

Fizičko-kemijske značajke kardiovaskularne kalcifikacije

KUI 11/2004
Prispjelo 5. rujna 2003.
Prihvaćeno 16. siječnja 2004.

B. B. Tomažić

4630 Learned Sage, Ellicott City, MD 21042, USA

Cilj ovoga pregleda je pobliže opisati fizičko-kemijske značajke prirodnih patoloških kardiovaskularnih naslaga (PCD), izoliranih s raznih mjesta ljudskog kardiovaskularnog sustava. U pokušaju razumijevanja složenog mehanizma nastajanja PCD-a i identifikacije prekursorske faze uspoređene su *in vitro* i *in vivo* studije.

Općenito se smatra da je PCD po sastavu hidroksiapatit (HAP), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$; međutim, to je još uvijek otvoreno pitanje i zahtijeva daljnje kritičko istraživanje.

Nakon izolacije PCD-a iz tkiva organski je sastojak izdvojen deproteinacijom, što je rezultiralo čistom anorganskom komponentom PCD-a. Ta je komponenta analizirana primjenom sljedećih metoda odnosno tehnika: rendgenska difrakcija (XRD), infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom (FTIR), optička, polarizacijska i pretražna mikroskopija (SEM), energijsko-disperzijska rendgenska mikroanaliza (EDS) i termodinamičko određivanje topljivosti anorganske faze. Iste su metode upotrijebljene i za karakterizaciju naslaga nastalih u eksperimentima *in vitro* i *in vivo*.

Rezultati kemijskih analiza pokazali su da PCD-i sadrže uglavnom organsku komponentu (proteini, kolesterol), a odvojeni anorganski sastojak je "bioapatit", koji je analogan defektnom HAP-u s povišenom makro inkorporacijom natrija, magnezija, karbonata i fluorida. Podaci XRD-a ukazuju na strukturni model apatita, međutim promjenljiv stupanj kristaliničnosti ukazuje da proces kristalizacije ovisi o vremenu i dinamici protoka (time and flow dynamics-dependent process). Kritična termodinamička topljivost nesumnjivo dokazuje da su PCD-i znatno topljiviji od HAP-a.

PCD-i su morfološki i kemijski heterogene tvorevine, vjerojatno nastale sporom, vremenski ovisnom hidrolitičkom transformacijom prekursora. Pokazalo se da ti prekursori mogu biti amorfni kalcijev fosfat i oktakalcijev fosfat (OCP), $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$.

Ključne riječi: *Kardiovaskularna biomineralizacija, hidroksiapatit, oktakalcijev fosfat, fizičko-kemijska karakterizacija.*

Uvod

Srčane bolesti, poglavito ateroskleroza uzrokuju više smrtnosti, nesposobnosti i ekonomskog gubitka u SAD-u od bilo koje druge akutne ili kronične bolesti. Vrlo često, srčano oboljenje je povezano sa stvaranjem naslaga na krvnim žilama koje sprječavaju normalan krvotok. Kolesterol čini organsku komponentu naslage, dok je drugi sastojak biomineralni sediment, uzročnik patološke kalcifikacije odgovoran i za opću degeneraciju kardiovaskularnog sustava. To se osobito odnosi na umjetne srčane zaliske, komercijalne proizvode izrađene od svinjskih srčanih zalistaka (porcine valve bioprosthetic, PVB) ili goveđeg osrčja (bovine pericardium bioprosthetic, BPB). Stvaranje naslaga biominerala vrlo je važna komplikacija kojoj se ne pridaje dovoljna važnost, unatoč činjenici da se to događa u krvnim žilama¹ i u tkivima srca.² Kardiovaskularne bioproteze tipa PVB i BPB zbog naslaga biominerala imaju loš učinak i ograničen vijek trajanja od 1–15 godina.^{3,4,16} Patološka kardiovaskularna kalcifikacija je složen proces povezan sa stvaranjem prekursora, koje pak uključuje biokemijske faktore kao proteine,⁷ protolipide,⁸ fosfolipide⁹ i kolesterol.¹⁰

Boskey¹¹ je ponudila iscrpni pregled o djelovanju organela i makromolekula u kalcifikaciji. Fosfatidilserin, tekuća komponenta stanične membrane stvara kompleks Ca^{2+} -fosfolipid (1:1), mogući je prekursor u nastajanju nukleusa patološkog biominerala.⁹ Studija o ko-kristalizaciji kolesterola i kalcijevih fosfata *in vitro* potkrepljuje hipotezu da kolesterol ima važnu funkciju u kalcifikaciji aorte *in vivo*,¹⁰ međutim točan mehanizam kardiovaskularne kalcifikacije nije poznat. Kombinirane fizičko-kemijske analize, potkrijepljene podacima o topljivosti pokazuju da je oktakalcijev fosfat (OCP), $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$ mogući prekursor u stvaranju kardiovaskularnih naslaga.⁶ Rezultati komparativne studije *in vivo* o mineralizaciji goveđeg osrčja, BP, dodatno potvrđuju da je OCP valjan prekursor u nastajanju bioapatita.¹³ Male razlike u kemijskom sastavu objašnjavaju prirodu procesa dozrijevanja bioapatita, koji se može shvatiti kao spori proces hidrolitičke transformacije prekursora. Objektivna i potpuna informacija o mehanizmu kalcifikacije osnovni je preduvjet za kontrolu procesa koji se odvija u krvnim žilama, srčanim tkivima i "tissue-derived" bioprotezama.

Materijali*

Tipovi kardiovaskularnih naslaga (cardiovascular deposits, CD):

1. Aterosklerotske naslage izolirane iz intime kalcificiranih aorti subjekata u dobnoj skupini od 40–80 godina.⁶
2. Naslage izolirane s umjetnog srca (total artificial heart, TAH) usađenog u eksperimentalne životinje, dobivene iz Hershey Medical Center, Hershey, PA, USA.⁶
3. Naslage izolirane s umjetnih srčanih zalistaka PVB koji su služili pacijentima 2–13 godina.¹⁶
4. Naslage iz aortalnih i mitralnih zalistaka pacijenata u dobnoj skupini od 51–84 godine, dobiveni iz Klinike Mayo, Rochester, MN, USA.¹⁵
5. Kalcificirane naslage nastale na segmentima govedeg osrčja pri pokusima *in vitro* (BP segmenti su podvrgnuti djelovanju prezasićenih otopina kalcijevog fosfata) i eksperimentalnim uvjetima *in vivo* (BP segmenti su implantirani u eksperimentalne štakore).¹³

Definirani uzorci analitički su ispitani i jednoznačno karakterizirani.

Metode

Primijenjene metode analize uključuju izolaciju i pročišćavanje PCD-a radi pripreme referentnih materijala za kompletnu fizičko-kemijsku karakterizaciju. To uključuje deproteinaciju PCD-a s hidrazinom¹⁷ i hipokloritom.¹⁸ Obje metode su primijenjene i kritički procijenjene za uspješnu nedestruktivnu deproteinaciju PCD-a.¹⁹ Slijedila je iscrpna kemijska analiza majorskih i minorskih sastojaka PCD-a i definiranje njihovih strukturnih i morfoloških svojstava te termodinamičke topljivosti deproteiniranih PCD-a.

Pomno je istražena *in vitro* i *in vivo* mineralizacija govedeg osrčja, čiji rezultati mogu doprinijeti boljem razumijevanju mehanizma stvaranja PCD-a.

Izolacija CD materijala

Aterosklerotske kalcificirane naslage

Aorte su sačuvane u hladnjaku nakon autopsije na temperaturi od –30 °C. Izolacija uključuje otapanje, disekciju i odvajanje mineralnih naslaga od tkiva.⁶ Nakon separacije, kriogenog mljevenja i deproteinacije, uzorci su pohranjeni u hladnjaku. Količine izoliranog uzorka bile su od 1 – 30 g. Isti pristup primijenjen je i na ostale vrste ispitivanih CD-a. Termogravimetrijska analiza (TGA) pokazuje da početni

uzorci prije deproteinacije imaju 20–40 % masenog udjela organske komponente.^{6,19}

Bioprostetske TAH kalcificirane naslage

Količine PCD-a izolirane s membrana poliuretanskog umjetnog srca iznosile su do 2 g.⁶

Kalcificirane naslage izolirane s umjetnih srčanih zalistaka PVB

Nakon kirušskog odvajanja, svinjski srčani zalisci (PV) isprani su vodenom otopinom soli i sačuvani u neutralnoj otopini fosfatnog pufera s $\varphi = 10$ % formalina. Takva otopina ne mijenja udjel kalcija u kalcificiranom tkivu. Kasnije CD-i su odvojeni od tkiva bioproteza i pažljivo obrađeni na već spomenuti način.¹⁶ Količine izoliranih CD-a varirale su od 0,1 – 0,8 g suhog uzorka.

Kalcificirane naslage iz prirodnih aortalnih i mitralnih srčanih zalistaka

Isti način separacije i čuvanja u puferiranoj formalinskoj otopini³ upotrijebljen je nakon kiruške eksplantacije aortalnih i mitralnih zalistaka. Količine izoliranih nativnih CD-a varirale su od 0,2 – 3,5 g/zalistasak, suhog uzorka.

Kalcificirane naslage s govedeg osrčja

Mineralizacija *in vitro* i *in vivo* te izolacija i obrada segmenta detaljno je opisana.¹³ Dio segmenta upotrijebljen je za histološku karakterizaciju.

Kemijska i stuktorna karakterizacija kalcificiranih naslaga

Navedene metode primijenjene su za dobivanje sveobuhvatne informacije o kemijskom sastavu sastojaka CD-a, strukturalne i fazne informacije, morfologija, refraktivna svojstva, reagenska mikroanaliza i fizičko-kemijska svojstva topljivosti.

