

УДК 577.1

ОСОБЕННОСТИ ДИНАМИКИ ДЕМИНЕРАЛИЗАЦИИ КОСТНОЙ ТКАНИ ЧЕЛОВЕКА И КРЫСЫ В МОРФОЛОГИЧЕСКИХ ИССЛЕДОВАНИЯХ¹

© 2006 Е.В. Писарева, В.Г. Подковкин, Е.А. Юлаев, Е. Н. Архипова²

Данная работа посвящена изучению деминерализации костной ткани человека и крысы, применяемой в морфологических исследованиях. В работе изучалась деминерализация разных типов костной ткани: компактной, губчатой и эмбриональной. Были выявлены оптимальные объемно-массовые соотношения при деминерализации костной ткани с использованием ЭДТА. Определены особенности деминерализации костной ткани в случае предварительной фиксации образцов.

Введение

Применение костных трансплантатов в настоящее время является одним из ведущих направлений в стоматологической и общехирургической практике, а также в травматологии и ортопедии. В различных случаях необходимо использование разного костного материала, например, на месте губчатой кости (грудины) хорошо приживаются трансплантаты, изготовленные из ткани плода (эмбриональный материал), на месте компактной кости – трансплантаты из аллогенной костной ткани (кость взрослого человека) [1]. В данном направлении исследований очень важно проведение экспериментов на животных, чаще всего это крысы и кролики. При операциях на животных используют ксеногенный материал, изготовленный из костей животных [2]. Поэтому важно знать особенности деминерализации костной ткани не только человека, но и используемых в экспериментах животных.

В связи с этим целью нашей работы было выявить особенности динамики деминерализации костной ткани человека и крысы, применяемой в морфологических исследованиях.

Для изготовления трансплантатов не требуется сохранения структуры кости, т.е. получается бесклеточный матрикс, содержащий в основном органиче-

¹ Представлена доктором биологических наук профессором О.Н.Макуриной.

² Писарева Елена Владимировна (pellal@rambler.ru), Подковкин Владимир Георгиевич (podkovkin@rambler), Юлаев Евгений Александрович, Архипова Екатерина Николаевна, кафедра биохимии Самарского государственного университета, 443011, Россия, г. Самара, ул. Акад. Павлова, 1.

ские компоненты: коллаген и неколлагеновые белки, так как минеральные вещества выходят в процессе деминерализации.

В морфологических исследованиях, напротив, очень важно сохранение клеточной структуры, цитоплазмы, ядра клетки. Поэтому в данном случае используют такие деминерализующие растворы, как трилон Б, трихлоруксусная и другие кислоты в малых концентрациях [3].

На данный момент имеется немного достоверных экспериментальных и теоретических данных о том, какие условия и факторы влияют на процесс деминерализации. Поэтому основной задачей данной работы являлось экспериментальное изучение влияния различных факторов и условий на скорость процесса деминерализации с последующим использованием полученного материала в морфологических исследованиях.

Методика исследований

Процесс деминерализации проводился в течение 20 суток при ежедневной смене раствора, каждая серия содержала четыре повторности. Измерения производились на пламенном анализаторе жидкости ПАЖ-2. Полученные экстракты предварительно разводили в 5 раз дистиллированной водой и проводили измерение интенсивности свечения пламени.

В качестве контроля использовали 25% раствор ЭДТА, который предварительно разводили аналогичным образом. Концентрацию определяли, используя стандартные калибровочные графики. В стандартных морфологических исследованиях используются соотношения массы кости и объема деминерализующего раствора ЭДТА 1:40 и 1:50 соответственно в течение 20 дней при ежедневной смене раствора, а завершение процесса деминерализации определяют, как правило, механическим способом [4]. В связи с этим основной задачей нашего исследования стало выявление наиболее эффективных условий деминерализации, а именно сокращения длительности процесса и объема деминерализующего раствора, а также проверка окончания деминерализации с помощью количественного определения выхода ионов Ca^{2+} в раствор с использованием пламенной фотометрии.

