

02

Метод спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки костной ткани животных при однократном и двукратном введении минерального костного компонента

© Е.В. Тимченко^{1,2}, Е.В. Писарева¹, О.О. Фролов¹, Ю.Д. Итяксов¹, П.Е. Тимченко^{1,2},
М.Ю. Власов^{1,2}, Э.М. Тчанг¹, И.Н. Лемба¹, Л.Т. Волова²

¹ Самарский университет,
Самара, Россия

² Самарский государственный медицинский университет,
Самара, Россия

e-mail: yura.ityaksov97@mail.ru

Поступила в редакцию 23.04.2024 г.

В окончательной редакции 20.06.2024 г.

Принята к публикации 30.10.2024 г.

Представлены результаты применения метода спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки функционального состояния костной ткани животных после однократного и двукратного введения минерального костного компонента (МКК), применяемого для лечения остеопороза и стимулирования остеоинтеграции. В качестве объектов исследований использованы костная ткань и сыворотка крови свиней. В качестве дополнительного метода анализа был использован биохимический анализ крови. Установлено, что МКК не оказывает негативного влияния на костную ткань свиней ни при однократном, ни при двукратном введении.

Ключевые слова: спектроскопия комбинационного рассеяния, спектральный анализ, минеральный костный компонент (МКК), костная ткань, биохимический анализ.

DOI: 10.61011/OS.2024.11.59492.6241-24

Проблема профилактики и лечения остеорезорбции является одной из актуальных в экспериментальной биологии и медицине [1]. Актуальной задачей является поиск новых биотехнологических решений, направленных на коррекцию обменных процессов и восстановление измененной структурно-функциональной целостности костной ткани. При разработке биосовместимых материалов аллогенного происхождения в первую очередь должна обеспечиваться их безопасность, способность к остеоинтеграции и обеспечение физиологической регенерации. Одним из перспективных материалов, обладающим большим потенциалом для применения в травматологии, стоматологии и челюстно-лицевой хирургии, является минеральный компонент кости (МКК), изготовленный по технологии „ЛИОПЛАСТ“ (ТУ-9398-001-01963143-2004, патент РФ № 2366173 от 15.05.2008; сертификат соответствия ISO 13485:2016, рег. № RU CMS-RU.PT02.00115; сертификат ISO 9001:2015, рег. № ТИС 15 100 159171) и получаемый путем деминерализации костных тканей человека и животных. Он может использоваться для лечения остеопороза и усиления процессов остеоинтеграции при имплантациях. Однако требуется исследовать его побочное влияние на организм, не вызывает ли он избыточного накопления в костях и не вызывает ли изменения ключевых биохимических параметров крови.

В настоящее время оптические методы исследования нашли широкое применение в биомедицинских зада-

чах [2,3]. Проведенные нами ранее исследования показали, что спектроскопия комбинационного рассеяния позволяет проводить оценку качества МКК при его изготовлении [4].

Биохимический анализ проводится в рамках расширенного исследования токсичности при введении препарата с целью оценки его безопасности при применении *in vivo* [5]. Выбор данного вида животных в настоящем исследовании определялся представлениями о том, что организм свиньи является адекватной моделью при проведении различных биологических экспериментов и доклинической оценке безопасности новых препаратов.

Целью работы является применение спектроскопии комбинационного рассеяния для оценки состояния костной ткани свиней (Susscrofa) после однократного и двукратного внутримышечного введения водной суспензии минерального костного компонента.

Эксперименты проведены на свиньях породы „Ливенская“ массой 13–15 кг. Три группы: 1) контрольная (5 животных), 2) группа 2 (12 животных), группа 3 (13 животных). Контрольным животным (группа 1) однократно делали внутримышечные инъекции стерильного физиологического раствора. Свиньям экспериментальной группы 2 производили внутримышечные инъекции суспензии аллогенного минерального костного компонента в дозе 100 mg/kg однократно в первый день эксперимента. В третьей группе производили внутримышечные инъекции суспензии минерального костного

