

ИНВАРИАНТНОСТЬ СТРУКТУРЫ ПОРИСТОСТИ КОМПАКТНОЙ КОСТИ ПО ДАННЫМ ЦЕНТРОБЕЖНОЙ ПОРОМЕТРИИ

Луныков А.Е.¹, Куликова Л.Н.², Гладилин Ю.А.³

INVARIANCE POROSITY STRUCTURE OF COMPACT BONE ACCORDING CENTRIFUGAL POROSIMETRY DATE

LUNKOV A.E., KULIKOVA L.N., GLADILIN U.A.

¹Кафедра медицинской биофизики (зав. кафедрой - доцент В.А. Дубровский), ²кафедра общей и биоорганической химии (зав. кафедрой - профессор П.В. Решетов), ³кафедра анатомии человека (зав. кафедрой - профессор О.Ю. Алёшкина) ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского», г. Саратов.

Экспериментально исследовались изменения в костном матриксе при удалении его органического или минерального компонент. Измерялись масса, общий и истинный объём, плотность образцов компактной кости в исходном состоянии и после декальцинации, в исходном состоянии и после отжига при температурах 500 и 900 °С. В каждом из сравниваемых состояний методом центробежной порометрии определялась структура пористости исследуемых образцов. Показано, что после удаления любого из компонентов костной ткани (минерального или органического) её матрикс сохраняет структуру пористости, характерную для системы центральных каналов, лакун и соединительных канальцев.

Ключевые слова: компактная кость, декальцинация, отжиг, текстурные параметры, центробежная порометрия, структура пористости.

Experimentally investigated changes in bone matrix upon removal of its organic or mineral components. Were measured mass, the total volume and the true density of compact bone samples before and after decalcification, before and after annealing at 500 and 900 °C. In each of the compared states by centrifugal porosimetry method was determined porosity structure of the samples. It is shown that after the removal of any components of the bone (mineral or organic) matrix retains its porosity structure consisting of a central channel osteons, lacunae and connecting tubules.

Keywords: compact bone, decalcification, annealing, textural parameters, centrifugal porosimetry, porosity structure.

Введение. Основные общеизвестные данные по архитектонике интерстициального пространства компактной кости, в том числе и размеры центральных каналов, лакун и канальцев, получены с помощью измерительной микроскопии. В этих методиках в качестве объекта исследований использовались поперечные срезы декальцинированной костной ткани, то есть костный матрикс с удалённым по стандартным методикам минеральным компонентом.

Возможность проверки идентичности внутреннего пространства компактной кости в исходном и декальцинированном состоянии появилась благодаря применению метода центробежной порометрии [1]. Центробежный метод получения кривой распределения объёма пористого пространства по размерам пор [2] не требует декальцинации образцов кости и является полностью неразрушающим. Это и позволило провести сопоставление данных центробежной порометрии и сканирующей электронной микроскопии на одних и тех же образцах, причём для электронной микроскопии эти образцы подвергались декальцинации, а поперечные срезы были получены на замораживающем микротоме. Несмотря на различие методик исследований, полученные результаты показали хорошее совпадение диаметров центральных каналов в исходном и декальцинированном состоянии компактной кости.

Известным способом удаления органического компонента костного матрикса является отжиг при температуре порядка 500 °С, который можно считать противоположным декальцинации. Термическое удаление органики в сочетании с измерением пористости костного образца применялось для определения состава костного матрикса [3].

Каждый из способов удаления одного из компонентов костного матрикса существенно изменяет его текстурные параметры: геометрический и истинный объём, общую и истинную плотность, объём пор. Представляет интерес сравнительное изучение структуры пористости компактной кости до и после удаления одного из компонентов костного матрикса с целью расширения представле-

ний о его композитных свойствах.

Цель исследования - экспериментальное изучение текстурных параметров и структуры пористости компактной кости в разных её состояниях: исходном, декальцинированном, после отжига при температурах 500 и 900 °С.

