

Исследование органоминеральной структуры костных имплантатов методом комбинационного рассеяния

Е.В.Тимченко, П.Е.Тимченко, Л.Т.Волова, Ю.В.Пономарева, Л.А.Таскина

Представлены результаты экспериментальных исследований образцов донорской костной ткани крысы, кролика и человека с различной степенью минерализации, выполненных с помощью метода комбинационного рассеяния (КР). Получены спектры КР для полос комбинационного рассеяния $950-962\text{ см}^{-1}$ (PO_4)³⁻, $1065-1070\text{ см}^{-1}$ (CO_3)²⁻ и 1665 см^{-1} (амид I). В деминерализованной костной ткани наблюдается резкий (до 98%) спад интенсивностей пиков $950-962$ и $1065-1070\text{ см}^{-1}$, который сопровождается появлением полосы $1079-1090\text{ см}^{-1}$, соответствующей гидратированному состоянию CO_3^{2-} .

Ключевые слова: комбинационное рассеяние, имплантат, деминерализация, спектр.

1. Введение

Рост потребности в костных имплантатах, наблюдаемый во всем мире, обусловлен высокими показателями травматических переломов [1]. Изначально способная к регенерации костная ткань теряет свои свойства в ходе нарушения метаболизма и минерализации костной матрицы, что со временем приводит к необходимости внедрения костных имплантатов [2]. При этом возникает ряд проблем, связанных с введением биоматериалов непосредственно в организм: нарушение гомеостаза, возможность отторжения имплантата, его плохая интеграция.

Особое значение в успешном решении этих проблем имеют физические методы контроля материала для изготовления имплантатов. Широко используемые в настоящее время методы, такие как FTIR спектроскопия, позволяют регистрировать минеральную составляющую костной ткани, однако не дают возможности различать виды минералов, из которых состоит кристаллическая решётка исследуемого минерала [3].

Костные имплантаты должны заполнять костный дефект, не вызывая иммунологического отторжения, обладать биологической активностью, стерильностью и способностью к биодеградации – постепенному замещению дефекта костной тканью [4]. Известной методикой является получение костного биоматериала для трансплантации путём деминерализации костной ткани (она увеличивает её регенеративные функции до 90% [5]), в которой к концу процесса сохраняется менее 5% кальцифицированной субстанции [4]. Авторы статьи [6] отметили наличие

остеоиндуктивной активности полностью и частично деминерализованного костного биоматериала, причём большая активность наблюдалась в последнем случае. Неполнота деминерализации объясняется прочной связью остеоиндуктора (органическая составляющая), отвечающего за остеогенез, с минеральной составляющей костной ткани [7]. Получение информации о минеральной составляющей имеет особое значение для клеточных культур, таких как остеобласты [8].

Биоминерализация исследовалась методом Шеррера по угловому изменению интенсивности дифрагировавшего рентгеновского излучения [9, 10]. В работах [11, 12] для определения состава минерального компонента костного материала предложено использовать методы спектроскопии комбинационного рассеяния (КР). С целью увеличения регенеративных функций костной ткани требуется сохранить в процессе деминерализации определенное количество белков, необходимых для костеобразования [13]. Однако в процессе деминерализации происходит уменьшение плотности и прочности имплантата, требования к которым обусловлены его типом и областью применения, вследствие чего возникает задача контроля уровня остаточной минерализации имплантата.

Метод спектроскопии КР предлагается использовать для оценки соотношения минеральной и органической составляющих костной ткани в зависимости от времени деминерализации в условиях работы лабораторий трансплантологии, в биотехнологических клеточных и тканевых производствах, в экспериментальной медицине. Целью настоящей работы являлось определение соотношения минеральной и органической составляющих донорского костного биоматериала в процессе изготовления костных имплантатов на основе анализа спектров КР.

