

ОРИГИНАЛЬНАЯ СТАТЬЯ

# ЭЛЕМЕНТНЫЙ СОСТАВ КОСТНЫХ ОБРАЗЦОВ НА РАЗЛИЧНЫХ СТАДИЯХ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ

Ю.Ю. Литвинов\*, В.В. Краснов

ФГБНУ «Всероссийский научно-исследовательский институт лекарственных и ароматических растений»  
Министерства науки и высшего образования  
Российская Федерация, 117216, Москва, ул. Грина, д. 7

**РЕЗЮМЕ.** Цель работы – изучение элементного состава костных образцов на различных стадиях деминерализации для оценки качества получаемых биологических имплантационных средств

**Материалы и методы.** Объектом исследования – цилиндрические образцы нативной, частично деминерализованной и деминерализованной кортикальной кости от клинически здоровых животных (бык, возраст 1,5–2 года). Содержание химических элементов в образцах диафиза бедренной кости быка на различных стадиях деминерализации исследовали методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии.

**Результаты.** Установлены закономерности изменений содержания изученных химических элементов в костных образцах в зависимости от времени их деминерализации. На протяжении всего эксперимента наблюдалось постоянное снижение относительного процента химических элементов, образующих минеральную фазу кости, и увеличение относительного процента химических элементов, образующих органическую фазу костной ткани.

**Выводы.** Предложенный подход может быть использован при проведении оценки и контроля качества получаемых биологических имплантационных средств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** элементный состав, костные образцы, деминерализованный костный матрикс.

## ВВЕДЕНИЕ

Для замещения дефектов кости широко применяют имплантаты из различных биологических и синтетических материалов, среди которых наибольший интерес вызывает деминерализованный костный матрикс. Его получают путем деминерализации костной ткани до остаточного значения содержания кальция менее 5 % (Кирилова, 2004).

В процессе изготовления имплантатов и имплантационных препаратов с заданными свойствами на основе деминерализованного костного матрикса, необходимо проводить контроль степени их минерализации (Литвинов, 2019). Для выполнения такого контроля одним из перспективных методов является метод энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии, основанный на анализе энергии эмиссии рентгеновского спектра изучаемого образца и позволяющий определить его качественный и количественный состав (Синдо, Оикава 2006; Якубова и др., 2015).

Несмотря на многочисленные исследования элементного состава нативной костной ткани человека и животных, до сих пор остается неисследованным элементный состав кости на различных стадиях деминерализации.

Цель исследования – изучение элементного состава костных образцов на различных стадиях деминерализации для оценки качества получаемых биологических имплантационных средств.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Объектом исследования служили цилиндрические образцы (высотой 12 мм, диаметром 5 мм) нативной, частично деминерализованной и деминерализованной кортикальной кости (средняя треть диафиза бедренной кости) от клинически здоровых животных (бык, возраст 1,5–2 года).

Для придания необходимой формы и размеров костным образцам выполняли механическую обработку нативной кости в охлаждающей среде

\* Адрес для переписки:  
Литвинов Юрий Юрьевич  
e-mail: vilar.litvinov@mail.ru

с использованием полой фрезы и станка IzoMet 4000 (Buehler, США), оснащенного алмазным отрезным диском со сплошной кромкой 5LC Diamond (Buehler, США) (Ярыгин и др., 1998; Литвинов, 2019).

Для деминерализации костных образцов их инкубировали в соляной кислоте 0,8 моль/дм<sup>3</sup> при объемном соотношении 1:100 в течение 24, 48 и 72 ч. Затем все образцы разрезали на две равные части перпендикулярно продольной оси и исследовали смежные поверхности среза.

