

Е.С. Ихалайнен¹, И.В. Гайворонский^{1,2},
В.В. Хоминец¹, А.А. Семенов¹, О.М. Фандеева¹

Сравнительная характеристика химического состава костной ткани мышечелков бедренной кости в норме и при деформирующем артрозе

¹Военно-медицинская академия им. С.М. Кирова, Санкт-Петербург

²Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург

Резюме. Представлен сравнительный анализ химического состава медиального и латерального мышечелков бедренной кости в норме и при деформирующем артрозе III степени. Установлено, что при дегградации костной ткани бедренной кости от поверхности в глубину наблюдаются снижение кристалличности, количественное и качественное изменения органического костного матрикса, в частности снижение доли белковой составляющей, изменение фазового неорганического состава, повышенная степень замещения кальция в гидроксипатите на ионы других металлов. Причем наиболее резкие изменения наблюдаются в костной ткани, расположенной вблизи патологически деформированных участков. Показано, что данные для нормальной костной ткани латерального и медиального мышечелков одного образца отличаются, что может быть вызвано разной степенью нагрузки на сами мышечелки в процессе жизнедеятельности организма, обусловленной несимметричностью и различной формой их суставных поверхностей. При деформирующем артрозе в поверхностном слое костной ткани возрастает концентрация кальция и ряда других металлов, в то время как доля белковой составляющей снижается. Выявлено, что в поражённой кости происходит замещение фосфатных тетраэдров карбонат-ионами, а также замещение катионов двухвалентного кальция ионами других металлов, таких как медь и марганец, и особенно катионами трехвалентного железа. Это нарушает общую структуру кристаллической решётки гидроксипатита и влияет на биомеханические свойства поверхности, в частности снижение трофики и упругости поверхности. В остеофитных пробах происходит частичная замена фосфатных групп на карбонатные группы. Изоморфные структурные замещения, вызванные отложением кристаллических примесей, приводят к изменению соотношения концентраций кальция и фосфора. Чрезмерное отложение солей кальция приводит к образованию остеофитов.

Ключевые слова: бедренная кость, химический состав, артроз, рентгенофазовый анализ костей, атомно-абсорбционная спектроскопия костей, мышечелки, костная ткань, деформирующий артроз.

Введение. Костная ткань – одна из важнейших тканей организма, обеспечивающая в его жизнедеятельности различные функции [2]. Нарушения функционирования костной ткани проявляются в виде ряда заболеваний. В основе патогенеза многих из них лежит изменение химического состава костей, а следовательно, и изменение в организме в целом обменных процессов. Естественно, что количественные изменения химического состава костной ткани отражаются на физических свойствах кости. Основными химическими компонентами костной ткани являются гидроксипатит, другие минеральные вещества и органический матрикс. Исследование градиента концентрации гидроксипатита и минеральных включений в ячеистой структуре кости позволит показать наличие качественных и количественных изменений в неорганическом компоненте трубчатых костей и установить их взаимосвязь с имеющимися в них морфологическими преобразованиями [4].

Состав костных тканей человека изучают с помощью физико-химических методик, таких как рентгенофазовый анализ (РФА), рентгенофлуоресцентный

анализ, инфракрасная спектрометрия, ядерно-магнитный резонанс и т. д. [6, 3]. В настоящее время РФА применяется для исследования костных объектов в палеонтологии и археологии, а также для определения биосовместимости различных имплантов с костью в травматологии и ортопедии [12].

Результаты научных исследований с успехом применяются в передовых медицинских исследованиях, например в ортопедии и стоматологии. Изучение дифракционных спектров костей позволяет получить новую и крайне важную информацию о соотношении кальция и фосфора в организме, а также об изменениях костного индекса кости с течением жизни организма. Данная информация очень важна в биомедицинской инженерии, так как покровные материалы имплантов сильно влияют на межповерхностные взаимодействия в биологических системах, в частности при имплантации в костную или губчатую ткань.

Основным минеральным компонентом костной ткани является гидроксипатит (ГА). Функциональные свойства ГА сильно зависят от его структуры, стереометрического соотношения кальция и фосфора, степени кристалличности, а также размеров кри-

сталлических фаз на поверхности и в объёме кости. В настоящее время растёт интерес к использованию биоматериалов на основе ГА для восстановления повреждённых костей и скелетных дефектов. Проводится ряд исследований, направленных на определение биосовместимости имплантов, имеющих поверхностное напыление металлов, с костью [11].

