

Изучение кристаллизации с участием синовиальной жидкости человека

О. А. Голованова, С. А. Герк, Р. Р. Измайлов
golovanoa2000@mail.ru, факс: 8 (3812) 64 24 10, тел.: 8 (3812) 26 81 99

Ключевые слова: физиогенный апатит, биоминералы, биоминералообразование, термодинамика осаждения, молярное соотношение Ca/P, костная ткань, костные заболевания, коксатроз.

Ссылка: Голованова, О. А., С. А. Герк, Р. Р. Измайлов (2011) Изучение кристаллизации с участием синовиальной жидкости человека, *Вестник ОНЗ РАН*, 3, NZ6020, doi:10.2205/2011NZ000150.

В живых организмах из биологических жидкостей образуются различные органоминеральные агрегаты (костная и зубная ткань, почечные, слюнные и зубные камни в организме человека и т.д.). Известно, что важнейшим свойством любой жидкости является ее вязкость. Вязкость оказывает большое влияние на скорость движения жидкости, сопротивление, которое она оказывает частицам при их перемещении, тем самым определяет направление и интенсивность многих биохимических реакций, в том числе и процессов образования минеральных фаз *in vivo*.

Изменение вязко – упругих свойств влияет на ряд физико-химических параметров биологической системы, сказывается на скорости химических реакций, протекающих в биожидкостях. Такой биожидкостью является синовиальная жидкость (СЖ, синовия) человека, она является одним из основных компонентов сустава и в значительной степени определяет его морфо-функциональное состояние, выполняет важную роль в реализации функций сустава и обеспечении его связи с другими тканями.

Ключевой характеристикой данной биожидкости является её вязкость, которая обеспечивает нормальную подвижность сустава, снижает трение и обеспечивает функциональную конгруэнтность. Вязкость синовии значительно колеблется в зависимости от pH, концентрации солей, температуры. В сравнении с другими биожидкостями вязкость синовиальной жидкости достаточно высока [Вересов и др., 2004], в связи, с чем целью данной работы является установление влияния вязкости модельного раствора СЖ на процессы костной минерализации.

Таблица 1. Диапазоны значений pH, индексов пересыщения, энергии Гиббса кристаллизации (кДж/моль) образования твердых фаз в модельных растворах

№	Соединение	Минимальные концентрации			Средние концентрации			Максимальные концентрации		
		pH	IS	-ΔG	pH	IS	-ΔG	pH	IS	-ΔG
1	Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂	7,00-8,00	0,80-1,36	4,17-7,11	7,00-8,00	0,89-1,45	4,66-7,60	7,00-8,00	0,95-1,51	4,93-7,90
2	β-Ca ₃ (PO ₄) ₂	7,00-8,00	0,21-0,75	1,07-3,90	7,00-8,00	0,32-0,86	1,65-4,48	7,00-8,00	0,39-0,93	2,01-4,84
3	Ca ₄ H(PO ₄) ₃ ·2.5H ₂ O	7,10-8,00	0,01-0,34	0,02-1,8	7,00-8,00	0,06-0,45	0,33-2,33	7,00-8,00	0,13-0,51	0,65-2,65
4	MgHPO ₄ ·3H ₂ O	7,00-8,00	0,07-0,24	0,36-1,28	7,00-8,00	0,18-0,36	0,95-1,88	7,00-8,00	0,25-0,42	1,3-2,22
5	CaHPO ₄ ·2H ₂ O	7,15-8,00	0,01-0,14	0,01-7,10	7,00-8,00	0,10-0,28	0,52-1,44	7,00-8,00	0,19-0,36	0,97-1,90
6	CaCO ₃ (кальцит)	7,33-8,00	0,01-0,36	0,02-1,88	7,26-8,00	0,01-0,40	0,006-2,07	7,21-8,00	0,01-0,43	0,02-2,23
7	CaCO ₃ (арагонит)	7,45-8,00	7,45-0,30	0,02-1,53	7,38-8,00	0,01-0,33	0,01-1,73	7,33-8,00	0,01-0,36	0,02-1,89
8	α-Ca ₃ (PO ₄) ₂	-	-	-	7,89-8,00	0,01-0,06	0,01-0,30	7,75-8,00	0,01-0,13	0,02-6,60