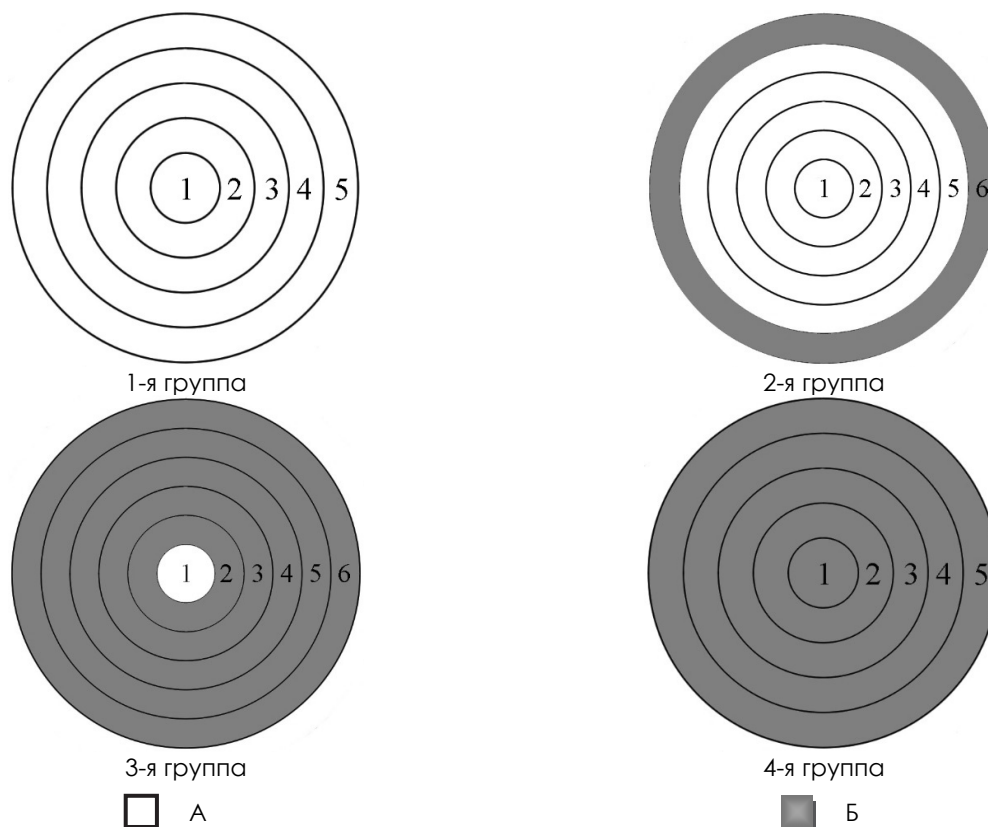
Изучение структуры и элементный анализ поверхностного слоя костных образцов проводили на базе ООО «Мелитэк» (Москва) с использованием сканирующего электронного микроскопа Phenom XL (Phenom-World BV., Нидерланды), оснащенным детектором для энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии и специализированным программным обеспечением для анализа элементного состава в точке Element Identification (Phenom-World BV., Нидерланды), позволяющим идентифицировать элементы в диапазоне от бора (5) до америция (95) периодической системы химических элементов.

Исследование элементного состава проводили в пяти точках каждой из зон поперечных

срезов костных образцов: нативные образцы – 1-я группа (контрольная),  $n = 5$ ; образцы после инкубирования в соляной кислоте в течение 24 ч – 2-я группа,  $n = 5$ ; 48 ч – 3-я группа,  $n = 5$ ; 72 ч – 4-я группа,  $n = 5$ . Во 2-й и 3-й группах исследовали как не деминерализованные (А), так и деминерализованные зоны (Б): 2-я группа (2А – не деминерализованные зоны 1-5, 2Б – деминерализованная зона 6), 3-я группа (3А – не деминерализованная зона 1, 3Б – деминерализованные зоны 2-6) (рис. 1).

Изучали содержание химических элементов, составляющих минеральную (Ca, P, Mg, Na) и органическую (O, N, C) основу костной ткани. Площадь каждой точки исследования составляла 0,001 мм<sup>2</sup>, время получения информации об элементном составе – 10–250 мс.

Статистический анализ полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 13.3 (TIBCO Software Inc, США). Для каждого показателя вычисляли среднее значение (M) и стандартное отклонение (SD). Для сравнения средних значений в двух независимых группах применяли *t*-критерий Стьюдента. Различия показателей считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ .



