

УДК 549.01:549.02:549.752:553.086

DOI: 10.35597/2313-545X-2023-9-4-6

## ГИДРОКСИЛАПАТИТ КОСТНОЙ ТКАНИ: ДИНАМИКА КРИСТАЛЛОХИМИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ ПРИ ОСТЕОПОРОЗЕ

А.А. Бибко<sup>1</sup>, О.В. Бухарова<sup>1</sup>, Е.А. Коструб<sup>2</sup>,  
А.Г. Мирошниченко<sup>3</sup>, М.В. Коровкин<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> Национальный исследовательский Томский государственный университет,  
пр. Ленина 36, г. Томск, 634050 Россия; bibko.geology@gmail.com

<sup>2</sup> Сибирский государственный медицинский университет, Московский тракт 2,  
г. Томск, 634050 Россия

<sup>3</sup> Южно-Уральский государственный медицинский университет,  
ул. Воровского 64, г. Челябинск, 454092 Россия

<sup>4</sup> Национальный исследовательский Томский политехнический университет,  
пр. Ленина 30, г. Томск, 634050 Россия

Статья поступила в редакцию 10.11.2023 г., принята к печати 08.12.2023 г.

## HYDROXYLAPATITE OF BONE TISSUE: DYNAMICS OF CRYSTALLOCHEMICAL ALTERATIONS UPON OSTEOPOROSIS

A.A. Bibko<sup>1</sup>, O.V. Bukharova<sup>1</sup>, E.A. Kostrub<sup>2</sup>,  
A.G. Miroshnichenko<sup>3</sup>, M.V. Korovkin<sup>1, 4</sup>

<sup>1</sup> National Research Tomsk State University, pr. Lenina 36,  
Tomsk, 634050 Russia; bibko.geology@gmail.com

<sup>2</sup> Siberian State Medical University, Moscovskiy trakt 2, Tomsk, 634050 Russia

<sup>3</sup> South Ural State Medical University, ul. Vorovskogo 64, Chelyabinsk, 454092 Russia

<sup>4</sup> National Research Tomsk Polytechnic University, pr. Lenina 30, Tomsk, 634050 Russia

Received 10.11.2023, accepted 08.12.2023

**Аннотация.** Костная ткань представляет собой физиогенный органоминеральный агрегат, состоящий из органических (коллаген, жиры, сахара) и минерального (гидроксилапатита) компонентов. Одно из наиболее распространенных заболеваний костной ткани – остеопороз. Оно приводит к нарушению процессов минерализации костной ткани. Для изучения динамики изменений гидроксилапатита при остеопорозе был проведен эксперимент на лабораторных животных с симуляцией системного остеопороза с помощью овариоэктомии (хирургического удаления яичников). При помощи рентгено-спектрального микроанализа определен химический состав минерального компонента костной ткани и проведена статистическая обработка результатов. При развитии остеопороза в гидроксилапатите увеличивается содержание изоморфных примесей (Mg, Al, K). Методами многомерной статистики зафиксирована существенная роль Al при развитии заболевания. Рентгеноструктурный анализ показал, что при развитии остеопороза параметры элементарной ячейки гидроксилапатита костной ткани увеличиваются. Результаты ИК спектроскопии показали наличие карбонатной группы в гидроксилапатите, содержание которой уменьшается при заболевании.

**Ключевые слова:** гидроксилапатит, костная ткань, остеопороз, биоминерал, структурно-химическая характеристика.

**Abstract.** Bone tissue is a physiogenic organomineral aggregate consisting of organic (collagen, fats, sugars) and mineral (hydroxlyapatite) components. Osteoporosis is one of the most common bone diseases leading to disruption of bone tissue mineralization processes. To study the dynamics of changes in

hydroxylapatite during osteoporosis, an experiment was conducted on laboratory animals with the simulation of systemic osteoporosis using ovariectomy (the surgical removal of an ovary or ovaries). The chemical composition of the mineral component of bone tissue was studied using electron microprobe analysis with further statistical processing of the results. The osteoporosis of bone tissue results in an increase in the content of isomorphous Mg, Al, and K in hydroxylapatite. A significant role of Al in the development of the disease was established using multivariate statistics methods. The X-ray diffraction revealed the increase in the unit cell parameters of hydroxylapatite with the osteoporosis progression. The results of IR spectroscopy showed the presence of a carbonate group in hydroxylapatite, the content of which decreases with disease.

**Keywords:** hydroxylapatite, bone tissue, osteoporosis, biomineral, structural and chemical characteristics.

## Введение

Остеопороз – это хроническое заболевание костной ткани, основным симптом которого является в хрупкости костей. На данный момент исследованы причины его возникновения, что связано с активным выделением щитовидной железой паратиреоидного гормона (ПТГ), который инициирует «вымывание кальция» из костной ткани, при этом кальций не удерживается в организме и выводится из него (Rachner et al., 2011). Фармакологические исследования в этом направлении позволяют частично улучшить качество жизни людей с таким заболеванием, т. е. приостановить процесс, однако повышенная хрупкость костей у пациентов остается (Meunier et al., 2004). Костная ткань состоит из двух компонентов (гидроксилатапата и коллагена) и относится по классификации биоминеральных объектов к физиогенным органо-минеральным агрегатам (Кораго, 1992). Кость постоянно обновляется. Каждый компонент агрегата, в частности, гидроксилатапатит костной ткани, может как формироваться, так и подвергаться естественной физиогенной резорбции на протяжении всей жизни организма (Glimcher, 1960). Крайнее проявление резорбции сопровождается нарушением структуры костной ткани и приводит к остеопорозу (Скоблин, Белоус, 1968). Химический состав минеральной фазы, с учетом всех возможных изоморфных замещений, весьма сложен. Стехиометрическая формула биогенного гидроксилатапата выглядит так  $A_{10}(XO_4)_6Z_2$ , где  $A = Ca^{2+}, Mg^{2+}, Mn^{3+}, Na^+, K^+, Sr^{2+}, Ba^{2+}$  и  $Al^{3+}$ ,  $X = P^{5+}, C^{4+}, Si^{4+}, Al^{3+}$  и  $S^{6+}$  и  $Z = (OH)^-, CO_3^{2-}, F^-, Cl^-$  и  $H_2O$ .

Биогенный гидроксилатапатит формируется благодаря костеобразующим клеткам (остеобластам), что предполагает сложный механизм образования, который значительно сложнее, чем для любого абиогенного минерала. Изоморфные вариации в минерале связаны с присутствием элементов в организме, механизмом их транспортировки и биохимическими реакциями (Hunter, Goldberg, 1993, 1996; Glimcher, 2006). Расширяют представление о минералообразовании гидроксилатапата результаты модельных экспериментальных исследований с использованием органических молекул (Simon et al., 2009; Casarrubios et al., 2020).

Исследования патологических процессов кости ограничены медико-фармацевтическими рамками. Это биохимические исследования, связанные с анализом биожидкостей пациентов с остеопорозом, без возможности корреляции этих данных с микроструктурными и химическими изменениями в минеральной составляющей кости (Ebeling et al., 2013). Были получены данные по увеличению минеральной плотности костей, что снижало риск внепозвоночных переломов на фоне медикаментозного лечения остеопороза (Reginster et al., 2005). Однако минеральная плотность кости не определяет структурные показатели органо-минерального агрегата, а также не дает полную характеристику качества минерализации.

Таким образом, детальный анализ минеральной составляющей костной ткани позволит точнее описать процессы деминерализации и реминерализации кости, а изучение динамики изменения минеральной составляющей (химического состава и кристаллической структуры) при развитии заболе-

---

*Для цитирования:* Бибко А.А., Бухарова О.В., Коструб Е.А., Мирошниченко А.Г., Коровкин М.В. Гидроксилатапатит костной ткани: динамика кристаллохимических изменений при остеопорозе. Минералогия, 9(4), 75–89. DOI: 10.35597/2313-545X-2023-9-4-6

*For citation:* Bibko A.A., Bukharova O.V., Kostrub E.A., Miroshnichenko A.G., Korovkin M.V. Hydroxylapatite of bone tissue: dynamics of crystallochemical alterations upon osteoporosis. Mineralogy, 9(4), 75–89. DOI: 10.35597/2313-545X-2023-9-4-6.

---



Рис. 1. Препараты костей для исследований: а – обезвоженные бедренные, большеберцовая и малая берцовая кости; б – бедренная кость после распила с указанием отделов трубчатой кости.

Fig. 1. Studied bone samples: а – dehydrated femur, tibia and fibula; б – femur after cutting, indicating the sections of the tubular bone.

вания будет способствовать пониманию проблемы, а, значит, и эффективности ее решения.