Kemijske analize

Izmjerene količine nativnih i deproteiniranih CD-a otopljene su i udjeli iona Ca^{2+} , Na^+ , Mg^{2+} određeni su atomskom apsorpcijskom spektroskopijom (AAS). Udjel fosfata određen je spektrofotometrijom.²⁰ Udjel HPO_4^{2-} određen je iz razlike absorbancije molibdo-vanadat-fosfat kompleksa hidroliziranog i nehidroliziranog uzorka.^{6,19,21} Karbonat je analiziran primjenom modificirane Conwayeve difuzijske metode.²² Maseni udjel fluorida u uzorcima CD-a određen je pomoću fluoridne ionske elektrode.²³

Rengenska (RTG) analiza i FTIR spektroskopija

Nativni i deproteinirani CD-i karakterizirani su primjenom reagenske difrakcijske analize (XRD).⁶ Snimljeni spektri praškastih uzoraka uspoređeni su sa spektrima²⁴ određenih faza kalcijevih fosfata.

*Komercijalni uzorci i uređaji opisani u ovom pregledu prezentirani su s ciljem da detaljnije opišu eksperimentalni postupak. To ne znači preporuku ili potvrdu Nacionalnog Instituta za Standarde i Tehnologiju (National Institute of Standards and Technology, NIST) ili Zdravstvene fundacije Američkog zubarskog udruženja (American Dental Association Health Foundation, ADAFH) da su navedeni uzorci ili uređaji nužno i najbolji za opisanu svrhu.

FTIR spektroskopija nativnih i deproteiniranih CD-a izvedena je na Nicolet 7000 FTIR spektrometru; 100 FTIR spektralnih obrisa dobiveno je u području od 400–4000 cm^{-1} .

Mikroskopske metode

Morfologija i kemijski sastav aterosklerotskih i bioprotetskih CD-a ispitivani su pomoću Cambridge 250 Mark II pretražnog elektronskog mikroskopa (SEM), opremljenog Princeton Gamma-Tech energijsko-disperzijskim rенgen-skim analizatorom (EDX),⁶ koncentracije iona Ca^{2+} , P^{3+} , Na^+ i Mg^{2+} određene su primjenom FRAME C korekcijskim postupkom.²⁵

Leitz Ortholux polarizacijski mikroskop upotrijebljen je za ispitivanje optičkih svojstava PCD-a. Mjerenje prosječne vrijednosti indeksa refrakcije, n , mikrokristaliničnih uzoraka obavljeno je imerzijskom metodom.²⁶

Mjerenje topljivosti PCD-a

Topljivost je važna fizičko-kemijska karakteristika patoloških kardiovaskularnih kalcificiranih naslaga. Topljivost pruža informaciju o prirodi biominerala i mehanizmu stvaranja. Isti kriterij vrijedi i za određivanje topljivosti prirodnih biominerala u kostima i zubima koji su intenzivno studirani i objavljeni.²⁷ Topljivosti deproteiniranih CD-a određene su uravnoteženjem praškastih uzoraka obradom s razrijeđenim otopinama fosforne kiseline.^{6,13,15,16,19}

Koncentracijski podaci uravnoteženih otopina upotrijebljeni su za izračunavanje topljivosti izraženih s produktom ionskih aktiviteta (IAP) za reprezentativne faze kalcijevih fosfata: hidroksiapatita (HAP), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$, oktakalcijevog fosfata (OCP), $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3 \cdot 2,5 \text{H}_2\text{O}$, trikalcijevog fosfata (TCP), $\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$ i dikalcijevog fosfata dihidrata (DCPD), $\text{CaHPO}_4 \cdot 2 \text{H}_2\text{O}$. Negativni logaritam ionskog produkta $pIAP$ navedenih kalcijevih fosfata definiran je sa :

$$pIAP_{\text{DCPD}} = -\log[\text{Ca}^{2+}] [\text{HPO}_4^{2-}] \quad (1)$$

$$pIAP_{\text{OCP}} = -\log[\text{Ca}^{2+}]^4 [\text{PO}_4^{3-}]^3 [\text{H}^+] \quad (2)$$

$$pIAP_{\text{TCP}} = -\log[\text{Ca}^{2+}]^3 [\text{PO}_4^{3-}]^2 \quad (3)$$

$$pIAP_{\text{HAP}} = -\log[\text{Ca}^{2+}]^5 [\text{PO}_4^{3-}]^3 [\text{OH}^-] \quad (4)$$

(zagrade u izrazima (1–4) označuju ionske aktivitete)

$pIAP$ vrijednosti su izračunate primjenom računalnog programa koji izračunava ionske koeficijente aktiviteta iona te uzima u račun Ca-PO_4 kompleksnu ravnotežu.²⁸ Ca-CO_3 kompleksnu ravnotežu,²⁹ kada se sustavi uravnotežuju pod protokom plinske smjese CO_2/N_2 . Svojstva topljivosti CD-a grafički se iskazuju pomoću dijagrama kemijskih potencijala (CPP) koji su vrlo korisni za analizu multikomponentnih sustava.²⁷ CPP-i se izvode unošenjem parova pripadnih vrijednosti $-\log[\text{Ca}^{2+}] [\text{OH}^-]^2$ i $-\log[\text{H}^+]^3 [\text{PO}_4^{3-}]$. Dijagramski prikaz rezultira ravnom crtom s nagibom $-1/r = a$, gdje r odgovara molarnom omjeru $n_{\text{Ca}}/n_{\text{P}}$ spoja koji kontrolira stanje ravnotežne topljivosti. Vrijednosti r za HAP, TCP, OCP i DCPD su 1,66, 1,50, 1,33 odnosno 1,0. Rezultantni

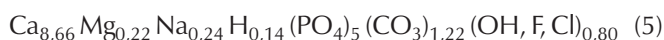
CPP-i pokazuju relativne topljivosti CD-a u usporedbi s termodinamičkom topljivošću navedenih kalcijevih fosfata.

Rezultati

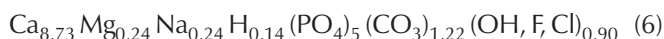
Pročišćavanje-deproteinacija CD-a upotrebom hidrazina ili hipoklorita smanjuje prvotni udjel organske komponente od $w = 20\text{--}30\%$ na svega $1\text{--}2\%$. Pročišćeni mineral može se upotrijebiti za fizičko-kemijsku karakterizaciju, određivanje strukture i termodinamičke topljivosti. Tablica 1 sadrži iscrpne podatke o kemijskom udjelu nativnih i pročišćenih kardiovaskularnih naslaga izoliranih s aorti, umjetnih srca (TAH), karotidnih arterija, prirodnih zalistaka i bioprotetskih zalistaka (PVB). Tablica 1 daje osnovnu informaciju da svi CD-i sadrže znatne količine makro- i mikrokonstituenta.

Prisutnost sličnih kemijskih vrsta, dokumentirana je i u drugim tipovima biominerala.³⁰ Visoki maseni udjel karbonata od kojih $w = 7\%$ smanjuje sa na kojih $w = 4,7\%$ nakon višestrukih uravnoteženja s razrijeđenom otopinom solne kiseline. To pokazuje da je karbonat vrlo čvrsto vezan i inkorporiran u strukturu biominerala. Na temelju podataka s tablice 1 prosječni je sastav PCD-a:

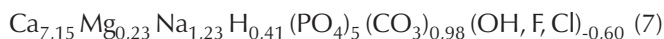
za aterosklerotski CD:



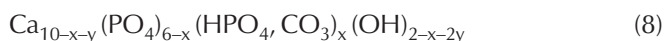
za TAH CD:



za PVB CD:



Ti sastavi odgovaraju sastavu supstituiranih apatita, predloženo po *Kuhlu* i *Nebergallu*:³¹



Odatle slijedi da su sastavi kardiovaskularnih naslaga iskazani formulama (5), (6) i (7) gotovo identični, što može značiti da je i mehanizam nastajanja i sazrijevanja PCD-a vrlo sličan. Najizraženija razlika je visok udjel kiselog fosfata u produktu.⁷ Pročišćavanje PCD-a s hidrazinom i hipokloritom daje vrlo koristan podatak. Visoki udjel HPO_4 produkta⁷ od 11% smanjen je nakon dugotrajnog i opasnog tretmana s hidrazinom na 8% . Nakon kratke, jednostavne obrade s hipokloritom, udjel kiselog fosfata praktički je eliminiran, što znači da hipokloritni postupak poremećuje ishodnu strukturu. Zbog toga je zaključeno da je pročišćavanje PCD-a s hidrazinom jedini pravi postupak obrade, jer se tako sačuva ishodni sastav i struktura.¹⁹

Strukturna svojstva kardiovaskularnih kalcificiranih naslaga

Spektri rенgen-ske difrakcijske analize (XRD) aortnih i bioprotetskih naslaga pokazuju mikrokristaliničnu apatitsku strukturu, koja se nije promijenila nakon hidrazinske obrade.⁶ Spektar ne pokazuje prisutnost TCP (210 i 220

Tablica 1 – Kemijski sastavi raznih kardiovaskularnih naslaga (molarni omjeri)

Table 1 – Chemical composition of multisite calcific deposits (all compositions are expressed as molar ratios)