Результаты и обсуждение

В ходе эксперимента были использованы объемно-массовые соотношения: 1:5, 1:20 и 1:50 соответственно. Были получены следующие результаты. При деминерализации компактной кости крысы без фиксации при соотношении массы кости и объема деминерализующего раствора 1:5 (рис.1) выход кальция завершился к девятым суткам с небольшими пиками на одиннадцатые и тринадцатые сутки. Длительность процесса деминерализации может быть объяснена тем, что кость была не полностью погружена в раствор трилона Б. Окончательно процесс деминерализации завершался на четырнадцатые сутки. Таким образом, можно

сделать вывод о том, что данный вариант объемно-массовых соотношений не следует использовать на практике из-за низкой эффективности.

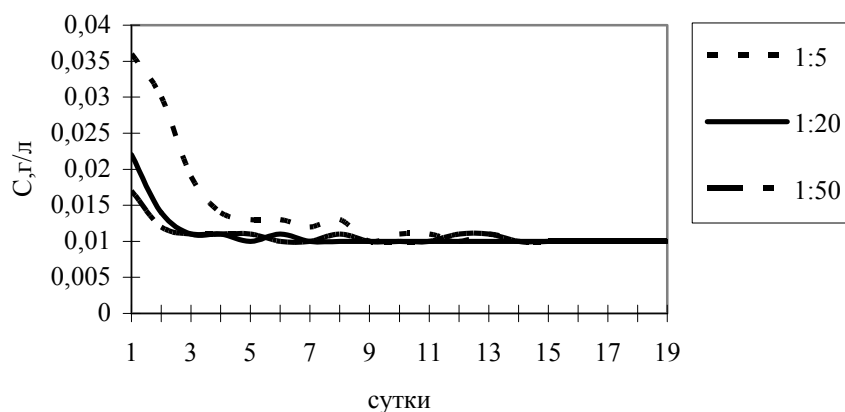


Рис.1. Выход кальция из компактной кости крысы без фиксации

При использовании соотношения массы кости и объема деминерализующего раствора 1:20 для деминерализации компактной кости крысы без фиксации процесс завершался к четвертым суткам. В случае использования объемно-массовых соотношений 1:50 процесс деминерализации завершался на третьи сутки с небольшими пиками на восьмые и двенадцатые сутки. Полученные результаты позволяют предположить, что самым оптимальным увеличением объема деминерализующего раствора, в случае компактной кости крысы, является 20-кратное превышение объема раствора по отношению к массе кости. Поскольку 50-кратное увеличение объема дает аналогичные результаты, то ими можно пренебречь в целях экономии деминерализующих растворов и оптимизации условий эксперимента.

При деминерализации губчатой кости человека с фиксацией и соотношением массы кости и объема деминерализующего раствора 1:5 основной выход кальция наблюдался до 5 суток, далее содержание ионов кальция в растворе было идентично контрольному показателю (рис.2). При соотношении 1:20 и 1:50 к 3 суткам регистрировалось падение уровня кальция в растворе, позже выход ионов держался на стабильном уровне, близком к фоновому значению. При деминерализации нефиксированной губчатой костной ткани и использовании объемно-массовых соотношений 1:5 и 1:20 основной выход кальция проходил за 4 суток, в последующие сутки концентрация ионов не отличалась от показателей фона. При соотношении 1:50 основной процесс выхода кальция завершался к 3 суткам. Деминерализация проходила достаточно быстро в связи с особенностями структуры губчатой костной ткани. При изучении содержания других химических элементов в губчатой кости получены сходные результаты. Из губчатой

кости калий, литий и бор выводились быстрее, чем из компактной. К четвертым суткам деминерализация заканчивалась.