### Методы исследований

Для того, чтобы корректно проанализировать гидроксилапатит костной ткани на фоне развития остеопороза был проведен контролируемый эксперимент на лабораторных крысах. В эксперименте при помощи овариоэктомии (хирургического удаления яичников) у крыс был вызван естественный сенильный системный остеопороз. Эксперимент был проведен на двух крысах линии Wistar весом 200–250 г, содержащихся в Центре доклинических исследований Центральной научно-исследовательской лаборатории Сибирского государственного медицинского университета в соответствии с Законодательством Российской Федерацией, требованиями и рекомендациями «Руководства по содержанию и использованию лабораторных животных» и ГОСТ Р ИСО 10993-2-2009 «Изделия медицинские. Оценка биологического действия медицинских изделий. Часть 2. Требования к обращению с животными».

Для проведения исследования животные были поделены на две группы: контрольная группа I (одна интактная крыса) и группа II с состоянием после овариоэктомии (одна крыса). Группе животных II в стерильных условиях была проведена двусторонняя овариоэктомия под внутримышечным наркозом (Золетил 100). После проведения оперативных вмешательств обе группы находились

в изолированных условиях. Согласно обобщению А. Комори (Komori, 2015), проявление системного остеопороза после овариоэктомии фиксируется в виде значимого снижения костной массы (более 30 %) в губчатой кости проксимального метафиза большеберцовой кости на 14-й день после операции, в шейке бедренной кости – на 30-й день и в теле поясничного позвонка – на 60-й день. Истончение кортикального слоя наблюдалось между 90 и 120-м днем после операции (Komori, 2015). На 20-е сутки после введения в эксперимент проведены заборы артериальной крови животных и бедренных, большеберцовых и малоберцовых костей. Всего было отобрано две бедренные, две большие берцовые и две малые берцовые кости с каждой особи (рис. 1). Все эксперименты выполнены с соблюдением правил бережного обращения с лабораторными животными и проведения работ с использованием экспериментальных животных.

Отобранные кости были термически обработаны ( $T \sim 100$  °C в течении 10 часов) для денатурации коллагена при сохранении текстуры самой кости. Фрагменты кости были зафиксированы в оптической эпоксидной смоле, затем в пластинах были выведены параллельные рабочие поверхности и отполированы. Полировка проводилась сначала на полировальных бумагах SiC для выравнивания. Затем на алмазных суспензиях в последовательности (размерность зерен/время полировки) при скорости оборотов полировочного диска 300 об/мин: 9 мкм/6 мин, 6 мкм/5 мин, 3 мкм/4 мин и 1 мкм/2 мин.

Морфологические особенности костной ткани, а также химический состав гидроксилатапатита изучены методами рентгеноспектрального микроанализа на сканирующем электронном микроскопе Tescan Mira 3 LMU (Czech Republic), совмещенным с энергодисперсионным безазотным SDD детектором Ultim MAX 40 (Oxford Instruments Analytical Ltd., Великобритания). Для этого пластины были покрыты проводящим материалом (углеродом) в низком вакууме. Параметры съемки при анализе химического состава минералов энергодисперсионным анализатором: ускоряющее напряжение 20 кВ, сила тока 750–860 пА, живое время набора 120 сек, катод вольфрамовый, размер зонда 1–2 мкм. Были использованы стандартные образцы MAC (55 Standard Universal Block Layout+F/Cup, Micro-Analysis Consultants Ltd, UK): SiO<sub>2</sub>, Al<sub>2</sub>O<sub>3</sub>, MgO, Ca<sub>3</sub>[Si<sub>3</sub>O<sub>9</sub>], Na[AlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>], K[AlSi<sub>3</sub>O<sub>8</sub>], NaCl, MgF<sub>2</sub>, BaF<sub>2</sub>, Fe[S<sub>2</sub>], GaP. Количественная оптимизация выполнялась по кобальту. Кристаллохимические коэффициенты в формуле гидроксилатапатита рассчитаны на 16 катионов. Результаты химических анализов были стандартизированы и обработаны при помощи программного пакета Statistica.

Оставшиеся фрагменты костей были измельчены в агатовой ступке для проведения рентгеноструктурного анализа и ИК спектроскопии. Рентгеноструктурный анализ выполнен на рентгеновском дифрактометре HAOYUAN DX-2700BH (Dandong Haoyuan Instrument Co, Ltd, China). Съемка проведена по геометрии Брэгга-Брентано с использованием CuK $\alpha$ -излучения с NiK $\beta$ -фильтром. Напряжение на трубке составило 40 кВ, ток – 30 мА. Рентгенограммы снимались с шагом 0.02° в интервале 2–70° 2 $\theta$  и выдержкой 0.3 сек в точке. Расшифровка дифрактограмм проводилась с помощью программного обеспечения PDF-4 и HighScore.

Для анализа инфракрасных спектров измельченные образцы костей (навеска менее 1 мг) перетирались до фракции 0.01 мм в агатовой ступке, затем тщательно перемешивались с порошком KBr

и прессовались в виде полупрозрачной таблетки. Анализ проводился сразу, чтобы избежать появления микротрещин в таблетке и дополнительной адсорбционной воды. Спектры ИК поглощения регистрировались на спектрофотометре IRPrestige-21 фирмы «Shimadzu» с преобразованием Фурье (FTIR-8400S) в интервале 300–4000 см<sup>-1</sup> с разрешением 0.001 см<sup>-1</sup> (FT-IR), с помощью программного обеспечения Irsolution. Количество измерений на каждый образец – 10. Количественный анализ отношения CO<sub>3</sub>/PO<sub>4</sub> по ИК спектрам выполнен в соответствии с методикой, описанной в работе (Grunenwald et al., 2014).

### Результаты исследований

Исследование биохимических показателей артериальной крови экспериментальных особей позволили выявить динамику развития заболевания (табл. 1). Создание модели гипозестрогении (синдрома, обусловленного снижением уровня эстрогенов) путем проведения овариоэктомии способствовало снижению секреции кальцитонина и повышению чувствительности кости к резорбтивному действию ПТГ у крысы из группы II, что означает поддержание содержания Ca и P в крови в гомеостатических уровнях за счет резерва минерального содержания костной ткани. Таким образом, результаты показали, что появились эффекты компенсаторного механизма, указывающие на развитие заболевания у крысы из группы II, а костная ткань крысы из группы I была принята как эталон для сравнения.

В гидроксилатапатите трубчатой кости выделяются эпифиз, сформированный губчатой костной тканью, и диафиз, представленный компактной костной тканью (рис. 1), отличающиеся плотностью размещения гаверсовых систем (остеонов), количеством вставочных пластин и концентрических костных пластинок в остеооне. В костных пластинках расположены клетки (остеоциты), которые

Таблица 1

Содержание видеообразующих элементов гидроксилатапатита в артериальной крови, ммоль/л

Table 1

Content of hydroxylapatite-forming elements in arterial blood, mmol/l

| Элемент | Группа I (здоровая) | Группа II (остеопороз) |
|---------|---------------------|------------------------|
| Ca      | 2.76                | 3.28                   |
| P       | 2.35                | 2.53                   |

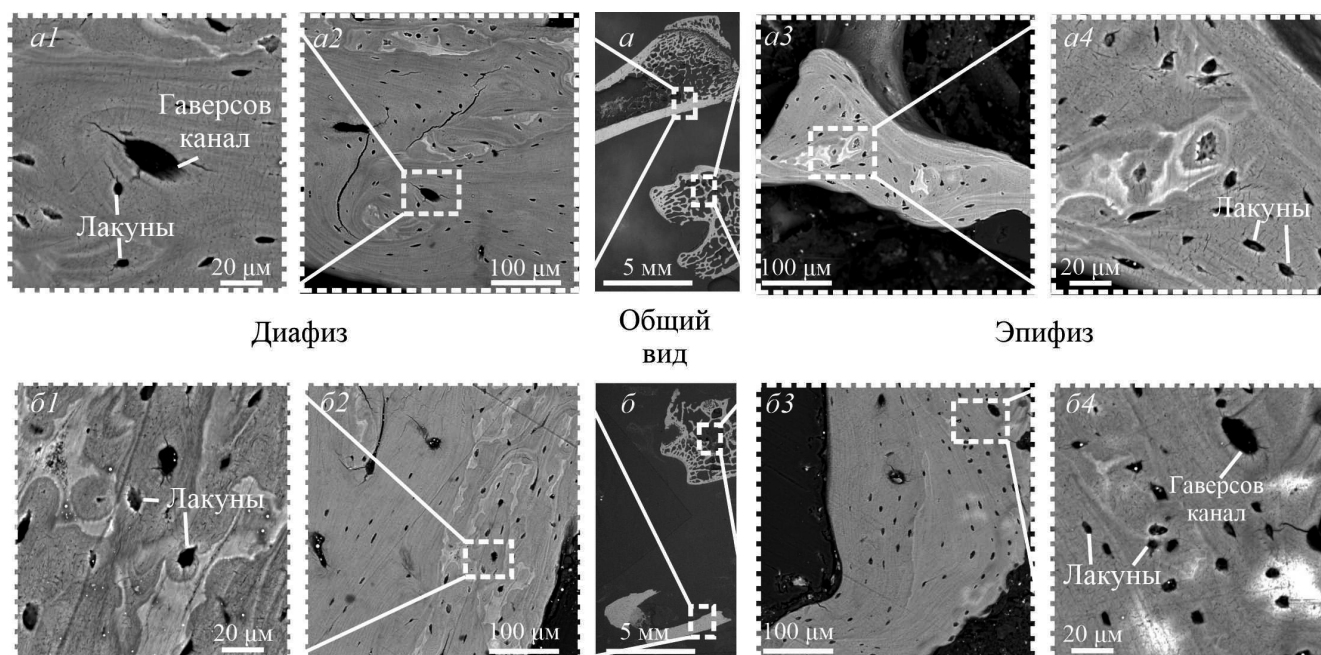


Рис 2. Продольные сечения диафиза и эпифиза трубчатых костей: а – кость здоровой особи; б – кость пораженной остеопорозом особи. BSE-фото.