Материал и методы исследования. Изменялись пористость, геометрический и истинный объёмы образцов, а также распределение радиусов центральных каналов и канальцев. Исследовались образцы компактного вещества трубчатых костей конечностей, а также костей черепа в двух сопоставляемых состояниях: исходном и декальцинированном, исходном и после отжига при 500 °С, исходном и после отжига при 900 °С.

Декальцинация образцов проводилась 15% раствором соляной кислоты в течение 3-х суток и последующей выдержкой в течение суток в 5% растворе сернокислого натрия.

Отжиг образцов производился в муфельной печи ПМ-12 М1 с выдержкой при максимальной температуре отжига (500 или 900 °С) в течение 30 минут.

Для измерения текстурных параметров исследуемых образцов применялась оригинальная методика измерения общего (геометрического) и истинного объёма пористых объектов. Методика основана на использовании мерного цилиндра с герметичной крышкой, заполняемого рабочей жидкостью через отверстие в крышке. Наличие отверстия позволяет всегда полностью заполнить мерный цилиндр с сохранением условия постоянства заполняемого объёма. С учетом этого условия общий объём образца $-V_{\text{общ}}$ и его истинный объём $-V_{\text{ист}}$ находятся по формулам:

$$V_{\text{общ}} = (m + M_0 - M) / d \quad (1)$$

$$V_{\text{ист}} = (m_0 + M_0 - M) / d \quad (2),$$

где m_0 - масса образца, m - масса образца, заполненного рабочей жидкостью, M_0 - масса мерного цилиндра, полностью заполненного рабочей жидкостью, M - масса полностью заполненного цилиндра с предварительно помещенным в жидкость образцом, полностью заполненным той же жидкостью, d - плотность рабочей жидкости.

Использование только одной процедуры - взвешивания на аналитических весах позволяет измерять объёмы с абсолютной погрешностью не более $\pm 5 \text{ мм}^3$, которая для измеряемого объёма в 1 см^3 соответствует относительной погрешности 0,5%. Для взвешивания во всех случаях использовались электронные лабораторные весы НР-60.

Методика центробежной порометрии, использованная для получения функции распределения внутреннего объёма пор по их радиусам, подробно описана в работе [4]. Она основана на пропитке исследуемых образцов смачивающей жидкостью с последующим удалением её путём центрифугирования на последовательно возрастающих частотах вращения ротора. После центрифугирования на каждой фиксированной частоте измеряется масса образца. По этим значениям строится кривая вытеснения жидкости, графическое дифференцирование которой даёт функцию распределения радиусов пор. Центрифугирование проводилось на стандартной центрифуге ОС-6М, ротор которой был заменен на ротор специальной конструкции [5]. Для исключения неконтролируемого испарения рабочей жидкости в процессе центрифугирования и взвешивания образцов в качестве рабочей жидкости использовалось вакуумное масло ВМ-6, практически не испаряющееся при атмосферном давлении за счёт очень низкого давления насыщенных паров $- 10^{-6} \text{ мм рт.ст.}$

Результаты исследования и их обсуждение. Для исследования изменений в текстуре костного матрикса, происходящих при удалении одного из его компонент - минерального или органического проводились измерения общего и истинного объёмов и, соответственно, кажущейся и истинной плотности одних и тех же образцов до и после декальцинации или термического отжига. Под истинным объёмом подразумевается объём только твердой фазы образца, а под общим - суммарный объём твердой фазы и внутреннего объёма пор. Масса образца, делённая на истинный объём даёт в результате плотность вещества образца, то есть, плотность органики в декальцинированном образце или плотность минерального компонента в кости с удалённой органикой.

Таблица 1.

