

КОМПЛЕКСНОЕ ИЗУЧЕНИЕ ОРГАНО-МИНЕРАЛЬНЫХ КОМПОЗИТОВ (НА ПРИМЕРЕ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА)

Е. А. Маловская, С. А. Лемешева, О. А. Голованова

*Омский государственный университет им. Ф. М. Достоевского, г. Омск,
eka-m19@yandex.ru, s_lemesheva@mail.ru, golovanova2000@mail.ru*

Костная ткань является высокоспециализированным видом соединительной ткани, отличается большой твердостью, механической прочностью и многокомпонентным составом, включающим трудноразделимые минеральные и органические составляющие. При интерпретации данных физико-химических методов исследования, дающих комплексную информацию о составе биоминерала, возникает ряд проблем. Так, на ИК-спектрах в широком диапазоне частот возможно наложение полос поглощений колебаний связей данных костных составляющих. Поэтому изучение химического состава костной ткани сопряжено со значительными трудностями, поскольку для выделения органического матрикса требуется провести деминерализацию кости [Панасюк, Ларионов, 2004]. В связи с этим, для решения сложившейся проблемы необходимым является разработка методики экстракционного разделения органической и минеральной фаз костной ткани с сохранной структурой кристаллической основы кости – костного апатита. Ее использование дает возможность получения дополнительной информации об изменениях отдельных костных компонент, что важно для понимания причин и этапов течения костных заболеваний (например, коксартроза); создания синтетических биосовместимых костных аналогов.

Целью работы является подбор экстрагентов и условий экстракционного разделения органической и минеральной составляющих костных тканей.

Отличительная особенность предлагаемого подхода состоит в том, что выбранные экстрагенты не должны оказывать разрушающего воздействия на минеральную фазу костной ткани. В существующих на сегодняшний день методиках выделение органической составляющей сопровождается декальцинацией минеральной компоненты.

Объектами исследования выступает коллекция из нормальных и пораженных коксартрозом головок бедренных костей жителей Омского региона четырех возрастных групп от 30 до 79 лет. Все образцы имеют различную величину и высокую твердость. По данной коллекции ведется электронная база данных с указанием половозрастных характеристик больного и сопутствующих заболеваний. Для оценки развития коксартроза, после механической очистки образцов от мягких тканей и промывания их от формалина, выпиливались три горизонтальных среза: верхний, средний и нижний. Срезы измельчали в порошок и в сухом виде брали для анализа. Данные по составу пораженных образцов сравнивались с содержанием в нормальной костной ткани.

Известно, что основной белок костной ткани – коллаген имеет сложный фракционный состав: солерастворимая, кислоторастворимая и водорастворимая фракции [Слущкий, 1969]. Для концентрирования водорастворимых белковых соединений костной ткани исследована экстракция рядом органических растворителей и их смесей (хлороформ, этиловый спирт, диэтиловый эфир, смеси хлороформ-спирт в соотношениях 1:1, 1:2 и 2:1). Кислоторастворимые фракции белка извлекались с помощью лимонной, уксусной, соляной кислот и раствора ЭДТА, а солерастворимые – хлоридом натрия (концентрация 0.5; 1.0; 5.0 и 10 мас. %). Эффективность экстракции оценивалась величиной степени извлечения и рассчитывалась по результатам спектрофотометрического анализа.

