував контроль і складав 55,81 %.

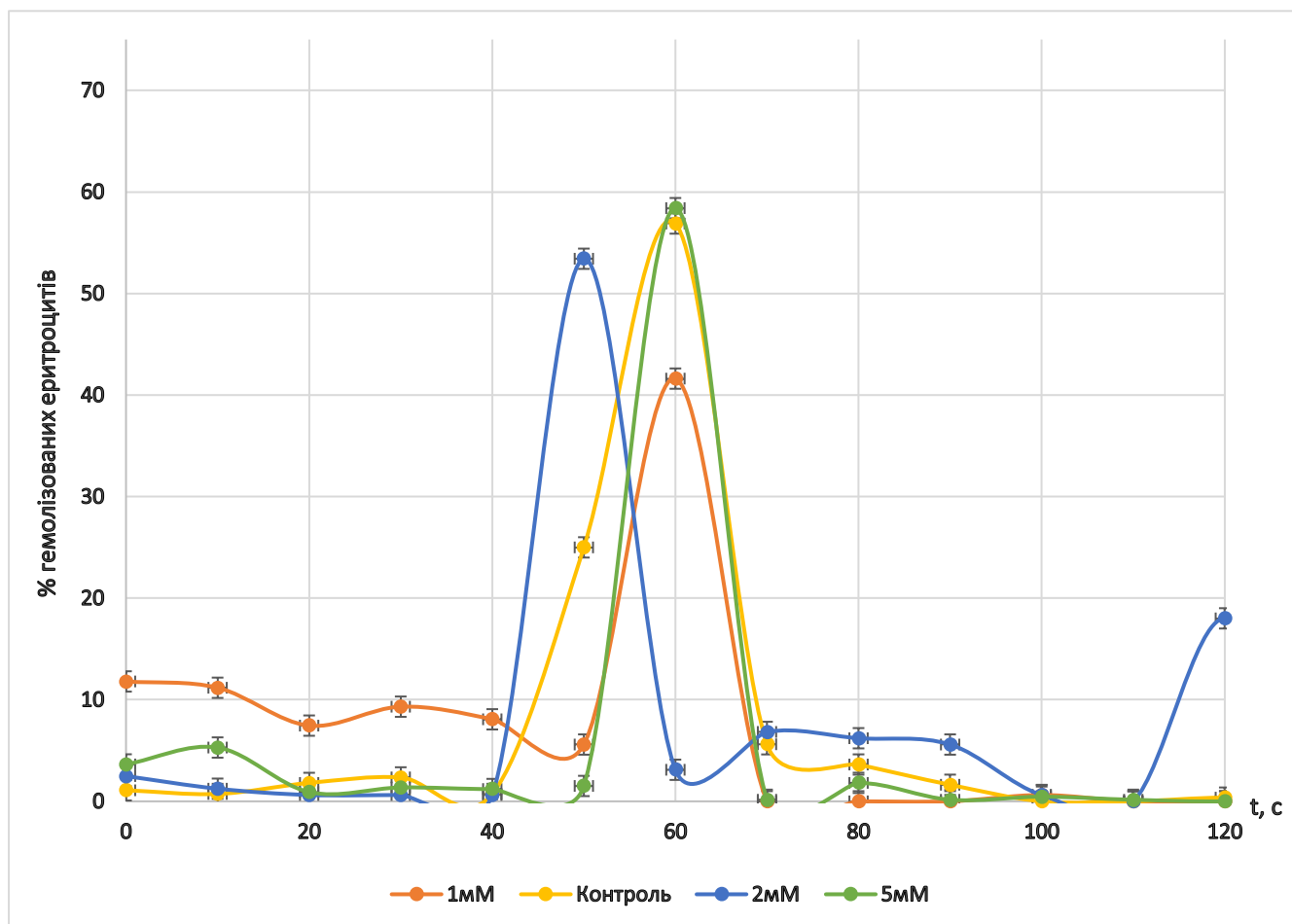


Рисунок 3.1.3 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісного наногідроксиапатиту (вміст феруму 1,3 мас.%) (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

За умови преінкубації з 2 мМ $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісним наногідроксиапатитом (вміст феруму 2,6 мас.%) спостерігали зсув кривої гемолізу вліво та пришвидшення процесу до 90 с, час досягнення піку гемолізу зміщувався до 50-ї секунди, що свідчить про дестабілізуючий вплив даної кількості зразка на клітинну мембрану еритроцитів (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.3).

Таким чином, вплив ферумкарбонатвмісного зразка на клітинну мембрану залежить від кількості зразка у середовищі інкубації еритроцитів.

За умови преінкубації з 1 мМ $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісний наногідроксиапатит (вміст феруму 2,6 мас.%) тривалість процесу гемолізу скорочувалася до 80 секунд, максимум гемолізу спостерігався на 50-й секунді, а рівень максимального гемолізу

знижувався до 48,84% (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.4). Така дія $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 2,6 мас.%)

може свідчити про мембраностабілізуючий ефект або обмежене проникнення наночастинок у клітинне середовище, що спричиняє лише помірне ушкодження мембрани.

При використанні кількості 5 мМ $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісний наногідроксиapatит (вміст феруму 2,6 мас.%) спостерігали подовження загального часу гемолізу до 110 секунд, тоді як час (60 с) та рівень максимального гемолізу (53,43 %) не відрізнялися від контролю (таблиця 3.1.1, рисунок 3.1.4). Отримані дані можуть свідчити про стабілізуючу дію наночастинок на мембрани клітин навіть при збільшенні їх кількості.

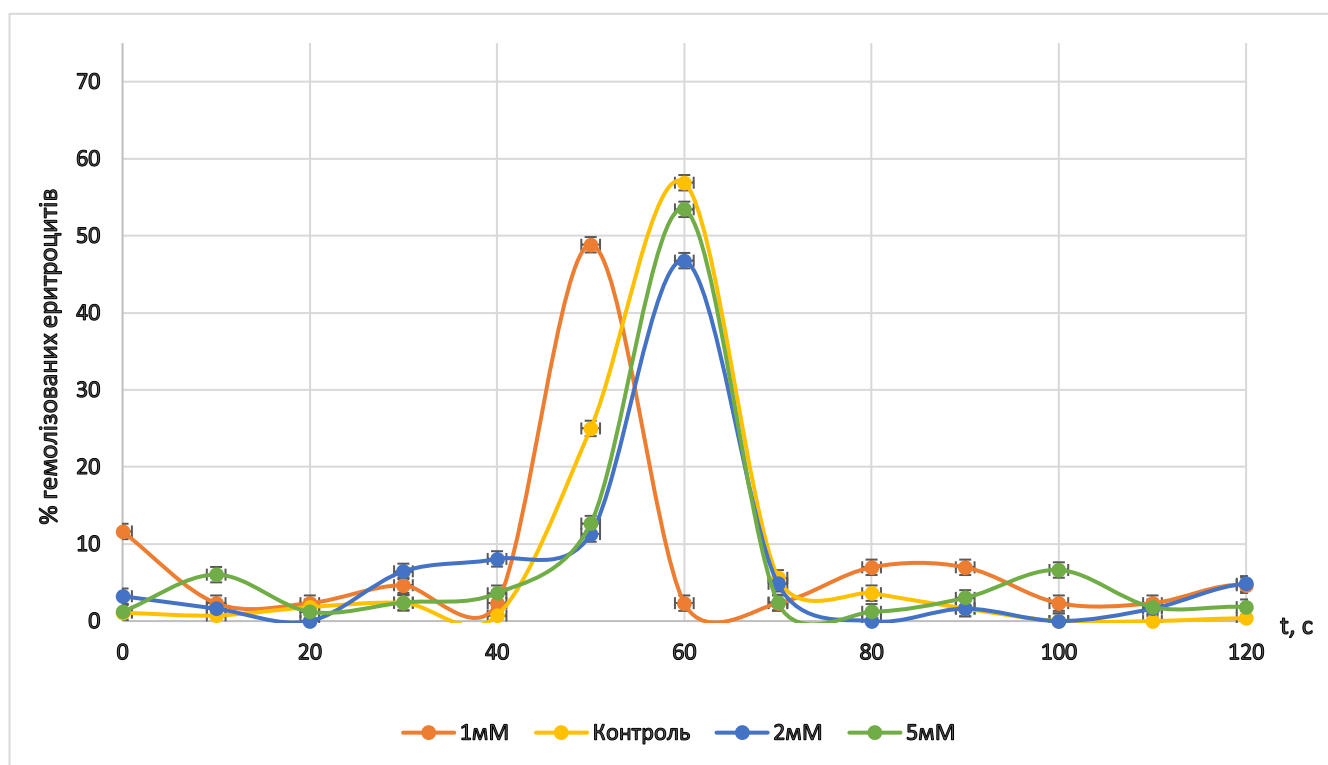


Рисунок 3.1.4 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії $\text{Fe}^{3+}, \text{CO}_3^{2-}$ -вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 2,6 мас.%) (1, 2 та 5 мМ). n=3

За умови підвищення кількості зразка до 2 мМ процес гемолізу як і у випадку дії 1 мМ зразку прискорювався 80 секунд. Максимум гемолізу спостерігався на 60-й секунді, а рівень максимального гемолізу знижувався порівняно з контролем та становив 46,77 %.

