

О.М. Левашов, В.А. Березовский, М.И. Левашов, С.Л. Сафонов

## Потенциал нагрузки бедренной кости крысы при дозированных механических воздействиях

*Досліджували потенціал навантаження (ПН) вологої стегнової кістки 24 білих щурів-самців лінії Вістар, що знаходилися в умовах нормо- та гіпокінезії. Механічне навантаження на кістку, яке становило 30, 50 і 100 % від маси тіла тварини, здійснювали в аксіальному напрямку. Тривалість перебування щурів в умовах жорсткої гіпокінезії обмеженого простору – 28 діб. У дослідженнях використовували електроди Ag-AgCl з сольовим містком з 0,9%-м розчином NaCl у 2%-му агарі [3]. Встановлено, що амплітуда електричного потенціалу, котра виникає у кістці при механічному навантаженні, залежить від величини цього навантаження. Однак існує визначений оптимум механічного навантаження, що забезпечує максимальний приріст ПН. Цей оптимум знаходиться в діапазоні навантажень фізіологічного рівня ( до 50 % від маси тіла щура). При розвитку гіпокінетичної остеопенії ПН зменшується також найбільш суттєво у діапазоні навантажень фізіологічного рівня. Це може бути однією з причин низької ефективності фізичних навантажень при розвитку вікової остеопенії та уповільненого відновлення кісткової тканини у періоді післядії гіпокінезії.*

### ВВЕДЕНИЕ

Деформации и напряжения кости при воздействии функциональных нагрузок, приводят к возникновению в ней электрических потенциалов нагрузки (ПН). Такие потенциалы возникают как при статических, так и при динамических нагрузках и могут быть зафиксированы на поверхности кости как *in vivo*, так и *in vitro* [2, 13–15, 21]. При этом на вогнутой поверхности кости (поверхность, которая подвергается сжатию) всегда регистрируется отрицательный потенциал, а на ее выпуклой поверхности (поверхность, которая подвергается растяжению) – положительный. Установлено, что ПН определяется свойствами как твердой (неорганический и органический матрикс), так и жидкой фазы кости (кровь, находящаяся в сосудах, тканевая жидкость системы гаверсовых и фолькмановских каналов, каналикул и остеоцитарных лакун).

Происхождение ПН связывают с пьезо-электрическими и электрокинетическими явлениями, возникающими в кости при нагрузках [9, 10, 16]. ПН отводится важная роль в регуляции физиологической перестройки и репаративной регенерации костной ткани, хотя однозначного ответа на вопрос об условиях возникновения, механизмах передачи и восприятия электрических сигналов остеогенными клетками до настоящего времени нет. Показано, что между величиной ПН и степенью деформации кости существует прямая корреляционная зависимость. Максимальная амплитуда ПН на единицу нагрузки уменьшается при снижении градиента деформации [4]. Однако исследования последних лет свидетельствуют о том, что связь между электрическим потенциалом и нагрузкой не такая простая, как представлялось ранее [1]. Полагают, что не только интенсивность, но и характер нагрузки влияют на процессы генерации ПН [6].

© О.М. Левашов, В.А. Березовский, М.И. Левашов, С.Л. Сафонов

Целью нашей работы было исследование закономерностей возникновения потенциала нагрузки во влажной свежeweделенной бедренной кости крыс при различных режимах механических воздействий.

## МЕТОДИКА

Исследования проведены на 24 лабораторных крысах-самцах линии Вистар трехмесячного возраста. Контрольные крысы (n=12) находились в обычных условиях вивария без ограничения подвижности, опытная группа (n=12) – в условиях жесткой 28-суточной гипокинезии. Объектом исследований служили свежeweделенные бедренные кости крыс (n=48).

Для определения ПН использовали установку, состоящую из электронного блока на основе трехкаскадного усилителя электрических сигналов, таймера, устройства для фиксации и увлажнения кости, электродов Ag-AgCl с солевым мостиком из 0,9%-го раствора NaCl в 2%-м агаре и регистратора [3]. Измерения проводили при максимальном разрешении 10 мкВ и базовой погрешности 0,05 %. Электроды располагали в центре диафиза бедренной кости. При этом электрод, расположенный на вогнутой стороне кости, подключали к инвертирующему входу, а электрод противоположной стороны – к неинвертирующему входу усилителя. Для поддержания кости во влажном состоянии использовали систему увлажнения 0,9%-м раствором NaCl с рН 7,2. Исследования проводили при 20–22°C.

