

© И.А. Талашова, Т.А. Силантьева, 2007

Лабораторное выделение кальцийфосфатных соединений из костной ткани крупного рогатого скота и определение их состава методом электронно-зондового микроанализа

И.А. Талашова, Т.А. Силантьева

The laboratory excretion of calcium phosphate compounds from the bone tissue of cattle and the determination of their composition by the method of electrone-probe microanalysis

I.A. Talashova, T.A. Silantiyeva

Федеральное государственное учреждение

«Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова Росмедтехнологий», г. Курган
(генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

Исследована зависимость элементного состава кальцийфосфатных соединений от способа их выделения из костной ткани сельскохозяйственных животных. Установлено, что максимально приближенным к минеральному матриксу костной ткани по содержанию остеотропных химических элементов является кальцийфосфатное соединение, полученное с применением 0,5 N раствора хлороводородной кислоты и насыщенного раствора гидроксида натрия.

Ключевые слова: имплантационные материалы, элементный состав, костный матрикс, остеотропные элементы.

The dependence of element composition of calcium phosphate compounds on the way of their excretion from the bone tissue of agricultural animals. It is established that calcium phosphate compound, obtained using 0,5 N of chlorohydric acid solution and saturated hydroxide sodium solution is the maximally approximated to bone tissue mineral matrix by the content of osteotropic chemical elements.

Keywords: implantation materials, element composition, bone matrix, osteotropic elements.

ВВЕДЕНИЕ

Восстановление поврежденных тканей является одной из актуальных проблем современного здравоохранения. При лечении целого ряда заболеваний, связанных с патологией костной ткани, возникает необходимость замещения костных дефектов и полостей. В современной медицине при операциях по восстановлению целостности поврежденной кости находят широкое применение материалы на основе фосфатов кальция в силу сходства их химического состава с составом костной ткани. Это биологически активные кальцийфосфатные материалы (КФМ) на основе гидроксиапатита и трикальцийфосфата, являющихся основными компонентами неорганического костного матрикса и относящихся к группе естественных метаболитов костной ткани [2, 9, 10].

Особое внимание при этом уделяется ксеноимплантатам — материалам, полученным из биологических тканей. В качестве ксеноимплантата часто используют биологический гидроксиапатит — неорганический костный матрикс, полученный из животного материала [6, 7, 8].

Стехиометрическое соотношение Са/Р в костном кристаллическом апатите составляет 1,37, весовое — 2,15. Аморфный фосфат характеризуется относительно постоянным соотношением Са/Р: стехиометрическое — 1,50, весовое — 1,94 [4]. В состав минеральной фазы кости помимо кальция и фосфора входит значительное количество ионов, которые обычно не содержатся в чистом гидроксиапатите, например, ионы магния, натрия, калия, хлора и др.

Соотношение Са/Р в имплантационных материалах является одним из показателей, характеризующих такие свойства имплантатов как биодеградация и остеокондуктивность, т.е. возможность их использования в качестве скаффолдов. Вышеперечисленные характеристики важны при выборе материалов для имплантации с учетом механической нагрузки на кость. В связи с этим в ходе данного исследования была изучена зависимость элементного состава кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани сельскохозяйственных животных, от способа их получения.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При получении кальцийфосфатных соединений (КФС) из костной ткани крупного рогатого скота (КРС) для деминерализации применяли хлороводородную кислоту различной концентрации, при осаждении фосфатов кальция использовали растворы гидроксидов натрия и кальция, а для очистки материалов от костных белков, соосадившихся при выделении неорганического матрикса, выделенный из костной ткани минерал обрабатывали раствором карбамида.

Для определения концентрации анализируемых химических элементов и их распределения в составе кальцийфосфатных соединений применяли метод рентгеновского электронно-зондового микроанализа [5].

