

Биофизические методы исследования в функциональной оценке состояния костной ткани в норме и при патологии

*Кафедра анатомии человека Сумского государственного университета
Г. Сумы, Украина*

В работе проведено изучение минерального обмена кости методом растровой электронной микроскопии с микроанализом. Результаты исследования позволяют оценить функциональное состояние минерального гомеостаза кости и процессов ремоделирования как в норме так и при нарушении водно-солевого обмена. Исследование интактной кости показали различное распределение Са и Р, которое зависит от функциональной нагрузки. Изучение репаративных процессов позволило выявить сроки начала кальцификации регенерата и усиление ремоделирования в неповрежденных участках. Нарушение водно-солевого обмена приводят остеопеническим проявлениям в интактной кости и к замедленному ремоделированию в травмированном органе.

Ключевые слова: кость, репаративный остеогенез, растровая электронная микроскопия, минеральный обмен.

Функциональное состояние тканей человека или животных может быть оценено путем измерения параметров метаболизма на организменном, органном, тканевом или клеточном уровнях. При этом возможно учитывать специфические клеточные маркеры и метаболиты определенных тканей, циркулирующие в крови или находящиеся в исследуемых тканях. Клеточный уровень метаболизма можно оценить по накоплению метаболитов в цитоплазме и органеллах, по степени экспрессии генов рецепторов, а также методом электронной микроскопии, позволяющей судить о состоянии субклеточных структур.

Для выявления особенностей метаболизма костной ткани разработаны методики определения специфических неколлагеновых протеинов, среди которых наибольшее распространение получили щелочная и кислая фосфатазы, костные морфогенетические белки, сиалопротеин, остеоонектин, остеопротегерин и прочие [11, 12, 15, 17]. Недостатком определения данных маркеров является их неспецифичность, что в ряде случаев приводит к затруднению трактовки полученных результатов [8, 9].

Просвечивающая электронная микроскопия кости получила распространение исключительно в экспериментальных целях и дает полную характеристику функционального состояния костных клеток. В связи с неравномерным распределением и удаленностью клеток друг от друга в костном матриксе, невозможно оценить одновременно необходимое количество клеточного состава, что ограничивает распространение данного метода [18].

В то же время основной метаболической функцией кости является поддержание минерального гомеостаза, поскольку большинство химических элементов использует костную ткань как депо. При различных патологических состояниях, вызванных нарушением как структуры кости так и общего состояния организма происходит перераспределение минерального состава костного матрикса,

сопровождающееся накоплением, потерей или перераспределением минеральной фазы ткани. Таким образом, оценка распределения химических элементов в костной ткани, может свидетельствовать о функциональном состоянии кости [6, 10].

Среди доступных методов анализа химического состава кости наибольшее распространение получили методы спектрометрии [3]. Их недостатками является полное разрушение объекта, что дает возможность оценить химический состав органа в целом, без учета его микроструктурных особенностей. Для выявления распределения химических элементов на поверхности структур костной ткани можно использовать растровую электронную микроскопию с рентгеновским микроанализом (РЭММА) и метод PIXE [16].

Использование РЭММА для исследования биологических объектов в том числе и костной ткани имеет целый ряд преимуществ, наиболее значительными из которых являются следующие: анализ является неразрушающим; возможно оценить состав заранее выбранных участков образца соответственно их структуре; анализируемое вещество может находиться в различных агрегатных состояниях; возможно одновременное определение всех элементов; широкий диапазон определяемых концентраций; небольшой объем образца. Особый интерес вызывает возможность определения элементного состава межклеточного матрикса и внутриклеточных органелл. С точки зрения клеточной патологии изменение содержания ионов может играть ключевую роль в модифицировании клеточного роста и в смерти клеток. В данном случае мы также можем судить о состоянии мембранных ионных насосов и белков-переносчиков.

Использование растровой электронной микроскопии и рентгеновского микроанализа костной ткани началось в 60-е – 70-е годы прошлого века. Большое количество публикаций обусловлено относительной легкостью подготовки кости к исследованию в сравнении с мягкими тканями. За прошедшие годы была подробно изучена структура губчатой и компактной костной ткани в норме и при различной патологии у лабораторных животных и человека. Показаны различия элементного состава костной ткани в зависимости от строения и функциональной значимости различных отделов кости. Большое значение данный метод играет также в изучении морфологии и состава дентина, позволяя судить о его состоянии тканей в норме, при различных видах кариеса и оценить реакцию тканей зуба на различные виды композитных материалов и керамики. Несмотря на многочисленные исследования, многие аспекты минерального состава костной ткани остаются неизученными. Среди них наибольший интерес представляет определение механизмов перераспределения химических элементов кости при травматическом повреждении органа как в здоровом организме, так и при нарушении гомеостаза.

Целью настоящего исследования стало изучение минеральной фазы костной ткани лабораторных животных в различных участках кости в возрастном аспекте, определение функциональной реакции кости на механическую травму в норме и в условиях нарушения водно-солевого обмена.

Материалы и методы исследования.

