

# Роль ионов цитрата в строении неорганического компонента костной ткани

**М**ассовая доля цитрата в костной ткани составляет всего 2%. Однако вопрос относительно значения этого вещества в поддержании структуры и функций опорно-двигательного аппарата остается одним из наиболее обсуждаемых в медицинской науке, поскольку современная модель минерального компонента костной ткани имеет ряд существенных недостатков. В ходе исследования E. Davies и соавт. (Кембриджский университет, Великобритания) была предложена и обоснована новая модель минерального компонента, согласно которой анионы цитрата образуют соединения между пластинками гидроксиапатитов, что позволяет объяснить многие особенности костной ткани. Предлагаем вниманию читателей «Медичної газети «Здоров'я України» обзор первой части данного исследования, посвященной изучению характеристик анионов цитрата.

Костная ткань является сложным композитным материалом, который состоит из органических и неорганических соединений. Наночастицы фосфата кальция удерживаются в структуре кости в первую очередь с помощью коллагенового матрикса. Минеральный компонент представлен в виде кристаллов гидроксиапатита. Согласно современной модели строения костной ткани минеральный компонент сформирован из комплексов толщиной 50-150 нм, которые состоят из очень плотно упакованных пластинок апатитов (M.J. Glimcher et al., 2006). Результаты ядерной магнитно-резонансной (ЯМР) спектроскопии показывают, что, помимо хорошо организованной нестехиометрической фазы апатитов, существует также гидратная неорганизованная фаза, которая содержит до 55% ионов фосфатов, представленных не ортофосфатами, а фосфатами водорода или фосфатами с сильными водородными связями с водой (C. Jäger et al., 2006). Гидратную фазу принято считать поверхностной, однако все еще неизвестно, на поверхности каких именно структур она расположена – отдельных минеральных пластинок или комплексов, сформированных этими пластинками. Кроме того, существует ряд убедительных экспериментальных данных, которые невозможно объяснить в рамках современной модели.

Одна из нерешенных проблем современной модели связана с тем, что в зрелой костной ткани никогда не наблюдалось изолированных минеральных пластинок даже при попытке диспергировать неорганический компонент костной ткани (S. Weiner, P.A. Price, 1986). Принимая во внимание это обстоятельство, можно сделать вывод о том, что минеральные пластинки не являются независимыми объектами. В действительности ранее описанные упорядоченные ассоциации минеральных пластинок представляют собой непрерывные структуры. Таким образом, возникает закономерный вопрос: за счет чего поддерживаются связи между минеральными пластинками?

Другая нерешенная проблема связана с тем, что в минеральном компоненте костной ткани в высокоорганизованном состоянии содержится до 28% воды, в то время как в синтетических моделях карбонатапатитов – менее 15%. Следовательно, неорганические вещества в костной ткани по какой-то причине обладают повышенной способностью образовывать сильные связи с водой. Следует также отметить, что при нагревании до 225 °C происходит испарение только 63% воды из гидратированной костной ткани, что свидетельствует о наличии значительного количества сильных связей с молекулами воды, которые крайне сложно разорвать. Более того, результаты ЯМР-спектроскопии указывают на присутствие двух отдельных участков, в которых происходит связывание молекул воды (E.E. Wilson et al., 2006). Высказывалось предположение, что связанные молекулы воды могут занимать гидроксильные участки основной структуры апатитов. Несмотря на то что в ряде исследований было показано, что гидроксильные группы составляют примерно 20% концентрации предполагаемых гидроксиапатитов, сложно объяснить, каким образом такая модель может включать достаточное количество молекул воды без нарушения структуры самого гидроксиапатита.

Кроме того, в противоречие с современной моделью входят данные ЯМР-спектроскопии, свидетельствующие о том, что группы фосфата водорода минерального компонента костной

ткани пребывают в относительно неподвижном состоянии. Такое положение не соответствует гипотезе, согласно которой большая часть групп фосфата водорода находится в слабосвязанном подвижном поверхностном гидратном слое.

Другой важный фактор, который следует принимать во внимание, – присутствие цитрата. Хотя наличие цитрата в костной ткани является общепризнанным фактом, до недавнего времени его значение оставалось неясным. Только в 2010 г. на основании результатов ЯМР-спектроскопии была предложена гипотеза, согласно которой цитрат связывается с поверхностью минеральных пластинок костной ткани (Y.-Y. Hu et al., 2010). С учетом крайне малого расстояния между минеральными пластинками существует высокая вероятность того, что именно цитрат образует соединения между их поверхностями и способствует образованию непрерывных комплексов, которые и формируют минеральный компонент костной ткани. Кроме того, такая гипотеза способна объяснить наличие дополнительного количества хорошо организованных молекул воды.

