

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ДИФРАКТОМЕТРИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КОСТНОЙ ТКАНИ, КОСТНОГО РЕГЕНЕРАТА И ПРИРОДНОГО КАЛЬЦИЙФОСФАТНОГО МАТЕРИАЛА

А.Н. Накоскин

д.б.н., профессор кафедры биологии, Институт естественных наук и математики,
Курганский государственный университет (г. Курган)
E-mail: Nakoskin_A@mail.ru

Для решения задачи поиска эффективных материалов, пригодных для имплантации, используют различные кальцийфосфатные вещества, получаемые искусственно или выделенные из зрелой костной ткани. Проанализированы дифрактограммы костного регенерата, здоровой кости и кальцийфосфатного соединения. Установлено, что с возрастом и при созревании регенерата происходит увеличение кристалличности минеральной фазы кости, что указывает на снижение обменных процессов, протекающих в ней.

Ключевые слова: костная ткань, регенерат, кальцийфосфатные материалы, гидроксипатит, дифрактометрический анализ.

Для цитирования: Накоскин А.Н. Сравнительная дифрактометрическая характеристика костной ткани, костного регенерата и природного кальцийфосфатного материала. Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии. 2019;22(6):44–49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-07>

В настоящее время ведется активный поиск эффективных материалов, пригодных для имплантации. Для решения этой задачи применяют различные материалы, получаемые искусственно или выделенные из зрелой костной ткани. Искусственно полученные гидроксипатиты находят широкое применение в практике имплантации, однако по различным параметрам не всегда являются эффективными. По мнению автора, полученные из зрелой костной ткани минеральные компоненты, в частности гидроксипатит, могут быть более эффективными в практике имплантации, так как микроэлементный и структурный состав природного костного минерала наиболее близок к костной ткани. В то же время методика выделения препаратов гидроксипатита из кости влияет на его строение, биоиндуктивные и биокондуктивные свойства [1, 2].

Исследование кристаллической составляющей минеральной фазы костной ткани является актуальным в свете перспектив создания и использования нативных кальцийфосфатных соединений в качестве имплантационных материалов. Известно, что в кристаллической фазе природного костного минерала отдельные ионы кальция могут замещаться сходными по физико-химическим свойствам ионами металлов. Это замещение, в свою очередь, влияет на химические свойства, например растворимость, а также на механические характеристики замещенного кристалла. Особенно это

важно при формировании новообразованной костной ткани.

Цель работы – изучение дифрактометрических характеристик костной ткани, костного регенерата и кальцийфосфатного материала, полученного из костной ткани по различным технологиям.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Проведена сравнительная оценка состояния новообразованного костного минерала в регенерате большеберцовой кости собак в сравнении с нативной костью.

Экспериментальными материалами исследования являлись имплантационные материалы на основе кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани крупного рогатого скота (КРС) с использованием: 1) слабого раствора (0,5 N) хлороводородной кислоты и насыщенного раствора гидроксида натрия (КФС-I); 2) слабого раствора (0,5 N) хлороводородной кислоты, насыщенного раствора гидроксида натрия и раствора карбамида (КФС-II); 3) концентрированного раствора (6 N) хлороводородной кислоты и раствора гидроксида кальция (КФС-III).

Для дифрактометрического исследования использовали участок здоровой костной ткани средней трети диафиза большеберцовой кости собак, костный регенерат и кальцийфосфатные материалы, выделенные из интактной костной ткани.

Регенерат получали удлинением голени аппаратом Илизарова с темпом distraction 1 мм в сутки, ритм distraction – 0,25 мм за четыре приема. Полученный регенерат на 28-е сутки фиксации препарировали, лиофильно высушивали и использовали для дифрактометрического анализа. Для сравнения брали здоровую костную ткань контрлатеральной конечности. Экспериментальные исследования проводили, руководствуясь требованиями, изложенными в «Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях» (1986 г.) с соблюдением этических норм и гуманного отношения к объектам изучения.

Кальцийфосфатные материалы (КФС-I, КФС-II, КФС-III) выделяли из здоровой кортикальной кости КРС по технологии, предложенной И.А. Талашовой [3].