Отже, аналіз впливу різних типів Fe-вмісних апатитів на гемоліз еритроцитів дозволив визначити як зразки з гемолітичною активністю, так і ті, які підвищують їх стійкість до гемолізу.

Найбільше зниження гемолізу було виявлено при використанні Fe³⁺-вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 1,3 мас.%) у кількостях 1 мМ (до 36,69%) та 2 мМ (до 35,56%), що свідчить про стабілізуючий вплив цих наногідроксиapatитів на мембранні структури еритроцитів, що підвищує їх стійкість до гемолізу.

Тоді як ферумкарбонатвмісні нано-ГАп (2 мМ Fe³⁺,CO₃²⁻-вмісного наногідроксиapatиту (вміст феруму 1,3 мас.%) та 1 мМ Fe³⁺,CO₃²⁻-вмісний наногідроксиapatит (вміст феруму 2,6 мас.%) хоч і знижували рівень гемолізованих еритроцитів, проте прискорювали процес гемолізу, за їх дії спостерігали зсув еритрограми вліво, що свідчить про зміну структурних та фізико-хімічних властивостей мембрани еритроцитів.

3.2. Вплив Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, - вмісного апатиту та Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, CO₃²⁻-вмісного апатиту на стійкість еритроцитів до гемолізу

За умови преінкубації з Na⁺, Mg²⁺, Zn²⁺, Fe³⁺, -вмісним апатиом у кількості 1 мМ спостерігали зниження рівня максимального гемолізу до 51,27 %, що супроводжувалося скороченням тривалості процесу до 80 секунд. (таблиця 3.2.1, рисунок 3.2.1).

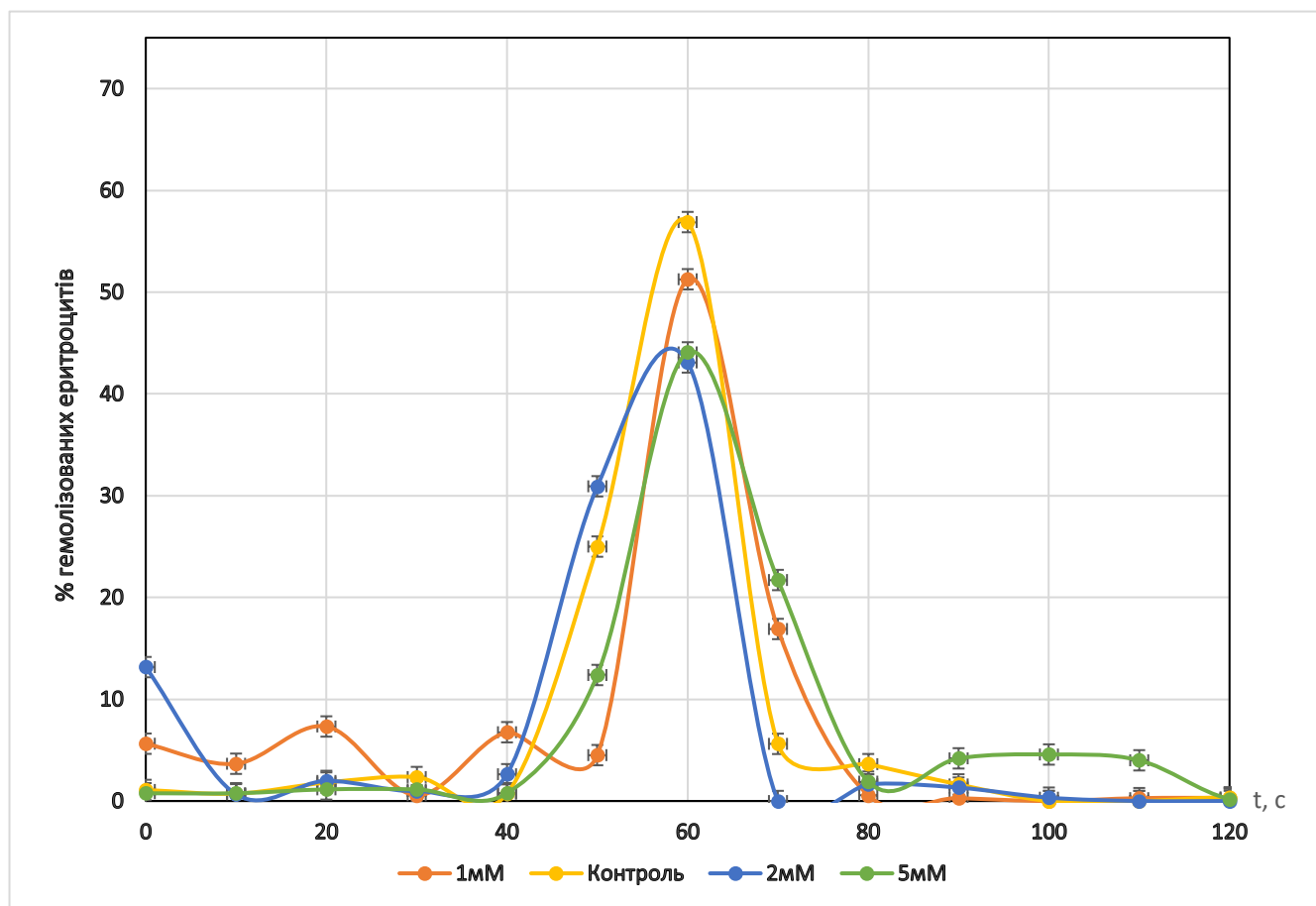


Рисунок 3.2.1 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} -вмісного апатиту (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

За кількості 2 мМ Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , - вмісного апатиту рівень максимального гемолізу знижувався до 43,09%. Це може бути зумовлено утворенням щільного шару наночастинок на поверхні еритроцитів, що викликає локальну стабілізацію мембрани. Агреговані частинки можуть частково захищати клітину від дії кислотного середовища, що ймовірно обмежує подальше пошкодження мембран (таблиця 3.2.1, рисунок 3.2.1).

За умови підвищення кількості Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} - вмісного апатиту до 5 мМ – відзначалося зниження максимального рівня гемолізу до 44,08%, що може свідчити про збереження мембраностабілізуючого ефекту (таблиця 3.2.1, рисунок 3.2.1).

Таблиця 3.2.1

Параметри гемолізу еритроцитів за умови преінкубації їх із Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} -вмісним апатитом та Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісним апатитом

| | | Час настання максимуму, с | Тривалість гемолізу, с | Максимум гемолізу, % |
|---|-----|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Контроль | | 60 | 100 | 57,88 |
| $\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}\text{Zn}_{0.25}\text{Fe}_{0.25}$ -вмісний апатит | 1мМ | 60 | 80 | 51,27 |
| | 2мМ | 50 | 90 | 43,09* |
| | 5мМ | 60 | 100 | 44,08* |
| Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісний апатит | 1мМ | 60 | 120 | 46,15* |
| | 2мМ | 60 | 80 | 51,32 |
| | 5мМ | 60 | 80 | 50,54 |

За умови преінкубації з 1 мМ Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісним апатитом спостерігали зниження максимального рівня гемолізу до 46,15 % порівняно з 57,88 % у контролі та подовження тривалості процесу гемолізу до 120 с (таблиця 3.2.1, рисунок 3.2.2).

