БИОЭЛЕКТРИЧЕСКИЕ СВОЙСТВА ДЕМИНЕРАЛИЗОВАННОЙ КОСТИ

Левашов М.И., Сафонов С.Л.

Институт физиологии им. А.А. Богомольца НАН Украины, Киев

До настоящего времени не существует четко установленных закономерностей динамики биоэлектрических свойств костной ткани при количественных и качественных изменениях состава ее матрикса. В первую очередь это относится к физиологическим и патологическим процессам, которые сопровождаются изменением степени минерализации кости. Значительные трудности, возникающие при исследовании биоэлектрических свойств костной ткани *in vivo,* а также неоднозначность интерпретации результатов таких исследований обуславливают необходимость их предварительного моделирования в условиях эксперимента. Результаты исследований, выполненных нами ранее на свежевыделенных бедренных костях лабораторных крыс-самцов Вистар, показали, что в условиях продолжительной экспериментальной гипокинезии и функциональной разгрузки задних конечностей происходят изменения не только минеральной плотности, но и биоэлектрических свойств кости [1]. Вместе с тем, разная направленность и степень выраженности качественных и количественных изменений, как составных компонентов костного матрикса, так и отдельных биоэлектрических показателей, не позволяла выделить наиболее устойчивые закономерности и характер взаимосвязи между исследуемыми показателями. Специфическими особенностями компактной костной ткани является высокая степень минерализации при относительно небольшом содержании органических веществ и воды. В физиологических условиях содержание воды и минералов в ней связаны реципрокными отношениями [2, 3]. Согласно концепции о реципрокном взаимоотношении процессов минерализации и гидратации костной ткани, после завершения формирования остеоида остеобластами его объем в процессе дальнейшей минерализации не изменяется. Таким образом, отложение минералов в уже сформированном остеоиде возможно только за счет вытеснения из него воды. Это означает, что увеличение минерализации костной ткани сопровождается уменьшением степени ее гидратации и наоборот – уменьшение минерализации костной ткани приводит к повышению содержания в ней воды. Очевидно, что данные закономерности могут проявляться и в случаях развития патологических изменений в костной ткани [4]. В этой связи особый интерес представляет вопрос о возможности использования метода биоэлектрического тестирования для оценки степени минерализации и гидратации кости.

Исследованы биоэлектрические свойства нативных и деминерализованных *in vitro* препаратов компактной костной ткани, полученных из свежевыделенных бедренных костей 12 крыс-самцов линии Вистар 3-месячного возраста. Перед началом процесса деминерализации определяли исходные параметры пассивных электрических свойств (ПЭС) препаратов – импеданс, активное сопротивление, реактивное сопротивление, поляризационную емкость [5]. Исследования проводили на мультичастотном LCR Meter Quad Thech 1920 в соответствии с описанной ранее методикой [1]. С целью деминерализации препараты, полученные из одной бедренной кости крысы, полностью погружали в 10% раствор динатриевой соли этилендиаминтетрауксусной кислоты (ЭДТА), pH=8,0 [6]. Раствор меняли ежедневно. Контрольные исследования ПЭС проводили на 14 и 28 дни деминерализации. Препараты извлекали из раствора ЭДТА, тщательно промывали свежеприготовленным 0,9% раствором натрия хлорида (NaCl) и оставляли на 24 часа в том же растворе. Через сутки препараты еще раз промывали 0,9% раствором NaCl и проводили измерения параметров ПЭС. Со-

держание минеральных, органических веществ и воды в костной ткани определяли гравиметрическим методом. Полноту деминерализации контролировали путем сжигания препаратов в муфельной печи в конце эксперимента [7]. Контролем служили препараты второй (не деминерализованной) бедренной кости тех же животных. Все манипуляции с крысами проводили в соответствии с требованиями биоэтики и принципов Европейской конвенции о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментальных и других научных целей. Полученные цифровые данные обрабатывали методом статистического анализа с использованием пакета программного обеспечения "Statistica-6.0" и программы Microsoft Exel 2000. Достоверность разницы средних величин определяли по t–критерию Стьюдента и U-критерию Манна-Уитни. Значения $p<0,05$ считали достоверными.

Установлено, что деминерализация препаратов свежевыделенных бедренных костей крыс сопровождалась уменьшением на 55,2% их исходной массы и значительным увеличением содержания воды. Если соотношение основных компонентов костного матрикса (минеральные вещества:органические вещества:вода) в нативных препаратах кости было 0,61:0,20:0,19, то после 28-суточной деминерализации оно существенно изменялось в сторону преобладания жидкой фазы – 0:0,33:0,67. Как показали расчеты, фактическое уменьшение массы костных препаратов достигало 65,3% и частично компенсировалось за счет замещения минерального компонента костного матрикса жидкой фазой. При исследовании ПЭС нативных препаратов средняя величина импеданса составляла 1410,63±307,01 Ом, активного сопротивления – 1478,63±328,24 Ом, реактивного сопротивления – 8512,50±1444,36 Ом, емкости – 2,313±0,422 нФ. Выраженные изменения биоэлектрических свойств препаратов кости отмечались уже в течение первых 2 недель воздействия ЭДТА, что совпадало с известными темпами деминерализации кости при гистологической проводке [4]. Через 14 дней деминерализации импеданс уменьшался до 63,88±10,40 Ом ($p<0,001$), активное сопротивление – до 68,13±11,34 Ом ($p<0,001$), реактивное сопротивление – до 242,05±23,13 Ом ($p<0,05$), а емкость возрастала до 70,125±6,891 нФ ($p<0,001$). При продлении срока деминерализации до 28 дней величины исследованных показателей достигали соответственно: 38,88±4,86 Ом ($p<0,001$), 42,63±4,61 Ом ($p<0,001$), 138,55 ±19,88 Ом ($p<0,001$) и 138,375±25,618 нФ ($p<0,001$). Таким образом, к концу 4-недельного периода деминерализации величины импеданса и активного сопротивления препаратов уменьшались более чем в 42 раза, а реактивного сопротивления – в 64 раза! Препараты практически полностью утрачивали свойство частотной зависимости (дисперсии) их электропроводности, а кривые дисперсии импеданса, активного и реактивного сопротивлений приобретали сглаженный характер. Если коэффициент Тарусова (Z_4/Z_6) нативных препаратов составлял 2,40, то через 14 дней деминерализации он уменьшался до 1,33, а через 28 дней не превышал 1,22. Поскольку препараты, в соответствии с методикой эксперимента, постоянно находились в условиях 100% абсолютной влажности, то очевидно, что в процессе их деминерализации имели место два параллельно протекающих процесса. С одной стороны, в костной ткани уменьшалось содержание минералов, в первую очередь – кальция, а с другой – увеличивалось содержание жидкости. Такие изменения в составе костного матрикса являлись главными причинами значительного увеличения электропроводности, уменьшения импеданса и активного сопротивления, а на этапе полной деминерализации кости – утраты присущих костной ткани свойств биологического диэлектрика и переходе ее в разряд проводников второго рода.