Механическую нагрузку на кость осуществляли в аксиальном направлении. Величину нагрузки рассчитывали исходя из условий физиологического распределения весовой нагрузки между передними и задними конечностями крысы, согласно которым 40 % весовой нагрузки приходится на передние конечности, а 60 % – на задние [5]. Таким образом, у крысы в условиях

покоя при опоре на все четыре конечности, на каждую переднюю конечность приходится нагрузка, равная 20 %, а на каждую заднюю – 30 % от массы тела. Все исследования проводили при трех степенях нагрузок: 30 % (I степень), 50 % (II степень) и 100 % (III степень) от массы тела животного. Нагрузка I степени соответствовала весовой нагрузке на задние конечности животного в состоянии покоя. Нагрузка II степени была применена исходя из того, что в определенных условиях крыса может принимать вертикальную позу с опором только на задние конечности. Учитывая то, что в экстремальных ситуациях крыса может совершать прыжки, при которых нагрузка на конечности может возрастать многократно, были проведены исследования при нагрузке, равной 100 % от массы тела (III степень).

Перед началом эксперимента определяли массу тела крысы и рассчитывали величину нагрузки в грам-силе, соответствующую 30, 50 и 100 % от установленной массы. После выведения животного из эксперимента, бедренную кость скелетировали, закрепляли в установке для измерения ПН в вертикальном положении и подключали систему увлажнения. К центру диафиза бедренной кости с медиальной и латеральной стороны подводили электроды. Для обеспечения надежного контакта с поверхностью кости использовали солевой агаровый мостик.

Ступенчатую нагрузку на кость осуществляли путем помещения, а затем удаления с верхней площадки системы крепления головки бедренной кости, груза заданной величины. Исследования повторяли не менее трех раз. Запись ПН проводили на двухкоординатном самописце XY Recorder (Прага). Зависимость электрического потенциала от механической нагрузки на кость оценивали по величине ПН, приходящейся на единицу нагрузки (у микровольтах на 1гс).

Полученные результаты обрабатывали методом статистического анализа с использованием критерия *t* Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При приложении механической нагрузки, равной 50% от массы тела, на поверхности бедренной кости контрольных животных регистрировались характерные двухфазные колебания электрического потенциала, амплитуда которых достигала 1200-1500 мкВ при длительности – 0,4–0,6 с (рис. 1).

Первая фаза ПН имела позитивное начальное отклонение и возникала в ответ на приложение механической нагрузки. Вторая фаза возникала при снятии нагрузки. Ее начальное отклонение имело обратную направленность, а амплитуда была равна или близка к амплитуде первой фазы. Расчетные величины абсолютного прироста потенциала на единицу нагрузки составляли от 1 до 3 мкВ.

Нами была исследована зависимость амплитуды ПН бедренной кости крысы от приложенной механической нагрузки. Установлено, что при увеличении нагрузки от 30 до 100 % от массы тела крысы амплитуда ПН возрастала в экспоненциальной зависимости (рис. 2). Максимальный прирост ПН отмечался уже при нагрузке I степени. При нагрузке II степени ПН продолжал увеличиваться, но меньшими темпами, а при нагрузке III степени его прирост был минимальный.

Если принять амплитуду ПН, которая достигалась при нагрузке III степени за 1,0 (нормализованное значение максимальной амплитуды), то амплитуда ПН при нагрузке I степени составляла 0,45, а при нагрузке II степени – 0,75. Дальнейшее двукратное увеличение нагрузки (с 50 до 100 %) обеспечивало дополнительный рост амплитуды ПН только на 0,25.

Статистический анализ показал, что средние значения амплитуды ПН при нагрузках II и III степени были больше, чем при нагрузках I степени на 53,1 и 113,6 % соответственно,  $P < 0,05$  (рис. 3). Однако значения потенциала, приходящиеся на единицу нагрузки III степени, были на 21,5 и 26,7 % меньше соответственно нагрузок I и II степени (рис. 4).

