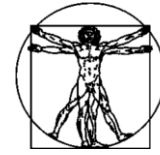


DOI: 10.15593/RZhBiomech/2019.2.06
УДК 531/534: [57+61]



**Российский
Журнал
Биомеханики**
www.biomech.ru

СРАВНИТЕЛЬНАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА МЕТОДОВ АТТЕСТАЦИИ ДЕФОРМИРОВАННОЙ МИКРОСТРУКТУРЫ ТРАБЕКУЛЯРНОЙ КОСТНОЙ ТКАНИ

М.В. Гилев^{1,3}, Д.В. Зайцев^{2,3}, М.Ю. Измоденова¹, Д.В. Киселева⁴, В.И. Силаев⁵

¹ Уральский государственный медицинский университет Минздрава Российской Федерации, Россия, 620028, Екатеринбург, ул. Репина, 3, e-mail: gilevmikhail@gmail.com

² Уральский Федеральный университет имени первого Президента России Б.Н. Ельцина, Россия, 620002, Екатеринбург, ул. Мира, 19, e-mail: dmitry.zaytsev@urfu.ru

³ Институт высокотемпературной электрохимии Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 620137, Екатеринбург, ул. Академическая, 20, e-mail: gilevmikhail@gmail.com

⁴ Институт геологии и геохимии Уральского отделения Российской академии наук, Россия, 620016, Екатеринбург, ул. Академика Вонсовского, 15, e-mail: dariakis81@gmail.com

⁵ Институт геологии Коми научного центра Уральского отделения Российской академии наук, Россия, Сыктывкар, 167982, ул. Первомайская, 54, e-mail: silaev@geo.komisc.ru

Аннотация. Анализируются данные микроскопических исследований трабекулярной костной ткани человека. Различия в деформационном поведении обусловлены морфологическими особенностями органического и минерального компонентов экстрацеллюлярного матрикса на всех структурных уровнях иерархической организации костной ткани. Целью работы было определение наиболее информативного метода микроскопического исследования для аттестации деформированной микроструктуры трабекулярной костной ткани в аспекте механизма формирования импрессионного перелома на микроуровне. Исходя из топологии возникновения импрессионных переломов, для исследования забиралась костная ткань латерального мыщелка большеберцовой кости. Все образцы были разделены на две группы: основная ($N = 20, 50,0\%$), в которой каждый образец подвергался одноосному сжатию на разрывной машине; контрольная группа образцов ($N = 20, 50,0\%$) была интактна к методам исследования деформационного поведения. Для аттестации остеоархитектоники применены современные методы визуализации: растровая электронная микроскопия и атомно-силовая микроскопия. Приводится подробное описание деформационного поведения трабекулярной кости при одноосном сжатии как структурная основа импрессионных дефектов. Представлены микрофотографии морфологических изменений при одноосном сжатии на макро-, промежуточном и микроскопическом уровнях организации экстрацеллюлярного матрикса костной ткани. Установлено, что трабекулярная костная ткань представляет пластичный материал на всех уровнях организации экстрацеллюлярного матрикса. Определен морфологический субстрат микроперелома на каждом структурном уровне: макро- (100–200 мкм) уровень – поперечные, продольные и фрагментированные переломы трабекул; мезоскопический (10–50 мкм) – у трабекулы отмечаются интерламеллярные трещины; микроскопический (5–10 мкм) – у ламеллы происходит дезорганизация коллагеновых фибрилл, уменьшение интерфибриллярных промежутков, нарушение

© Гилев М.В., Зайцев Д.В., Измоденова М.Ю., Киселева Д.В., Силаев В.И., 2019

Гилев Михаил Васильевич, к.м.н., доцент кафедры оперативной хирургии и топографической анатомии, заведующий лабораторией медицинского материаловедения и биокерамики, Екатеринбург

Зайцев Дмитрий Викторович, д.ф.-м.н., доцент кафедры физики конденсированного состояния, ведущий научный сотрудник лаборатории медицинского материаловедения и биокерамики, Екатеринбург

Измоденова Мария Юрьевна, студент V курса педиатрического факультета, Екатеринбург

Киселева Дарья Владимировна, к.геол.-мин.н., старший научный сотрудник лаборатории физических и химических методов исследования, Екатеринбург

Силаев Валерий Иванович, д.геол.-мин.н., главный научный сотрудник лаборатории петрографии, Сыктывкар

укладки кристаллов гидроксиапатита и разрушение их связей с коллагеном. Каждый вид исследования уточняет данные других видов микроскопии, ни один из них не может полностью заменить другие.