Декальцинированная теменная кость черепа

Обр.	Заполненная водой			После сушки				
	Размер (мм)	Масса (г)	$V_{\text{общ}}$ (см ³)	Размер (мм)	Масса (г)	$V_{\text{общ}}$ (см ³)	$V_{\text{истин}}$ (см ³)	Плотность (г/см ³)
№1	15x15,5x5	0,956	0,856	15x16x4	0,474	0,558	0,414	1,145
№2	19,5x11x5	1,062	0,913	19x10,5x4	0,517	0,555	0,448	1,155

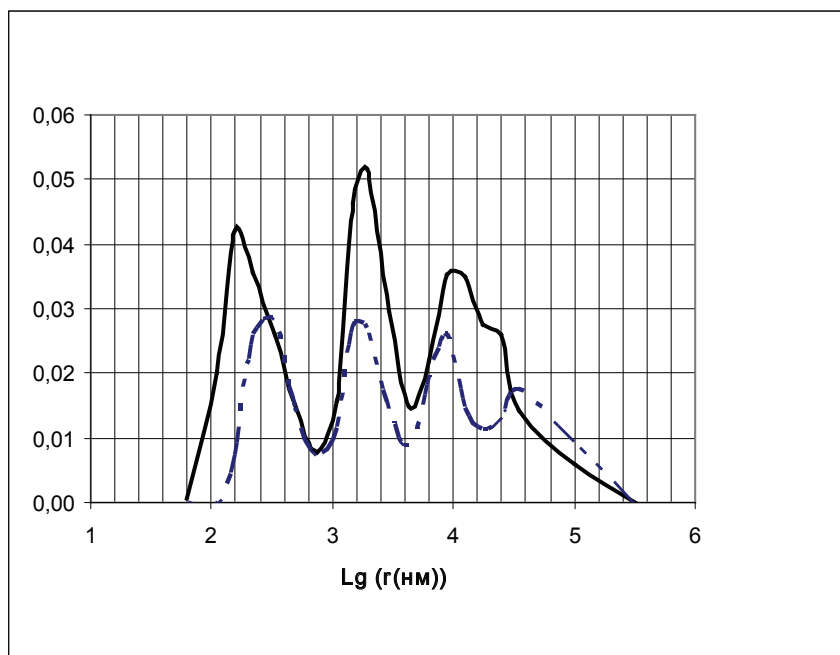


Рис. 1. Дифференциальные кривые распределения радиусов пор компактной кости в исходном (сплошная кривая) и декальцинированном (пунктирная кривая) состояниях.

Декальцинированная кость сохраняет свою эластичность и позволяет получать тонкие срезы для микроскопии только при хранении в воде. После извлечения из жидкости и сушки она становится жесткой и утрачивает прежнюю гидрофильность и способность к разбуханию. При дегидратации образцов, происходящей в процессе сушки, существенно меняются вышеуказанные текстурные параметры образцов.

В таблице 1 приведены данные измерений объемов и плотностей образцов декальцинированной теменной кости черепа, непосредственно после извлечения из воды и после сушки в течение суток при температуре 40 °С.

При измерении объемов извлеченных из воды образцов в качестве рабочей жидкости в мерном цилиндре использовалась также вода, и измерялся только общий объем образцов. При измерении объемов после сушки в качестве рабочей жидкости использовалось вакуумное масло ВМ-6 для исключения разбухания образцов, возможно при их пропитке водой.

Приведенные данные отражают следующие изменения, происходящие при сушке:

уменьшение размеров произошло только по толщине в 1,25 раз;

уменьшение массы составило (50÷56)%;

уменьшение общего объема – (35÷39)%;

истинная плотность образцов после сушки (плотность органики) 1,145÷1,155 г/см³;

пористость $(V_{\text{общ}} - V_{\text{ист}})/V_{\text{общ}}$ - 0,26÷0,19;

отношение общих объемов образцов в двух состояниях 1,534÷1,645 практически совпадает с квадратом отношения толщин $(5/4)^2=1,562$.