Полученные результаты свидетельствовали о том, что амплитуда электрического потенциала, который возникал в кости при механической нагрузке, находилась в прямой зависимости от величины (степени) этой нагрузки. Однако существовал определенный оптимум механической нагрузки, обеспечивавший максимальный прирост ПН. Этот оптимум находился в диапазоне нагрузок физиологического уровня (30, 50 % от массы тела крысы). Прирост амплитуды ПН при значительных механических нагрузках (100 % массы тела) достигался за счет снижения их эффективности, что выражалось в уменьшении прироста величины электрического потенциала на единицу нагрузки.

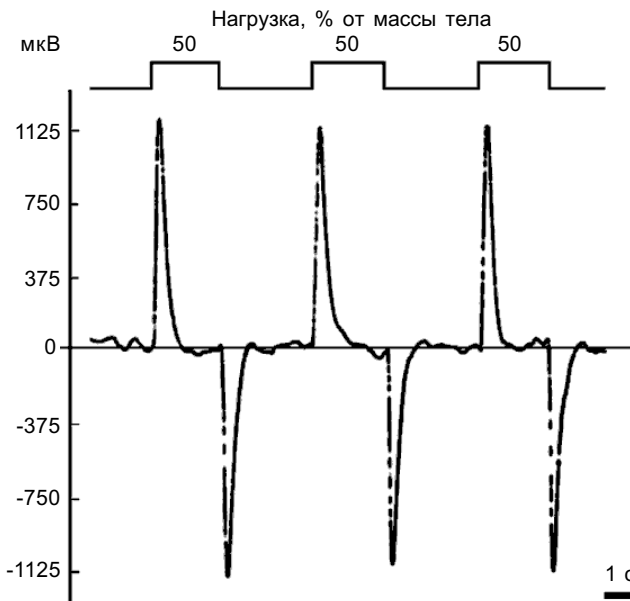


Рис. 1. Пример регистрации типичных потенциалов нагрузки бедренной кости взрослых крыс