Исследования проводили на рентгеновском электронно-зондовом микроанализаторе "INKA Energy 200" ("Oxford Instruments Analytical", Великобритания), смонтированном на сканирующем электронном микроскопе "JSM-840" ("JEOL", Япония), при ускоряющем напряжении 20 кВ и рабочем расстоянии 15 мм.

В образцах порошкообразных экспериментальных материалов, нанесенных на алюминиевую подложку при помощи клея на основе этилцианакрилата, определяли распределение и концентрацию анализируемых химических элементов. Результаты исследования получали в виде элементных карт (SmartMap), распределения по линии сканирования (LineScan) и данных количественного анализа в весовых процентах. Ана-

литической пробой считали гранулу экспериментального материала, закрепленную на подложке; аналитической навеской – участок поверхности гранулы при микроскопном увеличении 1000.

Для получения электронных изображений со сканирующего микроскопа образцы напыляли тонким слоем платины в ионном напылителе "IB-6" ("EIKO", Япония).

Для стандартизации результатов и обеспечения 98 % точности измерений калибровку прибора проводили по образцу-этalonу волластонита ($\text{CaO} \cdot \text{SiO}_2$), а коррекцию силы тока по образцу кобальта - через каждые 20 минут работы прибора.

Полученные результаты исследований были обработаны с помощью методов непараметрической статистики с использованием U-критерия Манна-Уитни для независимых выборок, поскольку наблюдаемые признаки не подчинялись нормальному распределению. Количество образцов в каждой из трех групп исследуемых материалов $n=15$, различия между группами наблюдений считались статистически значимыми при вероятности $p_0 < 0,01$. При статистической обработке результатов исследования применяли пакет прикладных программ StatSoft Statistica 6.0, а также программное обеспечение для анализа и обработки данных AtteStat 1.0 (И.П. Гайдышев, 2003), разработанное в лаборатории информационно-вычислительного центра ФГУ «РНЦ «ВТО» им. акад. Г.А. Илизарова Росмедтехнологий» [3].

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Исходное сырье подготавливали следующим образом: трубчатые кости КРС очищали от парасальных тканей механическим путем и измельчали при минимальном нагревании до частиц размером не более 0,5 см по любому из трех измерений, промывали теплой ($t=30-45^\circ \text{C}$) водой с добавлением нейтрального детергента, ополаскивали дистиллированной водой. Далее подготовленную костную ткань обрабатывали тремя различными способами.

1. Получение кальцийфосфатного соединения I (КФС I) – измельченную костную ткань деминерализовали 0,5 N раствором HCl. По завершении декальцинации жидкую часть взвеси отделяли фильтрацией. Кальцийфосфатные соединения осаждали из раствора добавлением при перемешивании насыщенного раствора NaOH до достижения значений pH реакционной среды 7,5-7,8, при этом отмечали обильное выпадение осадка. Взвесь отстаивалась, после чего декантированием удаляли максимально возможное количество надосадочной жидкости, а осадок центрифугировали на центрифуге ЦЛР-1 (1400 г × 30 мин.) для удаления оставшейся жидкости. Полученное пастообразное вещество многократно промывали дис-

тиллированной водой до значения pH промывных вод 6,0-6,5, отжимали на центрифуге ЦЛР-1 (1400 г × 30 мин.), выкладывали на эмалированный противень и высушивали в термостате при $t=37^\circ \text{C}$. Высушенный продукт измельчали в фарфоровой ступке.

2. Получение кальцийфосфатного соединения II (КФС II) – осаждение фосфатных солей кальция проводили аналогично технологии I, а затем полученный порошок заливали 8M раствором карбамида и выдерживали в течение 24 ч для удаления костных белков, соосадившихся вместе с минеральными солями. Надосадочную жидкость удаляли декантированием, осадок центрифугировали на центрифуге ЦЛР-1 (1400 г × 30 мин.). Далее продукт многократно промывали дистиллированной водой до значения pH промывных вод 6,0-6,5, отжимали на ЦЛР-1 (1400 г × 30 мин.), выкладывали на эмалированный противень и высушивали в термостате при $t=37^\circ \text{C}$. Высушенный продукт измельчали в фарфоровой ступке.