Fig 2. Longitudinal sections of diaphysis and epiphysis of long bones: a – bone of a healthy individual; b – bone of an individual affected by osteoporosis. BSE images.

участвуют в регуляции обмена Са в организме. Таким образом, строение эпифиза и диафиза определяет динамику остеогенеза.

В продольном спиле кости наблюдаются лакуны: костные полости, в которых размещаются остециты (рис. 2). Гаверсова система в данном сечении не различима, как и спайные линии. Структурно-морфологический рисунок кости хорошо читается в режиме обратно-отраженных электронов, обеспечивающим выделение контрастных зон в оттенках серого. Более темные участки расположены ближе к костным лакунам, светлые – наиболее удалены от них (рис. 2 а2, а3, б2, б3). Размер лакун в костной ткани здоровой особи в эпифизе составляет 6–11 мкм, в диафизе – 8–11 мкм, примерный размер гаверсовых каналов, которые представлены под угловым спилом составляет ~30 мкм (рис. 2 а1, а4). В патогенно измененной костной ткани размер лакун в эпифизе составляет 6–11 и ~14 мкм в диафизе (рис. 2 б1, б4).

Результаты рентгеноспектрального микроанализа позволили охарактеризовать состав кости в различных ее зонах (табл. 2). Суммарное содержание элементов в гидроксилапатите здоровой костной ткани варьирует от 68 до 74 мас. %, тогда как для пораженной остеопорозом оно составляет 61–68 мас. %. Оставшееся количество приходится

на легкие элементы, не определяемые рентгено-спектральным микроанализом. В незначительных количествах присутствуют галогены, причем в гидроксилапатите здоровой кости определяется хлор, в патогенной – фтор. Химический состав гидроксилапатита контрастных участков отличается по суммарному весу присутствующих элементов, в частности Р, Са, S, К.

Бинарные диаграммы распределения содержания видообразующих элементов (Са, Р) показали прямую положительную зависимость между этими компонентами. Коэффициент связи между элементами варьирует от 0.8 до 0.9 (рис. 3). Эта зависимость характерна для всех выделенных типов костей (по состоянию здоровья, по типу костной ткани, по структурно-текстурному рисунку). Однако в гидроксилапатите эпифиза кости, пораженной остеопорозом, концентрации и Р, и Са меньше, чем в кости здоровой особи. Особенностью содержания видообразующих элементов гидроксилапатита диафиза светлых и темных участков является повышенное содержание Р в образцах здоровой кости.

Соотношение содержания Са и Р в гидроксилапатите можно рассматривать как показатель изменения стехиометрической характеристики минеральной составляющей костной ткани, и в абсолютных значениях он меняется незначительно.

Таблица 2

## Средний химический состав гидроксилатапата костной ткани (мас. %)

Table 2

## Average chemical composition of bone tissue hydroxylapatite (wt. %)

| Компоненты                     | Здоровая   |            |            |            | Остеопороз |            |            |            |
|--------------------------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|------------|
|                                | Эпифиз     |            | Диафиз     |            | Эпифиз     |            | Диафиз     |            |
|                                | ТЗ (72)    | СЗ (56)    | ТЗ (41)    | СЗ (41)    | ТЗ (50)    | СЗ (37)    | ТЗ (24)    | СЗ (13)    |
| CaO                            | 40.77±3.44 | 42.00±3.21 | 38.07±3.19 | 39.43±3.29 | 33.91±2.32 | 36.80±2.52 | 36.14±2.69 | 38.74±2.36 |
| P <sub>2</sub> O <sub>5</sub>  | 29.31±2.67 | 29.69±3.62 | 28.53±1.95 | 29.03±2.33 | 25.05±1.94 | 27.27±1.87 | 26.21±2.36 | 27.41±1.10 |
| Na <sub>2</sub> O              | 0.57±0.16  | 0.59±0.27  | 0.52±0.13  | 0.50±0.14  | 0.50±0.09  | 0.66±0.14  | 0.51±0.13  | 0.56±0.14  |
| MgO                            | 0.81±0.15  | 0.81±0.25  | 0.88±0.12  | 0.86±0.14  | 0.78±0.12  | 0.87±0.12  | 0.84±0.15  | 0.83±0.09  |
| K <sub>2</sub> O               | 0.23±0.07  | 0.23±0.08  | 0.07±0.08  | 0.13±0.09  | 0.17±0.05  | 0.21±0.04  | 0.20±0.05  | 0.18±0.05  |
| Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | 0.08±0.06  | 0.09±0.09  | 0.04±0.06  | 0.02±0.05  | 0.12±0.04  | 0.11±0.05  | 0.10±0.04  | 0.10±0.05  |
| SiO <sub>2</sub> *             | –          | –          | –          | –          | 0.03±0.05  | 0.03±0.05  | 0.05±0.05  | 0.01±0.03  |
| S                              | 0.15±0.11  | 0.32±0.18  | 0.03±0.05  | 0.10±0.13  | 0.12±0.06  | 0.12±0.04  | 0.11±0.03  | 0.31±0.06  |
| Cl                             | 0.09±0.06  | 0.05±0.04  | 0.01±0.02  | 0.01±0.02  | –          | –          | –          | –          |
| F                              | –          | –          | –          | –          | 0.02±0.07  | 0.08±0.13  | 0.01±0.07  | –          |
| Сумма                          | 72.00      | 73.79      | 68.14      | 70.08      | 60.69      | 66.15      | 64.17      | 68.15      |
| Ca/P, ат. %                    | 1.77       | 1.79       | 1.69       | 1.72       | 1.72       | 1.71       | 1.74       | 1.79       |
|                                | Позиция А  |            |            |            |            |            |            |            |
| Ca, ф.к.                       | 9.77       | 9.79       | 9.69       | 9.76       | 9.64       | 9.56       | 9.70       | 9.77       |
| Mg                             | 0.27       | 0.26       | 0.31       | 0.29       | 0.30       | 0.32       | 0.32       | 0.30       |
| Na                             | 0.24       | 0.26       | 0.23       | 0.22       | 0.25       | 0.32       | 0.24       | 0.25       |
| K                              | 0.05       | 0.05       | 0.03       | 0.03       | 0.06       | 0.06       | 0.06       | 0.06       |
| Al                             | 0.03       | 0.03       | 0.00       | 0.00       | 0.03       | 0.03       | 0.03       | 0.03       |
|                                | Позиция Х  |            |            |            |            |            |            |            |
| P                              | 5.53       | 5.46       | 5.73       | 5.66       | 5.61       | 5.59       | 5.56       | 5.45       |
| Si                             | –          | –          | –          | –          | 0.02       | 0.01       | 0.02       | 0.00       |
| S                              | 0.07       | 0.13       | 0.01       | 0.04       | 0.06       | 0.06       | 0.06       | 0.14       |
|                                | Позиция Z  |            |            |            |            |            |            |            |
| Cl                             | 0.04       | 0.03       | –          | –          | –          | –          | –          | –          |
| F                              | –          | –          | –          | –          | 0.02       | 0.06       | 0.02       | –          |

*Примечание.* \* – присутствие Si может быть артефактом, вызванным подготовкой проб; ТЗ – темная зона; СЗ – светлая зона. В скобках – количество анализов.

*Note.* \* – the presence of Si may be an artifact caused by sample preparation; ТЗ – dark zone; СЗ – light zone. The number of analyses is given in brackets

Впрочем, в гидроксилатапате зоны эпифиза кости, подверженной остеопорозу, значения данного показателя меньше, чем в минеральной фазе здоровой кости, а в зоне диафиза – незначительно больше (табл. 2).

Менее очевидные зависимости содержаний элементов-примесей в гидроксилатапате костной ткани проанализированы с помощью кластерного и факторного анализов. Кластерный анализ выполнен иерархическим методом по алгоритму Варда (Ward, 1966). Поскольку при пробоподготовке использовали порошок SiC, частицы которого могли остаться в кости с признаками остеопороза, Si из

выборки был исключен. Отдельно рассмотрены характер объединения элементов в группах по степени здоровья костной ткани и типу костной ткани. В результате обработки химических анализов гидроксилатапата костной ткани наблюдаются сходная группировка элементов в кластеры (рис. 4).

