

СОВРЕМЕННЫЙ МЕТОД ЭЛЕМЕНТНОГО АНАЛИЗА МИНЕРАЛИЗОВАННОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ ЭНЕРГОДИСПЕРСИОННОЙ РЕНТГЕНОВСКОЙ СПЕКТРОСКОПИИ

Ю.Ю. Литвинов

ст. науч. сотрудник, отдел специальных работ НИЦ БМТ,
Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений (Москва)
E-mail: vilar.litvinov@mail.ru

Представлены результаты экспериментально апробированного современного метода элементного анализа минерализованной ткани с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Показано уменьшение относительного процентного содержания в ткани определяемых химических элементов, формирующих минеральную фазу кости, и увеличение относительного процентного содержания определяемых химических элементов, формирующих органическую фазу костной ткани.

Ключевые слова: рентгеновская спектроскопия, биоимплантология, остеогенез, деминерализация.

Для цитирования: Литвинов Ю.Ю. Современный метод элементного анализа минерализованной ткани с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(4):13–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-03>

Методы деминерализации костной ткани широко используются в современной биоимплантологии, так как остеоиндуктивные свойства имплантатов находятся в прямой зависимости от степени их деминерализации [1]. Деминерализованные костные имплантаты обладают высокими имплантационными качествами и используются для стимуляции репаративного остеогенеза [2, 3].

В практике получения имплантационных препаратов деминерализация костных имплантатов позволяет улучшить его остеоиндуктивные и остеокондуктивные свойства, способность к резорбции, а также увеличить пористость, объём системы внутрикостных пространств [2], что дает возможность проводить иммобилизацию на естественных поверхностях костного матрикса лекарственными средствами [3]. Получение деминерализованных имплантатов с различными свойствами, в том числе антимикробными, позволит использовать их в реконструктивно-восстановительной хирургии для восстановления соединительной ткани при наличии гнойных ран.

Для оценки степени деминерализации костных имплантатов используют методы микроскопического анализа, в том числе гистоморфометрический метод, оценивающий размеры зон деминерализации в отраженном свете с использованием красителей и производить количественную оценку потери органической фазы [4]. Однако развитие технологий и усовершенствование приборной ба-

зы обусловили необходимость обновления традиционных подходов к контролю и анализу степени деминерализации костной ткани при получении деминерализованных имплантатов.

Цель исследования – элементный анализ образцов костных имплантатов на разных этапах их деминерализации с использованием современного метода энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

В НИЦ БМТ ФГБНУ ВИЛАР разработана методика получения костных имплантатов из диафиза бедренной кости быка, с помощью которой получили имплантаты цилиндрической формы 12,5×5 мм. Для элементного анализа подготовили четыре группы образцов по пять штук в каждой:

- 1) нативные образцы (контрольная группа);
- 2) образцы, после инкубации в соляную кислоту 0,8 моль/дм³ в течение 24 ч (вторая группа);
- 3) образцы, после инкубации в соляную кислоту 0,8 моль/дм³ в течение 48 ч (третья группа);
- 4) образцы, после инкубации в соляную кислоту 0,8 моль/дм³ в течение 72 ч (четвертая группа).

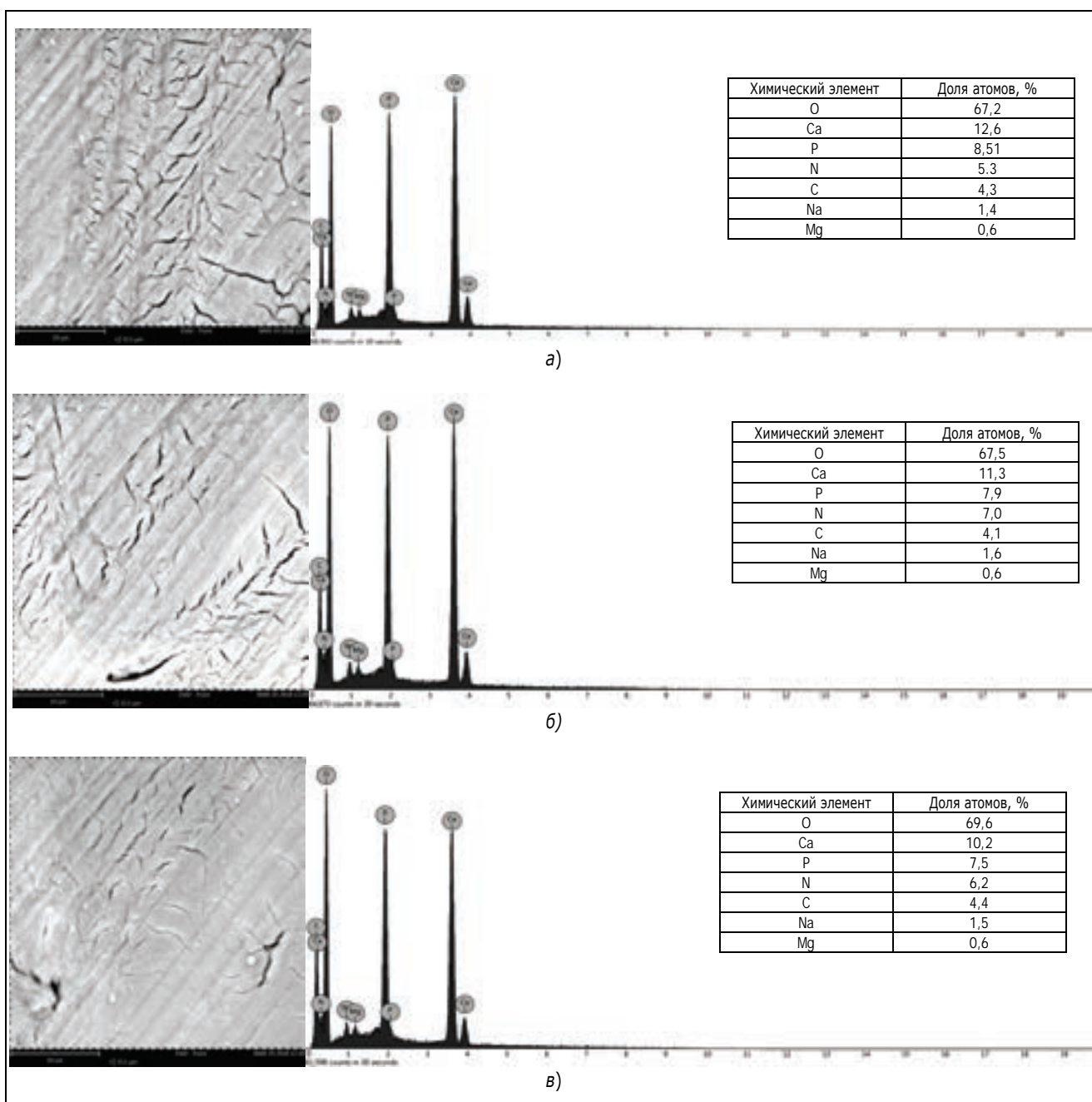
Оценку и контроль степени деминерализации костных имплантатов проводили с использованием сканирующего электронного микроскопа Phenom XL («Phenom-World», Нидерланды), оснащенного детектором для интегрированной энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Элементный анализ проводили в разных зонах костных образцов, расположенных от центра к краю образцов. Площадь зоны анализа определенная детектором энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, составила 0,001 мм². Данные элементного анализа представлены в соотношении количества атомов каждого элемента к общему количеству атомов в процентах с указанием пиков, соответствующих конкретному химическому элементу в зоне проведения анализа.

