

Вплив експериментального зневоднення організму на структурні характеристики мінералу губчастої кісткової тканини

Є.В. Гусак^{1,2}, С.М. Данильченко², В.М. Кузнецов², О.В. Гордієнко¹, М.В. Погорелов¹

¹ Сумський державний університет, вул. Римського-Корсакова, 2, 40007 Суми, України

² Інститут прикладної фізики НАН України, вул. Петропавлівська, 58, 40030 Суми, Україна

(Одержано 27.10.2014; опубліковано online 10.06.2015)

Багаторівнева будова кісткової тканини, мінеральну основу якої складає біологічний апатит, забезпечує широкий спектр механічних та фізіологічних можливостей. Досить значущим неорганічним компонентом кісткового матриксу є вода, яка забезпечує зв'язок внутрішнього та зовнішнього середовищ і транспортування речовин між клітинами та позаклітинним матриксом. Порушення загального вмісту води, а також її співвідношення в позаклітинному та клітинному секторах, може викликати зміни будови та функцій мінерального компоненту кістки. Тому, метою нашої роботи було вивчення структури біоapatиту в умовах порушення водного балансу кістки. Експеримент був проведений на лабораторних щурах, яким моделювали важкий ступінь дефіциту води. Рентгеноструктурний аналіз застосовували до зразків біоapatиту тазової кістки, відпалених при температурах 200 °С та 900 °С. Результати дослідження показали, що в умовах експериментального зневоднення мінеральна складова кістки відзначається більшим вмістом β -трикальцій-магній-фосфату (β -ТКМФ), утвореного після відпалу при 900 °С, що свідчить про значний дефіцит кальцію у первісному апатиті. Відносно високий рівень мікродеформацій в мінералі експериментальної групи вказує на переважаючу роль гетеровалентних заміщень в кристалічній решітці (Na^+ або $\text{K}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$), що підтверджується меншим вмістом магнію в β -ТКМФ після відпалу при 900 °С.

Ключові слова: Біологічний апатит, Вода, Відпал, Рентгенівська дифракція, β -трикальцій-магній-фосфат.

PACS numbers: 87.85.J – , 87.64.Bx

1. ВСТУП

Згідно сучасним даним, кістка має складну багаторівневу будову, нанорівневими складовими якої є мінеральна (кристаліти апатиту) та органічна (колаген) фази [1, 2]. Таким чином, базовими складовими кістки є мінералізовані волокна колагену I типу, а співвідношення зазначених компонентів є запорукою механічних характеристик органу.

Мінералізація в кістковій тканині – складний процес відкладання пластинко-подібних наночастинок гідроксиapatиту в міжфібрилярному та позафібрилярному просторі [2]. Центральним ядром кожної частинки є кристал; зовнішнє неапатитне оточення якого складають аморфний гідратний шар з розчиненими у ньому катіонами і аніонами та поверхнева плівка молекул води, жорстко зв'язаних між собою. Така багаторівнева будова біоapatиту забезпечує йому широкий спектр як механічних так і фізіологічних можливостей в організмі [3].

Не менш значущим неорганічним компонентом кісткового матриксу є вода, яка забезпечує зв'язок внутрішнього та зовнішнього середовищ і транспортування речовин між клітинами та позаклітинним матриксом [4].

Рідинний сектор кістки розділений на внутрішньоклітинну та позаклітинну воду [5]. До останньої відносять вільну (мобільну) воду, яка заповнює мікропори, мікросудини, Гаверсові канали, лакунарно-канальцеві системи, слабкозв'язану – зв'язується з фібрилами, матриксом та формує аморфний гідратний шар гідроксиapatиту, жорсткозв'язану воду – становить зовнішній шар біомінералу [6, 7, 8, 9]. За рахунок локалізації води в двох позиціях структури мінералу, виділяють наступні її ролі. По-перше, вода

займає вільні вакансії у кристалічній решітці недосконалого карбонатного апатиту, що забезпечує стабільність мінеральної системи з формуванням водневих зв'язків між сусідніми іонами. По-друге, гідратний шар на поверхні кристалітів створює механічну пару мінералу та колагену у кістковій тканині, він може виконувати функції «подушки» для захисту від механічних пошкоджень, оскільки рух води забезпечує витримку при навантаженні з меншою деформацією; забезпечує захист колагену від зсуву при одновісному стресі [2, 7].

