

А. Л. ШАБАДАШ

ДЕКАЛЬЦИНАЦИЯ КОСТИ НЕЙТРАЛЬНЫМИ СОЛЕВЫМИ РАСТВОРАМИ

(Представлено академиком А. И. Абрикосовым 10 XI 1949)

Для микроскопического изучения кости на срезах общепринято декальцинировать их действием сильных неорганических кислот (главным образом азотной, реже соляной). Предложены разнообразные смеси (в том числе и с органическими реактивами), но общим для всех них фактором является высокая кислотность раствора ($\text{pH} < 1,0$), которая обуславливает преобразование трикальцийфосфата в водно-растворимую соль⁽¹⁾. Удаление кальция с помощью крепких кислот сопровождается рядом побочных отрицательных влияний на структурные элементы; назову некоторые крупные дефекты, неизбежно возникающие при обычной технике обработки кости: 1) происходит набухание основного вещества, коллагеновых волокон и пр., деформирующее микроскопические детали; 2) наблюдается глубокое повреждение белковой основы кости, в частности, изменение изоэлектрических зон клеток и межклеточных образований, исключающее возможность их изучения и сопоставления с прижизненными свойствами ткани; 3) разрушается ряд химических составных частей и метаболитов (например, гликоген) и инактивируются многие ферменты (например, фосфатазы), гистохимическое исследование которых представляет выдающийся интерес для понимания процессов остеогенеза и заживления костных переломов. Таким образом, современное динамическое изучение гистологии зрелой кости наталкивается на серьезные препятствия, являющиеся следствием кислотной декальцинации.

Мне представляется важным подчеркнуть, что общепринятая техника удаления кальция из кости для приготовления срезов является грубым и искусственным приемом, не имеющим аналогов в прижизненных физиологических процессах обеднения скелетных частей минеральными солями: нет достоверных данных о том, что в очагах халистереза наблюдается значительное накопление сильных кислот. Выяснение механизмов прижизненных изменений кальциевого депо в костях не находит опоры в анализе искусственной кислотной декальцинации, опирающейся на явно небιологический принцип мобилизации кальция.

Из сказанного вытекают два ряда мотивов, заставивших нас в течение ряда лет исследовать течение процессов декальцинации кости и зуба: первый — необходимость создания рациональной гистотехники, щадящей микропрепараты и допускающей последующее применение новейших приемов гистохимии; второй — потребность сближения искусственных и естественных агентов и вскрытия существа прижизненной деминерализации путем имитации биологических условий; успешное ре-

шение поставленной задачи вооружает биологов и врачей методом управления рядом нормальных и патологических процессов в скелете.

В основу наших исканий по бескислотной мобилизации кальция в нейтральной среде легли факты предыдущих наблюдений⁽²⁾ о соотношениях органических и минеральных компонентов в костной ткани. Принято думать, что фосфорнокислые соли кальция во время остеогенеза вступают в прочную химическую связь с белково-органической основой кости⁽³⁾. Следствием таких представлений является убеждение, что высвобождение Са из этой связи возможно лишь путем глубокого нарушения сил сцепления минерала и белков ткани, с последующим энергичным процессом обменного разложения малорастворимого апатита $[3\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2 \cdot \text{CaCO}_3]$ с помощью сильных кислот. Наш опыт показал, что эти мнения не отражают истинного существа дела: связь Са и органической основы прочна лишь в физическом смысле; общезвестная твердость скелетных образований обусловлена своеобразием пространственной организации палочковидных мицелл белков и микрокристаллитов кальция, чередующихся в шахматном порядке в трех направлениях; в химическом и биологическом отношениях взаимосвязи кальциевых отложений и белков весьма подвижны и могут быть изменены достаточно деликатными способами даже *in vitro*; повидимому, они осуществляются за счет добавочных и побочных валентностей молекул.

