

14.10

## Влияние хлорида аммония на структуру наночастиц гидроксипатита и пролиферативную активность мезенхимных стромальных клеток

© И.П. Добровольская,<sup>1,2</sup> К.В. Малафеев,<sup>1</sup> Ю.А. Нащекина,<sup>1,4</sup> И.А. Касаткин,<sup>3</sup> Е.Н. Попова,<sup>2</sup> В.Е. Юдин<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого,  
195251 Санкт-Петербург, Россия

<sup>2</sup>Институт высокомолекулярных соединений РАН,  
199004 Санкт-Петербург, Россия

<sup>3</sup>Санкт-Петербургский государственный университет,  
199034 Санкт-Петербург, Россия

<sup>4</sup>Институт цитологии РАН,  
194064 Санкт-Петербург, Россия  
e-mail: zair2@mail.ru

Поступило в Редакцию 21 января 2020 г.

В окончательной редакции 10 апреля 2020 г.

Принято к публикации 10 апреля 2020 г.

Получены наночастицы синтетического гидроксипатита, содержащие кристаллы хлорида аммония. Методами рентгеновской дифракции, термогравиметрического анализа и БЭТ показано, что разложение кристаллов хлорида аммония в среде аргона происходит в интервале  $T = 220–270^\circ\text{C}$ . Обработка при  $T = 300^\circ\text{C}$  приводит к термической стабильности наночастиц. Наличие хлорида аммония в культуральной среде существенно влияет на биосовместимость наночастиц, увеличение его содержания снижает пролиферативную активность мезенхимных стромальных клеток.

**Ключевые слова:** наночастицы, гидроксипатит, хлорид аммония, структура, пролиферативная активность, стромальные клетки.

DOI: 10.21883/JTF.2020.09.49696.27-20

### Введение

Гидроксипатит (ГА) используют в медицине, в частности в трансплантологии, при замене костных тканей, поврежденных в результате травм или болезней. Ортофосфаты кальция входят в состав костей, зубов, сухожилий, придавая им прочность и упругость. Ткани животных и человека включают до 70 mass% ГА в виде наночастиц различной формы и размеров. ГА наряду с молекулами коллагена, а также клетками (остеобластами, остеоцитами, остеокластами и др.) включен в процессы рекомбинации ткани, необходимые для жизнедеятельности организма. Поэтому важной характеристикой материалов, используемых в клеточных технологиях и в тканевой инженерии, является их биосовместимость. Только отсутствие негативного влияния как самого материала, так и продуктов его биоразложения на адгезию и пролиферативную активность клеток позволяет успешно использовать синтетические материалы в составе матриц для тканевой инженерии. [1].

В связи с развитием тканевой инженерии, активно ведутся исследования по разработке способов получения и изучению свойств синтетического ГА [2,3]. Известно 11 ионнезамещенных ортофосфатов кальция с молярным соотношением Са/Р от 0.5 до 2.0 [4]. Наиболее широко используются фосфаты кальция из группы ГА. Наночастицы фосфатов кальция могут быть синтезированы различными способами: сухим и мокрым, гидротер-

мальным, механохимическим, с использованием микроволновых процессов, а также с применением микро- и наноэмульсионной технологии. Наиболее полно способы получения и свойства синтетического ГА описаны в работах [5,6]. В статье [7] обобщены методы синтеза кристаллов фосфатов кальция, определения их размеров от нано- до макроуровня. Особое внимание уделено изучению формы одно-, двух- и трехмерных частиц. Результаты исследования влияния термической обработки на структуру и свойства наночастиц синтетического и биологического ГА приведены в работе [3]. Методами рентгеновской дифракции, электронной просвечивающей микроскопии показано, что ГА, полученный методом осаждения, представляет собой порошок, состоящий из анизометричных частиц, продольный размер которых составляет 70–100 nm, а поперечный — 7–9 nm. Частицы состоят из кристаллитов с продольными размерами 22–24 nm, поперечными — 8–10 nm. При температуре 600°C происходит рост кристаллитов, уменьшение объемной пористости и удельной поверхности. Синтетический ГА характеризуется меньшей термической устойчивостью по сравнению с ГА биологического происхождения.

