

Структура и фазовый состав апатита костной ткани и кальцинированных фрагментов аорты при остеопорозе

Я.В. Хижня¹, А.В. Атаман¹, А.С. Станиславов², В.Н. Кузнецов², С.Н. Данильченко²

¹ Сумский государственный университет, ул. Римского-Корсакова, 2, 40007 Сумы, Украина

² Институт прикладной физики НАН Украины, ул. Петропавловская, 58, 40000 Сумы, Украина

(Получено 15.04.2013; в отредактированной форме – 12.05.2013; опубликована online 17.10.2013)

В работе приведены результаты исследований структуры и фазового состава апатита костной ткани и кальцинированных фрагментов аорты одного и того же экспериментального животного при модельном остеопорозе. Методами рентгеновской и электронной дифракции, электронной микроскопии и инфракрасной спектроскопии установлено, что патологический кальцификат образца аорты кролика при модельном остеопорозе с точки зрения кристаллохимии представляет собой дефектный апатит кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Температурный рост кристаллов эктопического апатита при отжиге до 900 °С происходит аналогично биоапатиту костной ткани.

Ключевые слова: Структура, Фазовый состав, Апатит костной ткани, Остеопороз.

PACS numbers: 87.15. ± v

1. ВСТУПЛЕНИЕ

Остеопороз и атеросклероз оказывают значительное неблагоприятное влияние на здоровье людей, причем остеопороз может являться практически бессимптомным до момента перелома [1]. Клиническая взаимосвязь между кальцификацией сосудов и снижением плотности костной ткани становится все более очевидной [1, 2]. Несмотря на то, что эта проблема окончательно не решена, данные современных исследований указывают на взаимосвязь этих заболеваний не только по общему возрасту возникновения, но и по биологическому механизму развития. Помимо увеличения числа переломов, остеопороз также повышает общую смертность от других причин. Низкая минеральная плотность костей (МПК) является независимым фактором риска сердечно-сосудистой смертности у пожилых людей, более весомым, чем уровни артериального давления и холестерина крови [3-6]. Кальцификация аорты и коронарных артерий широко распространены в старшем возрасте и могут являться основой сердечно-сосудистой заболеваемости и смертности, при этом они связаны с признаками резорбции костей и переломами позвоночника [7-10].

Проведен целый ряд исследований, посвященных кальцификации сосудов и ее связи с диабетом, остеопорозом и менопаузой, механизмам кальцификации сосудов в контексте биологии костей и связи между кальцификацией артерий с остеопорозом [11-13]. Кальцификация внеклеточного вещества является комплексным и многофакторным процессом, ограниченным влиянием матричных протеинов и регулируемым ингибиторами и активаторами кальцификации и формирования костей [14, 15].

Цель настоящей работы состояла в сравнительном анализе структурных характеристик апатита костной ткани и кальцинированных фрагментов аорты одного и того же экспериментального животного (кролика) в условиях модельного остеопороза.

2. МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Рентгено-дифракционные исследования структуры материалов были выполнены на дифрактометре ДРОН4-07 («Буревестник», Россия) с использованием излучения $\text{CuK}\alpha$ ($\lambda = 0,154$ нм) при условиях фокусировки по Брэггу-Брентано ($\theta - 2\theta$) (2θ – брэгговский угол). Образцы снимали в режиме непрерывной регистрации (скорость 2°/мин) в диапазоне углов 2 θ от 15 до 55°. Предварительная обработка экспериментальных результатов была проведена в программном пакете DIFWIN-1 (ТОО «Эталон ПТЦ»), идентификация кристаллической структуры и фазового состава – при помощи программного пакета Crystallographica Search-Match (Oxford Cryosystems).

Просвечивающая электронная микроскопия с электронной дифракцией была выполнена на приборе ПЭМ-125К (SELMI, Украина), который позволяет изучать морфологию и фазовый состав минеральной компоненты образцов.

При подготовке проб отожженные минерализованные ткани в форме порошка помещали в дистиллированную воду и обрабатывали ультразвуком с помощью установки УЗДН-А (SELMI, Украина). Ультразвуковой излучатель находился в сосуде с дистиллированной водой и образцами в течение десяти минут. Удельная мощность составляла приблизительно 15-20 Вт/см² при рабочей частоте излучателя 22 кГц.

Предварительный отжиг образцов при 400 °С позволял избавляться от мешающего влияния органических компонент при неизменной минеральной составляющей. Отжиг биоапатита при 900 °С служил температурным тестом, позволяющим из данных о составе образовавшихся кристаллических фаз сделать выводы о первоначальном состоянии минерала [16, 17].