Для всех рассмотренных выборок отмечают четыре группы: две моноэлементные (группа I – Ca, группа II – P) и группы, объединяющие S, K и Al (группа III), Mg и Na (группа IV). Кальций и P математически не регулируют друг друга и никак не влияют на вариабельность соседних групп. В третьей группе присутствуют вариации в харак-

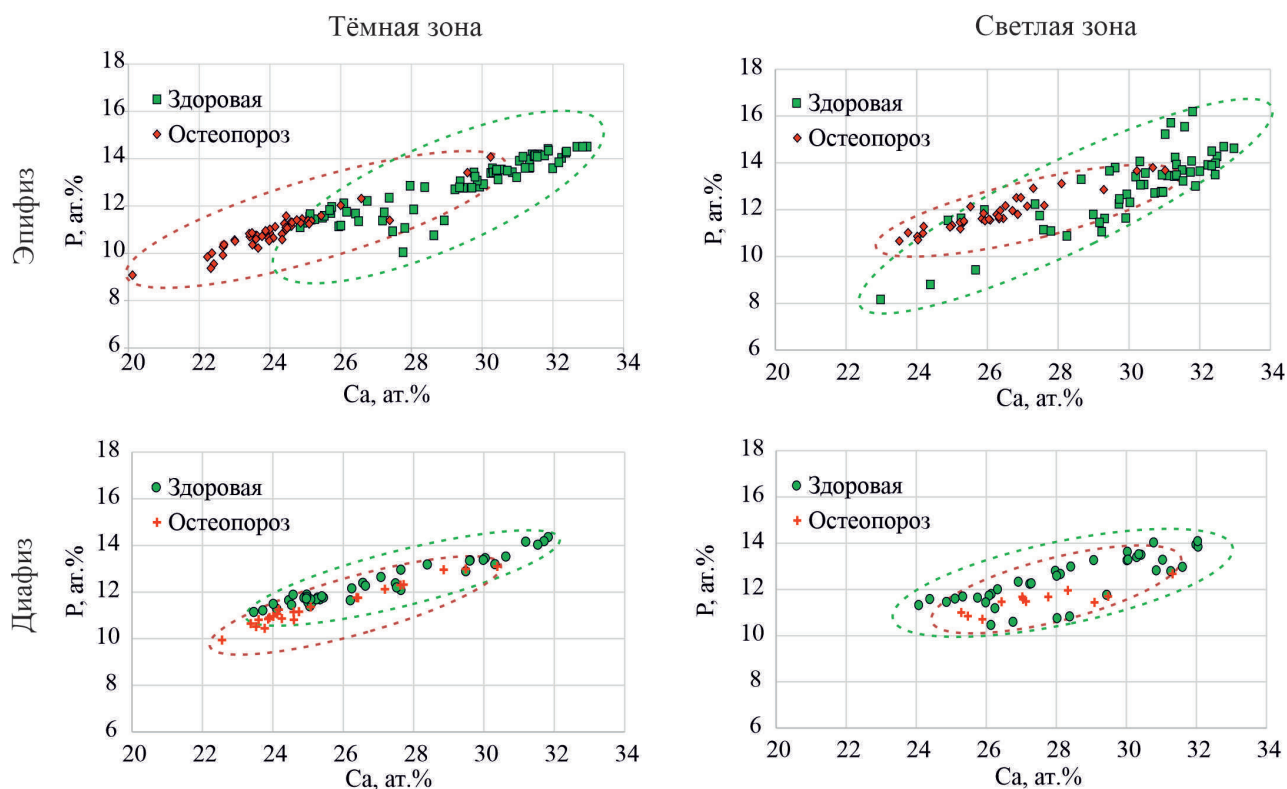


Рис. 3. Корреляция между содержаниями Ca и P в гидроксилапатите здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани.

Fig. 3. Ca–P correlation in hydroxylapatite of healthy and osteoporotic bone tissue.

тере связи между элементами, возможно, так отражается характер изоморфного замещения этих элементов в структуре минерала разных зон кости и ее состояния.

В результате факторного анализа методом главных компонент выделено три фактора, описывающих 83 % изменчивости системы (табл. 3). Первый фактор, вносящий максимальный вклад в дисперсию системы (38 %), является генеральным. Он определяется содержанием в минерале видообразующих элементов: P, Ca, а также Mg, который изоморфно замещает Ca. Второй фактор (20.8 % изменчивости системы) определяется наличием важных биогенных (эссенциальных) элементов: K, Na и Mg. При этом элемент с более крупным ионным радиусом (K) выступает в этой системе антагонистом для Mg и Na. Третий фактор (25.25 % изменчивости системы) определяет присутствие условно-эссенциального Al в минерале и противопоставляется эссенциальному Ca (Zoroddu et al., 2019).

Графическое представление результатов факторного анализа позволило показать динамику изменчивости химического состава гидроксилапатита в зависимости от частей трубчатой кости и ее

Таблица 3

**Факторные нагрузки распределения элементов биогенного гидроксилапатита здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани**

Table 3

**Factor loadings of distribution of elements of biogenic hydroxylapatite in healthy and osteoporotic bone tissue**

| Элементы         | F1           | F2            | F3            |
|------------------|--------------|---------------|---------------|
| Na               | 0.638        | <b>-0.004</b> | 0.677         |
| Mg               | <b>0.793</b> | <b>-0.283</b> | 0.400         |
| Al               | 0.041        | 0.122         | <b>0.931</b>  |
| P                | <b>0.958</b> | 0.197         | 0.095         |
| S                | 0.183        | 0.579         | 0.510         |
| K                | 0.119        | <b>0.844</b>  | 0.096         |
| Ca               | <b>0.811</b> | 0.523         | <b>-0.067</b> |
| Нагрузка на F, % | 38.00        | 20.80         | 25.25         |

Примечание. F1, F2, F3 – факторы 1, 2, 3.

Note. F1, F2, F3 – factors 1, 2, 3.

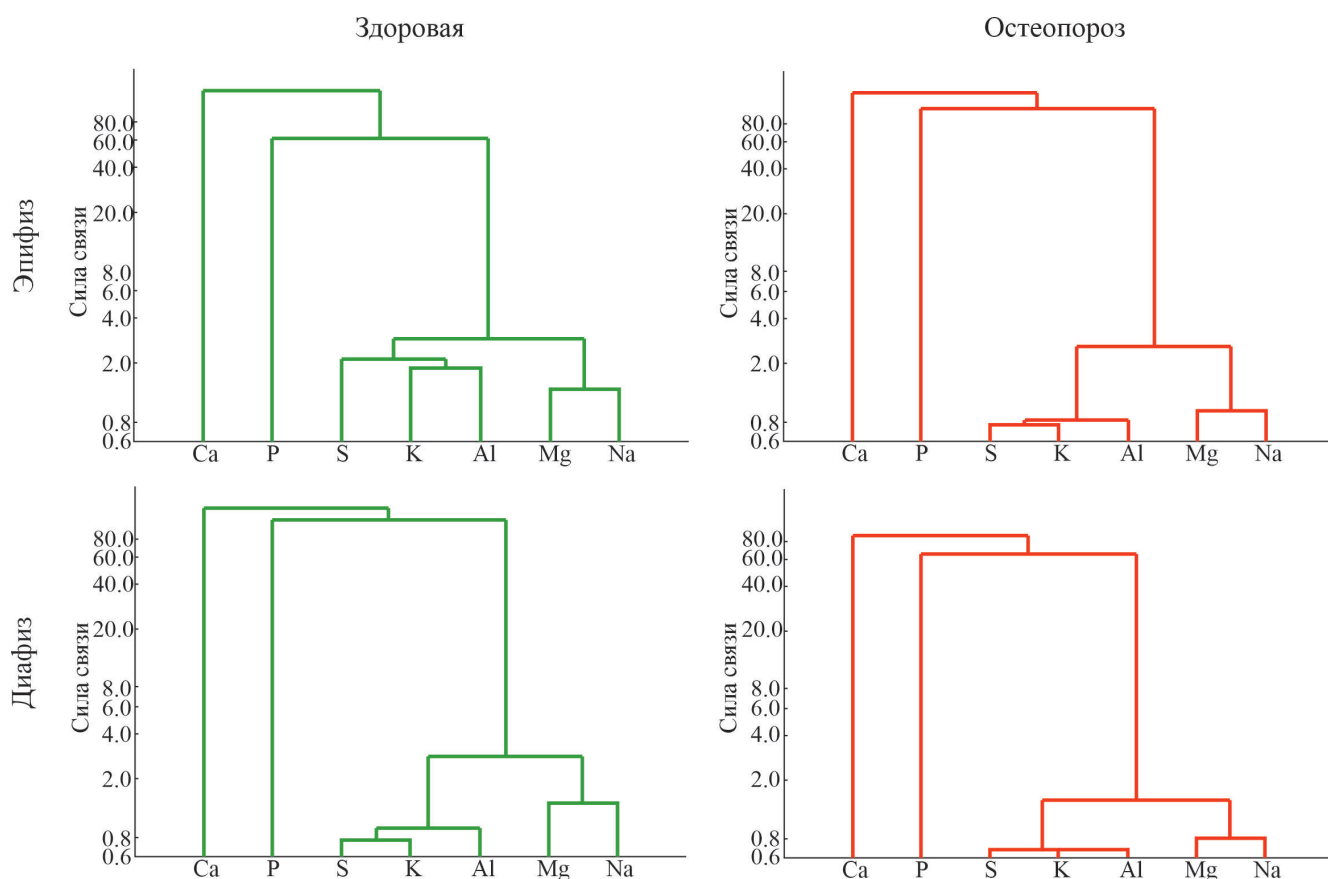


Рис. 4. Кластеризация элементов по результатам химического анализа гидроксилатапатита здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани.