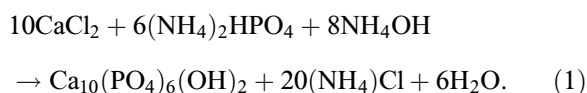
Одним из наиболее распространенных методов получения синтетических наночастиц ГА является их осаждение из смеси водных растворов  $\text{CaCl}_2$  и  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$  [8], в качестве осадителя используют раствор аммиака ( $\text{NH}_4\text{OH}$ ). В результате реакции, кроме кристаллов ГА

и воды, образуется хлористый аммоний  $\text{NH}_4\text{Cl}$  — кристаллическое вещество, растворимое в воде, кристаллы которого при нагревании до  $338^\circ\text{C}$  распадается на  $\text{NH}_3$  и  $\text{HCl}$ .

Поэтому целью настоящей работы являлось исследование структуры наночастиц синтетического ГА, полученного методом осаждения, изучение влияния ГА на пролиферативную активность мезенхимных стромальных клеток (СК).

## 1. Экспериментальная часть

Образцы наночастиц, содержащие ГА и хлорид аммония, получены в университете Сапиенза, Рим, Италия, методом синтеза, который описывается реакцией:



Содержание хлорида аммония варьировалось от 20 до  $\sim 40$  mass%, что достигалось режимом отмывки реакционной смеси в деионизованной воде. Были получены образцы, содержащие 20 и 40 mass% хлорида аммония (ГА20, ГА40).

Для сравнения было проведено исследование структуры и свойств порошка, полученного методом осаждения и содержащего 40 mass% хлорида аммония, который дополнительно обрабатывали при  $T = 300^\circ\text{C}$  в течение 30 min (образец ГА).

Фазовый анализ и расчет параметров кристаллической структуры образцов проводили методом рентгеновской дифракции на установке D2 Phaser (Bruker, Germany) использовали  $\text{CuK}\alpha$ -излучение. Обработка данных была выполнена с помощью программного обеспечения Topas 5.0 (Bruker). Размеры кристаллитов рассчитывали по интегральной ширине рефлексов с помощью программного обеспечения MAUD.

Пористую структуру и величину удельной поверхности определяли сорбционными методами, измерения проводили на газоадсорбционном порозиметре NOVA-1200e, США.

Термогравиметрический анализ (ТГА) образцов ГА был проведен на установке 209 F1 NETZSCH, Германия, в диапазоне температур от 30 до  $800^\circ\text{C}$  при скорости нагрева 10 deg/min в инертной среде (аргон). Расход инертного газа составлял 40 ml/min.

Частицы ГА, ГА20 и ГА40 выдерживали в питательной среде  $\alpha$ -MEM (Lonza, США) с добавлением 10% сыворотки крупного рогатого скота (HyClone, США) в течение 1 суток. Концентрация частиц ГА в питательной среде составила 0.01 g/ml. Ранее другими авторами было продемонстрировано, что даже незначительное содержание ГА, которое составляло не более 1% или 0.01 mg/ml, увеличивает остеогенный потенциал клеток [9]. Пролиферацию СК *in vitro* изучали в системе

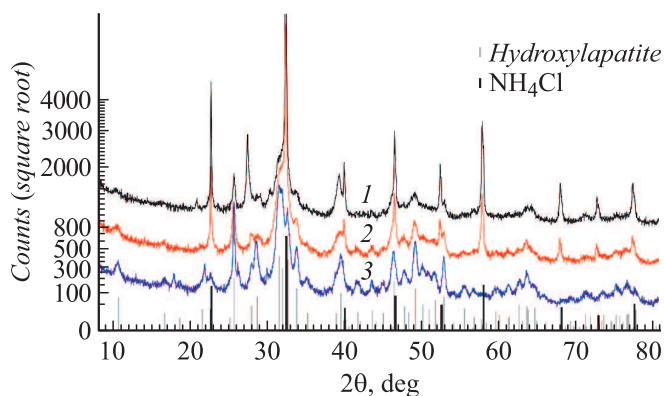
xCELLigenceRealTimeCellularAnalysis (RTCA). Первоначально измеряли фоновое сопротивление  $100\ \mu\text{l}$  питательной среды в лунках.  $100\ \mu\text{l}$  суспензии, содержащей  $5 \cdot 10^3$  клеток, вносили в лунки, и с помощью RTCA-системы оценивали пролиферацию. После культивирования в течение 1 суток питательную среду удаляли, и в лунки с клетками добавляли  $100\ \mu\text{l}$  питательной среды после инкубирования с частицами ГА. Клетки, культивируемые в питательной среде без инкубирования с частицами, служили положительным контролем. Изменения в сопротивлении, обозначенные как клеточный индекс (КИ), рассчитывали автоматически как СК, которые взаимодействуют с электродами E-планшетов.

