

Роль ионов цитрата в строении неорганического компонента костной ткани

Продолжение. Начало в № 7.

Ранее в «Медичній газеті «Здоров'я України» была опубликована первая часть обзора исследования E. Davies и соавт. (Кембриджский университет, Великобритания), посвященная обоснованию новой модели строения неорганического компонента костной ткани, ключевую роль в которой играют анионы цитрата. Предлагаем вниманию читателей заключительную часть, в которой приводятся возможные структурные модели октакальцийфосфат-цитрата (ОСР-цитрата) и данные, подтверждающие наличие подобного вещества в костной ткани.

Построение возможных моделей элементарной ячейки ОСР-цитрата

Следующим шагом исследования стало построение возможных моделей элементарной ячейки ОСР-цитрата на основании данных ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии, порошковой рентгено-структурной дифракции и инфракрасной спектроскопии на основе преобразования Фурье (Fourier transform infrared spectroscopy, FTIR), полученных в эксперименте, а также дальнейшая геометрическая оптимизация этих моделей. Для оценки правдоподобности каждой модели проводилось сравнение ее расчетных показателей с экспериментальными.

Построение структурных моделей проводилось на основании следующих принципов:

- каждая элементарная ячейка должна была содержать только необходимое количество углерода;
- группа фосфата водорода замещалась анионом цитрата с зарядом 2⁻ для достижения зарядового равновесия (хотя в некоторых моделях применялись анионы цитрата с зарядом 3⁻);
- группа P5 фосфата водорода рассматривалась как наиболее вероятный кандидат для замещения анионом цитрата; таким образом, из структуры ОСР производилось удаление одного (или больше) аниона P5 фосфата водорода;
- после включения цитрата элементарная ячейка удлинялась по оси A;
- химическая формула ОСР-цитрата была наиболее близка к $\text{Ca}_{16}(\text{PO}_4)_8(\text{HPO}_4)_3(\text{H}_2\text{CIT}) \cdot (11 \pm 1)\text{H}_2\text{O}$ при очевидном варьировании количества молекул воды;
- по крайней мере одна группа $\text{CH}_2\text{COO}(\text{H})$ должна была свободно продвигаться в водный канал, а ее пространственное расположение должно было иметь неорганизованный характер.

В ходе исследования была проведена геометрическая оптимизация 10 возможных моделей ОСР-цитрата. Расчетные данные ЯМР-спектроскопии для 9 из них в определенной степени были сопоставимы с экспериментальными данными. В ходе анализа правдоподобности моделей принималось во внимание, что химические сдвиги на ЯМР-спектроскопии рассчитывались для температуры 0 К, в то время как экспериментальные данные были получены при комнатной температуре. Кроме того, учитывалась также погрешность в расчетах для атомов ^{13}C , которая составляла приблизительно 1-2% от диапазона их химического сдвига ($\pm 2-4$ м. д.). Среди возможных моделей ОСР-цитрата были выделены 3, которые наиболее соответствовали экспериментальным данным.

Модель 1 обладала самой низкой внутренней энергией. В данной модели анион цитрата имел одну группу $\text{CH}_2\text{COO}(\text{H})$, свободно погруженную в водный канал (без координации с ионами кальция) и окруженную молекулами воды. Эту группу $\text{CH}_2\text{COO}(\text{H})$ ограничивали только подвижные молекулы воды, в связи с чем ее пространственное расположение могло варьировать при комнатной температуре, что, в свою очередь, приводило к рассеиванию химических сдвигов, связанных с атомами ^{13}C метиленовых групп, которое наблюдалось в экспериментальных данных. Кроме того, вокруг аниона цитрата

образовывалось пространство, позволявшее ему двигаться внутри гидратного слоя. Для этой модели было характерно хорошее соответствие расчетных данных экспериментальным, особенно при учете температурного режима, в котором производились измерения в эксперименте.