Эксперимент был проведен на ... лабораторных крысах 4-х месячного возраста. Все животные содержались в стандартных условиях вивария, эксперименты проводились в соответствии с «Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, которые используются для экспериментов или прочих научных целей» (Страсбург, 1985) и Хельсинской декларацией ассамблеи Всемирной медицинской ассоциации (2000).

Контрольная серия животных составила 6 интактных крыс.

Первой экспериментальной серии животных (24 особи) стоматологическим бором диаметром 2 мм наносили дырчатый дефект на медиальной поверхности средней трети большеберцовой кости.

Второй экспериментальной серии моделировали гипоосмолярную гипергидратацию тяжелой степени для выявления особенностей реакции костной ткани на нарушение водно-солевого баланса. Для достижения гипергидрии животным ежедневно гибким зонтом вводили дистиллированную воду в объеме 10 мл 3 раза в сутки. Также были использованы вываренные обессоленные корма для уменьшения поступления солей в организм. Для предотвращения физиологической поддержки водного гомеостаза и достижения необходимого уровня гидратации животным два раза в день вводили синтетический аналог АДГ – «Минирин» (Ferring) в дозе 0,01 мг. Длительность моделирования гипергидрии составляла 25 дней, что соответствовало увеличению содержания жидкости в организме на 15%. При моделировании гипоосмолярного синдрома учитывали осмолярность плазмы ниже 280 мосм/л и концентрацию натрия плазмы меньше 135 ммоль/л.

Третьей экспериментальной серии (24 особи) после достижения необходимого уровня гипергидратации наносили дырчатый дефект большеберцовой кости для выяснения особенностей минерального обмена костной ткани после травмы в условиях патологии водно-электролитного обмена.

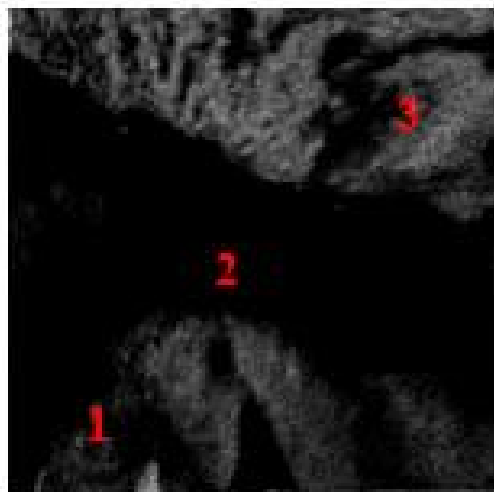
Интактных животных и крыс второй серии выводили из эксперимента путем декапитации под кетаминным наркозом после достижения тяжелой степени гипергидратации. Забор материала от животных первой и третьей серий производили в сроки 3, 10, 15 и 24 суток после нанесения дефекта кости для изучения особенностей минерального обмена соответственно стадиям репаративной регенерации [13].

Для исследования забирали интактные и травмированные большеберцовые кости, которые фиксировали в 3,125% глутаральдегиде в течении суток, в дальнейшем дофиксировали образцы 1% раствором осмия, обезвоживали в спиртах возрастающей концентрации (50 – 70 – 80 – 90 и 100%) и заливали в смесь смол «Эпон-аралдит». После полимеризации смолы проводили

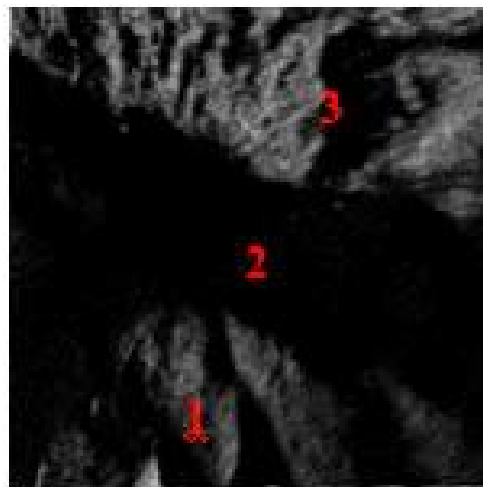
полирование поверхности исследуемых костей. Для улучшения визуализации подготовленную поверхность напыляли серебром в стандартной вакуумной установке типа ВУП-5 (SELMІ, Сумы, Украина). Перед проведением исследований травмированных костей методом растровой электронной микроскопии определяли качественное распределение кальция и фосфора на поверхности методом PIXE – анализа. В ИПФ НАН Украины г.Сумы создан ядерно-сканирующий микрозонд с интегрированной зондоформирующей системой на базе аналитическо-ускорительного комплекса "Сокол". Данная установка позволяет фокусировать пучок ионов высоких энергий (H⁺; He⁺) до 2 МэВ на мишени в пятно площадью не более 1 мкм² и с режимом работы при токах 1-100 пА для проведения аналитических измерений методами PIXE, RBS (Rutherford back-scattering spectroscopy), NRA (Nuclear Reaction Analysis).