2. Материалы и методы исследований

2.1. Объекты исследований

В качестве объектов исследования были использованы образцы костной ткани крысы и кролика с разной степенью минерализации, а также трёхмерный биопластиче-

Е.В.Тимченко, П.Е.Тимченко, Л.А.Таскина. Самарский государственный аэрокосмический университет им. акад. С.П.Королева (национальный исследовательский университет), Россия, 443086 Самара, ул. Московское шоссе, 34; e-mail: Vorobjeva.82@mail.ru, Timpavel@mail.ru, retuo@mail.ru, zakharov@ssau.ru
Л.Т.Волова, Ю.В.Пономарева. Институт экспериментальной медицины и биотехнологий СамГМУ, Россия, 443079 Самара, ул. Гагарина, 20; e-mail: csrl.sam@mail.ru

Поступила в редакцию 9 апреля 2014 г., после доработки – 15 июня 2014 г.

ский материал – деминерализованная спонгиозная крошка серии «Лиопласт»® (ТУ-9398-001-01963143-2004), который представляет собой природный мелкопористый биопластический материал и состоит из компонентов только губчатой формации аллогенной костной ткани человека. Первым этапом в технологическом процессе производства таких биоимплантатов является обезжиривание и полное удаление из межбалочных пространств кости всех элементов костного мозга и крови путем кратковременной низкочастотной ультразвуковой обработки (24–40 кГц в течение двух-трех минут).

Затем для получения деминерализованного биоматериала костную ткань помещают в раствор HCl 1.2 нормальности на время, которое зависит от места вырезки костного биоматериала и возраста донора. Следующим этапом является лиофилизация образца на установке ALPHA 2-4 LSC. Костный материал кролика также обрабатывался по данной технологии. Недеминерализованные образцы получали исключением из процесса подготовки этапа деминерализации в растворе соляной кислоты.

2.2. Экспериментальный стенд

Спектральные характеристики образцов изучались на экспериментальном стенде (рис.1), включающем в себя цифровой спектрометр высокого разрешения Shamrock sr-303i со встроенной охлаждаемой камерой ANDOR DV420A-OE, волоконно-оптический зонд для спектроскопии КР RPB785, совмещённый с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 (регулируемая мощность до 500 мВт, длина волны 785 нм). Эта длина волны хорошо себя зарекомендовала среди длин волн видимого диапазона в спектроскопии КР в биологических применениях благодаря низкому уровню автофлуоресценции. Мощность излучения 500 мВт используемого лазера в пределах времени экспозиции до 50 с не вызывает деструктивных изменений образцов.

Зонд КР 1 фокусирует лазерное излучение на объекте 2 на расстоянии 7.5 мм от выходного окна (диаметр фокусного пятна 0.2 мм) и собирает как излучение автофлуоресценции, так рассеянное излучение. Встроенный широкополосный фильтр зонда 1 предназначен для выделения излучения в спектральном диапазоне 790–1200 нм, которое затем направляется по световоду на спектрометр 3 со встроенной камерой 4. Для снижения уровня шумов

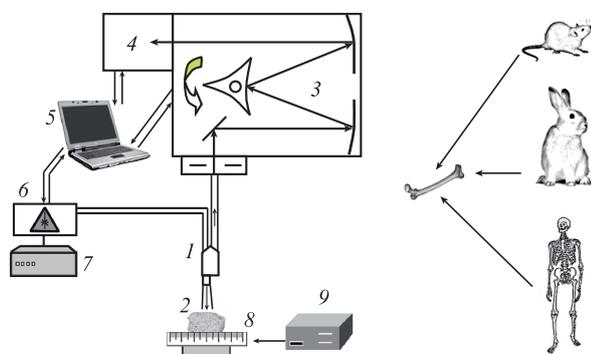


Рис.1. Экспериментальный стенд: 1 – зонд КР; 2 – объект; 3 – спектрометр; 4 – цифровая камера; 5 – компьютер; 6 – лазерный модуль; 7 – источник питания лазерного модуля; 8 – транспортёр с шаговым двигателем; 9 – блок управления транспортёром.

камера 4 охлаждается до -60°C , обеспечивая спектральное разрешение 0.15 нм ($\sim 1\text{ см}^{-1}$). Транспортёр 8 с шаговым двигателем позволяет пространственно сканировать образец.

Выделение спектра КР на фоне автофлуоресценции производилось методом полиномиальной аппроксимации [14, 15] регистрируемых спектров.

