

СОПОСТАВЛЕНИЕ ДАННЫХ РЕНТГЕНОВСКОЙ МИКРОТОМОГРАФИИ И ФЛУОРЕСЦЕНТНОГО АНАЛИЗА ПРИ ИЗУЧЕНИИ СТРУКТУРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ

© 2012 г. В. Е. Асадчиков¹, Р. А. Сенин³, А. Е. Благов¹, А. В. Бузмаков¹, В. И. Гулимова², Д. А. Золотов¹, А. С. Орехов¹, А. С. Осадчая¹, К. М. Подурец³, С. В. Савельев², А. Ю. Серегин¹, Е. Ю. Терещенко¹, М. В. Чукалина¹, М. В. Ковальчук^{1,3}

¹ Институт кристаллографии РАН, Москва

E-mail: buzmafov@gmail.com

² Научно-исследовательский институт морфологии человека РАМН, Москва

³ Национальный исследовательский центр “Курчатовский институт”, Москва

Поступила в редакцию 27.04.2012 г.

Возможность локализации скоплений атомов тяжелых элементов обоснована путем сопоставления данных рентгеновской микротомографии на разных длинах волн, растровой электронной микроскопии и рентгеновского флуоресцентного анализа. Впервые проведены исследования проксимальных хвостовых позвонков хрящепалого геккона (*Chondrodactylus turneri*) как гистологическими методами, так и физическими, включая рентгеновскую микротомографию на разных длинах волн и элементный анализ. Предложенная комплексная методология исследования позволила выявить области скопления тяжелых элементов в названных костях хрящепалого геккона.

ВВЕДЕНИЕ

Во время различных заболеваний и при экстремальных нагрузках структура живых тканей подвергается частичным внутренним изменениям, которые не имеют внешних физиологических или анатомических проявлений. Исследование таких структурных изменений позволяет выявить причины, их вызывающие, что играет важную роль при постановке диагноза. Наиболее интересным объектом исследований является костная ткань. Одна из причин возникновения ее патологии, в частности, связана с длительным нахождением позвоночных в условиях микрогравитации (невесомости).

Дегенерация тканей в невесомости является серьезным препятствием на пути к продолжительному пребыванию человека в космосе и межпланетным перелетам, вызывая резкое уменьшение объема костей и мышц [1]. Отмечено, что пребывание в таких условиях приводит к декальцификации костной ткани. Однако при этом можно ожидать изменения концентрации и иных более тяжелых элементов. Другие ткани организма также могут обладать механочувствительностью и нуждаться в гравитации для сохранения нормального метаболизма. Таким образом, костная и мышечная ткани являются своего рода “сигнальными системами”, демонстрируя наиболее ранний и очевидный ответ на влияние микрогравитации. При более длительном пребывании в невесомости могут проявиться другие серьезные изменения — например, в иммунной системе или

в регенеративной способности органов и тканей. Существует концепция о необходимости гравитационно-опосредованной механической нагрузки для сохранения здоровья живых организмов, которую можно проверить только при анализе последствий микрогравитации.

Исследования позвоночных животных в условиях микрогравитации проводятся с начала 1990-х гг. [2–6] по настоящее время [7–19]. Объектами исследований были амфибии, рептилии и млекопитающие как взрослые, так и на разных стадиях личиночного или эмбрионального развития (головастики шпорцевой лягушки *Xenopus laevis* [3–6], а также эмбрионы крыс, развитие которых проходило на борту космического аппарата (КА “Шаттл”) [20–23]. На основании полученных данных высказано предположение, что степень деминерализации скелета в невесомости у разных животных при близкой или одинаковой продолжительности полета может быть различной в зависимости от морфологических и поведенческих адаптаций исследуемых животных к их среде обитания [24]. Так, различной оказалась реакция скелета на пребывание в невесомости у личинок амфибий и взрослых животных. У головастиков шпорцевых лягушек после 11.5 сут. в невесомости (КА “Биокосмос”) был выявлен ряд отклонений в развитии скелета, не приводящих, однако, к деминерализации. В то же время у взрослых испанских тритонов (*Pleurodeles waltlii*) результатом двухнедельных полетов на КА “Космос 1887”, “Космос 2044”, “Бийон” и “Фотон” стала заметная

деминерализация костной и хрящевой ткани. Количество кальция, фосфора и серы у них уменьшалось на 7, 3 и 7% соответственно по сравнению с контролем [3].

Наравне с традиционными гистологическими исследованиями образцов возможно использование альтернативных методов исследования элементного состава костных тканей с использованием мощных синхротронных либо протонных источников [25–29]. Данные методы основаны на взаимодействии зондирующего излучения или потока частиц с атомами. При облучении атомов высокоэнергетическими рентгеновскими фотонами или электронами происходит возбуждение электронов внутренних оболочек этих атомов. Возбужденные электроны выбиваются со своих оболочек и на эти вакантные места перескакивают электроны с внешних оболочек. Высвободившаяся энергия выделяется в виде кванта рентгеновского диапазона или передается электрону из внешней оболочки (оже-электрон). По энергиям и количеству испущенных квантов (или электронов) судят о количественном и качественном составе анализируемого вещества. Однако при сканировании электронным пучком глубина проникновения электронов в исследуемый объект обычно не превышает 10 мкм, что позволяет получать информацию только с поверхности объекта, не позволяя заглянуть внутрь. Такие же ограничения накладываются и при детектировании вторичных электронов, поскольку их глубина выхода также не превышает нескольких микрометров. Оптическая схема эксперимента определяет пространственное разрешение выполняемых измерений. Для построения трехмерного распределения химических элементов был разработан метод рентгенофлуоресцентной томографии [30, 31]. Схема эксперимента предполагает регистрацию флуоресцентного излучения от образца с высоким пространственным разрешением. Для этого отдельные части образца засвечиваются микрофокусированным пучком зондирующего излучения, а перед энергодисперсионным детектором располагается коллимирующий элемент (чаще всего поликапиллярная линза-концентратор), что позволяет получать сигнал не от всего образца, а только от малой его части. При изменении положения пучка и детектора проводится трехмерное сканирование всего исследуемого образца. В настоящее время такие исследования проводятся лишь на ограниченном количестве станций в современных синхротронных центрах [30, 31].