Метод PIXE основан на регистрации характеристического рентгеновского излучения, возникающего при переходе электронов на вакантные места К и L-оболочек атомов, которые образуются из-за ионизационных процессов во время бомбардировки твёрдого тела тяжёлыми частицами. С помощью этого метода можно проводить картирование поверхности биологических объектов и осуществлять качественный и количественный анализ химических элементов, начиная с Na и до U. Чувствительность аппаратуры позволяет регистрировать концентрации до 1-2 ppm (10⁻⁴ %). Одновременное применение метода RBS позволяет контролировать падающий заряд на образце, а так же получать информацию о более лёгких элементах, из которых состоит органическая матрица (C, N, O).

После получения информации о распределении основных химических элементов (рис. 1), проводили изучение морфологических особенностей регенерата и неповрежденной поверхности кости и количественное определение содержания кальция и фосфора с помощью растрового электронного микроскопа РЭММА-102 (SELMІ, Сумы, Украина) в трех точках – в середине регенерата, на границе регенерата и «материнской» кости, на удалении 10 мм от зоны травмы. Исследование поверхности костей животных первой серии и интактных крыс проводили в середине диафиза и в проксимальном и дистальном эпифизах.



А



В

Рисунок 1 Распределение кальция и фосфора на поверхности травмированной кости, полученное методом PIXE – анализа. А – кальций, В – фосфор, 1 – зона дефекта, 2 – граница между дефектом и «материнской» костью, 3 – поверхность неповрежденной кости.

Результаты исследований и их обсуждение.

РЕММА у интактных животных. При анализе распределения кальция и фосфора методом зондового микроанализа у интактных крыс мы наблюдали неравномерное распределение кальция и фосфора в различных участках кости. Так наибольшая их концентрация наблюдается в середине диафиза и составляет соответственно 21,36 в% и 12,34 в%. Проксимальный эпифиз характеризуется несколько меньшим содержанием исследуемых элементов – соответственно 20,15 в% и 11,87 в%. В дистальном эпифизе наблюдается наименьшее содержание как кальция так и фосфора, что составляет 19,76 в% и 11,04 в%. Разницу в содержании основных элементов кости можно объяснить наличием различных по строению тканей, которые формируют соответствующие области. Диафиз сформирован за счет кортикальной кости, которая характеризуется большими механическими свойствами и меньшей скоростью ремоделирования. В то же время эпифизы сформированы в основном за счет губчатой кости, которая является метаболически более активной и выдерживает меньшие нагрузки нежели диафиз.

РЕММА при репаративной регенерации в норме.

Методом растровой электронной микроскопии у животных второй экспериментальной серии через 3 суток после нанесения дефекта визуализируется округлой формы дефект с гомогенным содержимым. (Рис. 2).

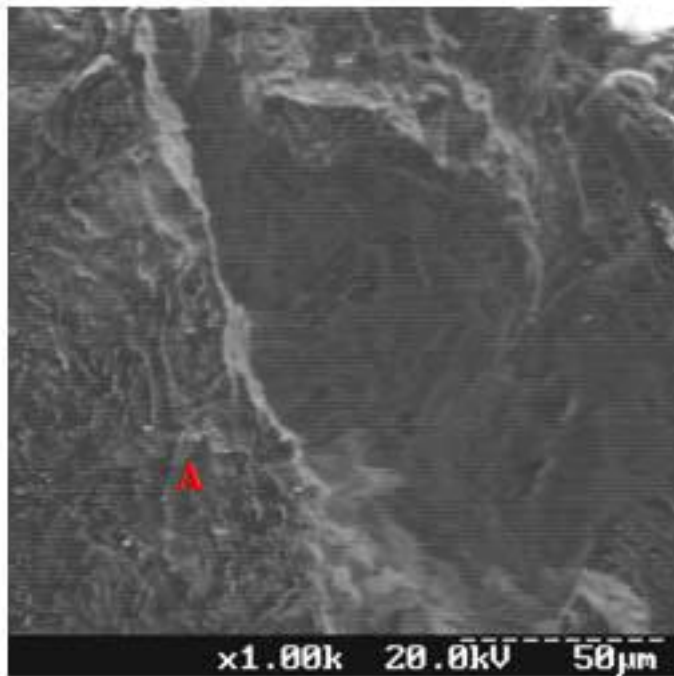


Рисунок 2 Сканограмма поверхности большеберцовой кости крысы через 3 дня после нанесения дефекта. Zoom 1000. А – место дефекта, заполненное гомогенным содержимым.

Методом зондового анализа поверхности дефекта обращает на себя внимание отсутствие остеотропных элементов – кальция и фосфора, что свидетельствует об отсутствии кальцификации места травмы в данные срок (рис. 3). В то же время определяется пик хлора, что свидетельствует о значительном содержании органической составляющей.

Возле зоны дефекта и на расстоянии от перелома содержание кальция составляет $19,66 \pm 0,43$ в% и $21,05 \pm 0,64$ в%, фосфора соответственно $9,21 \pm 0,23$ в% и $9,35 \pm 0,31$ в%. При этом следует отметить снижение уровня кальция возле места травмы, что может свидетельствовать об активизации процессов ремоделирования, инициированных травмой. В результате перестройки происходит активация остеокластической резорбции, что приводит к потере кальция.