3. Результаты исследований

На рис.2 показаны характерные спектры разных типов донорских костных тканей (крысы, кролика и человека). Зарегистрированные полосы КР соответствуют модам колебаний [16, 17], представленным в табл.1. Видно, что данные линии КР присутствуют во всех типах образцов тканей. Наиболее существенное различие проявляется в полосах 855 и 876 см^{-1} пролина и гидроксипролина, входящих в состав коллагена и имеющих наибольшее значение в случае образцов костной ткани человека.

Особенности спектров КР образцов костной ткани человека при развитии коксартроза, приводящего к уменьшению относительного содержания карбонат-ионов В-типа в структуре гидроксиапатита, исследованы в [16]. Следуя данной работе, степень деминерализации определяем соотношением интенсивностей полос КР PO_4^{3-} и амида I. Тогда для количественного определения степени вымывания органических компонентов в процессе деминерализации можно ввести отношение минерал/органический матрикс, которое представляет собой отношение интен-

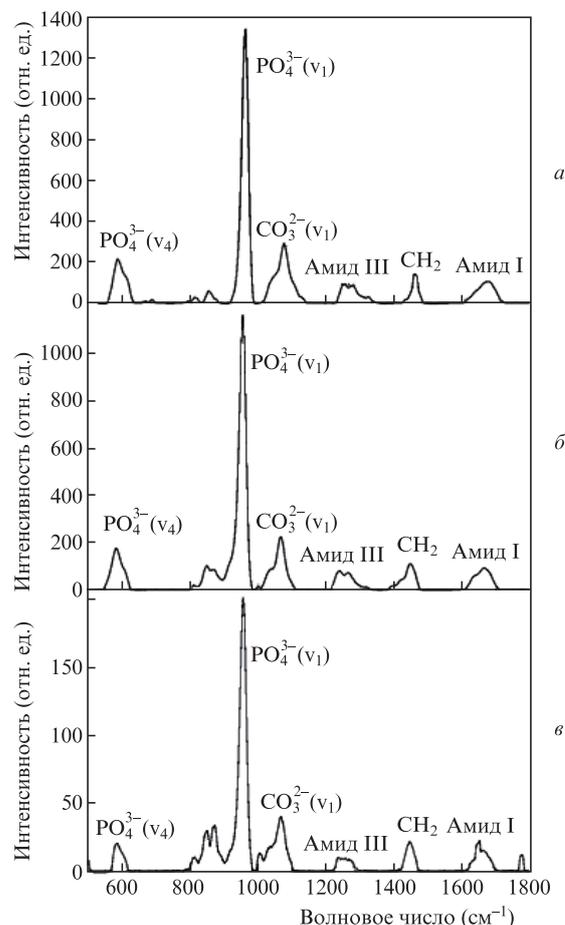


Рис.2. Спектры КР образцов недеминерализованной костной ткани крысы (а), кролика (б) и человека (в).

Табл.1. Полосы КР для костной ткани [16].

Волновое число (см ⁻¹)	Фрагмент, колебание
580	PO ₄ ³⁻ (ν ₄) (P–O, деформационное)
855	Бензольное кольцо пролина
876	Бензольное кольцо гидроксипролина
950–962	PO ₄ ³⁻ (ν ₁) (P–O, симметричное валентное)
1001–1003	«Дыхательная» мода бензольного кольца фенилаланина
1030	PO ₄ ³⁻ (ν ₃) (P–O, асимметричное валентное)
1045	PO ₄ ³⁻ (ν ₃) (P–O, асимметричное валентное)
1065–1070	CO ₃ ²⁻ (ν ₁) замещение В-типа (C–O плоскостное валентное)
1245–1270	Амид III (C–N–H, валентное)
1445	CH ₂ (деформационное крутильное)
1610–1620	γ8a (колебания боковой цепочки тирозина)
1665	Амид I (C–N–H, валентное)