## 2. Обсуждение результатов

На рис. 1 приведены рентгеновские дифрактограммы образцов ГА, ГА20 и ГА40. Из приведенных данных следует, оба образца синтетического ГА, не подвергнутые термической обработке, содержат хлорид аммония в виде второй фазы. Образец, обработанный при  $T = 300^\circ\text{C}$ , содержит только кристаллы ГА.

Количественный фазовый анализ показал, что концентрация хлорида аммония в образце ГА20 составляет 21.5 и 38.6 mass% в образце ГА40. Узкие дифракционные максимумы на рентгенограмме образца ГА свидетельствуют о более высокой кристалличности (больших размерах кристаллитов, меньшей их дефектности) по сравнению с образцами, содержащими  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Средний размер кристаллитов в ГА составляет 24 nm, для образца ГА20 это значение несколько ниже и равно 18 nm, аналогичная величина для ГА40 составляет 15 nm.

Термические свойства образцов ГА, ГА20 и ГА40 исследовали методом ТГА. На рис. 2 приведены зависимости потери массы от температуры в интегральном и дифференциальном виде. Видно, что для образцов ГА20 и ГА40 при  $T = 240\text{--}250^\circ\text{C}$  наблюдается интенсивная потеря массы, величина которой для ГА40 составляет



**Рис. 1.** Рентгеновские дифрактограммы порошков ГА, ГА20 и ГА40 (кривые 1–3). Вертикальные линии соответствуют дифракционным максимумам в соответствии с ICDD № 24–33 и № 7–7 для гидроксиапатита и хлорида аммония соответственно.

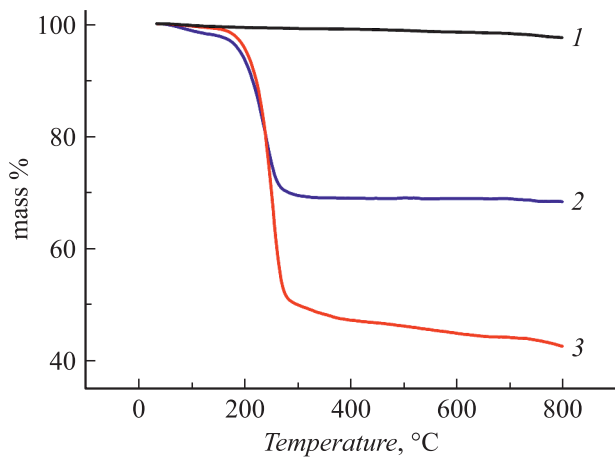


Рис. 2. ТГА кривые для 1 — ГА, 2 — ГА20, 3 — ГА40.

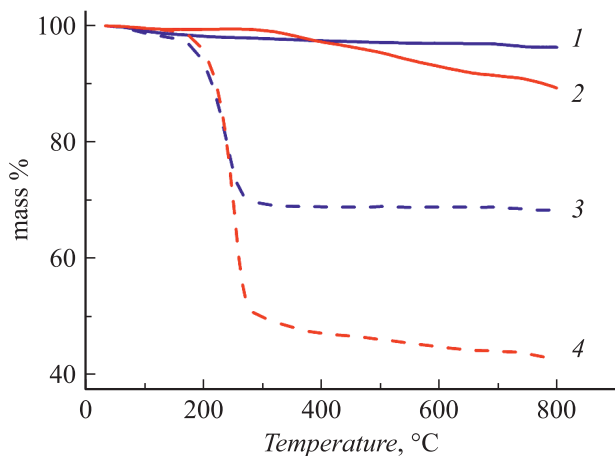


Рис. 3. Результаты термического анализа образцов ГА20 и ГА40: 1 — ГА20 после обжига, 2 — ГА40 после обжига, 3 — ГА20 исходный, 4 — ГА40 исходный.