Элементный анализ первой (контрольной) группы образцов. При анализе нативных (контрольных) образцов № 1–5, с неизменным составом получены данные о содержании основных химических элементов, которые составляют основу органической и минеральной фаз в компактном костном веществе диафиза бедренной кости быка: O, Ca, P, N, C, Na, Mg.

На рис. 1 показаны зоны анализа, равномерно распределенные в направлении от центра к краю образцов.



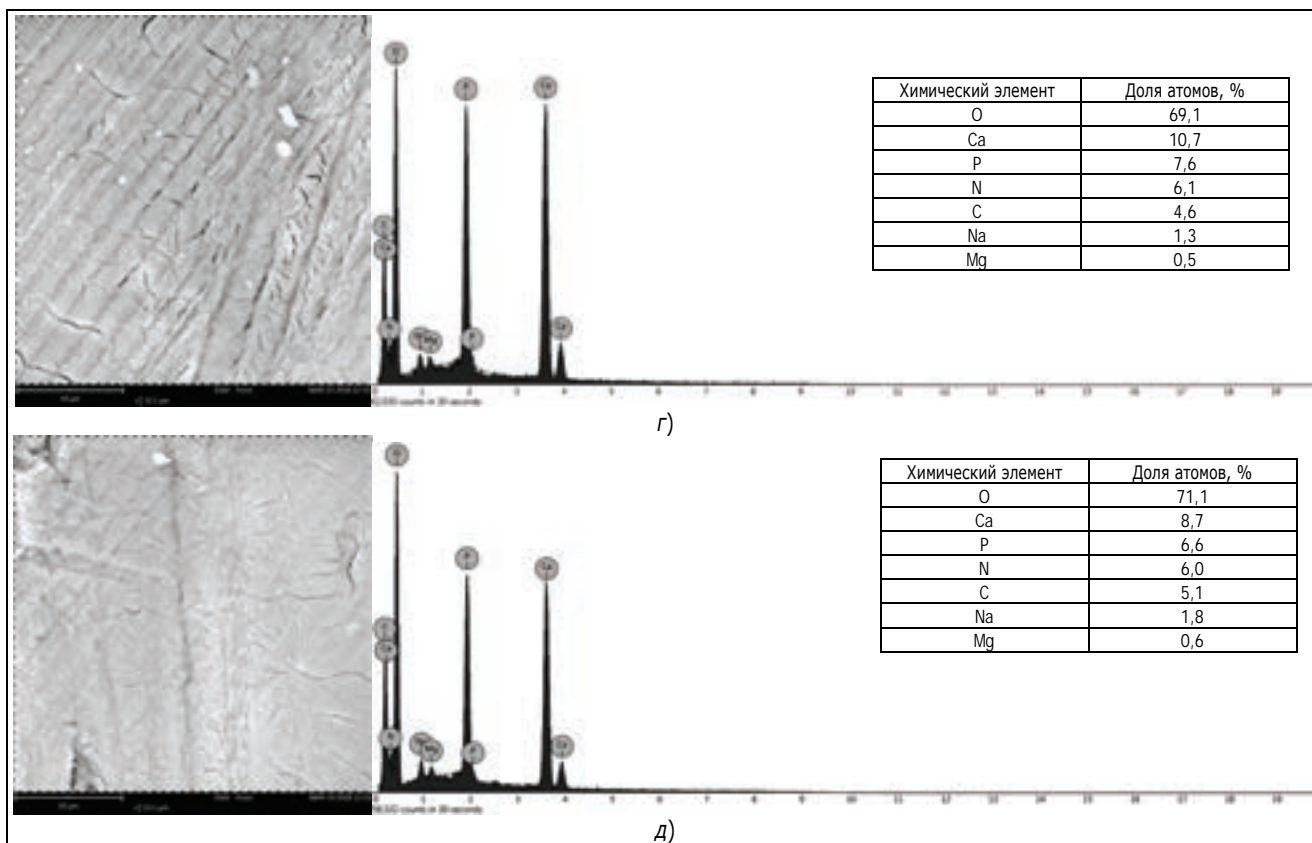


Рис. 1. Зоны анализа образцов первой (контрольной) группы: а – центральная зона образца № 1; б – средняя зона ближе к центру образца № 2; в – средняя зона образца № 3; г – средняя зона ближе к краю образца № 4; д – зона края образца № 5

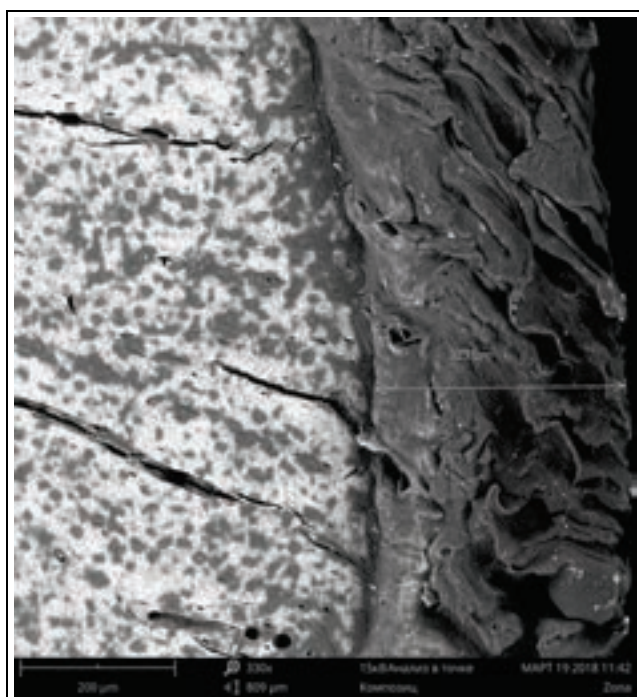


Рис. 2. Зона деминерализации на поперечном срезе образца через 24 ч обработки образца в соляной кислоте 0,8 моль/дм³; ×330

Ниже приведены значения содержания химических элементов в первой группе контрольных образцов № 1–5 в процентном соотношении количества атомов каждого элемента к общему количеству атомов:

O	68,9±0,7
Ca	10,7±0,6
P	7,6±0,3
N	6,1±0,3
C	4,5±0,2
Na	1,6±0,1
Mg	0,6±0,03

Элементный анализ второй группы образцов. Образцы инкубировали в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³ в течение 24 ч, вследствие чего на образцах этой группы образовался ярко выраженный фронт деминерализации. При помощи сканирующего электронного микроскопа Phenom XL получено изображение фронта деминерализации на высушенном при $t = 20\text{ }^{\circ}\text{C}$ образце. Ширина зоны с удаленной минеральной фазой на образце диаметром 4,5 мм через 24 ч деминерализации составила 0,323 мм (рис. 2).