3. Получение кальцийфосфатного соединения III (КФС III): деминерализацию костной ткани проводили с использованием 6 N раствора HCl, а для осаждения минеральных солей использовали

раствор гидроксида кальция, полученного гашением CaO дистиллированной водой. Раствор гидроксида кальция добавляли до достижения значения pH реакционной среды 7,5-7,8, при этом обильно выпадал осадок солей кальция. Надосадочную жидкость удаляли декантированием, осадок центрифугировали на центрифуге ЦЛР-1 ($1400 \text{ g} \times 30 \text{ мин.}$). Далее продукт многократно промывали дистиллированной водой до значения pH промывных вод 6,0-6,5, отжимали на центрифуге ЦЛР-1 ($1400 \text{ g} \times 30 \text{ мин.}$), выкладывали на эмалированный противень и высушивали в термостате при $t=37^\circ\text{C}$. Высушенный продукт измельчали в фарфоровой ступке.

При исследовании полученных кальцийфосфатных соединений методом сканирующей электронной микроскопии установлено, что все образцы представляют собой порошкообразные смеси с включениями гранул различного диаметра (рис. 1).

В образцах материалов КФС I и КФС II гранулы имеют неправильную форму, острые грани и плотную шероховатую поверхность (рис. 1, а, б).

Их диаметр колеблется в интервале между 100 мкм и 2000 мкм. В образце материала КФС III гранулы неправильной формы со сглаженными гранями отличаются рыхлой консистенцией (рис. 1, в). Их диаметр не превышает 500 мкм.

При большем увеличении электронного микроскопа видно, что поверхности гранул исследуемых материалов отличаются друг от друга. На поверхности гранулы материала КФС I (рис. 2, а) отчетливо видны тонкие слоистые структурные образования. Частицы на поверхности гранулы материала КФС II (рис. 2, б) в отличие от материала КФС I имеют округлую форму, а частицы на поверхности гранулы материала КФС III (рис. 2, в) соединены между собой и представляют более мелкие и округлые, по сравнению с материалом КФС II, образования.

В ходе проведенного количественного анализа химических элементов, входящих в состав кальцийфосфатных материалов, получены следующие результаты, которые подробно представлены в таблице 1.

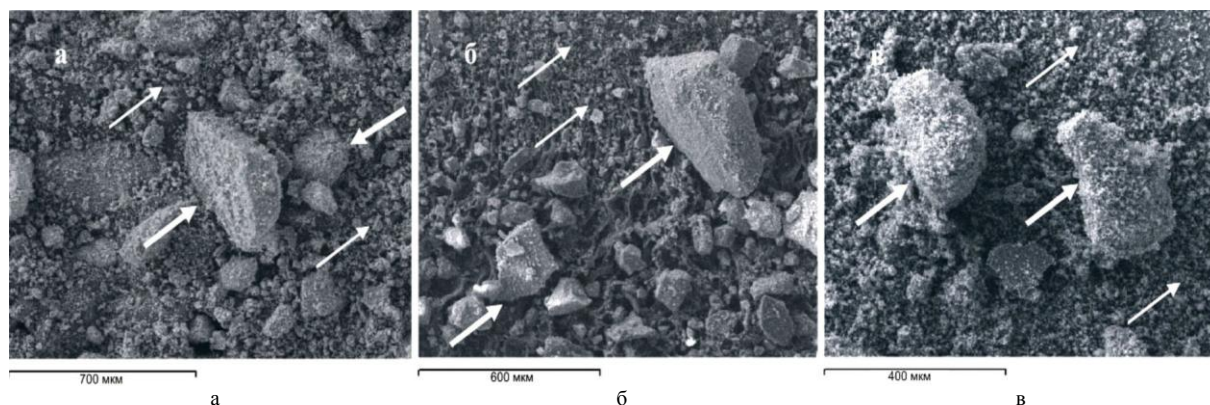


Рис. 1. Структура образцов исследуемых материалов: а – образец КФС I, ув. 70; б – образец КФС II, ув. 80; в – образец КФС III, ув. 120. Порошкообразный компонент указан тонкими стрелками, гранулярный – толстыми стрелками. Электронные сканограммы