Принимая во внимание вышеописанные обстоятельства, данное исследование предлагает новую модель минерального компонента костной ткани, согласно которой неорганизованные ионы цитрата формируют связи между поверхностями минеральных слоев апатитов в гидратных слоях, заключенных между минеральными пластинками по типу сэндвича. При этом молекулы воды в межпластиночных гидратных слоях находятся на расстоянии 2,3-2,5 Å (ангстрем) от атомов фосфора, что подразумевает наличие большего количества водных структур в минеральном компоненте костной

ткани по сравнению с соответствующим показателем в синтетических карбонатапатитах (E.E. Wilson et al., 2005). В данной модели гидратные слои выстелены группами фосфата водорода (неорганизованными в связи с наличием неорганизованных анионов цитрата среди них), что объясняет присутствие таких соединений в костной ткани.

Для обоснования предложенной модели проведен детальный анализ строения двойной соли октакальцийфосфатцитрата (ОСР-цитрата), в которой цитрат расположен в гидратном слое, образуя соединения между слоями апатитов.

Существование двойных солей ОСР-дикарбоновой и ОСР-трикарбоновой кислот было впервые продемонстрировано в 1983 г. В дальнейшем с помощью метода порошковой рентгеноструктурной дифракции было показано, что кристаллографическая структура двойных солей подобна таковой их предшественника ОСР. В большинстве случаев элементарная ячейка двойных солей удлинилась по оси А, в то время как измерения по оси В и С оставались неизменными, что указывало на включение анионов органических кислот в гидратный слой ОСР. Согласно предложенной химической формуле, анионы органических кислот замещают одну из групп фосфата водорода ОСР.

Поскольку структура ОСР-цитрата тесно связана со структурой ОСР, исследование началось именно с моделирования последней (рис.). С целью сбора информации об анионах фосфатов и цитратов, которая в дальнейшем использовалась для создания серии возможных структурных моделей, применялась ЯМР-спектроскопия твердого тела. Геометрические параметры моделей были оптимизированы

с помощью основных принципов вычисления электронной структуры, результатов ЯМР-спектроскопии и порошковой рентгеноструктурной дифракции. Вычисления производились с помощью программного обеспечения CASTEP (Cambridge Serial Total Energy Package). Искусственные оптимизированные модели в дальнейшем сравнивались с экспериментальными данными для определения правдоподобности каждой структуры.

Поскольку естественное строение костной ткани благодаря своей хаотичности наиболее полно описывается сосуществованием ряда различных структур, основной целью данного исследования было выяснить последовательность тех из них, которые определяют принцип хаотичности, связанный с ОСР-цитратом. Обсуждение результатов исследования начинается с анализа данных ЯМР-спектроскопии и порошковой рентгеноструктурной дифракции ОСР-цитрата, которые в дальнейшем использовались для геометрической оптимизации возможных моделей включения анионов цитрата в структуру минерального компонента костной ткани.

Микроскопический анализ ОСР-цитрата показал, что массовая доля углерода в нем составляет  $3,49 \pm 0,16\%$ . Отношение кальция к фосфору составило  $2,01 \pm 0,55$ . Химическая формула ОСР-цитрата такова:  $\text{Ca}_{16}(\text{PO}_4)_8(\text{HPO}_4)_2(\text{HCIT}) \cdot (11 \pm 1)\text{H}_2\text{O}$ . Все эти данные соответствуют стехиометрическим приближениям к структурному уравнению с одним анионом цитрата в каждой элементарной ячейке.

