

## Общий отчет по проведенной работе

В результате выполнения эксперимента были получены образцы в виде пленок, в которых периодические паттерны из фосфатов кальция находятся в органической матрице агара (Рисунок 1).

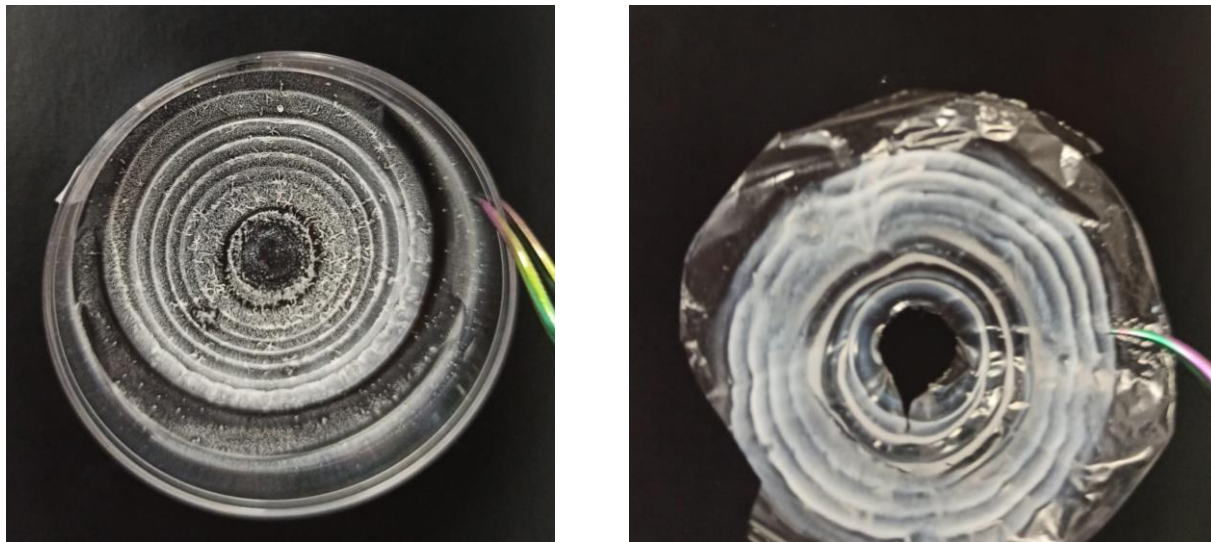


Рисунок 1 – Фотография полученных паттернов из фосфатов кальция, выращенная в агаре, содержащем 0,02 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . В качестве внешнего электролита использовали раствор 1 М  $\text{CaCl}_2$ .

Так как в костях существует пьезоэффект, который проявляется в возникновении электрических диполей в материале при механическом воздействии на него. Эти электрические диполи привлекают стволовые клетки, которые мигрируют в это место и превращаются в новую кость. Таким образом, пьезоэлектричество – это механизм восстановления костей, и, следовательно, очень важно получать материалы, которые обладают пьезоэлектрическими свойствами.

Пьезоэлектрический отклик исследовали с помощью атомно-силовой микроскопии и образцом в виде пленки с кольцами гидроксиапатита (ГА), выращенных в тонком слое агара, показаны на рисунке 2. Величина пьезоотклика измерялась на каждом из колец (Рисунок 2), причем измерения проводили в латеральном и аксиальном направлении для того, чтобы детектировать величину пьезоотклика. Установлено, что наибольшее значение пьезоотклика проявляет третье кольцо. На основании чего можно предположить, что этот участок будет обладать максимальной биосовместимостью.