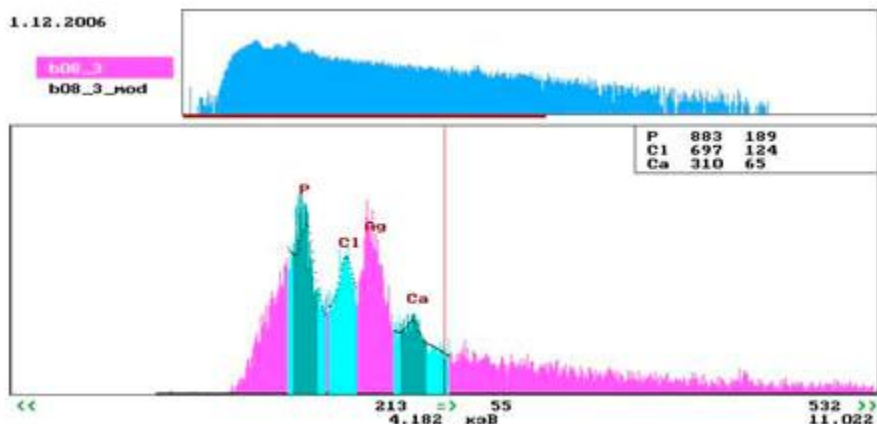


Рисунок 3 Спектр с поверхности дефекта большеберцовой кости через 3 дня после нанесения дефекта.

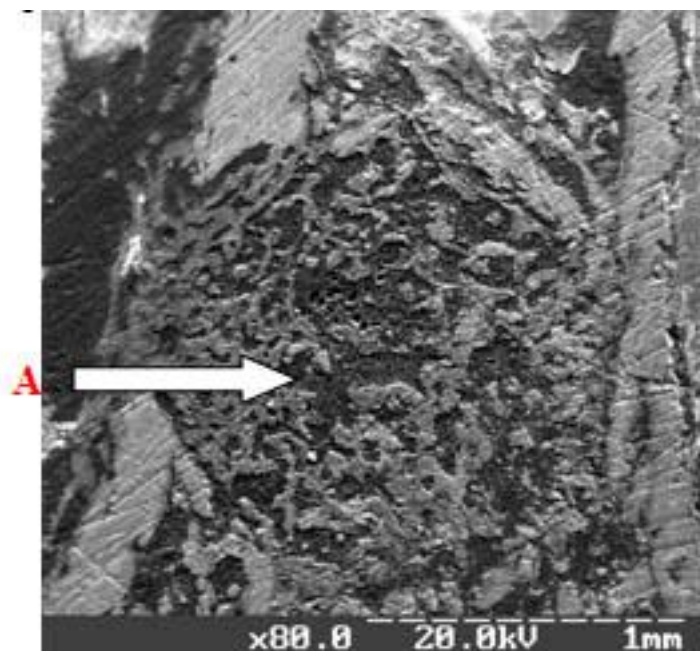


Рисунок 4 Сканограмма поверхности травмированной кости крысы через 10 дней после нанесения дефекта. Zoom 80. А – место дефект, выполненное формирующимися костными трабекулами.

Сканограммы, полученные с поверхности травмированных костей через 10 дней после нанесения дефекта, демонстрируют наличие в дефекте формирующихся костных трабекул с низкой концентрацией кальция и фосфора на их поверхности. (Рис. 4).

Возле зоны дефекта уровень кальция и фосфора уменьшается в сравнении с предыдущим сроком наблюдения в среднем на 12,42% ($p \leq 0,05$) и 11,28% ($p \leq 0,05$) и составляет $18,43 \pm 0,52$ в% и $8,29 \pm 0,16$ в% (рис. 5). Показатели содержания основных элементов кости на удаленных участках остаются неизменными.

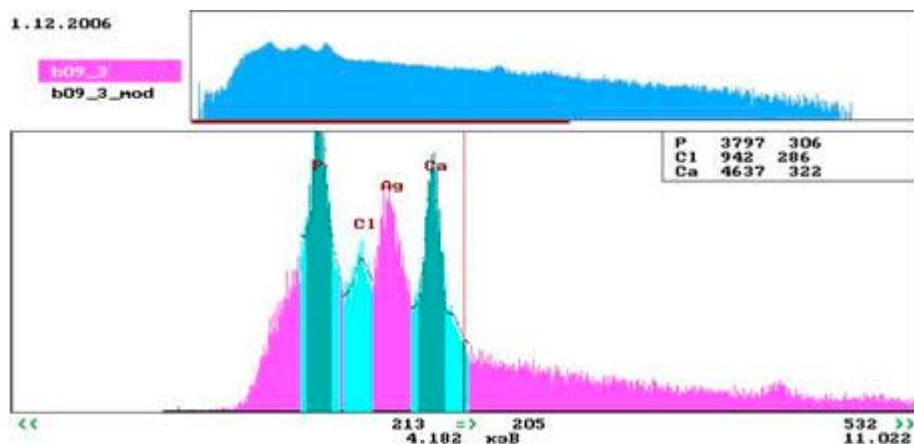


Рисунок 5 Спектр с поверхности большеберцовой кости крысы возле зоны дефекта через 10 дней после нанесения травмы

Через 15 суток после травмы на электронограммах в месте дефекта визуализируются костные трабекулы с гомогенными массами между ними. На поверхности новообразованных трабекул выявляется кальций и фосфор в концентрациях, значительно превышающие таковые в предыдущие сроки наблюдения. Такая картина характерна для начала интенсивной кальцификации органического матрикса и коррелирует с данными гистологических и биохимических исследований, опубликованных ранее.