Модель 2 обладала немного повышенной внутренней энергией (29 кДж/моль⁻¹) по сравнению с таковой модели 1, и в этом

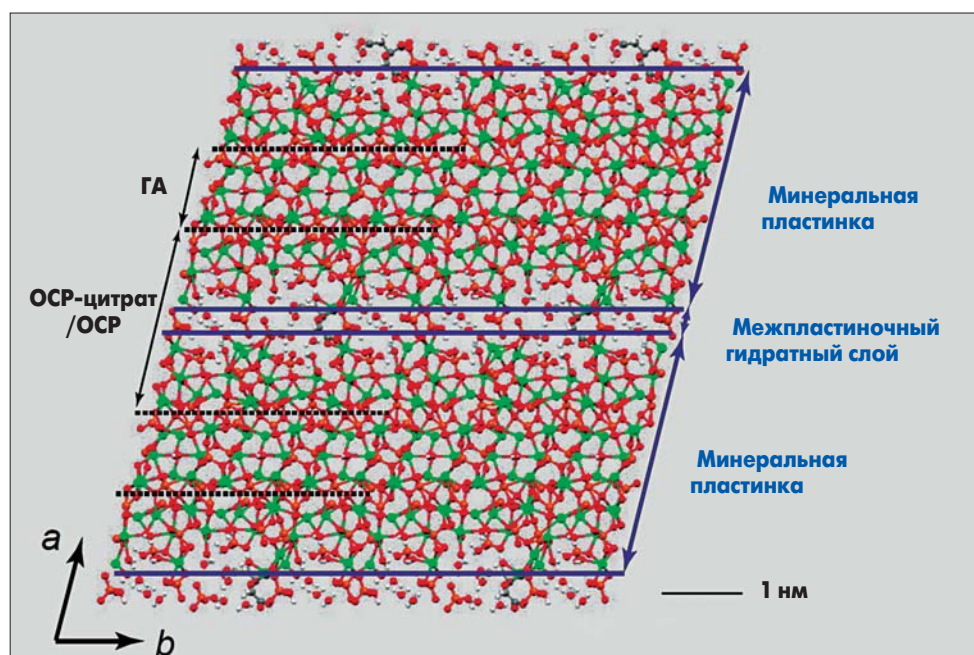


Рис. Модель неорганического компонента костной ткани

В предложенной модели неорганического компонента костной ткани минеральная пластинка состоит из двух слоев апатитов ОСР-цитрата, между которыми заключен один слой гидроксиапатита (ГА). Минеральные пластинки расположены параллельно друг другу и перемежаются гидратными слоями элементарных ячеек ОСР-цитрата. Только одна из трех элементарных ячеек ОСР-цитрата содержит ион цитрата в своем гидратном слое. Поверхности минеральных пластинок обозначены с помощью горизонтальных линий синего цвета. Все ионы кальция расположены внутри минеральных пластинок, а поверхности пластинок соединяются ионами цитрата. На практике расположение и ориентация ионов цитрата в гидратном слое будут хаотичными.

случае также удалось достичь соответствия расчетных данных экспериментальным. В целом модель 2 почти полностью совпала по своему строению с предыдущей, за исключением пространственного расположения аниона цитрата, который был развернут на 180° по оси В. Соответствие расчетных данных экспериментальным в данной модели свидетельствует о том, что неорганизованность анионов цитрата подразумевает возможность достаточно разнообразных ориентаций, колебаний и изменений позиции этого компонента гидратного слоя.

Для модели 3 была характерна еще более высокая внутренняя энергия (83 кДж/моль⁻¹). В отличие от моделей 1 и 2 химическая формула модели 3 представляла собой $\text{Ca}_{16}(\text{PO}_4)_8(\text{HPO}_4)_2(\text{H}_2\text{PO}_4)(\text{CIT}) \cdot 10\text{H}_2\text{O}$. Показатели химических сдвигов атомов ^{13}C ЯМР-спектроскопии были сопоставимы с таковыми в экспериментальных данных при изучении частично дегидратированного ОСР-цитрата. Форма элементарной ячейки была более сжатой по сравнению с таковой в моделях 1 и 2, что выражалось в частичном сужении гидратного слоя. При этом анион цитрата в узком гидратном слое вклинивался между слоями апатитов. Такой тип структурного коллапса достаточно правдоподобно моделирует состояние элементарной ячейки, теряющей молекулы воды из гидратного слоя, и является типичным для окружения цитрата в дегидратированном материале.