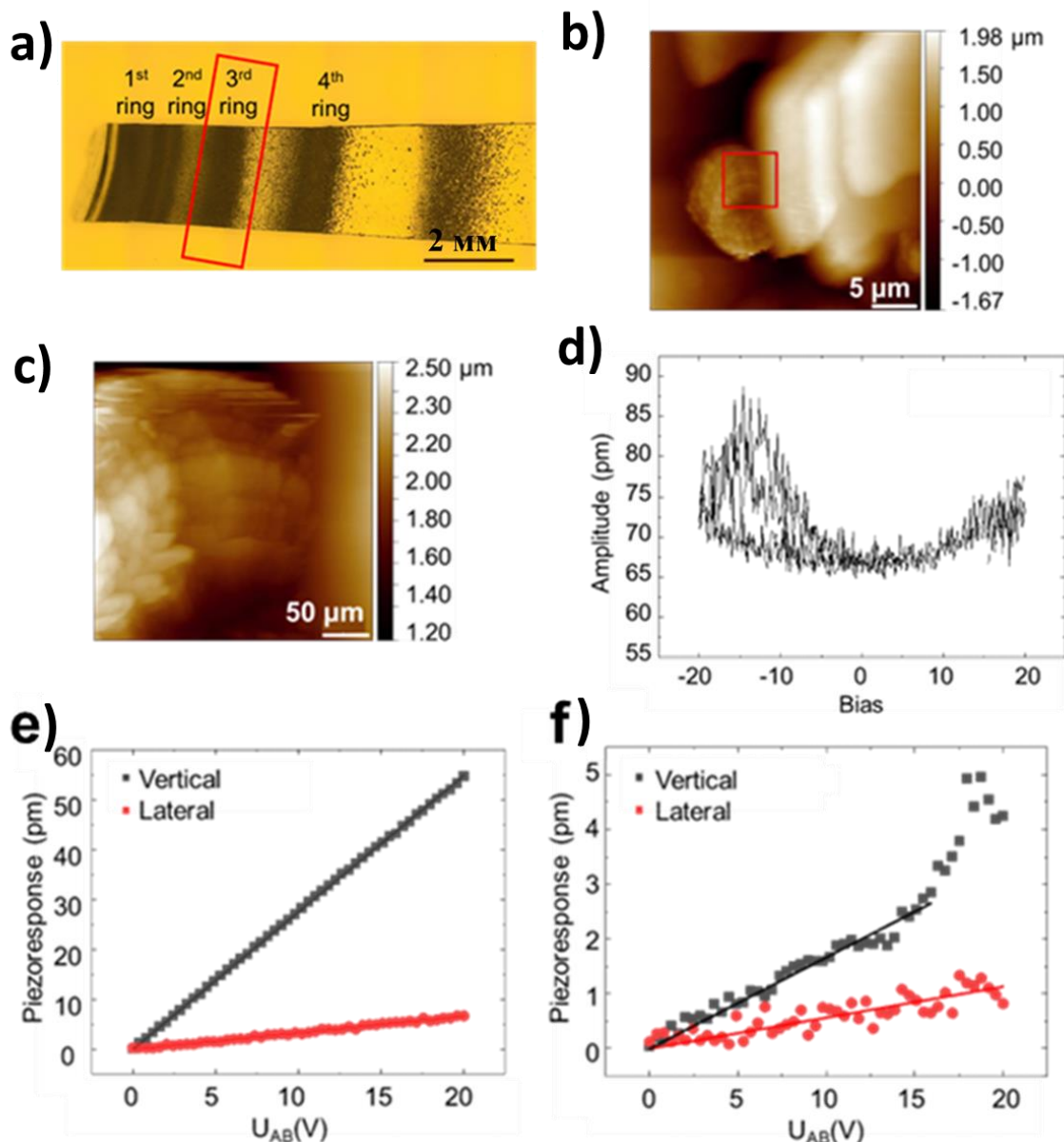


Рисунок 2 – а) Фотография образца с ГА кольцами. б–с) АСМ-изображения топографии пленки. д) Зависимость амплитуды от величины смещения во временной области. е–ф) Пьезоэлектрические кривые тонкой пленки с рисунком ГА, измеренные на третьем кольце

Еще одним параметром, влияющим на биосовместимость материала, является его фазовый состав. Рентгенофазовый анализ показывает структуру исследуемого вещества. Исследование порошка, собранного из разных участков пробирки показало, что осадок в начале эксперимента представляет собой гидроксиапатит (ГА), в середине эксперимента состоит из фосфата кальция, а на дне пробирки (окончание эксперимента) присутствует фаза гидрата гидрофосфата кальция (Рисунок 3).