В настоящей работе проведены комплексные исследования влияния микрогравитации на структуру костной ткани с использованием как гистологии, так и рентгенофлуоресцентного анализа (РФА), растровой электронной микроскопии (РЭМ) и метода абсорбционной рентгеновской микротомографии.

ВОЗМОЖНОСТЬ ИССЛЕДОВАНИЯ ПРОСТРАНСТВЕННОГО РАСПРЕДЕЛЕНИЯ ЭЛЕМЕНТОВ В ЛАБОРАТОРНЫХ УСЛОВИЯХ

Проанализируем некоторые аспекты использования абсорбционной микротомографии для выделения областей, различающихся по химическому составу.

При использовании монохроматического излучения микротомография позволяет получить информацию о трехмерной структуре линейного коэффициента поглощения на конкретной длине волны. Проводя томографические измерения на разных длинах волн, возможно локализовать области, в которых элементный состав отличается от состава в других областях.

Действительно, поглощение монохроматического рентгеновского излучения I_0 в однородном по составу и плотности образце описывается следующим образом:

$$I = I_0 \exp(-\mu d) = I_0 \exp(-n\mu_a d),$$

где I_0 – интенсивность падающего излучения, μ – линейный коэффициент ослабления рентгеновского излучения, d – толщина исследуемого образца, $\mu_a = 2r_0\lambda f_2$ – фотоэлектронное сечение рассеяния, $n = 1 - \frac{1}{2\pi} N r_0 \lambda^2 (f_1 + i f_2)$ – коэффициент преломления рентгеновского излучения, $f = f_1 + i f_2$ – атомный фактор рассеяния, r_0 – классический радиус электрона, λ – длина волны исследуемого излучения, N – число рассеивающих частиц.

Или

$$\frac{\mu}{\rho} \approx Z^4 \lambda^3 f_1, \quad (1)$$

где f_1 – эффективное число электронов, участвующих в рассеянии рентгеновского излучения.

Отметим, что в широком диапазоне энергий E рентгеновского излучения энергетическая зависимость коэффициента поглощения в полосах между скачками поглощения может быть приблизительно аппроксимирована гладкой функцией

$$\frac{\mu}{\rho} \approx Z^4 \lambda^3.$$

В случае, если объем неоднороден, то линейный коэффициент поглощения равен сумме вкладов составляющих объема:

$$\mu = \sum_i \mu_i = \sum_i \mu'_i \rho_i,$$

где μ'_i – массовый коэффициент ослабления i -го элемента, ρ_i – плотность i -го элемента.

Рассмотрим без ограничения общности модельный объект, состоящий из двух химических элементов.

Пусть плотности этих элементов в точках A и B равны соответственно ρ_i^A и ρ_i^B , $i = 1, 2$.

Тогда поглощение в этих точках $\mu^{A,B} = \mu_1^{A,B} \rho_1^{A,B} + \mu_2^{A,B} \rho_2^{A,B}$.

Контраст поглощений между этими точками будет равен

$$K = \frac{\mu^A}{\mu^B} = \frac{\mu_1 \rho_1^A + \mu_2 \rho_2^A}{\mu_1 \rho_1^B + \mu_2 \rho_2^B}. \quad (2)$$

Если элементы расположены равномерно по объекту, т.е. если $\rho_i^A = \rho_i^B = \rho_i$, то выражение (2) превращается в

$$K = \frac{\mu^A}{\mu^B} = \frac{\mu_1 \rho_1 + \mu_2 \rho_2}{\mu_1 \rho_1 + \mu_2 \rho_2} = 1. \quad (3)$$

Следует заметить, что это соотношение не зависит от длины волны падающего излучения. Таким образом, если элементный состав распределен по исследуемому образцу равномерно, то контраст в поглощении рентгеновского излучения будет постоянен.

Однако если соотношение плотностей химических элементов изменяется от точки к точке, то соотношение контрастов между этими точками при разных энергиях падающего излучения будет разным.

Пусть K_1 и K_2 — коэффициенты из соотношения (3) при измеряемых длинах волн λ_1 и λ_2 соответственно. Тогда принимая во внимание (1) и учитывая, что плотность вещества не зависит от длины волны падающего излучения, получаем:

$$\frac{K_1}{K_2} = \frac{(\mu_1 \rho_1^A + \mu_2 \rho_2^A)(\mu_1 \rho_1^B + \mu_2 \rho_2^B)}{(\mu_1 \rho_1^B + \mu_2 \rho_2^B)(\mu_1 \rho_1^A + \mu_2 \rho_2^A)} = \frac{(Z_1^4 f_{1,\lambda_1}^1 \rho_1^A + Z_2^4 f_{1,\lambda_1}^2 \rho_2^A)(Z_1^4 f_{1,\lambda_2}^1 \rho_1^B + Z_2^4 f_{1,\lambda_2}^2 \rho_2^B)}{(Z_1^4 f_{1,\lambda_1}^1 \rho_1^B + Z_2^4 f_{1,\lambda_1}^2 \rho_2^B)(Z_1^4 f_{1,\lambda_2}^1 \rho_1^A + Z_2^4 f_{1,\lambda_2}^2 \rho_2^A)}, \quad (4)$$

где Z_i — атомный номер i -го элемента, f_{i,λ_j}^j — реальная часть атомного фактора рассеяния j -го элемента на длине волны λ_j .