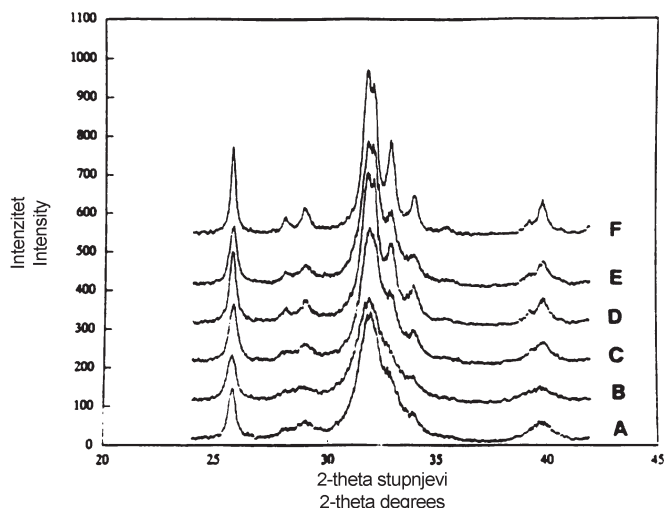
Uzorak Sample	<i>n</i>	$r_{Ca/P}$	$r_{Na/P}$	$r_{Mg/P}$	$r_{CO_3/P}$	$r_{HPO_4/P}$
AN	5	1,74	N.A.	N.A.	0,197	0,024
σ		0,03	–	–	–	–
A*	10	1,73	0,063	0,043	0,244	N.A.
σ		0,06	0,006	0,007	0,024	–
TAH N	4	1,74	0,061	0,056	0,221	0,021
σ		0,08	0,037	0,007	0,082	0,008
TAH *	3	1,75	0,047	0,048	0,238	N.A.
σ		0,08	0,020	0,003	0,017	–
CA	2	1,71	0,087	0,040	0,201	N.A.
MC	1	1,56	0,267	0,042	N.A.	0,092
MC*	1	1,61	0,217	0,039	N.A.	0,067
PVBN	10	1,30	0,245	0,031	N.A.	0,110
σ		0,12	0,159	0,006	–	0,014
PVB*	8	1,43	0,241	0,046	0,198	0,082
σ		0,07	0,089	0,012	0,042	0,043
PVB**	9	1,63	0,101	0,031	N.A.	0,005
σ		0,02	0,038	0,005	–	–
<i>in vitro</i>	6	1,25	N.A.	N.A.	N.A.	0,080
σ		0,06	–	–	–	–
<i>in vivo</i> ₁	10	1,26	N.A.	N.A.	N.A.	N.A.
σ		0,02	–	–	–	–
<i>in vivo</i> ₂	6	1,71	N.A.	N.A.	N.A.	
σ		0,04	–	–	–	

Kratice: A = aortni CD, TAH = CD polietanskog umjetnog srca, CA = CD iz karotidne arterije, MC = CD miokarda, PVB = CD bioproteza svinjskog srčanog zaliska, *in vitro* = CD produkt stvoren nakon 16 sati, *in vivo*₁ = CD stvoren na inplantiranom govedem osrčju BP nakon 14 dana, *in vivo*₂ = CD stvoren na inplantiranom govedem osrčju BP nakon 49 dana,¹³ *n* = broj uzoraka, N = nativni CD, * = hidrazinska deproteinacija CD-a, ** = hipokloritna deproteinacija CD-a, σ = standardna devijacija, N.A. = nije analizirano. Dio podataka iz tablice 1 objavljen je u literaturi.^{6,13,16}

Abbreviations: A = aortic CD, TAH = total artificial heart CD, CA = carotid artery CD, MC = myocardium CD, PVB = porcine valve bioprosthetic CD, *in vitro* = CD, 16-hour reaction product,¹⁶ *in vivo*₁ = CD, formed in subcutaneous implant, 14 days residence time in rat, *in vivo*₂ = CD, formed in subcutaneous implant, 49 days residence time in rat (13), N = native CD, * = hydrazine treated CD, ** = hypochlorite treated CD, *n* = number of specimens, σ = standard deviation, N.A. = not analyzed. Portion of data shown in Table 1 was reported in literature.^{6,13,16}

β -TCP), DCPD (020 i 141 DCPD) ili OCP (100) jer se ne pojavljuje njihov refleksi karakteristični odzivni pik. Komparativni XRD-spektre pet različitih CD-a prikazani na slici 1 pokazuju izrazitu razliku stupnja kristaliničnosti. Najbolju kristaliničnost pokazuje CD obilježen s F (mitralni srčani zalistak). CD obilježen s B (TAH CD) pokazuje najniži stupanj kristaliničnosti, slično spektru kosti A. Ti podaci uka-

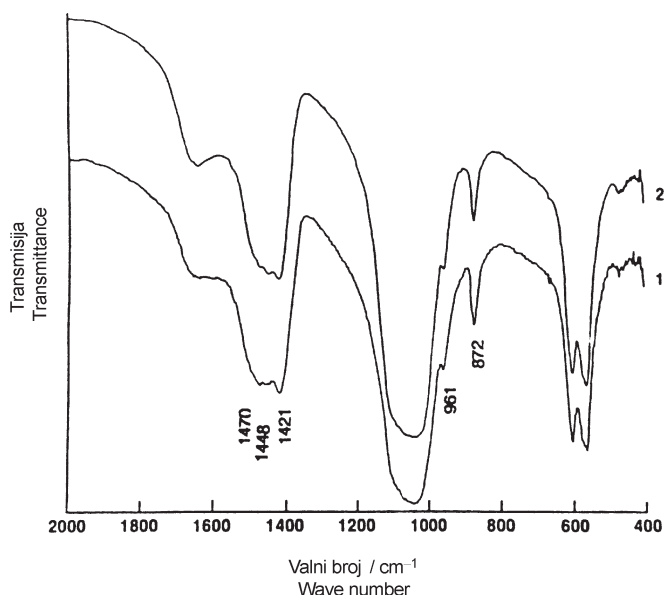
zuju da stupanj kristaliničnosti ovisi o vremenu nastajanja i sazrijevanja. TAH CD i PV CD imaju relativno kratko vrijeme postojanja (šest mjeseci, odnosno nekoliko godina) u usporedbi sa aortnim CD, miokardijalnim CD i mitralnim CD (51–85 godina).¹⁵ Aktivni protok krvi i stalno aktivni rad ostarjelih srčanih zalistaka doprinose rastu i sazrijevanju biomineralnih kristala.¹⁵



Slika 1 – XRD strukture pet kardiovaskularnih naslaga, označenih s: **B** TAH CD, **C** PV bioprotetski CD, **D** aortni CD, **E** CD miokardiuma, **F** CD mitralnog zaliska, **A** XRD kosti

Fig. 1 – XRD patterns of five cardiovascular deposits labeled as: **B** TAH CD, **C** PV CD, **D** aortic CD, **E** myocardium CD, **F** mitral valve CD, Bone pattern labeled as **A**

FTIR spektri deproteiniranih aortnih CD i TAH CD⁶ imaju iste karakteristike kao i PV CD¹⁶ (slika 2). Spektri pokazuju prisutnost vrpce kod 872 cm^{-1} , 1421 cm^{-1} i 1448 cm^{-1} , što ukazuje na karbonatnu supstituciju u apatitnoj strukturi, što rezultira stvaranjem "B" tipa karbonatnog apatita.^{35,36} Nepostojanje vrpce na 1545 cm^{-1} isključuje postojanje "A" tipa karbonatnog apatita u kardiovaskularnim CD-ima.³⁷ Vrpce kod 631 cm^{-1} i 3570 cm^{-1} koje su karakteristične za OH^- u HAP i 910 cm^{-1} za OCP nisu uočene u infracrvenim spektrima ispitivanih CD-a.³⁸

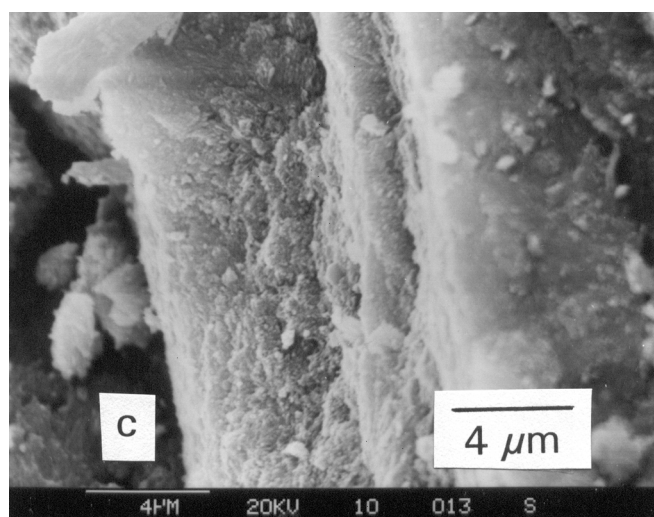
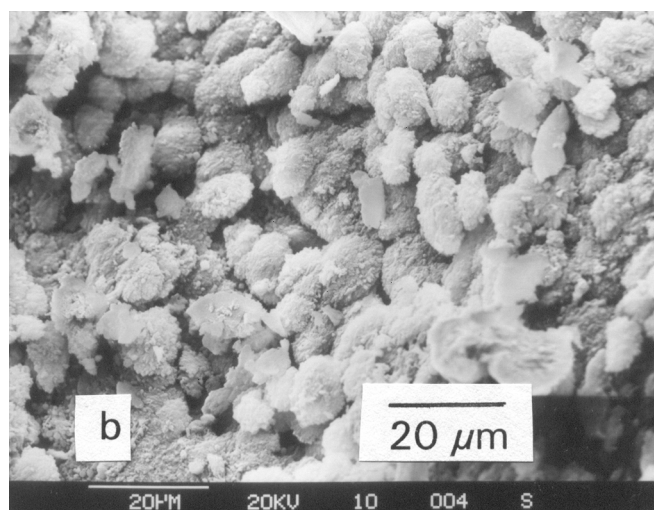
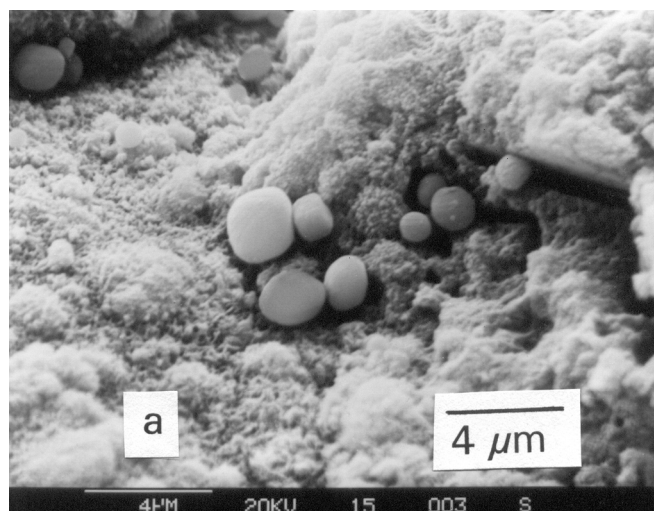