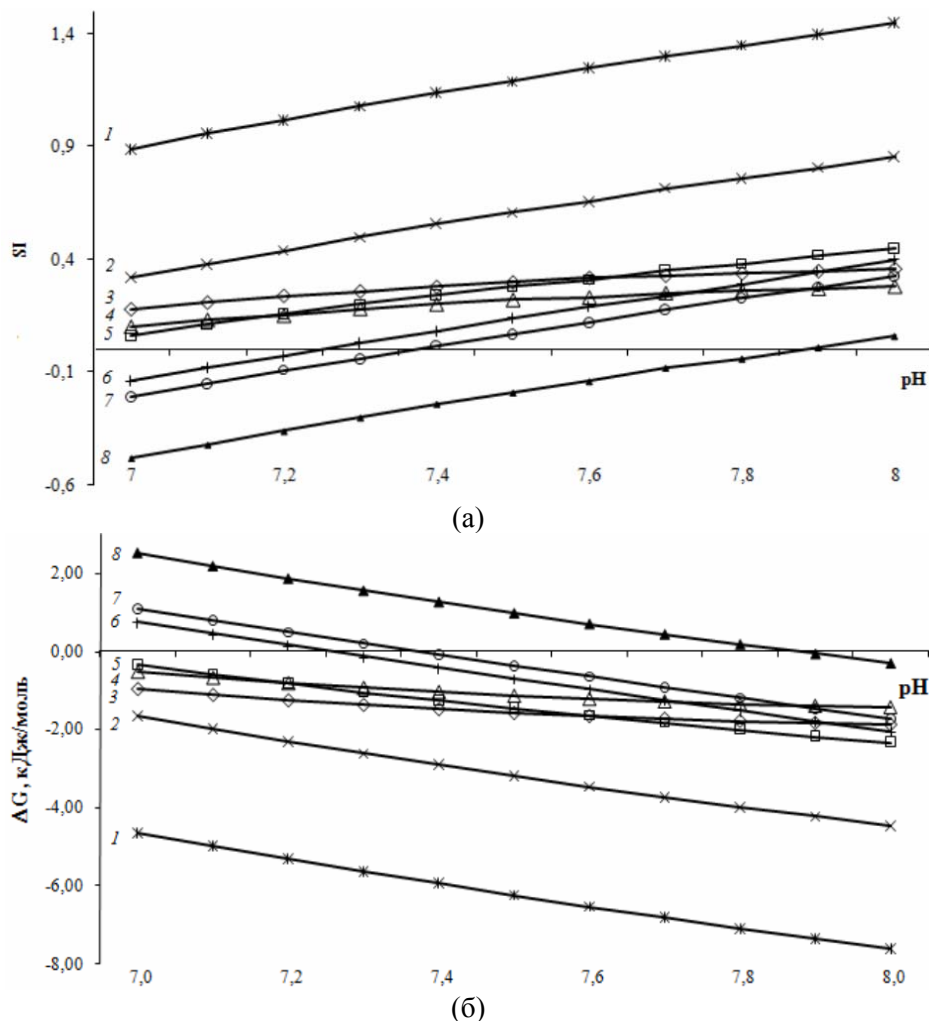


Рис. 1. Зависимость индекса пересыщения (а) и энергии Гиббса кристаллизации (б) от pH раствора для средних значений диапазона концентраций синовиальной жидкости для малорастворимых соединений: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ (1); $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (2); $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ (3); $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (4); $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2.5 \text{H}_2\text{O}$ (5); CaCO_3 – кальцит (6); CaCO_3 – арагонит (7); $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (8)

Согласно ранее проведенному термодинамическому расчету [Лемешева, 2010], показано, что в рамках выбранной термодинамической модели в исследуемом диапазоне pH в растворах возможно образование следующих веществ (табл. 1): $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$, $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$, $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O}$, $\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, CaCO_3 -кальцит, CaCO_3 -арагонит, $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. При этом для каждой системы значения pH начала осаждения малорастворимых соединений различны.

Кроме того, в модельных условиях устойчивой фазой является $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$. Известно, что именно этот фосфат выступает исходной аморфной компонентой, из которой в результате перекристаллизации образуются кристаллы гидроксиапатита кости.

Для $\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ при $\text{pH} > 7,8$ отмечаются отрицательные значения SI и положительные ΔG (искл., $\text{pH} = 7,75$ при максимальных концентрациях ионов в модельном растворе), поэтому в рамках данной модели его образование маловероятно. Остальные соединения обладают промежуточной устойчивостью (табл. 2), а, следовательно, их участие в формировании костной ткани зависит от концентрации осадкообразующих ионов, ионной силы, кислотности моделируемой среды.

Так, при $\text{pH} = 7,40 \pm 0,05$ модельного раствора термодинамическая вероятность образования убывает в ряду $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} > \text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2.5\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaCO}_3\text{-кальцит} > \text{CaCO}_3\text{-арагонит}$ и аналогична для всего рассматриваемого диапазона концентраций. Это указывает, на то, что при данном значении pH среды влиянием ионной силы можно пренебречь.