Ввиду того, что значение атомного фактора рассеяния f_1 зависит от длины волны, соотношение (4) не будет равно единице при $\rho_1 \neq \rho_2$ в точках A и B .

Таким образом, проводя томографические исследования на разных длинах волн и вычисляя контраст между различными областями образца, можно локализовать области, где химические элементы расположены неравномерно. Более того, полагаем, что исследование пространственного распределения химических элементов возможно при сочетании методов рентгеновской микро-томографии и РФА.

В дальнейшем можно исследовать методом РФА только эти области, что позволит существенно сократить время проведения измерений.

ОБЪЕКТ ИССЛЕДОВАНИЙ

В качестве образцов для исследования использовались кости проксимальных хвостовых позвонков хрящепалого геккона (*Chondrodactylus turneri* Gray, 1864). Название имеет многочисленные синонимы, из которых наиболее распространенный и широко используемый — *Pachydactylus turneri* (толстопалый геккон). Английский эквивалент названия — Turner's Thick-toed Gecko, немецкий — Turners Dickfingergecko. Хрящепалые гекконы обитают в Центральной и Южной Африке, населяя разнообразные биотопы: от каменистой пустыни до увлажненных берегов рек. Общая длина тела от кончика носа до кончика хвоста 15–20 см, ширина головы — 2.5–3 см, вес — 17–28 г. Эти рептилии были впервые предложены нами и успешно использованы в качестве модельного объекта для изучения амниот на непилотируемых КА серии “ФОТОН-М” № 2 (М2) и № 3 (М3) (2005 г. — 16 сут и 2007 г. — 12 сут соответственно), а также будут объектом более длительного орбитального эксперимента продолжительностью 30 сут. (старт запланирован на август–сентябрь 2012 г.).

В 16-суточном эксперименте на борту КА “ФОТОН-М” № 2, где объектом были рептилии — толстопалые гекконы, исследования минерального обмена проводились параллельно российскими и американскими участниками проекта, мнения которых относительно влияния факторов космического полета на кости скелета расходятся. Американская сторона пришла к выводу о значительном уменьшении объема губчатой костной ткани у полетных животных (F) и в группе синхронного (S) контроля (плечевая и бедренная кости) по сравнению с базальным контролем [1]. Российские исследователи не выявили заметной деминерализации в костях гекконов [32].

Одним из возможных объяснений столь несходных выводов при исследовании одного и того же материала является различие методик. Американские авторы применили для изучения костей Scanco Medical microCT40 scanner (20–50 кэВ) — прибор, разработанный и предназначенный для использования в медицине, спектр излучения которого достаточно широк, что полученный результат свидетельствовал не столько о деминерализации, сколько о потере белковой составляющей кости. Этот факт косвенно подтверждается изменениями органов желудочно-кишечного тракта, отмеченными в [32–34].

Рептилии благодаря их неприхотливости, малым размерам, принадлежности к амниотам и ряду других ценных качеств являются очень привлекательным модельным объектом, прежде всего для продолжительных орбитальных экспериментов на непилотируемых КА [1, 10, 11, 35–37]. Гекконы представляют для орбитальных экспери-



Рис. 1. Обзорная микрофотография поперечного среза хвоста хрящепалого геккона (смонтирована из 10 снимков). Окрашивание методом Ван-Гизона, объектив – 1.6×.

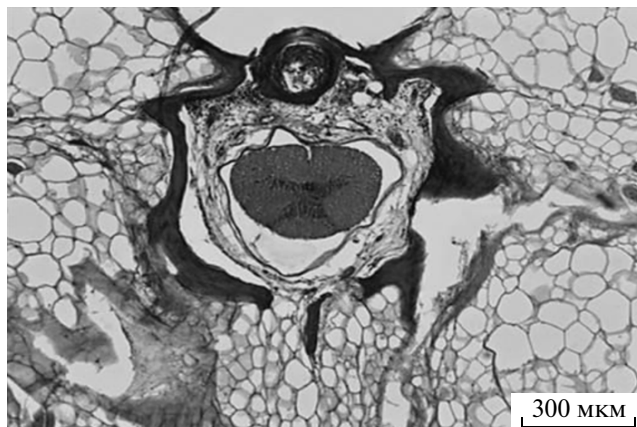


Рис. 2. Микрофотография поперечного среза через хвостовой позвонок хрящепалого геккона. Окрашивание гематоксилин-эозином, объектив – 5×.

ментов особый интерес, поскольку прикрепляются адгезивными подпальцевыми пластинками к любым поверхностям и не подвержены влиянию флотации. Однако вопрос о возможных изменениях костной ткани под влиянием факторов космического полета остается спорным и нуждается в дальнейших исследованиях. Возможно, деминерализация скелета после пребывания в космосе слабо выражена или отсутствует у хрящепалых гекконов потому, что благодаря адгезии они сохраняют в невесомости как реакцию опоры, так и локомоцию, характерную для них в наземных условиях. При этом хвост у хрящепалых гекконов не является хватательным и редко используется для опоры при локомоции. В основном он играет роль балансира, средства коммуникации и места для хранения запасов жира. Поэтому испытываемые им механические нагрузки можно считать пренебрежимо малыми по сравнению с предыдущими объектами – плечевой и большеберцовой костями, а также костями грудных позвонков. Таким образом, в свете имеющихся данных представляло интерес исследование пространственного распределения коэффициента поглощения рентгеновского излучения и элементного состава именно в хвостовых позвонках хрящепалых гекконов с целью выявления возможной деминерализации или ее отсутствия.

МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И РЕЗУЛЬТАТЫ

Гистологические исследования. 10-Микронные поперечные срезы хвоста получены после двухнедельной декальцинации и окрашены четырьмя разными методами: тройным окрашиванием по Маллори, гематоксилин-эозином по Эрлиху, методом Ромейса и методом Ван-Гизона. На гисто-

логическом уровне различий между группами не выявлено (рис. 1, 2).

Полученные результаты показывают целесообразность и перспективность проведения рентгеновского микротомографического анализа описанных выше биологических образцов совместно с изучением их элементного состава.

Рентгенофлуоресцентный анализ. РФА – один из современных спектроскопических неразрушающих методов, который позволяет детектировать практически все элементы периодической системы с массовыми долями от 10^{-4} до 100% (в зависимости от условий эксперимента). Метод основан на регистрации и последующем анализе характеристического флуоресцентного спектра, полученного в результате воздействия рентгеновского излучения на образец. Рентгенофлуоресцентные исследования проводились на рентгеновском дифрактометре SmartLab [38] с вращающимся анодом (излучение MoK_{α} , энергия излучения 17.5 кэВ) с использованием энергодисперсионного детектора XPIPS [39]. Монохроматизация и коллимация излучения обеспечивались фокусирующим дифракционным зеркалом и двукратным монохроматором Ge(220). Эксперименты проводились в условиях, которые позволили регистрировать флуоресцентный сигнал от всего объема образцов, размещенных на полированных кремниевых и сапфировых пластинах с известным химическим составом. Влияние подложек на флуоресцентные спектры исключалось подбором условий эксперимента (угол падения излучения 0.25° , размер щелей перед образцом 0.1×10 мм). Обработка экспериментальных спектров проводилась с использованием программы PyMCA (ESRF) [40], что позволило осуществить качественный анализ

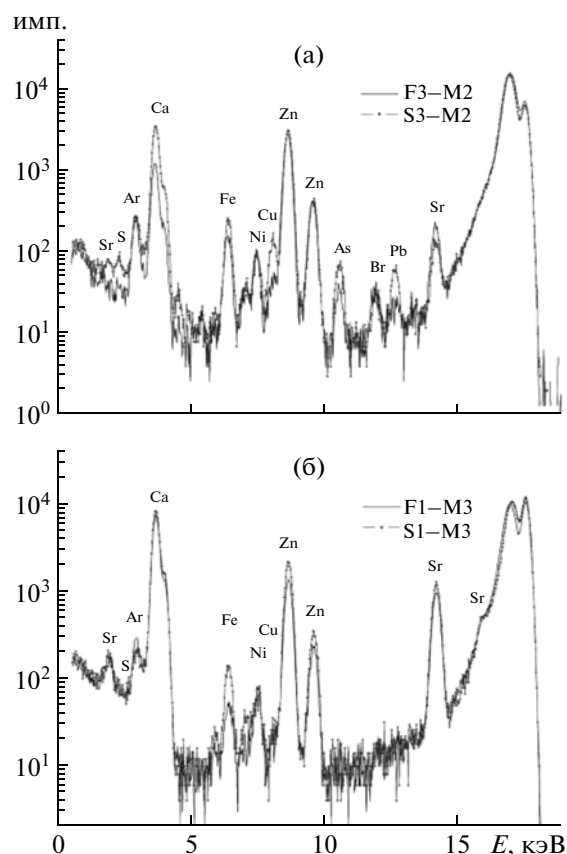


Рис. 3. Флуоресцентные спектры от образцов хвостовых позвонков хрящепалого геккона: а — S3-M2 и F3-M2 из серии M2, б — S1-M3 и F1-M3 из серии M3.

состава образцов и дать предварительную количественную оценку.

Исследовано четыре образца: S3-M2 и F3-M2 из эксперимента M2 и образцы S1-M3 и F1-M3 из эксперимента M3 (F — полетная группа, S — отложенный синхронный контроль, M2 — спутник “ФОТОН-М” № 2, летавший 16 сут, а M3 — “ФОТОН-М” № 3, летавший 12 сут). На рис. 3 приведены полученные спектры.

Присутствие на всех спектрах пика от аргона обусловлено взаимодействием рентгеновского излучения с воздухом, а наличие пика от никеля объясняется конструктивными особенностями используемого флуоресцентного детектора. Различия в интенсивности выхода флуоресценции от Ca (рассматриваемого в качестве основного элемента костной матрицы) для образцов можно объяснить индивидуальными изменениями их плотности.

Проведенные исследования показали, что в обеих сериях различия в элементном составе полетного (F) и синхронного (S) образцов в рамках каждой из серий незначительны, что может быть связано с индивидуальными особенностями объектов. В составе образцов серии M2 обнаружено

наличие следующих элементов: Ca, Zn, Fe, Sr, Cu, As, Pb, Br, S. Различия между образцами F3-M2 и S3-M2 проявляется в изменении интенсивности выхода флуоресценции от элементов Cu, Pb, S, Sr. В составе образцов серии M3 обнаружены следующие элементы: Ca, Zn, Fe, Sr, Cu, S. Разница в составе образцов F1-M3 и S1-M3 наблюдается в интенсивности выхода флуоресценции от Fe, Zn, Sr.