Ключевые слова: трабекулярная костная ткань, сканирующая электронная микроскопия, атомно-силовая микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Кость человека обладает сложноорганизованной иерархической структурой. Согласно литературным данным, кортикальная кость разрушается за счет образования в ней микротрещин, которые объединяются в макроскопические трещины, тогда как губчатая кость способна под нагрузкой подвергаться сильным необратимым деформациям без образования макроскопических разрушений [8, 15, 17, 19]. Различия в деформационном поведении обусловлены морфологическими особенностями органического и минерального компонентов экстрацеллюлярного матрикса на всех структурных уровнях иерархической организации костной ткани [1–5, 7, 11, 13].

Современные представления о строении костной ткани основываются на результатах микроскопических исследований [9, 18]. Для трабекулярной костной ткани не характерно остеонное строение, которое встречается в кортикальном слое кости. Пучки минерализованных коллагеновых фибрилл укладываются в ламеллы, которые формируют трабекулы – тяжи костного вещества, располагающиеся вдоль вектора функциональной нагрузки. Традиционное изучение окрашенных гистологических срезов методом оптической микроскопии остается наиболее широко применяемой методикой, однако гистологические техники вызывают искажение структур изучаемой ткани, в частности, набухание и деформацию коллагеновых фибрилл, поэтому не могут в полной мере отвечать всем научным вопросам [11].

Растровая электронная микроскопия также требует определенной пробоподготовки, однако позволяет изучать недекальцинированные нативные препараты и исследовать объемные структуры костного матрикса на больших увеличениях. Атомно-силовая микроскопия предоставляет возможность изучать костные ткани без какой-либо предварительной подготовки, с ее помощью можно наблюдать объекты размером в несколько нанометров без искажений. Исходя из вышесказанного, методы растровой электронной и атомно-силовой микроскопии находят все большее научное и практическое применение.

Целью работы было определение наиболее информативного метода микроскопического исследования для аттестации деформированной микроструктуры трабекулярной костной ткани в аспекте механизма его формирования на микроуровне.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследования проведены на образцах трабекулярной костной ткани околоуставной локализации, полученной от 40 трупов мужского ($N = 24$; 60,0%) и женского ($N = 16$; 40,0%) полов, умерших в возрасте от 30 до 50 лет (средний возраст $39,5 \pm 5,6$ г.). Критериями включения являлся возраст умерших от 30 до 50 лет как наиболее соответствующий возникновению импрессионных переломов костей конечностей для отдельных нозологических форм. Критерием исключения являлись видимые макроскопически дегенеративно-дистрофические заболевания суставов. Исходя из особенностей локализации возникновения импрессионных переломов, для исследования забирались фрагменты проксимального отдела большеберцовой кости в области латерального мыщелка ($N = 40$) как наиболее частой локализации импрессионной внутрисуставной травмы [3].

Из костных фрагментов были изготовлены цилиндры высотой 6 мм и диаметром 6 мм. Все образцы были разделены на две группы: основная ($N = 20, 50,0\%$), в которой каждый образец подвергался одноосному сжатию на разрывной машине *Shimadzu AG-X 50 kN*; контрольная группа образцов ($N = 20, 50,0\%$) была интактна к методам аттестации деформационного поведения. Для исследования микроархитектоники костных образцов обеих групп применялись следующие методы: оптическая микроскопия (компьютеризированный комплекс *OLYMPUS BX51*); растровая электронная микроскопия (*JSM-6400 Jeol*); зондовая атомно-силовая микроскопия (*MultiMode 8, Bruker, США*).