Рентгенофазовый анализ (РФА) минерального состава образцов костной ткани и кальцийфосфатных соединений проведен на дифрактометре ДРОН-7 (CuK α -излучение, Ni-фильтр). Дифракто-

граммы сняты при температуре 298 К в интервале углов дифракции $10^\circ \leq 2\theta \leq 120^\circ$ с шагом $0,02^\circ$ и экспозицией 15 с. Для анализа полученных дифрактограмм применяли программный комплекс PDWin 4.0. Фазовая идентификация проведена по базе данных ICDD PDF2. Образцы костной ткани крепили к кювете с помощью пластилина. Поверхности, подвергающиеся рентгенофазовому анализу, выравнивали с помощью наждачной бумаги, протирали этанолом и высушивали на воздухе.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

При анализе дифрактограмм образцов костной ткани регенератов и контрлатеральной конечности голени собак установлено, что кристаллическая составляющая регенерата качественно подобна нативной костной ткани. Уширение пиков в минеральной фазе регенерата может быть вызвано плохой окристаллизованностью фаз и/или механическими напряжениями в образцах. Дифрактограммы костного регенерата и нативной костной ткани контрлатеральной голени собак представлены на рис. 1.

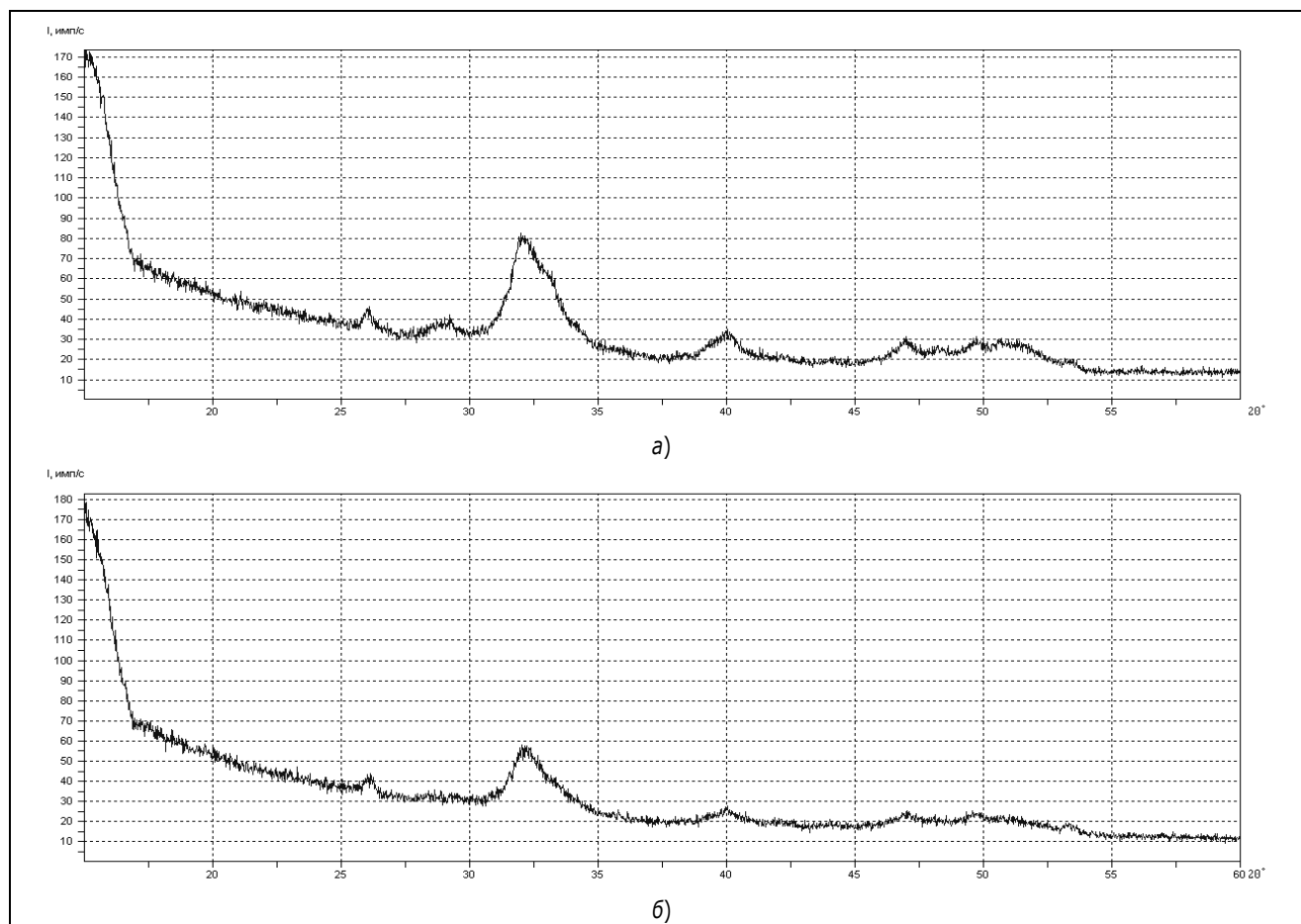


Рис. 1. Дифрактограммы образца нативной костной ткани контрлатеральной конечности (а) и костного регенерата (б)