Содержание кальция и фосфора возле зоны дефекта стремительно снижается, что можно объяснить локальной активизацией ремоделирования с использованием эндогенного кальция для оссификации новообразованной костной ткани регенерата. Их концентрации составляют $15,25 \pm 0,12$ в% и $6,992 \pm 0,05$ в%. На удаленных участках травмированной кости в данный период наблюдается стремительная потеря остеотропных элементов, что отсутствовало в предыдущие сроки. Содержание кальция и фосфора на поверхности кости уменьшается соответственно до $17,26 \pm 0,18$ в% и $7,59 \pm 0,07$ в% (Рис. 6).

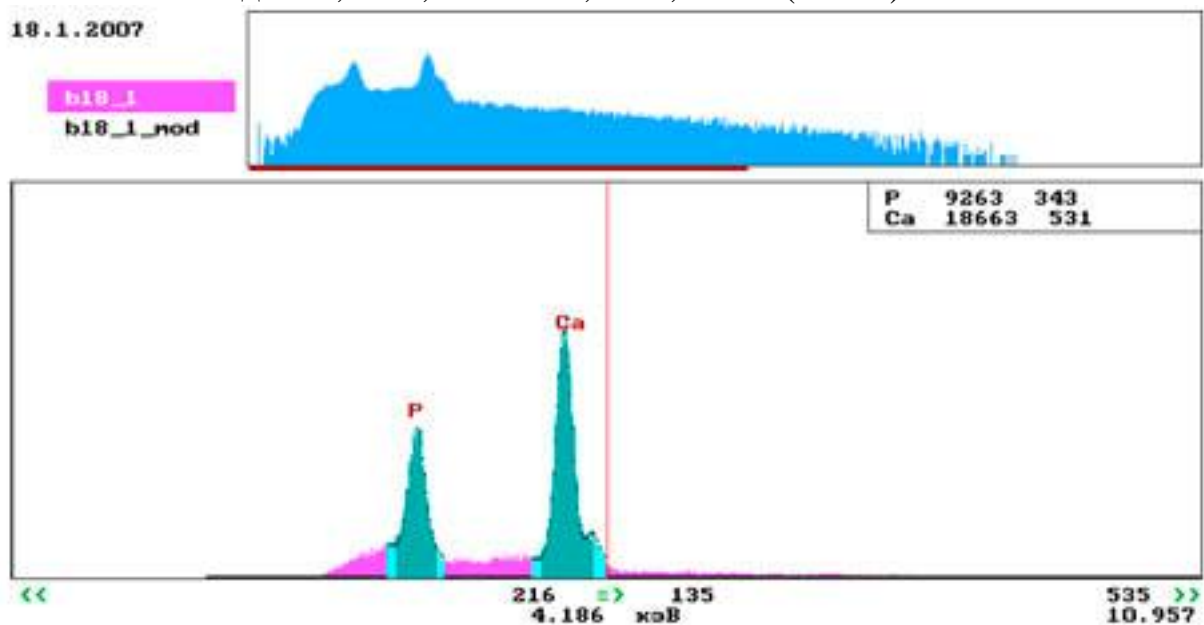


Рисунок 6 Спектр с поверхности большеберцовой кости крыс на расстоянии 10 мм от дефекта через 15 дней после нанесения травмы.

Электронограммы, полученные через 24 дня после травмы указывают на наличие низкоминерализированных трабекул губчатой кости и пластинчатой костной ткани возле кортикального слоя кости (Рис. 7). Рядом с дефектом и на расстоянии 10 мм содержание кальция и фосфора практически не изменяется в сравнении с предыдущим сроком наблюдения. В регенерате наблюдается некоторое

увеличения весовых концентраций основных элементов кости соответственно до $7,87 \pm 0,54$ в% и $3,97 \pm 0,17$ в%. Подобная картина характерна для снижения активности ремоделирования в "материнской" кости и начала процессов перестройки новообразованной костной ткани регенерата [14]. По данным Корж Н.А. и Дедух Н.В. процессы ремоделирования регенерата может затягиваться до 6-24 месяцев в зависимости от типа травмированной кости и завершаться образованием функционально полноценной ткани на месте утраченной [13].