Базируясь на наших наблюдениях в поляризованном свете, я пришел к выводу, что принципиально возможно осуществить декальцинацию кости *in vitro* с применением щадящей техники, следовательно, с полным исключением действия крепких или слабых кислот. Первая серия наших опытов в этом направлении была посвящена выяснению оптимального катиона, способного заместить Са в кости. Трубочатые кости крысы (плечевые, бедренные и т. п.) осторожно мацерировались, высушивались до постоянного веса, взвешивались на торсионных аналитических весах и погружались в эквимолекулярные* растворы нейтральных солей (хлоридов, сульфатов, нитратов и т. д.). Мы понимали, что в этих условиях получим лишь минимальное извлечение Са, однако предшествующие наблюдения убеждали, что соли одной и той же кислоты будут действовать различно, в зависимости от наличного в их составе катиона. Действительно, результаты анализа жидкости на кальций (в модифицированной нами технике определения Са по Крамер — Тислау), при абсолютно малых количествах Са** в растворе, позволили расположить соли по их эффективности в следующий ряд: $\text{K} < \text{Na} < \text{NH}_4$. Следовательно, оказалось целесообразным в дальнейшем вести наблюдения над аммонийными солями.

Во второй серии опытов исследовалось влияние эквинормальных растворов аммиачных солей разнообразных неорганических и органических кислот; исходный вес костей 90—275 мг, объем жидкости 100 см³, $t = 16$ — 18° . Сравнительная эффективность анионов в отношении извлечения Са из кости выражается следующим порядком: оксалат 0,7%, сульфат 2,9%, хлорид 3,8%, нитрат 4,5%, роданат 4,5%, цитрат 21,3%. Контрольное действие 7% азотной кислоты извлекало 23% Са.

Существенным является, однако, не простая последовательность анионов, напоминающая лиотропный ряд Гофмейстера: первые шесть солей (в растворе) обуславливают очень незначительную мобилизацию Са из кости и переход его в жидкость, несмотря на то, что некоторые растворы имели слабо кислую реакцию в силу гидролиза соли. Так, концентрация водородных ионов в использованных нормальных растворах аммонийных солей выражалась $\text{pH} = 5,6$ (для хлоридов) и $\text{pH} = 5,8$ — $5,9$ (для нитратов, роданатов, сульфатов); тем не менее, выдерживание в этих раство-

* Полуноральные, нормальные и двуноральные.

** Для NaCl — 0,2 мг%, для NH_4Cl — 4,5 мг%.

рах костей в течение 20—35 дней привело к извлечению в среднем не более 4,5% (от веса кости) кальция.

Роль трехосновного лимоннокислого аммония специфична и резко выделяется на общем фоне: высвобождение кальциевых солей и их переход в раствор, определяемый аналитически, достигает в течение 4—6 дней обработки 19—21% (от веса кости), т. е. приближается к его количеству, извлекаемому при декальцинации 7% азотной кислотой (20—23%)*. Обращают на себя внимание два обстоятельства: 1) Высокий уровень мобилизации Са из кости: количество удаляемого Са во много раз превосходит цифры, обнаруживаемые в растворах других аммиачных солей; физические свойства кости, подвергшейся действию нормального (8,7 г%) и двунормального (17,4 г%) растворов цитрата аммония, полностью соответствуют эффекту деминерализации — кости приобретают консистенцию сыра, прокалываются иглой, а при более длительном воздействии становятся просто мягкими и легко деформируемыми. В то же время, кость не набухает и окраска ее не изменяется (как при HNO_3). 2) Действие цитрата аммония сказывается в короткие сроки: плечевая кость крысы (100—130 мг весом) в 100 мл жидкости и при комнатной температуре декальцинируется за 120—140 час. Существенное значение имеет температурный фактор: при 37—40° скорость процесса вырастает почти вдвое: удаление 18—20% (от веса кости) кальция, достаточное для изготовления гистологических срезов, достигается уже через 72 часа. Таким образом, интенсивность декальцинирующего эффекта растворов лимоннокислого аммония вне сомнений.

