

ИССЛЕДОВАНИЕ МИНЕРАЛЬНОГО КОМПОНЕНТА И ОРГАНИЧЕСКОГО МАТРИКСА КОСТНОЙ ТКАНИ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ МЕТОДОВ АТОМНО-СИЛОВОЙ МИКРОСКОПИИ

В. П. Конев¹, С. Н. Московский¹, И. Л. Шестель¹, Ю. О. Шишкина¹, А. С. Коршунов²

¹Кафедра судебной медицины, правоведения ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Омск

²Кафедра челюстно-лицевой хирургии ФГБОУ ВО «Омский государственный медицинский университет» Минздрава РФ, Омск

Аннотация: В работе впервые предложен комплекс показателей, определяющих качество костной ткани, уже достаточно представленный в клинических медицинских специальностях. Применение этого комплекса позволит прийти к более однозначным оценкам возрастных критериев костной ткани, более четко оценивать костную ткань при системной патологии соединительной ткани.

Ключевые слова: минеральный компонент и органический матрикс костной ткани, коллаген, атомно-силовая микроскопия

INVESTIGATION OF THE MINERAL COMPONENT AND ORGANIC MATRIX OF BONE TISSUE USING METHODS OF ATOMIC-POWER MICROSCOPY

V. P. Konev, S. N. Moscovskiy, I. L. Shestel, Yu. O. Shishkina, A. S. Korshunov

Abstract: In this work, for the first time, a set of indicators determining the quality of bone tissue, already sufficiently presented in clinical medical specialties, is proposed. The use of this complex will bring better quality indicators of bone age, allowing more accurate assessment of bone tissue in systemic pathology of connective tissue.

Keywords: mineral component and organic matrix of bone tissue, collagen, atomic force microscopy

<http://dx.doi.org/10.19048/2411-8729-2018-4-1-22-25>

◇ ВВЕДЕНИЕ

Фундаментальные исследования, включающие микроскопическое исследование костной ткани с оценкой компактного и губчатого вещества, гистологическими исследованиями кости, оставляют многочисленные нерешенные вопросы. Большинство их связано в основном с недостаточным исследованием пространственной организации костной ткани, в то время как результаты изучения соотношения органического и минерального матрикса, особенностей организации минеральных частиц и пространственной укладки волокон коллагена способны внести существенный вклад в решение проблемы несовершенного остеогенеза, раннего остеопороза и остеопении, вопросов лечения и профилактики данных патологических процессов.

Цель работы: выработка критериев оценки для идентификационных и комплексных гистологических исследований (атомно-силовая микроскопия, световая микроскопия, денситометрия).

◇ МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Для реализации поставленных задач нами были проведены патоморфологические, рентгенологические и АСМ-исследования (АСМ – атомно-силовая микроскопия). В секционных исследованиях мы прибегали к поиску диагностических критериев остеопении, остеопороза (на фоне дисплазии соединительной ткани, ДСТ), при этом были использованы как скрининговые, так и клинические методы исследования. Основной задачей патоморфологических исследований было выявление качественных характеристик костной ткани у лиц с патологией соединительной ткани.

Учитывая тот факт, что морфологические исследования у лиц с ДСТ крайне затруднены, были проведены исследования на трупах погибших от несчастных случаев с последующим анализом медицинских документов. Нами обследовано 130 трупов лиц обоего пола в возрасте от 20 до 40 лет с признаками дисплазии соединительной ткани. Группу сравнения составили 64 секционных наблюдения погибших без ДСТ.

Для морфологического исследования было проведено прицельное исследование архивного биопсийного и операционного материала в количестве 120 у лиц в возрасте от 20 до 59 лет.

Морфологическому исследованию подвергались фрагменты плоских (нижняя челюсть) и трубчатых костей (бедренная кость).

В ходе исследования на базе секции «Оборудование и технологии сварочного производства» Омского государственного технического университета использовался полировально-шлифовальный станок Neris со шлифовальными кругами HERMES с разной степенью зернистости и полировальными кругами с алмазной суспензией Akasel разного количества микрон. Отсмотр образцов осуществлялся на оптическом микроскопе Olympus CX 41 с увеличением $\times 1000$, при этом изучалось микроскопическое строение костной ткани.

Костную ткань распиливали на блоки размером от 0,008 до 0,125 см³, которые помещали в 2% раствор натрия хлорида и проводили высаливание белков, форменных элементов крови и частиц жира из трабекул костной губчатой ткани в течение 24–48 часов. Далее промывали блоки водой, осуществляли гидролиз в 2% растворе гидроксида натрия в течение 24–48 часов, после

чего гидролизат сливали, а блоки промывали водой при постоянном помешивании до полной нейтрализации гидроксида натрия, помещали блоки в 3–4 % раствор перекиси водорода на 10–16 часов, промывали блоки дистиллированной водой. Затем в течение 48–72 часов осуществляли обезжиривание блоков в смеси хлороформа с этанолом, взятых в соотношении 2:1, после чего блоки промывали дистиллированной водой при постоянном помешивании, затем прогревали, равномерно повышая температуру от 600 до 1200 °С, и дополнительно прогревали при 1200–1300 °С в течение 2–5 минут.