Fig. 4. Clustering of elements based on results of chemical analysis of hydroxylapatite in healthy and osteoporotic bone tissue.

состояния (рис. 5). Область, соответствующая химическому составу гидроксилатапатита здоровой кости, обширна и занимает три квадранта (рис. 5а). При этом фигуративные точки гидроксилатапатита эпифиза и диафиза формируют отдельные поля, существенно отличающиеся в составе примесных элементов. Для гидроксилатапатита эпифиза присутствие К предпочтительнее, чем Na и Mg, в отличие от гидроксилатапатита диафиза. Фигуративные точки состава гидроксилатапатита пораженной остеопорозом кости группируются в «свободном» четвертом квадранте и образуют компактное поле анализов из диафиза и эпифиза. Очевидно, что в гидроксилатапатите кости особи, пораженной остеопорозом, происходит замена видообразующих элементов примесными. Поле смещено в противоположную сторону от кальциевого фактора, что может указывать на некоторый дефицит этого элемента, который компенсируется Al, в меньшей степени Mg и Na, либо на изменение биохимии процесса при формировании минеральной фазы (рис. 5б).

Рентгеноструктурный анализ (рис. 6) гидроксилатапатита кости, пораженной остеопорозом, фиксирует смещение всех рефлексов на дифрактограмме в сторону меньших углов  $2\Theta$ , что указывает на увеличение размеров его элементарной ячейки (табл. 4). Расчет элементарной ячейки и ее объема минеральной фазы кости показал незначительное увеличение данных параметров у гидроксилатапатита особи с остеопорозными изменениями (табл. 4).

Таблица 4

**Параметры и объем элементарной ячейки гидроксилатапатита здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани**

Table 4

**Parameters and unit cell volume of hydroxylapatite from healthy and osteoporotic bone tissue**

| Параметры         | Здоровая    | Остеопороз  |
|-------------------|-------------|-------------|
| a, Å              | 9.41 ± 0.01 | 9.43 ± 0.03 |
| c, Å              | 6.85 ± 0.01 | 6.89 ± 0.01 |
| V, Å <sup>3</sup> | 526.22      | 530.60      |



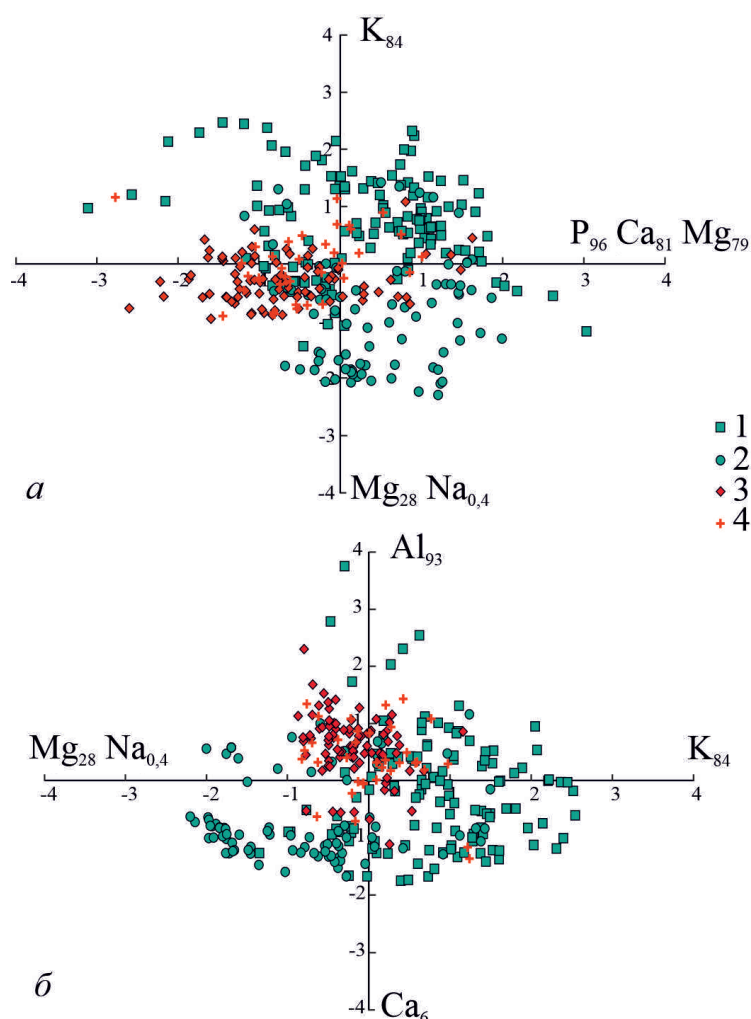


Рис. 5. Факторные нагрузки элементов (табл. 3) в гидроксилапатите костной ткани: а – F1/F2 (ось x – фактор F1, ось y – фактор F2); б – F2/F3 (ось x – фактор F2, ось y – фактор F3).

1, 2 – здоровая кость: 1 – эпифиз, 2 – диафиз; 3, 4 – кость, пораженная остеопорозом: 3 – эпифиз, 4 – диафиз.

Fig. 5. Factor loadings (Table 3) of elements of bone tissue hydroxylapatite: a – F1/F2 (axis x – factor F1, axis y – factor F2); b – F2/F3 (axis x – factor F2, axis y – factor F3).

1, 2 – healthy bone: 1 – epiphysis, 2 – diaphysis; 3, 4 – bone affected by osteoporosis: 3 – epiphysis, 4 – diaphysis.

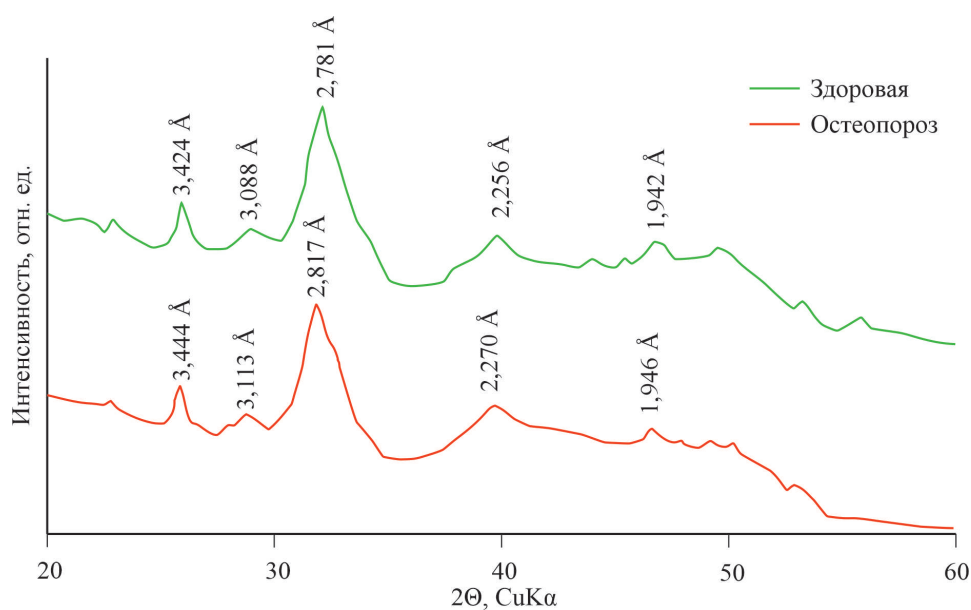


Рис. 6. Дифрактограммы гидроксилапатита здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани.

Fig. 6. X-ray diffraction patterns of hydroxylapatite of healthy and osteoporotic bone tissue.