Сопоставление результатов для серий M2 и M3 выявило следующие особенности:

- увеличение сигнала от Ca и Sr для образцов серии M3;

- отсутствие в составе образцов серии M3 элементов As, Pb, Br;

- снижение интенсивности сигнала от Cu в образцах серии M3.

Такое различие в составе образцов может быть обусловлено особенностями проведения орбитальных экспериментов, методов подготовки и хранения образцов.

Растровая электронная микроскопия. Проведены дополнительные исследования элементного состава образцов S3-M2 и S1-M3 методом растровой электронной микроскопии (Quanta 200 3D, FEI, USA) с детектором рентгеновского энергодисперсионного микроанализа (EDAX, USA) [41]. Энергодисперсионный микроанализ выполнялся в условиях вакуума ($\sim 10^{-3}$ торр), что позволяло проводить регистрацию флуоресцентного рентгеновского сигнала, в том числе от легких элементов (начиная от бериллия). Глубина проникновения электронов при ускоряющем напряжении 30 кВ порядка 5–6 мкм, что позволяет исследовать только приповерхностные области. Фотографии образцов на рис. 4 показывают, что поверхность исследуемых образцов имеет сложное строение, исключающее непосредственную возможность исследования их химического состава в отдельно взятых областях, в частности в центральной части, где и расположена костная ткань позвонка. Полученные результаты показали наличие элементов C, O, Na, Al, Ca, K, Mg, P, Cl (рис. 4). Было обнаружено различие в составе исследованных образцов, которое может быть обусловлено микронеоднородностями поверхности, вызванными индивидуальными особенностями. Интенсивность выхода флуоресценции от более тяжелых элементов (с энергией выше 4 кэВ) находилась на пределе чувствительности системы детектирования.

Столь существенное различие в полученных данных о химическом составе образцов из исследований РФА и РЭМ может быть объяснено неоднородным распределением элементов в образцах — т.е. можно сделать вывод, что тяжелые элементы сконцентрированы в глубине образца, что

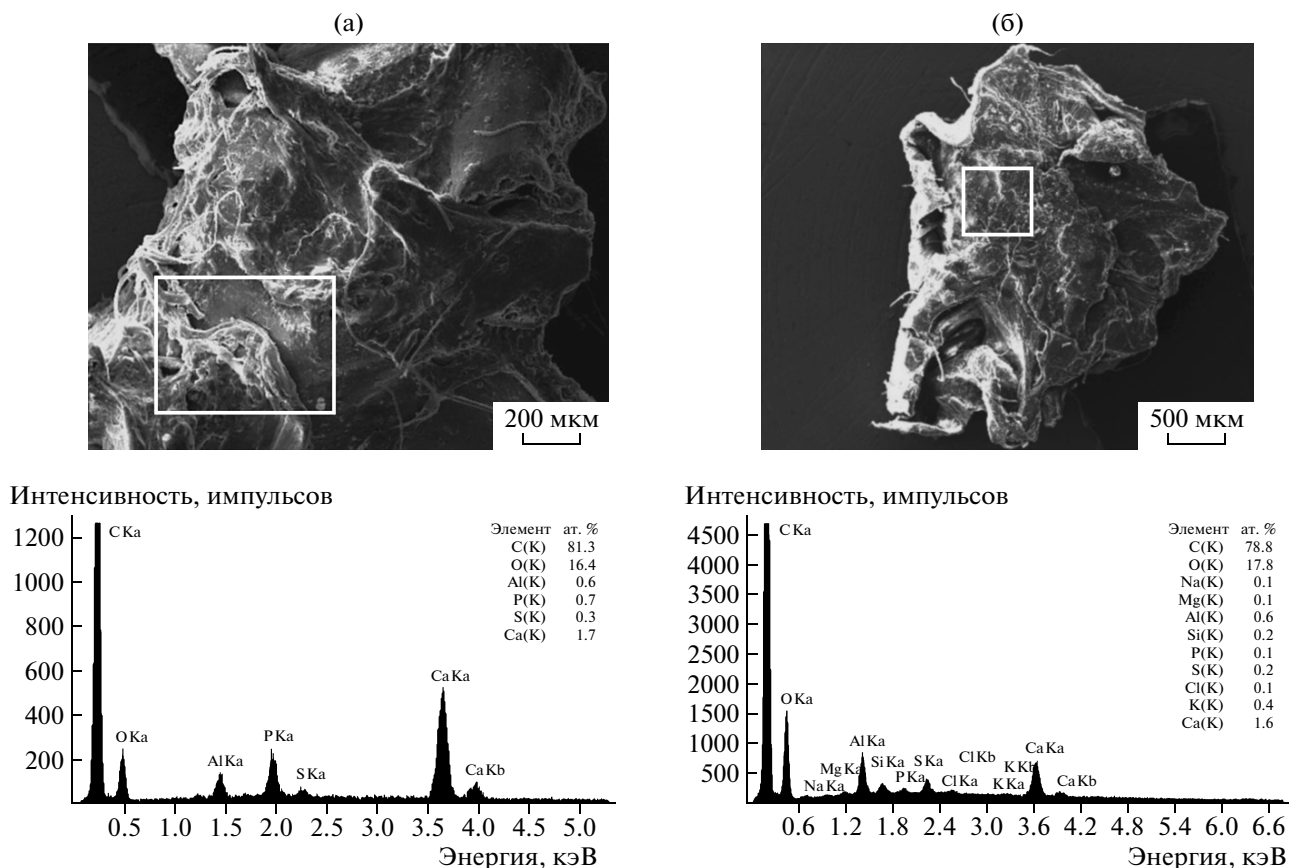


Рис. 4. Микрофотография и флуоресцентный спектр: а – от образца S1-M3, б – от образца S1-M2.