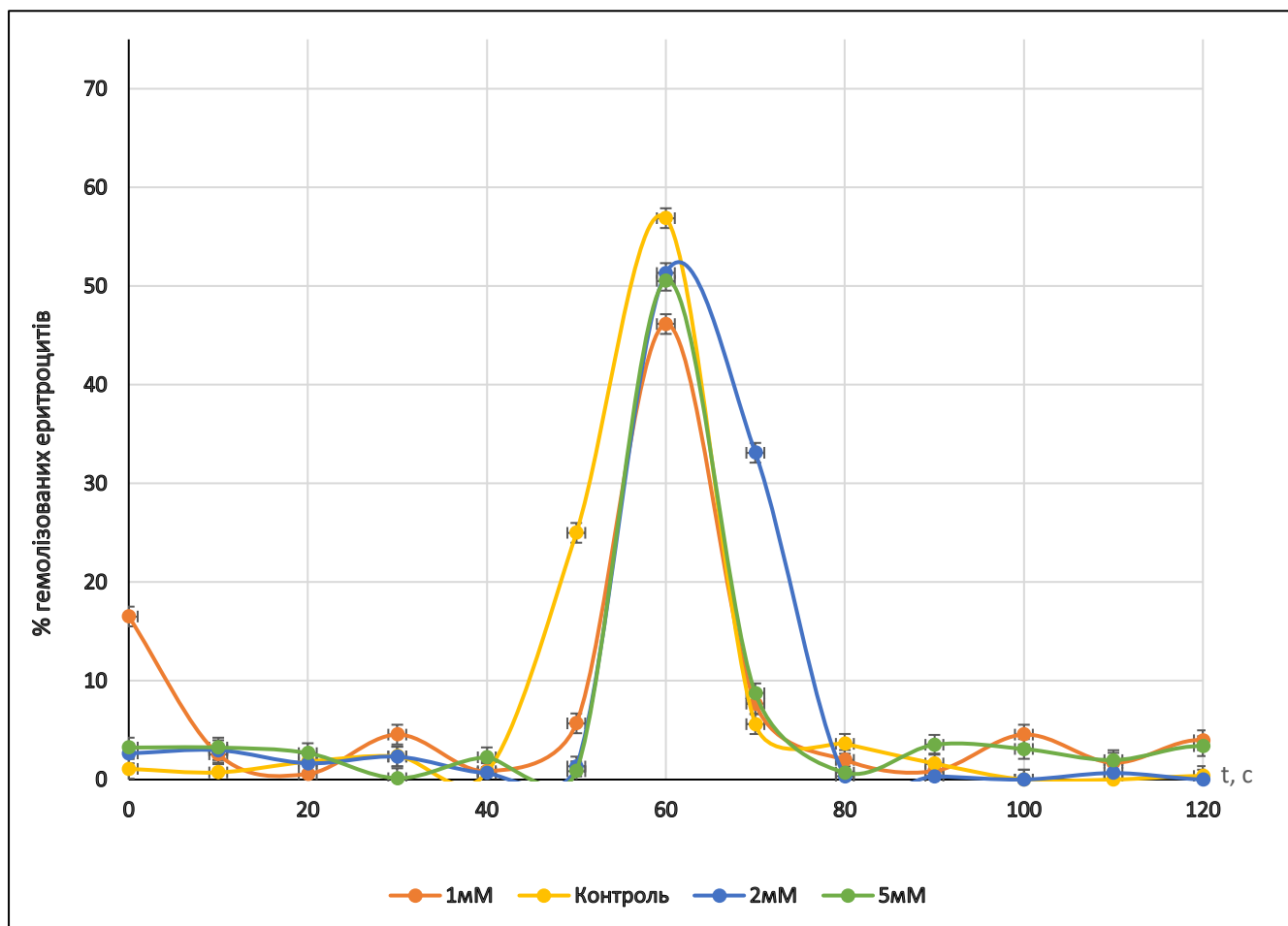


Рисунок 3.2.2 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

Це свідчить про стабілізуючий вплив дослідженого зразка на мембрани еритроцитів.

За преінкубації еритроцитів із 2 мМ та 5мМ Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту рівень гемолізу не змінювався порівняно з контролем, проте сам процес прискорювався (таблиця 3.2.1, рисунок 3.2.2).

На основі отриманих даних було встановлено, що зразки 2 мМ та 5 мМ $\text{Na}_{0.25}\text{Mg}_{0.25}\text{Zn}_{0.25}\text{Fe}_{0.25}$ -вмісний апатит та 1 мМ Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту, характеризуються здатністю знижувати відсоток гемолізованих еритроцитів у порівнянні з контролем. Найвираженіший захисний ефект

спостерігався для Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , -вмісного апатиту у кількості 2 мМ (43,09%) та 5 мМ (44,08%), що вказує на мембраностабілізуючі властивості. Такий результат свідчить про ефективну взаємодію цих наногідроксилапатитів з мембранами еритроцитів, що запобігає їх руйнуванню та вивільненню гемоглобіну. 2 мМ та 5 мМ карбонатвмісний зразок такого складу (Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , CO_3^{2-} -вмісний апатит) сприяв прискоренню процесу гемолізу, хоча й не впливав на рівень гемолізованих еритроцитів.

Таким чином, отримані результати свідчать про виражені стабілізуючі властивості вказаних наногідроксилапатитів, зокрема для Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , -вмісного апатиту у концентраціях 2 та 5 мМ. Враховуючи зниження гемолізу та ймовірний механізм стабілізації мембран, ці матеріали можуть розглядатися для подальшого використання в біомедичних застосуваннях, що потребують гемосумісності.

3.3 Вплив композиту Na^+ , Mg^{2+} , композиту Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} та композиту Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту з 25% ZnFe_2O_4 на стійкість еритроцитів до гемолізу

За умови преінкубації з композитом Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 у кількості 1 мМ тривалість гемолізу скорочувалась до 90 с, час досягнення максимуму – 60 с, що відповідає контрольним показникам. Максимальний рівень гемолізу знизився до 44,67 %, що менше за контрольний (57,88 %). За кількості 2 мМ максимум гемолізу мав схоже значення 47,04%. Це вказує на зниження ушкодження мембран, що може бути зумовлено поверхневою взаємодією наночастинок із мембраною еритроцитів, яка викликає зміни проникності без масового руйнування клітин (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.1).

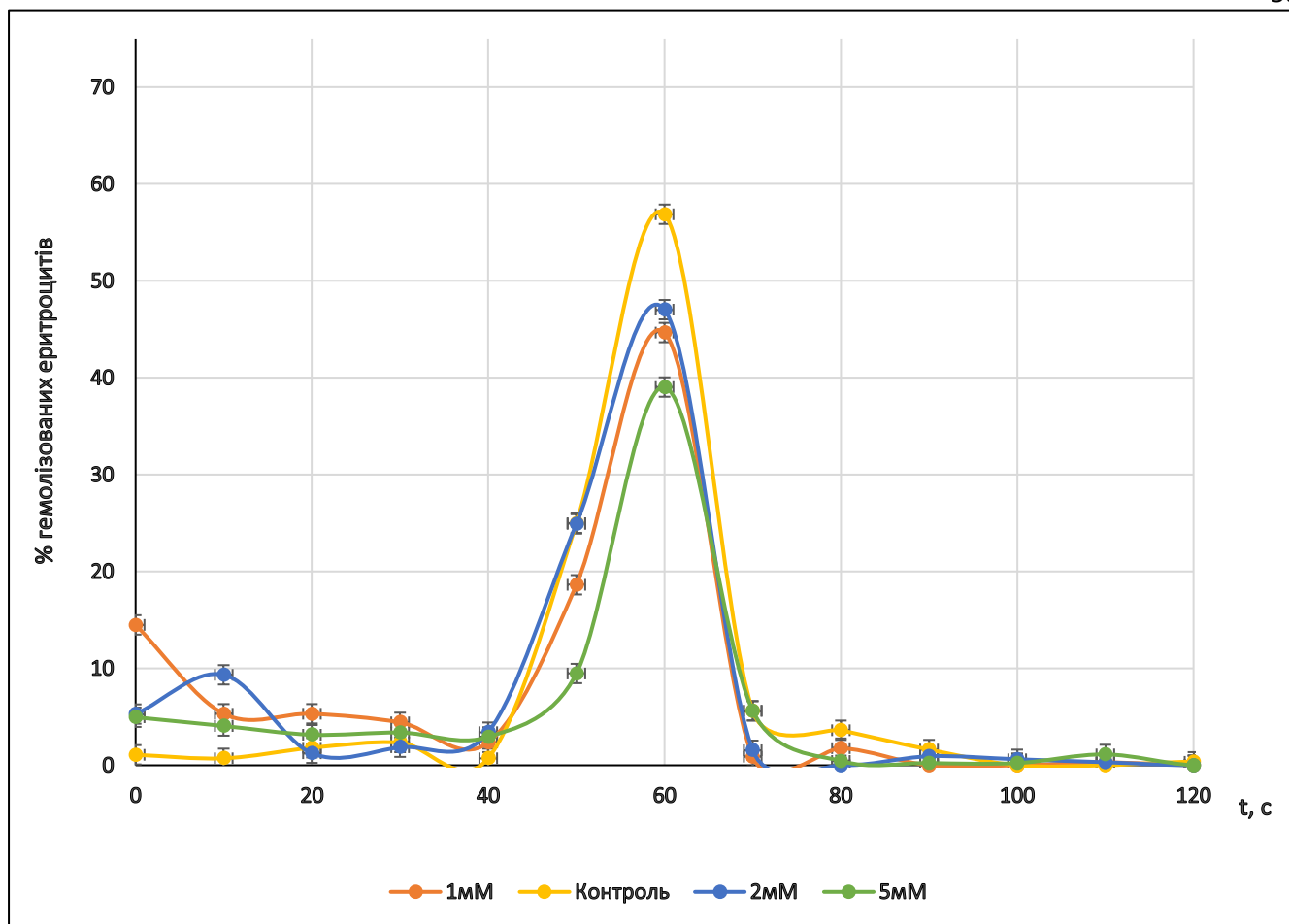


Рисунок 3.3.1 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії композиту Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

При кількості 2 мМ та 5мМ композиту Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 тривалість гемолізу скоротилася до 70 с та 80 с відповідно, час досягнення максимуму залишався на рівні 60 с як для 5мМ так і для 2мМ (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.1).

Таблиця 3.3.1

Параметри гемолізу еритроцитів при додаванні композиту Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 , композиту Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 та композиту Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4

| | | Час настання максимуму, с | Тривалість гемолізу, с | Максимум гемолізу, % |
|---|-----|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Контроль | | 60 | 100 | 57,88 |
| композит Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 | 1мМ | 60 | 90 | 44,67* |
| | 2мМ | 60 | 70 | 47,04* |
| | 5мМ | 60 | 80 | 36,46* |
| композит Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 | 1мМ | 60 | 110 | 48,58* |
| | 2мМ | 60 | 70 | 45,67* |
| | 5мМ | 60 | 90 | 45,16* |
| Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 | 1мМ | 60 | 100 | 39,94* |
| | 2мМ | 70 | 90 | 49,23* |
| | 5мМ | 60 | 100 | 40,75* |

За умови преінкубації композит Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 у кількості 1 мМ, 2мМ та 5мМ максимумами гемолізу були схожими. Вони становили 48,58%, 45,67% та 45,16% відповідно. Час досягнення максимуму становив 60 с для всіх кількостей.