Столь быстрые и значительные изменения пассивных электрических свойств были обусловлены тем, что компактная кость имеет высокую степень минерализации и при ее полной деминерализации в условиях 100% насыщения влагой в препаратах может накапливаться большое количество жидкости, имеющей высокую электропроводность. В наших исследованиях это был 0,9% раствор NaCl. Безусловно, в условиях целостного организ-

ма полной деминерализации кости никогда не происходит, да и сама модель химической модификации костной ткани лишь с известной степенью допущения может отражать реальные процессы деминерализации, которые наблюдаются в костной ткани при развитии различных патологических процессов. Однако, два факта, вытекающие из результатов данных исследований, представляют безусловный интерес и могут быть использованы для интерпретации изменений пассивных электрических свойств кости в условиях длительной гипокинезии и микрогравитации, а также при различных патологических процессах, приводящих к уменьшению минерализации костной ткани. Факт первый состоит в том, что процессы деминерализации и гипергидратации кости являются двумя взаимосвязанными процессами, которые протекают параллельно. Вода заполняет пространства, которые ранее занимали минеральные вещества. В результате в костной ткани увеличивается содержание свободной воды. Очевидно, что часть избыточно поступающей воды связывает органический матрикс, увеличивая тем самым содержание и связанной воды. Проведенные нами ранее исследования показали, что между возрастными изменениями показателей гидратации и минерализации компактной кости крыс существует выраженная обратная корреляционная зависимость ($r=-0,894$; $p<0,001$), тогда как между содержанием воды и органических веществ достоверной корреляционной зависимости установлено не было. Факт второй со всей очевидностью свидетельствует о том, что оба процесса – уменьшение содержания минеральных веществ и увеличение содержания воды – весьма существенно изменяют пассивные электрические свойства костной ткани. Она теряет свойства биологического диэлектрика, становясь проводником второго рода. Реализация механоэлектрических механизмов регуляции роста и физиологической перестройки в такой кости становится невозможной. Полученные результаты свидетельствуют о том, что характер и степень выраженности изменений состава деминерализованной костной ткани можно идентифицировать и дифференцировать по ее биоэлектрическим свойствам. Характерными признаками гипоминерализации и гипергидратации костной ткани являются: уменьшение величины импеданса, активного и реактивного сопротивлений, а также увеличение емкости на фоне общего уменьшении степени выраженности частотной дисперсии этих биоэлектрических показателей. Наличие тесной корреляционной связи между содержанием воды и минералов в костной ткани, а также показателями ПЭС, дает основание говорить о перспективности использования метода мультичастотной биоимпедансометрии для оценки качественных и количественных изменений ее состава как в физиологических условиях, так и при различных патологических процессах.

Литература

1. Березовский В.А., Левашов О.М., Сафонов С.Л. Пассивные электрические свойства компактной костной ткани в норме и при дефиците механической нагрузки // Український медичний альманах. – 2003. – Т.6, №2. – С.162-164.
2. *Fernandez-Seara M.A., Werli S.L., Takahashi M., Wehrli F.W.* Water content measured by proton-deuteron exchange NMR predicts bone mineral density and mechanical properties // J. Bone Miner. Res. – 2004. – V.19, №2. – P.289-296.
3. Левашов М.И. Возрастные изменения компактной кости крыс-самцов Вистар // Проблемы старения и долголетия. – 2009. – №3. – С.301-311.
4. *Nicodemo M.L., Scott D., Buchan W., Duncan A., Robins S.P.* Effects of variations in dietary calcium and phosphorus supply on plasma and bone osteocalcine concentrations and bone mineralization in grooving pigs // Exp. Physiol. – 1998. – V.83. – P.659-665.
5. Хасцаев Б.Д. Импедансный метод в медико-биологических исследованиях и его приборное оснащение // Медицинская техника. – 1996. – N3. – С.34-40.
6. Волкова О.В., Елецкий Ю.К. Основы гистологии с гистологической техникой. 2-е изд. –М.:Медицина, 1982. 304 с.
7. Левашов М.И., Березовский В.Я., Сафонов С.Л. Электродиагностика возрастных изменений состояния костной ткани // Проблеми остеології. – 2009. – Т2, №3. – С.61-62.