сивностей пиков в области 950–962 см⁻¹ (колебание PO₄³⁻) и в области 1665 см⁻¹ (полоса поглощения амида I):

$$M = I_{\text{PO}_4^{3-}}/I_{\text{амид I}}. \quad (1)$$

А отношение интенсивностей пиков в областях 1065–1070 и 950–962 см⁻¹ (отношение карбонат/фосфат) может использоваться для выявления донорского материала с артрозом:

$$K = I_{\text{CO}_3^{2-}}/I_{\text{PO}_4^{3-}}. \quad (2)$$

Предварительно была определена чувствительность методики к высоте расположения зонда над объектом исследования и к времени воздействия на него лазерного источника. Выявлено, что при длительном воздействии (до 80 мин) наблюдается рост интенсивности на 6%–8% с выходом на насыщение при сохранении формы спектральной кривой, что, по-видимому, обусловлено изменением интенсивности флуоресценции при нагреве. Максимальная интегральная интенсивность регистрируемого спектрометром излучения наблюдается на высоте 7 мм. Однако изменение расстояния от зонда до объекта в интервале 6–8 мм мало сказывалось на значениях коэффициентов M и K – погрешность их измерения не превышала 3%.

Относительная концентрация органических веществ деминерализованного костного материала может быть оценена по интенсивности следующих полос: полосы поглощения амида III (1245–1270 см⁻¹), полосы деформационного крутильного колебания CH₂ (1445 см⁻¹) и области 1610 см⁻¹, соответствующей колебанию побочной цепочки тирозина [16].

На рис.3,а показаны спектры КР образцов костной ткани, взятых из различных участков (для сопоставимости недеминерализованный образец также подвергался обезжириванию и сушке).

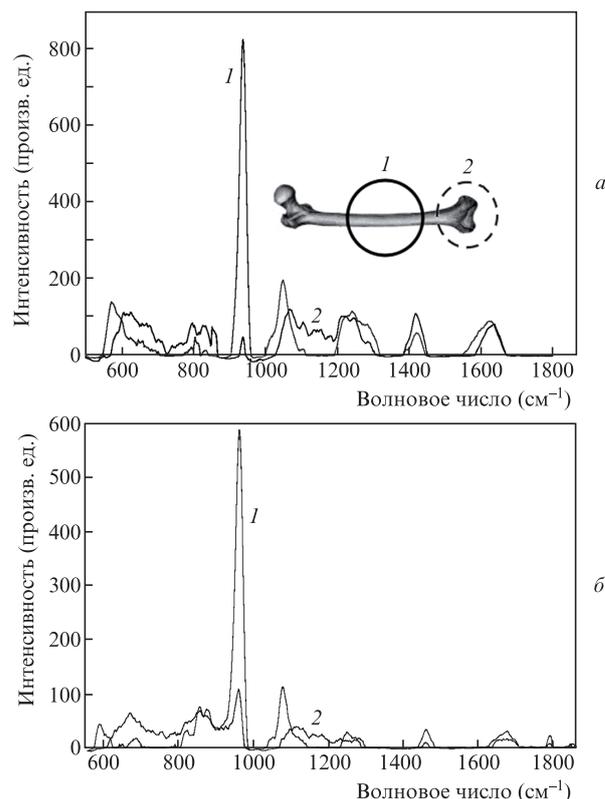


Рис.3. Спектры КР для недеминерализованного (а) и нативного (б) образцов бедренной кости; 1 – центральная часть, 2 – участок с хрящевой пластиной.

Для участка с хрящевой тканью по сравнению с центральной частью бедренной кости (рис.3,а) наблюдается уменьшение интенсивности полосы 956 см⁻¹ при значительном возрастании интенсивности пиков, отвечающих колебанию бензольного кольца пролина 855 см⁻¹, гидроксипролина 876 см⁻¹ и колебанию CH₂. На рис.3,б представлены спектры КР нативного (с элементами мышечной ткани и крови) костного биоматериала донора (крысы). При наличии скоплений кровеносных клеток на поверхности костной ткани проявляются дополнительные пики в областях 600–850 и 1080–1200 см⁻¹.

Помимо качества обработки имплантатов донорского материала существенным является различие в значениях M для разных доноров (табл.2) (усреднено по пяти образцам и пяти точкам).

Как видно из табл.2, значения M для человека и кролика максимальны и составляют для выбранных образцов 10.9–10.8. Из-за сложности извлечения губчатой фракции из кости у крысы в экспериментах использовалась вся бедренная кость, для которой отношение M на 10% меньше, чем у недеминерализованной костной ткани человека. В то же время при тех же временах экспозиции в деминерализующем растворе значение M для бедренной кости крысы было выше (0.89), чем у губчатой фрак-

Табл.2. Отношение минерал/органический матрикс для образцов костной ткани разных доноров.