При проведении элементного анализа второй группы образцов анализировали зоны на пяти образцах № 1–5 в точках, распределенных равномерно в направлении от центра к краю образцов (рис. 3).

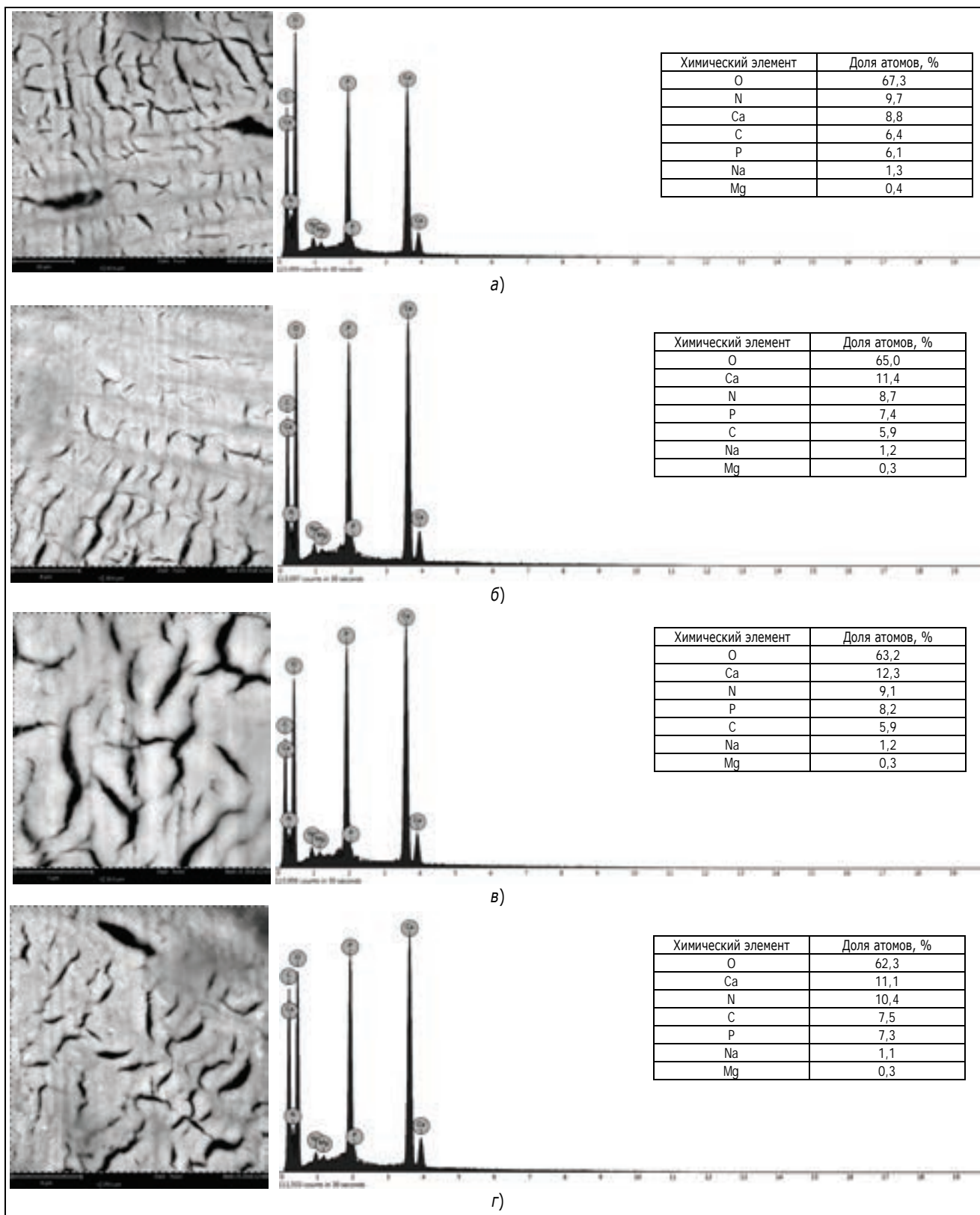
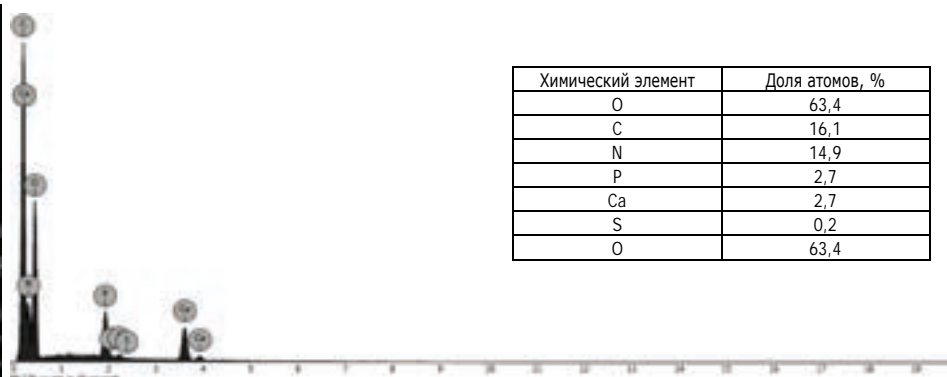
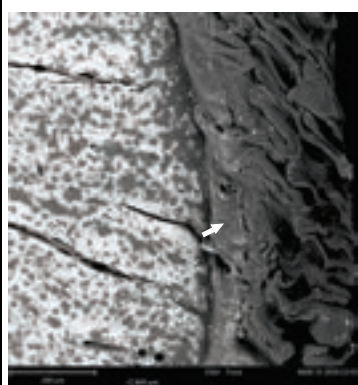
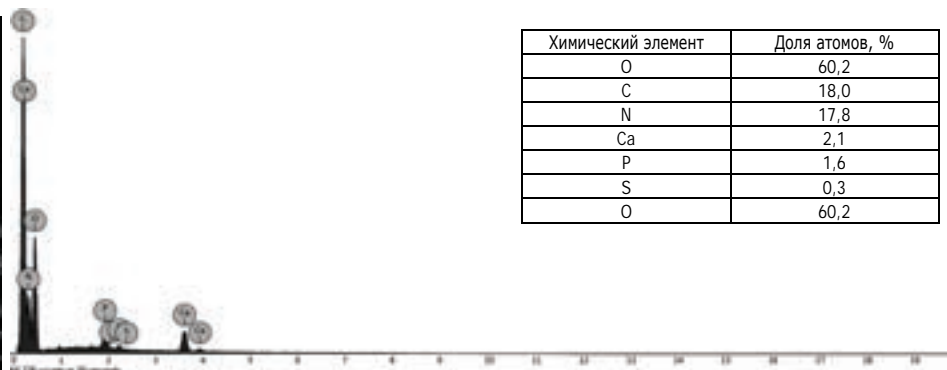
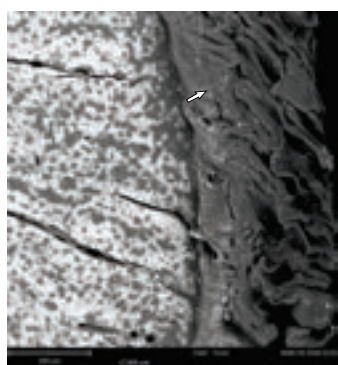