Данные о морфологии костной ткани могут быть получены с помощью различных микроскопических методик. Н.В. Старостенко и др. [5] указывают на то, что кости содержат внутренний трабекулярный слой с 50–90%-ной пористостью, в то время как наружный слой имеет пористость порядка 5–12%. Эти слои сильно отличаются по размеру пор, общей пористости, механическим свойствам и поверхностному окружению.

Известно, что ГА образует гексагональную кристаллическую решётку с пространственной группой $R\bar{6}3/M$ и состоит из 44 атомов в элементарной ячейке [4]. Элементарная ячейка содержит два различных кристаллографических типа ионов кальция, расположенных в цепочку вдоль грани элементарной ячейки и вдоль винтовой оси. Столбчатый кальций образует параллель с с-осью и располагается приблизительно на середине высоты между двумя ионами кислорода. Кальций, расположенный по винтовой оси, связывает расположенные в центре ОН-группы и образует равносторонний треугольник. Данные треугольники ориентированы вдоль оси с в аб плоскости. Размер пластинок ГА составляет около 50 нм в длину, 25 нм в ширину и 3 нм в толщину. В качестве нормального показателя кальцификации кости используют термин «костный индекс» (КИ), в норме имеющий значения 1,8–2,2 у. е. В то же время возможно другое представление степени кристалличности, такое как соотношение количества атомов кальция к количеству атомов фосфора (10:6). Медицинские исследования все чаще сфокусированы на понимании влияния структуры ГА на биохимические свойства поверхности новых медицинских композиционных материалов.

В исследовании Н. Jenssen et al. [10] показано, что индекс кристалличности (ИК) Са растёт с возрастом. Обнаружено, что даже небольшое замещение ионов кальция в поверхностном слое кости ионами меди приводит к резкому возрастанию величины поверхностной энергии и появлению цитотоксических эффектов. Результаты данных исследований позволяют предположить связь между степенью замещения кальция ионами других металлов и скоростью деформации костной ткани [14].

Цель исследования. Изучение с помощью химико-физических методик химического состава костной ткани мышечков бедренной кости в норме и при деформирующем артрозе III степени.

Материалы и методы. Исследованы 3 интактных бедренных кости (6 проб) и 3 бедренных кости, име-

ющих внешние признаки деформирующего артроза (6 проб). Мацерация интактных и изменённых костей проводилась в одинаковых условиях. Возраст женщин, которым принадлежали кости, также был примерно одинаковым – 65–70 лет. Исследование ГА проводилось на установках для РФА, элементный анализ – на атомно-абсорбционном спектрометре «ИМГА-915 МД» на базе химического факультета Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова и института элементарноорганических соединений им. А.Н. Несмеянова Российской академии наук.

Для приготовления костного гомогенизата в центре медиального и латерального мышечков бедренной кости на площади 1 см выпиливали параллелепипед с фиксированными размерами ребер. Из его поверхностного и глубокого слоев путем перетирания в ониксовой ступке готовился порошок костной ткани. Поверхностный слой представлял собой замыкательную пластинку компактного вещества, а глубокий – слой губчатого вещества, расположенный на глубине 3–5 мм под замыкательной пластинкой. Из каждого слоя получалось по 0,5 см порошка костной ткани.

Полученный костный гомогенизат анализировали в виде сухих порошкообразных проб. Состав различных спилов сравнивали между собой, с контрольными значениями ГА и других соединений. Анализ костной ткани проводили способом рентгенофазовой порошковой дифракции на дифрактометре «Huber (CuK α)» сканированием с шагом 0,03 в 2-диапазоне 6–110 с использованием геометрии Брегга-Брентано. Соотношение концентраций ГА, а также примесей в компактной и губчатой костных тканях изучала путем сравнения полученных дифракционных пиков с контрольными параметрами из кристаллохимической базы данных ICDB посредством программы WinXPow. Выбирали наилучшее соотношение пик/фон в данном рабочем режиме.

Качественные и количественные данные рентгенофазового анализа подтверждали и дополняли с помощью элементного анализа и атомно-абсорбционной спектроскопии. Для исследования элементного состава образцов определяли процентное содержание основных органических элементов (C, H, N) и около 50 гетероэлементов (Ca, Fe, Sr, Ba и др.).