Сканирующая растровая электронная микроскопия (SEM) и просвечивающая электронная микроскопия (ТЕМ) показали, что ОСР-цитрат образует кристаллы правильной и постоянной формы. Типичные размеры кристаллов составляют  $90 \pm 100 \times 100 \pm 30 \times \sim 20-50$  нм. Как и в предыдущих исследованиях, после порошковой рентгеновской дифракции было выявлено существенное смещение угла рассеяния, связанное с включением цитрата:  $4,85^\circ$  для ОСР по сравнению с  $4,09^\circ$  для ОСР-цитрата. Такое изменение угла рассеяния говорит о том, что элементарная ячейка кристаллической решетки ОСР распространяется вдоль оси А, чтобы прийти в соответствие размерам анионов цитрата ( $d_{100}=2,16$  нм для ОСР-цитрата;  $d_{100}=1,97$  нм для ОСР) в гидратном слое элементарной ячейки. Во всем остальном показатели порошковой рентгеновской дифракции для ОСР и ОСР-цитрата были сходными, хотя большинство отражений при изучении ОСР-цитрата существенно расширились, что связано с его слабой степенью кристаллизации и тонкостью кристаллов. Тот факт, что при анализе имели место как узкие, так и широкие отражения, связан с плоской пластиноподобной формой кристаллов ОСР-цитрата. Изменение в интенсивности некоторых узких отражений ОСР-цитрата по сравнению с интенсивностью таковых в ОСР скорее всего связано с тем, что пластиноподобная форма кристаллов ОСР-цитрата препятствует изотропному распределению ориентации кристаллов в порошке. В действительности метод дифракции электронов в выбранной области показал преобразование колец Кебая-Шерера в дуги, что указывает на неизотропное распределение ориентации кристаллов. Кристаллы ОСР-цитрата ограничены в росте по направлению А, что связано с включением цитрата в гидратный слой.

Как известно из предыдущих исследований, строение ОСР-цитрата характеризуется существенной хаотичностью. Прекрасной методикой изучения неорганизованного материала является ЯМР-спектроскопия твердого тела, которая уже применялась для изучения ОСР-сукцината на атомарном уровне. В данном исследовании ЯМР-спектроскопия впервые была использована для изучения ОСР-цитрата, а ее показатели сравнивались с таковыми ОСР.

В  $^1\text{H}$ -спектре ОСР-цитрата преобладал широкий сигнал с центром примерно 5,5 м. д. (миллионных долей), что связано с наличием воды и перекрытием сигналов атомов  $^1\text{H}$ ,

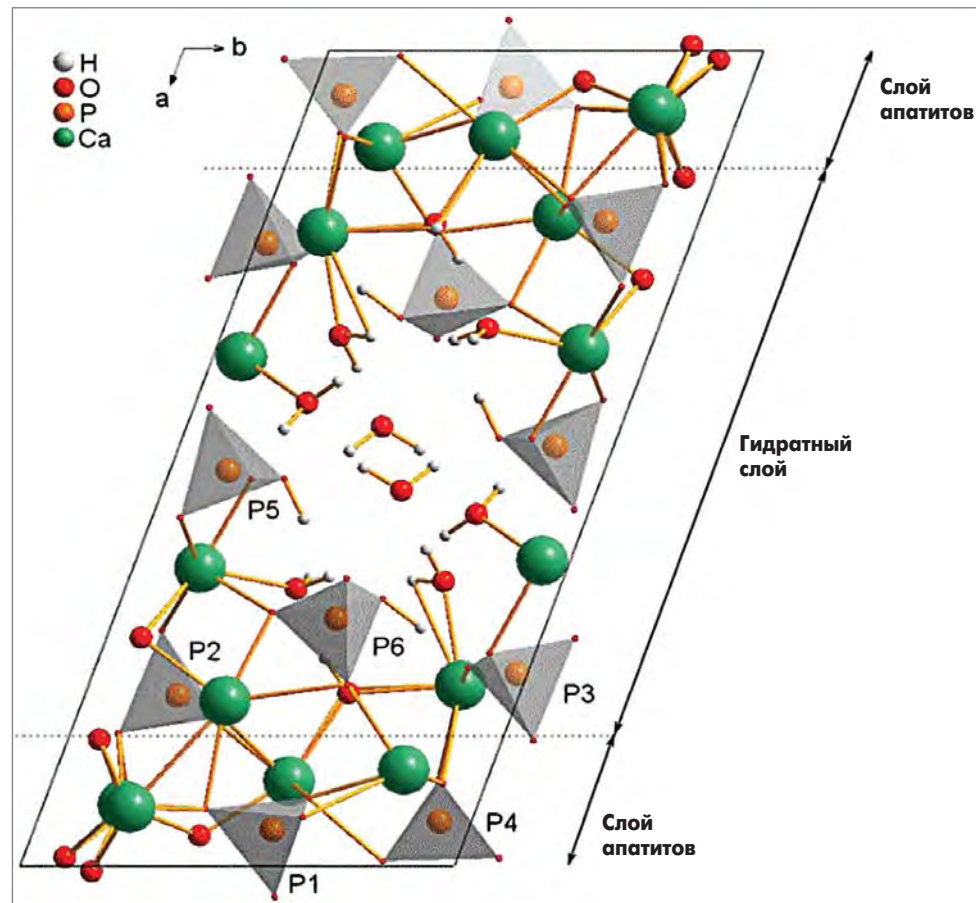


Рис. Элементарная ячейка ОСР

Показаны пронумерованные фосфатные группы, а также области, описанные как гидратный слой и слой апатитов. Гидратный слой содержит обе группы фосфатов водорода (P5 и P6) и две ортофосфатные группы (P2 и P3). Остальные ортофосфатные группы (P1 и P4) находятся внутри слоя апатитов. Элементарная ячейка ОСР близка к P-симметрии (наличие центральной симметрии при отсутствии других типов симметрии).