Slika 2 – FTIR spektr deproteiniranog aortnog CD (1) i CD umjetnog srca, TAH (2), prethodno objavljeno⁶

Fig. 2 – FTIR spectra of deproteinized aortic (1) and TAH bio-prosthetic (2) CD, previously reported⁶

Mikroskopska svojstva kalcificiranih naslaga

SEM snimke aortnih CD-a nakon hidrazinskog pročišćavanja prikazane su na slici 3 a, b, c. Anorganska faza je prostorno



Slika 3 – SEM mikrografije hidrazinom pročišćene aortne CD naslage (Z. Kardiol 90)

Fig. 3 – SEM micrographs of hydrazine-treated aortic CD (a-c)

heterogena i kemijski sastav reprezentativnih morfologija određen je rengenom mikroanalizom (EDX) i prikazan s $r_{\text{Ca/P}}$ omjerima kako slijedi: slika 3a: glatke sferične čestice, $r_{\text{Ca/P}} = 1,56$; slika 3b: nepravilne čestice spužvastog oblika

gotovo konstantnih dimenzija, $r_{Ca/P} = 1,68$; slika 3c: slojevita kristalna morfologija (najčešća), $r_{Ca/P} = 1,79$. Slična morfološka opažanja opisali su i Schmidt et al.³⁹ s pretpostavkom da površina naslage ima isti sastav kao i unutrašnjost naslage. Prikazani EDX podaci zacijelo pokazuju da je PCD heterogen kao rezultat dozrijevanja produkta koji uključuje stvaranje prekursora i sporu vremensku transformaciju.⁶

Optička mikroskopija dala je dodatne kvalitativne podatke. Optičke karakteristike i indeksi loma isključuju prisutnost β -TCP-a i HAP-a, jer su njihovi indeksi loma, koji variraju od 1,62 do 1,645⁴⁰ mnogo viši od pripadajućih vrijednosti za CD-e (1,55–1,585).^{6,16} Te su vrijednosti vrlo slične poznatim vrijednostima za OCP (1,576 – 1,585).⁴¹ Niža vrijednost ($n = 1,55$) ukazivala bi na DCPD, ali XRD-spektri isključuju prisutnost DCPD-a u kardiovaskularnim naslagama. Aortni CD ima indeks loma $n = 1,549 - 1,550$ i apatitnu strukturu (spektri XRD). Nakon grijanja do 550 °C, indeks loma se povećava na vrijednost od 1,585 – 1,60, što odgovara karbonatnom apatitu.⁴³ Nakon daljnjeg grijanja do 800 °C dolazi do razvijanja CO₂, što je dokazano termogravimetrijskom analizom (TGA), a indeks loma $n = 1,64$, ukazuje na nastajanje HAP-a.⁶

Svojstva topljivosti kalcificiranih naslaga (PCD)

Budući da su CD-i kompleksne heterogene tvorevine, definiranje njihove topljivosti nije jednostavno. Uklanjanjem organske komponente pri pripravi čiste anorganske matrice omogućeno je određivanje komparativne termodinamičke topljivosti.^{28,46,47,48} Pristup uspješno primijenjen pri praćenju topljivosti pročišćenih kardiovaskularnih naslaga zapravo je ponavljanje uravnoteženja u sustavu: $c_{CD} = 10^{-3}$ mol L⁻¹, $\gamma_{H_3PO_4} = 20$ g L⁻¹, $r_{CO_2} = 5\%$ CO₂, $r_{N_2} = 95\%$ N₂. Nakon 30 minutnog uravnoteženja, filtrirane otopine se analiziraju, a ostatak CD-a se ponovno suspendira u otapalu, milimolarnoj otopini fosforne kiseline. Uravnotežene otopine se analiziraju i izračunaju srednje $pIAP$ vrijednosti i standardne devijacije za DCPD, OCP, TCP i HAP (tablica 2). Ti podaci pokazuju da topljivost aortnog CD-a približno odgovara topljivosti OCP-a i β -TCP, ali znatno nadmašuje topljivost HAP-a.⁴⁵

Tablični pregled topljivosti deproteiniranih aortnih CD, TAH CD, PV bioprotetskih CD prikazan je u tablici 3.⁶⁷

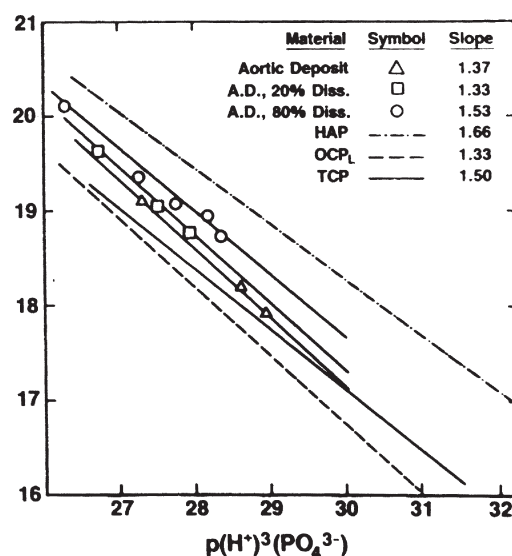
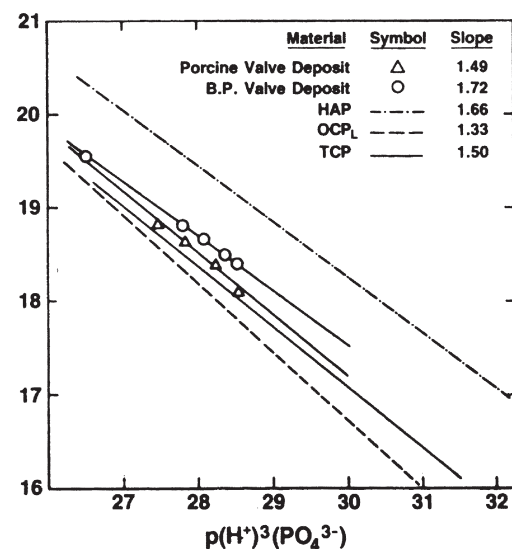
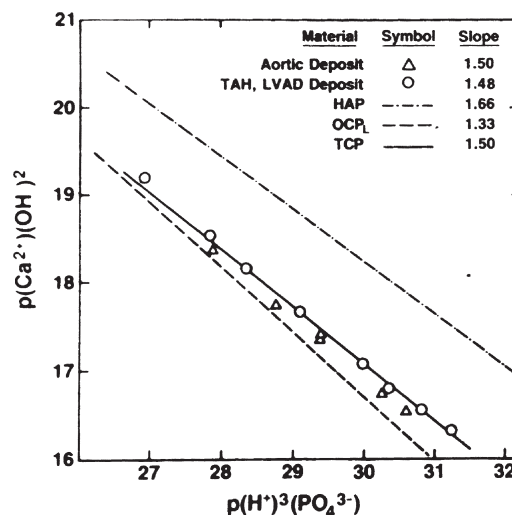
Tablica 2 – Prosječne $pIAP$ vrijednosti dobivene nakon osam uravnoteženja aortnih kalcificiranih naslaga. Uvjeti: CD, 20 g L⁻¹; H₃PO₄, 10⁻³ mol L⁻¹; $r = 5\%$ CO₂; 30 min 25 °C.

Table 2 – Average $pIAP$ values obtained after eight equilibrations of deproteinated aortic calcific deposits. Conditions: CD, 20 g L⁻¹; H₃PO₄, 10⁻³ mol L⁻¹; $r = 5\%$ CO₂; 30 min, 25 °C.