Образцы для изучения методом оптической микроскопии и атомно-силовой микроскопии выдерживались в ацетоне в течение 3 суток с целью удаления компонентов костного мозга. Образцы для растровой электронной микроскопии дополнительно заливали в эпоксидную смолу с последующей шлифовкой и полировкой. В процессе исследования был разработан и внедрен в практику новый способ подготовки поверхности образцов костной ткани для изучения её микроструктуры (Патент РФ № 2668879).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Деформационное поведение образцов при одноосном сжатии было подобно поведению упруго-пластических тел. Образцы были способны выдержать значительную деформацию без разрушения их на части (рис. 1). Испытания останавливали после достижения деформации $\sim 8\%$. Максимальное напряжение, которое достигалось при сжатии образцов, лежало в диапазоне 5–10 МПа. Деформация при максимальном напряжении была примерно 2–3%. Типичная деформационная кривая приведена на рис. 2. На начальном этапе нагружения зависимость деформации от напряжения была линейной. Далее до достижения максимального напряжения следовал нелинейный участок на деформационной кривой. После максимального напряжения, с увеличением деформации, напряжение снижалось, что было связано с разрушением отдельных трабекул [16].

При проведении оптической микроскопии образцов опытной группы визуализировались мультифокальные поперечные фрагментированные переломы трабекул костного вещества, поверхностный рельеф трабекул, образованный пучками коллагеновых фибрилл и кристаллами гидроксиапатита, был сглажен, однако детально исследовать этот процесс не представлялось возможным. В процессе деформации и, как следствие, образования микроперелома на оптическом уровне происходила дезорганизация и компактизация костного матрикса за счет нарушения направления костных трабекул в пространстве, изменения размеров и конфигурации пор.



Рис. 1. Образец после сжатия на 8%

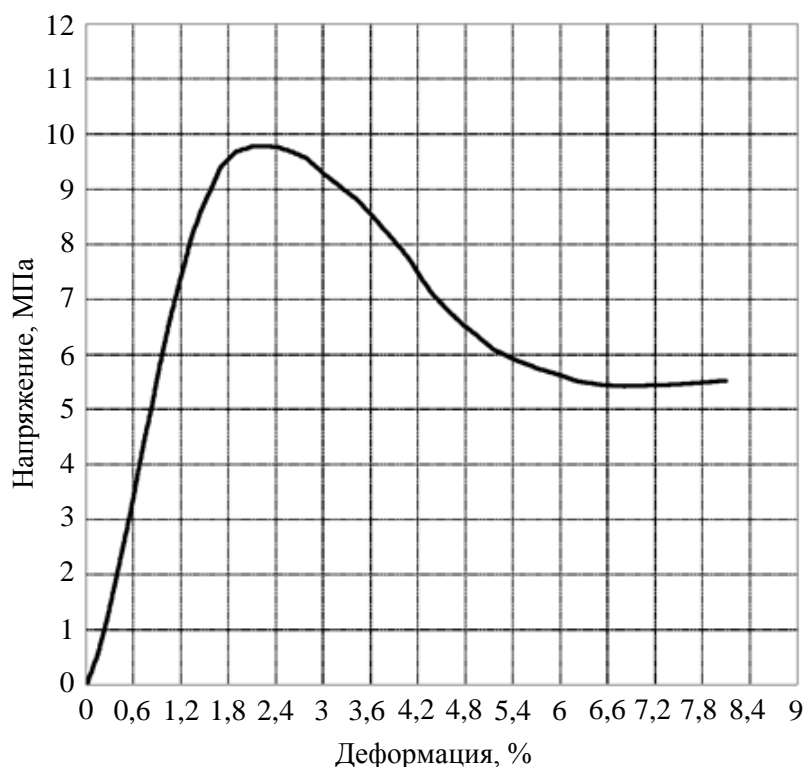


Рис. 2. Типичная деформационная кривая образца из кости при испытании на одноосное сжатие

Исследование образцов группы контроля позволяло увидеть трабекулы костного вещества, их продольные и поперечные размеры, а также ориентацию в пространстве. Хорошо прослеживались размеры, форма и конфигурация пор, в их просвете сохранялись стромальные элементы костного мозга. Микрофотографии образцов основной и контрольной групп при проведении оптической микроскопии представлены на рис. 3.