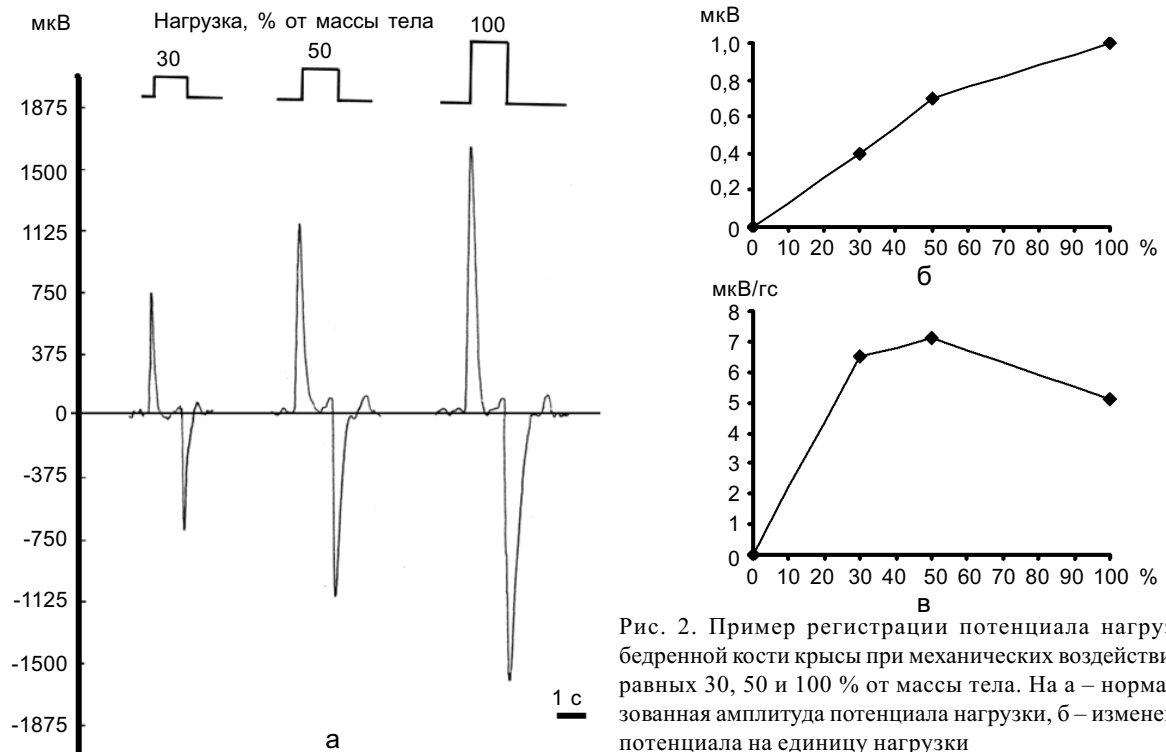


Рис. 2. Пример регистрации потенциала нагрузки бедренной кости крысы при механических воздействиях, равных 30, 50 и 100 % от массы тела. На а – нормализованная амплитуда потенциала нагрузки, б – изменение потенциала на единицу нагрузки

В физиологических условиях кость подвергается функциональным нагрузкам различного характера, интенсивности и продолжительности, что позволяет поддерживать необходимый уровень биоэлектрической регуляции физиологической перестройки костной ткани. В условиях же длительной гипокинезии, вследствие отсутствия механической нагрузки на опорно-

двигательный аппарат, биоэлектрические механизмы регуляции физиологической перестройки костной ткани не могут быть реализованы в полной мере. Однако сведения о том, как функционируют эти механизмы в периоде последствий гипокинезии и восстановления физиологического уровня функциональной нагрузки отсутствуют. Ответ на данный вопрос

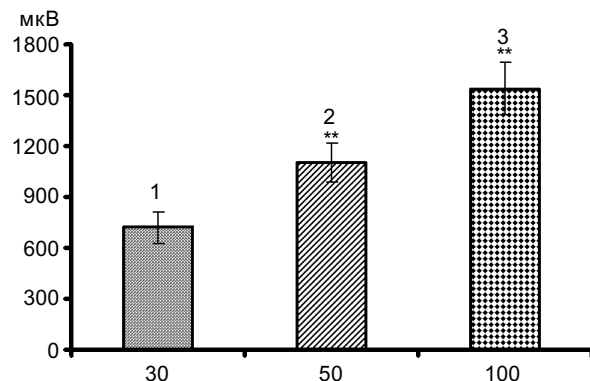


Рис. 3. Амплитуда потенциала бедренной кости крысы при различных нагрузках: 1 – 30 %, 2 – 50 %, 3 – 100 %

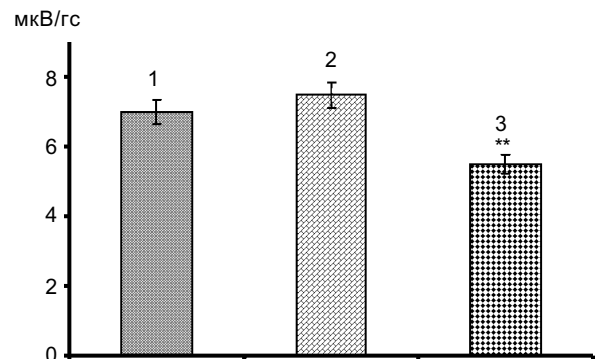


Рис. 4. Прирост потенциала бедренной кости крысы в расчете на 1 г различной нагрузки: 1 – 30 %, 2 – 50 %, 3 – 100 %

представляется чрезвычайно важным для понимания причин замедленного восстановления костной ткани после продолжительной гипокинезии и микрогравитации.

Сравнительный анализ кривых (рис. 5) позволяет говорить о том, что ПН бедренных костей крыс, находившихся в условиях продолжительной гипокинезии, имели меньшую амплитуду, чем у контрольных животных. В представленном примере амплитуда ПН при нагрузках I, II и III степени после гипокинезии составляла лишь 63, 65 и 77 % соответствующего показателя контрольных животных.

