

Є.В.Гусак<sup>1,2</sup>

С.М.Данильченко<sup>2</sup>

О.В.Гордієнко<sup>1</sup> Н.М.Іншина

<sup>1</sup> О.М.Олешко<sup>1</sup>

М.В.Погорєлов<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Сумський державний університет

<sup>2</sup> Інститут прикладної фізики НАН

України

Суми

**Ключові слова:** біоапатит, кристаліт, кристалічна решітка, мінеральна та органічна складова, губчаста кісткова тканина, елементний склад, «неапатитне оточення».

Надійшла: 21.08.2016

Прийнята: 12.09.2016

УДК:611.018.4:577.118:549.753.1-022.532

## ХІМІЯ ПОВЕРХНІ БІОЛОГІЧНИХ АПАТИТІВ МІНЕРАЛІЗОВАНИХ ТКАНИН (НА ПРИКЛАДІ ГУБЧАСТОЇ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ)

*Це дослідження є складовою частиною науково-дослідної теми «Морфофункціональний моніторинг стану органів і систем організму за умов порушення гомеостазу» (номер державної реєстрації 0115U000685).*

**Реферат.** Метою дослідження є вивчення кристалохімічних характеристик біологічно значимих апатитів кальцію на прикладі губчастої кісткової тканини для виявлення та дослідження біологічних ефектів структурних недосконалостей та мобільних іонних компонентів поверхневої локалізації при фізіологічній мінералізації.

**Morphologia.** – 2016. – Т. 10, № 3. – С. 114-117.

© Є.В.Гусак, С.М.Данильченко, О.В.Гордієнко, Н.М.Іншина, О.М.Олешко, М.В.Погорєлов, 2016

✉ m.pogorielov@gmail.com

**Husak E.V., Danylchenko S.M., Gordienko O.V., Inshyna N.M., Oleshko O.M., Pogorielov M.V. Surface chemistry of biological apatites in mineralized tissues (on the example of spongy bone tissue).**

**ABSTRACT. Background.** It is well known that poorly crystallized carbonate apatite is the main mineral component of the normal calcified hard tissues of human skeleton. However, some attributes and characteristics of bioapatites in physiologically mineralized tissue remain undefined. It is thought that structural imperfections and surface properties of the bioapatite nanocrystals govern the crystal chemistry and therefore should be crucial factors in formation, resorption and remodeling behavior of the biominerals. The biocrystal surface plays an exceptional role as a boundary between mineral and organic components and location of the main processes. The correlations between structural defects and content of labile ions on the crystal surface may reflect some ultrastructural features of bioapatite and ability to ion exchange. **Objective.** The aim of the research was to study the crystal-chemical characteristics of bio-related calcium apatites. **Methods.** In our research we used pyrolysis and subsequent ultrasonication in aqueous medium. Because apatite solubility is minor at normal conditions, the free ions can be removed in aqueous solution, keeping unaffected apatite structure, and then their concentration can be determined by atomic spectroscopy (AS). **Results.** 60-70 % of Mg present in bone seems to be incorporated in bioapatite structure substituting Ca, while the remaining Mg is located on the bone mineral crystal surface where it is easily available and could be removed by ultrasonic treatment. Also we got evidence that Mg and Na in bone apatite can be both in structurally bounded (substituting calcium in lattice) and in labile state (localizing on the crystal surface), while K is not able to join the apatite structure in significant amount or to be chemically bounded to it.

**Key words:** bioapatite, crystallite, crystal lattice, mineral and organic component, spongy bone tissue, elemental composition, "noapatite environment".

### Citation:

Husak EV, Danylchenko SM, Gordienko OV, Inshyna NM, Oleshko OM, Pogorielov MV. [Surface chemistry of biological apatites in mineralized tissues (on the example of spongy bone tissue)]. Morphologia. 2016;10(3):114-17. Ukrainian.

### Вступ

Кістка має складну багаторівневу будову, нанорівневими складовими якої є мінеральна (кристаліти апатиту) та органічна (колаген) фази [1]. 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 на-

ночастинок гідроксиапатиту в міжфібрилярному та позафібрилярному просторі [2]. Центральним ядром кожної частинки біоапатиту 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. Окремі кристаліти між собою формують конгломерати паралельних пластинчатих кристалів, об'єднаних між собою. Така багаторівнева будова біоапатиту

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. До останньої відносять вільну (мобільну) воду, яка заповнює мікропори, мікросудини, Гаверсові канали, лакунарно-каналіцеві системи, слабкозв'язану – зв'язується з фібрилами, матриксом та формує аморфний гідратний шар гідроксиапатиту, жорсткозв'язану воду – становить зовнішній шар біомінералу [5-8]. За рахунок такої локалізації вода виконує наступні ролі: стабілізацію кристалічної структури біоапатиту, захист від механічних пошкоджень, рух кристалітів відносно один одного та колагену [2,6].

