

02

Сравнительный спектральный анализ ксеноматериалов из губчатого и компактного компонентов костной ткани

© П.Е. Тимченко¹, Е.В. Тимченко¹, Е.В. Писарева¹, М.Ю. Власов², О.О. Фролов¹, Л.Т. Волова², Р.Т. Самигуллин¹, С.С. Сергеева¹

¹ Самарский национальный исследовательский университет им. акад. С.П. Королева, 443086 Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет, биотехнологический центр „БиоТех“, 443099 Самара, Россия

e-mail: laser-optics.timchenko@mail.ru

Поступила в редакцию 21.12.2021 г.

В окончательной редакции 26.01.2022 г.

Принята к публикации 23.03.2022 г.

Представлены результаты сравнительного анализа спектров комбинационного рассеяния ксеноматериалов из губчатого и компактного компонентов костной ткани после проточной делипидации. В качестве объектов исследований были использованы 36 образцов ксеноматериалов, полученных по технологии „Лиопласт“[®], по 18 образцов из губчатой и 18 образцов компактной костной ткани. Проточная делипидация осуществлялась путем фильтрации растворов после деминерализации губчатой и компактной костной ткани. В результате проведенных исследований установлено, что процесс фильтрации способствует снижению концентрации триглицеридов в исследуемых ксеноматериалах, полученных из губчатой и компактной костной ткани. Установлены спектральные изменения в губчатой костной ткани после фильтрации, которые свидетельствуют о более высоком качестве обработки данных биоматериалов после этапа делипидации.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, ксеноматериалы, губчатая костная ткань, компактная костная ткань, делипидация.

DOI: 10.21883/OS.2022.06.52619.26-22

Введение

Восстановление функций поврежденных конечностей после травм и ранений является актуальной задачей репаративной и регенеративной медицины [1]. В настоящее время для лечения переломов костей используются биосовместимые трансплантаты, которые должны обладать остеоиндуктивностью, остеоиндуктивностью, остеогенностью, иметь структуру, сходную со структурой костной ткани для обеспечения всех важнейших процессов остеоинтеграции, ремоделирования и физиологической регенерации [2–5].

Постоянно увеличивающийся спрос на биоматериалы определяет необходимость проведения оценки качественного и количественного состава минерального компонента костной ткани, полученного по технологии „Лиопласт“[®], с целью удовлетворения различных требований стандартов, предъявляемых к активным имплантируемым медицинским изделиям [6–8]. В частности, относительное содержание липидов в костных биоматериалах после обработки должно составлять не более 5%. Одним из элементов стандартной обработки является вакуумная делипидация трансплантатов. В связи с этим в данном исследовании была поставлена задача определить целесообразность использования предварительной отмывки костной ткани под вакуумом в связи с тем, что данный этап предполагает наличие специального дорогостоящего оборудования.

Оценку биоматериалов можно проводить с помощью оптических методов, которые являются оперативными и неинвазивными методами контроля [9–11]. Среди наиболее распространен метод рамановской спектроскопии [11–13]. Так, в статье авторов [12] исследованы структурные свойства нанокompозита с помощью рамановской спектроскопии, также были измерены спектры гигантского комбинационного рассеяния (ГКР) катионного порфирина, адсорбированного на поверхности пленки нанокompозита гидроксиапатит/серебро. В работе [13] методом ИК спектроскопии исследовался железозамещенный гидроксиапатит.

Цель работы: сравнительный спектральный анализ ксеноматериалов из губчатой и компактной костной ткани после проточной делипидации с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния.

1. Материалы и методы исследований

В качестве объектов исследований были использованы 36 образцов ксеноматериалов: 18 полученных из губчатой костной ткани коровы и 18 полученных из компактной костной ткани коровы по технологии „Лиопласт“[®]. Деминерализация исследуемых образцов проводилась в растворе соляной кислоты с нормальностью 2.4Н.

Исследуемые биоматериалы были условно разделены на 2 подгруппы: прошедшие этап фильтрации и нет, в

каждой подгруппе по 9 образцов. Во время этапа фильтрации растворов применялись фильтры типа „красная лента“ с размером пор 8–12 μm .