Враховуючи складну структуру кісткової тканини, відсутність розгалуженої сітки кровоносних судин та низьку щільність клітин, вода канальцевої системи кістки є основним чинником передачі біомеханічних та хімічних сигналів [10, 11]. Від водно-електролітного оточення залежать також активність ензимів та чутливість рецепторів кісткових клітин [12].

Вода системи остеоцитарних лакун є найбільш вірогідним претендентом на роль сенсорного та ефекторного механізмів в механостатичній гіпотезі підтримки маси кісткової тканини. Згідно даної гіпотези, зовнішня деформація кістки призводить до стискання інтерстиціальної рідини канальців, що в кінцевому рахунку впливає на мембрану ефекторних клітин кісткової тканини та запускає каскад біохімічних реакцій, які можуть розпочати процеси ремоделювання кістки згідно з діючими біомеханічними факторами. Рідини остеоцитарної системи є також основним шляхом доставки ендокринних та паракринних сигналів в глибокі шари кістки.

Таким чином, порушення загального вмісту води а також її співвідношення в позаклітинному та клітинному секторах може призвести до порушення чу-

гливості кісткової тканини до ефекторних сигналів та викликати зміни будови та функції мінерального компоненту органу. Однак на сьогодні залишається недостатньо вивчена структура біоapatиту в умовах порушення водного сектору кістки, що і є метою даної роботи.

2. МАТЕРІАЛИ ТА МЕТОДИ

Дослідження проводилось на 12-ох білих щурах 2 місячного віку, які були розподілені на 2 групи. Першу групу складали інтактні тварини, особинам 2-ї групи був змодельований дефіцит води, шляхом переводу щурів на безводну дієту та сухий комбікорм. Через 10 днів по досягненню важкого ступеня дегідратації організму, тварини повертались до нормального водного режиму. Через 7 днів щурів виводили з експерименту шляхом передозування наркозу (кетамін, 70 мг/кг). Такі строки забору матеріалу дали змогу охарактеризувати мінеральний стан губчатої тканини після відновлення водно-електролітного балансу організму. Усі маніпуляції на тваринах виконували у відповідності з правилами Європейської конвенції захисту хребетних тварин, які використовуються в експериментальних та інших наукових цілях.

У тварин видаляли тазову кістку, проводили механічну очистку від м'яких тканин, потім отриманий кістковий матеріал спалювали у муфельній печі при 200 °C і 900 °C протягом 1 години. Отриману золу розтирали в ступці у порошок і досліджували методом рентгеноструктурного аналізу. Низькотемпературний відпал при 200 °C призводив до декомпозиції органічної складової кісткової тканини та видаленню не зв'язаної кристалітами води при збереженні незмінної структури мінералу [2]. Відпалювання при 900 °C, що призводить до рекристалізації біоapatиту та появи нових фаз, застосовувалось для оцінки досконалості структури первісного апатиту [2, 13, 14].

Рентгеноструктурні дослідження структури зразків були виконані на автоматизованому дифрактометрі ДРОН-4-07 (НВП «Буревестник», www.bourevestnik.ru). Система автоматизації ДРОН заснована на мікропроцесорному контролері, котрий забезпечує управління гоніометром ГУР-9 та передачу даних у цифровому вигляді до ПК.

При зйомці застосовувалось випромінювання CuK α (довжина хвилі 0,154 нм), фокусування за Брегом-Брентано θ - 2θ (2θ – брегівський кут). Значення сили струму та напруги на рентгенівській трубці складали 20 мА та 40 кВ. Зйомка зразків проводилась у режимі безперервної реєстрації (швидкість 1 %/хв.), діапазон кутів 2θ від 10° до 60°.

При фокусуванні за Брегом-Брентано фокус рентгенівської трубки та приймальна щілина детектора розташовані на окружності гоніометра, в центрі якої знаходиться плоский зразок. Реєстрація дифракційного спектра здійснюється при синхронному обертанні детектора і зразка навколо осі гоніометра, причому кутова швидкість обертання детектора у два рази більша ніж у зразка. Кванти рентгенівського випромінювання, дифрагованого від зразка, перетворюються блоком детектування в електричні імпульси, котрі після виходу з блока детектування під-

даються підсиленню, амплітудній дискримінації і далі застосовуються в якості інформаційного сигналу для вимірювання і реєстрації швидкості рахунку імпульсів рентгенівського випромінювання.