Така динаміка вказує на зменшення загального ушкодження мембрани, ймовірно, внаслідок взаємодії наночастинок з поверхнею еритроцитів (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.2).

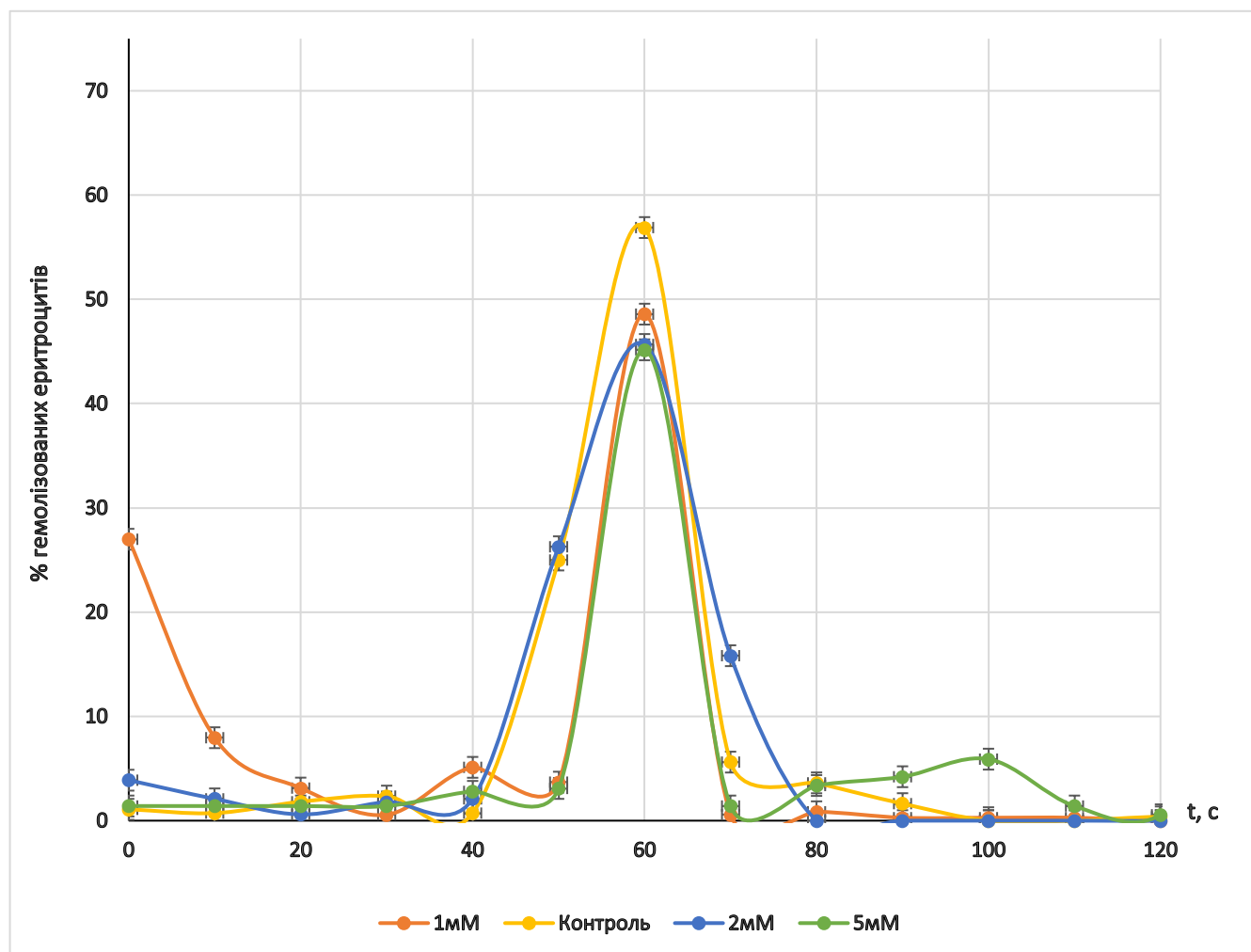


Рисунок 3.3.2 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії композиту Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

Тривалість гемолізу у всіх зразках була різною. Найменша тривалість спостерігалась для кількості 2 мМ та становила 70 с. Для концентрацій 1 мМ та 5 мМ вона становила 110 с та 90 с відповідно.

За умови преінкубації з 1 мМ композитом Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісний апатит +25% ZnFe_2O_4 час досягнення максимуму гемолізу (60 с) і тривалість процесу (100 с) відповідали контрольним значенням. Максимальний рівень гемолізу був істотно нижчим і становив 39,94 %, що вказує на виражений мембраностабілізуючий ефект наночастинок. Зменшенням рівня гемолізу свідчить про захисну дію

наногідрооксиапатитів, яка, ймовірно, досягається шляхом стабілізації мембрани або пригнічення процесів її ушкодження. (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.3).

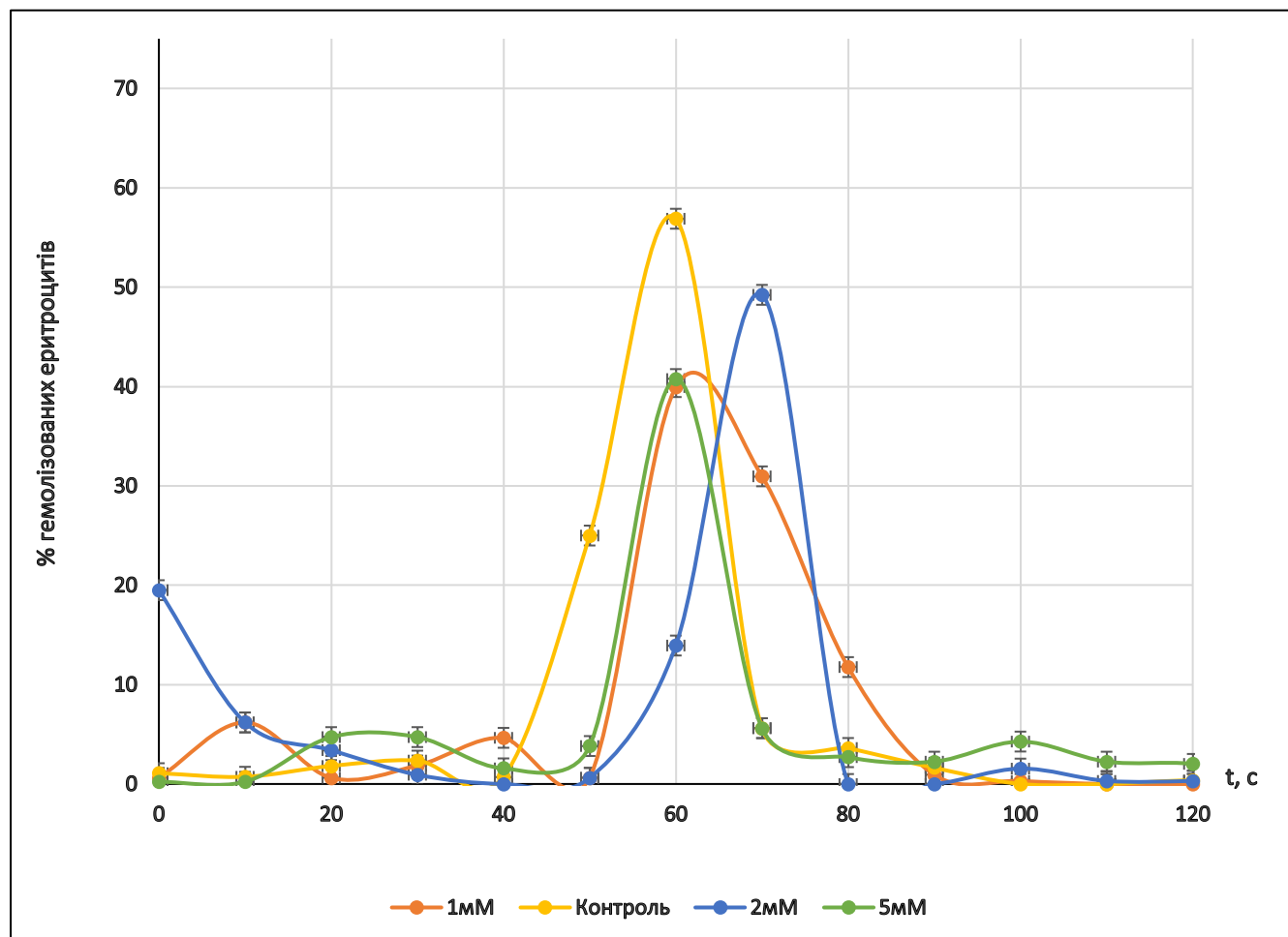


Рисунок 3.3.3 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії композиту Na^+ , Cu^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатит у+25% ZnFe_2O_4 (1, 2 та 5 мМ).

При підвищенні кількості до 2 мМ тривалість процесу скорочувалась до 90 с, а час досягнення максимуму зсувався до 70 с. Максимальний рівень гемолізу зростав до 49,23 % та був вищим ніж при кількості 1 мМ. Це дозволяє припустити, що за умов середньої концентрації існує виражений мембраностабілізуючий ефект. (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.3).