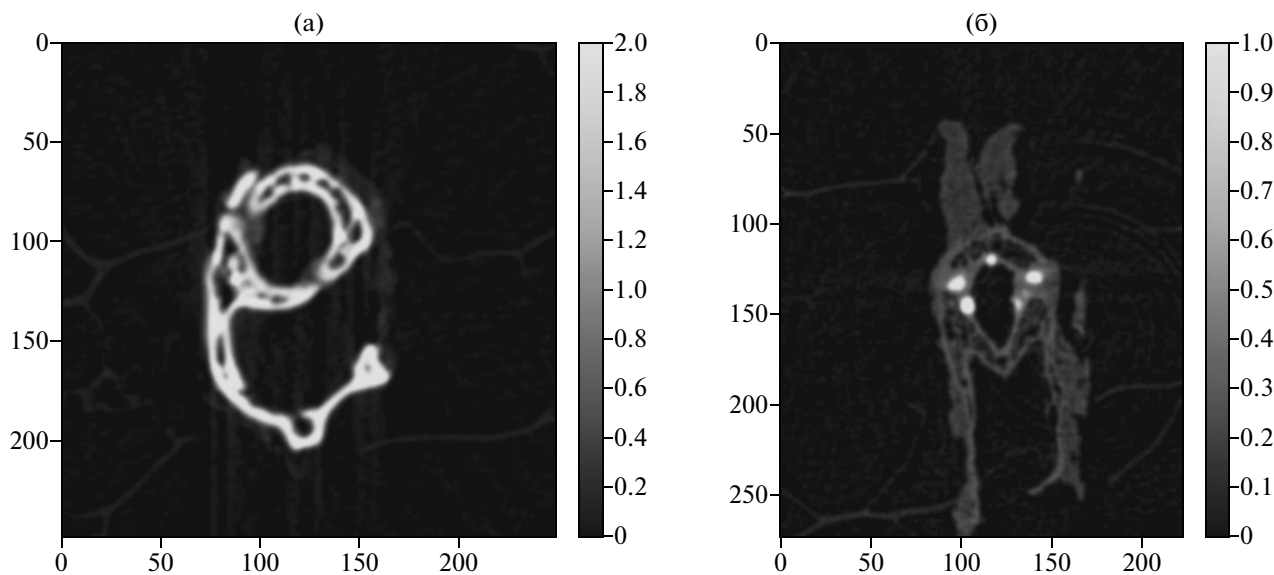


Рис. 5. Характерные сечения образцов серии M2 (а) и серии M3 (б), построенные по данным рентгеновской микрофотографии (цветовая шкала в мм^{-1}).

подтверждается представленными ниже данными рентгеновской микрофотографии.

Абсорбционная рентгеновская микрофотография. Томографические исследования объемной структуры образцов костной ткани животных,

бывавших в условиях микрогравитации, были выполнены на лабораторном рентгеновском микрофотографе в ИК РАН [42] и на синхротронных станциях “Медиана” и “РТ-МТ” [43] НИЦ “Курчатовский институт”. Лабораторный томо-

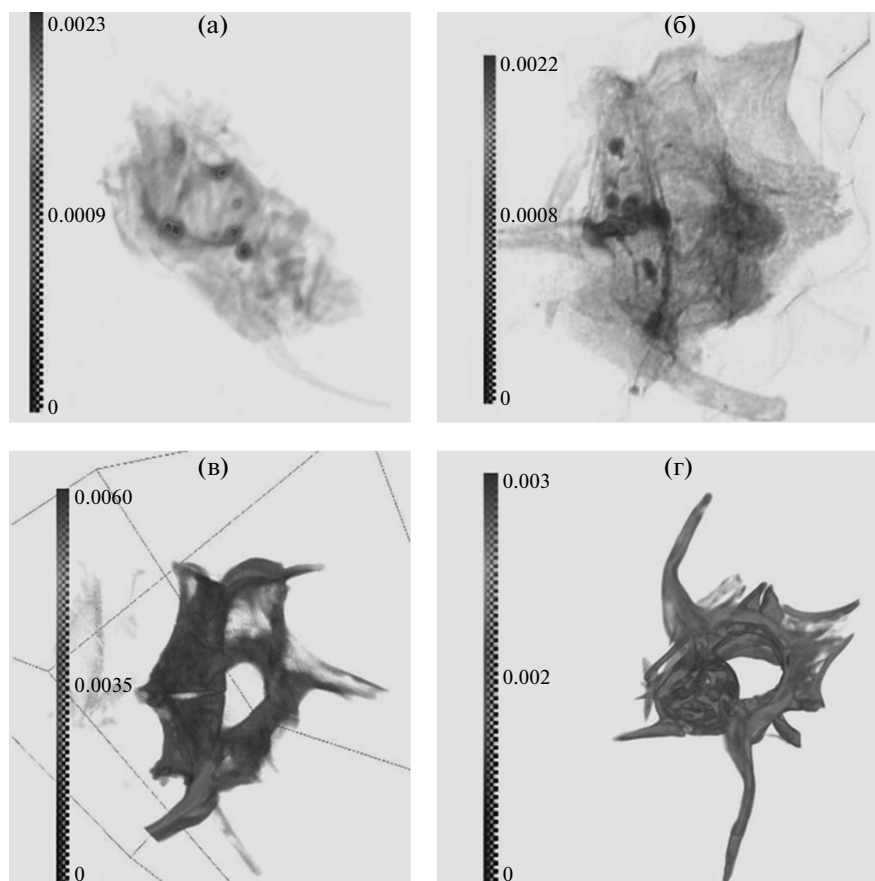


Рис. 6. Томографическая реконструкция позвонков геккона: образцы F2-M2 (а), S2-M2 (б), F1-M3 (в), S3-M3 (г).