Результаты и их обсуждение. В образцах интактной костной ткани, взятой с поверхности ($h=0,2$ см) обоих мышечков, присутствуют как органическая, так и неорганическая компоненты. Неорганическая часть содержит в основном ГА и карбонат кальция. ГА представлен фазами смешанного переменного состава с частичным замещением $Ca_{9-x}Me_x(PO_4)_6(OH)_2$. Степень замещения составляет $x=0,1-2\%$, где замещающими химическими элементами были Me – металлы (Fe, Mg, Zn, Sr). Полученные нами данные согласуются с данными других исследователей, наблюдавших замещение двухвалентного катиона кальция трехвалентными катионами в структуре ГА [1, 13]. Также в латеральном

мышцелке был обнаружен кристаллический оксалат кальция, что говорит о его насыщенности безазотистыми органическими компонентами. Вследствие близких величин значения ионных радиусов Ca и Me, а также наличия сходных сингоний и близких параметров элементарных ячеек у гидрофосфатов этих металлов данное замещение представляется возможным.

В изученных образцах костной ткани от поверхности в глубину мышцелка количество органической и аморфных фаз нарастает, а концентрация Ca падает. Основным гликопротеином костной ткани является хондроитин-сульфат, состоящий из остатка глюкуроновой кислоты и сульфатированный в положение 4 или 6 N-ацетилглюкозамин. Кроме него, в костной ткани были обнаружены другие гликозаминогликаны: гиалуроновая кислота, состоящая из остатков уронеовой кислоты и глюкозамина, а также кератан-сульфат, состоящий из остатков глюкозы и 6-сульфо-N-ацетилглюкозамина. Данные классы соединений входят в состав высокомолекулярных кластеров, биохимическая функция которых изучена недостаточно. D.A. Cardoso at al. [7] показали их участие в процессах минерализации, а также повышение концентрации с возрастом.

Согласно данным атомно-абсорбционной спектроскопии, массовые доли углерода и азота возрастают незначительно, в то время как массовая доля водорода остается практически неизменной. Это косвенно свидетельствует о возрастании в образцах количества белковой составляющей. Содержание различных химических элементов для нормальной ткани латерального и медиального мышцелков одного костного образца отличается. Это может быть вызвано разной степенью нагрузки на сами мышцелки в процессе жизнедеятельности организма, обусловленной

несимметричностью и различной формой их суставных поверхностей. Данные качественного и количественного анализов органической и неорганической фаз, полученные методом атомно-абсорбционной спектроскопии, приведены в таблице 1 и полностью согласуются с результатами РФА. В поверхностном слое интактной костной ткани латерального мышцелка массовые доли кальция и фосфора находятся в пределах нормы (2, 15).

Установлено, что в поверхностном слое латерального мышцелка значительно повышено содержание двух- и трехвалентных катионов железа (в три раза), марганца (в два раза), а в медиальном мышцелке – марганца (в два раза), серы (в 1,2 раза), калия (в 1,2 раза), цинка (на четверть) и меди (в 2,3 раза). Это свидетельствует о замещении ионов кальция в структуре ГА вышеуказанными катионами и, как следствие, об изменениях механопрочностных свойств костной ткани.

Однозначно идентифицировать весь фазовый состав представляется затруднительным. В поверхностном слое медиального мышцелка бедренной кости отмечается некоторое снижение массовых долей кальция и фосфора, а костный индекс находится в пределах нормы (2,1 у. е.).

В глубоком слое заметно увеличивается доля органической компоненты. Массовая доля углерода и азота в этом слое больше на 0,3 и 0,2% соответственно. Изменение степени кристалличности костной ткани на различной глубине согласуется с S.V. Dorozhkin at al. [9], определявших кальцификацию костей в компактном и губчатом слоях с помощью ИК. Степень минерализации костной ткани влияет на прочностно-механические свойства, что в свою очередь позволяет судить о степени деградации и возможности к восстановлению данного участка костной ткани.

Таблица 1

Концентрация гетероэлементов в поверхностном слое костной ткани латерального и медиального мышцелков бедренной кости в норме

Элемент	ЛМБ	ММБ
Ca, м. д.	20±0,5	19,4±0,5*
P, м. д.	9,3±0,2	9,2±0,2*
Na, м. д.	0,7±0,2	0,6±0,2*
Fe, м. д.	0,16±0,004	0,68±0,2*
Mg, м. д.	0,21±0,005	0,199±0,005
S, м. д.	0,141±0,004	0,174±0,004
Zn, м. д.	0,034±0,001	0,043±0,001
K, м. д.	0,048±0,001	0,06±0,002
C, %	18,5±0,1	17,3±0,1*
H, %	3,15±0,03	3,2±0,03*
N, %	4,8±0,1	5,2±0,1*
Sr, м. д.	121±6	120±6*
Al, м. д.	45±2	46±2*
Mn, м. д.	9±0,5	24±1*
Cu, м. д.	9±0,5	28±1*
Ba, м. д.	15±0,8	16±0,8*

Примечание: ЛМБ – латеральный мышцелок бедра; ММБ – медиальный мышцелок бедра; м. д. – массовая доля; * – p<0,05.