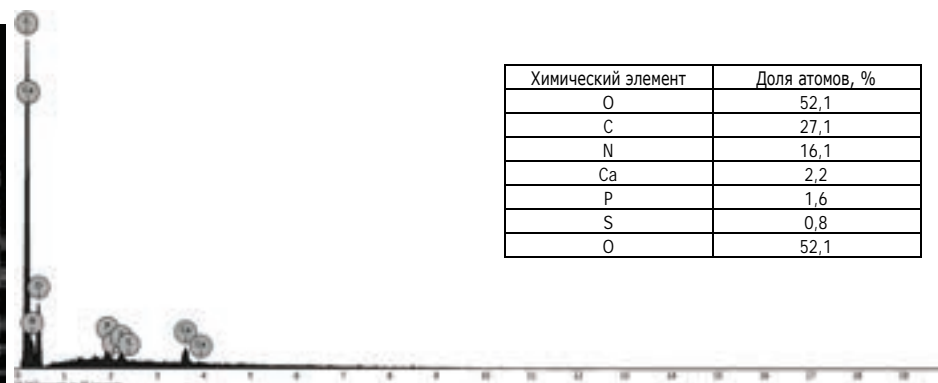
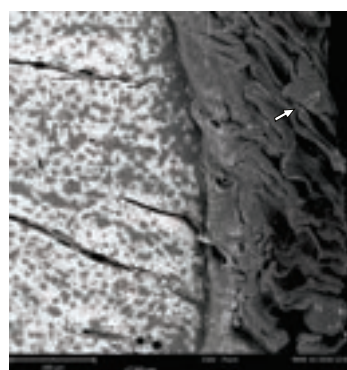
Рис. 3. Зоны анализа образцов второй группы: а – центральная зона образца № 1; б – средняя зона ближе к центру образца № 2; в – средняя зона образца № 3; г – средняя зона ближе к краю образца № 4



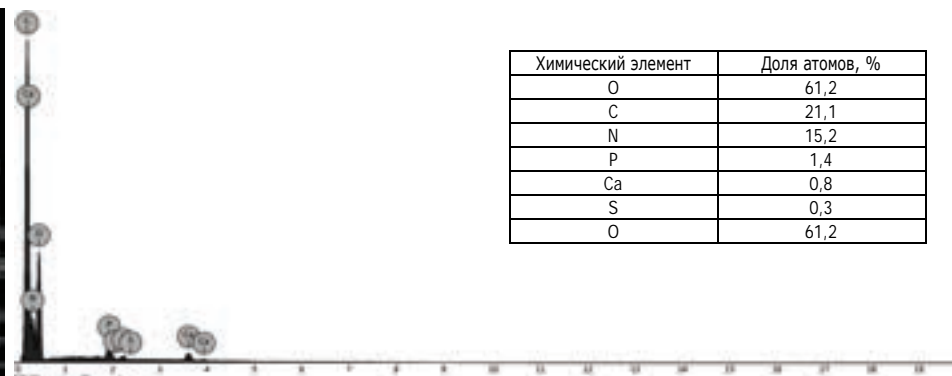
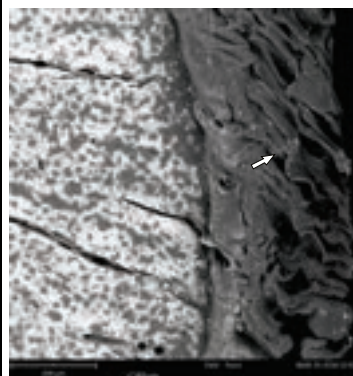
а)



б)



в)



г)

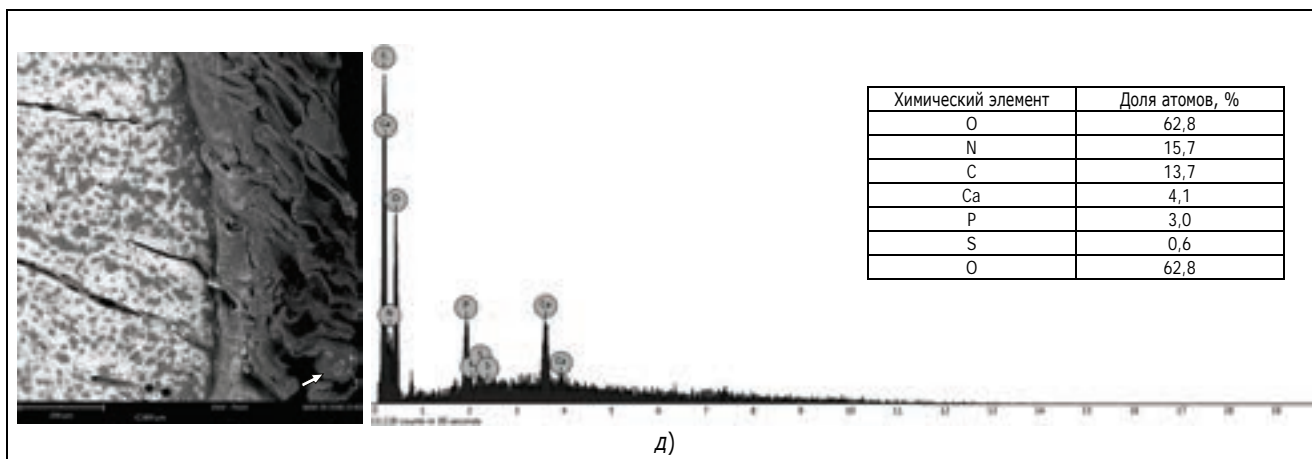


Рис. 4. Зоны анализа образца № 5 второй группы: а – за фронтом деминерализации в точке № 2; б – за фронтом деминерализации в точке № 3; в – за фронтом деминерализации в точке № 5; г – за фронтом деминерализации в точке № 6; д – за фронтом деминерализации в точке № 7

Чтобы проанализировать образец № 5 за пределами фронта деминерализации, элементный анализ провели дополнительно, а именно: в пяти точках деминерализованной зоны образца шириной 0,323 мм. Точки анализа № 2–7 обозначены на рис. 4.