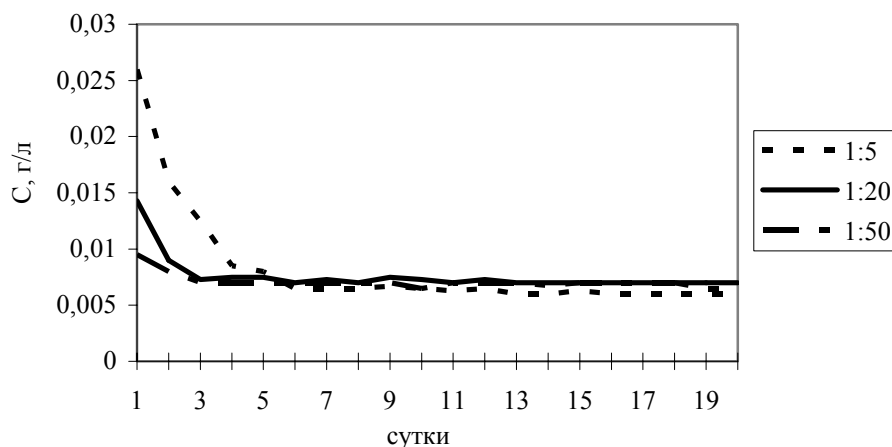


Рис.2. Выход кальция из губчатой кости человека с фиксацией

При деминерализации фиксированной компактной кости человека установлено, что соотношение массы кости и объема раствора 1:5 не является эффективным, поскольку требует сроков деминерализации, превышающих 20 суток. При соотношении массы кости и объема раствора 1:20 и 1:50 деминерализация проходила в течение первых 5-10 суток с наличием достаточного количества пиков при выходе ионов кальция. В случае деминерализации компактной кости без фиксации наблюдалась сходная тенденция. Пики при выходе кальция в раствор связаны с плотностью структуры компактной кости [1,2,4], поскольку в этом случае происходит послойная деминерализация. При изучении содержания кальция, лития, бора в деминерализующем растворе получены аналогичные результаты, хотя в целом эти химические элементы выводились из компактной кости быстрее, чем кальций.

Выход кальция из эмбриональной кости закончился на шестые сутки, т.е. значительно раньше, чем из компактной кости взрослого человека. Существенных различий в динамике деминерализации предварительно фиксированных и нефиксированных образцов выявлено не было.

Заключение

Полученные в ходе данного исследования результаты позволяют дать следующие практические рекомендации, которые можно использовать при деминерализации костной ткани человека и крысы с последующим применением образцов в морфологических исследованиях (в качестве деминерализующего раствора используется 25% трилон Б).

1. При деминерализации компактной кости крысы с фиксацией и без оптимальное соотношение массы кости и объема деминерализующего раствора 1:20. Процесс деминерализации можно проводить в течение 4-5 суток.
2. При деминерализации фиксированной губчатой кости крысы можно сократить объемное соотношение до 1:5 и процесс деминерализации проводить 7 суток. При объемно-массовых соотношениях 1:20 и 1:50 процесс деминерализации завершается в те же сроки.
3. При деминерализации компактной костной ткани человека наиболее оптимальным является соотношение массы кости к объему раствора 1:20. Деминерализация завершается на 10-12 сутки. Для губчатой кости это соотношение можно сократить до 1:5. Деминерализация заканчивается в течение 10 суток.
4. При деминерализации эмбриональной кости человека выход ионов кальция заканчивается на 6 сутки, т.е. значительно быстрее, чем из компактной кости взрослого человека.

Литература

- [1] Улумбеков, Э.Г. Гистология / Э.Г. Улумбеков, Ю.А. Челышев. – М.: ГЭОТАР-МЕД, 2001. – 672 с.
- [2] Касавина, Б.С. Жизнь костной ткани / Б.С. Касавина, В.П. Торбенко. – М.: Наука, 1979. – 167 с.
- [3] Справочник биохимика/ Р. Досон [и др.]; пер. с англ. – М.: Мир, 1991. – 544 с.
- [4] Франке, Ю. Остеопороз / Ю.Франке, Г.Рунге; пер. с немец. – М.: Медицина, 1995. – 304 с.

Поступила в редакцию 25/IX/2006;

Paper received 25/IX/2006.

в окончательном варианте – 4/X/2006.

Paper accepted 4/X/2006.

THE PECULIARITIES OF DEMINERALIZATION DYNAMICS OF MAN'S AND RAT'S BONE TISSUE IN MORFOLOGICAL RESEARCHES³

© 2006 E.V. Pisareva, V.G. Podkovkin, E.A.Yulaev, E.N. Archipova⁴

The paper is devoted to study of demineralization of man's and rat's bone tissue as applied to morphological researches. Different types of bone demineralization: compact, spongy and embrion are studied. Optimum volumetric-mass parities are found at a bone tissue demineralization using EDTA are found. The peculiarities a bone tissue demineralization in the case of preliminary fixing samples are determined.

³ Communicated by Dr. Sci. (Biology) Prof. O.N. Makurina.

⁴ Pisareva Elena Vladimirovna (pella1@rambler.ru), Podkovkin Vladimir Georgievich (podkovkin@rambler), Yulaev Evgeny Alexandrovich, Archipova Ekaterina Nikolaevna, Dept. of Biochemistry, Samara State University, Samara, 443011, Russia.