Spoj Material	$pIAP$	σ	pK_{sp}	Stanje State	$p/\%$	Referenca
OCP	48,49	0,45	48,6	SS	0,2	46
β -TCP	29,32	0,41	28,91	US	-0,1	47
HAP	53,1	0,77	58,55	SS	9,2	28
DCPD	6,92	0,05	6,60	US	-4,8	48

Kratice: $p/\% = [(pK_{sp} - pIAP)/pK_{sp}] \times 100$; SS = prezasićen; $p/\% > 0$; US = nezasićen; $p/\% < 0$.⁶⁷

Abbreviations: $p/\% = [(pK_{sp} - pIAP)/pK_{sp}] \times 100$; SS = supersaturated; $p/\% > 0$; US = undersaturated; $p/\% < 0$.⁶⁷



Slika 4 – Dijagrami kemijskih potencijala (CPP) dobivenih nakon uravnoteženja: a aortnih i TAH CD-a b PV bioprotetskih CD-a i c djelomično otopljenih aortnih CD-a, prethodno objavljeno⁶⁷
Fig. 4 – Chemical potential plots data obtained through equilibration of: a aortic and TAH CD b PC CD and c fractionally dissolved aortic CD⁶⁷

Tablica 3 – Podaci o topljivosti i parametri dijagrama kemijskih potencijala CPP, deproteiniranih CD

Table 3 – Solubility data and chemical potential plot parameters CPP, for deproteinated CD

CD	$r_{Ca/P}$	t	χ_{CO_2} %	p/AP OCP	σ	p/AP HAP	σ	a	b	$n^{\&}$
A4–6	1,77	8 d	0	50,46	0,19	53,84	0,44	1,44	54,96	8 #
A11–1	1,73	8 d	0	50,54	0,45	54,50	0,94	1,46	55,30	5 #
A7–3	1,73	8 d	0	50,11	0,57	53,20	1,10	1,41	54,27	8 #
TAH1s	1,67	8 d	0	50,38	0,39	54,08	1,05	1,41	54,57	7 #
TAH6c	1,74	8 d	0	50,05	0,36	53,42	1,07	1,39	53,85	8 #
A7–2	1,78	6 h	1	49,23	0,53	53,61	0,62	1,47	53,60	6 #
A7–2*	1,78	6 h	1	49,46	0,38	54,46	0,55	1,44	54,80	6 ##
A7–2	1,78	6 h	5	49,53	0,99	54,44	0,90	1,66	58,78	6 ##
A7–2*	1,78	6 h	5	50,61	0,57	55,93	0,40	1,67	59,51	6 ##@
A7–2	1,78	6 h	33	49,39	0,28	54,46	0,11	1,56	56,98	6 ##
A7–2*	1,78	6 h	33	49,58	0,13	55,06	0,29	1,43	54,56	5 ##
PV	1,62	6 h	5	49,20	0,37	54,14	0,48	1,49	55,56	5 ##
A10–0 %	1,65	6 h	5	49,51	0,33	54,14	0,45	1,37	53,47	5 ##
A10–20 %	1,64	6 h	5	49,57	0,29	54,76	0,81	1,33	52,93	
A10–80 %	1,62	6 h	5	50,57	0,39	56,42	0,32	1,53	57,12	

Nema znatnih razlika u topljivosti ($p > 0,1$) nakon osmodnevnog uravnoteženja

Nema znatnih razlika u topljivosti ($p > 0,1$) nakon šestosatnog uravnoteženja

@ Topljivosti za uzorke A7–2* znatno različite od ostalih ## sustava. Znatne razlike u topljivostima ($p < 0,05$) između # i ## sustava.

No significant difference in solubilities ($p > 0,1$) after 8 days equilibrations

No significant difference in solubilities ($p > 0,1$) after 6 h equilibrations

@ Solubility data for A7–2* samples significantly different from other ## systems. Significant difference in solubilities ($p < 0,05$) between # and ## systems.

Kratice: $r_{Ca/P}$ = molarni omjer u CD-u; t = vrijeme uravnoteženja; χ_{CO_2} % je udjel u N_2/CO_2 plinskom protoku; $n@$ broj neovisnih uravnoteženja sa standardnom devijacijom, σ ; $a = -1/r$ = nagib ($\sigma > 0,98$) i b = odrezak CPP-a. A = aortni CD, TAH je CD s umjetnog srca, Hershey bolnica, primijenjenog u ovce (s) i krave (c), PV = CD s bioproteze svinjskog zaliska, A7–2* = podaci ponovnog uravnoteženja CD A7–2; A10-X %: aortni CD, djelomično (X %) otopljen. Podatci su objavljeni u literaturi.⁶⁷

Abbreviations: $r_{Ca/P}$ = molar ratio in CD; t = equilibration time; χ_{CO_2} % = fraction in N_2/CO_2 gas flow; p/AP = average value from $n@$ independent equilibrations with corresponding standard deviations σ ; $a = (-1/r)$ = slope ($\sigma > 0,98$) and b = intercept of chemical potential plot. A = aortic CD; TAH = TAH CD from c = calf or s = sheep application; PV = porcine valve bioprosthetic CD, A7–2* = redissolution data; A10 – X %: aortic CD, partially (X %) dissolved. Reported in literature.⁶⁷

Navedene su prosječne vrijednosti p/AP i njihove standardne devijacije te poredbene dvije definirane faze kalcijevih fosfata (OCP i HAP) i regresijski parametri dijagrama kemijskih potencijala, CPP, prikazanih na slici 4 a-c. Vrijednosti topljivosti vrlo su ovisne o vremenu uspostavljanja ravnoteže, koja se brže uspostavlja pri protoku CO_2 . Prosječne p/AP vrijednosti, standardne devijacije i 95 % granice pouzdanosti za šestosatno uravnoteženje pri protoku od 5 % CO_2 jesu: $49,46 \pm 0,20$ (OCP podaci), $54,41 \pm 0,47$ (HAP podaci). Odgovarajuće prosječne vrijednosti dobivene osmodnevnim uravnoteženjem CD-a pri protoku čistog dušika su $50,31 \pm 0,22$ (OCP podaci) i $53,81 \pm 0,52$ (HAP podaci). Podaci topljivosti dobiveni pri šestosatnom i osmodnevnom uravnoteženju znatno su različiti ($p < 0,05$). Te razlike ukazuju na unutrašnju heterogenost CD biomateriala. Kako je objašnjeno,⁶⁷ prilikom uravnoteženja pri protoku dušika uspostavlja se ravnotežno stanje koje omogućuje polaganu taloženje HAP-a. To je vrlo važan podatak jer pruža indirektan dokaz da patološki biomaterial koji se stvara u kardiovaskularnom sustavu dozrijeva tijekom procesa transformacije. Kao što je vidljivo na slici 4a, aortne i TAH naslage imaju vrlo slične topljivosti, približne topljivostima OCP-a i β -TCP-a. Njihovi CPP-i nalaze se uvjerljivo ispod HAP CPP-a izoterme, što ukazuje da su

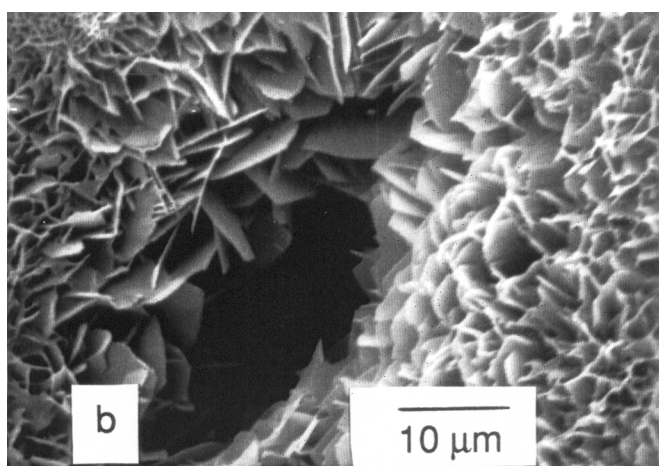
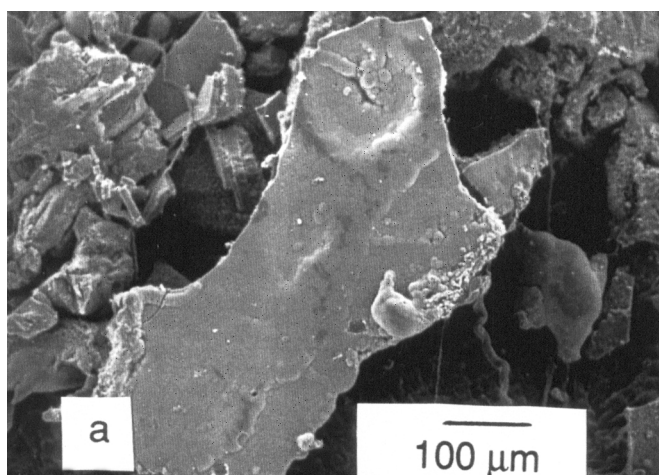
biominerali znatno topljiviji od HAP-a. Prosječni nagibi CPP-a ($-1/r$) variraju od 1,4 – 1,5. Ta niska vrijednost isključuje HAP ($-1/r = 1,66$) kao materijal, koji kontrolira ravnotežu otapanja PCD-a. Topljivost deproteiniranih bioprotetskih PVD-a i BPVD-a, prikazana s CPP-om na slici 4b, ukazuje na slične topljivosti s aortnim i TAH CD-om, koji su nešto topljiviji. No svi uzorci PCD-a znatno su topljiviji od HAP-a. Topljivosti bioprotetskih CD-a izmjerene na temelju 57 neovisnih ravnotežnih mjerenja i izraženih s vrijednostima p/AP_{OCP} iznose $49,78 \pm 0,30$,¹⁶ što je samo jednu p-jedinicu više od pK_{sp} OCP⁴⁶ ali je gotovo identična vrijednost za p/AP_{OCP} oktakalcijevog fosfata hidrolizata OCPH-a.⁴⁹ Slika 4c demonstrira heterogenu topljivost deproteiniranog aortnog CD-a, koji je izložen parcijalnoj disoluciji (0, 20 i 80 %). Čak i preostali CD nakon 80 %-tnog otapanja, ima znatno veću topljivost od HAP-a. Završni nagib CPP-a, $-1/r = 1,53$, ukazuje da je preostalih 20 % CD-a bazičnije od polaznog materijala ($-1/r = 1,37$).