Последний из перечисленных выше результатов свидетельствует о том, что уменьшение объема при сушке происходит за счет уменьшения межфибрильного пространства вследствие дегидратации коллагена и(или) за счет уменьшения диаметров фибрилл. При длительном хранении образцов декальцинированной компактной кости наблюдается уменьшение пористости до 0,05÷0,1 и увеличение истинной плотности до 1,8÷2,0 г/см³.

Полученные результаты согласуются с отмечаемой зависимостью от температуры кинетики образования и морфологии фибрилл коллагена [6] и отражают существенные изменения текстурных параметров образцов костной ткани при её декальцинации. Однако основная цель исследований состояла в изучении внутренней структуры пористости костного матрикса при удалении, в данном случае, его минерального компонента.

Поскольку высушенные образцы декальцинированной кости приобретают жесткость, достаточную для их центрифугирования, имеется возможность с помощью метода центробежной порометрии получить распределение внутреннего объема по радиусам пор в исходном и декальцинированном состоянии компактной кости.

Результаты подобного сравнительного ис-

Таблица 2.

Тестурные параметры образцов компактной кости до и после отжига

№№ обр.	Исходные			После отжига					
	Масса m_0 (г)	Общий объём (см ³)	Плот- ность (г/см ³)	отжига (°C)	Масса m_t (г)	Общий объём (см ³)	Истин. объём (см ³)	Истин. пл-ть (г/см ³)	Плотн. органи- ки (г/см ³)
1	2,703	1,395	1,938	500	1,903	1,339	0,660	3,00	1,18
2	2,184	1,156	1,889	500	1,504	1,106	0,455	3,30	1,22
3	2,976	1,531	1,944	500	2,084	1,489	0,684	3,05	1,19
4	2,105	1,066	1,975	900	1,391	0,746	0,425	3,27	-
5	2,148	1,032	2,081	900	1,418	0,76	0,441	3,22	-
6	2,148	1,085	1,990	900	1,444	0,782	0,440	3,28	-

следования, полученные для костей нижней челюсти человека, приведены на рис. 1.

При сравнительном анализе этих кривых следует иметь в виду, что средние значения радиусов пор соответствуют положениям максимумов кривых распределения по оси логарифмов радиусов пор. Использование логарифмического масштаба связано с большим диапазоном изменения размеров – от 0,1 до 100 мкм или от 10^2 до 10^5 нм. С учетом этого замечания, сравнение кривых показывает полное совпадение максимумов при $Lg r = 3,25$ (1,8 мкм) и совпадение в области значений 10÷30 мкм при более выраженном раздвоении максимума у декальцинированного образца. Смещение центра максимумов мелких пор от 0,16 до 0,25 мкм можно считать несущественным, так как ширина максимумов на уровне 0,7 составляет $0,013 \div 0,025$ мкм против $0,02 \div 0,04$ мкм.

Измеренные размеры радиусов пор соответствуют радиусам центральных каналов остеонов (от единиц до десятков мкм) и радиусам канальцев (0,1÷0,5 мкм), соединяющих костные лакуны с центральными каналами [4,7]. Поэтому главный вывод, который следует из анализа приведенных кривых, состоит в том, что декальцинированная кость сохраняет внутреннюю архитектуру, присущую компактной кости.

Для проверки инвариантности структуры пористости компактной кости к удалению органического компонента исследовались образцы кортикального слоя бедренной кости, выпиленные из её диафиза. Для всех шести образцов массой 2÷3 грамма в исходном состоянии измерялись

объём и плотность, а также находились кривые распределения радиусов пор методом центробежной порометрии. Затем три образца отжигались при температуре 500 °C и три – при температуре 900 °C. Выбор температур отжига обусловлен тем, что при них происходит полное выгорание органики, но при 500 °C еще сохраняется объём минерального каркаса, уменьшение которого наблюдается, начиная с 800 °C [7]. После отжига измерялись текстурные параметры образцов и снимались кривые распределения радиусов пор.