Вважається, що структурні недосконалості та властивості поверхні нанокристалів біоапатиту визначають їх кристалохімію і є критичними факторами у процесах формування, резорбції та перебудови біомінералів. Поверхня біокристалу відіграє роль межі поділу мінеральної і органічної складових та місце перебігу головних фізіологічних процесів. Кореляції між структурними дефектами та вмістом рухливих іонів на поверхні кристалу має відображати певні ультраструктурні особливості біоапатиту та спроможність до іонного обміну [9-11]. Тим не менш, поверхня кристалів та їх неапатитне мінеральне оточення як у фізіологічному залишаються недостатньо вивченими.

Губчаста кісткова тканина має значну площу поверхні, високий вміст води і як результат високу клітинну активність. Тому отримання нових даних про іонний обмін та взаємодію між фазами нанокристалів і некристалічним мінеральним оточенням у біоапатитах кальцію цієї тканини має сприяти розширенню сучасних уявлень про особливості нормальної мінералізації живої тканини, а також винайденням засобів ефективного впливу на ці процеси. **Метою** даної роботи є визначення місць переважної локалізації і відповідних (відносних) концентрацій Na, K та Mg, для детальної оцінки елементного складу мінералізованих тканин.

#### **Матеріали і методи**

Експеримент був проведений на 12 білих лабораторних щурах 6-місячного віку. Тварини утримувались на звичайному харчовому раціоні та в умовах, що відповідають «Санітарним правилам створення, обладнання та утримання експериментально-біологічних клінік (віваріїв)» від 06.04.73 р. та доповненням від 04.12.78 р. до Наказу МОЗ СРСР № 163 від 10.03.66 р. «Про добові норми харчування тварин та продуценти». Уся експериментальна частина дослідження була

проведена згідно з вимогами міжнародних принципів „Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, які використовуються в експерименті та інших наукових цілях“ (Страсбург, 1986 р.), принципів Гельсінської декларації, прийнятої Генеральною асамблеєю Всесвітньої медичної асоціації (1964-2004 рр.) та відповідного закону України „Про захист тварин від жорстокого поводження“ (№ 3446-IV від 21.02.2006 р., м. Київ) [5,6,7,12]. Усіх тварин виводили з експерименту шляхом передозування наркозу, після чого видаляли тазову кістку. Досліджуваний матеріал очищали від м'яких тканин. Зразки досліджуваного матеріалу зважували і відпалювали у муфельній печі протягом 6 годин при температурі  $450\pm 5^\circ\text{C}$ . Розтерті зразки відпалювали у муфельній печі протягом години по досягненні температур  $600\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $640\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $680\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $720\pm 2^\circ\text{C}$ ,  $760\pm 2^\circ\text{C}$  відповідно. Після зважування зразки обробляли ультразвуком протягом 10 хв установці УЗДН-А (SELMI, Україна) в бідистильованій воді з рН 6,6. Озвучені суспензії фільтрували. Отримані розчини кожної температури відпалення аналізували на атомно-абсорбційному спектрометрі в режимі емісії та полуменевої атомізації для визначення концентрації Na, K, Mg.

#### **Результати та їх обговорення**

Термічна обробка зразків комбінації з ультразвуковою обробкою мінералітів у бідистильованій воді з рН 6,6 здатні забезпечити інформацію про елементний склад твердої кристалічної фази (чи фаз) та мікроелементне оточення кристалічних частинок. рН бідистильованої води не впливає на розчинність біологічного апатиту. Ультразвукова обробка дозволяє забезпечити більш повний перехід мікроелементів зруйнованого гідратованого шару біоапатитів у водорозчинний стан після кожної температурної обробки. Відпалювання за  $t\ 600\pm 2^\circ\text{C}$  показує вміст іонів вільної і зв'язаної з органічними сполуками води та самої органічної фази. Діапазон відпалення у проміжку від  $640\pm 2^\circ\text{C}$  до  $760\pm 2^\circ\text{C}$  відповідає температурі початку рекристалізації з утворенням відносно бездефектних кристалів за рахунок іонного обміну між їх об'ємом і поверхнею [13]. При рекристалізації виникають нові кристаліти, які ростуть за рахунок дефектної матриці при утворенні в ній зародків рекристалізації. Процеси росту кристалічної решітки кристалів апатиту супроводжуються виходом катіонів у неапатитне оточення або навпаки їх захопленням [14,15].

За допомогою способу визначення переважної локалізації та концентрації макро- та мікроелементів біологічних мінералізованих тканин було проведено дослідження фазового елементного складу магнію, калію, натрію нормально мінералізованої губчастої кісткової тканини (Табл.1).