Исследования проводились в соответствии с Хельсинской декларацией, протокол был одобрен Комитетом по этике (выписка из протокола № 242 заседания комитета по биоэтике Самарского государственного медицинского университета от 15.12.2021 г.).

Образцы исследовали с помощью стенда, реализующего метод спектроскопии комбинационного рассеяния, состоящего из высокоразрешающего цифрового спектрометра Shamrock sr-303i, встроенной охлаждаемой камеры DV420A-OE (со спектральным диапазоном 200–1200 nm), волоконно-оптического зонда RPB-785 для спектроскопии КР, совмещенного с лазерным модулем LuxxMaster LML-785.0RB-04 с длиной волны лазерного излучения 785 nm [14].

Спектры снимались в трех точках, по 27 спектров в каждой подгруппе. Обработка полученных спектров КР была выполнена в программе Wolfram Mathematica 9. Исследуемый спектр при обработке очищали от шумов сглаживающим медианным фильтром (5 точек), определяли на выбранном интервале 700–2200 cm^{-1} при помощи итерационного алгоритма аппроксимирующую линию (полином пятой степени) автофлуоресцентной составляющей, а затем вычитали эту составляющую, в результате получали выделенный спектр КР [16].

Дополнительно был использован биохимический анализ, реализованный путем определения содержания липидов в образцах ксеноматериалов, полученных по технологии „Лиопласт“. Проведена оценка концентрации липидов в зависимости от наличия или отсутствия этапа фильтрации, выявлены связи между содержанием триглицеридов в исследуемых образцах и заданными условиями технологического процесса.

В образцах ксеноматериалов определяли уровень триглицеридов на спектрофотометре „ShimadzuUV-1280“ (Япония) по реакции с ацетилацетоном. Принцип метода заключается в экстракции триглицеридов смесью гептана и изопропилового спирта [17]. Триглицериды гидролизуются щелочью с образованием глицерина, окисляемого далее йодной кислотой до формальдегида, вступающего в реакцию с ацетилацетоном с образованием окрашенного продукта желтого цвета, регистрируемого при длине волны 425 nm в кюветах с длиной оптического пути 1 cm. Результаты выражали в mg/g ксеноматериалов.

2. Результаты исследований

На рис. 1 представлены результаты исследования образцов ксеноматериалов из губчатой и компактной костной ткани, фильтрованных и не фильтрованных.

Из рис. 1 можно видеть спектральные различия между образцами, так, например, увеличение соотношения амплитуд линий 957 cm^{-1} (νPO_4^{3-}) и 1069 cm^{-1}

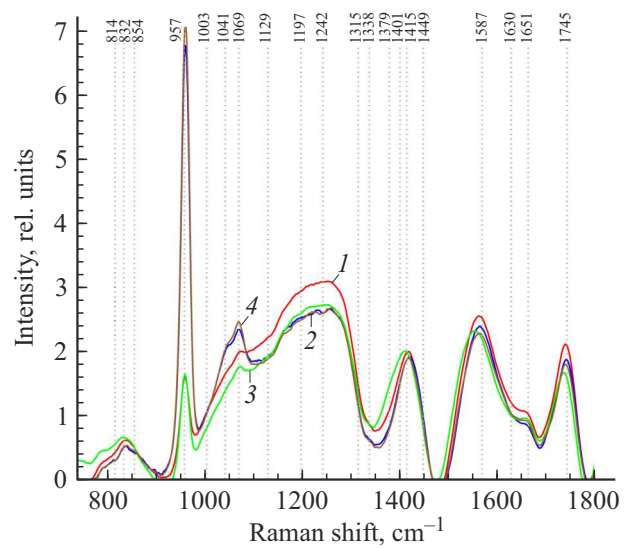


Рис. 1. Усредненные спектры комбинационного рассеяния ксеноматериалов, полученных из: 1 — губчатой костной ткани, не фильтрованные; 2 — компактной костной ткани, не фильтрованные; 3 — губчатой костной ткани, фильтрованные; 4 — компактной костной ткани, фильтрованные.