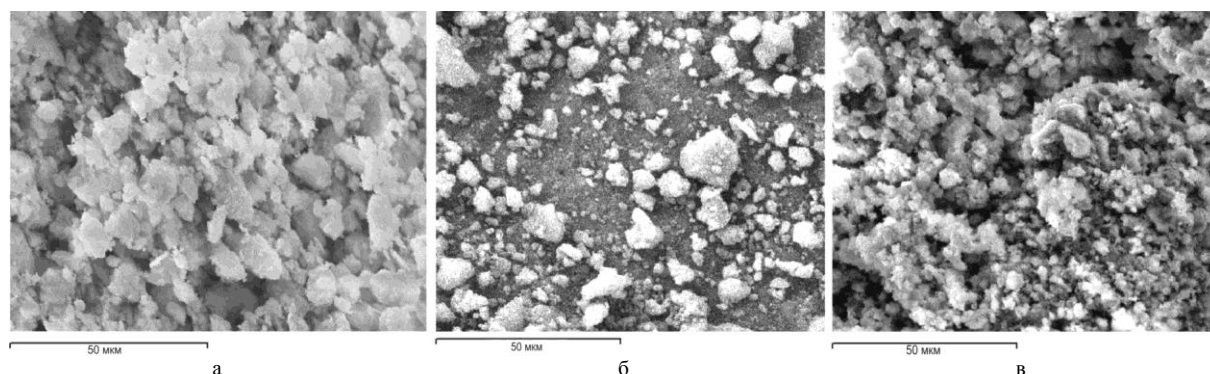


Рис. 2. Структура поверхности гранул образцов исследуемых материалов: а – образец КФС I, ув. 1000; б – образец КФС II, ув. 1000; в – образец КФС III, ув. 1000. Электронные сканограммы

Таблица 1

Содержание химических элементов

Соединение	n	Содержание химических элементов в образце, вес. %					
		Кальций	Фосфор	Магний	Натрий	Сера	Хлор
КФС I	15	33,18±1,88*	15,71±1,52*	0,43±0,07*	0,35±0,08	0,07±0,03	-
КФС II	15	28,26±2,16	12,36±1,34#	0,40±0,09#	0,28±0,08	-	0,58±0,15
КФС III	15	28,07±2,33	9,63±1,65	0,10±0,06	0,29±0,15	-	2,54±0,93

* - значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих значений КФС II и КФС III ($p_U < 0,01$); # - значения, статистически значимо отличающиеся от соответствующих значений КФС III ($p_U < 0,01$)