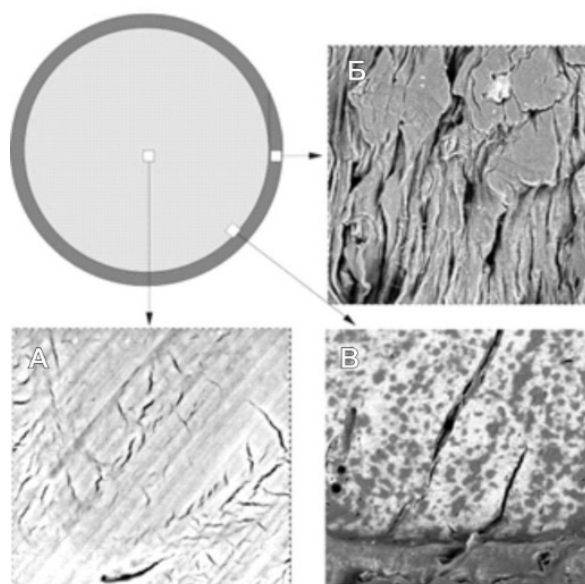
**Рис. 1.** Зоны исследования элементного состава поперечных срезов костных образцов 1-4 групп: А – не деминерализованные (светлый цвет), Б – деминерализованные (тёмный цвет)

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Результаты объективной регистрации состояния поверхности торцевых срезов костных образцов показали, что микроструктура их поверхности сохранена и не претерпела температурных или деформационных изменений в процессе пробоподготовки.

На поперечном срезе частично деминерализованных образцов (2, 3 группа) наблюдался ярко выраженный фронт деминерализации (расположенный по периферии) с сохранившимся в центре не деминерализованным участком округлой формы. Ширина зоны с удаленной минеральной фазой варьировала во 2-й группе от 0,25 до 0,32 мм, в 3-й группе – от 1,96 до 2,49 мм. Структура компактного вещества не деминерализованной и деминерализованной кости была не повреждена (рис. 2).

Полученные результаты анализа элементного состава представлены в соотношении количества атомов каждого элемента к общему количеству атомов в процентах (таблица).



**Рис. 2.** Структура костной ткани на торцевом срезе образца после инкубации в соляной кислоте в течение 24 ч: А – не деминерализованная; Б – в зоне границы деминерализации; В – деминерализованная. СЭМ,  $\times 300$

**Таблица. Динамика элементного состава образцов костной ткани до, в процессе и после деминерализации**

Элемент	Доля атомов, %					
	1-я группа	2-я группа		3-я группа		4-я группа
		А	Б	А	Б	
Ca	10,7 $\pm$ 1,43	10,9 $\pm$ 1,49	2,4 $\pm$ 1,19*	10,2 $\pm$ 0,38	< IDL	< IDL
P	7,6 $\pm$ 0,69	7,3 $\pm$ 0,87	2,0 $\pm$ 0,73*	7,2 $\pm$ 0,09	0,6 $\pm$ 0,03*	0,2 $\pm$ 0,04*
Mg	0,6 $\pm$ 0,04	0,3 $\pm$ 0,05*	< IDL	0,3 $\pm$ 0,01*	< IDL	< IDL
Na	1,5 $\pm$ 0,19	1,2 $\pm$ 0,08*	< IDL	1,1 $\pm$ 0,02*	< IDL	< IDL
O	68,9 $\pm$ 1,60	64,5 $\pm$ 2,21*	59,9 $\pm$ 1,56*	65,7 $\pm$ 0,28*	68,1 $\pm$ 0,64	62,3 $\pm$ 1,51*
N	6,1 $\pm$ 0,71	9,5 $\pm$ 0,74*	15,5 $\pm$ 1,53*	9,1 $\pm$ 0,88*	13,1 $\pm$ 0,59*	15,6 $\pm$ 0,43*
C	4,5 $\pm$ 0,38	6,4 $\pm$ 0,75*	19,6 $\pm$ 0,47*	6,3 $\pm$ 0,92*	17,9 $\pm$ 0,40*	20,5 $\pm$ 0,52*
Ca/P	1,41	1,49	1,2	1,41	–	–

Примечание: \* – различия статистически значимы по сравнению с контролем; IDL – предел обнаружения прибора; А – не деминерализованная зона, Б – деминерализованная зона.

Представленные количественные данные свидетельствуют о существенных различиях химического состава нативной, частично деминерализованной и деминерализованной костной ткани.