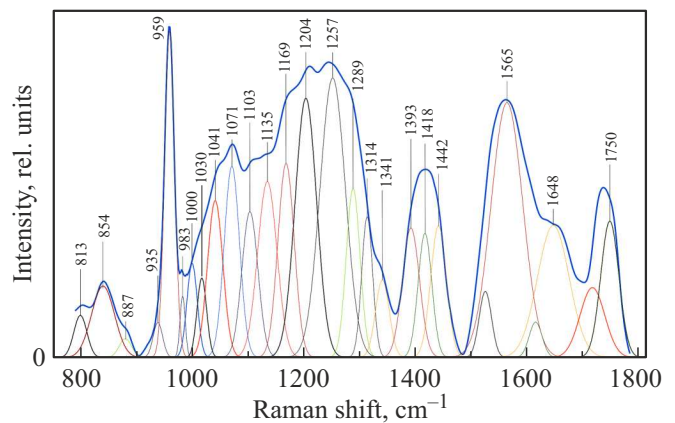


Рис. 2. Разложение спектрального контура для исследуемых образцов ксеноматериалов из компактной костной ткани.

(валентные колебания CO_3^{2-}), что обусловлено разной степенью минерализации исследуемых образцов. Кортикальная ткань является более минерализованной по сравнению с губчатой костной тканью.

Из рис. 1 также видно, что процесс фильтрации наиболее выражено происходит в губчатой костной ткани по сравнению с кортикальной и проявляется в снижении интенсивностей линий 1129–1242 cm^{-1} (Amide III), 1537–1587 cm^{-1} (Amide II) и 1651 cm^{-1} (Amide I) и 1745 cm^{-1} (фосфолипиды), соответствующих органической составляющей костной ткани.

Для получения детальной информации и повышения информативности спектров комбинационного рассеяния исследуемых объектов был проведен нелинейный ре-

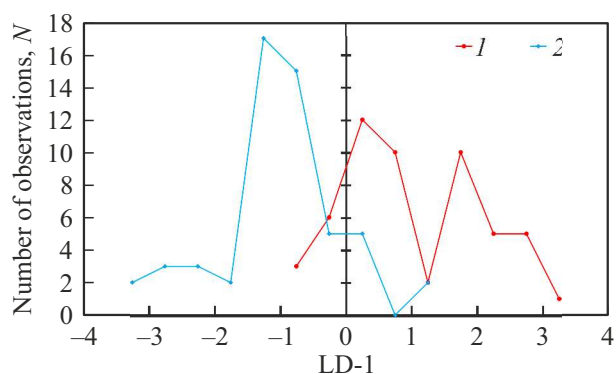


Рис. 3. График значений линейной дискриминантной функции образцов ксеноматериалов: 1 — из губчатой костной ткани; 2 — из компактной костной ткани.

грессионный анализ спектров, состоящий в их разложении на спектральные линии. На рис. 2 представлены результаты разложения спектрального контура на сумму распределений Гаусса для образцов из компактной костной ткани и губчатой костной ткани соответственно.

На рис. 2 среднее значение коэффициента детерминации результирующего спектра по исходному в диапазоне $800\text{--}1780\text{ cm}^{-1}$ составило $R^2 = 0.99$, относительная ошибка оценки интенсивности спектральных линий a составила менее 7%, среднее стандартное отклонение координаты линии x_0 составило 0.9 cm^{-1} , среднее стандартное отклонение ширины гауссовой линии (HWHM) dx составило 1.9 cm^{-1} .

Далее был проведен анализ амплитуд разделенных линий комбинационного рассеяния образцов из компактной и губчатой костной ткани, нормированных на интенсивности линии Amide I с помощью метода линейного дискриминантного анализа (LDA). Данный метод реализован в программной среде SPSS Statistics 23.