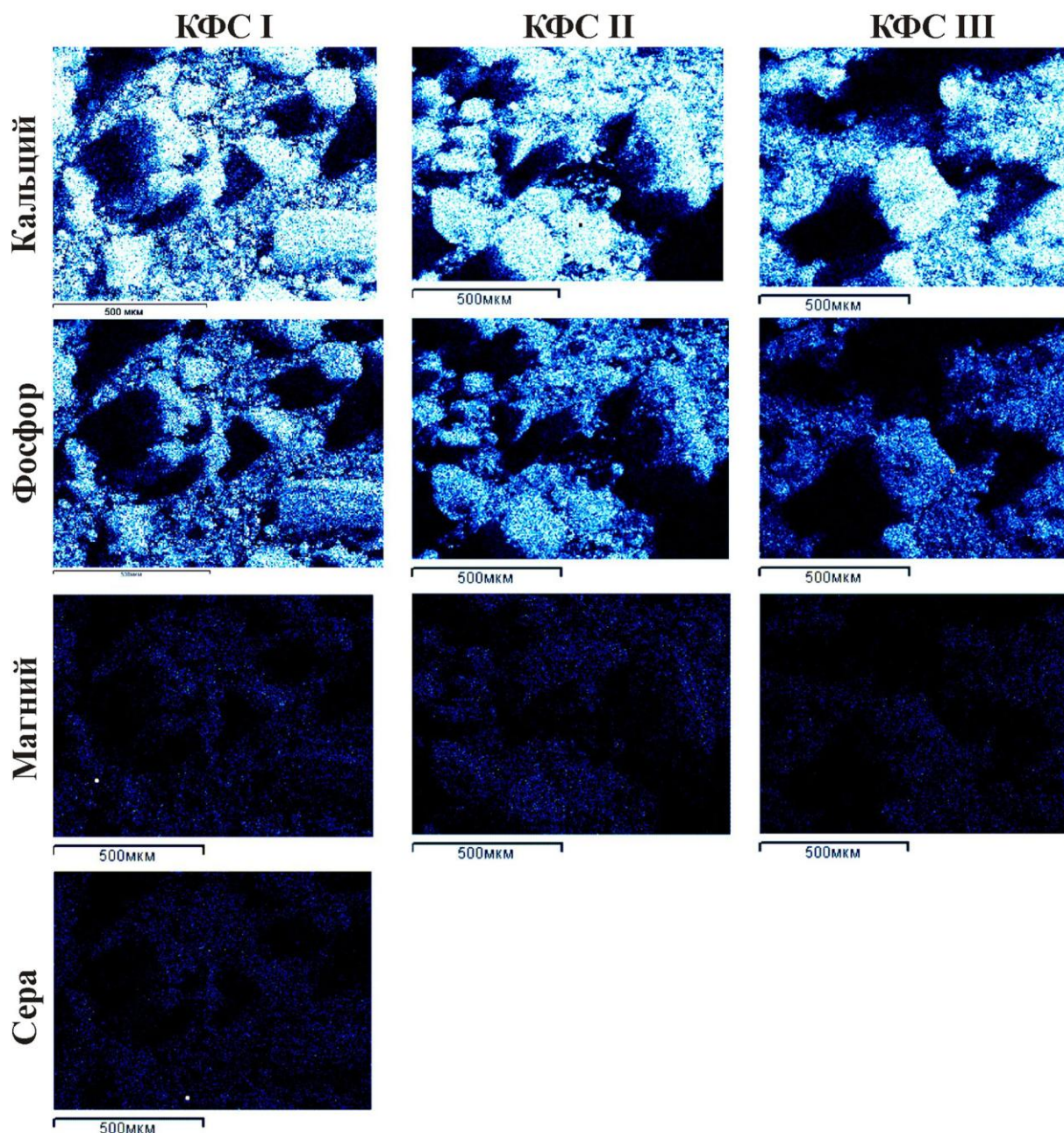


Рис. 3. Распределение химических элементов кальция, фосфора, магния и серы на картах рентгеновского электронно-зондового микроанализа образцов кальцийфосфатных материалов

Следует отметить, что концентрации остеотропных элементов кальция, фосфора и магния значимо выше в образце КФС I, а в образце КФС II – содержание фосфора и магния превышает значения, полученные для образца КФС III ($p < 0,01$).

В экспериментальных образцах определяли соотношение количества кальция и фосфора. Результаты исследований представлены в таблице 2.

Таблица 2

Соотношение количества кальция и фосфора в полученных кальцийфосфатных соединениях

Соединение	Соотношение количества кальция и фосфора
КФС I	2,11
КФС II	2,29
КФС III	2,91

Данные об элементном составе полученных соединений свидетельствуют о том, что материал КФС I наиболее близок по своему составу к костному матриксу животных, включая кальций, фосфор, магний, натрий и серу, в отличие от материалов КФС II и КФС III, в составе которых занижено содержание кальция и фосфора, отсутствует сера, но присутствует хлор. Учитывая, что соотношение содержания кальция и фосфора в чистом гидроксиапатите равно 2,15, можно утверждать, что материал КФС I по содержанию в нем кальция и фосфора ($Ca/P = 2,11$) максимально приближен к основной минеральной составляющей костной ткани – гидроксиапатиту.