Изменения текстурных параметров образцов в результате отжига приведены в таблице 2, из этих данных следует:

общий объём образцов за счет отжига уменьшился на 4% для 500 °C и на 30% для 900 °C;

отношение массы отожженных образцов к их истинному объёму, которое соответствует плотности минерального компонента, практически совпадает для обеих температур отжига и находится в пределах $3,0 \div 3,3$ г/см³;

поскольку общий объём образцов после 500 °C отжига уменьшился незначительно, разность общего и истинного объёмов соответствует объёму удаленной органики, который составил в среднем 55% общего объёма;

значения плотности органики, вычисленные как $(m_0 - m_t) / (V_{\text{общ}} - V_{\text{ист}})$, т.е. $1,18 \div 1,22$ отличаются от соответствующих значений таблицы 1 – $1,145 \div 1,155$ в среднем не более чем на 5%;

относительное уменьшение масс образцов после отжига при 900 °C ($1,49 \div 1,51$) превышает относительное изменение масс после 500 отжига

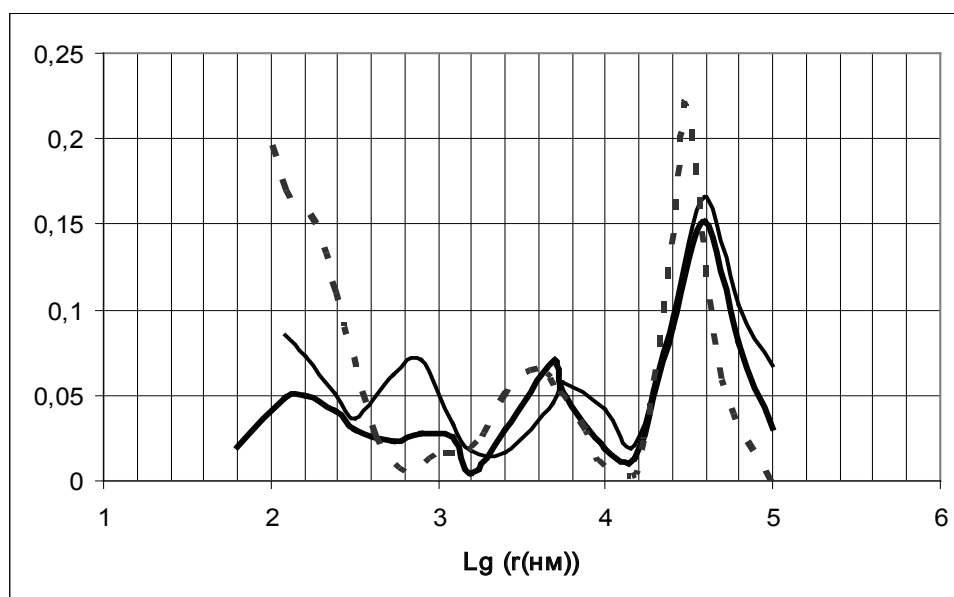


Рис. 2. Дифференциальные кривые распределения размеров пор кортикального слоя бедренной кости в исходном состоянии (толстая сплошная), после отжига при 5000С (тонкая сплошная) и после отжига при 9000С (пунктирная кривая).

(1,42÷1,45) не более чем на 5%.

Пористость компактной кости в исходном состоянии, складывающаяся из объёма центральных каналов, костных лакун и канальцев, обычно не превышает 10 % общего объёма. При температурах отжига до 500 °С пористость увеличивается на величину объёма удаленной органики и достигает до 55%. При температуре отжига 900 °С пористость уменьшается до 46%, что вместе с уменьшением общего объёма свидетельствует о частичном спекании минеральной матрицы, образуемой кристаллами гидроксиапатита [7].

Структуру пористости компактной кости до и после отжига отражают кривые, приведенные на рис. 2. Для увеличения достоверности экспериментальные данные порометрии усреднялись по всем шести образцам исходного состояния и по трём отожженным образцам.