При анализе нативных образцов 1-й группы с неизменным композитным составом полу-

чены данные о содержании основных химических элементов, которые составляют основу как органической, так минеральной фаз в компактном веществе кости. В процессе деминерализации у образцов группы 2А, в сравнении с первой контрольной группой образцов, наблюдалось увели-

чение относительного процентного содержания N и C – в 1,5 раза ( $p < 0,001$ ) с одновременным снижением концентрации Na – в 1,3 раза ( $p = 0,012$ ), Mg – в 2 раза ( $p < 0,001$ ). Содержание Ca и P оставалось практически без изменений. В зоне деминерализации (группа 2Б), по сравнению с нативными образцами 1-й группы, происходило значительное снижение относительного процентного содержания Ca – в 4,5 раза ( $p < 0,001$ ), P – в 3,5 раза ( $p < 0,001$ ) с одновременным увеличением относительного процентного содержания C – в 4,2 раза ( $p < 0,001$ ) и N – в 2,6 раза ( $p < 0,001$ ). Содержание Na и Mg оказалось ниже предела обнаружения прибора. У образцов группы 3А процентное соотношение изучаемых элементов практически не отличалось от такового группы 2А, однако в деминерализованной зоне содержание Ca, Na и Mg было ниже предела обнаружения прибора, а содержание P снизилось в 12,7 ( $p < 0,001$ ) раза по отношению к группе нативных костных образцов. В образцах группы 3Б и 4-й группы также не определялось наличие Ca, Na и Mg. Отмечалась наблюдаемая ранее тенденция снижения относительного процентного содержания P (которое достигло в 4-й группе в 38 раз,  $p < 0,001$ ), с одновременным увеличением относительного процентного содержания N (в 4-й группе – в 2,5 раза,  $p < 0,001$ ) и C (в 4-й группе – в 4,5 раза,  $p < 0,001$ ).

Соотношение содержания Ca/P в образцах 1-й группы составляло 1,41, группы 2А – 1,49, группы 2Б – 1,2 и группы 3А – 1,41. Кальциево-фосфатный коэффициент является важным показателем для оценки качества минерального матрикса нативной кости, используемой для изготовления костных имплантатов. Стереохимическое

соотношение Ca/P в кристаллическом апатите колеблется от 1,37 до 1,67, в аморфном фосфате оно более стабильно и составляет 1,5. Полученные нами данные сопоставимы с результатами других исследователей, изучавших элементный состав костной ткани в норме и при патологии (Аврунин, Корнилов, 2002; Герк и др., 2015; Писарева и др., 2015; Сеницкий и др., 2021).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные исследования элементного состава костных образцов на различных стадиях деминерализации методом энергодисперсионной рентгеновской спектроскопии продемонстрировали на протяжении всего эксперимента перманентное снижение относительного процентного содержания химических элементов, формирующих минеральную фазу кости и увеличение относительного процентного содержания химических элементов, формирующих органическую фазу костной ткани.

Метод элементного анализа с использованием рентгеновской спектроскопии может быть рекомендован для оценки и контроля качества получаемых костных имплантатов на различных стадиях их изготовления (заготовка, отмывка, деминерализация, деорганификация, стерилизация, консервация, хранение и др.).

## Конфликт интересов

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## Источник финансирования

Исследование выполнено в рамках государственного задания FGUU-2022-0008.

## ЛИТЕРАТУРА

- Аврунин А.С., Корнилов Н.В. Зависимость статистических и динамических параметров минерального матрикса костной ткани от соотношения кристаллических и аморфных структур. *Гений Ортопедии*. 2001; (2): 44–48.
- Герк С.А., Голованова О.А. Элементный состав костной ткани человека в норме и при патологии. *Вестник Омского университета*. 2015; 4: 39–44.
- Кирилова И.А. Деминерализованный костный трансплантат как стимулятор остеогенеза: современные концепции. *Хирургия позвоночника*. 2004; (3): 105–110.
- Литвинов Ю.Ю. Получение костных имплантатов и имплантационных препаратов с антимикробными свойствами на основе стерильного деминерализованного костного матрикса. *Вопросы биологической, медицинской и фармацевтической химии*. 2019;22(3): 21–30.
- Писарева Е.В., Власов М.Ю., Волова Л.Т. Структура и свойства биоматериалов на основе минерального компонента костной ткани. *Современные проблемы науки и образования*. 2015; 5: URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22675> (дата обращения: 14.06.2023).
- Синдо Д., Оикава Т. Аналитическая просвечивающая электронная микроскопия. М.: Техносфера, 2006. 256 с.
- Сеницкий А.И., Коркмазов М.Ю., Дубинец И.Д., Учаев Д.А., Щербаков А.А., Колесников О.Л. Особенности элементного статуса костной ткани височной кости при острых и хронических гнойных заболеваниях среднего уха. *Микроэлементы в медицине*. 2021; 22(2): 36–42.