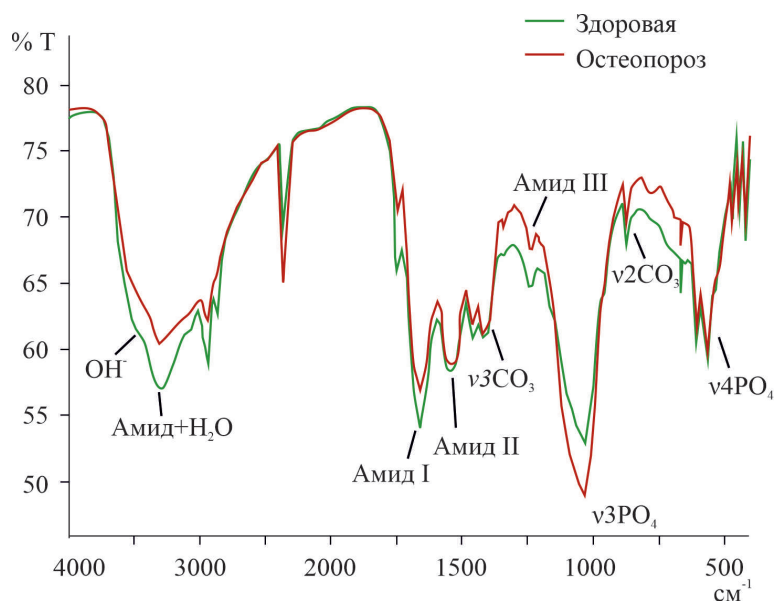


Рис. 7. ИК спектры гидроксилапатита здоровой и пораженной остеопорозом костной ткани.

Fig. 7. IR spectra of hydroxylapatite of healthy and osteoporotic bone tissue.

ИК спектроскопия кости зафиксировала следующие характерные пики (рис. 7): асимметричные деформационные колебания  $[\text{PO}_4]^{3-}$  ( $545 \text{ см}^{-1}$ ), симметричные деформационные колебания  $[\text{CO}_3]^{2-}$  ( $872 \text{ см}^{-1}$ ), симметричные валентные колебания  $[\text{PO}_4]^{3-}$  ( $1030 \text{ см}^{-1}$ ), асимметричные валентные колебания  $[\text{CO}_3]^{2-}$  ( $1420 \text{ см}^{-1}$ ), пик органических соединений ( $1223 \text{ см}^{-1}$ ) (амид III). Обычно пики  $1640$  и  $3450 \text{ см}^{-1}$  характеризуют поглощение адсорбированной воды, интенсивность которых уменьшается при вакуумной сушке. В этом же диапазоне присутствуют пики амид II ( $1560 \text{ см}^{-1}$ ) и амид I ( $1650 \text{ см}^{-1}$ ). Наличие пиков в области  $3000\text{--}3500 \text{ см}^{-1}$  характеризует растяжения C–H и N–H в амидах.

Приблизительно рассчитанное содержание  $\text{CO}_3$ , входящего в структуру биогенного апатита, составляет  $4.3 \text{ мас. \%}$  для гидроксилапатита костной ткани здоровой особи и  $3.7 \text{ мас. \%}$  для гидроксилапатита костной ткани с признаками остеопороза.

### Обсуждение результатов

Комплексное исследование биогенного апатита в рамках поставленного эксперимента с имитацией биологических процессов позволило получить информацию о динамике изменения различных параметров минеральной фазы костной ткани.

Анализ морфологических элементов структуры кости показал, что на первых этапах развития заболевания размеры лакун и гаверсова канала в

костях остаются неизменными. Соотношение размеров этих полостей по максимальному раскрытию составляет  $1 : 3$ , т. е. являются стандартными, характерными для генома.

По сумме оксидов в химическом анализе, полученном на СЭМ, гидроксилапатита здоровой и патогенной кости видно, что при появлении первичных остеопорозных признаков суммарное содержание компонентов в минерале уменьшается. Это может быть связано с увеличением в костной ткани (в органо-минеральном агрегате) как органических соединений (Suvorova et al., 2007), так и гидроксогруппы в составе минеральной фазы. Типоморфными являются галогены. Известно, что фтор, а точнее его повышенные концентрации, могут приводить к остеопорозу (Михайлова и др., 2019).

Характер концентрации Ca и P в гидроксилапатите закономерно связан с морфологией кости и ее зонами. В эпифизе, где процесс биохимического обмена протекает более интенсивно, особенно в частях, расположенных ближе к гаверсовым каналам (темные зоны), содержания и P, и Ca в гидроксилапатите патогенно измененных образцов ниже, чем в эталоне. Изменения в зоне диафиза протекают менее интенсивно, о чем свидетельствует содержание Ca и P в эталонной и остеопорозной костной ткани (рис. 3), при этом следует отметить, что при широком разбросе значений содержание Ca и P в больной кости оказывается ниже, чем в эталонной.

Отношение Ca/P в гидроксилапатита описывает степень изменения костной ткани при остеопорозе (Basle et al., 1990; Kourkoumelis et al., 2012). При этом одни авторы указывают, что в пределах компактной ткани значения данного соотношения не меняются и составляют ~2.23 г/кг (Basle et al., 1990), другие фиксируют уменьшение значения Ca/P как в губчатой, так в плотной ткани кости (от 1.88 до 1.80 г/кг) (Kourkoumelis et al., 2012). Наше исследование не добавило определенности, поскольку значения Ca/P в апатите эпифиза при остеопорозе меньше относительно здоровой кости (на 4 %), а в диафизе – больше (на 4 %), что не позволяет трактовать этот показатель однозначно. По всей видимости, использование значения Ca/P в качестве биомаркера пока не оправдано.

Судя по результатам математической обработки данных, патогенный процесс в организме не нарушает общие химические законы, в том числе характер изоморфного замещения химических элементов в структуре гидроксилапатита. Это видно по группировке элементов в кластеры (рис. 4). Если рассматривать общую выборку, т. е. брать за основу признак остеопорозного поражения костной ткани, наблюдается разделение на две группы: химия здоровой кости и химия патогенной (рис. 8). Анализируя дендрограмму, полагаем, что интерес представляет Al и, в меньшей степени, Mg и Na. Факторный

анализ также продемонстрировал ведущие изменения в координатах этих же элементов (Al, Mg, K), которые участвуют в биохимическом синтезе гидроксилапатита.

Акцентным элементом считается Al, поскольку он отвечает за образование фосфатных и белковых комплексов и, как следствие, за формирование кости. В организме концентрация Al в костной ткани самая высокая после легких (Cournot-Witner et al., 1981). В физиогенном процессе Al имеет близкие связи с Ca, P, Mg и Na и при патогенном развитии процессе остеогенеза он образует самостоятельный кластер (рис. 8). Как отмечалось ранее (Trapp, 1983; Clarkson, Sandeson, 1971), он может выступать антагонистом практически любому элементу, входящему в состав гидроксилапатита костной ткани, за исключением Sr и Ba, и может входить как в позицию A, так и в позицию X (Chappard et al., 2016).

Различные вариации замещений должны отражаться в параметрических характеристиках структуры минерала, что напрямую зависит от размера радиусов ионов заместителей видообразующих элементов в позициях A, X, Z. Кальций в структуре апатита находится в позиции A с координационными числами 9 и 7 в соотношении 2 : 3 соответственно. Таким образом, в структуре гидроксилапатита ионы Ca представлены двумя типами (по размерам)

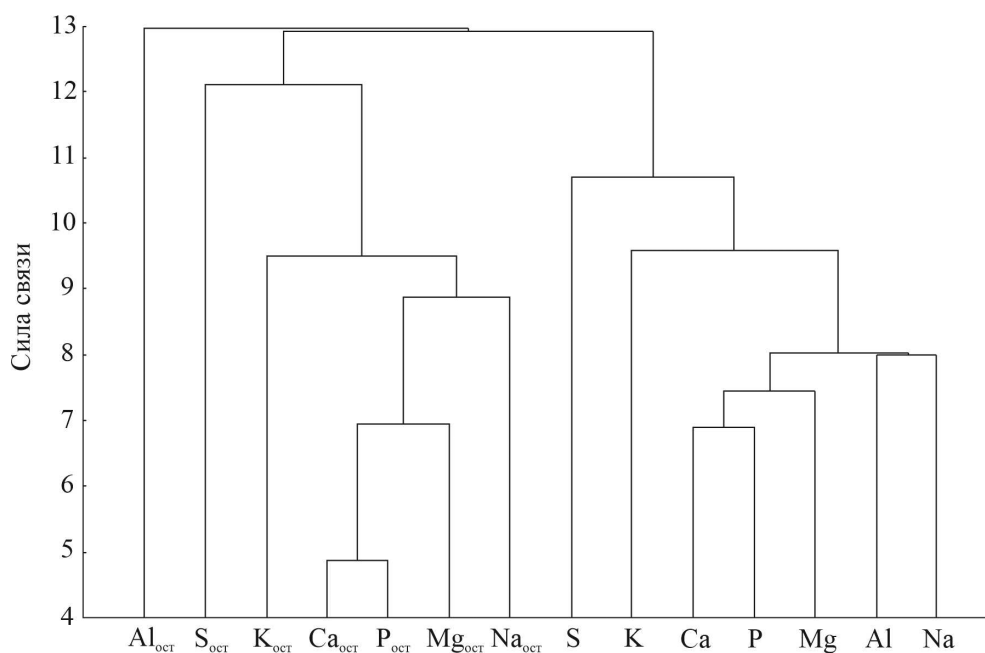


Рис. 8. Общая дендрограмма по результатам химического анализа гидроксилапатита костной ткани.  
 Fig. 8. General dendrogram based on results of chemical analysis of bone tissue hydroxylapatite.