Инфракрасные спектры были получены на приборе Spectrum-One (Perkin Elmer). Перед исследованиями образцы в виде порошка были смешаны с порошком KBr (3.0 мг образца на 300 мг KBr) и спрессованы в таблетки.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Рентгеновские дифрактограммы образцов апатита плечевой и бедренной кости кролика, отожженных при 400 °С, имеют вид типичный для апатита костной ткани с размытыми и перекрывающимися линиями (из-за малых размеров кристаллитов). На дифрактограммах образцов апатита костей, отожженных при 900 °С, кроме хорошо выраженной фазы гидроксиапатита $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ видны признаки кристаллической фазы октакальций фосфата $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$. Это свидетельствует о дефиците кальция в исходном апатите костной ткани, поскольку соотношение Ca/P в $\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ (1,33) значительно ниже, чем в стехиометрическом гидроксиапатите (1,67). Такая картина в целом типична для апатита костей молодых животных [17] и поэтому дифрактограммы костной ткани здесь не приводятся.

Поскольку количество образца патологического кальцификата аорты было недостаточным для полноценного рентгендифракционного анализа, исследования фазового состава были выполнены только методом электронной дифракции. Полученные результаты сравнивали с данными аналогичных исследований биоапатита плечевой и бедренной кости, принимая во внимание и результаты рентгеновской дифракции этих образцов.

Согласно данным электронной микроскопии, размеры и форма кристаллов исследованных образцов минерала костной ткани (рис. 1) вполне соответствуют известным ранее данным о биоапатите кости [18]; картины дифракции электронов (рис. 1б) содержат рефлексы апатита (отмечены индексами hkl), что согласуется с результатами рентгеновской дифракции.

Размеры (20-30 нм) и форма кристаллов патологического кальцификата аорты кролика (рис. 2а) близки к таковым для образцов апатита кости. Некоторые кристаллы сгруппированы в более крупные

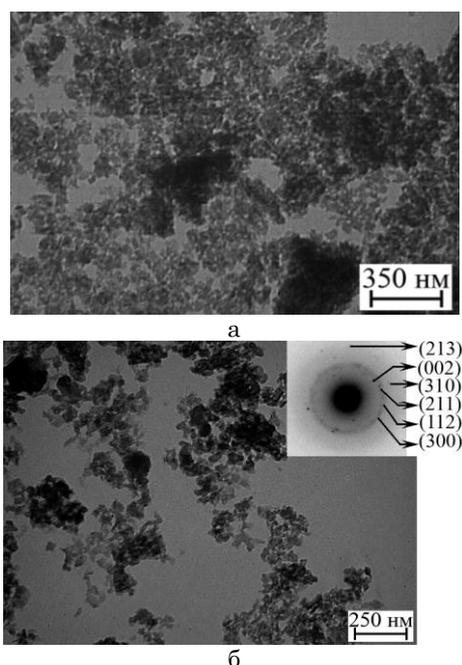


Рис. 1 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов и картина электронной дифракции образца плечевой кости ($T = 400$ °С)

скопления, но нельзя утверждать точно, что это – относительно крупные кристаллические частицы, или агломераты небольших кристаллов, не вполне диспергированные при ультразвуковой обработке. В целом, можно сказать, что разброс размеров кристаллических частиц патологического кальцификата аорты значительно шире, чем кристаллов апатита костной ткани. Немного большим есть и средний размер кристаллических частиц кальцификата аорты. Как и для кристаллов апатита кости, картины дифракции электронов патологического кальцификата аорты кролика, отожженного при 400 °С (рис. 2б), содержат линии гидроксиапатита (отмечены индексами hkl). Отчетливых линий других кристаллических фаз не выявлено.

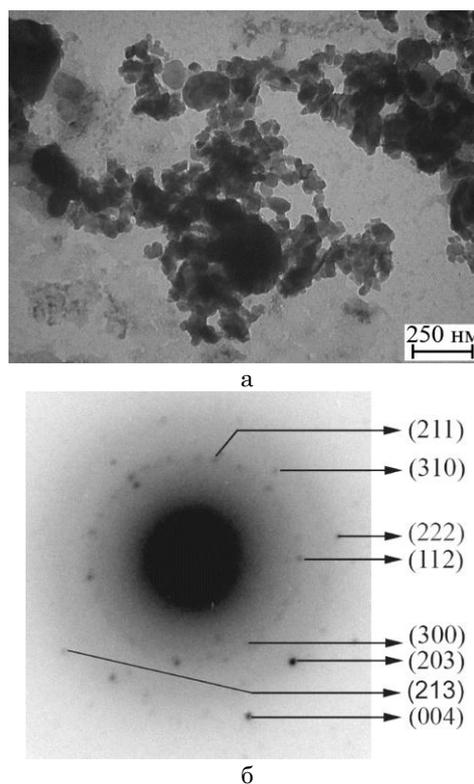


Рис. 2 – Электронно-микроскопическое изображение кристаллов (а) и картина электронной дифракции (б) образца кальцификата аорты ($T = 400$ °С)