Якубова И.И., Острянко В.И., Тиньков В.А. Рентгеноспектральный анализ в изучении структуры эмали на этапах ее формирования и вторичной минерализации. Бюллетень медицинских Интернет-конференций. 2015; 5(11): 1404–1407.

Ярыгин Н.В., Матвейчук И.В., Докторов А.А. Фреза для обработки кости. Пат. 7301, Заявка: 97111997. Опубл. 16.08.1998.

## ELEMENTAL COMPOSITION OF BONE SAMPLES AT VARIOUS STAGES OF DEMINERALIZATION

*Y.Y. Litvinov, V.V. Krasnov*

FSBSI "All-Russian Research Institute of Medicinal and Aromatic Plants"  
of the Ministry of Science and Higher Education,  
7, Grina str., 117216, Moscow, Russian Federation;  
E-mail: vilar.litvinov@mail.ru

**ABSTRACT.** The content of chemical elements in the diaphysis samples of the femur of the bull at various stages of demineralization was studied by energy dispersion X-ray spectroscopy. Regularities of the change in the content of the studied chemical elements in bone samples were established depending on the time of their demineralization. During the experiment, a constant decrease in the relative percentage of chemical elements forming the bone mineral phase and an increase in the relative percentage of chemical elements forming the bone organic phase were found. Proposed approach can be used in evaluation and quality control of obtained products of biological implantation.

**KEYWORDS:** elemental composition, bone implants, demineralized bone matrix.

### REFERENCES

Avrounin A.S., Kornilov N.V. The dependence of statistical and dynamic parameters of bone mineral matrix on the correlation of crystalline and amorphous structures. *Genij Ortopedii (Orthopaedic genius)*. 2001; (2): 44–48. (In Russ.)

Gerk S.A., Golovanova O.A. Trace element composition of human bone tissue in normal and pathological condition. *Vestnik Omskogo universiteta*. 2015; 4: 39–44. (In Russ.)

Kirilova I.A. Demineralized bone graft as an osteogenesis stimulator: current literature review. *Hirurgiâ pozvonočnika (Spine Surgery)*. 2004; (3): 105–110. (In Russ.)

Litvinov Y.Y. Production of implant preparations with antimicrobial properties on the basis of sterile demineralized bone matrix. *Voprosy biologicheskoy, medicinskoj i farmacevticheskoy himii*. 2019; 22(3): 21–30. (In Russ.)

Sindo D., Oikava T. *Analytical transmission electron microscopy*. M.: Tekhnosfera, 2006. 256.

Pisareva E.V., Vlasov M.Y., Volova L.T. Structure and features of biomaterials based on mineral component of bone tissue. *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya (Modern Problems of Science and Education. Surgery)*. 2015; 5: URL: <https://science-education.ru/ru/article/view?id=22675> (date of application: 14.06.2023).

Sinitskii A.I., Korkmazov M.Y., Dubinets I.D., Uchaev D.A., Shcherbakov A.A., Kolesnikov O.L. Features of the element status of the bone tissue of the timous bone in acute and chronic purulent diseases of the middle ear. *Mikroelementy v medicine (Trace elements in medicine)*. 2021; 22(2): 36–42. (In Russ.)

Yakubova I.I., Ostryanko V.I., Tinkov V.A. X-ray spectral analysis in the study of enamel structure at the stages of its formation and secondary mineralization. *Byulleten' medicinskih Internet-konferencij (Bulletin of medical internet conferences)*. 2015; 5(11): 1404–1407. (In Russ.)

Yarygin N.V., Matveychuk I.V., Doktorov A.A. Bone Milling Cutter. Patent: 7301, Application: 97111997. Published: 16.08.1998.