Данные, подтверждающие наличие в костной ткани вещества, подобного ОСР-цитрату

Взаимосвязь между цитратом и неорганическим компонентом костной ткани ранее была продемонстрирована во время изучения атомов $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ по методу REDOR (Rotational Echo Double Resonance) ЯМР-спектроскопии (Y.Y. Hu et al., 2010). В ходе этого эксперимента выяснилось, что в костной ткани атомы углерода находятся на близком расстоянии от атомов фосфора. Поскольку подавляющее большинство атомов фосфора костной ткани находятся в ее неорганическом компоненте, такие данные указывают на очень близкое пространственное расположение органических и неорганических структур.

Во время изучения с помощью REDOR-ЯМР атомов $^{13}\text{C}\{^{31}\text{P}\}$ в образце костной ткани конечности взрослой лошади наблюдалось дефазирование (снижение интенсивности) сигналов в спектре REDOR относительного референтного спектра, что было связано с пространственной близостью атомов ^{13}C

Каким образом становится возможным включение такого элемента, как ОСР-цитрат, в структуру неорганического компонента костной ткани? Вполне очевидно, что ответ должен быть основан на особенностях строения как первого, так и второго. Как известно, неорганический компонент сформирован из комплексов, или «стопок», очень плотно упакованных минеральных пластинок. Определить расстояние между пластинками крайне сложно. Пластинки расположены настолько близко друг к другу, что расстояние между ними находится за пределами разрешающей способности просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения. В предыдущем исследовании (E.A. McNally et al., 2012) отмечалось, что это расстояние составляет менее 0,1 нм, хотя данный показатель также находился за пределами разрешающей способности исследования (0,18-0,34 нм). Структура костной ткани с характерным близким расположением минеральных пластинок очень точно отражена в ОСР-цитрате. Слои апатитов в ОСР-цитрате разделены тонким гидратным слоем. Толщина гидратного слоя составляет приблизительно 5 ангстрем и зависит от того, в каких границах производится измерение. Такое небольшое расстояние позволяет цитрату образовывать связи между слоями апатитов. Кроме того, в структурной модели 1 анионы P5 HPO_4^{2-} также образовывали связи в гидратном слое. Таким образом, структура гидратного слоя хорошо объясняет данные просвечивающей электронной микроскопии высокого разрешения, которые показывают отсутствие границы между минеральными пластинками. Однако необходимо принимать во внимание, что неорганический компонент костной ткани в значительной степени сформирован из структур, связанных с гидроксиапатитом, в то время как слой апатитов в ОСР-цитрате не настолько велик, чтобы в него могли входить все гидроксиапатиты неорганического компонента. Хорошо известно, что гидроксиапатит и ОСР способны формировать эпитакасиальный переходный слой, для которого характерна минимальная межповерхностная энергия между плоскостью гидроксиапатита и плоскостью ОСР (M.E. Fernandez et al., 2003). Следовательно, слои гидроксиапатита могут сложным образом соединяться со слоями апатитов ОСР-цитрата, формируя более толстые минеральные пластинки. По данным ЯМР-спектроскопии толщина минеральных пластинок ранее приблизительно оценивалась как 2,5 нм (K. Schmidt-Rohr et al., 2007). Толщина минерального слоя ОСР-цитрата составляет 1,2-1,4 нм. Присоединение одной элементарной ячейки гидроксиапатита (0,95 нм) к плоскости ОСР-цитрата может привести к формированию минеральной пластинки толщиной около 2,2 нм. Однако последние измерения, проведенные с помощью методов электронной микроскопии, свидетельствуют о том, что средняя толщина минеральных пластинок костной ткани составляет не 2,5 нм, а 5 ± 2 нм. Тем не менее в предложенной структурной модели неорганического компонента костной ткани более толстые минеральные пластинки могут быть образованы с помощью простого добавления большего количества элементарных ячеек гидроксиапатита. Например, посредством присоединения 4 элементарных ячеек гидроксиапатита к плоскости ОСР-цитрата может быть сформирована минеральная пластинка толщиной около 5 нм.