Во всех трёх состояниях кривые распределения имеют по два максимума в области радиусов центральных каналов (4÷5 и 30÷35 мкм). Максимальное центробежное ускорение, которое достигалось при снятии порограмм, позволяет вытеснить рабочую жидкость из пор с минимальными радиусами до 0,1 мкм. Это оказывается достаточным для регистрации максимума, соответствующего радиусам канальцев, через которые происходит вытеснение жидкости из клеточных лакун. Для различных образцов компактной кости наблюдается либо явно преобладающие значения радиусов канальцев, как на рис. 1, либо «разма-

занный» диапазон их значений, как на рис. 2. Заслуживает внимания то, что в исходном состоянии точно регистрируется максимум в области $Lg r = 2,1$ или $r = 0,13$ мкм, а соответствующие максимумы кривых для 500 °С и 900 °С не сформировались и имеют явную тенденцию к переходу в область меньших значений радиусов. Это можно объяснить тем, что на максимальных центробежных ускорениях начинается частичное вытеснение жидкости и из пространства, которое занимала в костном матриксе удаленная органика. Это означает, что максимальные радиусы образованных пор достигают значений десятых долей мкм или сотен нм, что может соответствовать поперечным размерам волокон удаленного коллагена.

Основной результат состоит в том, что минеральный компонент костного матрикса также сохраняет информацию об исходной структуре пористости компактной кости после удаления органики, несмотря на существенное увеличение пористости (с 5÷10 до 50÷55 %) за счет объёма удаленной органики.

Экспериментальные кривые вытеснения жидкости из образцов получают при последовательном возрастании частот центрифугирования, то есть от больших радиусов освобождаемых пор к меньшим. При этом в отожженных образцах большая часть жидкости, находящейся в порах, образованных при удалении органики, остаётся не вытесненной в силу их малых радиусов. Поэтому интегральные кривые отражают динамику

вытеснения из образцов небольшого количества жидкости, происходящего на фоне её большого остаточного (не вытесненного) объёма. Но спектр радиусов получается из дифференциальной кривой, вид которой не зависит от абсолютных значений объёмов пор. Поэтому она и отражает распределение радиусов пор исходного костного матрикса, так как радиусы центральных каналов остеонов существенно больше радиусов пор, образовавшихся при удалении органики. Радиусы канальцев, через которые вытесняется объём жидкости, находящейся в клеточных лакунах, перекрываются с максимальными радиусами удалённых коллагеновых волокон, что отражается на соответствующем участке кривых рис.2. Однако при дифференцировании интегральной кривой вытеснения жидкости можно использовать условие, что общий объём центральных каналов и лакун примерно равны [7]. Это позволит исключить начальный объём жидкости, вытесненный из пространства, освобожденного от органики и скорректировать соответствующий участок кривой распределения радиусов пор в матриксе с удалённой органикой.

Полученные результаты дают количественную оценку существенных изменений текстурных параметров костного матрикса, происходящих при удалении одного из его компонентов – органического или минерального. Главный же результат проведенных исследований состоит в экспериментальном доказательстве инвариантности исходной внутренней архитектуры компактной кости к декальцинации и высокотемпературным воздействиям.

ЛИТЕРАТУРА:

1. Луников А.Е., Абросимов Г.Н., Омеляненко Н.П. Сопоставление диаметров гаверсовых каналов трубчатых костей по данным сканирующей электронной микроскопии и центробежной порометрии // *Морфология*, №6, 1992.
2. Ксенжек О.С., Калиновский Е.А., Петрова С.А., Литвинова В.И. Центробежный метод нахождения функции распределения пор по размерам в пористых средах. // *Журнал физической химии*, 1967, XLI, №7, с. 1602-1607.
3. Луников А.Е., Абросимов Г.Н. Метод определения состава костной ткани // *Архив анатомии, гистологии и эмбриологии*, т. 100, №2, 1991, с. 57-60.
4. Луников А.Е., Куликова Л.Н., Применение центробежной порометрии для морфометрии костной ткани // *Медицинская физика* №1, 2011, с. 69-74.
5. Луников А.Е., Абросимов Г.Н. Ротор для выделения жидкости из пористого образца в процессе центробежного порометрирования, Патент РФ № 1729598.
6. Николаева Т.И., Кузнецова С.М., Рогачевский

В.В., Регуляция фибриллярной структуры коллагена температурами, близкими к физиологической температуре // *Современные проблемы науки и образования*, №6, 2011, приложение «Биологические науки», с. 19.