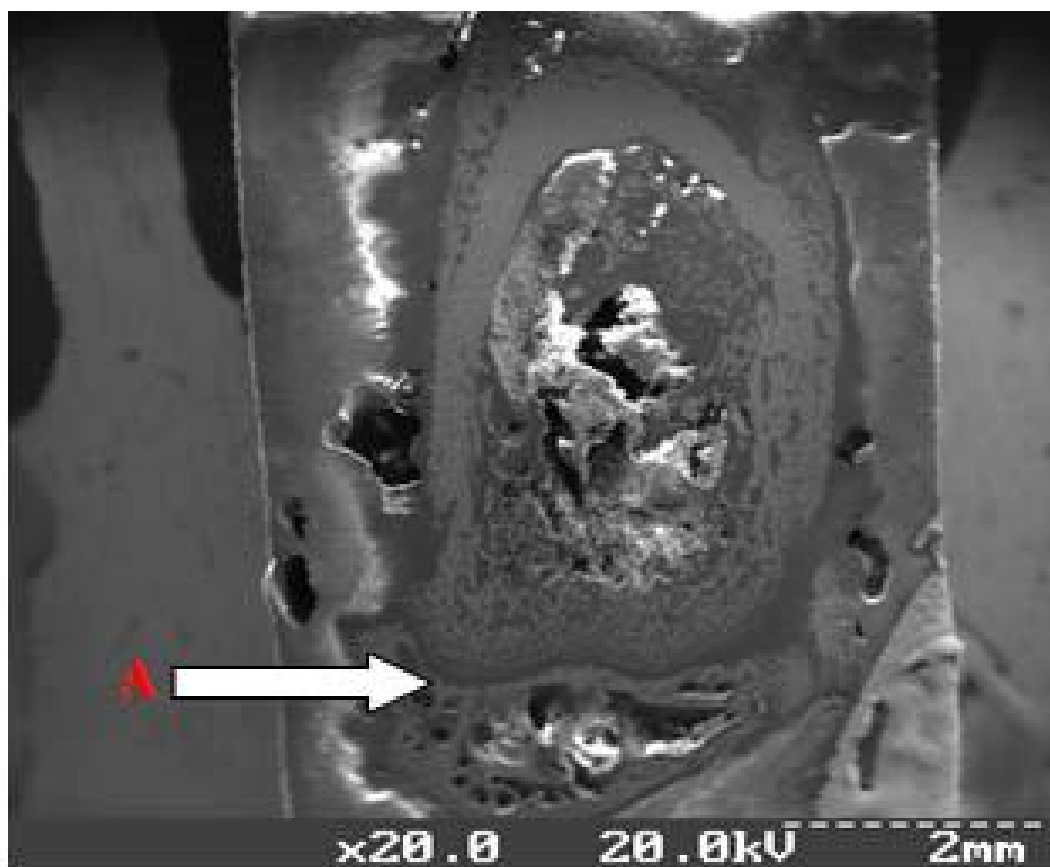


Рисунок 7 Сканограмма поверхности травмированной кости через 24 дня после нанесения дефекта. Zoom 20. А - место дефекта, заполненное сформировавшейся костной тканью.

РЕММА нетравмированной кости в условиях гипергидрии.

Тяжелая степень гипергидратации приводит к стремительному снижению элементов кости через 1 день после прекращения моделирования нарушений водно-солевого обмена, разница с контролем в диафизе при этом составляет для кальция 8,9% ($p \leq 0,05$), для фосфора – 9,4% ($p \leq 0,05$), в проксимальном эпифизе – 12,5% ($p \leq 0,05$) и 11,8% ($p \leq 0,05$) соответственно и в дистальном эпифизе – 14,6% ($p \leq 0,05$) и 14,2% ($p \leq 0,05$). Обращает на себя внимание значительная утрата кальция дистальными отделами кости, что может быть связано с большей функциональной нагрузкой данной области. Через 7 дней наблюдения содержание исследуемых элементов продолжается уменьшаться, что является

проявлением инерционных процессов в костной ткани (рис. 8). Клетки ремоделирования (остеобласты и остеокласты) под влиянием гипергидратации утрачивают функциональную активность и тем самым вызывают снижения скорости ремоделирования, что приводит к потере минеральной составляющей кости [1, 5, 7]. В связи с этим возобновление баланса кальция и фосфора может занять длительное время. Через 14 дней наблюдения разница с контролем для содержания кальция и фосфора является значительной и достоверной, составляя от 9,3% ($p \leq 0,05$) до 15,6% ($p \leq 0,05$). Начиная с 21 дня после окончания эксперимента наблюдается тенденция к уменьшению разницы с контролем но, даже через 30 дней наблюдения содержание кальция и фосфора остается достоверно меньше уровня контрольных животных. Содержание кальция меньше в диафизе на 6,5% ($p \leq 0,05$), в эпифизах – на 11,4% ($p \leq 0,05$) и 12,9% ($p \leq 0,05$) соответственно. Содержание фосфора меньше в сравнении с контролем на 7,3% ($p \leq 0,05$), 11,4% ($p \leq 0,05$) и 13,2% ($p \leq 0,05$).