Электронно-микроскопическое изображение и картина электронной дифракции для образца патологического кальцификата аорты кролика, отожженного при 900 °С, (рис. 3) подтверждает то, что основным минералом кальцификата является апатит. Кристаллы после отжига становятся большими (200-700 нм) с характерной для апатита формой (огранка частиц соответствует гексагональной симметрии).

Электроннограмма патологического кальцификата аорты кролика, отожженного при 900 °С, содержит только рефлексы гидроксиапатита (отмечены индексами hkl). Видимых признаков других кристаллических фаз не выявлено. Точечный характер колец свидетельствует о том, что электронный пучок формирует дифракционную картину на группе (агломерате) из нескольких монокристаллов.

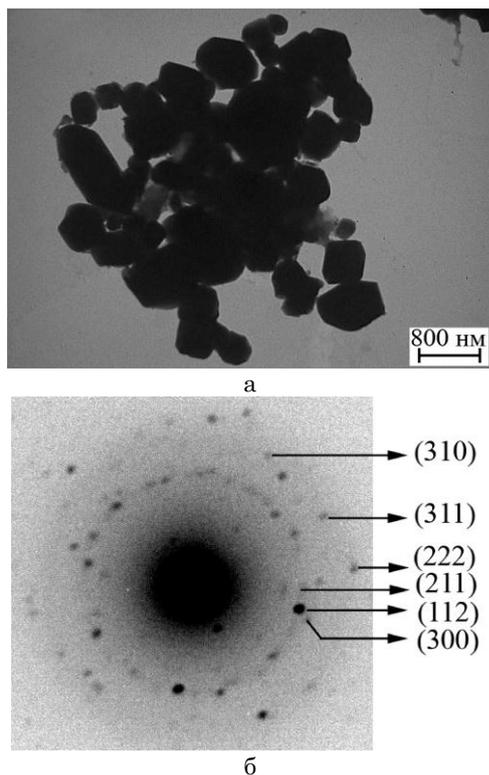


Рис. 3 – Електронно-мікроскопічне зображення кристалів (а) і картина електронної дифракції (б) зразка кальцифіката аорти після отжигу при $T = 900\text{ }^{\circ}\text{C}$

С приведенными выше результатами структурного анализа хорошо согласуются данные инфракрасной (ИК) спектроскопии, подтверждающие апатитную природу кальцификата аорты. Кроме того, ИК

спектры имеют полосы поглощения, соответствующие карбонатным замещениям в структуре апатита. Обнаруженный карбонатный апатит имеет преимущественно признаки В-типа, т.е. частичного замещения фосфат-ионов карбонат-ионами.

4. ВЫВОДЫ

Согласно данным комплексных исследований (рентгеновская и электронная дифракция, электронная микроскопия, ИК спектроскопия) патологический кальцификат данного образца аорты кролика при модельном остеопорозе с точки зрения кристаллохимии представляет собой нанокристаллический апатит кальция $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Данные ИК спектроскопии указывают на присутствие карбонатных ионов в позиции фосфатных ионов апатита, что свидетельствует о полной идентичности патологического кальцификата аорты минералу нормальной костной ткани. Вместе с тем, к отличительным морфологическим особенностям кристаллов эктопического биоапатита можно отнести несколько большие размеры и большую неоднородность размеров и формы по сравнению с биоапатитом костной ткани. Температурный рост кристаллов патологического кальцификата аорты (при отжиге $900\text{ }^{\circ}\text{C}$) происходит также как и в случае биоапатита костной ткани. Следует отметить, что биоапатит костной ткани в условиях модельного остеопороза может иметь и свои структурные и морфологические особенности, вызванные этой экспериментальной патологией. Наиболее существенным выводом данной работы есть установленный факт кристаллохимической идентичности патологического кальцификата аорты и минерала костной ткани одного экспериментального животного.