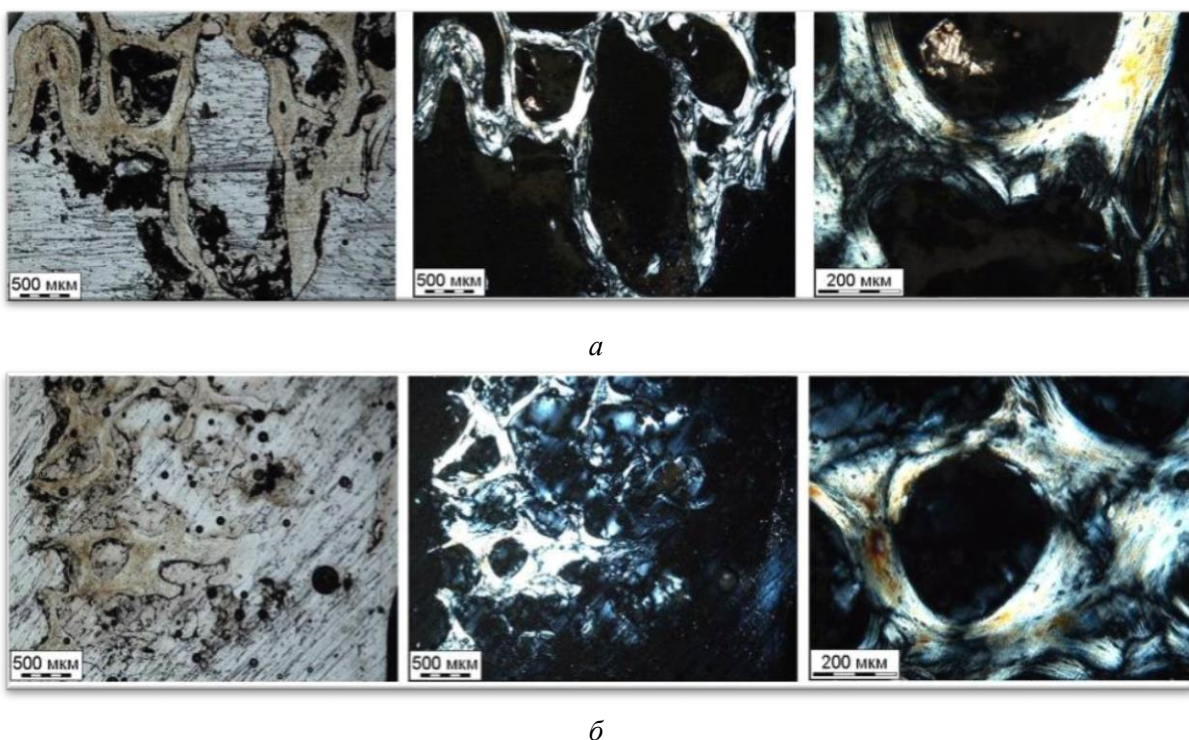


Рис. 3. Оптическая микроскопия: *а* – образец группы контроля; *б* – образец после одноосного сжатия, видны компактизация и дезорганизация костных трабекул

При проведении растровой электронной микроскопии в образцах контрольной группы прослеживались лакуны остеоцитов, ламеллы и отдельные гаверсовы системы. Направление ламелл в трабекуле было неоднородным: в центральной части пластинки костного вещества были расположены продольно, в периферической части лежали поперечно. В основной группе при проведении одноосного сжатия распространение трещин происходило по интерламеллярным промежуткам; были отмечены множественные трещины, идущие вдоль оси нагружения в центральной и периферической частях костной трабекулы. Протяженность трещин варьировалась от нескольких микрометров до тех, что протянулись вдоль всей трабекулы и являлись объединением множественных более мелких трещин, имеющих многочисленные ответвления, за счет которых происходил рост основной трещины. Зародившаяся на периферии поперечная трещина, дойдя до центральной части, изменяла свое направление на продольное в соответствии с расположением ламелл. В крупных трабекулах встречалась укладка костных пластин в виде гаверсовых систем. В этом случае трещины распространялись в радиальном направлении от центрального канала. Микрофотографии образцов основной и контрольной групп при проведении растровой электронной микроскопии представлены на рис. 4.