Експериментальні результати передавались безпосередньо в програмний пакет підтримки експерименту DifWin-1 (ТОВ «Эталон-ТЦ», www.specord.ru) для попередньої обробки. Ідентифікація кристалічних фаз проводилась за допомогою картотеки JCPDS (Joint Committee on Powder Diffraction Standards).

Оцінка стану мікроструктури біоapatиту проводилась двома методами. По-перше, середній розмір кристалітів розраховувався за формулою Шерера [15] припускаючи нехтовно малий вплив на розширення дифракційних піків фактору мікрореформацій кристалічної решітки. По-друге, розмір кристалітів та величина мікрореформацій у певному напрямку був розрахований за методом апроксимацій [16], котрий, при наявності двох піків, що відповідають паралельним кристалографічним площинам різних порядків відбиття одного напрямку, дозволяє розділити вплив на розширення дифракційних ліній двох головних факторів – малого розміру кристалітів, та наявності мікрореформацій, тобто відхилень міжплощинних відстаней зразка від міжплощинних відстаней еталону, в якому мікронапруги відсутні.

Необхідність застосування обох методів зумовлена специфічними особливостями дифракційної картини біогенного апатиту, яка характеризується значним розширенням ліній (рис. 1) через невелику кристалічність біомінералу. Оскільки застосування методу апроксимацій потребує наявності двох піків, то крім добре придатної лінії (0 0 2), виникає необхідність аналізу більш розмитої лінії (0 0 4). Такий підхід, з одного боку, дозволяє уникнути нехтування важливого кількісного показника стану мікроструктури – мікрореформацій решітки – який, як відомо [17], має значний вплив на функціональні характеристики біоapatиту, з іншого – загальна похибка подібних розрахунків може привести до неточного визначення розмірів кристалітів. Тому, з отриманих результатів (таблиця 1) більш коректним буде порівняння розмірів кристалітів, розрахованих за формулою Шерера з урахуванням факту наявності ненульових мікрореформацій решітки, отриманих методом апроксимацій, що дозволяє отримати якісну і кількісну характеристику мінералу губчатої кістки, наявність, характер і рівень дефектів його кристалічної будови в умовах експериментального дефіциту води.

3. РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Фазовий аналіз зразків обох груп при температурі обробки 200 °C показав наявність у них лише однієї фази – гідроксиapatиту (ГА), JCPDS 9-432, з характерно невисокою для кісткового мінералу кристалічністю (рис. 1).

Згідно таблиці 1 отримані за формулою Шерера розміри кристалітів демонструють тенденцію до збільшення у результаті експериментальної дегідратації. Однак, при врахуванні двофакторної залежності розширення дифракційної лінії (метод апроксимацій), спостерігається протилежна ситуація: розміри кристалітів помітно зменшуються при дегідрата-

ції. Це явище також може мати свої пояснення, але найбільш суттєвим і вартим особливої уваги є факт значного зростання рівня мікрореформацій кристалічної решітки біоapatиту у зразках після дегідратації. Збільшення дефектності, тобто структурної недосконалості, біомінералу при дегідратації організму свідчить про порушення нормальних обмінних процесів у кістковому матриксі.

Для уточнення наведених вище результатів було проведено дослідження фазового стану та розмірів кристалітів біоapatиту після відпалу зразків при 900 °С.

Після відпалу кісткового мінералу при 900 °С спостерігається (рис. 2) поява ще однієї фази - β -трикальцій-магній-фосфату (β -ТКМФ), що свідчить про дефіцит кальцію, а отже нестехіометричність апатиту в обох вихідних групах. Слід відмітити, що в кожній з них присутні фази β -ТКМФ з різним співвідношенням кальцію і магнію (контрольний – $\text{Ca}_{2,589}\text{Mg}_{0,411}(\text{PO}_4)_2$, JCPDS 87-1582; після зневоднення – $\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$, JCPDS 77-692). Оцінка розмі-

рів кристалітів за Шерером показала лише незначні відмінності (таблиця 2), які не мають інформативної значимості. Кількісний фазовий аналіз за допомогою методу корундових чисел [18] показав зменшення концентрації фази апатиту і, відповідно, збільшення концентрації β -ТКМФ після зневоднення. Порівняння ступені заміщення кальцію магнієм у β -ТКМФ за брутто-формулами $\text{Ca}_{2,589}\text{Mg}_{0,411}(\text{PO}_4)_2$ і $\text{Ca}_{2,86}\text{Mg}_{0,14}(\text{PO}_4)_2$ свідчить про її зменшення після дегідратації.