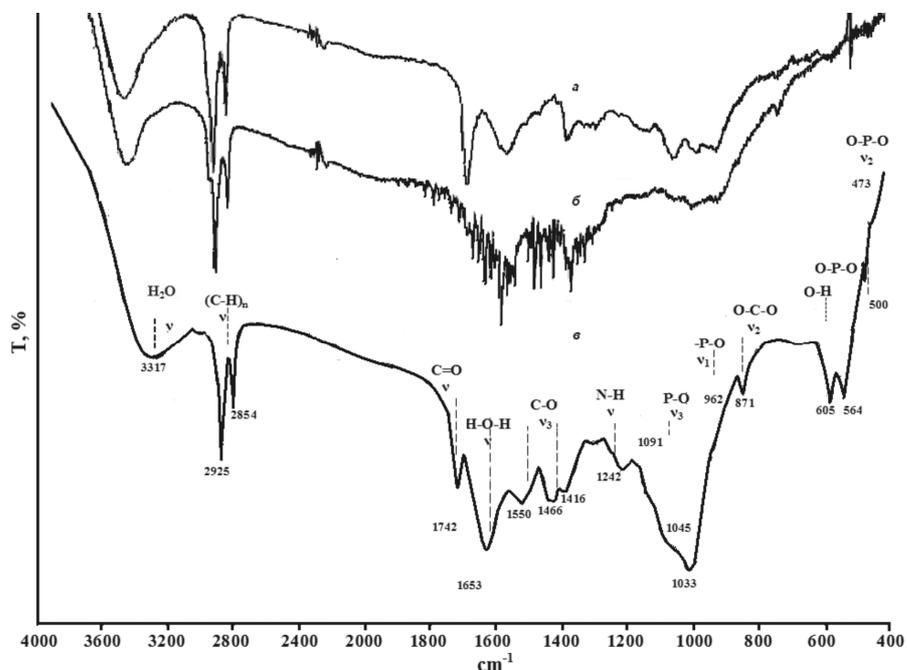


Рис. 1. ИК-спектры пораженной коксартрозом костной ткани (а – до экстракции, б – после экстракции раствором ЭДТА, в – после двукратной экстракции раствором NaCl и смесью хлороформ-спирт 2:1).

На основе многочисленных экспериментов установлено, что наиболее эффективными реагентами является смесь хлороформ-спирт в соотношении 2:1 и 1% раствор хлорид натрия с концентрацией, соответствующей физиологическому раствору. Время экстракции составляет 3 суток в каждом случае. Использование растворов кислот и ЭДТА приводит к разрушению минеральной основы (рис. 1).

Применение данных экстрагентов в указанной последовательности также позволяет идентифицировать полосы поглощения колебаний разных костных составляющих на ИК-спектрах.

После экстрагирования белковых веществ из костных тканей на ИК-спектрах отмечено уменьшение интенсивностей $\nu(\text{NH})$, $\nu(\text{C-H}_n)$, $\nu(\text{C=O})$ органических групп (рис. 1). Полосы поглощения колебания связей неорганической компоненты являются наиболее разрешенными. На рентгенограммах таких проб видно, что для апатита характерны узкие рефлексы. Таким образом, в интервале частот поглощения колебаний разных по природе костных составляющих основной вклад в интенсивности на ИК-спектрах принадлежат неорганическим группам.

Результаты определения содержания азота пептидных связей в водных растворах органических экстрактов костных тканей контрольных и пораженных проб представлены в таблице 1.

Таблица 1

Содержание и степень экстракционного извлечения (R) белкового азота в костной ткани человека в «норме» и при патологии (n = 3; P = 0.95)

Степень поражения костной ткани	Костный срез	Белковый азот, %		R _{ср.} , %
		NaCl, 1% раствор	Хлороформ-спирт (2:1)	
Патология	Верх	1.166±0.78	2.725±1.85	68.5
	Середина	1.081±0.63	1.069±0.58	32.4
	Низ	1.033±0.29	0.468±0.11	33.9
«Норма»		1.00±0.19	0.429±0.16	23.4

Видно, что доля извлекаемых белковых фракций с помощью предложенной методики составляет от 23 до 70 %, что возможно связано с их различной растворимостью вследствие деформации и разрушения волокон коллагена.

Кроме того, выявлено, что больше всего по содержанию солерастворимой компоненты к «норме» приближена костная ткань нижнего патогенного среза (табл. 1). Статистически значимые отличия наблюдаются для наиболее пораженной верхней пластинки. Это также подтверждает большую метаболическую активность солерастворимой фракции при патогенных изменениях. Показано, что наибольшая степень извлечения белковой компоненты характерна для патогенного верхнего среза (см. табл. 1), что можно объяснить её разрушением при патологии.

Установлено, что при экстракции не происходит деминерализации костного апатита. Так, на рентгенограммах таких образцов отмечается заметное снижение фоновых сигналов, особенно в области от 10.8 до 16.8 2 θ , принадлежащей органической аморфной компоненте. Рефлексы, относящиеся к минеральной кристаллической фазе – костного апатита, являются более разрешенными, что указывает на улучшение его кристалличности.

Полученные данные подтверждают эффективность использования данной методики для извлечения белковых соединений из костной ткани с сохранной структурой апатита.

Таким образом, методика позволяет проводить экстракционное разделение органической и минеральной костных составляющих с сохранной структурой апатита.

Литература

Панасюк А. С., Ларионов Е. В. Способ получения коллагена из костной ткани // Патент № 2273489. Решение о выдаче на изобретение заявка № 2004124907/15 от 17.08.04.

Слуцкий Л. И. Биохимия нормальной и патологически измененной соединительной ткани. Л.: Медицина, 1969. 375 с.