

ИЗУЧЕНИЕ БИОАКТИВНОСТИ ФОСФАТОВ КАЛЬЦИЯ СИНТЕЗИРОВАННЫХ ИЗ МОДЕЛЬНЫХ РАСТВОРОВ ПЛАЗМЫ КРОВИ

Ю.А. Кутузова, А.А. Солодянкина, О.А. Голованова

ФГБОУ ВПО «ОмГУ им. Ф.М. Достоевского», г. Омск, pushistik_9393@mail.ru

Установление процессов и закономерностей кристаллизации малорастворимых соединений в организме человека всегда привлекало внимание исследователей. Особый интерес вызван тем, что такие соединения входят в состав патогенных минералов и являются причинами различных болезней человека. Такие патогенные минеральные образования как кальцификаты артериальных стенок являются причиной болезней, например, артериосклероз – заболевание, которое характеризуется отложением солей кальция в фиброзных бляшках. Это заболевание является самой распространенной причиной смерти в странах Западной Европы. Кроме того, результаты этих исследований широко применяются при создании современных биосовместимых материалов медицинского назначения.

Изучения таких соединений весьма затруднительны из-за сложного состава среды, в которой происходит их образование. Известно, что биологические жидкости состоят из множества компонентов, как неорганических, так и органических. Такая биологическая жидкость как плазма крови состоит из воды (около 90 % массы), низкомолекулярных соединений органического и неорганического происхождения – солей или электролитов, углеводов, липидов, органических кислот и оснований, промежуточных продуктов обмена как содержащих азот, так и неазотистого происхождения, витаминов (около 2 % массы), белков, на долю которых приходится до 8 % массы плазмы.

В последние годы процент патогенных минералобразований в кровеносных сосудах и сердечных клапанах увеличивается. Связи с этим изучение кристаллизации и свойств малорастворимых соединений является перспективным направлением.

Главной неорганической фазой патогенной кальцификации коллагеновых и мышечных тканей, так же как в костной и зубной тканях, является фосфат кальция, который с определенной степенью приближения и идеализации относят к карбонатсодержащему гидроксилapatиту, как правило, слабо окристаллизованному и нестехиометрическому из-за присутствия значительных количеств посторонних ионов. Некоторые из этих ионов входят в кристаллическую решетку апатита, другие же только адсорбируются на

поверхности апатита. Этот апатит является типичным биогенным минералом, тесно связанным пространственно, генетически структурно и морфологически с протеинами, липидами и полисахаридами тканей организма.

Патогенный апатит не имеет такой тесной связи с обменными процессами в организме, как физиогенный. Степень дефектности его всегда высока и зависит в большей степени от локальных процессов, чем от состояния организма в целом. Соотношение Ca/P в кальцификатах, по многочисленным литературным данным, варьирует в значительных пределах. В матричных везикулах это соотношение может быть около 0,66, а в зрелом апатите доходит до 2. Размер кристаллов в процессе созревания био-apatита увеличивается от наноразмерных до 100 и даже более микрон

Цель работы – изучение кристаллизации фосфатов кальция из прототипов плазмы крови человека и исследование их свойств.

Для синтеза проведен расчет состава модельной системы, при этом использовали значения средней концентрации неорганических веществ, входящих в плазму крови человека. Выбор исходных реагентов и их соотношение в растворе определялись таким образом, чтобы концентрации ионов и ионная сила раствора были максимально приближены к данным параметрам моделируемой системы.

В качестве исходных реагентов использовали соли марки ч.д.а. и х.ч. и дистиллированную воду. Для каждой серии экспериментов были приготовлены растворы, содержащие катионы и анионы, при совместном присутствии которых в данных условиях не образуются малорастворимые соединения. В каждом производили корректировку значений pH до физиологического значения (7.4 ± 0.01) путем добавления 30 %-ого раствора NaOH или HCl (конц.). После смешения эквивалентных объемов растворов получаем раствор с заданным пересыщением и рассчитанной концентрацией компонентов. Время синтеза составляло от 1 до 8 недель. По окончании времени синтеза раствор фильтруют. Отбирают часть надосадочной жидкости для проведения химических анализов. По окончании фильтрования осадок высушивают в сушильном шкафу при температуре