Також заслуговує уваги той факт, що за даними якісного фазового аналізу апатитна фаза у обох зразках після відпалу найкращим чином відповідає більш складній структурі ($\text{Ca}_{3,892}\text{Na}_{0,087}\text{Mg}_{0,021}$) ($\text{Ca}_{5,589}\text{Na}_{0,125}\text{Mg}_{0,028}$) $(\text{PO}_4)_{5,4}$, JCPDS 89-6441, з частковими заміщеннями Са на Na і Mg.

Таким чином, підвищена концентрація β -ТКМФ у зразках біоapatиту після дегідратації свідчить про більший дефіцит кальцію, а менший рівень заміщення кальцію магнієм в β -ТКМФ є ознакою недостатності магнію в структурі первісного апатиту порівняно з контрольними зразками. Зазвичай дефіцит

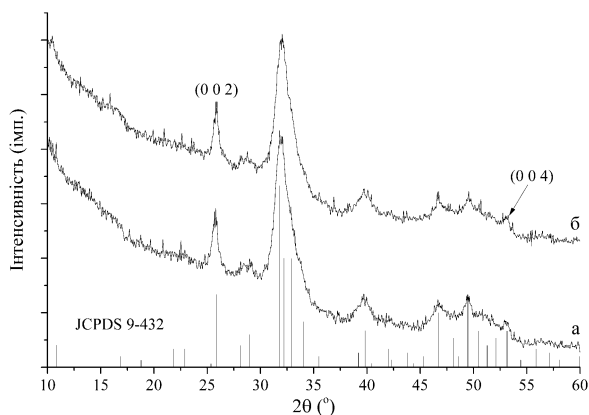


Рис. 1 – Дифрактограми зразків, відпалених при 200 °С (а – вододефіцитний, б – контрольний)

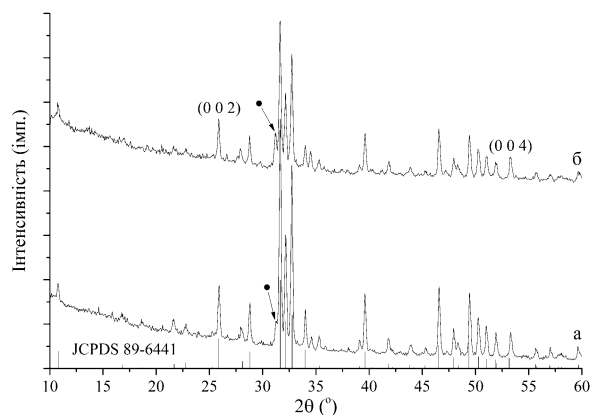


Рис. 2 – Дифрактограми зразків, відпалених при 900 °С (а – вододефіцитний, б – контрольний)

Таблиця 1 – Мікроструктурні характеристики біомінералу зразків кістки після відпалу при 200 °С

Зразок	Індекси Міллера, (h k l)	Розмір кристалітів за Шерером, нм	Параметри мікроструктури	
			Розмір кристалітів, нм	Величина мікрореформацій, 10^{-3}
Контрольний	(0 0 2)	15,8	17,5	1,34
	(0 0 4)	14,3		
Вододефіцитний	(0 0 2)	17,2	12,8	3,16
	(0 0 4)	26,1		

Таблиця 2 – Фазовий склад та структурні характеристики мінералу зразків кістки після відпалу при 900 °С

Зразок	Фази та їх концентрації у %		Індекси Міллера, (h k l)	Розмір кристалітів, нм	Ступінь заміщення кальцію магнієм, %
	Фаза	Концентрація, %			
Контрольний	ГА	92	(2 1 1)	53,8	6,22
			(2 1 3)	73,5	
	β -ТКМФ	8	(0 2 10)	37,5	
			(2 2 0)	52,7	
Вододефіцитний	ГА	85	(2 1 1)	51,5	5,75
			(2 1 3)	61,5	
	β -ТКМФ	15	(0 2 10)	41,4	
			(2 2 0)	49	

кальцію у структурі апатиту пов'язується з ізовалентними (наприклад, $Mg^{2+} \rightarrow Ca^{2+}$) або гетеровалентними (наприклад, Na^+ або $K^+ \rightarrow Ca^{2+}$) заміщеннями. У останньому випадку однозарядність натрію чи кальцію компенсується відповідним заміщенням у аніонній підрешітці $CO_3^{2-} \rightarrow PO_4^{3-}$, що супроводжується збільшенням мікронапружень і мікродеформацій.