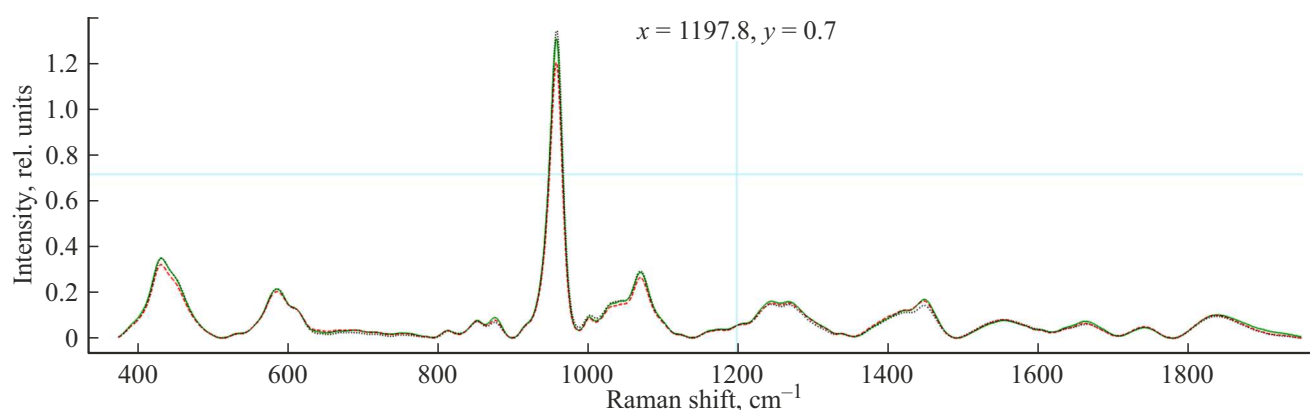


Рис. 1. Усредненные спектры КР костной ткани исследуемых групп: первая группа — черная пунктирная линия, вторая группа — зелёная сплошная линия, третья группа — красная штриховая линия.

компонента в дозе 100 mg/kg двукратно в первый и 14-й дни эксперимента. Общая длительность эксперимента составила 28 суток. Забор крови на биохимический анализ производился троекратно: в первые сутки до введения минерального костного компонента, на 14-е и на 28-е сутки эксперимента.

После вывода животных из эксперимента забирали фрагменты плечевых костей (диафизные и метафизные участки) и лопаток.

Дальнейшие исследования проводили *in vitro* с помощью метода спектроскопии комбинационного рассеяния СКР (основной метод). Метод СКР был реализован с помощью экспериментального стенда, описанного в работе [6]. Использование спектрографа ANDOR Sharmrock 303i с охлаждаемой камерой DV-420A-OE обеспечивало разрешение 0.15 nm ($\sim 1.5 \text{ cm}^{-1}$). Для возбуждения использовался лазер 785 nm номинальной мощностью до 450 mW с волоконным выходом. Регистрацию спектров комбинационного рассеяния (КР) проводили с помощью оптического зонда, который располагали над объектом на расстоянии 7 mm. Нормализация спектров проведена методом *standard normal variate* (SNV). С каждого животного снималось от 3 до 5 спектров (в пределах групп спектры усреднялись, а в статистическом анализе использовались как отдельные точки). Сглаживание спектров проведено методом *Maximum Likelihood Estimation Savitzky-Golay filter* (MLE-SG) с параметром $\sigma = 4$. Для исключения вклада автофлуоресценции в спектр КР использовался модифицированный метод вычитания флуоресцентной составляющей, полиномиальной аппроксимацией *Extended Modified Multi-Polynomial Fitting* (Ex-ModPoly) со степенью полинома 10.

В качестве дополнительного метода исследования был использован биохимический анализ крови.

На рис. 1 представлены усредненные спектры КР исследуемых групп образцов. Из рисунка видно, что основные спектральные максимумы исследуемых групп на линиях $\sim 958\text{--}960 \text{ cm}^{-1}$ (гидроксиапатит, $\text{PO}_4^{3-} (\nu_1)$

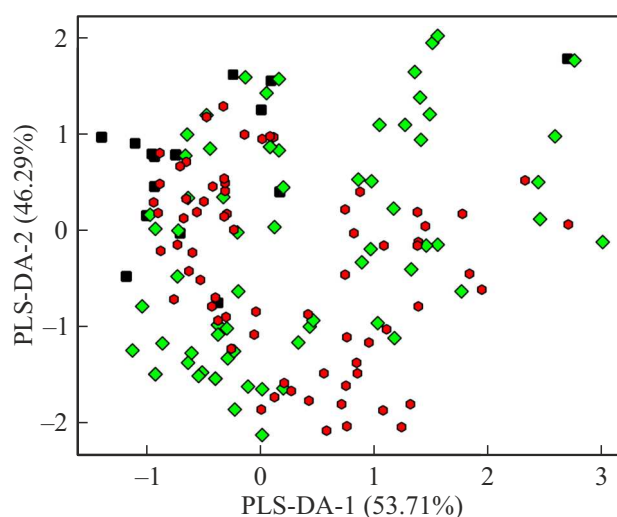


Рис. 2. Двумерный график значений линейной дискриминантной функции LDA: первая группа — черный квадрат, вторая группа — зелёный ромб, третья группа — красный круг.