Зі збільшенням кількості до 5 мМ час досягнення максимуму залишався на рівні 60 с, а тривалість процесу поверталась до контрольного значення — 100 с. Максимальний рівень гемолізу становив 40,75 %, що менше за рівень при 2 мМ. Отримані результати свідчать про наявність мембраностабілізуючої дії наночастинок, імовірно, внаслідок зміни властивостей мембрани еритроцитів. (таблиця 3.3.1, рисунок 3.3.3).

На підставі наведених даних встановлено, що всі досліджувані зразки наногідроксиапатитів з додаванням 25% ZnFe_2O_4 чинять виражений мембраностабілізуючий ефект, що проявляється у зниженні максимального рівня кислотного гемолізу еритроцитів порівняно з контролем (57,88%).

Найбільше зниження гемолізу спостерігалось для зразка композиту Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 при концентрації 5 мМ — максимум гемолізу становив 36,46%, що є найнижчим показником серед усіх досліджених зразків. Високі стабілізуючі властивості продемонстрували також зразки композит Na^+ , Mg^{2+} , CO_3^{2-} -вмісний апатит +25% ZnFe_2O_4 при концентраціях 5 мМ (40,75%) і 1 мМ (39,94%), а також композиту Na^+ , Mg^{2+} -вмісного апатиту +25% ZnFe_2O_4 при 1 мМ (44,67%). Усі зразки сприяли зниженню гемолізу незалежно від концентрації, однак ступінь цього ефекту варіювався, що свідчить про залежність біологічної активності від складу і дози. Наявність карбонатних груп, а також іонів Mg^{2+} або Cu^{2+} у складі наногідроксиапатитів разом з включенням феритної фази ZnFe_2O_4 може відігравати ключову роль у підвищенні біосумісності та захисної дії на мембрани еритроцитів.

Таким чином, наногідроксиапатити, леговані ZnFe_2O_4 та додатковими функціональними іонами (Mg^{2+} , Cu^{2+} , CO_3^{2-} , Na^+), мають виражені стабілізуючі властивості та демонструють потенціал для застосування як біосумісні матеріали з мембраностабілізуючим ефектом у біомедичних технологіях.

3.4 Вплив композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 та композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4 на стійкість еритроцитів до гемолізу

За умови преінкубації з композитом Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 спостерігали зсув еритрограми вправо більшою мірою у кількості 2 мМ зразку, тоді як відсоток гемолізованих еритроцитів та загальна тривалість процесу (100 с) не змінювалась порівняно з контролем, що вказує на мембраностабілізуючу дію досліджуваних наночастинок (таблиця 3.4.1, рисунок 3.4.1).

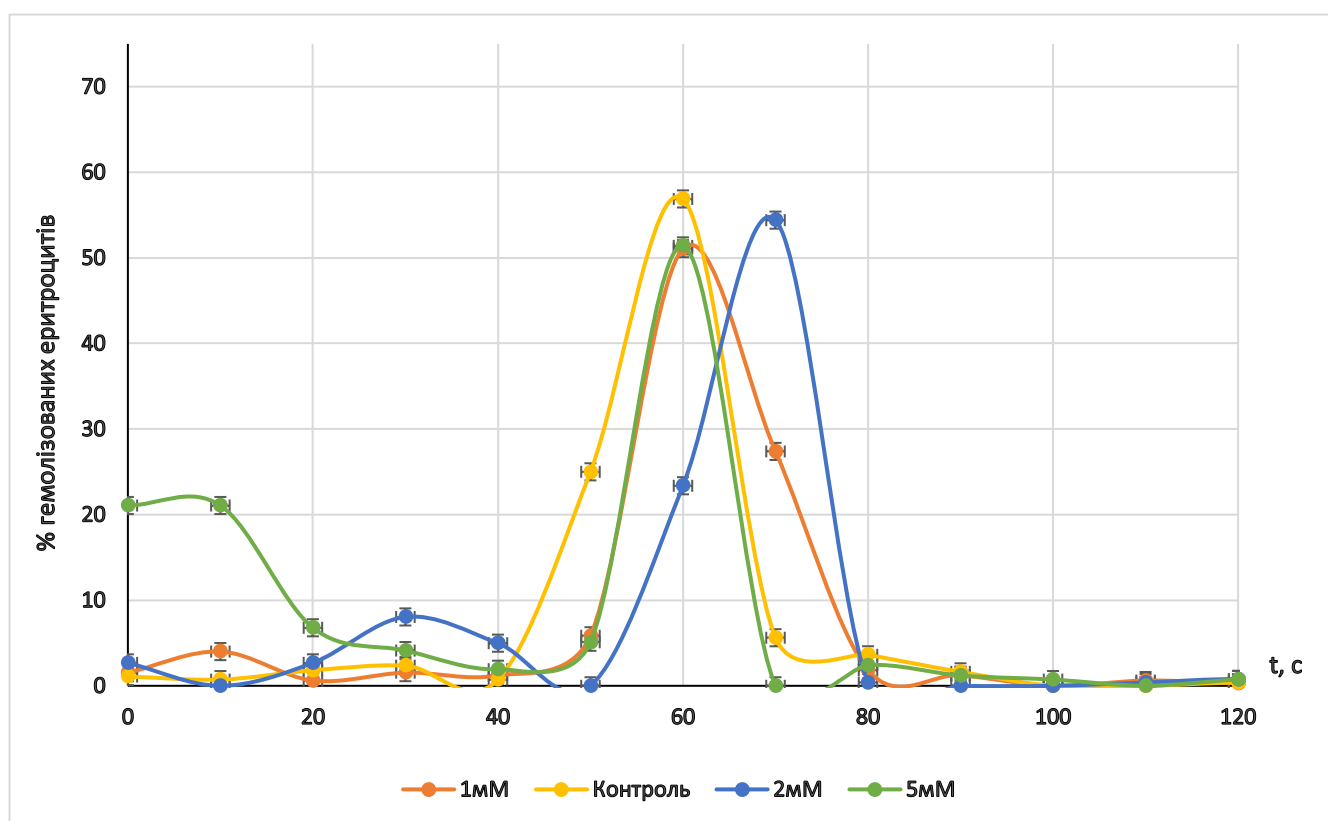


Рисунок 3.4.1 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 (1, 2 та 5 мМ). n=3

Таблиця 3.4.1

Параметри гемолізу еритроцитів при додаванні композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 та композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4

| | | Час настання максимуму, с | Тривалість гемолізу, с | Максимум гемолізу, % |
|---|-----|---------------------------|------------------------|----------------------|
| Контроль | | 60 | 100 | 57,88 |
| композит Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% MgFe_2O_4 | 1мМ | 60 | 100 | 51,08 |
| | 2мМ | 70 | 80 | 54,41 |
| | 5мМ | 60 | 90 | 51,40 |
| композит Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4 | 1мМ | 60 | 90 | 37,42* |
| | 2мМ | 70 | 90 | 43,23* |
| | 5мМ | 60 | 110 | 55,48 |

Зі збільшенням кількості до 5 мМ час досягнення максимуму залишався на рівні 60 с, а тривалість процесу становила 90 с, що є дещо коротшим від контрольного значення. Максимальний рівень гемолізу дорівнював 51,40 %, що підтверджує збереження мембраностабілізуючого ефекту наночастинок навіть за підвищеної кількості. (таблиця 3.4.1, рисунок 3.4.1).

За умови преінкубації з 1 мМ композитом Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4 тривалість процесу становила 90 с, тобто була коротшою за контрольне значення (100 с), тоді як час досягнення максимуму залишався незмінним — 60 с. Максимальний рівень гемолізу був суттєво нижчим за контроль і становив 37,42 %, що свідчить про зменшення інтенсивності ушкодження. Ймовірно, після початкового дестабілізуючого впливу наночастинок частково стабілізують мембрану, знижуючи її проникність (таблиця 3.4.1, рисунок 3.4.2).