Таблица 1. Кинетические параметры растворения твердых фаз в 0.9 % раствор NaCl

Время синтеза	Пересыщение	Порядок	Уравнение	$R^2_{\text{расч}}$	v , мкмоль/л*мин
8 недель	10	0	$C = 0,1448x + 9,3282$	0,4891	0,1448
	20		$C = 0,0825x + 7,8891$	0,4487	0,0825
	30		$C = 0,2852x + 3,608$	0,6654	0,2852
	40		$C = 0,028x + 2,7053$	0,6571	0,0280
	50		$C = 0,0557x + 4,0013$	0,4970	0,0557
	100		$C = 0,1518x + 4,7436$	0,6994	0,1518

~ 80 °С до полного удаления воды. В результате 35 полученных фаз анализировали комплексом физико-химических методов.

Результаты РФА показали, что все образцы, синтезируемые в среде модельного раствора плазмы крови человека при варьировании пересыщений и времени синтеза, представляют собой смесь из карбонатгидроксилапатита, октокальцийфосфата и витлокита, при этом пики максимальной интенсивности находятся близко и накладываются друг на друга, что затрудняет расшифровку. Линиям ОКФ соответствуют пики по шкале 2 θ :28,3;34,4;36,7, линиям КГА соответствуют пики по шкале 2 θ :26,3;33,9;34,6, а линиям витлокита соответствуют пики по шкале 2 θ :17,4;30,2;33,7, причем с увеличением пересыщения и времени синтеза содержание КГА увеличивается.

Для установления качественного состава твердых фаз использовали ИК-спектроскопию. На спектрах всех исследованных образцов регистрируются полосы поглощения в спектральных диапазонах, относящихся соответственно к валентным и деформационным колебаниям связей С-О карбонат-ионов. Можно отметить, что интенсивность, характерная для гидроксилапатита, полос колебания ОН- в области 3500 см⁻¹ очень мала. Отсюда можно предположить, что осадок содержит карбонатгидроксилапатит А-типа.

Далее было изучено растворение синтезированных порошков, с разным пересыщением (S = 10,20,30,40,50,100) и временем синтеза 8 недель. Растворение проводилось в трех растворителях.

По кинетическим кривым $C(\text{Ca}^{2+}) = f(\tau)$ растворение в 0.9 % растворе NaCl, видно, что насыщение ионами кальция происходит за 5 минут. Далее по полученным кривым рассчитали кинетические закономерности (табл. 1). Получили, что порядок реакций растворения нулевой, при этом в зависимости от пересыщения скорость монотонно не изменяется.

Аналогичные закономерности были получены при изучении биоактивности в растворах трис-буфера и в ацетатном буфере. Далее для исследуемых проб провели растворение при температуре до 40 °С для расчёта энергии активации.

Выявили, что для раствора 0,9 % NaCl (табл. 2) характерно снижение энергии активации с уменьшением пересыщения. Это связано с тем, что для пересыщения 100 требуется меньше энергии для осуществления процесса растворения, так как происходит увеличение ионной силы раствора, то есть проявляется солевой эффект. Сравнивая растворение при одинаковых пересыщениях (50) в ацетатном и трис-буфере можно отметить, что для трис-буфера энергия активации гораздо выше.

Анализ данных табл. 2 показал, что наибольшая скорость растворения синтезированных образцов

Таблица 2. Изменение энергии активации для разных растворителей

Растворитель	Пересыщение	E_a , Дж/моль
NaCl, 0,9 %	10	226,52
	100	32,33
Ацетатный буфер	50	84,97
Трис-буфер	50	382,63

характерна для ацетатного буфера (наименьшее значение энергии активации), это, по нашему мнению, связано с кислой средой ацетатного буфера.

Выводы. Осуществлен синтез из прототипов плазмы крови человека в зависимости от пересыщения и времени синтеза. Получены твердые фазы, состоящие из октокальцийфосфата, карбонатгидроксилапатита А-типа, витлокита.

Изучено растворение в трех растворителях. Выяснено, что порядок растворения для всех трех растворителей равен нулю. Скорость растворения для всех растворителей изменяется немонотонно. Установлено, что более эффективное растворение наблюдается в ацетатном буфере.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 15-35-50424 мол_нр).