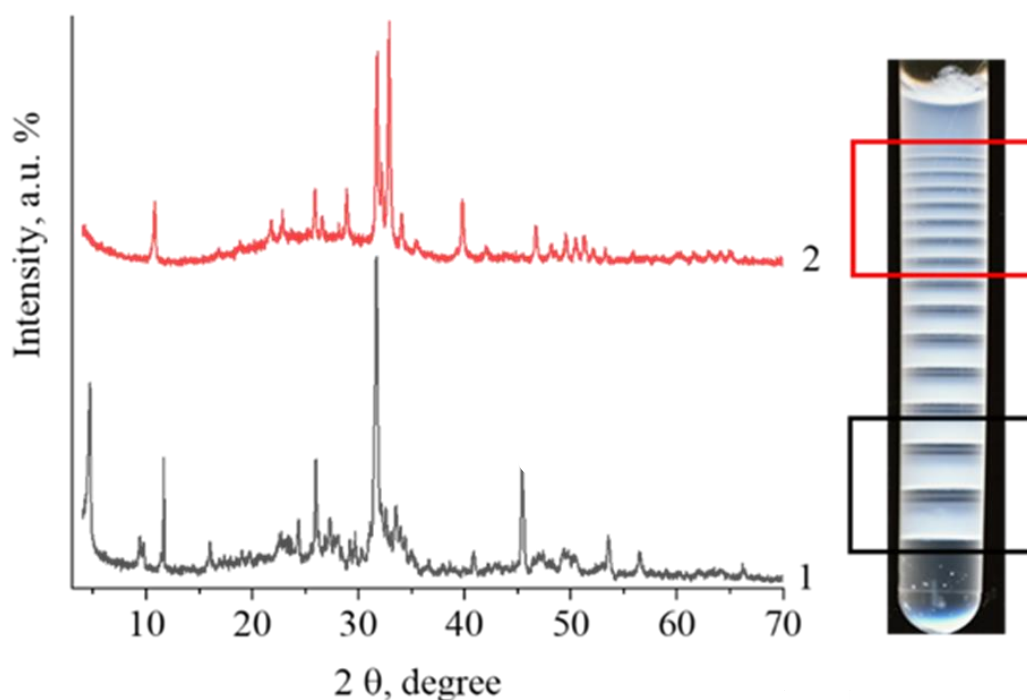


Рисунок 3 – Рентгенограммы порошков, полученных из верхних (красная кривая) и нижних (черная кривая) участков пробирки с кольцами Лизеганга

Таким образом, различные фазы могут быть получены из-за градиента концентрации ионов  $\text{Ca}^{2+}$ , которое происходит при диффузии раствора  $\text{CaCl}_2$  через гель агара.

ИК-спектры дают информацию о структуре вещества и наличии у него функциональных групп, которые отображаются в виде пиков при определенных длинах волн. На ИК-спектре видны две характерные полосы при  $562$  и  $601\text{ см}^{-1}$ , соответствующие деформационным колебаниям  $\nu_4$  ( $\text{O—P—O}$ ) в спектрах (Рисунок 4, таблица 1). Полоса в спектре при  $962\text{ см}^{-1}$  соответствует симметричным колебаниям связи  $\nu_1$  ( $\text{P—O}$ ), а пик в диапазоне  $1100\text{--}1000\text{ см}^{-1}$  соответствует антисимметричному растяжению  $\nu_3$  ( $\text{PO}$ ). Эти группы образуют характерную структуру  $\text{PO}_4^{3-}$  тетраэдров в решетке апатита. Полоса, относящаяся к группам  $\text{OH}$  ( $\delta$ ), и полоса ( $\text{OH}^-$ ) растяжения  $\text{HPO}_4^{2-}$  наблюдаются при  $631$  и при  $868\text{ см}^{-1}$  соответственно. Кроме того, основные колебания  $\text{OH}^-$  группы наблюдаются при  $3571\text{ см}^{-1}$  и при  $1640\text{ см}^{-1}$ . Следует отметить, что существенной разницы в ИК-спектрах не наблюдается для порошков, полученных при разных температурах от  $4$  до  $25^\circ\text{C}$ .