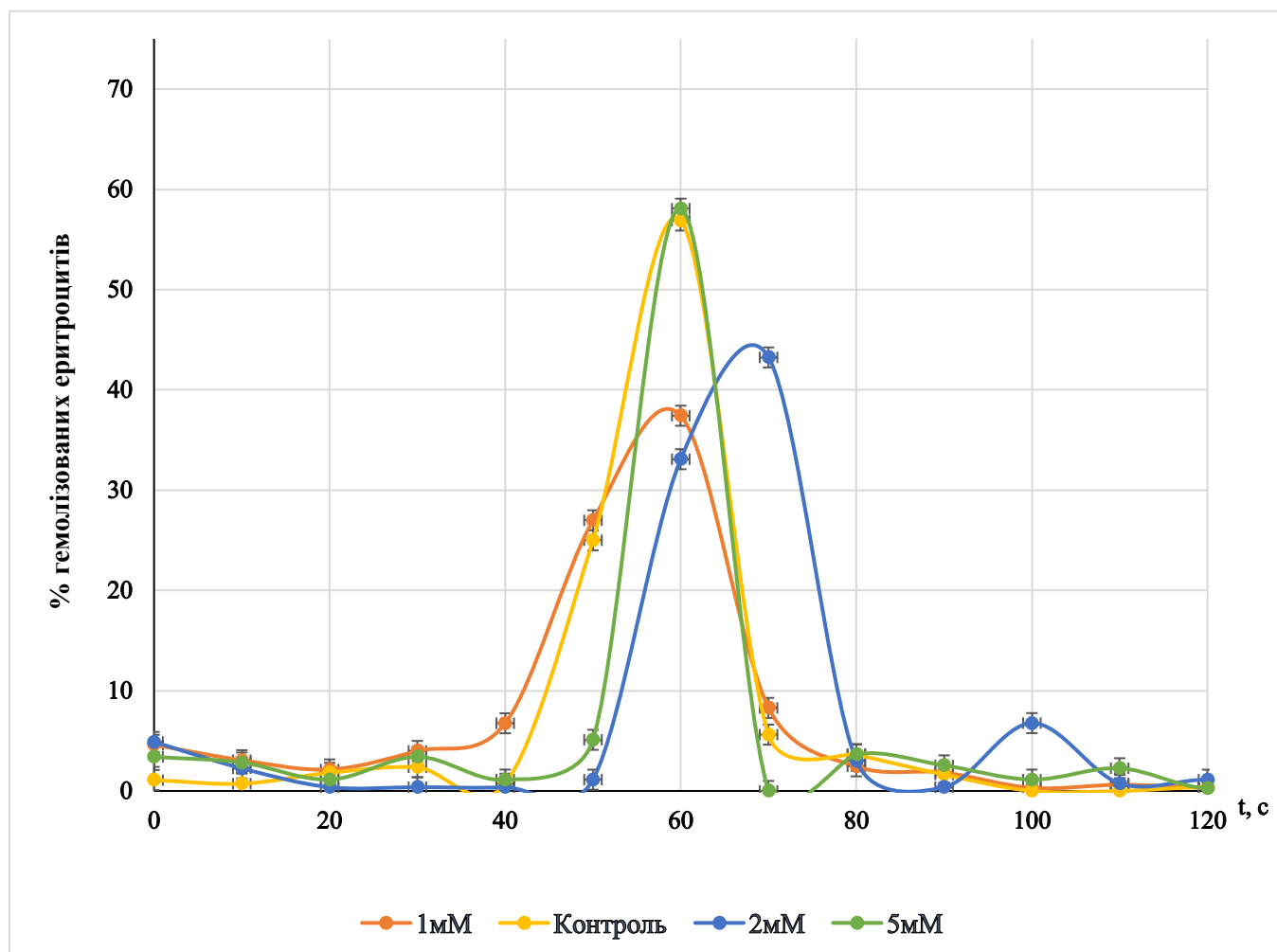


Рисунок 3.4.2 – Стійкість еритроцитів до гемолізу за дії композиту Na^+ , Zn^{2+} , CO_3^{2-} -вмісного апатиту +25% CuFe_2O_4 (1, 2 та 5 мМ). $n=3$

При підвищенні кількості до 2 мМ тривалість процесу залишалася сталою — 90 с, однак час досягнення максимуму гемолізу зміщувався до 70 с, що свідчить про стабілізацію мембрани. Максимальний рівень гемолізу становив 43,23 %, залишаючись нижчим за контроль, але вищим, ніж при концентрації 1 мМ. Це вказує на присутність мембраностабілізуючого ефекту зі зростанням концентрації. (таблиця 3.4.1, рисунок 3.4.2).

За кількості 5 мМ спостерігали подовження тривалості гемолізу до 110 с, тоді як максимальний рівень гемолізу та час досягнення його максимуму не відрізнявся від контрольних значень. Такий результат свідчить про незначне зменшення мембраностабілізуючих властивостей наночастинок у кількості 5 мМ порівняно з нижчими кількостями цього зразка. (таблиця 3.4.1, рисунок 3.4.2).

На основі представлених даних встановлено, що преінкубація еритроцитів з легованими наногідроксиапатитами з феритами (25% MgFe_2O_4 та CuFe_2O_4), призводить до змін у динаміці та максимальному рівні гемолізу еритроцитів. За умови преінкубації з наногідроксиапатитами, модифікованими MgFe_2O_4 , виявлено зсув еритрограми вправо, тоді як впливу на рівень гемолізованих еритроцитів не спостерігали.

У разі преінкубація еритроцитів із зразками з CuFe_2O_4 -феритами - найбільший захисний ефект спостерігався при концентрації 1 мМ — рівень гемолізу становив лише 37,42%, що є найнижчим серед усіх досліджених зразків. Кількість 2 мМ зумовлювала також помітне зменшення (43,23%). Водночас при 5 мМ рівень гемолізу (55,48%) майже не відрізнявся від контролю.

Отже, найбільш виражену мембраностабілізуючу дію продемонстрували зразки легованих наногідроксиапатитів з 25% CuFe_2O_4 та MgFe_2O_4 - феритами у кількості 1 мМ. Високі концентрації деяких зразків втрачали здатність знижувати гемоліз, що вказує на можливу дозозалежну дію.

4. ОХОРОНА ПРАЦІ ТА ДОВКІЛЛЯ

Виконання дослідження з вивчення мембранотоксичної дії наногідроксиapatитів та їх композитів потребує дотримання комплексу заходів з охорони праці, техніки безпеки, хімічної і біологічної безпеки, санітарно-гігієнічних норм, а також врахування впливу експериментальної діяльності на навколишнє природне середовище. Усі дослідницькі етапи передбачали застосування хімічних реагентів, біологічного матеріалу (еритроцитів) та лабораторного обладнання, що підвищує потенційний ризик травматизму, хімічного чи біологічного ураження та забруднення середовища.

З огляду на специфіку експерименту, особливу увагу приділено питанням безпечної організації робочого місця в умовах біохімічної лабораторії, правильному зберіганню та поводженню з реагентами, утилізації відходів і дотриманню правил роботи з біологічними матеріалами.

Для забезпечення безпеки праці під час роботи з наногідроксиapatитами, їх модифікаціями та розчином соляної кислоти (HCl) дотримувалися вимог Правил охорони праці під час роботи в хімічних лабораторіях (НПАОП 73.1-1.11-12) та Інструкції з охорони праці при роботі з кислотами (НПАОП 73.1-1.11-12, 2012); Робота з біологічним матеріалом (еритроцитами) виконувалась відповідно до настанов ВООЗ з лабораторної біобезпеки та загальних правил безпечної роботи з біологічними агентами

4.1 Ризики при роботі з хімічними речовинами

У ході дослідження застосовувалися хімічні сполуки, зокрема: солі кальцію, фосфати, соляна кислота, гідроксиди та розчинники. Особливу небезпеку становлять концентровані кислоти та основи, а також токсичні солі важких металів.

Соляна кислота (HCl), яка застосовується для індукції кислотного гемолізу, є сильною неорганічною кислотою з високою корозійною активністю. Її пари здатні подразнювати слизові оболонки, викликати хімічні опіки шкіри та дихальних шляхів, а також ушкодження очей при потраплянні навіть незначної кількості.

4.2 Заходи безпеки при роботі з НСІ включають:

- роботу виключно у витяжній шафі;
- використання хімістійких рукавичок, щільного лабораторного халата, захисних окулярів або щитка;
- застосування автоматичних дозаторів з фільтрами для уникнення контакту з парою;
- чітке маркування ємностей;
- наявність нейтралізуючих засобів у зоні експерименту;

Під час проведення синтезу наногідроксиапатитів та їхніх модифікованих форм дотримувались загальних вимог хімічної безпеки в лабораторії. Робота з хімічними реактивами (нітрати кальцію, феруму (III), двовалентних металів, фосфат амонію, гідрокарбонат амонію, розчин амоніаку) проводилась у витяжній шафі з використанням індивідуальних засобів захисту: лабораторного халата, захисних рукавичок та окулярів.

Синтез за участю амоніаку супроводжувався контролем рівня рН. Нагрівання зразків проводили на піщаній бані в умовах постійного нагляду, з дотриманням безпечної відстані та використанням жаростійкого посуду.

Після синтезу всі відходи збирали окремо відповідно до правил поводження з неорганічними та азотовмісними речовинами і утилізували згідно з чинними екологічними нормами. Робочі поверхні та обладнання очищали після завершення експериментів. Спектроскопічні дослідження проводились з дотриманням інструкцій з експлуатації ІЧ-спектрометра, без перевищення допустимих навантажень на прилад.

4.3 Біологічна безпека при роботі з еритроцитами

В експерименті використовували еритроцити барана, стабілізовані гепарином. Згідно з положеннями санітарно-епідеміологічних норм та рекомендацій ВООЗ, робота з кров'ю та її компонентами належить до об'єктів другого рівня біологічної небезпеки (BSL-2).

Основні ризики при роботі з біоматеріалом:

- можливість передачі зоонозних патогенів (включно з бактеріями, вірусами, паразитами);
- випадкове потрапляння біоматеріалу на шкіру, слизові, або в очі;
- аерозольне розповсюдження при піпетуванні або центрифугуванні.

Запобіжні заходи:

- використання одноразових пробірок, піпеток, наконечників з фільтрами;
- дезінфекція поверхонь перед та після досліду (розчини гіпохлориту, етиловий спирт);
- знезараження залишків крові перед утилізацією;
- суворе сортування лабораторних відходів.