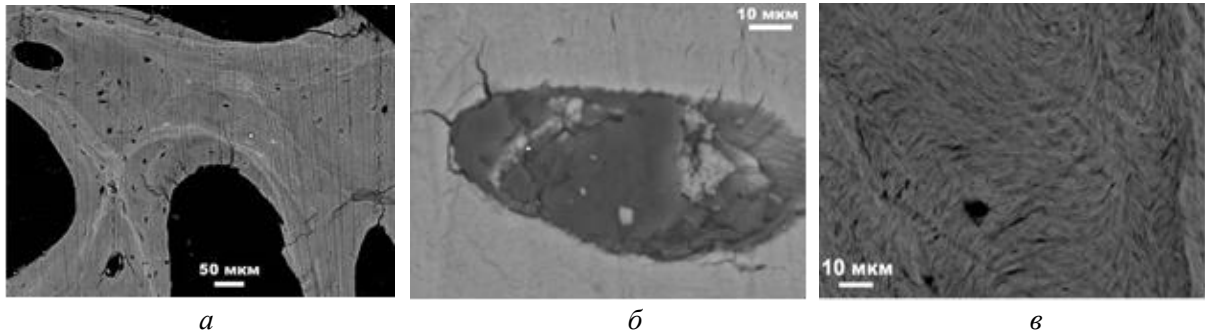


Рис. 4. Растровая электронная микроскопия: *а*, *б* – изображения образца опытной группы в режиме вторичных электронов: *а* – костная трабекула с характерным узором первичных и вторичных трещин; *б* – остеоцитарная лакуна, в которой видно перифокальное радиальное распространение трещин; *в* – участок пластических деформаций с перистой архитектурой, снятых в режиме упруго-отраженных электронов

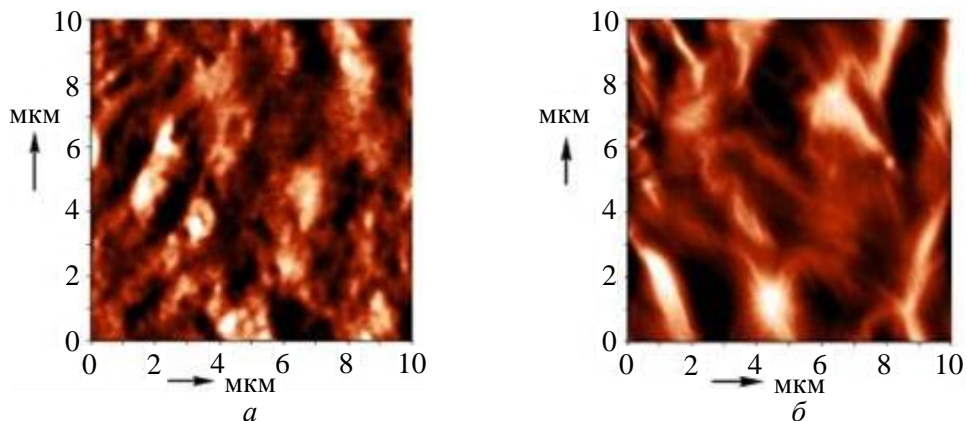


Рис. 5. Атомно-силовая микроскопия: *а* – образец группы контроля (показаны минерализованные фибриллы коллагена, формирующие сетчатую структуру. Прослеживается упорядоченное расположение кристаллов гидроксиапатита пластинчатой формы, четко видны межфибриллярные промежутки); *б* – деформированный образец той же локализации, заметно изменение микроструктуры экстрацеллюлярного матрикса в виде компактизации коллагеновых фибрилл, вызванное одноосным сжатием образца