Перед СЭМ микроскопией, кольца гидроксиапатита извлекали из агара, промывали горячей дистиллированной водой и высушивали при  $60^\circ\text{C}$ . На рисунке 5 видно, что кристаллы, полученные при разной температуре и pH среды, различные по виду и форме, что может быть обусловлено различной фазовой структурой.

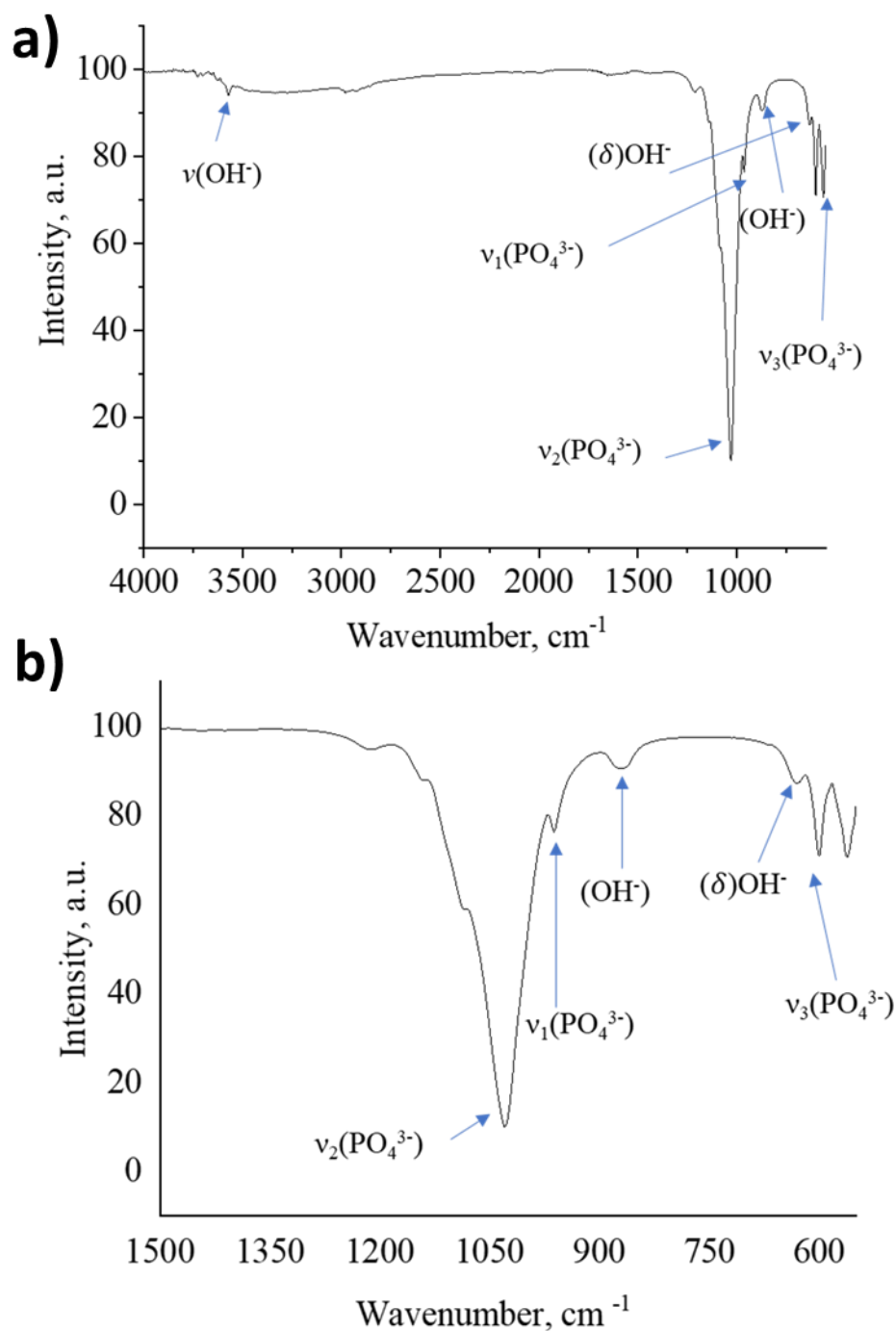


Рисунок 4 – ИК-Фурье спектры высушенного и отмытого порошка фосфата кальция, извлеченного из колец Лизеганга, выросших в 0,4 % агаре с добавлением 0,02 М  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ . Внизу спектра показан увеличенный фрагмент ИК-спектра в области 1500–600  $\text{cm}^{-1}$