В глубоком слое медиального мышечка бедренной кости массовые доли углерода, азота и водорода увеличиваются на 0,2; 0,3 и 0,6% соответственно, что свидетельствует об общем увеличении доли органического матрикса и качественно подтверждается увеличением фона в начальном диапазоне углов на дифрактограммах.

В медиальном мышечке, по сравнению с латеральным мышечком, органическая компонента выражена менее явно, но изменяется качественный состав, что согласуется с данными атомно-абсорбционной спектроскопии и результатами РФА.

Разница в массовых долях углерода и азота в глубоком слое латерального и медиального мышечков составляет – 0,7 и + 0,7 массовых процентов соответственно, в то время как разница в массовых процентах по водороду составляет лишь + 0,2. Это свидетельствует о большем количестве гликозамингликановой и коллагеновой составляющих в медиальном мышечке.

При деформирующем артрозе в двух наблюдениях в губчатом веществе медиального мышечка ($h=0,5$ см) была обнаружена костная киста размером $1 \times 0,7$ см. Элементный состав органической части кисты показал, что массовая доля углерода по сравнению с интактными поверхностями медиального и латерального мышечков в 3,5 раза выше, водорода – более чем в два раза. Массовая доля азота содержимого кисты по сравнению с костной тканью в губчатом веществе меньше в семь с половиной раз. Эти данные говорят о небелковом составе содержимого кисты.

Исследование фазового состава кисты позволило выявить наличие стеаратов, пальмитатов, бензоатов, уратов, капратов и цитратов натрия. Эти углеводные компоненты входят в состав гликозаминогликанов костной ткани. Неорганическая кристаллическая составляющая по результатам РФА в кисте не зафиксирована.

Исследование патологически измененных образцов костной ткани при деформирующем артрозе III степени выявило наличие повышенного уровня фона рентгеноаморфной компоненты в начальном угле рентгенограммы. Сравнение дифрактограмм порошка костной ткани в области остеофита с порошком нормальной костной ткани свидетельствует о снижении степени кристалличности гидроксиапатита в патологически измененной кости. В данном случае включение примесных фаз и степень замещения Са ионами других металлов, возможно, являются причинами повышенной твердости костной ткани [8].

Установлено, что поражение мышечков бедренной кости при деформирующем артрозе развивается от поверхности к глубинным слоям. Это отчетливо видно при сравнении дифрактограмм горизонтальных срезов.

Состав самых глубоких слоев губчатого вещества мышечков бедренной кости при деформирующем артрозе максимально близок к составу интактной кости. При этом в поверхностном слое мышечков

концентрации гетероэлементов изменялись неоднородно. Количество кальция и фосфора выросло на 20%, при этом костный индекс остался прежним (2,11 у. е.), содержание железа снизилось на 40%. Концентрации микроэлементов алюминия и бария выросли почти в полтора раза, в то время как доли марганца и меди уменьшились. Массовые доли углерода и азота снизились на 20%, что свидетельствует о снижении доли белковой компоненты среди органических веществ. Вместе с тем отчетливо определяется прямая зависимость между уровнем нарушения обмена веществ в костной ткани и степенью деформирующего артроза. Выявлено, что в составе ГА из остеофитной пробы в сравнении с нормальным ГА существенно повышено содержание железа, цинка, бария и других элементов.

Заключение. Установлено, что поверхностные и глубокие слои мышечков интактной бедренной кости при деформирующем артрозе III степени отличаются по химическому составу. При этом обнаружены отличия в строении и химическом составе костной ткани медиального и латерального мышечков в норме. Полученные данные и используемые методики могут применяться для качественной оценки состояния костной ткани.