граф ранее использовался для исследования других костных материалов [24, 32–34, 36]. Синхротронные станции “Медиана” и “РТ-МТ” для проведения таких работ использованы впервые. Типичные результаты восстановления внутренней структуры образцов представлены на рис. 5, 6.

Для проведения исследований методом селективной по химическому составу рентгеновской микротомографии проводились исследования биологических образцов на различных энергиях рентгеновского излучения (5.4, 8.0 и 12.0 кэВ). Целесообразность этих исследований для выявления различий в химическом составе образцов обоснована выше. Проведенные исследования показали, что на периферийных участках образцов не содержится элементов с атомным номером более 20 (что соответствует атомам кальция) или их концентрация меньше чувствительности метода. Это хорошо согласуется с данными растровой электронной микроскопии. Кроме того, обнаружено существенное уменьшение (в 3–5 раз) коэффициента поглощения рентгеновского излучения в образцах серии М2 по сравнению с образцами серии М3. Это может говорить о том, что фиксация образцов после полета в космос про-

дидась в растворах, по-разному влияющих на структуру образцов. Уменьшение среднего коэффициента поглощения на образцах серии М2 позволило, однако, обнаружить в них области, поглощающие существенно сильнее остальной костной ткани (рис. 5). Это может свидетельствовать о том, что именно в этих областях (расположенных ближе к центральному каналу позвонка) локализованы тяжелые элементы, обнаруженные методом РФА.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Впервые проведено комплексное исследование влияния микрогравитации на процессы, происходящие в элементах опорно-двигательного аппарата (проксимальных хвостовых позвонках) хрящепалого геккона. Данные традиционных гистологических исследований сопоставлялись с результатами рентгеновской микротомографии, а также рентгенофлуоресцентного анализа и данными растровой электронной микроскопии. Установлено, что в зависимости от условий эксперимента и способов приготовления препаратов поглощающая плотность названных позвонков

может заметно меняться. Выявлены области повышенной плотности, расположенные ближе к центральному каналу позвонка. Следует отметить, что соотношение поглощений на разных участках костной ткани изменяется при варьировании длины волны зондирующего рентгеновского излучения. Это косвенно указывает на неравномерность распределения элементного состава в объеме костей. В связи с этим установлена корреляция данных рентгенофлуоресцентного анализа с результатами рентгеновской микромографии.

По данным рентгенофлуоресцентного анализа впервые установлен факт наличия в приведенных структурах ряда тяжелых элементов (Fe, Ni, Cu, Zn, Br, Sr) и выявлена неравномерность их распределения. Сопоставление данных электронной микроскопии и рентгено-флуоресцентного анализа показывает, что эти элементы расположены в глубине костной ткани (явно глубже, чем на расстоянии 10 мкм от ее поверхности), что также соответствует результатам рентгеновской микромографии.

Логично предположить, что выявленные области повышенной плотности (электронной плотности), возможно, являются первичными центрами оксификации.