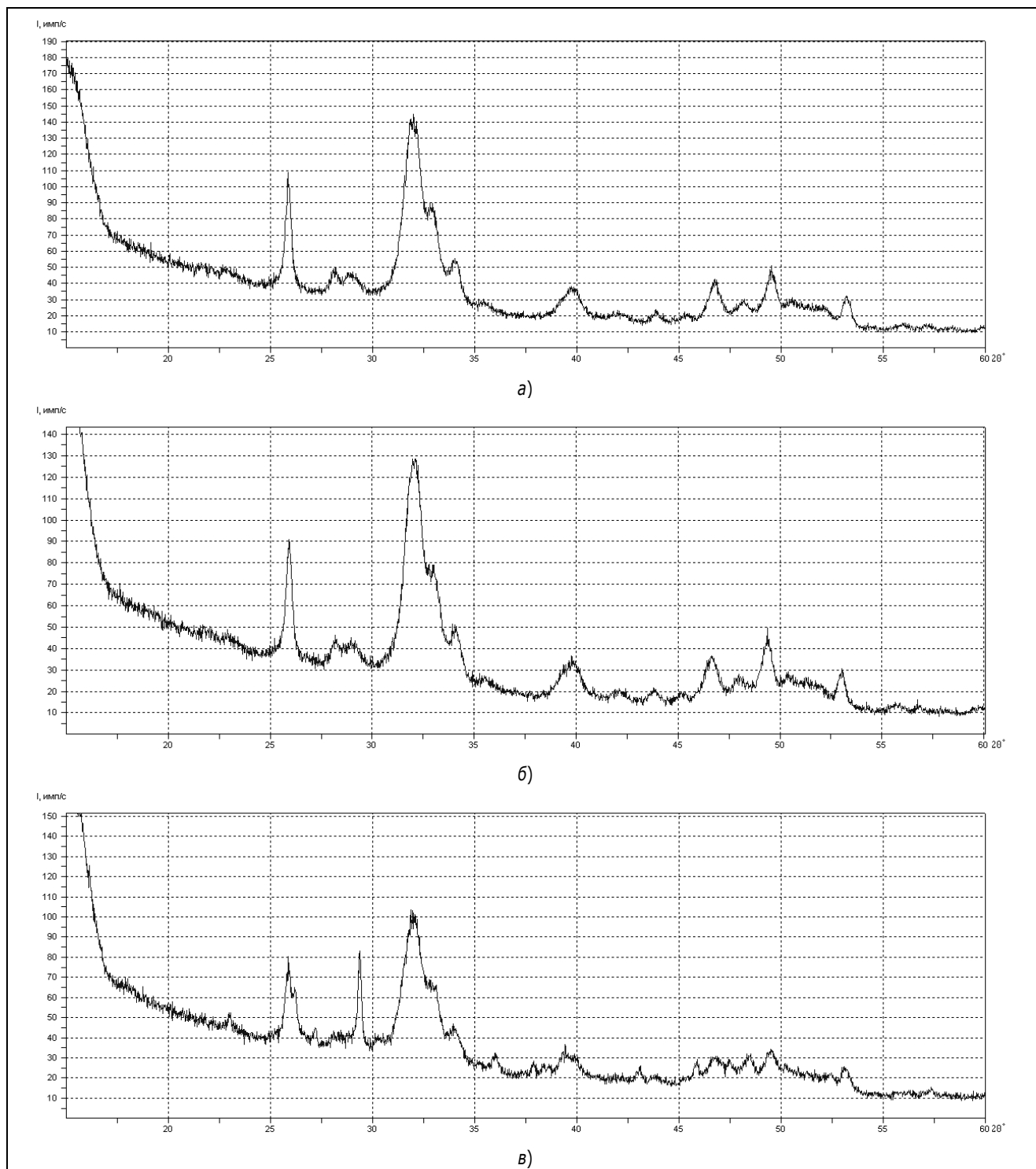


Рис. 2. Дифрактограммы образцов костного минерала, выделенных из костной ткани КРС по различным технологиям: а - КФС-I; б - КФС-II; в - КФС-III

Наблюдается снижение интенсивности основных пиков в пробах костных регенератов по сравнению с контрлатеральной конечностью, что можно интерпретировать как уменьшение степени кристалличности материала или меньшей концентрацией фазы в образце [4]. Данное обстоятельство указывает на то, что на 28-е сутки формирования костного регенерата у собак формирование кристаллической фазы еще не завершено.