Ризики кислотного гемолізу

Процедура кислотного гемолізу передбачає інкубацію еритроцитарної суспензії з наноматеріалами та подальше додавання HCl у визначених концентраціях. Можливе утворення аерозолів при піпетуванні кислоти, контакти з зараженими пробами.

Потенційні небезпеки:

- Утворення токсичних парів HCl при відкритому піпетуванні.
- Випадкове розлиття зразків, які містять як кислоту, так і біологічний матеріал.
- Потрапляння кислоти чи інфікованої рідини на шкіру, слизові оболонки або в очі.
- Пошкодження пробірок під час центрифугування (герметичність, балансування).
- Контамінація поверхонь або обладнання після контакту з кров'ю.
- Недостатнє маркування зразків, що ускладнює їх ідентифікацію та безпечне зберігання.

Комплексні заходи безпеки:

- Робота з кислотами здійснюється з використанням індивідуальних засобів захисту (рукавички, халат, захисні окуляри або щиток).
- Визначення та дотримання чіткого алгоритму дій при аварійних ситуаціях: негайне промивання ураженої ділянки великою кількістю води; повідомлення керівника;
- Зберігання зразків, що містять кислоту та біоматеріал, у холодильнику в окремому, чітко промаркованому контейнері з індикатором небезпеки.
- Регулярна дезінфекція робочих поверхонь після завершення роботи зі зразками.
- Забезпечення наявності аптечки, нейтралізувальних засобів та доступу до проточної води.

Фізичні та технічні чинники небезпеки

До фізичних чинників ризику, які супроводжують проведення дослідження, належать:

- високі температури — під час термічної обробки зразків у муфельній печі або сушильній шафі;
- робота з електрообладнанням — спектрофотометрами, центрифугами, мішалками, що потребує дотримання правил електробезпеки;
- механічні ушкодження — можливі при роботі зі скляним посудом, при транспортуванні пробірок тощо.

Робочі поверхні повинні бути вільними, а обладнання — стабільно закріпленим та перевіреном перед використанням. Лабораторія обладнана вогнегасником, аптечкою, засобами для промивання очей.

4.4 Екологічні аспекти дослідження

Вплив дослідження на довкілля мінімальний, однак усі відходи класифікуються відповідно до ступеня небезпеки:

- Хімічні відходи (розчини кислот, залишки реагентів) — нейтралізуються перед утилізацією;
- Біологічні відходи (еритроцити, піпетки, пробірки) — підлягають обов'язковій дезінфекції та утилізації через спеціалізовані служби;
- Комбіновані відходи — потребують подвійної обробки (дезінфекція + нейтралізація).

Забороняється зливати хімічні або біологічні відходи у каналізацію. Всі відходи збираються у герметичні контейнери з чітким маркуванням та передаються на утилізацію відповідно до затверджених екологічних норм.

ВИСНОВКИ

1. Згідно аналізу літературних джерел, встановлено, що наногідроксиапатити є перспективними для застосування у біології та медицині завдяки їхній високій біосумісності, структурній подібності до мінеральної фази кісткової тканини та можливості модифікації фізико-хімічних властивостей для покращення їх біологічних властивостей, зокрема легуванням різними іонами (Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+}). Дослідження впливу нових модифікованих зразків нано-ГАп на еритроцити є важливим для оцінки їхньої безпечності для подальшого біомедичного застосування.
2. Встановлено, що наногідроксиапати, леговані Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} проявляли мембраностабілізуючий вплив на мембранні структури еритроцитів. Зразок наногідроксиапатиту, легований Fe^{3+} (вміст феруму 1,3 мас.%) у кількості 1 мМ та 2 мМ найефективніше знижував рівень гемолізу — на 21,2 % і 22,3 % порівняно з контролем відповідно.
3. Виявлено, що стійкість еритроцитів до кислотного гемолітика за умови преінкубації їх із наногідроксиапатитами, легованими Fe^{3+} , Na^+ , Mg^{2+} та Zn^{2+} та CO_3^{2-} виражена меншою мірою, порівняно із безкарбонатними. Найбільший захисний ефект спостерігали за дії зразка, легованого Na^+ , Mg^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{3+} та CO_3^{2-} у кількості 1 мМ, який знижував рівень гемолізу на 11,7% порівняно з контролем та подовжував тривалість гемолізу до 120 секунд. Тоді як зразки, леговані Fe^{3+} (1,3 мас.%) та CO_3^{2-} у кількості 2 мМ та Fe^{3+} (2,6 мас.%) та CO_3^{2-} у кількості 1 мМ призводили до скорочення часу настання максимального гемолізу та тривалості цього процесу, що свідчить про дестабілізуючий вплив на мембрани еритроцитів.
4. Встановлено, що композити наногідроксиапатитів з феритами (ZnFe_2O_4 , CuFe_2O_4 , MgFe_2O_4) виявили мембраностабілізуючі властивості, що проявлялися зниженням максимального рівня гемолізу еритроцитів. Найбільший захисний ефект виявлено для композитів наногідроксиапатитів, легованих Na^+ , Zn^{2+} та CO_3^{2-} із 25 %

CuFe_2O_4 у кількості 1 мМ та $\text{Na}^+\text{Mg}^{2+} + 25\% \text{ZnFe}_2\text{O}_4$ у кількості 5 мМ, які знижували гемоліз еритроцитів на 20,4% та 21,4% порівняно з контролем відповідно.

5. Описано заходи з охорони праці та техніки безпеки у лабораторії. Дотримання заходів з охорони праці є необхідною умовою мінімізації ризиків, попередження негативного впливу наночастинок на здоров'я працівників та довкілля, а також забезпечення відповідності лабораторної діяльності чинним нормативно-правовим актам. Особлива увага приділяється впровадженню засобів індивідуального захисту, технічного контролю середовища, раціонального поводження з наноматеріалами й постійній підготовці персоналу до роботи в умовах підвищеної небезпеки.

ПЕРЕЛІК ПОСИЛАНЬ

1. Ray Tjieh Lim Q., Yi Cheng X., Yi Wee C. An Insight to the Various Applications of Hydroxyapatite. *Advanced Materials Science and Technology*. 2023. Vol. 5, no. 2. P. 0. URL: <https://doi.org/10.37155/2717-526x-0502-1> (date of access: 03.03.2025).
2. Lara-Ochoa S., Ortega-Lara W., Guerrero-Beltrán C. E. Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications. *PTArmaceutics*. 2021. Vol. 13, no. 10. P. 1642. URL: <https://doi.org/10.3390/pPTArmaceutics13101642> (date of access: 01.06.2025).
3. Hydroxyapatite (nano). *Public Health*. URL: https://health.ec.europa.eu/publications/hydroxyapatite-nano-0_en (date of access: 03.03.2025).
4. Nano hydroxyapatite induces glioma cell apoptosis by suppressing NF- κ B signaling pathway / G. Guo та ін. *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2019. URL: <https://doi.org/10.3892/etm.2019.7418> (дата звернення: 03.03.2025).
5. Harnessing the power of hydroxyapatite nanoparticles for gene therapy / Z. Xing et al. *Applied Materials Today*. 2024. Vol. 39. P. 102317. URL: <https://doi.org/10.1016/j.apmt.2024.102317> (date of access: 03.03.2025).
6. 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> (date of access: 03.03.2025).
8. Nanotechnology-based non-viral vectors for gene delivery in cardiovascular diseases / L. Jiao et al. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*. 2024. Vol. 12. URL: <https://doi.org/10.3389/fbioe.2024.1349077> (date of access: 03.03.2025).
9. Physicochemical evaluation and in vitro hemocompatibility study on nanoporous hydroxyapatite - *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. *SpringerLink*.

URL: <https://link.springer.com/article/10.1007/s10856-019-6247-5> (date of access: 12.06.2025).

10. The Effect of the Acid-Base Imbalance on the Size and Structure of Red Blood Cells / S. Kandrashina et al. *Cells*. 2024. Vol. 13, no. 21. P. 1813. URL: <https://doi.org/10.3390/cells13211813> (date of access: 21.05.2025).

11. Approach to analyse kinetics of erythrocyte hemolysis. 36. 2016. No. 36. URL: <https://doi.org/10.26565/2075-3810-2016-36-08> (date of access: 21.05.2025).

12. Hemolysis of Human Erythrocytes by Argovit™ AgNPs from Healthy and Diabetic Donors: An In Vitro Study / R. Luna-Vázquez-Gómez et al. *Materials*. 2021. Vol. 14, no. 11. P. 2792. URL: <https://doi.org/10.3390/ma14112792> (date of access: 21.05.2025).

13. Red blood cells as an efficient *in vitro* model for evaluating the efficacy of metallic nanoparticles / R. Wadhwa et al. *3 Biotech*. 2019. Vol. 9, no. 7. URL: <https://doi.org/10.1007/s13205-019-1807-4> (date of access: 21.05.2025).

14. Nanotoxicity of Silver Nanoparticles to Red Blood Cells: Size Dependent Adsorption, Uptake, and Hemolytic Activity / L. Q. Chen et al. *Chemical Research in Toxicology*. 2015. Vol. 28, no. 3. P. 501–509. URL: <https://doi.org/10.1021/tx500479m> (date of access: 21.05.2025).