Ниже приведены значения содержания химических элементов во второй группе образцов № 1–4 с внутренней стороны относительно фронта деминерализации и образца № 5 с внешней стороны относительно фронта деминерализации после 24-часового воздействия раствора соляной кислоты 0,8 моль/дм³.

Образцы № 1–4:

O	64,5±1,1
Ca	10,9±0,7
N	9,5±0,4
P	7,3±0,4
C	6,4±0,4
Na	1,2±0,1
Mg	0,3±0,04

Образец № 5:

O	59,9±2,0
C	19,2±2,3
N	15,9±0,5
Ca	2,4±0,5
P	2,1±0,3
S	0,4±0,1

Через 24 ч деминерализации второй группы образцов в зоне анализа в пределах фронта деминерализации в сравнении с первой контрольной группой образцов происходит увеличение относительного процентного содержания N в 1,5 раза, C – в 1,5 раза;

уменьшение концентрации Na в 1,3 раза, Mg – в 2 раза; содержание Ca и P – без изменений.

В зоне анализа за пределами фронта деминерализации наблюдается значительное уменьшение относительного процентного содержания следующих химических элементов в сравнении с первой нативной группой: Ca – в 4,5 раза, P – в 3,5 раза. Отмечено увеличение относительного процентного содержания C – в 4,2 раз, N – в 2,6 раза. Анализ определил незначительное содержание в образцах S и не определил Na и Mg.

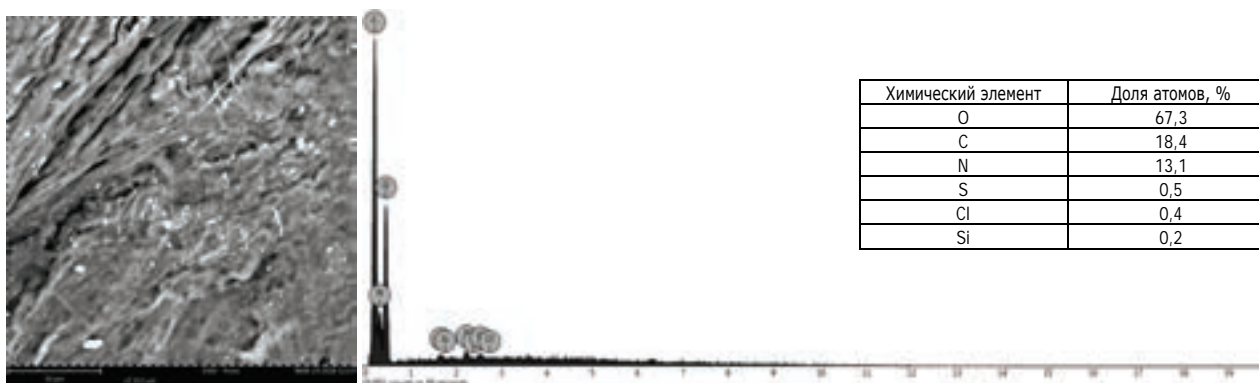
Элементный анализ третьей группы образцов. Образцы инкубировали в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³ в течение 48 ч.

На рис. 5 приведены данные элементного анализа образцов № 1–5 в зонах, начиная от центра к краю образцов.

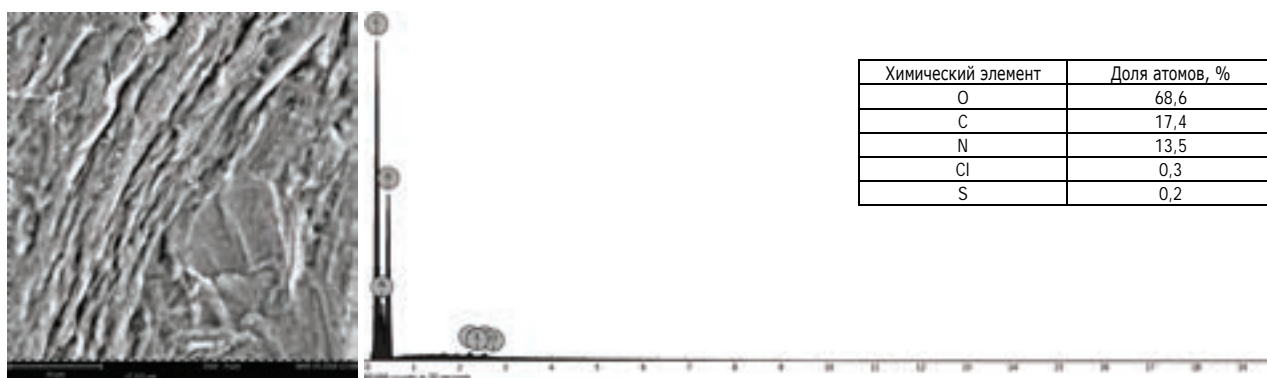
Ниже приведены значения содержания химических элементов в третьей группе образцов костной ткани, после 48 часов инкубации образцов № 1–5 в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³:

O	68,1±0,3
C	17,9±0,2
N	13,1±0,3
S	0,3±0,05
Cl	0,2±0,1
Si	0,1±0,1

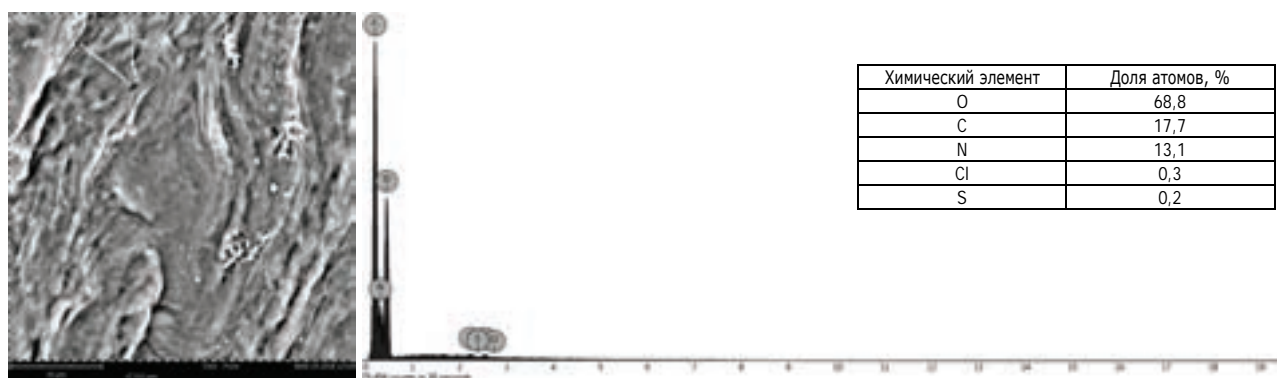
По данным анализа, через 48 ч инкубации образцов в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³ в костном матриксе не определялись Ca, P, Mg. При этом увеличилось относительное процентное содержание N – в 2 раза, C – в 4 раза. Анализ показал незначительную концентрацию S, Cl, Si.