При проведении атомно-силовой микроскопии в образцах контрольной группы прослеживались волокна коллагена, расположенные ангулярно, между которыми определялись промежутки различной формы, компоненты минерального матрикса присутствовали в виде упорядоченных ромбовидных пластинок, прочно связанных с коллагеном. В основной группе наблюдались дезорганизация коллагеновых фибрилл и объединение отдельных волокон в более крупные аморфные конгломераты. Кристаллы гидроксиапатита, покрывающие коллагеновые волокна, приобретали аморфный вид. Также изменялась конфигурация пространств между пучками коллагена: несколько более мелких пространств, отграниченных друг от друга и имеющих сложную конфигурацию, сливались в одно более крупное, утрачивающее свою первоначальную форму. Микрофотографии образцов основной и контрольной групп при проведении растровой электронной микроскопии представлены на рис. 5.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Оптическая микроскопия. В доступной литературе приводятся описания гистологических препаратов трабекулярной костной ткани с посттравматическими изменениями структуры, изученными под оптическим микроскопом. Морфометрические изменения характеризуются уменьшением площади костных балок и нарушением целостности костных лакун. Трабекулы значительно утолщены, межзеренные пространства содержат фиброретикулярную ткань. Сохранены лишь отдельные локусы костного мозга [7].

Растровая электронная микроскопия. Данный метод позволяет оценить размеры пор, форму и направление трабекул, выявить их разрушения, оценить структуры костного коллагена. Показано, что поврежденные участки костных тканей уплотнены, имеют меньшие размеры костных ячеек (пор). Костная ткань, в отличие от «нормы», плотно упакована, имеет неупорядоченное строение, четко прослеживаются фрагменты разрушения костного вещества с кистозными образованиями. В образцах с кистами обнаружены костные трабекулы с трещинами, наблюдается увеличение размеров костных лакун, губчатое вещество местами уплотнено, местами становится более пористым [2, 8, 11].

На серии изображений с увеличением от 330 до 13 000 хорошо визуализируются структурные особенности костной трабекулы. Направления пучков волокон костного коллагена изменяются в зависимости от зоны трабекулы. Видно, что сходящиеся из трех направлений тяжи костного коллагена у основания трабекулы переплетаются в одно направление по мере перехода в тело. На изображениях с большим увеличением отмечаются множественные трещины и участки разволокнения в пучках костного коллагена. В переходной зоне трабекулы определяются фрагментарные микропереломы с частичной отслойкой поверхностного слоя трабекулы [3, 6, 13].

Атомно-силовая микроскопия. Согласно литературным данным, в минерализованных фибриллах кристаллы образуют цепочки, состоящие из структур пластинчатой формы. Стыкуясь край в край, они часто формируют более крупные пластинки, которые образованы несколькими кристаллами и иногда выступают в межфибрилярное пространство. Другая форма гидроксиапатита представлена эллипсоидными (некоторые авторы описывают их как веретенновидные) кристаллами [4]. Морфологическую основу повреждений составляют связи между структурами минерального матрикса. На уровне кристаллитов – это гидратный слой, обеспечивающий их соединение, а на уровне объединений минералов – это минеральные связи между ними [1].

Исследование органического матрикса методом атомно-силовой микроскопии показало, что фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядят поперечно исчерченными с периодом 67 нм, который включает одну темную и одну светлую полосы, с диаметром в среднем 100 нм. При этом у лиц с патологией соединительной ткани исследователи наблюдали, что сопоставимые измерения длины и поперечника коллагеновых волокон сильно варьировались с увеличением промежутка между волокнами до 98 нм (в среднем 84 нм) и уменьшением поперечного размера волокон до 40 нм (в среднем 56 нм) [5]. Другая группа авторов характеризует микроскопическую картину следующим образом: «Наблюдаются разрушение белкового матрикса и последующие изменения в упаковке коллагеновых волокон. Хорошо видна перестройка коллагеновых волокон из сетчатого вида с волокнами толщиной 1–2 мкм в плотные ориентированные структуры значительной толщины (3–7 мкм)» [7].