На рис. 3 показаны результаты сравнения LDA двух групп образцов. Было проанализировано 108 спектров комбинационного рассеяния ксеноматериалов (54 губчатой костной ткани и 54 компактной ткани). Дискриминантная функция LD-1 описывает 100%-дисперсию. Положительные значения LD-1 в основном характеризуют спектры комбинационного рассеяния ксеноматериалов, полученные из материалов губчатой костной ткани, и наоборот, отрицательные значения характеризуют спектры комбинационного рассеяния ксеноматериалов, полученные из компактной костной ткани. Области групп имеют значительное пересечение в диапазоне $LD-1 = \{-0.75; 1.25\}$.

На рис. 4 показаны коэффициенты матрицы факторной структуры, имеющие физический смысл корреляции между переменными в модели и дискриминантной функцией. Чем выше значение модуля LD-1 для переменной, тем больше она определяет различия в дискриминантной модели между группами образцов.

Специфичность диагностической модели на основе дискриминантного анализа составила 77.8%, чувствительность — 85.2%, что говорит о существовании значимых различий образцов и возможности соотношения спектров КР ксеноматериалов к различным группам.

На рис. 5, *a* показаны результаты сравнения LDA двух групп образцов из компактной костной ткани. Было

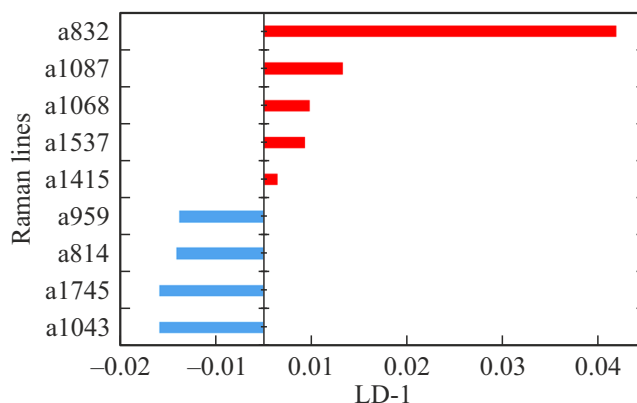


Рис. 4. График значений линейной дискриминантной функции образцов ксеноматериалов из губчатой и компактной костной ткани.

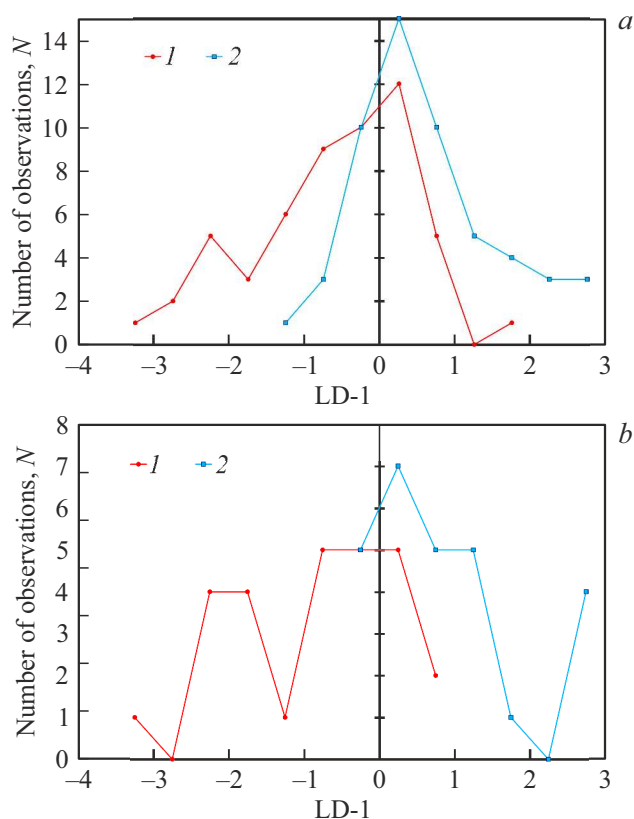


Рис. 5. Графики значений линейной дискриминантной функции образцов ксеноматериалов фильтрованных и нефильтрованных: (а) из компактной костной ткани; (б) из губчатой костной ткани (1 — нефильтрованные; 2 — фильтрованные).