Строение такой модели с добавлением слоя гидроксиапатита (состоящего из одной элементарной ячейки) к плоскости ОСР-цитрата основано на данных о содержании цитрата в костной ткани, которые свидетельствуют о том, что на 3 элементарные ячейки гидроксиапатита приходится приблизительно

І анион цитрата (рис.). Таким образом, в предложенной структурной модели с единственным слоем элементарных ячеек гидроксипапатита, добавленных к ОСП-цитрату, только 1/3 часть элементарных ячеек ОСП-цитрата содержат цитрат, в то время как остальные 2/3 гидратного слоя смоделированы в виде ОСП-подобной структуры, удлиненной для соответствия параметрам ОСП-цитрата, т. е. представляют собой ОСП-цитрат без цитрата.

Модель неорганического компонента, состоящего из плотно упакованных минеральных пластинок, которые соединены цитратом и разделены водой (а также ионами фосфата водорода), естественным образом объясняет ряд следующих особенностей костной ткани: наличие дополнительного количества организованных молекул воды по сравнению с синтетическими моделями неорганического компонента; наличие значительного количества относительно неподвижных, но вместе с тем неорганизованных групп фосфата водорода; дефицит гидроксильных групп по сравнению со структурой чистого апатита. Особенно важным представляется то, что предложенная модель способна дать достаточно убедительное объяснение морфологии минеральных кристаллов костной ткани, которого ранее не существовало (S.V. Dorozhkin et al., 2009). Пластиноподобная форма кристаллов ОСП-цитрата поддерживается за счет того, что анионы цитрата ингибируют рост элементарной ячейки по оси А. По такому же принципу связывание поверхностей минеральных кристаллов костной ткани анионами цитрата приводит к ингибированию роста минеральных кристаллов по оси А и определяет их форму, которая наблюдалась в процессе исследования. Более того, цитрат может обеспечивать сегрегацию в пространстве между минеральными пластинками, пускай и только по отношению к атомам, расположенным в непосредственной близости от пластинок. Если бы цитрат не обеспечивал сегрегацию атомов, то потеря воды из гидратного слоя приводила бы к постепенному слиянию соседних минеральных пластинок в более крупные одиночные кристаллы, что, в свою очередь, обусловило бы катастрофические последствия для механических свойств костной ткани.

Как уже отмечалось ранее, механические свойства костной ткани зависят от кристаллической структуры ее неорганического компонента. Повышение степени кристаллизации и образование более крупных минеральных кристаллов приводят к повышению хрупкости макроструктуры. В предложенной модели включение цитрата естественным образом ограничивает степень кристаллизации и размер минеральных частиц. Следовательно, включение цитрата в структуру костной ткани может представлять собой биологический механизм контроля кристаллизации. И последнее обстоятельство, которое необходимо упомянуть, заключается в том, что даже в свете данных электронной микроскопии, свидетельствующих о наличии отдельных минеральных пластинок, связывание последних анионами цитрата способно объяснить формирование непрерывных комплексов из этих пластинок, достаточно прочных, чтобы не разрушаться при удалении коллагенового матрикса, диспергировании и воздействии ультразвуком.

Нельзя обойти стороной и то обстоятельство, что другим химическим элементам, которые в большом количестве представлены в костной ткани, например кислороду, не уделялось достаточно внимания в исследованиях. ^{17}O представляет собой малораспространенный в природе, исключительно ЯМР-активный изотоп кислорода с квадрупольным ядром. ЯМР-спектроскопия данного изотопа кислорода является потенциально ценным инструментом для изучения структуры костной ткани, поскольку минеральные фосфаты кислорода скорее всего могут давать очень точную информацию о фосфатном окружении. В ходе данного исследования было проведено сравнение ЯМР-спектра атомов ^{17}O в костной ткани, кристаллах гидроксипапатита обогащенного ^{17}O , пропитанном лимонной кислотой неорганическим компонентом костной ткани и в ОСП-цитрате. Сигналы атомов ^{17}O в ортофосфатах апатитов находились на уровне 90–120 м. д., в фосфатах водорода — 60–90 м. д., в гидратных ортофосфатах — приблизительно между двумя предыдущими показателями. Вполне очевидно, что как гидроксипапатит, так и цитратный неорганический компонент не показали спектральных