около 50%, а для ГА20 — 30%. При этом потери массы для ГА в этом температурном диапазоне не наблюдаются. Отметим, что по данным рентгенофазового анализа образцы ГА20 и ГА40 содержат в значительном количестве кристаллы хлорида аммония.

Известно [10], что температура возгонки кристаллов хлорида аммония составляет 337°C. Процесс возгонки сопровождается образованием аммиака ( $\text{NH}_3$ ) и хлористого водорода ( $\text{HCl}$ ), которые при снижении температуры способны вновь соединиться в хлорид аммония. Отметим, что температура плавления кристаллических веществ существенно зависит от таких параметров, как размеры кристаллов, наличие примесей, пористость и др. Исходя из этого, можно предположить, что значительная потеря массы при  $T = 250^\circ\text{C}$  связана с разложением кристаллов хлористого аммония, входящего в состав ГА20 и ГА40. В пользу этого свидетельствует полное отсутствие потери массы в этом температурном

диапазоне для ГА, полученного из ГА40 и термообработанного при  $300^\circ\text{C}$ .

Образец	Объем пор, $\text{cm}^3/\text{g}$	Удельная поверхность, $\text{m}^2/\text{g}$
ГА20	0.152	57.789
ГА40	0.055	14.492
ГА	0.050	13.616

диапазоне для ГА, полученного из ГА40 и термообработанного при  $300^\circ\text{C}$ .

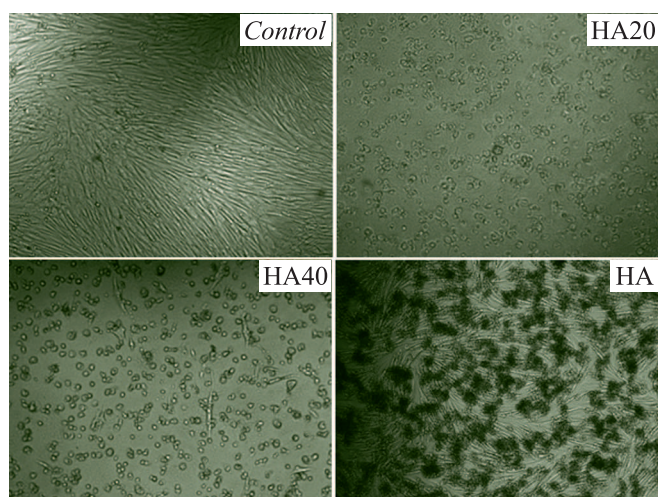
Справедливость высказанного предположения подтверждается результатами экспериментов по термообработке при  $T = 300^\circ\text{C}$  образцов синтетического ГА. На рис. 3 приведены ТГА кривые для образцов ГА20 и ГА40 до и после термообработки в течение 30 min при  $T = 300^\circ\text{C}$ . Видно, что для исходных образцов наблюдается существенная потеря массы при  $T = 220\text{--}250^\circ\text{C}$ . Образцы, подвергшиеся дополнительной высокотемпературной обработке ( $300^\circ\text{C}$ ), обладают термостабильностью в широком температурном диапазоне. Эти данные свидетельствуют в пользу удаления хлорида аммония в процессе термообработки при  $T = 300^\circ\text{C}$ .

Отметим, что разложение хлорида аммония, выделение аммиака и хлористого водорода происходит при температурах, которые для получения материалов для тканевой инженерии, а также в клеточных технологиях не используют.