Вміст калію, магнію, натрію в губчастій кістковій тканині в нормі

Назва проби (t обробки зразка)	K, мкг/г	Mg, мкг/г	Na, мкг/г
600°C	3886,85±53,7	240,56±12,9	214,27±15,3
640°C	4051,86±45,2	52,02±2,4	2904,39±34,7
680°C	3753,25±87,34	677,69±36,1	5363,13±56,2
720°C	3940,79±39,2	797,06±34,7	8063,09±75,1
760°C	4031,11±37,1	321,61±28,6	1264,45±23,8

Отримані фільтрати при  $t\ 600\pm 2^\circ\text{C}$  відносять до елементного складу органічного компоненту, вільної та зв'язаної з органічними сполуками води. Фільтрати з температурного діапазону  $640\pm 2^\circ\text{C}$  -  $760\pm 2^\circ\text{C}$  відносять до елементного складу води зв'язаної з кристалітами, яка характеризує іонообмін між неапатитним оточенням та кристалічною решіткою біоапатита. Зміни концентрацій в межах досліджуваних температур говорять про характер поведінки елементів, а саме вхід або вихід їх з неапатитного оточення кристалітів. Зменшення концентрації Mg при температурі  $760\pm 2^\circ\text{C}$  може свідчити про утворення нових фаз, наприклад ТКМФ (трикальцій магній фосфат) та входження його до решітки кристаліту, зменшення Na, K, Ca може свідчити про захоплення цих катіонів кристалічною реші-

ткою біоапатиту.

#### Висновки

В ході дослідження була отримана модель співвідношення і взаємодії між фазою нанокристалів і некристалічним мінеральним оточенням біоапатитів кальцію губчастої кісткової тканини. Була визначена переважна локалізація та роздільна концентрація K, Mg, Na в комплексі органічного компоненту з водою вільною та зв'язаною з органічними сполуками та в неапатитному оточенні біокристалів.

#### Перспективи подальших досліджень

Порівняльний аналіз іонного неапатитного оточення фізіологічних і патологічних біоапатитів має поглибити розуміння механізму біомінералізації у цілому.

#### Літературні джерела

#### References

- Hiratai R, Nakamura M, Yamashita K. Role of collagen and inorganic components in electrical polarizability of bone. *Journal of Veterinary Medical Science*. 2014;76(2):205-10.
- Davies E. Citrate bridges between mineral platelets in bone. *Proc Natl Acad Sci*. 2014;124:1354-63.
- Wang Y. Water-mediated structuring of bone apatite. *Nat Mater*. 2013;12(12):1144-53.
- Guyton AC. *The body fluid compartments: extracellular and intracellular fluids; interstitial fluid and edema*. Philadelphia: Saunders; 2000. 278p.
- Schroeder MJ, Sadasiva A, Nelson RM. Role of water content and state on effective permittivity using mixing formulas. *Biomechanics, Biomedical and Biophysical engineering*. 2008;1(1):1-11.
- Wilson EE. Three structural roles for water in bone observed by solid-state NMR. *Biophysical Journal*. 2006;90:3722-31.
- Gun'ko VM, Turov VV. [Relationships between characteristics of interfacial water and human bone tissues]. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2006;53:29-36. Ukrainian.
- Combes C, Cazalbou S, Rey C. Apatite Biominerals. *Minerals*. 2016;6(34):1-25.
- Omelson S. A review of phosphate mineral nucleation in biology and geobiology calcified tissue. *International*. 2013;93(4):382-96.
- Krieger NS, Bushinsky DA. The relation between bone and stone formation calcified tissue international. 2013;93(4):374-81.
- Wu M, Rementer C, Giachelli CM. Vascular calcification: an update on mechanisms and challenges in treatment. *Calcified Tissue International*. 2013;93(4):365-73.
- Zapadnyuk VI, Zakharia EA. *Laboratory animals*. Kyiv: Vyshcha shkola; 1985. 385p. Ukrainian.
- Mkukuma LD, Imrie CT, Skakle JM, Hukins DW, Aspden RM. Thermal stability and structure of cancellous bone mineral from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis*. 2005 Feb;64(2):222-5.
- Danilchenko SN, Protsenko IY, Sukhodub LF. Some features of thermo-activated structural transformation of biogenic and synthetic Mg-containing apatite with  $\beta$ -tricalcium-magnesium phosphate formation. *Cryst Res Technol*. 2009;44:553-60.
- Wang Y, Von Euw S, Fernandes FM, Casaignon S, Selmane M, Laurent G, Pehau-ArnauDET

**Гусак Е.В., Данильченко С.Н., Гордиенко Е.В., Иншина Н.Н., Олешко А.Н., Погорелов М.В. Химия поверхности биологического апатита минерализованные тканей (на примере губчатой костной ткани).**

**Реферат.** Целью исследования является изучение ультраструктурных и кристаллохимических характеристик биологически значимых апатитов кальция на примере губчатой костной ткани для выявления и исследования биологических эффектов структурных несовершенств и мобильных ионных компонентов поверхностной локализации при физиологической минерализации.

**Ключевые слова:** биоапатит, кристаллит, кристаллическая решетка, минеральная и органическая составляющая, губчатая костная ткань, элементный состав, «неапатитное окружение».