Таблица 2. Значения индексов пересыщения труднорастворимых соединений модельных растворов при минимальных, средних, максимальных значениях интервала рН и концентрации неорганических ионов

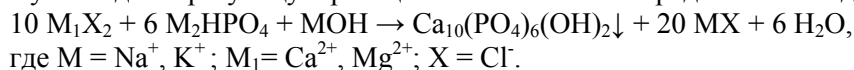
№	рН Концентрации*	7,4			7,6			7,8		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3
1	$\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$	1,04	1,14	1,2	1,15	1,25	1,31	1,26	1,35	1,41
2	$\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	0,45	0,56	0,63	0,55	0,66	0,73	0,65	0,76	0,83
3	$\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$	0,14	0,24	0,3	0,21	0,31	0,38	0,28	0,38	0,44
4	$\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$	0,17	0,28	0,35	0,2	0,32	0,38	0,23	0,34	0,41
5	$\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0,06	0,2	0,29	0,09	0,23	0,32	0,12	0,26	0,35
6	CaCO_3 (кальцит)	0,05	0,08	0,11	0,15	0,19	0,22	0,26	0,29	0,32
7	CaCO_3 (арагонит)	-0,02	0,02	0,05	0,09	0,12	0,16	0,19	0,23	0,26
8	$\alpha\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$	-0,35	-0,24	-0,17	-0,25	-0,14	-0,07	-0,15	-0,04	0,03

Примечание. 1 – минимальные; 2- средние; 3 - максимальные значения концентраций.

С увеличением рН растворов наибольшую термодинамическую устойчивость приобретают фазы, в анионах которых отсутствуют или присутствуют в меньших количествах ионы водорода. Так, при минимальных концентрациях ионов $\text{pH}=7,60 \pm 0,05$ фазой предшествующей осаждению ньюбериита является октакальция фосфат, а брушита - кальцит: $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O} > \text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} > \text{CaCO}_3$ (кальцит) $> \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaCO}_3$ (арагонит). При $\text{pH}=7,80 \pm 0,05$ данная закономерность прослеживается более четко.

С увеличением концентраций ионов в обоих случаях, возрастают силы межионного отталкивания, что приводит к уменьшению коэффициентов активностей и возрастанию вероятности образования наиболее растворимой и термодинамически неустойчивой фазы. Так, вслед за осаждением $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5\text{H}_2\text{O}$ отмечается последовательное образование соединений, растворимость которых уменьшается в ряду: $\text{MgHPO}_4 \cdot 3\text{H}_2\text{O} > \text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O} > \text{CaCO}_3$ (кальцит) $> \text{CaCO}_3$ (арагонит).

Таким образом, полученные результаты указывают на то, что оптимальными условиями получения гидроксиллаптита в модельных растворах синовиальной жидкости является $\text{pH}=7,8$ (средние, максимальные концентрации), где основной примесной фазой выступает $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ и осаждение других труднорастворимых соединений термодинамически маловероятно. Основную осадкообразующую реакцию синтеза можно представить следующим образом:



Для постановки модельного эксперимента в лабораторных условиях, был взят раствор с близким минеральным содержанием основных компонентов к суставной синовиальной жидкости здорового взрослого среднестатистического человека (табл.3).

Таблица 3. Минеральный состав синовиальной жидкости человека [Матвеева и др., 1999], ммоль/л

Компонент	Минимальная концентрация	Максимальная концентрация	Среднее значение концентрации
Кальций	2,25	2,80	2,53
Натрий	130,00	150,00	140,00
Магний	0,70	1,50	1,10
Калий	3,80	5,40	4,60
Хлориды	95,00	111,00	103,00
Карбонаты	24,00	30,00	27,00
Фосфаты	2,42	6,34	4,38
Сульфаты	9,90	12,90	11,40

Состав модельного водного раствора задавался на основании минимальных, средних и максимальных концентраций ионов, проводился учет его ионной силы, рН (7,0-8,0), температуры и вязкости, которая лежит в интервале $26,3 \pm 3,13 \text{ мм}^2/\text{с}$. При этом в эксперименте создавалась вязкость равная 5,10,15,25,30 $\text{мм}^2/\text{с}$. Вязкость модельной синовиальной жидкости

создавали с помощью раствора желатина в воде.

После того, как была создана необходимая вязкость в колбу добавляли ионы кальция и магния, доводили рН раствора до 7.4, герметично закрывали и оставляли на 1 месяц для кристаллизации твердой фазы из раствора. По истечению указанного срока, осадок отфильтровывали и анализировали с помощью рентгенофазового анализа (рис.2).