и становится возможным его замещение ионами с более крупными радиусами ( $\text{Na}^+$  и  $\text{K}^+$ ), которые могут занимать позицию с координационным числом 9, с менее крупными ( $\text{Al}^{3+}$  и  $\text{Mg}^{2+}$ ) в позиции с координационным числом 7 (Posner et al., 1984). Как следствие, увеличение содержания примесных элементов с крупными радиусами может приводить к увеличению параметров элементарной ячейки.

Фосфор входит в состав кислотного остатка ( $[\text{PO}_4]^{3-}$ ), который может замещаться карбонатной группой:  $[\text{PO}_4]^{3-} \leftrightarrow [\text{CO}_3]^{2-}\text{F}^-$  (замещения В-типа). Помимо этого,  $[\text{CO}_3]^{2-}$  может замещать гидроксильную группу в позиции добавочного аниона (замещение А-типа). Подобные схемы изоморфизма предлагаются многими авторами (Годовиков, 1975; Legros et al., 1987; Chang, Tanaka, 2002; Kono et al., 2022). По результатам эмпирических исследований вхождение группы  $[\text{CO}_3]^{2-}$  приводит к увеличению параметров элементарной ячейки гидроксилapatита (Posner, 1969; Elliot, 2002). В нашем случае расчетные значения содержания карбонат-иона в структуре патогенной кости ниже примерно на 15 %, чем в эталонной, на фоне незначительного увеличения (~1 %) размера элементарной ячейки. Однако несмотря на зафиксированные изменения, этот вопрос остается дискуссионным. Так, например, отмечается, что при низкотемпературном воздействии на нестехиометричный гидроксилapatит с карбонатными группами содержание  $[\text{CO}_3]^{2-}$  в различных позициях изменяется (Shi et al., 2005). Эти процессы могут идти неодинаково в здоровой и патогенной костной ткани при сушке. Чтобы корректнее оценить этот показатель, необходимо проанализировать содержание  $[\text{CO}_3]^{2-}$  в разных позициях точечной ИК спектроскопией (например, ИК спектроскопия нарушенного полного внутреннего отражения) и с большей статистической выборкой.

В связи с этим, снова обращает на себя внимание Al, который в структуре гидроксилapatита может входить как в позицию А, так и в позицию Х (Chappard et al., 2016, Чайкина и др. 2016) и, по данным обзорной работы (Legros et al., 1987), увеличение его содержания будет приводить к увеличению параметров элементарной ячейки. Вероятно, Al предпочтительнее будет занимать позицию Х, поскольку его ионный радиус в 1.2 раза больше, чем у P, что и будет сказываться на параметрах элементарной ячейки гидроксилapatита. Возможно, именно эта схема изоморфного замещения фиксирует в зоне диафиза начальную стадию остеопороза (меньше P при равных вариациях Ca), в то время

как в зоне эпифиза процесс прошел значительно дальше и мы наблюдаем не только уменьшение содержания P, но и содержания Ca в патогенных костях.

## Выводы

В результате детального исследования костной ткани в режиме контролируемого эксперимента по динамике развития остеопороза у лабораторных крыс в период менопаузы выявлены ключевые минералогические и химические критерии проявления заболевания. Морфология органо-минерального агрегата в начальной стадии развития болезни однотипна и не позволяет фиксировать патогенез. Минералогические критерии (химический состав, структура минерала) показали частично ожидаемые результаты. Кристаллическая структура минерала меняется незначительно (увеличивается объем элементарной ячейки). Это может быть причиной изменения устойчивости кристаллов к внешним воздействиям, которые могут проявляться как в физическом (механическом), так и в химическом (диффузия) плане. Показано, что зона эпифиза (губчатая ткань) динамичнее реагирует на биологические изменения. Стехиометрия минеральной фазы остается неизменной. На наш взгляд, особого внимания в качестве примесного элемента заслуживает Al, содержание которого и распределение в патогенной кости представляется значимым по результатам математической обработки данных. Одним из химических маркеров является присутствие хлора в структуре здоровой кости, а в пораженной остеопорозом – фтора. Неожиданно, результаты нашей работы показали уменьшение содержания карбонатной группы в структуре гидроксилapatита кости с остеопорозными изменениями. Эти данные требуют дальнейшего уточнения, наряду с анализом отношения Ca/P гидроксилapatита костной ткани при развитии остеопороза.

*Исследования (электронная микроскопия и рентгеноструктурный анализ) выполнены на оборудовании Томского регионального центра коллективного пользования Национального исследовательского Томского государственного университета и на базе аналитической лаборатории кафедры геологии и разведки полезных ископаемых Института природных ресурсов ТПУ (ИК спектроскопия). Центр поддержан грантом Министерства науки и высшего образования Российской Федерации №. 075-15-2021-693 (№ 13.ЦКП.21.0012).*

## Литература

- Годовиков А.А. (1975) Минералогия. М., Недра, 520 с.
- Корого А.А. (1992) Введение в биоминералогию. СПб, Недра, 280 с.
- Михайлова Н.Н., Ядыкина Т.К., Бугаева М.С., Данилов И.П., Семенова Е.А., Дорошилов А.В., Килина Л.П., Жукова А.Г. (2019) Клинико-экспериментальные исследования состояния костной ткани при флюорозе. *Медицина труда и промышленная экология*, **59**(6), 364–370.
- Скоблин А.П., Белоус А.М. (1968) Микроэлементы в костной ткани. М., Медицина, 232 с.
- Чайкина М.В., Булина Н.В. Ищенко А.В., Проханов И.Ю. (2016) Исследование процесса замещения фосфата на алюминат в структуре гидроксиапатита при механохимическом синтезе и отжиге. *Химия в интересах устойчивого развития*, **24**(5), 669–678.
- Basle M.F., Rebel A., Mauras Y., Allain P., Audran M., Clochon P. (1990) Concentration of bone elements in osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, **5**(1), 41–47.
- Casarrubios L., Gómez-Cerezo N., Sánchez-Salcedo S., Feito M., Serrano M., Saiz-Pardo M., Ortega L., de Pablo D., Díaz-Güemes I., Fernández-Tomé B., Enciso S., Sánchez-Margallo F., Portolés M., Arcos D., Vallet-Regí M. (2020) Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta biomaterialia*, **101**, 544–553.
- Chang M.C., Tanaka J. (2002) FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, **23**(24), 4811–4818.
- Chappard D., Bizot P., Mabilieu G., Hubert L. (2016) Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al<sup>3+</sup> deposition in the calcified matrix of bone // *Morphologie*, **100**(329), 95–105.
- Clarkson D.T., Sanderson J. (1971) Inhibition of the uptake and long-distance transport of calcium by aluminium and other polyvalent cations. *Journal of Experimental Botany*, **22**(4), 837–851.
- Cournot-Witmer G., Zingraff J., Plachot J. (1981) Aluminum localization in bone from hemodialyzed patients: relationship to matrix mineralization. *Kidney International*, **20**(3), 375–385.
- Ebeling P., Daly R., Kerr D., Kimlin M. (2013) Building healthy bones throughout life: an evidence-informed strategy to prevent osteoporosis in Australia. *Medical Journal of Australia*, **2**(S1), 1–9.
- Elliott J.C. (2002) Calcium phosphate biominerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **48**(1), 427–453.
- Glimcher M.J. (1960) Specificity of the molecular structure of organic matrices in mineralization. *Calcification in Biological Systems*, 421487.
- Glimcher M.J. (2006) Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, **64**(1), 223–282.
- Grunenwald A., Keyser C., Sautereau A., Crubézy E., Ludes B., Drouet C. (2014) Revisiting carbonate quantification in apatite (bio) minerals: a validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*, **49**, 134–141.
- Hunter G.K., Goldberg H.A. (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, **90**(18), 8562–8565.
- Hunter G.K., Hauschka P., Poole A., Rosenberg L., Goldberg H.A. (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*, **317**(1), 59–64.
- Komori T. (2015) Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology*, **759**, 287–294.
- Kono T., Sakae T., Nakada H., Kaneda T., Okada H. (2022) Confusion between carbonate apatite and biological apatite (carbonated hydroxyapatite) in bone and teeth. *Minerals*, **12**(2), 170.
- Kourkoumelis N., Balatsoukas I., Tzaphlidou M. (2012) Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *Journal of biological physics*, **38**, 279–291.
- Legros R., Balmain N., Bonel G. (1987) Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcified Tissue International*, **41**, 137–144.
- Meunier P., Roux C., Seeman E., Ortolani S., Badurski J., Spector T., Cannata J., Balogh A., Lemmel E., Pors-Nielsen S., Rizzoli R., Genant H., Reginster J. (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, **350**(5), 459–468.
- Posner A.S. (1969) Crystal chemistry of bone mineral. *Physiological reviews*, **49**(4), 760–792.
- Posner A.S., Blumenthal N.C., Betts F. (1984) Chemistry and structure of precipitated hydroxyapatites. *Phosphate minerals*, 330–350.
- Rachner T.D., Khosla S., Hofbauer L.C. (2011) Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*, **377**(9773), 1276–1287.
- Reginster J., Seeman E., De Vernejoul M., Adami S., Compston J., Phenekos C., Devogelaer J., Curiel M., Sawicki A., Goemaere S., Sorensen O., Felsenberg D., Meunier P. (2005) Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**(5), 2816–2822.
- Shi J., Klocke A., Zhang M., Bismayer U. (2005) Thermally-induced structural modification of dental enamel apatite: Decomposition and transformation of carbonate groups. *European Journal of Mineralogy*, **17**(5), 769–776.
- Simon P., Rosseeva E., Buder J., Carrillo-Cabrera W., Kniep R. (2009) Embryonic states of fluorapatite–gelatine

nanocomposites and their intrinsic electric field-driven morphogenesis: the missing link on the way from atomistic simulations to pattern formation on the mesoscale. *Advanced Functional Materials*, 19(22), 3596–3603.