Различия значений ПН между контрольными и опытными крысами были наиболее выражены при нагрузках I и II степени. Общая закономерность увеличения амплитуды ПН при возрастании степени нагрузки на бедренную кость, была характерна как для контрольных, так и для опытных животных. Однако у крыс, которые подвергались воздействию гипокинезии, темпы

прироста амплитуды ПН были всегда меньше. Электрический потенциал, приходящий на единицу нагрузки I, II и III степени у животных опытной группы был на 20–25 % меньше, чем у контрольных (рис. 5).

На рис. 6 и рис. 7 представлены средние значения амплитуд ПН и величин электрического потенциала, приходящихся на единицу нагрузки, полученные при исследовании бедренных костей животных контрольной и опытной групп.

Средняя амплитуда ПН у контрольных крыс составила  $720,0 \pm 89,5$ ,  $1102,6 \pm 10,8$  и  $1537,6 \text{ мкВ} \pm 189,6 \text{ мкВ}$ , а у опытных –  $456,8 \pm 54,5$ ,  $812,8 \pm 83,6$  и  $1287,7 \text{ мкВ} \pm 173,1 \text{ мкВ}$  соответственно при нагрузках I, II и III степени. Статистический анализ показал, что при нагрузках I и II степени различия в амплитуде ПН между животными контрольной и опытной групп были достоверными ( $P < 0,05$ ). Средние значения электрического потенциала, приходящихся

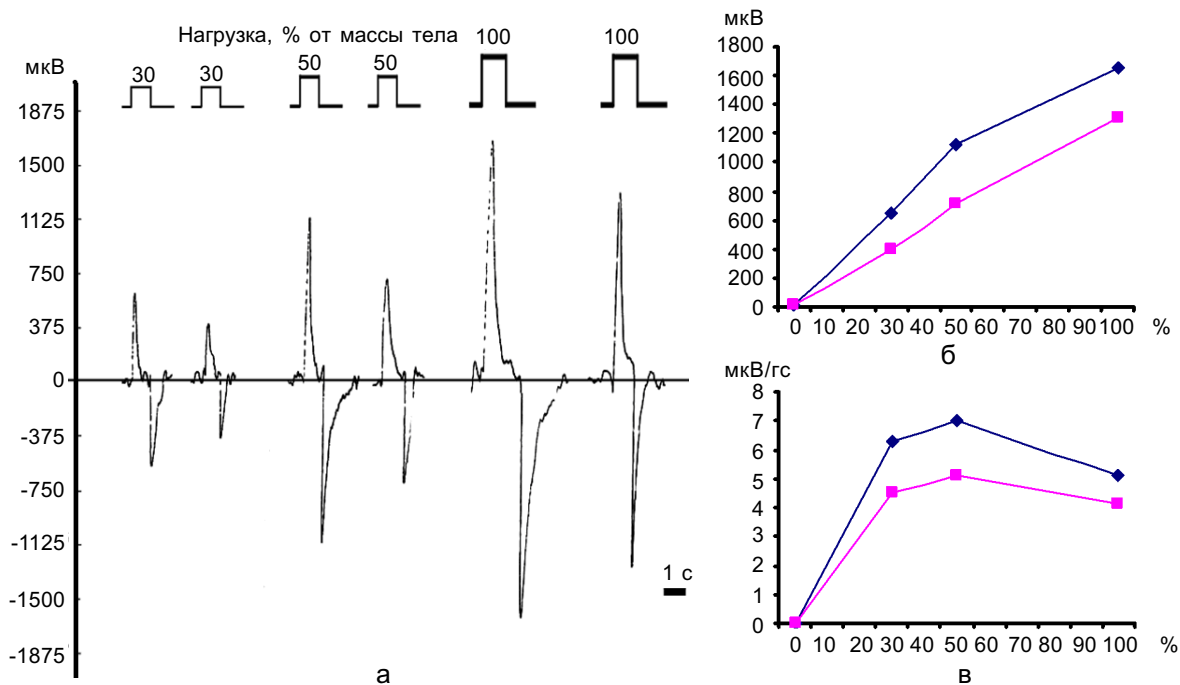


Рис. 5. Пример регистрации (а) потенциалов нагрузки бедренной кости крыс в контроле и после 28-суточной гипокинезии при механических воздействиях, соответствующих 30, 50 и 100 % от массы тела. На б – нормализованная амплитуда потенциала нагрузки, в – изменение потенциала на единицу нагрузки

на единицу нагрузки, у опытных животных при нагрузках I – II степени были на 36,7–35,5 % ( $P < 0,05$ ) меньше, чем у контрольных. При нагрузках III степени достоверных различий в амплитуде ПН и значений потенциала, приходящейся на единицу нагрузки, между контрольными и опытными животными установлено не было.