Фазовый состав кристаллической составляющей нативной кости и костного регенерата представлен ниже.

Нативная костная ткань, %:

Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ (Hydroxyapatite)	26,3
Ca ₅ (PO ₄) ₃ OH (Hydroxyapatite)	30,5
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH, Cl, F) (Hydroxyapatite, chlorian)	18,3
Ca ₁₀ (PO ₄) ₃ (CO ₃) ₃ (OH) ₂ (Carbonatehydroxyapatite)	16,6
Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl (Chlorapatite)	8,3

Костный регенерат, %:

Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ (Hydroxyapatite)	30,6
Ca ₅ (PO ₄) ₃ F (Fluorapatite)	27,9
Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl (Chlorapatite)	17,1
Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ F(OH) (Carbonatehydroxyapatite)	18,3
Ca ₁₀ (PO ₄ ,OH,CO ₃) ₆ (OH) ₂ (Carbonate-apatite)	6,1

Массовые соотношения идентифицированных фаз приведены без учета аморфной и неидентифицированных фаз. Корректная оценка количества аморфной фазы затруднена из-за неидеальной стехиометрии.

По полученным данным основной частью кристаллической фазы нативной костной ткани являются кристаллы гидроксиапатита в виде и мономеров, и димеров. Замещенных форм гидроксиапатита значительно меньше. В отличие от нативной кости в костном регенерате преобладают замещенные формы гидроксиапатита. В качестве заместителей обнаружены ионы хлора, фториды и карбонат-ионы. Это связано с незрелым строением костного регенерата. Впоследствии замещенные формы гидроксиапатита сменяются естественными его формами в процессе физиологического обновления кости.

Полученные в исследовании дифрактограммы кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани КРС по различным технологиям, представлены на рис. 2.

Профили дифрактограмм образцов кальцийфосфатных материалов качественно подобны. Вы-

сота пиков свидетельствует о более высокой кристалличности, полученных материалов в сравнении с кристаллической фазой нативной костной ткани и костного регенерата. В то же время отличия дифрактограмм в области углов $25^\circ \leq 2\theta \leq 30^\circ$ свидетельствуют о том, что технология получения кальцийфосфатных материалов оказывает значительное влияние на кристалличность и фазовый состав конечных продуктов. Данное обстоятельство подтверждается и тем, что в состав кристаллической фазы кальцийфосфатных соединений входят различные формы гидроксипапатитов.

Образец КФС-I содержит, %:

Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) – Hydroxyapatite	16,8
Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl – Chlorapatite	26,6
Ca ₅ (PO ₄) ₃ F – Fluorapatite	26,9
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ – Hydroxyapatite dimer	3,7
Ca ₁₀ (PO ₄) ₃ (CO ₃) ₃ (OH) ₂ – Carbonatehydroxyapatite	11,1
CaMg(CO ₃) ₂	4,8

Образец КФС-II содержит, %:

Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl – Chlorapatite	23
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) – Hydroxyapatite	14
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH, Cl, F) – Hydroxyapatite, chlorian	13
Ca ₁₀ (PO ₄) ₆ (OH) ₂ – Hydroxyapatite	12
Ca ₅ (PO ₄) ₃ F – Fluorapatite	12
NaMgPO ₄ Magnesium Sodium Phosphate	11
CaNaPO ₄ Sodium Calcium Phosphate	9
Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ (OH)F – Carbonatehydroxyapatit	6

Образец КФС-III содержит, %:

Ca ₄ P ₂ O ₉ (карточка 11-232 Calcium Phosphate)	24,3
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH, Cl, F) (карточка 25-166 Hydroxyapatite, chlorian Hydroxyapatite, chlorian)	14,4
Ca ₅ (PO ₄) ₃ (OH) (карточка 24-33 Hydroxyapatite Hydroxyapatite)	10,8
Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ (OH)F (карточка 21-145 Carbonatehydroxyapatite)	10,2
Ca ₁₀ (OH) ₂ (PO ₄) ₆ (карточка 3-747 Hydroxyapatite)	7,9
Ca ₁₀ (PO ₄) ₅ CO ₃ (OH) _{0.5} F _{1.5} (карточка 31-267 Carbonate fluorapatite)	9,6
Ca ₁₀ (PO ₄) ₃ (CO ₃) ₃ (OH) ₂ (карточка 19-272 Carbonatehydroxyapatite Carbonatehydroxyapatite)	10,7
Ca ₂ PO ₄ Cl (карточка 19-247)	5,2
Ca ₅ (PO ₄) ₃ F (карточка 34-11 Fluorapatite)	4,4
Ca ₅ (PO ₄) ₃ Cl (карточка 27-74 Chlorapatite)	2,4

Частично пики обнаруженных соединений накладываются, так как основой этих кристаллических соединений является гидроксиапатит. Фазовый состав КФС-II качественно отличается от образца КФС-I. В его состав входит большее количество замещенных фракций гидроксиапатита и двойных фосфатных солей. Профиль дифрактограммы образца КФС-III качественно подобен пробам образцов КФС-I и КФС-II, но есть и дополнительные рефлексы.

Наибольшее сходство выделенных кальций-фосфатных соединений с нативной костной тканью и костным регенератом наблюдается в образцах КФС-I и КФС-II. Отмечено также увеличение интенсивности пиков КФС, улучшение их разрешения, уменьшение их ширины по сравнению с образцами костной ткани и регенерата, что говорит о высокой степени кристалличности выделенных минералов.

Следует отметить, что осадитель при получении кальцийфосфатного материала играет ключевую роль в кристаллообразовании. Так, в случае использования в качестве осадителя раствора гидроксида натрия (КФС-I и КФС-II) кристаллическая фаза была наиболее схожа с нативной костью и костным регенератом. В случае использования в качестве осадителя кальция гидроксида дифрактограммы и состав кристаллической фазы имели несколько иной вид. Это связано с тем, что образующаяся в результате реакции соль натрия хлорида не участвует в кристаллообразовании, и соотношение основных нативных ионов кальция и фосфата остается в таком же стехиометрическом соотношении, как в нативной кости. При использовании кальция гидроксида в качестве осаждающего агента стехиометрическое соотношение кальция и фосфата смешалось в пользу кальция и, как следствие, менялся состав и кристалличность конечного продукта. В представленном исследовании не обнаружено влияния карбамида на состав кристаллической фазы при получении кальций-фосфатного соединения, однако его влияние на течение регенеративных процессов в костной ткани показано в работах И.А. Талашовой и соавт [3].

Таким образом, анализ дифрактограмм показал, что основной кристаллической фазой исследуемых образцов является гидроксиапатит с характерными дифракционными рефлексами. При этом кристалличность ярче выражена в зрелой костной ткани по сравнению с костным регенера-

том. Данное обстоятельство косвенно может свидетельствовать в пользу того, что в процессе физиологического старения костной ткани кристалличность минеральной фазы увеличивается.

Состав образцов костного минерала, полученного различными способами, отличается, что свидетельствует о важности процедуры получения. Общей характерной чертой состава костного минерала является малое содержание карбонатных форм гидроксиапатита, что вполне объясняется тем, что в процессе получения этих веществ из костной ткани происходит обработка раствором хлороводородной кислоты. В результате этого карбонат-ион выделяется в виде углекислого газа. На кристалличность костного минерала оказывает влияние объем раствора, из которого происходит осаждение. Общая тенденция такова: чем больше объем раствора и, соответственно, ниже концентрация костного минерала, тем выше кристалличность получаемого продукта.

ВЫВОДЫ

Высокая кристалличность может являться ключевым фактором в каскаде репаративных процессов, протекающих при регенерации кости. С возрастом и при созревании регенерата происходит увеличение кристалличности минеральной фазы кости, что указывает на снижение обменных процессов, протекающих в ней.

В связи с этим использование кальцийфосфатных материалов с высокой кристалличностью не будет способствовать скорейшему заживлению перелома.

ЛИТЕРАТУРА

1. Зеличенко Е.А., Гузев В.В., Роголина А.С., Гурова О.А., Ковальская Я.Б. Исследование свойств гидроксиапатита, выделенного из костной ткани сельскохозяйственных животных // Химия в интересах устойчивого развития. 2012. № 20. С. 543–548.
2. Розанов В.В., Матвейчук И.В., Денисов-Никольский Ю.И., Литвинов Ю.Ю. Костная ткань как объект биотехнологических исследований и разработок // Технологии живых систем. 2016. Т. 13. № 1. С. 25–25.
3. Талашова И.А., Силантьева Т.А. Качественный и количественный состав имплантационных кальций-фосфатных материалов // Успехи современного естествознания. 2007. № 11. С. 15–19.
4. Кузнецов С.В., Осико В.В., Ткаченко Е.А., Федоров П.П. Неорганические нанофториды и наноконкомпозиты на их основе // Успехи химии. 2006. Т. 75. № 12. С. 1193–1211.