В ходе дальнейших исследований необходимо установить, насколько наличие сильнопоглощающих элементов, а также неравномерность их распределения являются особенностями только названных позвонков, и, насколько это справедливо для других частей опорно-двигательного аппарата хрящепалого геккона.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 11-02-12110-офи-м-2011), часть работы выполнена на оборудовании центра коллективного пользования ИК РАН и центра коллективного пользования “Курчатовский центр синхротронного излучения и нанотехнологий” в рамках государственного контракта № 16.552.11.7003.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Савельев С.В., Макаров А.Н., Прошина А.Е. и др. // Актуальные вопросы современной гистопатологии. М., 1993. С. 141.
2. Besova N.V., Savel'ev S.V. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1993. V. 116(7). P. 87.
3. Besova N.V., Savel'ev S.V., Chernikov V.P. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1993. V. 116(7). P. 90.
4. Бесова Н.В., Савельев С.В., Гулимова В.И. // Тез. Докл. X конф. “Космическая биология и авиакосмическая медицина”, Москва, 7–10 июня 1994. С. 98.
5. Савельев С.В., Макаров А.Н., Прошина А.Е. и др. Тез. Докл. X конф. “Космическая биология и авиакосмическая медицина”. Москва. 7–10 июня 1994. С. 96.
6. Савельев С.В., Барабанов В.М., Бесова Н.В. и др. Бюлл. Эксп. Биол. и Мед. 1995. № 6. С. 650.
7. Roberts L., Almeida E.A.C., Dvorochkin N. et al. // 29th Annual International Gravitational Physiology Meeting, Final Program and Abstracts. 22–27 June. 2008. Angers. France. P. 154.
8. Nikitin V., Kharlamova A.S., Godovalova O.S. et al. // 29th Annual International Gravitational Physiology Meeting. Final Program and Abstracts. 22–27 June. 2008. Angers. France. P. 157.
9. Kharlamova A.S., Barabanov V.M., Proshchina A.E. et al. // 29th Annual International Gravitational Physiology Meeting. Final Program and Abstracts. 22–27 June. 2008. Angers. France. P. 164.
10. Гулимова В.И., Никитин В.Б., Барабанов В.М. и др. Материалы докладов IX конгресса МАМ. Морфология. 2008. Т. 133. № 2. С. 37.
11. Никитин В.Б., Гулимова В.И., Харламова А.С. и др. // Тез. докл. Междунар. конф. SPEXP 2008 “Научные и технологические эксперименты на автоматических космических аппаратах и малых спутниках”. Самара, 2008. С. 133.
12. Гулимова В.И., Никитин В.Б., Барабанов В.М. и др. // Сб. науч. тр. конф. “Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии”. М., 2008. С. 44.
13. Гулимова В.И., Никитин В.Б., Окитейн И.Л. Сорок третьи научные чтения памяти К.Э. Циолковского, Калуга, 2008. С. 155.
14. Nikitin V.B., Proshchina A.E., Kharlamova A.S. et al. // J. Gravitational Physiology. 2008. V. 15(1). P. 285.
15. Proshchina A.E., Kharlamova A.S., Barabanov V.M. et al. // J. Gravitational Physiology. 2008. V. 15(1). P. 297.
16. Gulimova V.I., Nikitin V.B., Barabanov V.M. et al. // 17th IAA Humans in Space Symposium, Book of abstracts (June 7–11, 2009, Moscow). P. 51.
17. Прошина А.Е., Харламова А.С., Барабанов В.М. и др. // Сб. науч. тр. конф. “Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии”. М., 2010. С. 166.
18. Gulimova V.I., Barabanov V.M., Nikitin V.B. et al. // ESA/ISGP/ISSBB/ELGRA Joint Life Sciences Meeting 2010: Life in Space for Life on Earth. 13–18 June 2010, Stazione Marittima Congress Centre, Trieste, Italy, Abstract Book. P. 84.
19. Гулимова В.И., Барабанов В.М., Савельев С.В. // Сб. науч. тр. VIII Всерос. конф. по патологии клетки. М.: МДВ, 2010. С. 82.
20. Proshchina A.E., Besova N.V., Voronov K.A. et al. // Bull. Exp. Biol. Med. 2000. V. 130(9). P. 908.
21. Serova L.V., Shakhmatova E.I., Savel'ev S.V. et al. // Aviakosm. Ekolog. Med. 1999. V. 33(2). P. 5.
22. Savel'ev S.V., Serova L.V., Besova N.V. et al. // Aviakosm. Ekolog. Med. 1998. V. 32(2). P. 31.
23. Прошина А.Е., Бесова Н.В., Воронов К.А. и др. // Бюлл. Эксп. Биол. Мед. 2000. Т. 130. № 9. С. 342.
24. Nikitin V.B., Gulimova V.I., Ilyin E.A. et al. // J. Gravitational Physiology. 2007. V. 14(1). P. 103.

25. Zoeger N., Wobrauschek P., Strelci C. et al. // X-Ray Spectrom. 2005. V. 34. P. 140.
26. Jones K.W., Schidlovsky G., Burger D.E. et al. // Adv. Vivo Body Comp. 1990. P. 281.
27. Wobrauschek P., Pepponi G., Strelci C. et al. // Adv. X-Ray Anal. 2002. V. 45. P. 478.
28. Lindh U., Brune D., Nordberg G. // Sci. Total Environ. 1978. V. 10. P. 31.
29. Schidlovsky G., Jones K.W., Burger D.E. et al. // Adv. Vivo Body Comp. 1990. P. 275.
30. Almeida E.A.C., Roden C., Phillips J.A. et al. // J. Gravitational Physiology. 2006. V. 13(1). P. 193.
31. Besova N.V., Savelev S.V. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1993. V. 116(7). P. 87.
32. Gulimova V.I., Nikitin V.B., Asadchikov V.E. et al. // J. Gravitational Physiology. 2006. V. 13(1). P. 197.
33. Гулимова В.И., Никитин В.Б., Асадчиков В.Е. и др. // Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии. М.: МДВ, 2006. С. 125.
34. Гулимова В.И., Никитин В.Б., Асадчиков В.Е. и др. // Морфология. 2006. № 4. С. 41.
35. Никитин В.Б., Гулимова В.И., Макаров А.Н. и др. Матер. Междунар. науч.-практ. конф., посвящ. 75-лет. Астраханского гос. ун-та "Экология биосистем: проблемы изучения, индикации и прогнозирования". Изд. дом "Астраханский университет", 2007. Ч. 2. С. 265.
36. Nikitin V., Gulimova V., Asadchikov V. et al. // Conference on Mission to Mars: African Perspective Subtheme on Brain Neuroplasticity October 22–23, 2007, Owerri, Nigeria. Book of abstracts. P. 26.
37. Gulimova V.I., Nikitin V.B., Barabanov V.M. et al. // Conference on Mission to Mars: African Perspective Subtheme on Brain Neuroplasticity October 22–23, 2007, Owerri, Nigeria. Book of abstracts. P. 27.
38. <http://www.rigaku.co.jp/ru/products/xrd/smartlab.htm>
39. <http://www.canberra.com/products/13411.asp>
40. <http://pymca.sourceforge.net/>
41. Besova N.V., Savel'ev S.V., Chernikov V.P. // Biull. Eksp. Biol. Med. 1993. V. 116(7). P. 90.
42. Асадчиков В.Е., Бузмаков А.В., Золотов Д.А. и др. // Кристаллография. 2010. Т. 55. № 1. С. 167.
43. Сенин Р.А., Хлебников А.С., Анохин К.В. и др. // Тез. Докл. РСНЭ-2011. 14–18 ноября 2011. С. 510.