Уже первые исследования биоэлектрических потенциалов, возникающих в кости при механической нагрузке, показали, что их характер значительно варьирует в зависимости от частоты, величины и длительности деформирующего воздействия. Однако каких-либо четких закономерностей установлено не было. Результаты наших исследований свидетельствуют о том, что амплитуда ПН бедренной кости крысы в значительной степени определяется величиной этой нагрузки. Однако существует определенный оптимум нагрузки, обеспечивающий максимальный прирост величины ПН. Он соответствует уровню стереотипных функциональных нагрузок (30–50 % от массы тела).

Электрические потенциалы, возникающие в кости при функциональной нагрузке, рассматриваются в качестве одного из важнейших мессенжеров, обеспечивающих ее связь с процессами физиологической перестройки кости [2, 14]. В настоящее время большинство исследователей разде-

ляет мнение о том, что в механизме генерации ПН в сухой кости доминирующую роль играют пьезоэлектрические явления, а во влажной – электрокинетические (потенциал протекания – ПП) [9, 17–19]. ПП представляет собой разность потенциалов, возникающую в неоднородной системе при движении ее фаз относительно друг друга под действие каких-либо сил. В костной ткани ПП возникает вследствие переориентации диполей диффузионного слоя жидкости относительно двойного электрического слоя стенки костных полостей под действием разности гидростатического давления, связанной с изменением механической нагрузки [11]. Подтверждением электрокинетической природы ПН служит его зависимость от электропроводности, вязкости, а также состава жидкости, находящейся в кости [19, 22]. Важную роль в возникновении электрокинетических явлений в кости отводят органической составляющей костного матрикса, в первую очередь – коллагену [8]. В пользу этого говорит тот факт, что ПН обнаруживаются не только в костях, но в сухожилиях и хрящах [9], а дегенерация протеогликанов и коллагеновых фибрилл внеклеточного матрикса кости приводит к изменению ПН [7, 10]. Тесная связь электрокинетических явлений с процессами поляризации и электропроводности

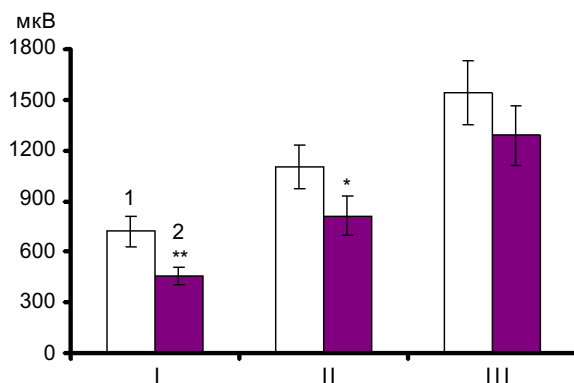


Рис. 6. Амплитуда потенциала бедренной кости крысы в контроле (1) и после гипокинезии (2) при различных нагрузках: I – 30 %, II – 50 %, III – 100 %

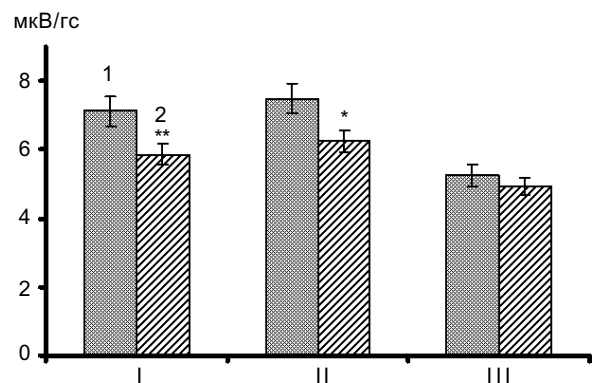


Рис. 7. Величина прироста потенциала бедренной кости крысы в расчете на 1 г различной нагрузки в контроле (1) и после гипокинезии (2): I – 30 %, II – 50 %, III – 100 %

биологических систем является важным биофизическим обоснованием зависимости ПН от пассивных электрических свойств кости [7, 10, 19].