**Suvorova E.I., Petrenko P.P., Buffat P.A.** (2007) Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure. *Scanning: The Journal of Scanning Microscopies*, 29(4), 162–170.

**Trapp G.A.** (1983) Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sciences*, 33(4), 311–316.

**Ward J.** (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function // *Journal of the American Statistical Association*, 58(301), 236–244.

**Zoroddu M., Aaseth J., Crisponi G., Medici S., Peana M., Nurchi V.** (2019) The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of inorganic biochemistry*, 195, 120–129.

## References

**Basle M.F., Rebel A., Mauras Y., Allain P., Audran M., Clochon P.** (1990) Concentration of bone elements in osteoporosis. *Journal of Bone and Mineral Research*, 5(1), 41–47.

**Chaikina M.V., Bulina N.V. Ishchenko A.V., Prosanov I.Yu.** (2016) [Study of the process of replacing phosphate with aluminate in the structure of hydroxylapatite during mechanochemical synthesis and annealing]. *Khimiya v interesakh ustoychivogo razvitiya [Chemistry for Sustainable Development]*, 24(5), 669–678. (in Russian).

**Casarrubios L., Gómez-Cerezo N., Sánchez-Salcedo S., Feito M., Serrano M., Saiz-Pardo M., Ortega L., de Pablo D., Díaz-Güemes I., Fernández-Tomé B., Enciso S., Sánchez-Margallo F., Portolés M., Arcos D., Vallet-Regí M.** (2020) Silicon substituted hydroxyapatite/VEGF scaffolds stimulate bone regeneration in osteoporotic sheep. *Acta biomaterialia*, 101, 544–553.

**Chang M.C., Tanaka J.** (2002) FT-IR study for hydroxyapatite/collagen nanocomposite cross-linked by glutaraldehyde. *Biomaterials*, 23(24), 4811–4818.

**Chappard D., Bizot P., Mabileau G., Hubert L.** (2016) Aluminum and bone: Review of new clinical circumstances associated with Al<sup>3+</sup> deposition in the calcified matrix of bone // *Morphologie*, 100(329), 95–105.

**Clarkson D.T., Sanderson J.** (1971) Inhibition of the uptake and long-distance transport of calcium by aluminium and other polyvalent cations. *Journal of Experimental Botany*, 22(4), 837–851.

**Cournot-Witmer G., Zingraff J., Plachot J.** (1981) Aluminum localization in bone from hemodialyzed patients: relationship to matrix mineralization. *Kidney International*, 20(3), 375–385.

**Ebeling P., Daly R., Kerr D., Kimlin M.** (2013) Building healthy bones throughout life: an evidence-

informed strategy to prevent osteoporosis in Australia. *Medical Journal of Australia*, 2(S1), 1–9.

**Elliott J.C.** (2002) Calcium phosphate biominerals. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 48(1), 427–453.

**Glimcher M.J.** (1960) Specificity of the molecular structure of organic matrices in mineralization. *Calcification in Biological Systems*, 421487.

**Glimcher M.J.** (2006) Bone: nature of the calcium phosphate crystals and cellular, structural, and physical chemical mechanisms in their formation. *Reviews in Mineralogy and Geochemistry*, 64(1), 223–282.

**Godovikov A.A.** (1975) [Mineralogy]. Moscow, Nedra, 520 p. (in Russian).

**Grunenwald A., Keyser C., Sautereau A., Crubézy E., Ludes B., Drouet C.** (2014) Revisiting carbonate quantification in apatite (bio) minerals: a validated FTIR methodology. *Journal of Archaeological Science*, 49, 134–141.

**Hunter G.K., Goldberg H.A.** (1993) Nucleation of hydroxyapatite by bone sialoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(18), 8562–8565.

**Hunter G.K., Hauschka P., Poole A., Rosenberg L., Goldberg H.A.** (1996) Nucleation and inhibition of hydroxyapatite formation by mineralized tissue proteins. *Biochemical Journal*, 317(1), 59–64.

**Korago A.A.** (1992) [Introduction to biomineralogy]. St. Petersburg, Nedra, 280 p. (in Russian)

**Komori T.** (2015) Animal models for osteoporosis. *European Journal of Pharmacology*, 759, 287–294.

**Kono T., Sakae T., Nakada H., Kaneda T., Okada H.** (2022) Confusion between carbonate apatite and biological apatite (carbonated hydroxyapatite) in bone and teeth. *Minerals*, 12(2), 170.

**Kourkoumelis N., Balatsoukas I., Tzaphlidou M.** (2012) Ca/P concentration ratio at different sites of normal and osteoporotic rabbit bones evaluated by Auger and energy dispersive X-ray spectroscopy. *Journal of biological physics*, 38, 279–291.

**Legros R., Balmain N., Bonel G.** (1987) Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcified Tissue International*, 41, 137–144.

**Meunier P., Roux C., Seeman E., Ortolani S., Badurski J., Spector T., Cannata J., Balogh A., Lemmel E., Pors-Nielsen S., Rizzoli R., Genant H., Reginster J.** (2004) The effects of strontium ranelate on the risk of vertebral fracture in women with postmenopausal osteoporosis. *New England Journal of Medicine*, 350(5), 459–468.

**Mikhailova N.N., Yadykina T.K., Bugaeva M.S., Danilov I.P., Semenova E.A., Doroshilov A.V., Kiliina L.P., Zhukova A.G.** (2019) [Clinical and experimental studies of the state of bone tissue in fluorosis]. *Meditsina truda i promyshlennaya ekologiya [Occupational Medicine and Industrial Ecology]*, 59(6), 364–370. (in Russian).

**Posner A.S.** (1969) Crystal chemistry of bone mineral. *Physiological reviews*, 49(4), 760–792.

- Posner A.S., Blumenthal N.C., Betts F.** (1984) Chemistry and structure of precipitated hydroxyapatites. *Phosphate minerals*, 330–350.
- Rachner T.D., Khosla S., Hofbauer L.C.** (2011) Osteoporosis: now and the future. *The Lancet*, **377**(9773), 1276–1287.
- Reginster J., Seeman E., De Vernejoul M., Adami S., Compston J., Phenekos C., Devogelaer J., Curiel M., Sawicki A., Goemaere S., Sorensen O., Felsenberg D., Meunier P.** (2005) Strontium ranelate reduces the risk of nonvertebral fractures in postmenopausal women with osteoporosis: Treatment of Peripheral Osteoporosis (TROPOS) study. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **90**(5), 2816–2822.
- Shi J., Klocke A., Zhang M., Bismayer U.** (2005) Thermally-induced structural modification of dental enamel apatite: Decomposition and transformation of carbonate groups. *European Journal of Mineralogy*, **17**(5), 769–776.
- Simon P., Rosseeva E., Buder J., Carrillo-Cabrera W., Kniep R.** (2009) Embryonic states of fluorapatite–gelatine nanocomposites and their intrinsic electric field-driven morphogenesis: the missing link on the way from atomistic simulations to pattern formation on the mesoscale. *Advanced Functional Materials*, **19**(22), 3596–3603.
- Skoblin A.P., Belous A.M.** (1968) [Microelements in bone tissue]. Moscow, Meditsina, 232 p. (in Russian).
- Suvorova E.I., Petrenko P.P., Buffat P.A.** (2007) Scanning and transmission electron microscopy for evaluation of order/disorder in bone structure. *Scanning: The Journal of Scanning Microscopies*, **29**(4), 162–170.
- Trapp G.A.** (1983) Plasma aluminum is bound to transferrin. *Life Sciences*, **33**(4), 311–316.
- Ward J.** (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function // *Journal of the American Statistical Association*, **58**(301), 236–244.
- Ward J.** (1963) Hierarchical Grouping to Optimize an Objective Function // *Journal of the American Statistical Association*, **58**(301), 236–244.
- Zoroddu M., Aaseth J., Crisponi G., Medici S., Peana M., Nurchi V.** (2019) The essential metals for humans: a brief overview. *Journal of inorganic biochemistry*, **195**, 120–129.