Biomineralizacija segmenata govedeg osrčja (perikardiuma)

Slijede informativni podaci o mineralizaciji *in vitro* i *in vivo* govedeg osrčja.¹³ Segmenti glutaraldehyd-tretiranog gove-

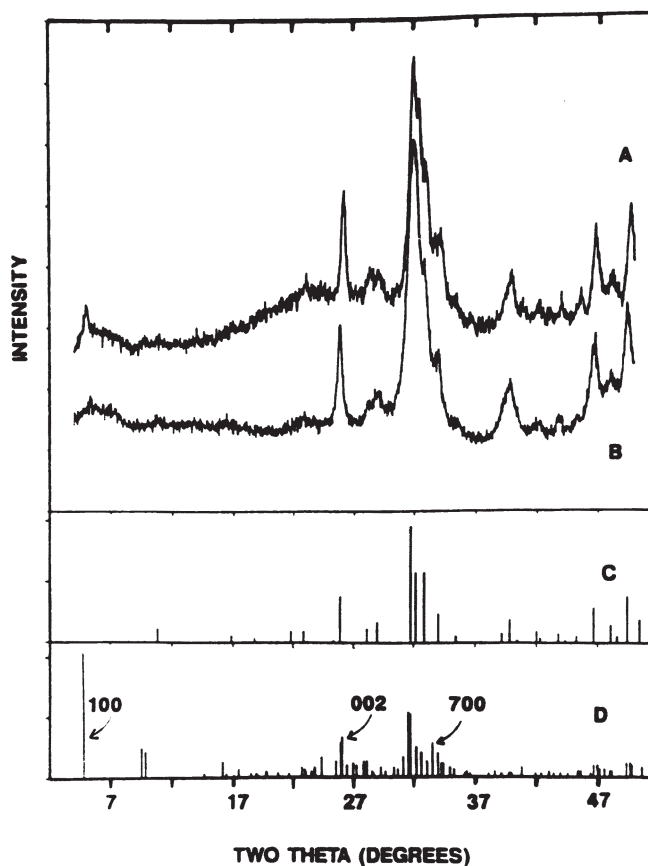
deg osrčja BP priređenih u poduzeću EDWARDS LIFE-SCIENCES, velikoj tvrtki koja proizvodi umjetne srčane zaliske, mineralizirani su *in vitro* i *in vivo*. Mineralizacija *in vitro* izvodi se uranjanjem BP segmenata u otopinu kalcijevog fosfata prezasićenu prema OCP, TCP i HAP ($0,15 \text{ mol dm}^{-3} \text{ NaCl}$, pH 7,40, $T = 37 \text{ }^\circ\text{C}$). Kristalni rast praćen je kinetički pri pH-statskim uvjetima, pH 7,40. Tako su postignuti uvjeti koji odgovaraju fiziološkim uvjetima u organizmu. Na završetku pokusa, segmenti su izvađeni iz otopine za histološku, mikoskopsku, FTIR i kemijsku analizu. SEM mikrografije produkata površinske mineralizacija prikazane su na slici 5 a i b. Morfologija rozeta odgovara izgledu OCP. XRD-spektar kristalizacijskih produkata prikazan je na slici 6, A-D. Spektar A (BP- površinski kristalni produkt) i B (PCD stvoren na bioprotezi)¹⁶ slični su spektru OCP (spektar D), uključujući bitnu 100 OCP refleksiju; tablica 4 pruža zaključni dokaz da reakcijski produkt koji je nastao na površini BP-a odgovara OCP-u.

Tako je dokazano da je OCP sudionik u funkciji tranzitnog ranog prekursora pri nastajanju PCD-a u krvožilnom sustavu. Tu su hipotezu, neovisno od drugih autora, potvrdili Kapos et al.⁵⁰ Nastajanje OCP-a potvrđeno je metodom konstantnog sastava.⁴⁴



Slika 5 – SEM mikrografije minerala stvorenog *in vitro* na površini BP-a nakon 16 satnog rasta: **a** veliki ravni kristali (manji udjel) i **b** morfologija rozeta odgovara morfologiji OCP-a (veći udjel)

Fig. 5 – Scanning electron micrographs of mineral formed *in vitro* on BP surface after 16 h: **a** large plate-like crystals (minor fraction); **b** rosette-like OCP crystals (major fraction)



Slika 6 – XRD spektri i uzorci: A *in vitro* nastali produkt na površini BP; B bioprotetski zalistak, CD; C HAP; i D OCP²⁴

Fig. 6 – X-ray diffraction pattern of: A *in vitro* formed product on BP surface; B bioprosthetic CD; C HAP; D OCP²⁴

Biomineralizacija BP segmenata *in vivo* koji su bili implantirani u eksperimentalne štakore pokazali su vremenom progresivnu mineralizaciju i povećanje omjera $r_{\text{Ca/P}}$. Mineralizacija *in vitro* odvijala se samo na površini segmenata, dok proces mineralizacije *in vivo* teče i odvija se pod površinom tkiva, omjer $r_{\text{Ca/P}} = 1,25$, što blisko odgovara sastavu OCP-a. U daljnjoj fazi implantacije dolazi do povećanja omjera $r_{\text{Ca/P}}$ do 1,7–1,9, što odgovara sastavu kompleksnog supstituiranog bioapatita.^{13,67,69} Ti rezultati slažu se s rezultatima druge neovisne studije kojom je dokazano vremensko povećanje omjera $r_{\text{Ca/P}}$ za biominerale koji nastaju na srčanim implantatima.⁵¹ Mavrilas et al.⁵¹ predložili su mehanizam koji uključuje intrinzično stvaranje DCPD-a, koji se potom hidrolitički transformira u OCP sa završnim produktom koji ima omjer $r_{\text{Ca/P}} = 1,78 \pm 0,20$ (28 dana) i $1,94 \pm 0,20$ (56 dana). Pogubni proces stvaranja PCD-a na umjetnim srčanim zaliscima je intrinzična mineralizacija,⁵⁴ koja je ustanovljena u eksperimentima *in vivo*.^{13,51}

Rasprava

Nastajanje kalcificiranih naslaga u kardiovaskularnom sustavu kompleksan je fenomen, koji se ne može lako pratiti, a pogotovo spriječiti. Opće mišljenje medicinskih stručnjaka je da je nalaz kardiovaskularnih naslaga i konačno stanje kardiovaskularne patologije. Međutim, iz fizičko-kemijske i biofizičke perspektive takvo stajalište nije prihvatljivo. Može se predložiti nekoliko tipova primijenjenih

Tablica 4 – Sastav minerala stvorenog na površini BP segmenata. Šest segmenata izolirano iz otopine, obrađeno i analizirano nakon 16-satne mineralizacije *in vitro*.Table 4 – Composition of mineral formed on BP discs. Six discs recovered, processed and analyzed after 16 h mineralization *in vitro*.

Uzorak Sample	Masa Mass m_{Ca}/mg	Masa Mass m_{PO_4}/mg	Masa Mass m_{Ca+PO_4}/mg	Površinska gustoća Surface density $a_{Ca+PO_4}/mg\ cm^{-2}$	Molarni omjer Molar ratio r_{Ca/PO_4}
D-1*	0,492	0,882	1,374	0,208	1,32
D-2*	0,022	0,451	0,673	0,1020	1,17
D-1**	0,460	0,891	1,351	0,2047	1,23
D-2**	0,173	0,328	0,501	0,0760	1,25
D-1***	0,166	0,298	0,464	0,0703	1,32
D-2***	0,163	0,301	0,464	0,0703	1,24

* mineral otopljen u 1 mol dm^{-3} HCl (3 min "vibromix" agitacija); 95 % minerala otopljeno.

** mineral otopljen u koncentriranoj HCl; slijedi uparavanje i oksidativna razgradnja proteina s H_2O_2 do oko 97 % minerala te izolirano i analizirano.

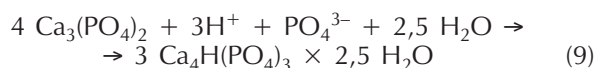
*** mineral otopljen u koncentriranoj HNO_3 ; slijedi uparavanje i oksidativna razgradnja proteinskog ostatka s H_2O_2 do oko 98 % minerala, te izolirano i analizirano.¹³

* mineral was dissolved in 1 mol dm^{-3} HCl (3 min "vibromix" shaking agitation); cca 95 % of mineral recovered.

** mineral was dissolved in concentrated HCl, followed by evaporation and oxidative decomposition of protein residue with H_2O_2 ; cca 97 % of mineral was recovered.

*** mineral was dissolved in concentrated HNO_3 , followed by evaporation and oxidative decomposition of protein residue with H_2O_2 ; cca 98 % of mineral was recovered. Reported in literature.¹³

istraživanja za sprječavanje nastajanja PCD-a: 1) istraživanje mehanizma nukleacije i kristalnog rasta CD-a *in vitro* i *in vivo*; 2) istraživanje inhibicije stvaranja CD-a u medijima koji odgovaraju kardiovaskularnim fluidima; 3) pronalaznje praktičnih načina eliminacije CD-a *in vivo*, otapanjem ili kelatnom terapijom.⁵⁷ Najjednostavniji prekursor je amorfni kalcijev fosfat (ACP); njegovo nastajanje je kinetički favoriziran proces koji se nesmetano odvija usprkos postojanju mnogih prirodnih inhibitora. Nalaz ACP-a potvrđen je u kostima^{17,53} i aortnom zalisku.⁵² Drugi vrijedni potencijalni prekursor za stvaranje bioapatita *in vivo* je OCP. Velika strukturna XRD sličnost OCP i HAP potvrđuje hipotezu prekursora.⁴¹ Meyer i Eanes⁵⁶ dali su termodinamičke podatke koji pokazuju da svježe istaloženi ACP u stvaranju apatita uključuje OCP:



Produkt reakcije (9), OCP, termodinamički je nestabilan i u odsutnosti inhibitora može se transformirati u oktakalcijev fosfat hidrolizat, OCPH,^{34,49} što je sljedeći nestabilni prekursor u nastajanju HAP-a. Stvaranje OCP prekursora potvrđeno je eksperimentalno u ranoj fazi taloženja kalcijevog fosfata u serumu.⁵⁸ Komponente seruma stabilizirale su OCP do 20 dana prije hidrolitičke transformacije u apatitnu fazu. Svi podaci navedeni u ovom opširnom pregledu mogu dovesti do dobrih strategija za sprječavanje nastajanja PCD-a. To se posebno odnosi na umjetne srčane zaliske koji imaju ograničen uporabu vijek.^{4,16} Vrlo dobar primjer je primjena bifosfonata kao aktivnih inhibitora kalcifikacije umjetnih srčanih zalistaka (PVB).⁶⁴ Ograničenje kvalitete tog pristupa je ograničeno trajanje implantiranog inhibitora. Kada se inhibitor potroši, proces intrinzičke kalcifikacije ponovno započinje. Istražuju se novi inhibitori, odnosno sinergističke smjese metalnih iona, Mg^{2+} , Al^{3+} i Fe^{3+} , koje se upotrebljavaju za preinkubaciju bioprotetskih implantata, što dovodi do usporavanja procesa kalcifikacije.^{65,66} Patološka mineralizacija povezana je s oštećenom

staničnom membranom i s njenim konstituentima, koji mogu djelovati kao prirodni inhibitori.