Как было отмечено выше, ПН отводят значительную роль в физиологии и патологии костной ткани. Считают, что он отражает не только особенности движения жидкости в лакуно-каналикулярной системе, но участвует в поддержании гомеостаза и контроле ионного обмена между различными отделами кости [23]. Полагают, что ПН является важнейшим источником информации для костных клеток о состоянии и структуре костного матрикса и изменений биомеханической нагрузки на кость [12, 13]. Существующие данные литературы свидетельствуют о том, что биоэлектрические механизмы участвуют не только в процессах физиологической перестройки, но и репаративной регенерации кости [4, 8].

Поскольку электрокинетические явления, тесно связаны с процессами поляризации и электропроводности кости, несомненный интерес представляет комплексное исследование патофизиологических и биофизических закономерностей изменений потенциала нагрузки и пассивных электрических свойств кости в различных статокINETических условиях.

## ВЫВОДЫ

1. Электрический потенциал, возникающий на поверхности бедренной кости крысы при механических воздействиях, возрастает в экспоненциальной зависимости от прилагаемого усилия. Наибольший прирост электрического потенциала на единицу нагрузки обеспечивают воздействия, соответствующие уровню стереотипных функциональных нагрузок.

2. Развитие гипокINETической остеопении в условиях жесткого ограничения подвижности крысы сопровождается уменьшением электрического потенциала при

всех режимах механической нагрузки на кость.

3. Снижение уровня биоэлектрической регуляции физиологической перестройки кости вследствие уменьшения потенциала нагрузки, может быть одной из причин низкой эффективности стандартных физических нагрузок при развитии возрастной остеопении и замедленного восстановления костной ткани в периоде последствий гипокINETИИ.

**O.M.Levashov, B.A.Berezovskii, M.I.Levashov, S.L.Saphonov**

## THE STRESS GENERATED POTENTIAL IN RATS' FEMUR AT THE DIFFERENT MODES OF MECHANICAL LOADING

It was studied the stress generated potential (SGP) of moist femur bones of 24 Vistar rats-males in normo- and hypokinesia conditions. The mechanical loading on bone was evened 30-50 and 100% from animal body mass. The mechanical pressure was carried out in axial direction. The rats stay in hard hypokinesia for 28 days. In all experiments Ag-AgCl with a salt bridge from 0,9% NaCl in 2% agar were utilized (Cochran G.V. et al., 1989). It was set that amplitude of electric potential which arises up in bones at the mechanical loading depends on the level of this loading. However there is a certain optimum of the mechanical loading which provides the maximal increase of SGP. This optimum is in the range of physiology level of loadings. At development of hypokinetic osteopenia SGP diminished most substantially in the range of physiology level loadings also. It may be one of reasons of low efficiency of the physical loadings at development age-old osteopenia and slow renewal of bone tissue after hypokinesia.

*O.O.Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beck D.R., Qin Y.X., NeLeod K.J., Otter M.W. On relationship between streaming potential and strain in an in vivo bone preparation//*Calcif. Tissue Int.* –2002. – **71**(4). – P.335–343.
2. Chilberg P.D., Sale D.G., Webber C.E. Exercise and bone mineral density//*Sports Med.* – 1995. – **19**(2). – P.103–122.
3. Cochran G.V.B., Dell D.G., Palmiery V.R. et al. An improved desing of ektrodes for measurement of streaming potentials on wet bone in vitro and in vivo//*J. Biomechanics.* – 1989. – **22**(6/7). – P.745–750.
4. Cochran G.V., Wu D.D., Lee B.Y. et al. Streaming po-