На основании данных РФА во всем диапазоне созданной вязкости основной минеральной фазой является магний содержащий β - $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (витлокит), а как известно именно этот минерал является исходной аморфной компонентой из которой в результате перекристаллизации образуется кристаллы гидроксилапатита. На ИК-спектрах исследуемых проб (рис. 3) присутствуют полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям молекулярной воды $\nu_{\text{H}_2\text{O}}$ - 3440 – 3400 cm^{-1} и деформационным колебаниям Н–О–Н в H_2O - 1680-1610 cm^{-1} ; асимметричным валентным колебаниям ν_3 Р–О в PO_4^{3-} - 1090-1030 cm^{-1} и деформационным колебаниям ν_4 О–Р–О данной группы - 604 cm^{-1} и 546 cm^{-1} . Фоновые сигналы в области частот 1560-1410 cm^{-1} , а также 900-600 cm^{-1} могут указывать на присутствие примеси карбонатапатита. По нашему мнению, лимитирующей стадией осаждения витлокита является массоперенос частиц в вязкой среде. Поэтому при отсутствии костных заболеваний дальнейшей кристаллизации гидроксилапатита с участием синовиальной жидкости не наблюдается и синовия совместно с кровью, приносимой кровеносными капиллярами со стороны кости обеспечивают питание и функционирование суставного хряща, а, следовательно, подвижность самого сустава. Очевидно, на характер течения процессов минералообразования помимо вязкости среды синовиальной жидкости, оказывают влияние значение рН и изменение содержания ряда органических веществ. Этот факт подтверждает ранее проведенное термодинамическое и экспериментальное моделирование без учета вязкости, в которых основным образующимся минералом является гидроксилапатит, с примесями витлокита, брусшита, октакальция фосфата. На основании проведенного термодинамического расчета данное соединение является термодинамически наиболее устойчивым.

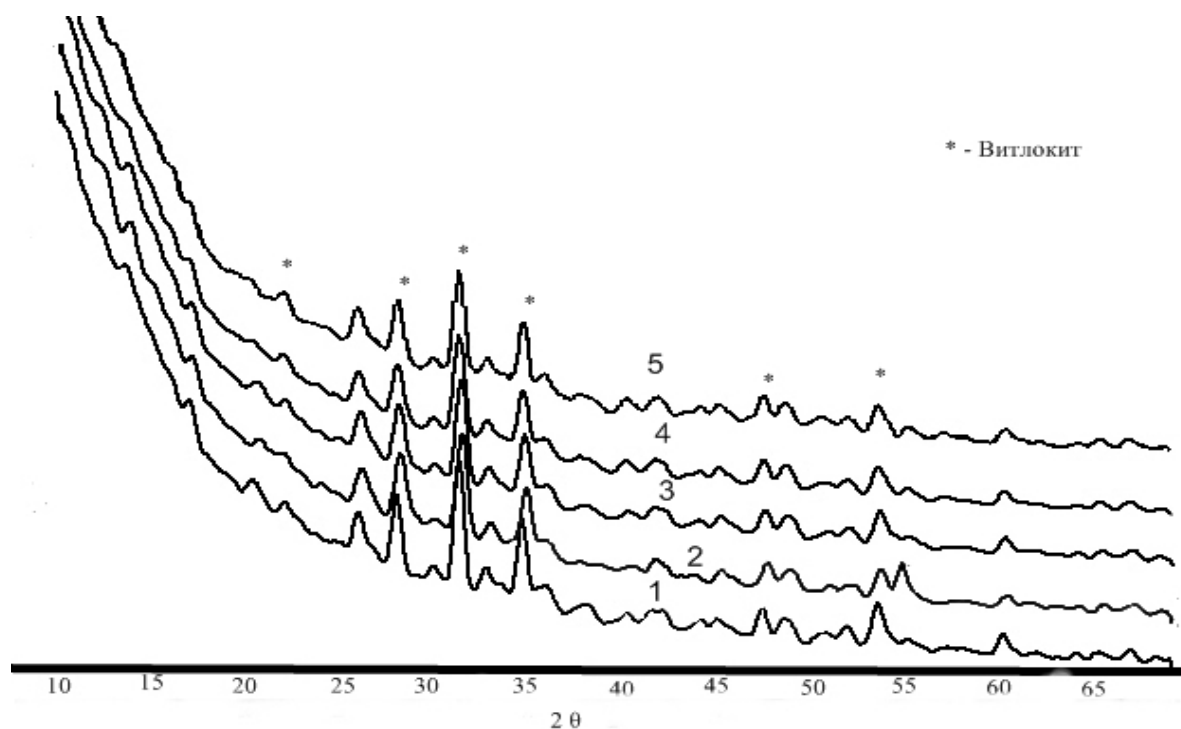


Рис.2. Дифрактограммы образцов, синтезированных при $\dot{\gamma}$ 5 mm^2/c (1), 10 mm^2/c (2), 15 mm^2/c (3), 25 mm^2/c (4), 30 mm^2/c (5).