которые находятся в цитрате. При изучении ОСП наблюдалось динамическое сужение сигнала атомов  $^1\text{H}$  воды в связи с подвижностью молекул воды в данной структуре. Сигнал 5,5 м. д. при изучении ОСП-цитрата был значительно шире, чем атомов  $^1\text{H}$  воды в ОСП, что свидетельствует о более медленном изменении ориентации молекул воды и/или меньшей амплитуде в ОСП-цитрате по сравнению с ОСП. Таким образом, включение цитрата в структуру ОСП конфликтует с водными каналами, которые находятся вдоль кристаллографической оси С в так называемом гидратном слое ОСП. Этот вывод согласуется с замещением одного из ионов фосфата водорода, выстилающих водные каналы, анионом цитрата и с продвижением последнего в водный канал.

Как окружение, так и структура аниона цитрата в ОСП-цитрате изучались с помощью блоховского затухания (Bloch decay, BD) атомов  $^{13}\text{C}$  и кросс-поляризации ЯМР-спектра материала. Устранение искажений в 3 сигналах атомов углерода карбоксилатов показало, что их интенсивность близка к идентичной. В связи с этим их можно отнести к 3 карбоксилатным группам, которые окружают цитрат. Однако характеристики сигналов указывают также на некоторую неорганизованность или гетерогенность в данных карбоксилатных группах.

Два метиленовых сигнала, как и в случае с карбоксилатами, обладали одинаковой интенсивностью, что позволяет отнести их к двум метиленовым углеродам, которые окружают цитрат. Вполне очевидно, что эти две метиленовые группы не эквивалентны, поскольку элементарная ячейка ОСП и анионы цитрата имеют несовместимую симметрию: в структуре ОСП отсутствует какая-либо симметрия, кроме центральной, в то время как анионы цитрата не имеют центральной симметрии.

Следует отметить, что дезорганизация в структуре аниона цитрата может быть как статической, так и динамической. Анализ возможности динамической дезорганизации был проведен с помощью охлаждения ОСП-цитрата до температуры 200 К. Снижение температуры ниже 200 К не использовалось, поскольку приводило к образованию льда, что могло быть связано с потерей молекул воды в образце и, как следствие, могло приводить к изменению структуры кристалла. Охлаждение образца не привело к изменению относительной интенсивности сигналов метиленовых групп. Результаты анализа также показали, что при комнатной температуре цепь  $\text{CH}_2(2)\text{COO}(\text{H})$  цитрата находилась в состоянии движения, которое замедлялось при снижении температуры. Возможность динамической реориентации цепи  $\text{CH}_2(2)\text{COO}(\text{H})$  говорит о том, что такие цепи не связаны с кальцием и способны вращаться относительно свободно. Поскольку анионы цитрата находятся в гидратном слое ОСП, наиболее вероятно, что цепи  $\text{CH}_2(2)\text{COO}(\text{H})$  выдвигаются в гидратный слой, что обуславливает их относительно свободную реориентацию. Данная особенность может быть использована для последующей геометрической оптимизации при построении возможных моделей элементарной ячейки ОСП-цитрата.

Структура фосфатных включений в ОСП-цитрате изучалась с помощью сигнала атомов  $^{31}\text{P}$  ЯМР-спектроскопии. Для спектра  $^{31}\text{P}$  ОСП-цитрата были характерны значительно более широкие линии, чем для ОСП. В связи с недостатком симметрии в кристаллографической элементарной ячейке после включения цитрата ожидалась недостаточная разрешающая способность ЯМР-спектра атомов  $^{31}\text{P}$ . Таким образом, невозможно произвести замену фосфатной группы цитратом без нарушения центральной симметрии элементарной ячейки ОСП, поскольку сам цитрат не обладает центральной симметрией. Как результат, вместо 12 спаренных эквивалентных окружений  $^{31}\text{P}$ , характерных для ОСП, в ОСП-цитрате наблюдалось 11 отдельных окружений  $^{31}\text{P}$ . Некоторая структурная дезорганизация фосфатных участков, находящихся вблизи анионов цитрата, по-видимому, обусловлена конформационной дезорганизацией динамических цепей  $\text{CH}_2(2)\text{COO}(\text{H})$  цитрата. Известно также, что химический сдвиг атомов  $^{31}\text{P}$  в значительной степени коррелирует с длиной связи Р-О, а также чувствителен к углу связи О-Р-О. Если соседние анионы цитрата будут обладать диапазоном конформаций, то для обоих вышеуказанных параметров будет характерно малое