Состояние ткани	Образец		
	Губчатая фракция бедренной кости человека	Губчатая фракция бедренной кости кролика	Бедренная кость крысы
Недемнерализованная	10.9 ± 0.2	10.9 ± 0.2	9.1 ± 0.2
Демнерализованная	0.54 ± 0.02	0.63 ± 0.02	0.89 ± 0.02

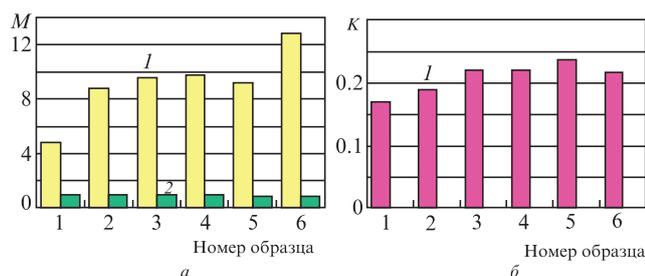


Рис.4. Гистограммы отношений минерал/органический матрикс (*a*) и карбонат/фосфат (*b*) образцов бедренной кости шести особей крысы – недеминерализованная ткань (1) и деминерализованная ткань (2).

ции бедренной кости человека и кролика (0.54–0.63). Это обусловлено большей плотностью и меньшей пористостью костного биоматериала крысы и должно учитываться при деминерализации.

Для донорского материала характерен разброс параметров, что может быть обусловлено как индивидуальными особенностями организмов и возрастом доноров, так и различными заболеваниями. Для оценки естественного разброса параметров ткани доноров были измерены отношения *M* и *K* для костной ткани (бедренные кости), взятой у шести крыс одной группы, но извлечённой в разные дни в течение месяца (рис.4).

Для данной выборки естественный разброс отношения *M* составил 65% для недеминерализованных образцов и 20% – для деминерализованных, а разброс отношения *K* для недеминерализованных образцов был равен 35%, что на порядок выше погрешности их определения и обусловлен пространственной неоднородностью минеральной плотности кости. При выборе режимов деминерализации необходимо учитывать естественные флуктуации первичного донорского материала, в противном случае разброс в параметрах готовых имплантатов достигает 20% (рис.4). Для каждого донора длительность деминерализации будет отличаться от индивидуально подбираемой длительности выдержки в кислоте (в зависимости от начальных параметров материала).

На рис.5 представлены спектры КР исследуемых образцов недеминерализованной и деминерализованной губчатой фракции бедренной кости кролика. Для всех трёх образцов наиболее информативными полосами являются 956 см^{-1} ($\text{PO}_4^{3-}(\nu_1)$) и $1065\text{--}1070\text{ см}^{-1}$ ($\text{CO}_3^{2-}(\nu_1)$). В

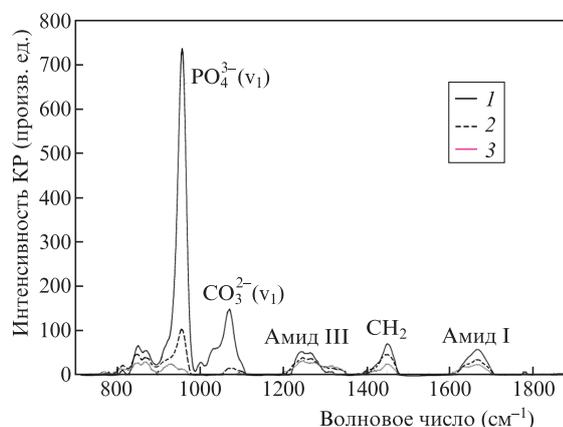


Рис.5. Сравнение КР-спектров образцов костной ткани – недеминерализованного образца (1), образца с деминерализацией в течение 5 мин (2) и образца с деминерализацией в течение 20 мин (3).