ВЫВОДЫ

Таким образом, в результате проведенного исследования установлено, что качественный состав и структура кальцийфосфатных соединений, выделенных из костной ткани сельскохозяйственных животных, зависит от концентрации хлороводородной кислоты, применяемой для деминерализации костной ткани, качественного состава реагента, используемого для осаждения минеральной фазы, и дополнительной обработки полученного вещества раствором карбамида.

При использовании для выделения кальцийфосфатных соединений из костной ткани сельскохозяйственных животных концентрированных растворов хлороводородной кислоты и рас-

твор карбамида для очистки полученного вещества от костных белков происходит потеря таких остеотропных элементов как фосфор, магний и сера, что может негативно сказаться на биосовместимости имплантационных кальцийфосфатных материалов [1].

По соотношению содержания кальция и фосфора наиболее близким к основной минеральной составляющей костной ткани – гидроксиапатиту – является кальцийфосфатное соединение, выделенное из костной ткани КРС с использованием слабых растворов хлороводородной кислоты для ее деминерализации и насыщенного раствора гидроксида натрия для осаждения фосфатов кальция.

ЛИТЕРАТУРА

1. Касавина, Б. С. Жизнь костной ткани / Б. С. Касавина, В. П. Торбенко. - 2-е изд. - М. : Наука, 1979. - 176 с.
2. Леонтьев, В. К. Биологически активные синтетические кальций-фосфатсодержащие материалы для стоматологии / В. К. Леонтьев // Стоматология. - 1996. - № 5. - С. 4-6.
3. Реброва, О. Ю. Статистический анализ медицинских данных. Применение пакета прикладных программ STATISTICA / О. Ю. Реброва. - М. : МедиаСфера, 2002. - 312 с.
4. Смолеговский, А. М. История кристаллохимии фосфатов / А. М. Смолеговский. - М. : Наука, 1986. - 263 с.
5. Шахламов, В. А. Применение метода рентгеноспектрального локального микроанализа в биологии и медицине / В. А. Шахламов, С. В. Буравков // Архив АЭГ. - 1983. - Т. LXXXIV, № 4. - Режим доступа : <http://lab.wolf.ru/Test/Papers/Microanalysis.htm>.
6. Пат. 2232585 Российская федерация, МПК7 А 61 К 35/32; F 2/28, L27/00, 27/54; P 19/00. Способ приготовления биоактивного костно-пластического материала «Депротекс» / Кириллова И. А. - № 2001105849/15; заявл. 01.03.2001; опубл. 20.02.2002, Бюл. № 35.
7. Заявка № 2005100254 Российская Федерация, МПК7 А 61 К 31/00. Биоимплантат для возмещения дефектов минерализованных тканей и способ его получения / Шевцов В.И., Талашова И. А., Лунева С. Н., Ковинька М. А. заявитель ФГУ «РНИЦ «ВТО» им. акад. Г. А. Илизарова. - заявл. 11.01.2005; опубл. 20.06.2006, Бюл. № 18.
8. Biobon® for effective bone engineering. - Режим доступа : <http://www.biometmerck.com/english/products/biomaterials/biobon.htm>.
9. Osseous substance formation induced in porous calcium phosphate ceramics in soft tissues / C. Klein [et al.] // Biomaterials. - 1994. - Vol. 15. - P. 31-34.
10. Osteogenesis in extraskeletal implanted porous calcium phosphate ceramics: variability among different kinds of animals / Z. Yang [et al.] // Biomaterials. - 1996. - Vol. 17. - P. 2131-2137.

Рукопись поступила 12.10.06.