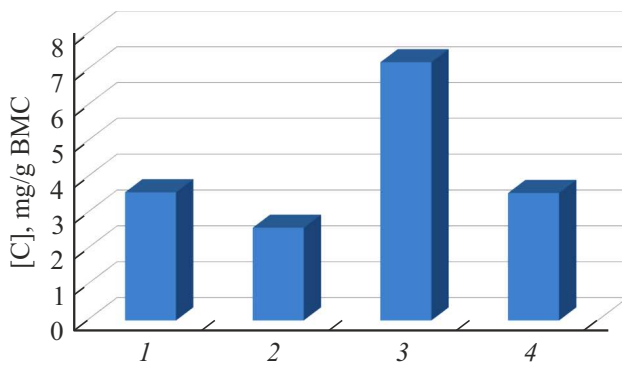


Рис. 6. Содержание триглицеридов в образцах ксеноматериалов, полученных после деминерализации различных типов кости в 2.4Н растворах соляной кислоты: 1 — из компактной костной ткани без фильтра; 2 — из компактной костной ткани с фильтром; 3 — из губчатой костной ткани без фильтра; 4 — из губчатой костной ткани с фильтром.

проанализировано 108 рамановских спектров ксеноматериалов (54 фильтрованных и 54 нефилтрованных). Дискриминантная функция LD-1 описывает 100%-дисперсию. Положительные значения LD-1 в основном характеризуют рамановские спектры полученных фильтрованных материалов и, наоборот, отрицательные значения характеризуют рамановские спектры нефилтрованных материалов. Области групп имеют значительное пересечение в диапазоне LD-1 = {−1.25; 1.75}.

Также на рис. 5, b представлены результаты LDA сравнения двух групп образцов из губчатой ткани. Проанализированы 54 спектра ксеноматериалов (27 фильтрованных и 27 нефилтрованных). Дискриминантная функция LD-1 описывает дисперсию на 100%. Положительные значения LD-1 в большей степени характерны для спектров КР фильтрованных материалов, отрицательные — нефилтрованных. Области групп имеют пересечение в интервале LD-1 = {−0.25; 0.75}.

Из рис. 5, b видно, что спектральные изменения в губчатой костной ткани после фильтрации более выражены, чем в кортикальной костной ткани.

Далее на рис. 6 приведены результаты биохимического анализа образцов ксеноматериалов, полученных после деминерализации в 2.4Н растворах соляной кислоты. Содержание триглицеридов уменьшается в образцах ксеноматериалов, полученных из фильтрованных растворов.

Результаты биохимического анализа также показали, что процесс делипидации в целом приводит к снижению уровня триглицеридов в ксеноматериалах, полученных из губчатой костной ткани коровы. Это объясняется характерным строением этого типа ткани — системой разреженных трабекул, между которыми находится костный мозг, поэтому деминерализация губчатой кости происходит плавно, а содержание триглицеридов изменяется аналогично (рис. 6).

3. Выводы

Проведенный расширенный сравнительный анализ спектров комбинационного рассеяния исследуемых образцов ксеноматериалов, полученных из компактной и губчатой костной ткани, показал, что наиболее выраженные спектральные изменения после процесса фильтрации наблюдаются в образцах из губчатой костной ткани и проявляются в уменьшении липидного компонентного состава и незначительном изменении органического состава, о чем свидетельствует изменение на линии 1745 cm^{-1} (фосфолипиды), а также на линиях $1129\text{--}1242\text{ cm}^{-1}$ (Amide III), $1537\text{--}1587\text{ cm}^{-1}$ (Amide II) и 1651 cm^{-1} (Amide I) соответственно. Полученные результаты могут свидетельствовать, что степень очистки образцов из губчатой костной ткани выше, чем в кортикальной. Таким образом, дополнительные этапы очистки на завершающих стадиях могут существенно повысить качество ксеноматериалов, полученных из губчатой костной ткани.