Структура і фазовий склад апатиту костної тканини кальцинованих фрагментів аорти при остеопорозі

Я.В. Хижня¹, О.В. Атаман¹, О.С. Станіславов², В.М. Кузнецов², С.М. Данильченко²

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

² Інститут прикладної фізики НАН України, вул. Петропавлівська, 58, 40000 Суми, Україна

У роботі наведені результати досліджень структури та фазового складу апатиту кісткової тканини і кальцинованих фрагментів аорти однієї і тієї ж експериментальної тварини при модельному остеопорозі. Методами рентгенівської та електронної дифракції, електронної мікроскопії та інфрачервоної спектроскопії встановлено, що патологічний кальцифікати зразка аорти кролика при модельному остеопорозі з точки зору кристаллохімії являє собою недосконалий апатит кальцію $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Температурний ріст кристалів ектопічного апатиту при відпалюванні до $900\text{ }^{\circ}\text{C}$ відбувається аналогічно біоапатиту кісткової тканини.

Ключові слова: Структура, Фазовий склад, Апатит костної тканини, Остеопороз.

Structure and Phase State of Bone Apatite of Calcified Aortic Fragments with OsteoporosisYa.V. Khyzhnya¹, A.V. Ataman¹, A.S. Stanislavov², V.N. Kuznetsov², S.M. Danilchenko²¹ *Sumy State University, 2, R.-Korsakov Str., 40007 Sumy, Ukraine*² *Institute for Applied physics, NAS of Ukraine, 58, Petropavlovskaya Str., 40000 Sumy, Ukraine*

The paper represents the results of the study on the structure and phase composition of bone apatite and fragments of calcified aorta of the same experimental animal with model osteoporosis. Examination by the X-ray and electron diffraction, electron microscopy and infrared spectroscopy reveals that pathological calcification of rabbit aorta with model osteoporosis in crystal-chemical terms is the imperfect calcium apatite $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Temperature growth of ectopic apatite crystals during annealing at 900°C is similar to bioapatite of bone.

Keywords: Structure, Phase composition, Bone apatite, Osteoporosis.

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. R.S. Braithwaite, N.F. Col, J.B. Wong, *J. Am. Geriatr. Soc.* **51**, 364 (2003).
2. D.P. Kiel, L.I. Kauppila, L.A. Cupples, *Calcif. Tissue Int.* **68**, 271 (2001).
3. E. Schulz, K. Arfai, X. Liu, J. Sayre, V. Gilsanz, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **89**, 4246 (2004).
4. D.M. Kado, W.S. Browner, T. Blackwell, R. Gore, *J. Bone Miner. Res.* **15**, 1974 (2000).
5. T. Yamaguchi, T. Sugimoto, S. Yano, et al., *Endocr. J.* **49**, 211 (2002).
6. K.S.G. Jie, M.L. Bots, C. Vermeer, J.C.M. Witteman, D.E. Grobbee, *Calcif. Tissue Inter.* **59**, 352 (1996).
7. A.E. Hak, H.A. Pols, A.M. van Hemert, A. Hofman, J.C. Witteman, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* **20**, 1926 (2000).
8. L.L. Demer, *Circulation* **92**, 2029 (2005).
9. P.A. Price, S.A. Faus, M.K. Williamson, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* **21**, 817 (2001).
10. M. Abedin, Y. Tintut, L.L. Demer, *Arterioscler Thromb Vasc. Biol.* **24**, 1161 (2004).
11. T.M. Doherty, L.A. Fitzpatrick, F. Inoue, *Endocr. Rev.* **25**, 629 (2004).
12. S.I. McFarlane, R. Muniyappa, J.J. Shin, G. Bahitayar, J.R. Sowers, *Endocrine* **23**, 1 (2004).
13. M.R. Rubin, S.J. Silverberg, *J. Clin. Endocrin. Metab.* **89**, 4243 (2004).
14. T.M. Doherty, K. Asotra, L.A. Fitzpatrick, *PNAS* **100**, 11203 (2003).
15. L.I. Demer, *Int. J. Epidemiol.* **31**, 737 (2002).
16. S.N. Danilchenko, A.V. Koropov, I.Yu. Protsenko, B. Sulkiocleff, L.F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.* **41**, 263 (2006).
17. S.N. Danilchenko, I.Yu. Protsenko, L.F. Sukhodub, *Cryst. Res. Technol.* **44**, 553 (2009).
18. С.Н. Данильченко, *Вісник СумДУ: Серія «Фізика, математика, механіка»* №2, 33 (2007).