Литература

1. Брик, А.Б. Биоминералогические подходы к изучению изоморфных замещений и мест локализации примесей в наноразмерных подсистемах эмали и дентина зубов / А.Б. Брик [и др.] // Минералогич. журн. – 2008. – Т. 30. – С. 13–25.
2. Гайворонский, И.В. Вариантная анатомия и морфометрическая характеристика мышечков большеберцовой кости взрослого человека / И.В. Гайворонский [и др.] // Морфолог. науки и клин. мед. – СПб., 2015. – С. 44–47.
3. Лемешева, С.А. Состав и структура костных тканей человека как отражение процессов патогенной минерализации при коксартрозе / С.А. Лемешева [и др.] // Вестн. Ом. ун-та. – 2010. – № 2. – С. 106–112.
4. Накоскин, А.Н. Изменения биохимического состава бедренной кости у людей разного возраста / А.Н. Накоскин [и др.] // Проблемы старения и долголетия. – 2008. – Т. 17. – С. 21–26.
5. Старостенко, Н.В. Замещение кальция и фосфора на празеодим и кремний в структуре гидроксиапатита / Н.В. Старостенко [и др.] // Журн. неорган. химии. – 2012. – Т. 57. – С. 1274–1277.
6. Chappard, C. Analysis of hydroxyapatite crystallites in subchondral bone by Fourier transform infrared spectroscopy and powder neutron diffraction methods / C. Chappard [at al.] // Comptes Rendus Chimie. – 2015. – Vol. 19. – P. 1625–1630.
7. Cardoso, D.A. Synthesis and application of nanostructured calcium phosphate ceramics for bone regeneration / D.A. Cardoso [at al.] // J. Biomed. Mater. Res. Part B. – 2012. – P. 2316–2326.
8. Chandramohan, D. Contribution of Biomaterials to Orthopaedics as Bone Implants – A Review / D. Chandramohan [at al.] // International Journal of Materials Science. – 2010. – Vol. 5. – P. 399–409.
9. Dorozhkin, S.V. Biological and Medical Significance of Calcium Phosphates / S.V. Dorozhkin [at al.] // Angew. Chem. Int. Ed. – 2002. – Vol. 41. – P. 3130–3146.
10. Jenssen, H. Antimicrobial peptides on calcium phosphate-coated titanium for the prevention of implant-associated infections / H. Jenssen [at al.] // Biomaterials. – 2010. – Vol. 31. – P. 9519–9526.

11. Kay, M.I. Crystal structure of hydroxyapatite / M.I. Kay [at al.] // Nature. – 1964. – Vol. 204. – P. 1050–1052.
12. Nacarino-Meneses, C. Multidisciplinary characterization of the long-bone cortex growth patterns through sheep's ontogeny / C. Nacarino-Meneses [at al.] // Journal of Structural Biology. – 2015. – Vol. 191. – P. 1–9.
13. Rao, D.V. Synchrotron-based XRD from rat bone of different age groups / D.V. Rao [at al.] // Materials Science and Engineering C. – 2017. – № 74. – P. 207–218.
14. Schaffler, M.B. Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone / M.B. Schaffler [at al.] // Bone. – 2004. – Vol. 34. – P. 443–453.

E.S. Ihalainen, I.V. Gayvoronsky, V.V. Khominets, A.A. Semenov, O.M. Fandeeva

Comparative chemical composition analysis of femoral condyles bone tissue in health and in deforming arthrosis

Abstract. *A comparative analysis of the chemical composition of the medial and lateral condyles of the femur in norm and with deforming arthrosis of the third degree is presented. It was found that when the bone tissue of the femur is degraded from the surface, a decrease in crystallinity is observed in depth, quantitative and qualitative changes in the organic bone matrix, in particular, a decrease in the proportion of the protein component, a change in the phase inorganic composition, and an increased degree of substitution of calcium in hydroxyapatite for ions of other metals. And the most dramatic changes are observed in bone tissue located near the pathologically deformed areas. It is shown that the data for normal bone tissue of the lateral and medial condyle of one specimen differ, which can be caused by different degrees of stress on the condyles themselves in the process of vital activity of the organism caused by asymmetry and a different shape of their articular surfaces. With deforming arthrosis in the surface layer of bone tissue, the concentration of calcium and a number of other metals increases, while the proportion of the protein component decreases. It was revealed that in the affected bone replacement of phosphate tetrahedra with carbonate ions occurs, as well as substitution of cations of divalent calcium with ions of other metals such as copper and manganese, and especially ferric cations. This breaks the overall structure of the crystal lattice of hydroxyapatite and affects the biomechanical properties of the surface, in particular, the reduction of trophism and the elasticity of the surface. In osteophyte tests, partial replacement of phosphate groups with carbonate groups occurs. Isomorphous structural substitutions caused by deposition of crystalline impurities lead to a change in the ratio of calcium and phosphorus concentrations. Excessive deposition of calcium salts leads to the formation of osteophytes.*

Key words: *human femur bone, chemical composition, bones powered X-ray diffraction, bones atomic absorption spectroscopy, condyles, bones, hydroxyapatite, arthrosis, deforming arthrosis, bone tissue, condyles.*

Контактный телефон: 8-981-856-46-13; e-mail: semfeodosia82@mail.ru