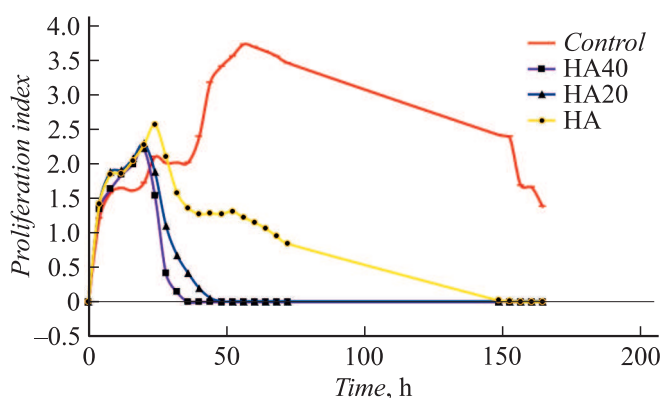
Наночастицы ГА используют в качестве наполнителей в композиционных материалах. Композиционные волокна, пленки и губки в последнее время находят применение как матрицы для тканевой инженерии. Взаимодействие полимерной матрицы с наполнителем в значительной степени зависит от его удельной поверхности. Пористая структура, величина удельной поверхности определяют реакционную способность материала, скорость протекания химических и биологических процессов в активных средах. Последнее важно при прогнозировании резорбции наночастиц ГА и материалов, в состав которых они входят после имплантации.

В таблице приведены значения объемной пористости и величины удельной поверхности образцов ГА, ГА20 и ГА40.

Из приведенных данных видно, что наибольшим объемом пор и величиной удельной поверхности обладает образец синтетического ГА20. Параметры пористой структуры образца ГА40 близки к аналогичным значениям ГА, подвергнутого термической обработке. Можно предположить, что кристаллы хлорида аммония располагаются в порах наночастиц. Поэтому пористость образца ГА40 ниже, чем аналогичная величина образца, содержащего меньшее количество фазы  $\text{NH}_4\text{Cl}$ . Уменьшение пористости и удельной поверхности термообработанного образца, видимо, связано с повышением его кристалличности в процессе отжига. Как показали



**Рис. 4.** Световая микроскопия СК после 1 недели культивирования в жидких средах, полученных после культивирования аналогичных клеток в присутствии частиц ГА, ГА20 и ГА40; увеличение  $10 \times$ .



**Рис. 5.** Изменение индекса пролиферации стромальных клеток в зависимости от времени культивирования в присутствии питательной среды после инкубирования с частицами ГА, ГА20, ГА40; контроль — клетки после культивирования в среде без предварительного инкубирования с частицами ГА.

результаты рентгеноструктурного анализа, этот образец отличается повышенными размерами кристаллитов, меньшей их дефектностью.

Результаты исследования пролиферации СК в культуральных средах, полученных после сокультивирования аналогичных клеток и частиц с разным содержанием хлорида аммония, приведены на рис. 4. Видно, что в контрольном образце СК образовали полный монослой. Клетки имеют веретенообразную форму и расположены по гиперболическим траекториям. После культивирования клеток в жидких средах, полученных после сокультивирования с ГА20 и ГА40, большинство клеток сохраняют округлую форму. Отметим, что в эксперименте по пролиферации СК в среде с меньшим содержанием хлорида аммония (после сокультивирования СК и

частиц ГА20), наряду с клетками округлой формы видны клетки вытянутой формы, характерной для контрольного образца. Морфология клеток в присутствии питательной среды после инкубирования частиц ГА, обработанных при высокой температуре, близка к морфологии клеток в контрольном образце. Клетки имеют вытянутую веретеновидную форму.

Округлая форма клеток, отсутствие веретенообразных клеток при культивировании в среде, полученной после сокультивирования клеток с частицами ГА20 и ГА40, свидетельствуют о ее негативном влиянии на клеточные процессы. Можно предположить, что в процессе сокультивирования клеток и наночастиц в биологически активной культуральной среде происходит частичный гидролиз хлорида аммония в соответствии с уравнением



$\text{NH}_4\text{Cl}$  используют в гистологии в качестве красителя тканевого материала, гематологии — для лизиса эритроцитов крови, в цитологии — для сортировки клеток, т.е. это вещество взаимодействует с клетками, способствует их разделению для последующего анализа. Также известно, что ионы аммония синтезируются некоторыми бактериями в организме и участвуют в физиологических процессах [11]. Однако, как показали результаты проведенных исследований, наличие в культуральной среде достаточно большого количества  $\text{NH}_4\text{Cl}$  препятствует расплыванию клеток, существенно снижает их пролиферативную активность.