распределение. В свою очередь, распределение фосфатных структур/ориентаций, находящихся вблизи от анионов цитрата, будет обладать эстафетным эффектом по отношению к более удаленным фосфатным участкам, что приведет к некоторому расширению всех сигналов  $^{31}\text{P}$ .

При сравнении частоты сигналов  $^{31}\text{P}$  в ОСП и ОСП-цитрате наблюдался четкий сдвиг в низкочастотной части спектра: по сравнению с ОСП Р3, Р5 и Р6 сигналы в ОСП-цитрате сместились к более высоким частотам. В образце ОСП-цитрата в области спектра ниже 0 м. д. оставался только один малый широкий сигнал с двумя новыми широкими перекрывающимися сигналами более высокой частоты (с центром в 1,1 и 1,6 м. д.), которые в значительной степени замещали низкочастотные сигналы ОСП. На основании таких показателей можно сделать вывод о том, что включение анионов цитрата в структуру ОСП в большинстве случаев приводит к разрыву водородных связей

между фосфатными группами гидратного слоя, которые давали низкочастотные сигналы в ОСП.

Особое внимание следует уделить принадлежности сигналов  $^{31}\text{P}$  в 1,1 и 1,6 м. д. Метод гетероядерной корреляции спектра позволил выяснить их принадлежность с помощью определения наиболее близких в пространстве атомов  $^1\text{H}$  и  $^{31}\text{P}$ . Результаты анализа показали, что оба сигнала коррелируют с сигналами атомов  $^1\text{H}$  воды и фосфатов водорода, что указывает на их принадлежность (по крайней мере, частичную) к группам фосфата водорода.

Ортофосфатные группы в слое апатитов (Р1 и Р4) ОСП-цитрата давали широкий сигнал с центром в 3,7 м. д. (в ОСП – 3,2 и 3,6 м. д. для Р1 и Р4 соответственно). В ОСП-цитрате отмечалась также корреляция между ортофосфатными группами слоя апатитов и атомами  $^1\text{H}$  воды, что говорит о наличии существенного дипольного взаимодействия между атомами  $^1\text{H}$  воды и  $^{31}\text{P}$  этих групп. Кроме того, мобильность

молекул воды, дипольно связанных с ортофосфатными группами, может снижать эффективность процесса отсоединения атомов  $^1\text{H}$ , что, несомненно, будет приводить к расширению сигнала.

В заключение следует отметить, что из ОСП-цитрата могут быть выделены как вода, так и цитрат.

Продолжение следует.

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.

Во второй части обзора будут представлены варианты построения моделей ОСП-цитрата на основании вышеописанных данных ЯМР-спектроскопии и порошковой рентгеноструктурной дифракции, а также доказательства наличия в костной ткани вещества, подобного ОСП-цитрату.

Подготовил Игорь Кравченко



## ЦИТРА-КАЛЬЦЕМІН

### Ваша опора на довгі роки!



#### СКЛАД «ЦИТРА-КАЛЬЦЕМІНУ»

Кальцій (у вигляді кальцію цитрату)	250 мг
Вітамін D <sub>3</sub>	125 МО
Магній	40 мг
Цинк	3,75 мг
Мідь	0,5 мг
Марганець	0,5 мг
Бор	0,25 мг

## Новинка в родині Кальцемінів!

Цитра-Кальцемін — наступник Кальцемін D<sub>3</sub> для ще кращого засвоєння кальцію. Висока ефективність обумовлена цитратом кальцію у складі препарату\*.

\*Howard J. Heller, MD, Laura G. Greer, BA, Sharon D. Haynes, RN, John R. Poindexter, BS, and Charles Y. C. Pak, MD Отримано з Центру мінерального обміну і клінічних досліджень, Південно-Західний медичний центр Університету штату Техас, Даллас, Техас. Представлено для публікації 29 березня 2000; виправлений варіант прийнятий 30 травня 2000. Журнал клінічної фармакології, 2000; 40:1237-1244. © 2000 Американський коледж клінічної фармакології. Висновок Державної санітарно-епідеміологічної експертизи № 04.03.02-03/11255 від 13.11.2012. Не є лікарським засобом.