Исследование биосовместимости полученных образцов проводится с помощью клеточных культур. Биосовместимость образцов характеризуется клеточной плотностью на образцах. На рисунке 6 видно, что клетки C2C12 предпочитают расти непосредственно на кольцах паттернов гидроксиапатита.

**Таблица 1.** Сравнение полос, наблюдаемых в ИК-спектрах образцов, с литературными данными.

Группы	Частоты колебаний (см <sup>-1</sup> )	Ссылки
O–P–O	562	568 <sup>[1]</sup> , 560-600 <sup>[2–4]</sup>
O–P–O	601	601 <sup>[1]</sup> , 602 <sup>[5]</sup>
(δ) O–H	631	635 <sup>[1]</sup> , 630 <sup>[2]</sup>
O–H колебания	868	875 <sup>[2,3]</sup>
HPO <sub>4</sub> <sup>2–</sup>	962	960 <sup>[1,2,3]</sup>
P–O асимметричные колебания	1031	1100-1000 <sup>[1,4]</sup>
(H <sub>2</sub> O)	1650	1640 <sup>[1]</sup> , 1650 <sup>[3]</sup>
O–H колебания	3571	3572 <sup>[1]</sup> , 3570 <sup>[5]</sup>

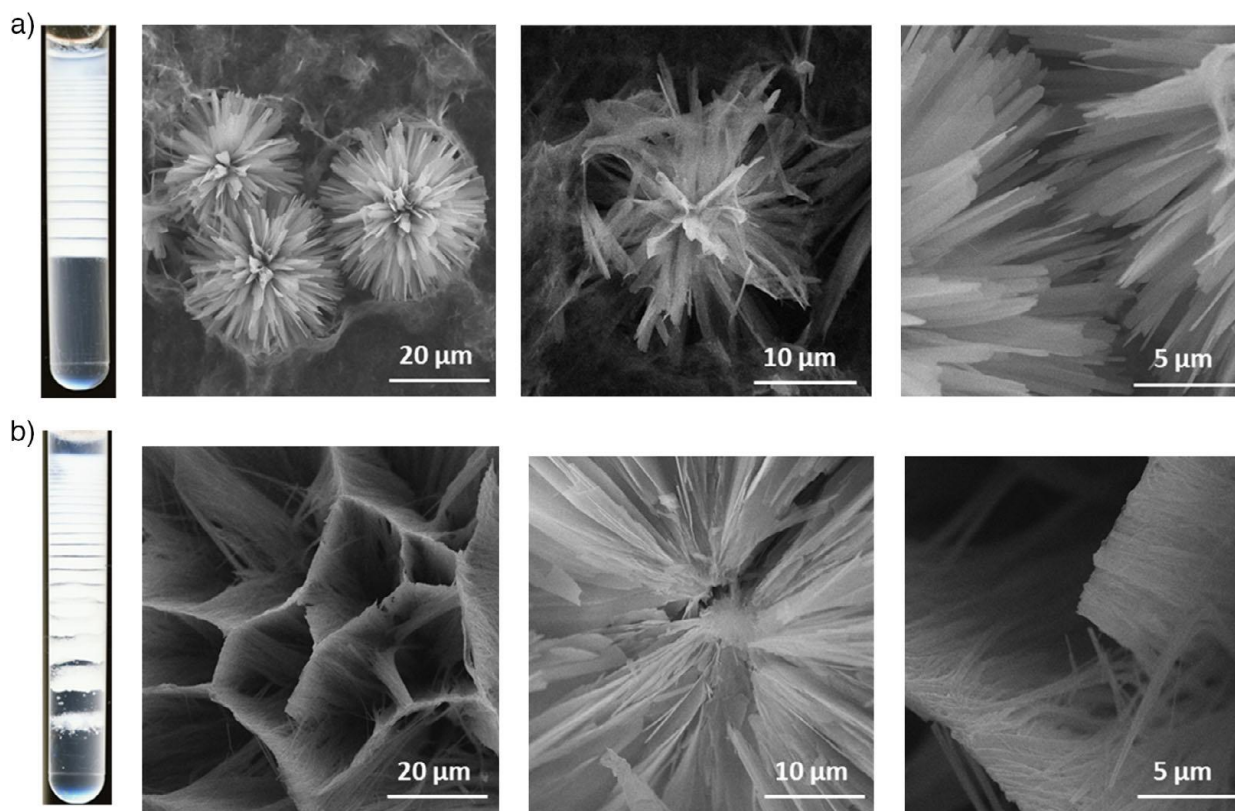


Рисунок 5 – СЭМ-изображения порошка фосфата кальция, полученного из колец Лизеганга, выращенных в геле агара с 0,075 М Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> при 25°C (а) и 37°C (б) и величине pH = 9 (а) и pH = 7 (б). В работе использовали раствор 1М CaCl<sub>2</sub>.

На рисунке 6 (а–б) видно, что клетки предпочитают расти на поверхности колец Лизеганга и выстраиваются вдоль колец фосфатов кальция. Стоит отметить, что плотность клеток на поверхности агара и на образце



между кольцами значительно ниже, чем на кольцах, что может быть обусловлено двумя факторами.

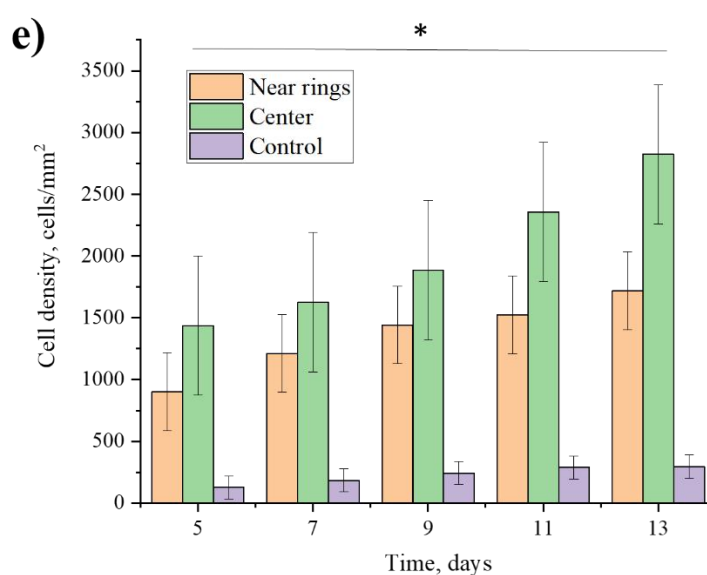
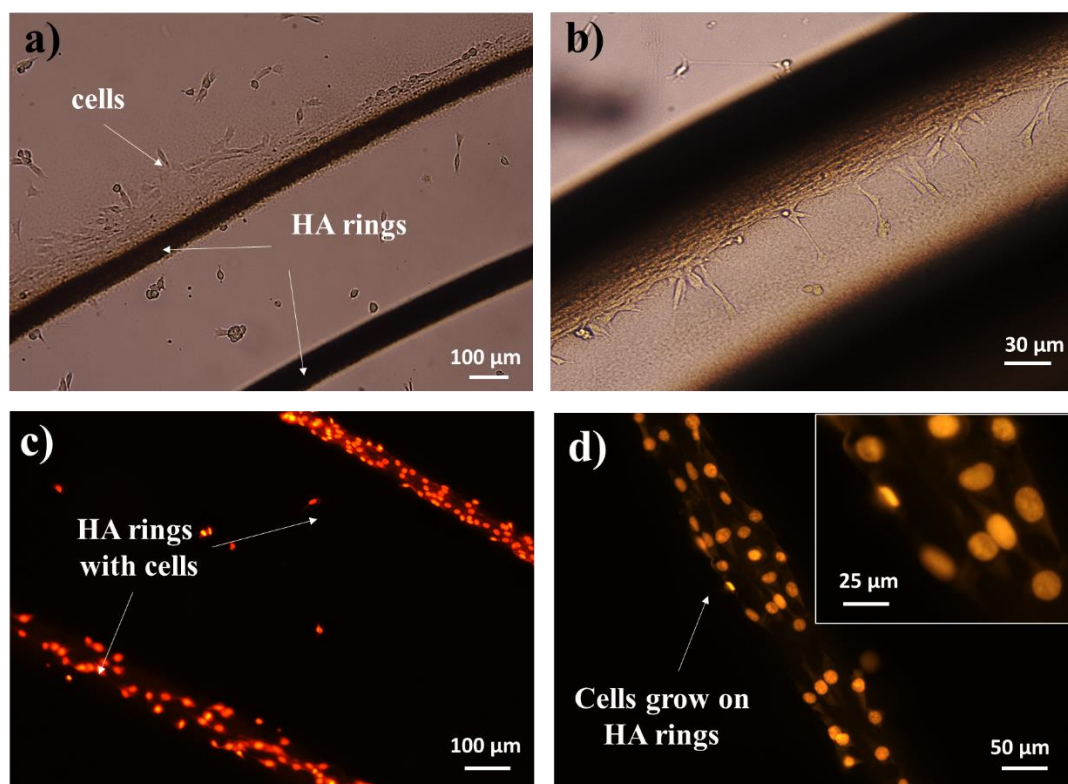