Od posebnog značenja su površine kolagena, elastin, fosfolipidi, matrični sudovi i mitohondrijske membrane.⁶¹ Zato je predloženo da moduliranje matričnih proteina koji reguliraju mineralizaciju mogu pružiti djelotvoran terapijski pristup prevenciji oštećenja srčanog zaliska.⁶⁹

Očito je da je simultana kontrola tolikih biogenih, kemijskih i biokemijskih čimbenika vrlo težak zadatak. Upravo zato, fizičko-kemijski pristup opisan u ovom pregledu može biti prihvaćen kao pojednostavljeni korisni pristup, čiji bi se principi mogli primijeniti u predstojećim primijenjenim industrijskim istraživanjima. Smatra se da je osnovni razlog kratkog uporabnog vijeka PV- i BP-bioproteza činjenica da su one izrađene od "mrtvog" tkiva čiji su sastojci idealna mjesta za nukleaciju prekursora i kristalni rast biominerala.⁷⁻¹¹ U tijeku su brojna primijenjena istraživanja za poboljšanje materijala za izradu umjetnih srčanih zalistaka. Vrlo zanimljiv pristup je primjena AUTOGRAFTA, izradom srčanog zaliska od pacijentovog vlastitog srčanog osrčja. Kirurška operacija eksplantacije oštećenog srčanog zaliska provodi se tako da se najprije izolira osrčje, izradi AUTOGRAFT-zalistak (AUTOGENICS – ATCV™ Construction), koji se potom implantira. Taj precizni zahvat produljuje operacijski zahvat za 30 min., jeftin je i ima potencijalno ogromne prednosti. Novi AUTOGRAFT-zalistak je od živog tkiva, prema tome nema opasnosti od odbacivanja tkiva i imunoloških komplikacija. Posebno je bitno da je zalistak izrađen od živog tkiva, prema tome može se očekivati da patološka mineralizacija izostane. Početni podaci vrlo su dobri, što ukazuje da bi primjena takvog pristupa mogla bitno produljiti vijek bioproteze srčanog zaliska.

Zaključak

Opsežni literaturni podaci pokazuju da je nastajanje kardiovaskularnih kalcificiranih naslaga složen dinamički pro-

ces. Razumijevanje reakcijskog mehanizma od ranog procesa nukleacije do stvaranja konačne faze naslage zahtijeva dodatna osnovna i primijenjena istraživanja. Zapaženiji prilog rješavanju toga problema može se dobiti iz znanstvenih informacija o procesima koji su odgovorni za stvaranje biominerala koji postoje u kostima i zubima kralježnjaka. Osnovni mineral je vrlo reaktivan medij, koji u procesu formiranja uključuje mnoge interakcije s organskim i anorganskim konstituentima što rezultira stvaranjem vrlo komplicirane matrice konačnog biominerala, koji je u svom životnom vijeku izložen stalnim promjenama dinamičkog dozrijevanja. Osnovni uvjet korisnog rješavanja problema je koordinirani napor raznorodnih specijalista. Topljivost biominerala je vrlo važno oruđe jer taj podatak može indirektno identificirati prekursorske faze u nastajanju CD-a. Posve je logično zaključiti da su u cijeli spektar prekursora uključeni: amorfni kalcijev fosfat, oktakalcijev fosfat, razni kompleksi koji sadrže kalcij, fosfat, proteine i druge biogene vrste. Rezultati izloženi u ovom pregledu ukazuju na to da je oktakalcijev fosfat koji prolazi kroz faze hidrolitičke transformacije valjani kandidat za ulogu tranzijentnog prekursora u stvaranju patološkog biominerala. Sastav PCD-a odgovara bioapatitu, koji ima visok stupanj supstitucije mikro i makro komponenata i visoku topljivost koja nadmašuje termodinamičku topljivost hidroksiapatita.

ZAHVALA

Ovaj revijalni prikaz proizlazi iz istraživanja izvršenih pri ADA Health Foundation (ADAHF) koja su djelomično pokrivena iz US Public Health Service Istraživačkog granta HL 30035 i DE 10851, naznačenih ADAHF-u od National Institute of Health (NIH), za dio zubnog istraživačkog programa izvođenog pri National Institute of Standards and Technology (NIST) u suradnji sa ADAHF (Zdravstvenom fondacijom Američkog zubarskog udruženja).

Popis kratica i simbola

List of abbreviations and symbols

- AAS– atomska apsorpcijska spektroskopija
– atomic absorption spectroscopy
- BP – goveđe osrčje
– bovine pericardium
- BPB– zalistak od goveđeg osrčja
– bovine pericardium bioprosthetic
- CD – kardiovaskularne naslage
– cardiovascular deposit
- CPP– dijagram kemijskih potencijala
– chemical potential plot
- DCPDD – dikalcijev fosfat dihidrat
– dicalcium phosphate dihydrate
- EDS– energijsko-disperzijska rengenska mikroanaliza
– energy dispersive x-ray microanalysis
- FTIR spectroscopy – Infracrvena spektroskopija s Fourierovom transformacijom
– Fourier transform infrared spectroscopy
- HAP– hidroksiapatit
– hydroxyapatite

- IAP – produkt ionskih aktiviteta
– ionic activity product
- OCP – oktakalcijev fosfat
– octacalcium phosphate
- PCD – patološke kardiovaskularne naslage
– pathological cardiovascular deposits
- PV – svinjski (srčani) zalisci
– porcine valve
- PVB – svinjski srčani zalistak
– porcine valve bioprosthetic
- SEM – pretražna elektronska mikroskopija
– scanning electron microscopy
- TAH – umjetno srce
– total artificial heart
- TGA – termogravimetrijska analiza
– thermogravimetric analysis
- XRD – rengenska difrakcijska analiza
– x-ray diffraction analysis
- a – površinska gustoća, mg cm^{-2}
– surface density
- c – koncentracija, mol L^{-1}
– amount concentration
- n – indeks loma
– refraction index
- r – molarni omjer
– molar ratio
- λ – količinski udjel
– amount fraction
- γ – masena koncentracija, g L^{-1}
– mass concentration
- σ – standardna devijacija
– standard deviation
- φ – volumni udjel
– volume fraction
- w – maseni udjel
– mass fraction

Literatura

References

1. A. Fleckenstein, M. Frey, F. Thimm, G. Fleckenstein-Grün, *Cardiovascular Drugs and Therapy* **4** (1990) 1005.
2. C. S. Passik, D. M. Ackermann, J. R. Pluth, M. D. Edwards, *Mayo Clin. Proc.* **62** (1987) 119.
3. F. J. Schoen, J. Fernandez, L. Gonzales-Lavin, A. Cernianu, *Circulation* **76** (1987) 618.
4. F. J. Schoen, *J. Biomed Mat Res: Applied Biomaterials* **21** (1987) 91.
5. W. S. Pierce, J. H. Donachy, G. Rosenberg, *Science*, **208** (1980) 601.
6. B. B. Tomazic, W. E. Brown, L. A. Queral, M. Sadovnik, *Atherosclerosis* **69** (1988) 5.
7. M. R. Urist, "Biologic initiators of calcification" Zipkin I (ed) *Biological Mineralization*, John Wiley & Sons, New York, 1973, pp. 757–805.
8. J. Ennever, J. J. Vogel, L. J. Riggan, *Atherosclerosis* **35** (1980) 209.
9. E. Dmitrovsky, A. L. Boskey, *Calc. Tiss. Int.* **37** (1985) 121.
10. S. Sarig, D. Hirsch, R. Azoury, T. A. Weiss, I. Katz, H. S. Kruth, *Cells and Materials* **2** (1992) 339.