- tentials in gap osteotomy callus and adjacent cortex. A pilot study//Clin. Orthop. Relat. Res. – 1997. – **337**. – P.291–301.
5. Fukuda S., Iida H. Age related changes in bone mineral density, cross-sectional area and the strength of long bones in the hind limbs and first lumbar vertebra in female Wistar rats//J. Vet. Med. Sci. – 2004. – **66**(7). – P.755–760.
  6. Goodship A.E., Cunningham J.L., Kenwright J. Strain rate and timing of stimulation in mechanical modulation of fracture healing//Clin. Orthop. Relat. Res. – 1998. – **355**, Suppl. – P.105–115.
  7. Gu W.Y., Mao X.G., Rawlins B.A. et al. Streaming potential of human lumbar annulus fibrosus is anisotropic and affected by disc degeneration //J. Biomech. – 1999. – **32**(11). – P.1177–1182.
  8. Guzelsu N., Walsh W.R. Streaming potential of intact wet bone//J. Biomech. – 1990. – **23**(7). – P.673–685.
  9. Hastings G.W., Mahmud F.A. Electrical effects in bone//J. Biomach. Eng. – 1998. – **10**(6). – P.515–521.
  10. Legare A., Garon M., Guardo R. et al. Detection and analysis of cartilage degeneration by spatially resolved streaming potential//J. Orthop. Res. – 2002. – **20**(4). – P.819–826.
  11. Li D., Chen H., Wang Z. Mechanical response numerical analysis of bone tissue based on liquid saturated biphasic porous medium model //Sheng Wu Yi Xue Gong Cheng Xue Za Zhi. – 2004. – **21**(3). – P.381–386.
  12. MacGinitie L.A., Seioz K.G., Otter M.V., Cochran G.V. Streaming potential measurements at low ionic concentrations reflect bone microstructure//J. Biomech. – 1994. – **27**(7). – P.969–978.
  13. Mak A.F., Zhang J.D. Numerical simulation of streaming potentials due to deformation-induced hierarchical flows in cortical bone//J. Bimech. Eng. – 2001. – **123**(1). – P. 66–70.
  14. McDonald F. Electrical effects at the bone surface//Europ. J. Orthods. – 1993. – **15**. – P.175–183.
  15. Nanaka S.V., Sun H.B., Yokota H. Bone formation induced by novel form of mechanical loading on joint tissue//Biol. Sci. Space. – 2004. – **18**(2). – P.41–44.
  16. Otter M., Shoenung J., Williams W.S. Evidence for different sources of stress-generated potentials in wet and dry bone// J. Orthop. Res. – 1985. – **3**(3). – P.321–324.
  17. Otter M., Goheen S., Williams W.S. Streaming potentials in chemically modified bone//J. Orthop. Res. – 1988. – **6**(3). – P.346–359.
  18. Otter M.W., Palmieri V.R., Cochran G.V. Transcortical streaming potentials are generated by circulatory pressure gradients in living canine tibia//Ibid. – 1990. – **8**(1). – P.119–126.
  19. Otter M.W., Palmieri V.R., Wu D.D. et al. A comparative analysis of streaming potentials in vivo and in vitro//Ibid. – 1992. – **10**(7). – P.710–719.
  20. Pollack S.R., Salzstein R., Pienkowski D. The electric double layer in bone and its influence on stress-generated potentials//Calcif. Tissue Int. – 1984. – **36**, Suppl 1. – P.77–81.
  21. Qin Y.X., Lin W., Rubin C. The pathway of bone fluid flow as defined by in vivo intramedullary pressure and streaming potential measurements//Ann. Biomed. Eng. – 2002. – **30**(5). – P.693–702.
  22. Walsh W.R., Guzelsu N. Ion concentration effects on bone streaming potentials and zeta potentials//Biomaterials. – 1993. – **14**(5). – P.331–336.
  23. Walsh W.R., Guzelsu N. Electrokinetic behavior of intact wet bone: compartmental model//J. Orthop. Res. – 1991. – **9**(5). – P.683–692.

*Ин-т фізіології ім. А.А. Богомольця НАН України, Київ*  
*E-mail: levashov@biph.kiev.ua*