Выводы

1. Трабекулярная костная ткань представляет собой пластичный материал на всех уровнях организации экстрацеллюлярного матрикса, ее анизотропные свойства проявляются в виде накопления микропереломов и трещин.

2. Определен морфологический субстрат микроперелома на каждом структурном уровне: макроскопический (100–200 мкм) уровень – поперечные, продольные и фрагментированные переломы трабекул; мезоскопический (10–50 мкм) – у трабекулы отмечаются интерламеллярные трещины; микроскопический (5–10 мкм) – у ламеллы происходит дезорганизация коллагеновых фибрилл, уменьшение интерфибриллярных промежутков, нарушение укладки кристаллов гидроксиапатита и разрушение их связей с коллагеном.

3. Каждый вид исследования дополняет и уточняет данные других видов микроскопии, ни один из них не может полностью заменить другие.

Благодарности

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 18-38-20097.

Конфликт интересов

Конфликт интересов отсутствует.

Список литературы

1. Аврунин А.С., Паршин Л.К., Докторов А.А. Взаимосвязь морфологических характеристик фибриллярной организации костного матрикса и его механических свойств с позиций теории слабого звена // *Гений ортопедии*. – 2014. – № 4. – С. 81–88.
2. Воробьев К.А., Лабутин Д.В., Божкова С.А. Влияние методов очистки и стерилизации на структуру и биологическую совместимость костнопластических материалов на основе губчатой кости в эксперименте *in vitro* // *Материалы XI Всерос. съезда травматологов-ортопедов*, 11–13 апреля 2018. – СПб., 2018. – Т. 1. – С. 60–63.
3. Гилев М.В., Зайцев Д.В., Киселева Д.В., Измоденова М.Ю. К вопросу о патомеханике внутрисуставных импрессионных переломов костей конечностей // *Российский журнал биомеханики*. – 2018. – Т. 22, № 2. – С. 154–165.
4. Голованова О.А., Герк С.А. Механизм развития коксартроза на макро-, микро- и молекулярных уровнях костных тканей человека // *Вестник Кольского научного центра Рос. акад. наук*. – 2017. – № 4. – С. 37–43.