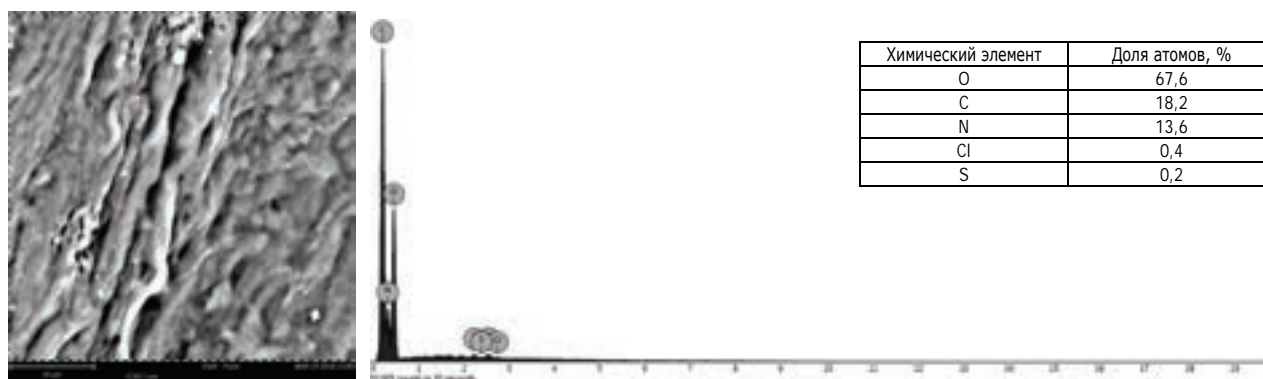
а)



б)



в)



г)

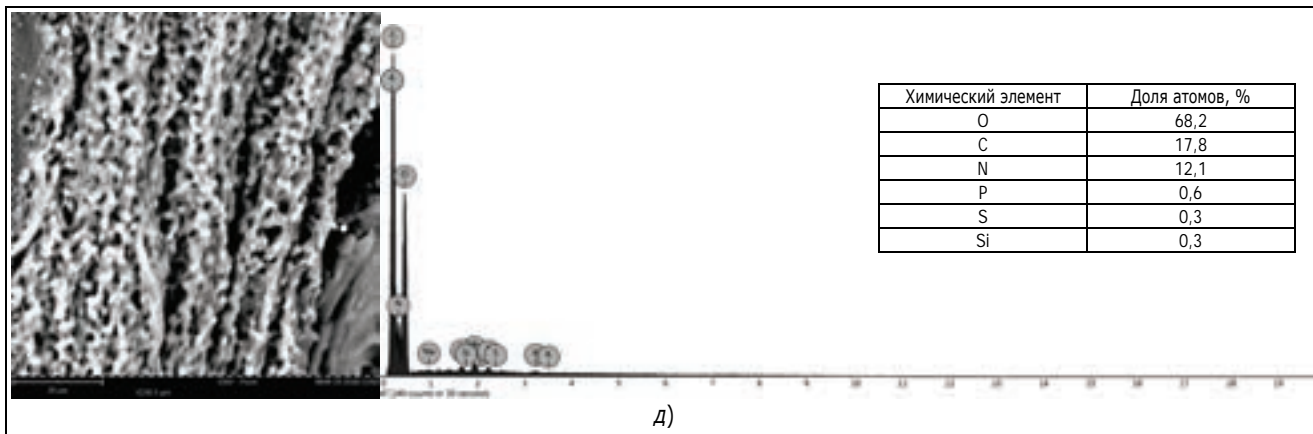


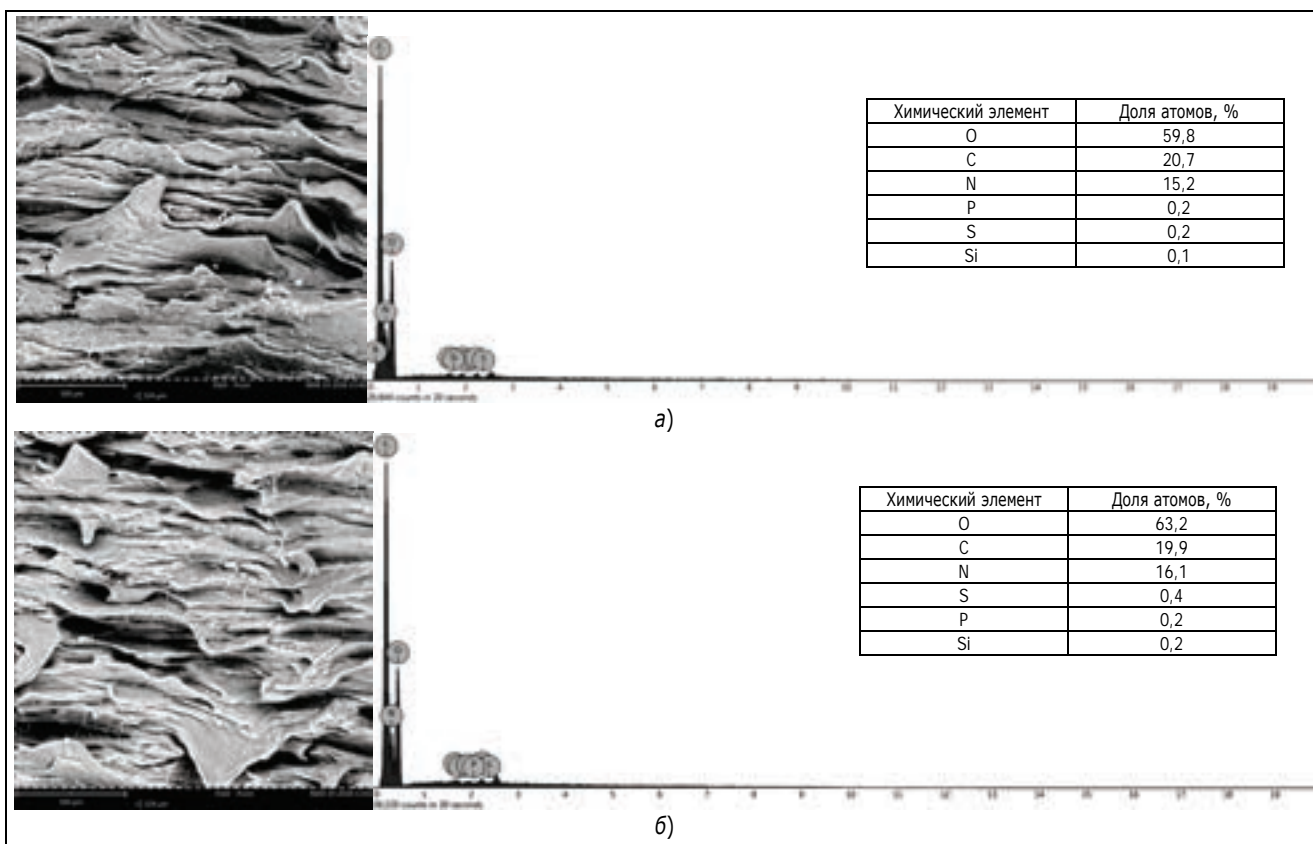
Рис. 5. Зоны анализа образцов третьей группы: а – центральная зона образца № 1; б – средняя зона ближе к центру образца № 2; в – средняя зона образца № 3; г – средняя зона ближе к краю образца № 4; д – зона края образца № 5

Элементный анализ четвертой группы образцов. Образцы инкубировали в 0,8 моль/дм³ раствор соляной кислоты в течение 72 ч. На рис. 6 приведены данные элементного анализа образцов № 1–5 в зонах анализа, равномерно расположенных в направлении от центра к краю образцов.