Отримані дані цілком узгоджуються з описаним вище фактом зростання мікродеформацій кристалічної решітки біоapatиту при експериментальному зневодненні. Питання зміни розмірів кристалітів апатиту при зневодненні організму залишається відкритим і потребує подальших досліджень.

Мінеральний компонент матриксу у групі тварин з вододіфіцитним станом організму характеризується формуванням зсуву на мікроструктурному рівні. Зменшення концентрації магнію у зразках пов'язане з частковим розчиненням або осадженням мінералу в наслідок активної роботи остеоцитарного насосу. У першому випадку видаляються іони, які входять до складу аморфної фази, а також магній, який має поверхневу локалізацію в кристалах біоapatиту. У другому – частина іонів, яка виявилась у більш стійкому стані, приймає участь у формуванні кристалічної решітки з мінерал-утворюючими іонами. Збільшення кристалічності кісткової тканини за умов зневоднення організму може бути пов'язане з активною діяльністю остеоцитарного насосу.

Внаслідок патологічної мінералізації позаклітинного матриксу виникає викривлення механічних і електрохімічних сигналів між клітинами кісткової тканини. У результаті чого просторова структура регуляторно-метаболических зсувів у сітці виявляється неадекватною істинним механічним навантаженням, і структура адаптивного ремоделювання кістки перестає бути оптимальною. Окрім цього, зменшення рівня водного компонента та видозміна структури порожнин призводять до порушення транспортної функції лакуарно-канальцевої системи. Зменшення ефективності механізму мікроциркуляції знижується, а отже погіршуються гомеостатичні характеристики остеоцитів.

4. ВИСНОВКИ

В умовах експериментального зневоднення організму мінеральна складова кістки відзначається більшим вмістом β -ТКМФ, утвореного після відпалу при 900 °C, що свідчить про значний дефіцит кальцію в первісному апатиті. Відносно високий рівень мікродеформацій в мінералі експериментальної групи вказує на переважаючу роль гетеровалентних заміщень в кристалічній решітці (Na^+ або $K^+ \rightarrow Ca^{2+}$), що підтверджується меншим вмістом магнію в β -ТКМФ після відпалу при 900 °C.

Influence of Experimental Dehydration on Structural Characteristics of Bone Mineral

E.V. Husak^{1,2}, S.N. Danilchenko, V.N. Kuznetsov², E.V. Gordienko¹, M.V. Pogorielov¹

¹ Sumy State University, 2, Rimsky Korsakov Str., 40007 Sumy, Ukraine

² Institute of Applied Physics, NAS Ukraine, 58, Petropavlovskaya Str., 40030 Sumy, Ukraine

Multilayer structure of bone tissue, the mineral bases of it is bioapatite, provides wide spectrum of mechanical and physiological properties. Water is also a significant component of bone matrix, which ensures relation between internal and external environment and transports nutrients from extracellular matrix to the cells. Violation of the water content and its ratio in extracellular and cellular sectors may change structure and function of the mineral component of bone. Thus, the aim of this research was to determine the structure of bioapatite in case of water imbalance. The experiment was conducted on laboratory rats, which modeled a heavy degree of water deficiency. X-Ray diffraction was applied to samples bioapatite pelvic bone, annealed at 200 °C and 900 °C. The research results demonstrate the high level of β -tricalcium-magnesium-phosphate as bone mineral component in conditions of experimental dehydration, which formed after burning in 900 °C. It testifies a significant calcium deficiency in the original apatite. The relatively high level of microstrain in the mineral component of experimental group indicates the dominant role of heterovalent substitutions in the crystal lattice (Na^+ or $K^+ \rightarrow Ca^{2+}$) which is confirmed by lower content of magnesium in β -tricalcium-magnesium-phosphate after specimen's annealing in 900 °C.

Keywords: Bioapatite, Water, Annealing, X-Ray Diffraction, β -tricalcium-magnesium-phosphate.