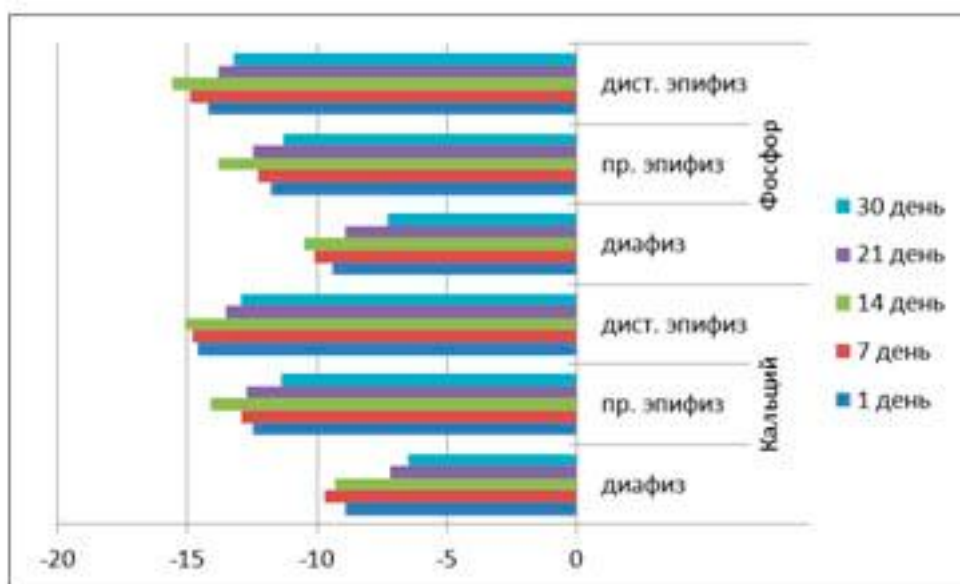


Рисунок 8 Динамика изменения содержания кальция и фосфора на поверхности кости (РЭММА) животных зрелого возраста в условиях гипоосмолярной гипергидратации тяжелой степени в различные сроки репаративного остеогенеза.

РЭММА при репаративной регенерации в условиях гипергидрии.

Растровая электронная микроскопия образцов животных третьей экспериментальной серии показала снижение скорости формирования костных балочек, их истончение и задержку формирования пластинчатой костной ткани. Проведение зондового анализа поверхности травмированных костей определило глубокие функциональные изменения минерального метаболизма всей кости. Так в области дефекта отмечается уменьшение содержания кальция и фосфора через 10 дней соответственно на 7,51% ($p \leq 0,05$) и 4,55% ($p \geq 0,05$), через 15 дней – на 9,18% ($p \leq 0,05$) и 10,41% ($p \leq 0,05$) и через 24 дня – на 11,22% ($p \leq 0,05$) и 10,58% ($p \leq 0,05$). В то же время уровень кальция и фосфора возле места травмы и на удалении увеличивается в сравнении с контролем, где наблюдались процессы потери костных элементов. Данная динамика может указывать на снижение процессов ремоделирования кости и уменьшение ее чувствительности к

регуляторным факторам, которые вызывают усиление процессов ремоделирования при нормальном течении регенерации [2, 4]. Так возле дефекта уровень Са и Р увеличиваются в сравнении с контролем через 10 дней на 6,58% ($p \leq 0,05$) и 6,11% ($p \leq 0,05$), через 15 дней - на 8,03% ($p \leq 0,05$) и 9,42% ($p \leq 0,05$) и через 24 дня – на 8,59% ($p \leq 0,05$) и 11,83% ($p \leq 0,05$). Проксимально от дефекта уровень вышеуказанных элементов достоверно возрастает в сравнении с контролем через 15 дней соответственно на 8,43% ($p \leq 0,05$) и 7,34% ($p \leq 0,05$) и через 24 дня – на 12,47% ($p \leq 0,05$) и 9,16% ($p \leq 0,05$) (рис. 9).

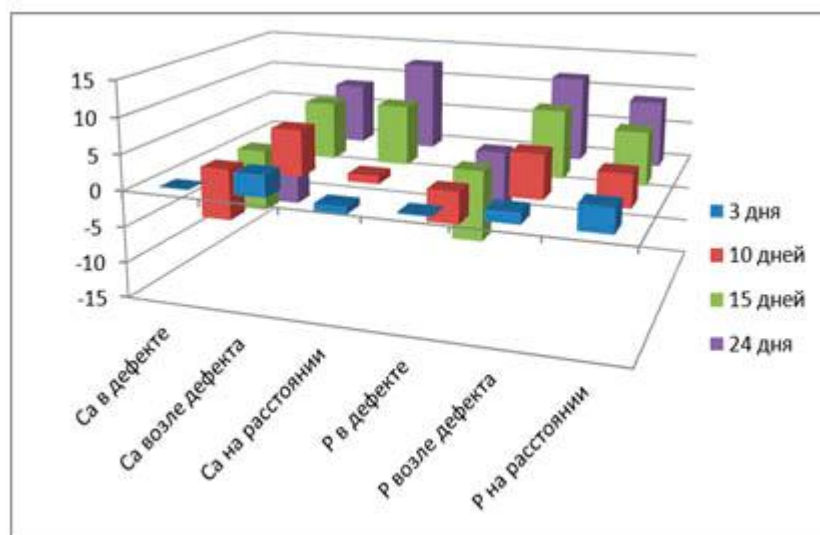


Рисунок 9 Динамика изменения содержания кальция и фосфора на поверхности травмированной кости (РЭММА) животных зрелого возраста в условиях гипоосмолярной гипергидратации тяжелой степени в различные сроки репаративного остеогенеза.