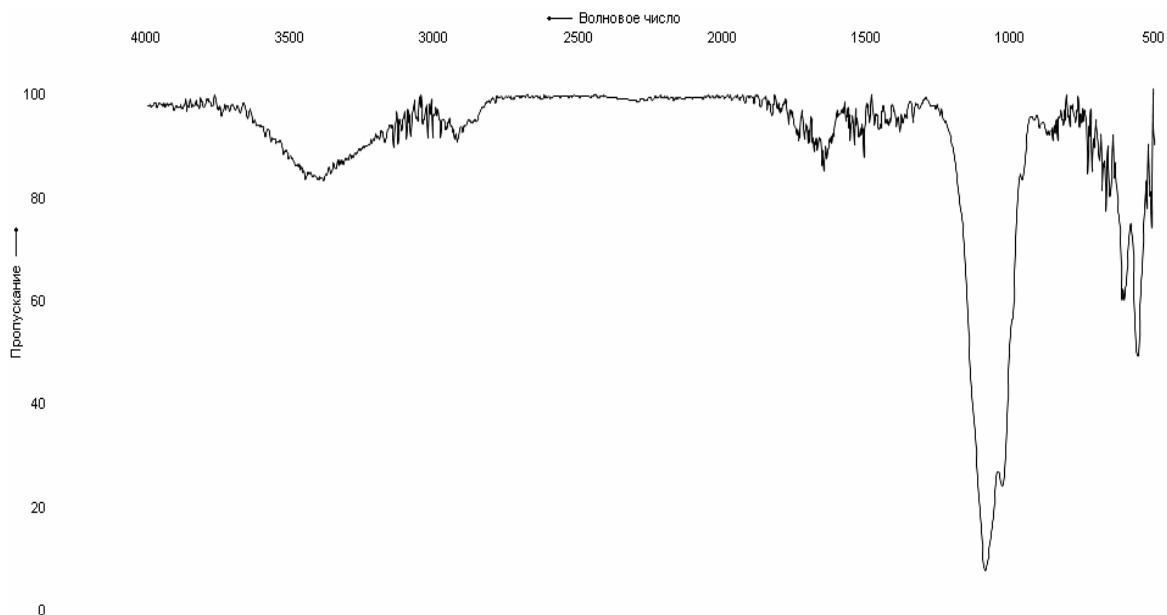


Рис. 3. ИК- спектр образца, синтезированного при $\dot{\eta} = 15 \text{ мм}^2/\text{с}$

Таким образом, можно отметить, что в синовиальной жидкости могут образовываться два основных минерала, один из которых является термодинамически устойчивым продуктом - гидроксилapatит, а другой кинетически устойчивым - магний содержащий $\beta\text{-Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ (витлокит). Возможно, именно он образуется на ранних стадиях заболевания опорно-двигательной системы человека, затем с течением времени переходит в гидроксилapatит, образование которого приводит к нарушению многих характеристик в суставе, прежде всего pH [Ларионов, 2003], а это в свою очередь влияет на вязкость синовиальной жидкости, она снижается. Это способствует истиранию гиалинового хряща и соприкосновению костной ткани человека с синовиальной жидкостью, что приводит к прогрессированию заболевания.

Литература

- Вересов, А. Г., В. И. Путляев, Ю. Д. Третьяков, 2004, Химия неорганических биоматериалов на основе фосфата кальция, *Российский химический журнал*, Т.48, №4, С.52-64.
- Ларионов, В. П., А. Т.Титов, А. М. Караськов, В. С. Щукин, 2003, Структура и физико-химические условия образования кальцификатов на клапанах сердца, *Патология кровообращения и кардиохирургия*, №1, С. 4-76.
- Лемешева, С. А., Р. Р. Измайлов, О. А. Голованова, 2010, Теоретическое моделирование состава синовиального раствора, *Вестник Казанского Государственного Технического Университете им. А.Н. Туполева. – Казань. №1*, С. 45 -49.
- Матвеева, Е. Л. *Биохимические изменения в синовиальной жидкости при развитии дегенеративно-дистрофических процессов в коленном суставе*: Автореф. Дис. д.б.н. Тюмень: Тюменский гос. университет, 2007. 24 с.