7. Луников А.Е., Гладилин Ю.А., Куликова Л.Н. Индивидуальные особенности пористости трубчатых костей человека // *Морфология*, №4, 2011, с. 57-60.

8. Баринов С.М., Комлев В.С. Биокерамика на основе фосфатов кальция, М., Наука, 2005, 179 с.

REFERENCES:

1. Lun'kov, A.E. Sopotavlenie diametrov gaversovykh kanalov trubchatykh kostej po dannym skaniruyushhej ehlektronnoj mikroskopii i tsentrobezhnoj porometrii / A.E. Lun'kov, G.N. Abrosimov, N.P. Omel'yanenko // *Morfologiya*. – 1992. – №6. – S.76-80.
2. Tsentrobezhnyj metod nakhozhdeniya funktsii raspredeleniya por po razmeram v poristyx sredakh. / O.S. Ksenzhek, E.A. Kalinovskij, S.A. Petrova, V.I. Litvinova V.I. // *Zhurnal fizicheskoy khimii*. – 1967. – №7. – S. 1602-1607.
3. Lun'kov, A.E. Metod opredeleniya sostava kostnoj tkani / A.E. Lun'kov, G.N. Abrosimov // *Arkhir anatomii, gistologii i ehmbriologii*. – 1991. – №2. – S.88-91.
4. Lun'kov, A.E. Primenenie tsentrobezhnoj porometrii dlya morfometrii kostnoj tkani / A.E. Lun'kov, L.N. Kulikova // *Meditinskaya fizika* - 2011. – №1. – S.69-74.
5. Lun'kov, A.E. Rotor dlya vydeleniya zhidkosti iz poristogo obraztsa v protsesse tsentrobezhnogo porometrirovaniya / A.E. Lun'kov, G.N. Abrosimov // *Patent RF* - 1993. – № 1729598.
6. Nikolaeva, T.I. Regulyatsiya fibrillyarnoj struktury kollagena temperaturami, blizkimi k fiziologicheskoy temperature / T.I. Nikolaeva, S.M. Kuznetsova, V.V. Rogachevskij V.V. // *Sovremennye problemy nauki i obrazovaniya, prilozhenie «Biologicheskie nauki»*. – 2011. – №6. – S. 19.
7. Lun'kov, A.E. Individual'nye osobennosti poristosti trubchatykh kostej cheloveka / A.E. Lun'kov, YU.A. Gladilin, L.N. Kulikova // *Morfologiya*. – 2011. – №4. – S.57-60.
8. Barinov, S.M. Biokeramika na osnove fosfatov kal'tsiya / S.M. Barinov, V.S. Komlev. – М., 2005. – 204s.

Авторская справка:

1. Луников Александр Евгеньевич, кандидат физико-математических наук, доцент кафедры медицинской и биологической физики ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского». 410056, г. Саратов, ул. Советская 72/82 кв. 215, 8-917-301-14-02, E-mail: aelunkov@mail.ru.

2. Куликова Лариса Николаевна, кандидат

химических наук, старший преподаватель кафедры общей и биоорганической химии ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского». E-mail: kulikovaln@gmail.com.

3. Гладилин Юрий Александрович, доктор

медицинских наук, доцент кафедры анатомии человека ГБОУ ВПО «Саратовский государственный медицинский университет им. В.И. Разумовского». 410600, г. Саратов, ул. Б.Казачья 112а, (8452) 51-16-13.