5. Давыдов Д.А. Особенности морфологического строения и процессов ремоделирования костной ткани головки бедра при деформирующем артрозе различного генеза // Политравма. – 2015. – № 2. – С. 83–89.
6. Коршунов А.С., Московский С.Н., Конев В.П., Шестель И.Л., Серов Д.О., Шишкина Ю.О., Субоч А.В., Марковский С.О. Исследование минерального компонента и органического матрикса костной ткани с использованием метода атомно-силовой микроскопии // Практическая медицина. – 2018. – № 1 (112). – С. 168–172.
7. Кузнецова Т.Г. Наноструктурная организация минерального матрикса костной ткани // Проблемы здоровья и экологии. – 2008. – Т. 5, № 2. – С. 40–44.
8. Fyhrie D.P., Schaffler M.B. Failure mechanisms in human vertebral cancellous bone // Bone. – 1994. – Vol. 15, № 1. – P. 105–109.
9. Han S.W., Tamaki T., Adachi T. A novel osteoblast/osteocyte selection method in primary isolated chick bone cells by atomic force microscopy // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2015. – Vol. 15, № 5. – P. 3923–3927.
10. Kang D.J., Lee S.J., Na J.E., Seong M.J., Yoon S.Y., Jeong Y.W., Ahn J.P., Rhyu I.J. Atmospheric scanning electron microscopy and its applications for biological specimens // Microscopy Research and Technique. – 2018. – Vol. 82, № 1. – P. 53–60.
11. Kim G.J., Yoo H.S., Lee K.J., Choi J.W., Hee A.J. Image of the micro-computed tomography and atomic-force microscopy of bone in osteoporosis animal model // Journal of Nanoscience and Nanotechnology. – 2018. – Vol. 18, № 10. – P. 6726–6731.
12. Koga D., Kusumi S., Shodo R., Dan Y., Ushiki T. High-resolution imaging by scanning electron microscopy of semithin sections in correlation with light microscopy // Microscopy. – 2015. – Vol. 64, № 6. – P. 387–394.
13. Koga D., Ushiki T., Watanabe T. Novel scanning electron microscopy methods for analyzing the 3D structure of the Golgi apparatus // Anatomical Science International. – 2017. – Vol. 92, № 1. – P. 37–49.
14. Kusumi S., Koga D., Watanabe T., Shibata M. Combination of a cryosectioning method and section scanning electron microscopy for immuno-scanning electron microscopy // Biomedical Research. – 2018. – Vol. 39, № 1. – P. 21–25.
15. Launey M.E., Buehler M.J., Ritchie R.O. On the mechanistic origins of toughness in bone // Annual Review of Materials Research. – 2010. – Vol. 40. – P. 25–53.
16. Oftadeh R., Perez-Viloria M., Villa-Camacho J.C., Vaziri A., Nazarian A. Biomechanics and mechanobiology of trabecular bone: a review // The Journal of Biomechanical Engineering. – 2015. – Vol. 137, № 1. – P. 1–15.
17. Peterlik H., Roschger P., Klaushofer K., Fratzl P. From brittle to ductile fracture of bone // Nature Materials. – 2006. – Vol. 5. – P. 52–55.
18. Timashev P.S., Koroleva A.V., Konovalov N.A., Kotova S.L., Solovieva A.B. Atomic force microscopy of tissue sections is a useful complementary tool in biomedical morphological studies // Modern Technologies in Medicine. – 2018. – Vol. 10, № 1. – P. 70–80.
19. Wegst U.G.K., Bai H., Saiz E., Tomsia A.P., Ritchie R.O. Bioinspired structural materials // Nature Materials. – 2015. – Vol. 14. – P. 23–36.

COMPARATIVE CHARACTERISTIC OF THE METHODS OF CERTIFICATION OF DEFORMED MICROSTRUCTURE OF TRABECULAR BONE TISSUE

**M.V. Gilev, D.V. Zaitsev, M.Yu. Izmodenova, D.V. Kiseleva (Yekaterinburg, Russia),
V.I. Silaev (Syktyvkar, Russia)**

The article analyzes the data of microscopic studies of human trabecular bone tissue. Differences in the deformation behavior are due to the morphology of the organic and mineral components of the extracellular matrix at all structural levels of the hierarchical organization of bone tissue. The purpose of the work was to determine the most informative microscopic method for certifying the deformed microstructure of trabecular bone tissue in terms of the mechanism of its formation at the microlevel. Proceeding from the localization of the appearance of impression fractures, the bone tissue of the lateral condyle of the tibial bone

was taken for examination. All samples were divided into two groups: basic ($N = 20$, 50.0%), in which each sample was subjected to uniaxial compression; the control group ($N = 20$, 50.0%) was intact to the methods of studying the deformation behavior. For the certification of osteoarchitecture, modern visualization methods are applied: raster electron microscopy and atomic force microscopy. A detailed description is given of the deformation behavior of trabecular bone under uniaxial compression as the morphological substrate of impression defects. Photos of morphological changes during uniaxial compression are presented at the macroscopic, intermediate, and microscopic levels of organization of the extracellular matrix of bone tissue. It is established that trabecular bone tissue is a plastic material at all levels of the organization of the extracellular matrix. The morphological substrate of microfracture was determined at each structural level: macroscopic (100–200 μm) level – transverse, longitudinal, and fragmented trabeculae fractures; mesoscopic (10–50 μm) – interlamellar cracks observed in trabeculae; microscopic (5–10 μm) – the lamella is disorganized by collagen fibrils, the interfibrillar gaps are reduced, the hydroxyapatite crystals are disrupted and their bonds with collagen are destroyed. Each type of research complements data from other types of microscopy, none of them can completely replace the others.

Key words: trabecular bone tissue, raster electron microscopy, atomic force microscopy.

Получено 19 апреля 2019