Ниже приведены значения содержания химических элементов в четвертой группе костных об-

разцов, после 72 ч их инкубации в раствор соляной кислоты 0,8 моль/дм³.

O.....	62,3±0,7
C.....	20,5±0,2
N.....	15,6±0,2
P.....	0,2±0,04
S.....	0,4±0,1
Si.....	0,2±0,03



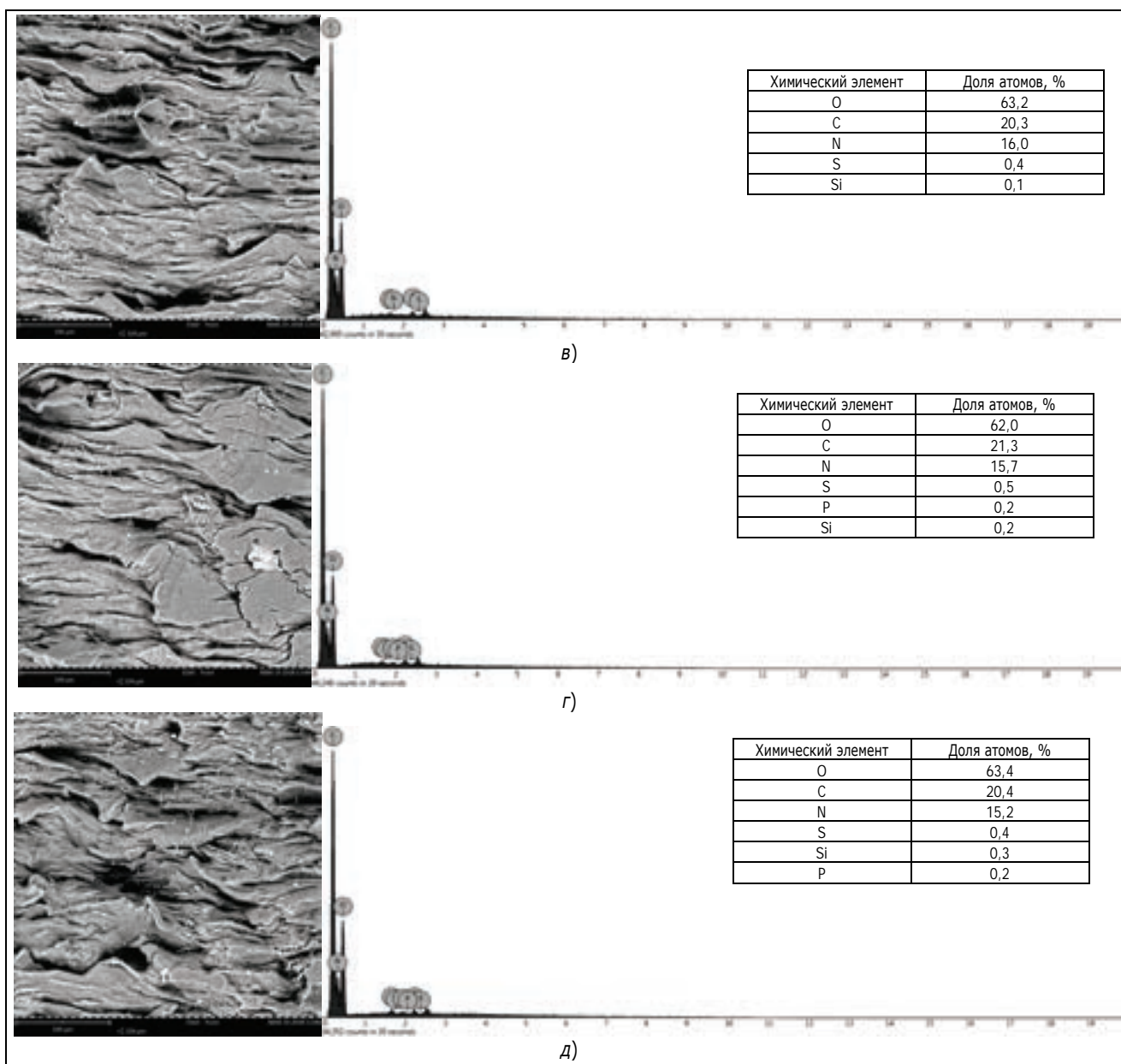


Рис. 6. Зоны анализа образцов четвертой группы: а – центральная зона образца № 1; б – средняя зона ближе к центру образца № 2; в – средняя зона образца № 3; г – средняя зона ближе к краю образца № 4; д – зона края образца № 5

Контроль показал, что через 72 ч воздействия на четвертую группу образцов раствором соляной кислоты $0,8 \text{ моль/дм}^3$, в костном матриксе по данным рентгеновской спектроскопии не определялось наличие Ca, Na, Mg.

Наряду с этим уменьшилось относительное процентное содержание P в 45 раз, увеличилось относительное процентное содержание N в 2,5 раза, C в 4,5 раза.

В таблице представлены итоговые данные исследования по результатам элементного анализа контрольной группы нативных костных образцов и деминерализованного матрикса.

По результатам экспериментальной апробации современного метода элементного анализа с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии получены количественные данные о существенном изменении химического

состава образцов костных имплантатов на разных этапах их деминерализации.

Таблица. Результаты элементного анализа

Химический элемент	Доля атомов, % (контроль)	Доля атомов, % (деминерализованный матрикс)
O	68,9±0,7	62,3±0,7
Ca	10,7±0,6	Не определен
P	7,6±0,3	0,2±0,04
N	6,1±0,3	15,6±0,2
C	4,5±0,2	20,5±0,2
Na	1,6±0,1	Не определен
Mg	0,6±0,02	Не определен

ВЫВОДЫ

1. Результаты проведенного элементного анализа контрольной группы образцов и деминерализованных на разных этапах трех групп образцов свидетельствуют об уменьшении относительного процентного содержания в ткани определяемых химических элементов, формирующих минеральную фазу кости и увеличении относительного процентного содержания определяемых химических элементов, формирующих органическую фазу костной ткани.
2. Экспериментально апробированный метод элементного анализа с использованием энергодисперсионной рентгеновской спектроско-