Поступила 20 октября 2018 г.

COMPARATIVE DIFFRACTOMETRIC CHARACTERISTICS OF BONE TISSUE, BONE REGENERATE AND NATURAL CALCIUM PHOSPHATE MATERIAL

© A.N. Nakoskin, 2019

A.N. Nakoskin

Dr.Sc. (Biol.), Professor, Department of Biology,

Institute of Natural Sciences and Mathematics, Kurgan State University (Kurgan)

E-mail: Nakoskin_A@mail.ru

The purpose of the work is to study the diffractometric characteristics of bone tissue, bone regenerate and calcium phosphate material obtained from bone tissue using various technologies.

Material and methods: For the study, samples of calcium phosphate material from mature bulls bone tissue were obtained, healthy bone and a dog's distraction regenerate were studied. All samples were examined on a DRON-7 x-ray diffractometer. It was established that with age and with the maturation of the regenerate an increase in the crystallinity of the mineral phase of bone occurs, which indicates a decrease in the metabolic processes occurring in it.

Resultate: High crystallinity may be a key factor in the cascade of reparative processes occurring during bone regeneration. With age and with the maturation of the regenerate, an increase in the crystallinity of the mineral phase of the bone occurs, which indicates a decrease in the metabolic processes occurring in it.

Thus, the analysis of diffraction patterns showed that the main crystalline phase of the studied samples is hydroxyapatite with characteristic diffraction reflexes. At the same time, crystallinity is more pronounced in mature bone tissue compared to bone regenerate. This circumstance may indirectly indicate that during the physiological aging of the bone tissue, the crystallinity of the mineral phase increases.

Conclusions: The composition of samples of bone mineral obtained in various ways is different, which indicates the importance of the procedure for obtaining. A common characteristic of the composition of the bone mineral is the low content of carbonate forms of hydroxyapatite, which is completely explained by the fact that in the process of obtaining these substances from the bone tissue, treatment with hydrochloric acid solution occurs. As a result, the carbonate ion is released as carbon dioxide. The crystallinity of the bone mineral is influenced by the volume of the solution from which precipitation occurs. The general trend is as follows: the greater the volume of the solution and, accordingly, the lower the concentration of bone mineral, the higher the crystallinity of the resulting product.

In this regard, the use of calcium phosphate materials with high crystallinity will not contribute to the speedy healing of a fracture.

Key words: Bone tissue, regenerate, calcium phosphate materials, hydroxyapatite, diffractometric analysis.

For citation: Nakoskin A.N. Comparative diffractometric characteristics of bone tissue, bone regenerate and natural calcium phosphate material. Problems of biological, medical and pharmaceutical chemistry. 2019;22(6):44-49. <https://doi.org/10.29296/25877313-2019-06-07>

REFERENCES

1. Zelichenko E.A., Guzeev V.V., Rogulina A.S., Gurova O.A., Koval'skaya Ya.B. Issledovanie svojstv gidroksiapatita, vydelennogo iz kostnoj tkani sel'sko-hozyajstvennyh zhivotnyh // Himiya v interesah ustojchivogo razvitiya. 2012. № 20. S. 543-548.
2. Rozanov V.V., Matvejchuk I.V., Denisov-Nikol'skij Yu.I., Litvinov Yu.Yu. Kostnaya tkan' kak ob'ekt biotekhnologicheskikh issledovanij i razrabotok // Tekhnologii zhivyh sistem. 2016. T. 13. № 1. S. 25-25.
3. Talashova I.A., Silant'eva T.A. Kachestvennyj i kolichestvennyj sostav implantacionnyh kal'cij-fosfatnyh materialov // Uspekhi sovremennogo estestvoznaniya. 2007. № 11. S. 15-19.
4. Kuznecov S.V., Osiko V.V., Tkachenko E.A., Fedorov P.P. Neorganicheskie nanoftoridy i nanokompozity na ih osnove // Uspekhi himii. 2006. T. 75. № 12. S. 1193-1211.