характеристик, сравнимых с таковыми костной ткани, в этой ключевой области спектра. (Ключевой, поскольку присутствие кислых и гидратированных фосфатных групп в неорганическом компоненте костной ткани отличает его от чистого гидроксипапатита.) Однако включение в структурную модель ОСП-цитрата обеспечивает намного лучшее соответствие ЯМР-спектра атомов ^{17}O в структурной модели и в костной ткани.

Выводы

Результаты данного исследования предлагают новую модель неорганического компонента костной ткани, согласно которой ионы цитратов находятся в гидратных слоях и образуют соединения между минеральными пластинками. Эти соединения по своей химической структуре подобны кристаллам ОСП-цитрата. Связывание минеральных пластинок фосфата кальция посредством ионов цитрата объясняет следующие структурные особенности костной ткани:

- тонкую пластиноподобную форму зрелых минеральных кристаллов;

- относительно высокую концентрацию фосфата водорода;
- наличие значительного количества сильных связей с молекулами воды.

Предложенная модель связывания с помощью цитрата также может объяснять механизм поддержания целостности непрерывных комплексов минеральных пластинок даже при устранении белкового матрикса и ультразвуковом воздействии на неорганический компонент. Важно отметить, что включение цитрата в гидратные слои ОСП-цитрата ограничивает рост кристаллов в направлении А и, следовательно, обуславливает плоскую пластиноподобную форму кристаллов. По такому же принципу цитратное связывание минеральных пластинок может обуславливать плоскую форму минеральных кристаллов костной ткани, а также склонность к образованию непрерывных комплексов из таких пластиноподобных кристаллов. Пространственная ориентация цитрата в предложенной структурной модели имеет хаотичный характер. Подобная ситуация в костной ткани приводит к тому, что

атомное окружение ионов цитрата (поверхность минеральных пластинок) также принимает хаотичный характер, что, в свою очередь, приводит к образованию хаотично расположенных пустот в гидратном слое между минеральными пластинками и препятствует формированию крупных монокристаллов, что могло бы негативно сказаться на механических свойствах костной ткани. Следует также отметить, что степень включения цитрата в неорганический компонент может иметь большое значение для объяснения изменений процесса кристаллизации при метаболических заболеваниях и понимания механических особенностей костной ткани на молекулярном уровне.

Davies E. et al. Citrate bridges between mineral platelets in bone. Proc Natl Acad Sci U S A. 2014 Apr 8; 111 (14): E1354-63. Epub 2014 Mar 24.

Підготував **Ігорь Кравченко**

37

КАЛЬЦЕМІН® – СИЛА КАЛЬЦІЮ ТА МІНЕРАЛІВ ДЛЯ ЗДОРОВ'Я ВАШИХ КІСТОК.



**Здорові кістки складаються на 70% з кальцію,
на 22% з колагену та на 8% з води*.**

Кальцій надає кісткам міцності

Вітамін D₃ допомагає кальцію засвоюватися

Мінерали сприяють утворенню КОЛАГЕНУ



Реклама лікарського засобу. Інформація призначена для медичних та фармацевтичних працівників.
РП МОЗ України № UA/7110/01/01, дійсно до 19.10.2017, № UA/7138/01/01, дійсно до 19.10.2017, Висновок державної санітарно-епідеміологічної експертизи
№ 05.03.02-03/111255, дійсний до 13.11.2017.

*Громова О.А., Торшин І.Ю., Лиманова О.А. Кальцій і його синергисти в підтримку структури соединительной и костной ткани // Лечащий врач – 2014. – № 5. – С. 69–76.