Результаты подтверждены биохимическим анализом. Процесс фильтрации, применяемый в технологии получения костно-пластических материалов, снижает содержание липидов в ксеноматериалах. Применение проточной делипидации по сравнению с вакуумной значительно удешевляет процесс производства костно-пластического материала, так как является более доступным и экономичным по времени. Содержание триглицеридов при применении данного метода составляет не более 1%, что соответствует требованиям, предъявляемым биоматериалам аллогенного происхождения.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов

Список литературы

- [1] G. Marongiu, A. Dolci, M. Verona, A. Capone. *Bone Reports*, **12**, 100249 (2020). DOI: 10.1016/j.bonr.2020.100249
- [2] S. Weiner, W. Troub, H.D. Wagner. *J. Struct. Biol.*, **126**, 241–255 (1999). DOI: 10.1006/jsbi.1999.4107
- [3] P. Baldwin, D.J. Li, D.A. Auston, H.S. Mir et al. *J. Orthop Trauma*, **33** (4), 203–213 (2019). DOI: 10.1097/BOT.0000000000001420
- [4] Q. Yu, R. DiFeo Jacquet, W.J. Landis. *Cells Tissues Organs*, **209** (2–3), 128–143 (2020). DOI: 10.1159/000509036
- [5] F. Piacentini, M.J. Ceglia, L. Bettini et al. *J. Orthop Traumatol.*, **20** (1), 13 (2019). DOI: 10.1186/s10195-019-0522-6
- [6] A. Nather, N. Yusof, N. Hilmy. *Allograft procurement, processing and transplantation: a comprehensive guide for tissue banks* (Singapore, World Scientific, 2010).
- [7] D. Fehily, S.A. Brubaker, J.N. Kearney, L. Wolfenbarger. *Tissue and Cell Processing: an essential guide* (USA, Wiley-Blackwell, 2012).

- [8] N.L. Dock, J.C. Osborne, S.A. Brubaker. *Standards for Tissue Banking*, 13th ed. (USA, American Association of Tissue Banks, 2012).
- [9] В.Е. Привалов, В.Г. Шеманин. *ЖТФ*, **69** (8), 65–70 (1999).
- [10] В.Н. Демкин, В.Е. Привалов. *Вестн. СПбО Академии инженерных наук*, 138–187 (2008).
- [11] Jessica A. Stammeier, Bettina Purgstaller, Dorothee Hippler, Vasileios Mavromatis, Martin Dietzel. *MethodsX*, **5**, 1241–1250 (2018). DOI: 10.1016/j.mex.2018.09.015
- [12] А.Ю. Панарин, А.В. Абакшонок, П. Мойзес, С.Н. Терехов. *Журн. прикл. спектр.*, **88** (5), 748 (2021). [A. Panarin, A.V. Abakshonok, P. Mojzes, S.N. Terekhov. *J. Appl. Spectrosc.*, **88** (5), 980 (2021). DOI: 10.1007/s10812-021-01269-2].
- [13] Н.О. Донская, А.В. Беляков, М.А. Гольдберг. *Успехи в химии и химической технологии*, **34** (5), 30 (2020).
- [14] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.Yu. Vlasov, L.T. Volova, O.O. Frolov, Ya.V. Fedorova, G.P. Tikhomirova, D.A. Romanova, M.A. Daniel. *Opt. Spectrosc.*, **128** (7), 989 (2020). DOI: 10.1134/S0030400X20070243
- [15] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, L.T. Volova, O.O. Frolov, M.A. Zibin, I.V. Bazhutova. *Diagnostics*, **10** (11), 876 (2020). DOI: 10.3390/diagnostics10110876
- [16] E.V. Timchenko, P.E. Timchenko, E.V. Pisareva, M.A. Daniel, L.T. Volova, A.A. Fedotov, O.O. Frolov, A.N. Subatovich. *J. Optical Technology*, **87** (3), 161 (2020). DOI: 10.1364/JOT.87.000161.
- [17] *Clinical Laboratory Examination Methods*, ed. by V.V. Menshikov, (Medicine: Moscow, 1987), p. 246–247.