15. Safitri N., Rauf N., Tahir D. Енано-Ганнинг drug loading and release with hydroxyapatite nanoparticles for efficient drug delivery: A review synthesis methods, surface ion effects, and clinical prospects. *Journal of Drug Delivery Science and Technology*. 2023. P. 105092. URL: <https://doi.org/10.1016/j.jddst.2023.105092> (date of access: 21.05.2025).

16. Lara-Ochoa S., Ortega-Lara W., Guerrero-Beltrán C. E. Hydroxyapatite Nanoparticles in Drug Delivery: Physicochemistry and Applications. *PΓArmaceutics*. 2021. Vol. 13, no. 10. P. 1642. URL: <https://doi.org/10.3390/pΓArmaceutics13101642> (date of access: 21.05.2025).

17. Nano-hydroxyapatite as a delivery system: overview and advancements / M. U. Munir et al. *Artificial Cells, Nanomedicine, and Biotechnology*. 2021. Vol. 49, no. 1. P. 717–727. URL: <https://doi.org/10.1080/21691401.2021.2016785> (date of access: 21.05.2025).

18. Investigating an organ-targeting platform based on hydroxyapatite nanoparticles using a novel in situ method of radioactive ¹²⁵Iodine labeling / N. Ignjatović et al. *Materials Science and Engineering: C*. 2014. Vol. 43. P. 439–446. URL: <https://doi.org/10.1016/j.msec.2014.07.046> (date of access: 21.05.2025).

19. Hydroxyapatite Nanoparticles for Improved Cancer Theranostics / S. Kargozar et al. *Journal of Functional Biomaterials*. 2022. Vol. 13, no. 3. P. 100. URL: <https://doi.org/10.3390/jfb13030100> (date of access: 21.05.2025).

20. Synthesis and Application of Nanometer Hydroxyapatite in Biomedicine. *Nanotechnology Reviews*. URL: <https://www.degruyterbrill.com/document/doi/10.1515/ntrev-2022-0127/html> (date of access: 10.06.2025).

21. Ionic Doping of Hydroxyapatite for Bone Regeneration: Advances in Structure and Properties over Two Decades—A Narrative Review / Z. Kubiak-Mihkelsoo et al. *Applied Sciences*. 2025. Vol. 15, no. 3. P. 1108. URL: <https://doi.org/10.3390/app15031108> (date of access: 01.06.2025).

22. Структура гідроксиапатиту, синтез, кристали і застосування. *Thpanorama*. URL: <https://ua.thpanorama.com/articles/qumica/hidroxiapatita-estructura-sntesis-cristales-y-usos.html> (дата звернення: 10.06.2025).

23. Hydroxyapatite benefits, dosage, and side effects. *Examine.com*. URL: <https://examine.com/supplements/hydroxyapatite/> (date of access: 10.06.2025).

24. Rowden A. Hydroxyapatite: What is its function in bone?. *Medical and health information* / *MedicalNewsToday*. URL: <https://www.medicalnewstoday.com/articles/hydroxyapatite-bone> (date of access: 10.06.2025).

25. Hurly A. Remineralizing Hydroxyapatite Toothpaste, Explained. *GQ*. URL: <https://www.gq.com/story/hydroxyapatite-toothpaste-explained> (date of access: 10.06.2025).

26. Scalable fabrication of freely sΓAable 3D hierarchical Cu-doped hydroxyapatite scaffolds via rapid gelation for енано-ΓАпnced bone repair / H. Yang et al. *Materials Today Bio*. 2024. Vol. 29. P. 101370. URL: <https://doi.org/10.1016/j.mtbio.2024.101370> (date of access: 10.06.2025).

27. Nanohydroxyapatite (нано-ΓАп) Doped with Iron Oxide Nanoparticles (IO), miR-21 and miR-124 Under Magnetic Field Conditions Modulates Osteoblast Viability, Reduces Inflammation and Inhibits the Growth of Osteoclast – A Novel Concept for Osteoporosis Treatment: Part 1 - PMC. *PMC Home*. URL: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8140937/> (date of access: 10.06.2025).

28. Hydroxyapatite vs Nano-Hydroxyapatite: Which is Right for You?. *Boka*. URL: <https://www.boka.com/blogs/guides/hydroxyapatite-vs-nano-hydroxyapatite> (date of access: 10.06.2025).

29. pascal helou. Comparative Analysis of Hydroxyapatite: Nano vs. Micro. *immunizeLABS*. URL: <https://immunizelabs.com/blogs/news/comparative-analysis-of-hydroxyapatite-nano-vs-micro-efficacy-applications-and-safety-considerations> (date of access: 10.06.2025).

30. N L. A Review on Natural Resources and Method of Hydroxyapatite Synthesis for Biomedical Application. *Modern Research in Dentistry*. 2023. Vol. 8, no. 1. URL: <https://doi.org/10.31031/mrd.2023.08.000676> (date of access: 10.06.2025).

31. Singh A., Kumari K., Kundu P. P. Synthesis of Biomimetic Hydroxyapatite from Natural Sources for Bone Tissue Engineering. *SpringerLink*. URL: https://link.springer.com/rwe/10.1007/978-981-97-4618-7_73 (date of access: 10.06.2025).

32. A Dental Hygienists' Overview of Nano vs. Micro Hydroxyapatite. *Today's RDH*. URL: <https://www.todaysrdh.com/a-dental-hygienists-overview-of-nano-vs-micro-hydroxyapatite/> (date of access: 10.06.2025).

33. Mechanical and morphological characterization of nano-hydroxyapatite (нано-ГАп) for bone regeneration: A mini review / D. V. Abere et al. *Biomedical Engineering Advances*. 2022. P. 100056. URL: <https://doi.org/10.1016/j.bea.2022.100056> (date of access: 10.06.2025).

34. Synthesis and characterization of hydroxyapatite nanoparticles prepared by a high-gravity precipitation method / H. Peng et al. *Ceramics International*. 2015. Vol. 41, no. 10. P. 14340–14349. URL: <https://doi.org/10.1016/j.ceramint.2015.07.067> (date of access: 10.06.2025).

35. Comprehensive Review of Preparation Methodologies of Nano Hydroxyapatite. *Journal of Environmental Nanotechnology*. 2014. Vol. 3, no. 1. P. 101–121. URL: <https://doi.org/10.13074/jent.2013.12.132058> (date of access: 10.06.2025).

36. Patrick G. Gallagher. 164 - Hemolytic Anemias: Red Cell Membrane and Metabolic Defects. URL: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4377-1604-7.00555-8> (date of access: 10.06.2025).

37. SAMIR K. BALLAS M.D AND STEVEN H. KRASNOW. Structure of Erythrocyte Membrane and Its Transport Functions. URL: <https://www.annclinlabsci.org/content/10/3/209.full.pdf> (date of access: 10.06.2025).

38. Aishwarya i. B. S. S. i. S. S. N. C. A Review for Resealed erythrocytes as a carrier for drug targeting. *International Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2024. Vol. 2, no. 7. P. 1085–1099. URL: <https://doi.org/10.5281/zenodo.12740027> (date of access: 10.06.2025).

39. Antony Vincy, Sarmistha Mazumder. Recent Progress in Red Blood Cells-Derived Particles as Novel Bioinspired Drug Delivery Systems: Challenges and

Strategies for Clinical Translation.

URL: <https://doi.org/10.3389/fchem.2022.905256> (date of access: 10.06.2025).

40. Erythrocyte Hemolysis: Mechanisms and Disease Implications. *BiologyInsights*. URL: <https://biologyinsights.com/erythrocyte-hemolysis-mechanisms-and-disease-implications/> (date of access: 10.06.2025).

41. Waldvogel Abramowski S. Hemolysis: Mechanism and clinico-biological consequences. *Transfusion Clinique et Biologique*. 2021. URL: <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2021.08.352> (date of access: 10.06.2025).

42. Cell Membrane – Structure, Components, Function and Diagram. Microbe Notes. URL: <https://microbenotes.com/cell-membrane/> (date of access: 10.06.2025).

43. 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> (date of access: 10.06.2025).

44. Gene Delivery by Hydroxyapatite and Calcium Phosphate Nanoparticles: A Review of Novel and Recent Applications. URL: <https://doi.org/10.5772/intechopen.71062> (date of access: 10.06.2025).

45. Exploring the effect of hydroxyapatite nanoparticle shape on red blood cells and blood coagulation / W. Sun et al. *Nanomedicine*. 2024. P. 1–14. URL: <https://doi.org/10.1080/17435889.2024.2396152> (date of access: 12.06.2025).

46. Hemolytic and biological assessment of lithium substituted hydroxyapatite nanoparticles for L929 and Hela cervical cancer cells / T. V. Kolekar et al. *Inorganic Chemistry Communications*. 2022. Vol. 137. P. 109172. URL: <https://doi.org/10.1016/j.inoche.2021.109172> (date of access: 12.06.2025).

47. Synthesis of silver modified hydroxyapatite nanoparticle and evaluation of its biological properties *in vitro* for potential biomedical application / H. WANG et al. *Journal of the Ceramic Society of Japan*. 2021. Vol. 129, no. 7. P. 443–452. URL: <https://doi.org/10.2109/jcersj.20230> (date of access: 12.06.2025).