Влияние экспериментального обезвоживания организма на структурные характеристики минерала губчатой костной ткани

Е.В. Гусак^{1,2}, С.Н. Данильченко², В.М. Кузнецов², А.В. Гордиенко¹, М.В. Погорелов¹

¹ Сумский государственный университет, ул. Римского-Корсакова, 2, 40007 Сумы, Украина
² Институт прикладной физики НАН Украины, ул. Петропавловская, 58, 40030 Сумы, Украина

Многоуровневое строение костной ткани, минеральную основу которой составляет биологический апатит, обеспечивает широкий спектр механических и физиологических возможностей. Достаточно значимым неорганическим компонентом костного матрикса является вода, которая обеспечивает связь внутренней и внешней сред и транспортировку веществ между клетками и внеклеточного матрикса. Нарушение общего содержания воды, а также ее соотношение во внеклеточной и клеточном секторах, может вызвать изменения строения и функций минерального компонента кости. Поэтому, целью нашей работы было изучение структуры биоапатита в условиях нарушения водного баланса кости. Эксперимент был проведен на лабораторных крысах, которым моделировали тяжелую степень дефицита воды. Рентгеноструктурный анализ применяли к образцам биоапатита тазовой кости, отожженных при температурах 200 °С и 900 °С. Результаты исследования показали, что в условиях экспериментального обезвоживания минеральная составляющая кости отличается большим содержанием β -трикальций-магний-фосфата (β -ТКМФ), образованного после отжига при 900 °С, что свидетельствует о значительном дефиците кальция в первоначальном апатите. Относительно высокий уровень микродеформаций в минерале экспериментальной группы указывает на преобладающую роль гетеровалентного замещений в кристаллической решетке (Na^+ или $\text{K}^+ \rightarrow \text{Ca}^{2+}$), что подтверждается меньшим содержанием магния в β -ТКМФ после отжига при 900 °С.

Ключевые слова: Биологический апатит, Вода, Отжиг, Рентгеновская дифракция, β -трикальций-магний-фосфат.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R. Hiratai, M. Nakamura, K. Yamashita, *J. Vet. Med. Sci.* **76** No 2, 205 (2014).
2. E. Davies, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **111**(14) No 8, 1354 (2014).
3. Yan Wang, *Nat. Mater.* **12** No 12, 1144 (2013).
4. A.C. Guyton, J.E. Hall, *Textbook of Medical Physiology*, 264 (2000).
5. Vivian Job, W.W. Swanson. *J. Biol. Chem.* **122**, 485 (1938).
6. M.J. Schroeder, A.Sadasiva, R.M. Nelson, *Biomechan. Biomed. Biophys. Eng.* **2** No 1, 1 (2008)
7. E.E. Wilson, A. Awonusi, M.D. Morris, D.H. Kohn, M.J. Teckienburg, L.W. Beck, *Biophys. J.* **90**, 3722 (2006).
8. J.W. Smith, *J. Bone Joint Surg. Am.* **46 B** No3, 553 (1964).
9. V.M. Gun'ko, V.V. Turov, *Colloid. Surf. B: Biointerface.* **53**, 29 (2006).
10. H.M. Frost, *Anat. Rec.* **262**, 398 (2001).
11. J.P. Bilezikian, L.G. Raisz, G.A. Rodan, *Principles of Bone Biology* (Calif.: Academic Press: 2002).
12. H.M. Frost, *J. Bone Miner. Res.* **7**, 253 (1992).
13. X.-Y. Wang, Y. Zuo, D. Huang, X.-D. Hou, Y.-B. Li, *Biomed. Environ. Sci.* **23**, 473 (2010).
14. А.В. Брик, С.Н. Данильченко, В.В. Радчук, В.Л. Карбовский, А.М. Калиниченко, Н.Н. Багмут, *Mineral. J.* **29** No 2, 32 (2007) (A.B. Brik, S.N. Danil'chenko, V.V. Radchuk, V.L. Karbovskiy, A.M. Kalinichenko, N.N. Bagmut, *Mineral. J.* **29** No 2, 32 (2007)).
15. H.P. Klug, L.E. Alexander, *X-Ray Diffraction Procedures: For Polycrystalline and Amorphous Materials* (New York: Wiley: 1974).
16. S.N. Danilchenko, O.G. Kukharenko, C. Moseke, I.Yu. Protsenko, L.F. Sukhodub, B. Sulkio-Cleff, *Crystal Res. Technol.* **37**, 1234 (2002).
17. С.М. Данильченко, *Вісник СумДУ. Серія «Фізика, математика, механіка»* № 2 (2007) (S.M. Danyl'chenko, *Visnyk SumDU. Seriya «Fizyka, matematyka, mekhanika»* № 2 (2007)).
18. F.H. Chung, *J. Appl. Crystallogr.* **8**, 17 (1975).