(P–O symmetric stretch)), $\sim 1070 \text{ cm}^{-1}$ (карбонатсодержащий гидроксиапатит, $\text{CO}_3^{2-} (\nu_1)$ B-type substitution (C–O in-plane stretch)), которые соответствуют минеральным компонентам костной ткани, а на линиях $\sim 1229\text{--}1242 \text{ cm}^{-1}$ (Амид III), 1445 cm^{-1} ((CH_2) , (CH_3) , scissoring, phospholipids (lipid assignment), $\sim 1537\text{--}1587 \text{ cm}^{-1}$ (Амид II) и $\sim 1651 \text{ cm}^{-1}$ (Амид I) и $\sim 1745 \text{ cm}^{-1}$ ($\nu(\text{C}=\text{O})$, phospholipids (lipid assignment) соответствуют органическим компонентам костной ткани. Из рисунка видно, что существенных спектральных отличий между исследуемыми группами во всем исследуемом спектральном диапазоне не наблюдается.

Для дальнейшего анализа декомпозированных линий был выбран PLS-DA-дискриминантный анализ методом частичных наименьших квадратов (рис. 2).

На графике видно, что значимых различий в спектральных компонентах контрольной группы, а также

групп однократного и двукратного воздействия МКК не наблюдается.

Данные биохимического анализа крови показали, что активность ферментов, концентрация креатинина, глюкозы, общего белка, кальция общего, фосфатов, IgE, С-реактивного белка, мочевины в исходном состоянии в экспериментальных группах соответствует норме, характерной для данного вида животных. Из результатов эксперимента следует, что МКК не оказывает значительного влияния на основные биохимические показатели крови. Таким образом, можно сделать вывод о его относительной безопасности для использования в медицинских целях.

В результате проведенных исследований по влиянию вводимой дозы МКК на состав костной ткани свиней с помощью спектроскопии комбинационного рассеяния было установлено, что вводимая доза МКК (100 mg/kg веса) как при однократном, так и при двукратном введении препарата не оказывает влияния на состав костной ткани, что отчетливо видно по спектрам КР. Установлено, что во всем исследуемом спектральном диапазоне $380\text{--}1900\text{ cm}^{-1}$ не наблюдается значимых спектральных различий между группами.

Минеральный костный компонент при однократном и двукратном внутримышечном введении не оказал влияния на большинство биохимических показателей крови свиней. Установленные изменения биохимических показателей находились в пределах нормативных значений, характерных для данного вида.

Полученные результаты могут быть использованы в дальнейшем в качестве предпосылки для тестирования данного препарата на более крупных животных и перехода к клиническим исследованиям.

Этический комитет

Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. Выписка из протокола 200 заседания Комитета по биоэтике при Самарском государственном медицинском университете от 22.05.2019 г.

Конфликт интересов

Авторы заявляют, что конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

- [1] M.M. Sobh, M. Abdalbary, S. Elnagar, E. Nagy, N. Elshabrawy et al., *J. Clin. Med.* **11**(9), 2382 (2022). DOI: 10.3390/jcm11092382.
- [2] Г.И. Долгих, В.Е. Привалов. *Лазерная физика. Фундаментальные и прикладные исследования* (Изд-во „Рея“, Владивосток. 2016), 351 с.
- [3] S.J. Barton, T.E. Ward, B.M. Hennelly. *Analytical Methods*, **10**, 3759 (2018). DOI: 10.1039/C8AY01089G
- [4] П.Е. Тимченко, Е.В. Тимченко, Е.В. Писарева, М.Ю. Власов, О.О. Фролов, Л.Т. Волова, Р.Т. Самигуллин, С.С. Сергеева. *Опт. и спектр.*, **130** (6). (2022) DOI: 10.61011/OS.2024.11.59492.6241-24
- [5] Н.Г. Войтенко, М.Н. Макарова *Лабораторные животные для научных исследований.* **2020**(3), 7-15 (2020). DOI:10.29296/2618723X-2020-02-01
- [6] P.E. Timchenko, E.V. Timchenko, L.T. Volova, O.O. Frolov, *J. Optical Technol.* **88**(9), 485–488 (2021). DOI:10.1364/JOT.88.000485