деминерализованной губчатой костной ткани наблюдается резкое уменьшение интенсивности пика на 956 см^{-1} – на 86% при пятиминутной и на 98% при двадцатиминутной длительности деминерализации. Аналогичное уменьшение наблюдается в полосе $1065\text{--}1070\text{ см}^{-1}$ с появлением полосы $1079\text{--}1090\text{ см}^{-1}$, соответствующей гидратированному состоянию CO_3^{2-} [18]. В ходе анализа спектров было зафиксировано уменьшение с временем деминерализации интенсивности полосы, отвечающей за «дыхательную» моду бензольного кольца фенилаланина ($1003\text{--}1005\text{ см}^{-1}$).

4. Заключение

Получены спектры КР костного биоматериала с разной степенью деминерализации трёх типов доноров – крысы, кролика и человека. Показано, что процесс деминерализации может количественно контролироваться с использованием введенных отношений интенсивности спектральных пиков КР, пропорциональных отношениям минерал/органический матрикс и карбонат/фосфат. Так, при пятиминутной деминерализации спонгиозы в растворе соляной кислоты 1.2 нормальности отношение минерал/органический матрикс уменьшается на 86%, а при двадцатиминутной – на 98%.

Для каждого донора необходимо индивидуально подбирать длительность деминерализации. Следовательно, метод оптической аттестации имплантатов по спектральным отношениями *K* и *M* может обеспечить существенное уменьшение разброса их выходных параметров, а значит, улучшение потребительских качеств имплантатов в результате индивидуализации длительности процесса их обработки.

1. Гринь В.К., Попандоупо А.Г., Штутин А.А., Гнилорыбов А.М., Миминошвили О.И., Фисталь Э.Я., Михайличенко В.Ю. *Вестник неотложной и восстановительной медицины*, **13** (1), 3 (2012).
2. Mobini S., Solati-Hashjin M. *J. Med. Biolog. Eng.*, **33** (2), 207 (2011).
3. West P.A., Torzilli P.A., Chen C., Lin P., Camacho N.P. *J. Biomed. Opt.*, **10** (1), 014015 (2005).
4. Кирилова И.А. *Хирургия позвоночника*, **3**, 105 (2004).
5. Urist M.R., Iwata H.J. *Theor. Biol.*, **38**, 155 (1973).
6. Савельев В.И., Хлебович Н.В. В сб. *Научных трудов С.-Петербургского политехнического ун-та* (СПб., 1993, с. 125).
7. Слущкий Л.И., Севастьянова Н.А. *Ортопедия и травматология*, **8**, 82 (1986).
8. Захаров В.П., Белоконев В.И., Братченко И.А., Тимченко П.Е., Пономарева Ю.В., Вавилов А.В., Волова Л.Т. *Квантовая электроника*, **41** (4), 318 (2011).
9. Bonewald L.F., Harris S.E., Rosser J., Dallas M.R., Dallas S.L., Camacho N.P., Boyan B., Boskey A. *Calcif. Tiss. Int.*, **72**, 537 (2003).
10. Stanford C.M., Jacobson P.A., Eanes E.D., Lembke L.A., Midura R.J. *J. Biol. Chem.*, **270** (16), 9420 (1995).
11. Otto C., de Grauw C.J., Duindam J.J., et al. *J. Raman. Spectr.*, **28** (2–3), 143 (1998).
12. Tarnowski C.P., Igelzi M.A., Morris M.D. *J. Bone Mineral Res.*, **17**, 1118 (2002).
13. Zhao J. et al. *Soc. Appl. Spectros.*, **61** (11), 1225 (2007).
14. Захаров В.П., Ларин К.В., Козлов С.В., Морятов А.А., Братченко И.А., Мякинин О.О., Артемьев Д.Н., Христофорова Ю.А. *Физика волновых процессов и радиотехнические системы*, **16** (3), 73 (2013).
15. Тимченко П.Е., Захаров В.П., Волова Л.Т., Болтовская В.В., Тимченко Е.В. *Компьютерная оптика*, **35** (2), 183 (2011).
16. Киселева Д.В. *Ежегодник Тр. ИГГ УрО РАН*, **157**, 332 (2010).
17. Morris M.D., Finney W.F. *IOS Press – Spectros.*, **18**, 155 (2004).
18. Wehrmeister U., Jacob D.E., Soldati A.L., Loges N., Hagerb T., Hofmeister W. *J. Raman Spectros.*, **42**, 926 (2011).