пии может быть использован для контроля степени деминерализации костной ткани при получении костных имплантатов и имплантационных препаратов для биоимплантологии.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Миронов С.П., Лекишвили М.В.* Деминерализованные костные аллоимплантаты: некоторые свойства и закономерности // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ «Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий». М. 2006. Вып. 24. С. 154–165.
2. *Денисов-Никольский Ю.И., Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Матвейчук И.В.* Актуальные проблемы теоретической и клинической ортоартрологии. М.: ОАО «Типография «Новости». 2005. 336 с.
3. *Миронов С.П., Омеляненко Н.П., Малахов О.А., Карпов И.Н., Матвейчук И.В., Дорохин А.И.* Возможности использования костного матрикса для стимуляции репаративного остеогенеза // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ «Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий». М. 2001. Вып. 17. С. 12–16.
4. *Реброва Г.А., Василевский В.К., Вичканова С.А., Шипулина Л.Д., Сокольская Т.А., Колхир В.К., Фейзуллаева Э.М., Фатеева Т.В., Крутикова Н.М.* Разработка лекарственных форм на основе коллагена с фитопрепаратами // Биомедицинские технологии: сб. научн. работ «Труды межведомственного научно-исследовательского и учебно-методического центра биомедицинских технологий». М. 1996. Вып. 3. С. 52–57.
5. *Матвейчук И.В.* Структурно-функциональная адаптация костной ткани как композита с учетом видовых, возрастных и функциональных особенностей: Дисс. ... докт. биол. наук. М. 1998. 285 с

Поступила 6 марта 2019 г.

MODERN METHOD OF ELEMENTAL ANALYSIS OF MINERALIZED TISSUE USING ENERGY DISPERSIVE X-RAY SPECTROSCOPY

© Y.Yu. Litvinov, 2019

Y.Yu. Litvinov

Senior Research Scientist, Special Work Department of Research and Educational Center of Biomedical Technologies, All-Russian Scientific Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants (Moscow)
E-mail: vilar.litvinov@mail.ru

The results of experimentally tested modern method of elemental analysis of mineralized tissue using energy dispersive x-ray spectroscopy are presented.

Material and methods: it have been studied 4 groups of bone samples of 5 pieces each:

- 1) native bone samples (control group);
- 2) bone samples, after incubation in hydrochloric acid 0.8 n for 24 hours;
- 3) bone samples, after incubation in hydrochloric acid 0.8 n for 48 hours;
- 4) bone samples, after incubation in hydrochloric acid 0.8 n for 72 hours.

Evaluation and control of the degree of demineralization of bone implants was performed using scanning electron microscope Phenom XL (Phenom-World, the Netherlands), equipped with a detector for integrated energy dispersive x-ray spectroscopy.

Results and discussion: the control showed that after 72 hours of incubation in hydrochloric acid 0.8 n, the presence of - Ca, Na, Mg is not determined in the bone matrix according to x-ray spectroscopy. The relative percentage of P has decreased by 45 times. The relative percentage of N has increased by 2.5 times and C has increased by 4.5 times.

Summary: experimentally tested method of elemental analysis using energy dispersive x-ray spectroscopy can be used to control the degree of demineralization of bone tissue in the preparation of bone implants for bioimplantology.

Key words: x-ray spectroscopy, bioimplantology, osteogenesis, demineralization.

For citation: Litvinov Y.Yu. Modern method of elemental analysis of mineralized tissue using energy dispersive x-ray spectroscopy. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(4):13–23. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-04-03>

REFERENCES

1. Mironov S.P., Lekishvili M.V. Demineralized bone alloplasty: some properties and regularities // Biomedical technology: collection of scientific works. Proceedings of the interdepartmental research and educational center of biomedical technologies. Moscow. 2006. V.24. P. 154–65.
2. Denisov-Nikolsky Yu.I., Mironov S.P., Omelyanenko N.P., Matveychuk I.V. Actual problems of theoretical and clinical osteoarthology // JSC "Typography "News", Moscow. 2005. 336 p.
3. Mironov S.P., Omelyanenko N.P., Malakhov O., Karpov I.N., Matveychuk I.V., Dorokhin A.I. Possibilities of using bone matrix for stimulation of reparative osteogenesis // Biomedical technologies: sat. works. Proceedings of the interdepartmental research and educational center of biomedical technologies. Moscow. 2001. V.17. P. 12–16.
4. Rebrov G.A., Vasilevsky V.K., Vechkanova S.A., Shipulina L.D., Sokolskaya T.A., Kolker V.K., Feyzullayev M.E., Fateev T.V., Krutikov N.M. Development of medicinal forms on the basis of collagen with herbal remedies // Biomedical technology: collection of scientific works. Proceedings of the interdepartmental research and educational center of biomedical technologies. Moscow. 1996. V. 3. P. 52–57.
5. Matveychuk I.V. Structural and functional adaptation of bone tissue as a composite taking into account species, age and functional features: Thesis for the degree of doctor of biological Sciences. M. 1998. 285 p.



Лекарственные препараты, разработанные ВИЛАР

Алпизарин (таблетки, мазь), рег. №№ 85/507/2; 85/507/10; 85/507/16 – противовирусное средство, получаемое из травы копеечника альпийского (*Hedysarum alpinum* L.) или копеечника желтеющего (*Hedysarum flavescens* Rerel et Schmalh).

По сравнению с ацикловиром обладает более широким спектром действия.

Амифурин (таблетки, спиртовой раствор), рег. №№ 83/914/9; 70/151/47; 70/151/48 – фотосенсибилизирующее средство, получаемое из плодов амми большой (*Ammi majus* L.).

Камадол (масляный экстракт) (рег. № 96/432/13) – противовоспалительное средство, получаемое из травы ромашки аптечной (ромашки ободранной) *Chamomilla recutita* (L.) Rauschert (*Matricaria recutita* L., *M. chamomilla* L.) и травы ноготков лекарственных (календулы лекарственной) – *Calendula officinalis* L., экстракцией маслом из плодов расторопши пятнистой – *Silybum marianum* (L.) Gaertn.

Леспефлан (экстракт жидкий очищенный) (рег. №№ 001423/01; 000571; 001865/01) – гипозотемическое, диуретическое и противовоспалительное средство в комплексном лечении хронической почечной недостаточности различного генеза, получаемое из побегов леспедецы двуцветной (*Lespedeza bicolor* Turcz.).

Элеутерококк (сухой экстракт, таблетки, покрытые оболочкой) (рег. № № 92/210/3; 92/210/7) – общетонизирующее средство, получаемое из корневищ и корней элеутерококка колючего (*Eleutherococcus senticosus* (Rupr. et Maxim.) Maxim.).

Эвкалимин (раствор, суппозитории для детей и взрослых) (рег. №№ 90/249/2; 91/194/13; 91/194/12) – антибактериальное и противовоспалительное средство, получаемое из эвкалипта прутовидного (*Eucalyptus viminalis* Labill.).

Тел. контакта: 8(495)388-55-09; 8(495)388-61-09; 8(495)712-10-45

Факс: 8(495)712-09-18;

e-mail: vilarnii.ru; www.vilarnii.ru