11. A. L. Boskey, *Clin. Orthoped.* **157** (1981) 225.
12. D. Hirsch, R. Azoury, S. Sarig, *J. Crystal Growth* **104** (1990) 759.
13. B. B. Tomazic, C. Siew, W. E. Brown *Cells and Materials* **1** (1991) 231.
14. H. C. McGill Jr, *Lab. Invest.* **19** (1968) 465.
15. B. B. Tomazic, W. E. Edwards, F. J. Schoen, *Ann. Thorac. Surgery* **60 S** (1995) 322.
16. B. B. Tomazic, W. E. Brown, F. J. Schoen, *J. Biomed. Mater. Res.* **94** (1994) 35.
17. J. P. Termine, E. D. Eanes, D. J. Greenfield, M. U. Nylen, R. A. Harper, *Calcif. Tiss. Res.* **12** (1973) 73.
18. S. Weiner, P. A. Price, *Calcif. Tiss. Int.* **39** (1986) 365.
19. B. B. Tomazic, W. E. Brown, E. D. Eanes, *J. Biomed. Mat. Res.* **27** (1993) 217.
20. Standard Methods for Examination of Water and Wastewater, 15th ed, T. M. Greenberg, J. J. Connors, D. Jenkin, MASH Franson (eds) Prepared and published jointly by American Public Health Association, American Water Works Association, Water Pollution Federation, Washington, DC, (1981) pp. 415.
21. A. Gee, V. R. J. Dietz, *J. Am. Chem. Soc.* **77** (1955) 2961.
22. E. J. Conway, "Microdiffusion Analysis and Volumetric Error", C. Lockwood, London, (1962) pp 201–207.
23. G. L. Vogel, C. M. Carey, L. C. Chow, W. E. Brown, *J. Dent. Res.* **66** (1987) 1691.
24. Powder Diffraction File (1986) Swarthmore, PA 19801 USA: International Center for Diffraction Data, Card No 9–432 (HAP), No 46–1056 (OCP), No 9–169 (β -TCP), No 11–293 (DCPD), No 212–145 (Dahlite) and No 19–272 (Carbonate apatite)
25. R. L. Miklebus, S. E. Fiori, K. F. J. Heinrich, "FRAME C: a compact procedure for quantitative energy-dispersive electron probe X-ray analysis", National Bureau of Standards Technical Note 1106, U.S. government Printing Office, Washington, DC, 1979.
26. F. J. Bloss, *An Introduction to the Methods of Optical Crystallography*, Holt, Rinehart and Winston, Inc, Philadelphia, 1961.
27. J. MacGregor, W. E. Brown, *Nature* **205** (1965) 359.
28. H. McDowell, T. M. Gregory, W. E. Brown, *J. Res. Natl. Bur. Stand.* **81 A** (1977) 273.
29. L. N. Plummer, E. Busenberg, *Geochim. Cosmochim. Acta*, **46** (1982) 1011.
30. J. Daculsi, J. Pouzérat, L. Peru, Y. Maugars, T. Z. LeGeros, "Ectopic calcifications", u: E. Bonucci (ed) *Calcification in Biological Systems*, CRC Press, Boca Raton, 1992, chap. 15.
31. G. Kuhl, W. H. Nebergall, *Z. Anorg. Allg. Chem.* **324** (1963) 313.
32. F. J. Wall, *Statistical Data Analysis Handbook*, McGraw Hill Company, New York, **206** (1968) 403.
33. M. Mathew, W. E. Brown, L. Schroeder, B. Dickens, *J. Crystal Spectr. Res.* **18** (1988) 235.
34. B. B. Tomazic, M. S. Tung, T. M. Gregory, W. E. Brown, *Scanning Microsc.* **3** (1989) 117.
35. R. Zapanta-LeGeros, *Nature* **206** (1965) 403.
36. R. Z. LeGeros, Ph. D. Thesis, New York University, 1967.
37. J. C. Elliot, *Clin. Orthoped.* **953** (1973) 313.
38. B. O. Fowler, E. C. Moreno, W. E. Brown, *Arch. Oral. Biol.* **20** (1966) 477.
39. K. Schmidt, W. O. McSharry, C. H. Pamijer, J. P. Binette *Atherosclerosis* **37** (1980) 199.
40. C. Palache, H. Berman, C. Frondel, *Dana's System of Mineralogy*, vol. II, 7th ed. John Willey & Sons, New York, 1944.
41. W. E. Brown, L. P. Smith, J. R. Lehr, A. W. Frazier, *Nature*, **196** (1962) 1048.
42. J. R. Lehr, W. E. Brown, A. W. Frazier, J. P. Smith, R. D. Trasher, "Crystallographic Properties of Fertilizer Compounds", *Chemical Engineering Bulletin* No. 6, Tennessee Valey Authority, 1967 pp. 76.
43. H. S. Washington, *The American Mineralogist*, **14** (1929) 369.
44. G. H. Nancollas, M. B. Tomson, *Science* **200** (1978) 1059.
45. B. B. Tomazic, E. S. Etz, W. E. Brown, *Scanning Microsc.* **1** (1987) 95.
46. M. Tung, N. Eidelman, B. Sieck, W. E. Brown, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **93** (1988) 613.
47. T. M. Gregory, E. C. Moreno, J. M. Patel, W. E. Brown, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* 78A (Phys and Chem) **6** (1974) 667.
48. T. M. Gregory, E. C. Moreno, W. E. Brown, *J. Res. Nat. Bur. Stand.* **74 A** (1974) (Phys and Chem) 461.
49. B. B. Tomazic, Y. Mayer, W. E. Brown, *J. Cryst. Growth* **108** (1991) 670.
50. J. Kapolos, D. Mavrilas, Y. Missirlis, P. G. Koutsoukos, *J. Biomed. Mater. Res.* **38** (1997) 183.
51. D. Mavrilas, A. Apostolaki, J. Kapolos, P. G. Koutsoukos, M. Melachrinou, V. Zolota, D. Dougenis, *J. Cryst. Growth* **205** (1999) 554.
52. K. M. Kim, B. F. Trump, *Calc. Tiss. Res.* **18** (1975) 155.
53. R. E. Wuthier, S. Biaz, R. G. G. Russell, H. Fleisch, *Calcif. Tiss. Res.* **10** (1972) 198.
54. F. J. Schoen, H. Harasaki, K. M. Kim, H. C. Anderson, R. J. Levy, *J. Biomed. Mater. Res.* **22** (1988) 11.
55. W. E. Brown, L. C. Chow, C. Siew, S. Gruninger, "Acidic calcium phosphate precursors in formation of enamel mineral", u: Fearnehead RW, Suga S (ur.) *Tooth Enamel IV*, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1984, pp. 8–13.
56. J. I. Meyer, E. D. Eanes, *Calc. Tiss. Res.* **25** (1978) 39.
57. *A Textbook on EDTA Chelation Therapy*, E. M. Cranton (ur.), A Special Issue of the *Journal of Advancement in Medicine*, JAME E7 **2**(1/2) 1989, 1.
58. N. Eidelman, L. C. Chow, W. E. Brown, *Calc. Tiss. Int.* **41** (1987) 18.
59. M. Markovic, B. O. Fowler, W. E. Brown, *Chem. Mater.* **5** (1993) 1401.
60. W. E. Brown, N. Eidelman, B. B. Tomazic, *Adv. Dent. Res.* **1** (1987) 306.
61. K. M. Kim, "Patological calcification", u: Arstrilla AU, Trump BF (ur.) *Pathology of Cell Membranes*, vol, III, Academic Press, New York, 1983, pp. 117–155.
62. D. E. Eanes, "Dynamics of calcium phosphate precipitation", u: E. Bonucci (ur.) *Calcification in Biological Systems*, CRC Press, Boca Raton, chap 1, 1992.
63. J. Höhling, R. W. Fearnehead, G. Loter, *Ger. Med. Mon.* **13** (1968) 135.
64. G. Colomb, M. Dixon, M. S. Smith, F. J. Schoen, R. J. Levy, *J. Pharm. Sci.* **76** (1987) 271.
65. M. S. Tung, W. E. Tomazic, B. B. Brown, *Arch. Oral. Biol.* **37** (1992) 585.
66. R. J. Levy, F. J. Schoen, W. B. Flowers, S. T. Staelin, *J. Biomed. Mat. Res.* **23** (1991) 905.
67. B. B. Tomazic, "Characterization of Mineral Phases in Cardiovascular Calcification", u: P. W. Brown, Constantz (ur.) *Hydroxyapatite and Related Materials*, CRC Press Boca Raton, 1994, pp. 93–115.
68. B. B. Tomazic, L. C. Chow, C. M. Carey, A. J. Shapiro, *J. Pharm. Sci.* **86** (1997) 1432.
69. S. S. Srivatsa, P. J. Harrity, B. P. Maercklein, L. Kleppe, W. D. Edwards, C. M. Johnson, L. A. Fitzpatrick, *J. Clin. Invest.* **99** (1997) 996.
70. B. B. Tomazic, *Z. Kardiol.* **90** (2001) Suppl 3, III/68-III/80.

SUMMARY

Physicochemical Principles of Cardiovascular Calcification*B. B. Tomažič*

Objectives. The objectives of this review article are to provide detailed physicochemical information on the nature of pathological cardiovascular deposits, PCD, isolated from different sites of human cardiovascular system. In order to help to understand the complex mechanism of the formation of PCD, special emphasis is focused on the attempt to recognize early precursor(s) of PCD by utilizing combined *in vitro* and *in vivo* studies.

Background. The common idea is that PCD is hidroxyapatite (HAP), $\text{Ca}_5(\text{PO}_4)_3\text{OH}$; however, this is questionable and deserves critical evaluation.

Methods. After isolation of PCD, deproteination followed, producing pure inorganic fraction of deposits that were subject to chemical analyses, x-ray diffraction (XRD), FT-IR spectroscopy, optical, scanning electron microscopy (SEM), polarizing microscopy, energy dispersive x-ray micro-analyses (EDS) and thermodynamic solubility measurements. The same methods were used to characterize the *in vitro* and *in vivo* formed calcific deposits.

Results. The results of chemical analyses provided essential information that PCD contained significant organic fraction; inorganic fraction appears to be bioapatite, corresponding to defect HAP with substantial macroincorporation of sodium, magnesium, carbonate and fluoride. Structural XRD data show apatitic pattern; however, variable crystallinity of OCD suggests that crystallization is a time and flow-dynamics dependent process. Critical thermodynamic solubility measurements unequivocally prove that PCVD are significantly more soluble than HAP.

Conclusions. The PCDs are morphologically and chemically heterogeneous products which can be a consequence of time-dependent hydrolytic transformation of precursors that may include amorphous calcium phosphate and octacalcium phosphate (OCP), $\text{Ca}_4\text{H}(\text{PO}_4)_3$.

4630 Learned Sage, Ellicott City, MD 21042, USA

Received September 5, 2003

Accepted January 16, 2004