Это подтверждает количественная оценка индекса пролиферации СК (рис. 5). Видно, что по истечении 1 суток при добавлении питательной среды после инкубирования с частицами ГА, индекс пролиферации клеток существенно снижается по сравнению с контролем. Причем чем больше хлористого аммония в образце, тем ниже индекс пролиферации. Отжиг образца ГА приводит к уменьшению количества хлористого аммония, и к увеличению пролиферативной активности СК. Хотя и этот образец уступает контролю, но в меньшей степени по сравнению с образцами ГА20 и ГА40.

## Выводы

Получены наночастицы, содержащие ГА и хлорид аммония в различном соотношении. Показано, что разложение кристаллов хлорида аммония происходит в интервале температур  $220\text{--}270^\circ\text{C}$ . Наличие хлорида аммония в культуральной среде существенно снижает пролиферативную активность стволовых клеток. Термическая обработка наночастиц при  $T = 300^\circ\text{C}$  приводит к снижению их негативного влияния на пролиферативную активность стромальных клеток, существенному повышению биосовместимости.

### Благодарности

Авторы благодарят Ресурсный центр „Рентгенодифракционные методы исследования“ Научного парка СПбГУ за проведение исследований по рентгеноструктурному анализу.

### Финансирование работы

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, проект № 19-73-30003.

### Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

### Список литературы

- [1] *Dobrovolskaya I.P., Yudin V.E., Popryadukhin P.V., Ivan'kova E.M.* St. Petersburg: Mediapapir, 2018. 232 p.
- [2] *Parisi M., Stoller M., Chianese A.* // Chem. Eng. Trans. 2011. Vol. 24. P. 211–216.
- [3] *Dobrovolskaya I.P., Tsarev N.S., Osmolovskaya O.M., Kasatkin I.A., Ivan'kova E.M., Popova E.N., Yudin V.E.* // Russ. J. Appl. Chem. 2018. Vol. 91. N 3. P. 368–374.  
DOI: 10.1134/S1070427218030035
- [4] *Dorozhkin S.* // Materials. 2009. Vol. 2. N 2. P. 399–498.  
DOI:10.3390/ma2020399
- [5] *Šupová M.* // J. Nanoscience Nanotechnol. 2014. Vol. 14. N 1. P. 546–563. DOI: 10.1166/jnn.2014.8895
- [6] *Sadat-Shojai M., Khorasani M.T., Dinpanah-Khoshdargi E., Jamshidi A.* // Actabiomater. 2013. Vol. 9. N 8. P. 7591–7621.  
DOI:10.1016/j.actbio.2013.04.012
- [7] *Lin K., Wu C., Chang J.* // Actabiomater. 2014. Vol. 10. N 10. P. 4071–4102. DOI: 10.1016/j.actbio.2014.06.017
- [8] *Caprariis B., Chianese A., Stoller M., Verdona N.* // Hydroxyapatite-Advances in Composite Nanomaterials, Biomedical Applications and Its Technological Facets. IntechOpen. 2018. DOI: 10.5772/intechopen.71775
- [9] *Carles-Carner M., Saleh L.S., Bryant S.J.* // Biomed. Mater. 2018. Vol. 13. N 4. P. 045009.  
DOI: 10.1088/1748-605X/aabb31
- [10] *Galston A.W.* Biological Chemistry Henry R. Mahler Eugene H. Cordes. 1967.
- [11] *Matsui T., Matsukawa Y., Sakai T., Nakamura K., Aoike A., Kawai K.* // Dig. Dis. Sci. 1997. Jul. Vol. 42. N 7. P. 1394-9.  
DOI: 10.1023/A:1018837920769