Выводы.

1. Растровая электронная микроскопия с микроанализом показала наличие областей с различной минерализацией, степень которой может зависеть от функциональной нагрузки, выполняемой определенной зоной кости. Соотношение кальция к фосфору при этом является константой и отражает нестехиометрию апатита костной ткани.
2. Процессы репаративной регенерации кости характеризуются началом минерализации новообразованного соединительнотканного остова на 15 сутки после травмы и сопровождаются потерей кальция и фосфора как возле зоны травмы так и на отдаленных участках кости, что может быть свидетельством активизации ремоделирования кости в ответ на механическую травму.
3. Нарушение водно-солевого баланса приводит к остеопеническому синдрому в интактной кости и замедлению формирования минерализованного матрикса во время репаративной регенерации. При этом наблюдается замедление ремоделирующей активности травмированной кости.

Литература

1. Augat, P. Mechanics and mechnobiology of fracture healing in normal and osteoporotic bone/ P. Augat, U. Simon, A. Liedert // *Osteoporos Int.* 2005. Vol. 16. P. 36–43.
2. Barnes, B. F. Conserved molecular program regulating cranial and appendicular skeletogenesis / B. F. Barnes, J. A. Helms // *Developmental Dynamics.* 2004. V. 231. P. 4–13.
3. Butala, S. J. Atomic absorption spectrophotometry methodology for the quantitative analysis of mercury in fish and hair / S. J. Butala, L. P. Scanlan, S. N. Chaudhuri // *J Food Prot.* November 1, 2006; 69(11): 2720–2728.
4. Cattermole, H. C. Bone mineral changes during tibial fracture healing / H. C. Cattermole [et al.] // *Clin. Orthop.* 1997. Vol. 339. P. 190–196.
5. Effects of mechanical forces on maintenance and adaptation of form in trabecular bone / R. Huiskes [et al.] // *Nature.* 2000. № 6. P. 704–706.
6. Frost, H. M. Perspectives: A Proposed General Model of the “Mechanostat” / H. M. Frost // *The anatomical record.* 1996. V. 244. P. 139–147.
7. Gerstenfeld, L. C. Developmental aspects of fracture healing and the use of pharmacological agents to alter healing / L. C. Gerstenfeld, T. A. Einhorn // *J. Musculoskel Neuron Interact.* 2003. Vol. 3, № 4. P. 297–303.
8. Groenevald, E. H. J. Bone morphogenetic proteins in human bone regeneration / E. H. J. Groenevald, E. H. Durger // *Eur J Endocrinol.* 2000. P. 9–21.
9. Lou, E. Bone morphogenetic proteins: an overview of therapeutic application / E. Lou // *Orthopedics.* 2001. Vol. 24, № 5. P. 504–509.
10. Schoenau, E. The "Muscle-Bone-Unit" in Children and Adolescents / E. Schoenau, H. M. Frost // *Calcif Tissue Int.* 2002. V. 70. P. 405–407.
11. Sodek, J. Osteopontin / J. Sodek, B. Ganss, M. D. McKee // *Crit Rev Oral Biol Med.* 2000. № 11. P. 279–303.
12. Towler. Bone morphogenetic proteins / Towler, Dwight A. // *Blood.* 2009. № 114(10). P. 2012–2013.
13. Корж, Н. А. Репаративная регенерация кости: современный взгляд на проблему. Стадии регенерации / Н. А. Корж, Н. В. Дедух // *Ортопедия, травматология и протезирование.* 2006. № 1. С. 76–84.
14. Лузин, В. И. Ультраструктура минерала плечевой кости у белых крыс различного возраста при нанесении дырчатого дефекта большеберцовой кости / В. И. Лузин, В. Н. Прочан // *Український морфологічний альманах.* 2010. Т. 8. № 1. С. 54–58.
15. Попова, Н. В. Щелочная фосфатаза и минеральная плотность трабекулярной костной ткани поясничных позвонков у женщин с естественной менопаузой / Н. В. Попова, Т. И. Рубченко, С. Ю. Лукашенко // *Проблемы репродукции.* 2005. № 4. С. 72–76.
16. Скальный, А. В. Современные методы диагностики элементного баланса и их роль в восстановительной медицине // *Современные технологии восстановительной медицины* / А. В. Скальный, И. А. Труханов; под ред. А. И. Труханова. М.: Медика, 2004. 288 с.
17. Уровни организации минерального матрикса костной ткани и механизмы, определяющие параметры их формирования / А. С. Аврунин [и др.] // *Морфология.* 2005. Т. 127, № 2. С. 78–82.

18. Физиология. Основы и функциональные системы: курс лекций / под ред. К. В. Судакова. М.: Медицина, 2000. С. 256–264.