Однако для исчерпывающих доказательств этого тезиса было необходимо проверить и установить возможность побочных влияний и, в первую очередь, закисления среды в результате гидролиза соли. Кристаллическая соль трехосновного лимоннокислого аммония при ее растворении в дистиллированной воде неизбежно гидролизует, а так как ее катион обладает меньшей силой диссоциации, чем анион, то возникает слабо кислая реакция: для нормального цитрата аммония рН раствора составляет от 5,3 до 4,7**. Незначительная кислотность жидкости в общем того же порядка, что и в растворах хлорида, нитрата, сульфата или роданата аммония, причем длительное (30—35-дневное) воздействие последних имело лишь слабый декальцинирующий эффект, не превышающий 4,0—4,5% кальция от веса кости. Поэтому можно было бы сказать, что при равных условиях — рН, концентрации растворов и температуры — лимоннокислый аммоний является значительно более энергичным деминерализующим агентом, чем другие изученные нами аммонийные соли. В целях уточнения вопроса и, главным образом, для приближения условий эксперимента *in vitro* к прижизненной среде тканей теплокровных животных была осуществлена особая серия опытов, в которых путем дробного добавления (по каплям!) раствора аммиака к лимоннокислому аммиону рН раствора сдвигался в щелочную зону, т. е. становился больше 7,0.

Нами исследовано действие 1*N* и 2*N* растворов цитрата аммония с рН = 7,1; 7,2; 7,3; 7,5; 7,6; 8,0. Следовательно, декальцинация костей осуществлялась, строго говоря, даже не в нейтральной, но в слабо щелочной среде. Тем не менее, и в этих условиях мобилизация кальция из кости с помощью цитрата аммония оказалась непреложным фактом. При рН = 7,1—7,3 количество кальция, переходящего в раствор, практически мало отличается от опытов с 1*N* и 2*N* лимоннокислым аммонием без его подщелачивания, иными словами, достигает 19—21% (от веса кости) при 6-дневном воздействии и комнатной температуре. Для предотвращения улетучивания аммиака из смеси реакция проводится

* Определение Са в жидкости проводила Д. Я. Гольдбурт.

** Соли различных серий производства.

в сосудах с шлифованными стеклянными пробками, а кость подвешивается на шелковинке, чтобы жидкость омывала ее со всех сторон. Температурный коэффициент скорости и в этих опытах полностью сохраняет свое значение. Декальцинированная кость легко режется микротомом на срезы заданной толщины. При увеличении щелочности до $pH = 7,6$ наблюдается некоторое снижение количественных показателей декальцинации, примерно до 18—19% (от веса кости) кальция, что все еще допускает разрезание кости острым ножом и приготовление препаратов для микроскопирования. Таким образом, после контролей с искусственным защелочением жидкости и доведением ее pH до величин, совместимых с жизнедеятельностью тканей и клеток теплокровных, имеются все основания утверждать, что лимоннокислый аммоний, взаимодействуя с солями кальция в нейтральной и слабо щелочной среде, обуславливает их мобилизацию и переход из ткани в окружающий раствор; этот факт подтверждается прямым химическим анализом Ca , извлеченного из кости, потерей тканью суммы минеральных веществ и изменением ее физических свойств, допускающим приготовление срезов для микроскопического изучения.

Опыт бескислотной декальцинации кости приводит к новым представлениям о типе отложений кальция; они коренным образом отличаются от прежних взглядов и углубляют высказанное выше положение о биологической (следовательно, и химической) лабильности связей Ca с белками ткани. Действие растворов лимоннокислого аммония в условиях физиологического pH , в сущности говоря, создает модель прижизненных возможностей мобилизации кальция из кости при полном отсутствии органических (например, молочная) или неорганических кислот. Экспериментальная проверка сближает факторы биологических и технических воздействий и подтвердила реальную значимость установленных нами данных для явлений халистереза в организме животных.

На основе представленного материала мною разработаны: 1) метод извлечения кальция нейтральными и слабо щелочными смесями для изучения микроструктуры и гистохимических свойств кости, состоящий в обработке 1N и 2N раствором цитрата аммония ($pH = 7,1—7,3$) в течение 64—72 час. при температуре 37—39°; 2) теория биологических механизмов высвобождения Ca из его депо в скелете. Накопление лимоннокислого аммония, осуществимое специальным вмешательством в углеводный обмен ткани, является важнейшим фактором мобилизации этого катиона.

Московский медицинский
стоматологический институт

Поступило
10 XI 1949

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ Encycloped. microscop. Techniq., 1926, II, S. 1149—1157. ² А. Л. Шабалаш, Взаимосвязь солей кальция и органических веществ в кости и зубах по данным гистохимических исследований. Тезисы конференции МГСИ, 20—21 мая 1948, М.
³ С. Я. Капланский, Минеральный обмен, 1938, стр. 206—207.