Рисунок 6 – Оптические (a–b) и конфокальные (c–d) изображения клеток C2C12, выращенных на кольцах Лизеганга из гидроксиапатита через 7 сут культивирования. Ядра клеток окрашены оранжевым (пропидий йодидом) е) Гистограмма плотности клеток C2C12, выращенных на разных участках образца в течение 13 сут культивирования клеток. Значки погрешностей представляют собой стандартное отклонение. В работе исследовали по три образца для каждого типа площади и три независимых образца, \* $p < 0,05$ ;  $n = 3$ .

Исследование плотности клеток в течение 13 сут показало, что с каждым днем клеточная плотность на образцах возрастает, что обусловлено биосовместимостью образцов. Кроме того, наличие клеток на поверхности колец Лизеганга подтверждали с помощью флуоресцентных красителей, которые предпочтительно связываются с ДНК и применяются для обнаружения клеток и подтверждения того, что в течение первых 1–5-сут клетки предпочитают расти на кольцах гидроксиапатита (Рисунок 6).

В качестве таких красителей использовали раствор пропидий йодида, который связывается с ДНК в ядрах клеток. После фиксации и окрашивания клеток образцы переворачивали, чтобы видеть клетки, выращенные на поверхности колец Лизеганга. На рисунке 6 (с–d) области колец ГА видны оранжевые ядра клеток, которые окрашены оранжевым.

Как видно из рисунка 6, на кольцах клетки растут более интенсивно чем в областях между кольцами. Следует отметить, что на кольцах примерно в восемь раз большее количество клеток, чем на агаре (Рисунок 6 е).

Таким образом, полученные структуры являются перспективными подложками для изучения пролиферации клеток и образования тканей. Полученные подложки также могут быть альтернативой 3D-биопечати и использоваться для формирования клеточных структур и узоров.

#### Используемая литература:

- [1] A. Paz, D. Guadarrama, M. López, J. E. González, N. Brizuela, J. Aragón, Quim. Nova 2012, 35, 1724.
- [2] A. Destainville, E. Champion, D. Bernache-Assollant, E. Laborde, Mater. Chem. Phys. 2003, 80, 269.
- [3] S. Raynaud, E. Champion, D. Bernache-Assollant, P. Thomas, Biomaterials 2002, 23, 1065.
- [4] I. Mobasherpour, M. S. Heshajin, A. Kazemzadeh, M. Zakeri, J. Alloys Compd. 2007, 430, 330.
- [5] J. K. Han, H. Y. Song, F. Saito, B. T. Lee, Mater. Chem. Phys. 2006, 99, 235.