Также технический результат достигался за счет использования для замещения и восстановления костных дефектов костного минерального компонента, полученного в соответствии с вышеописанным способом и выполненного в виде блоков или крошки.

Полученный таким образом костный минеральный компонент использовали в виде блоков или измельчали до получения костной крошки с размером частиц 700–2000 мкм, фасовали в стеклянные флаконы и стерилизовали потоком быстрых электронов. Ультраструктурное строение изучалось на базе кафедры прикладной и медицинской физики Омского государственного университета, с использованием сканирующего зондового микроскопа SolverPro (NT-MDT, Россия). Анализ образцов АСМ-изображения осуществлялся с использованием программного модуля обработки изображений Image Analysis (NT-MDT).

◇ РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Основу костного матрикса образуют коллагеновые фибриллы и аморфное вещество, которые подвергаются процессу минерализации в виде округлых пластин со средней шириной 5–6 мкм, длиной 6–8 мкм, высотой 100–120 нм. При зондовой микроскопии костной ткани видно, что молекулы коллагена не связаны между собой «конец в конец», а между ними имеется промежуток в 35–40 нм. Предполагается, что в костной ткани эти промежутки выполняют роль центров минерализации. В пластинчатой костной ткани более 65 % общей массы приходится на внутри- и межфибриллярные минеральные отложения, которые сформированы кристаллами гидроксиапатита. Форма и размеры этих мелких пластинок значительно варьируют. Встречаются варианты овальной, ромбической, треугольной и веретеновидной формы. Наиболее характерными оказались два варианта, различающиеся особенностями морфологии и пространственной ориентации минеральных отложений. Первый вариант представлен чешуевидными пластинками неправильной формы, которые стыкуются или налегают друг на друга. Их размеры показывают следующие средние значения: ширина 35–70 нм, длина 170–220 нм, толщина 3–8 нм. Однако на малых полях сканирования хорошо видно, что между ними встречаются минеральные композиты значительно меньших размеров. Это указывает, что в составе отдельных пластинок различимы более мелкие составляющие компоненты в виде округлых минеральных частиц диаметром 14–15 нм и толщиной 1–2 нм, объединения которых и приводят, по-видимому, к формированию пластинок следующих размерных классов.

Второй вариант организации минерального компонента представлен в виде вытянутых веретеновидных кристаллов, ориентированных параллельно друг другу. На отдельных участках они формируют короткие плоские пучки шириной 0,4–0,8 мкм и длиной 1–2 мкм, имеющие ромбовидную форму. Отчетливо прослеживаются длинные веретеновидные или цилиндрические минеральные композиты размером (200–500)×(15–50)×(10–20), ориентированные параллельно друг другу. На больших пло-

щадях сканирования в этих зонах регистрируются ряды длинных, параллельно лежащих волокон с диаметром 50–100 нм, которые представляют собой минеральный каркас коллагеновых фибрилл.

Исследование органического матрикса методом атомно-силовой микроскопии показало, что фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядят поперечноисчерченными с периодом 67 нм, который включает одну темную и одну светлую полосы, с диаметром в среднем 100 нм. Зарегистрированная толщина предполагает наложение и/или объединение двух или более пластин. Подобный механизм формирования и роста минеральных объединений приводит к образованию первого варианта минеральных частиц. Его описание преобладает в литературе и представляется в виде стыкующихся пластинок неправильной формы или чешуек. Анализ полученных в представленной работе АСМ-изображений позволяет предположить, что такие объединения кристаллов соответствуют минерализованному аморфному веществу на сформированных участках костной поверхности. Считают, что такое строение максимально повышает сопротивление всего агрегата растягивающим нагрузкам.

При этом у лиц с патологией соединительной ткани мы наблюдали, что сопоставимые измерения длины и поперечника коллагеновых волокон сильно варьировали, с увеличением промежутка между волокнами до 98 нм (в среднем 84 нм) и уменьшения поперечного размера волокон до 40 нм (в среднем 56 нм). На определенном уровне структурной организации могут появляться и объединения второго морфологического варианта – в виде веретенообразных частиц. Их строгая параллельная ориентация, размеры и анализ взаимного расположения, включая и формирование пучков, позволяют заключить, что эти минеральные компоненты ассоциированы с коллагеновыми фибриллами.

◇ ВЫВОДЫ

Таким образом, минеральные объединения и пространственная архитектура костной ткани дают возможность определения уровня минерализации коллагеновых волокон. При оценке результатов исследования костной ткани видно, что основным различием между группой контроля и пациентами с патологией соединительной ткани (остеопенией, остеопорозом) является наличие пустот, что влечет за собой изменение структуры залегания минеральных элементов кости, изменение формирования объединений кристаллов в виде второго варианта, а также изменение количества минеральных компонентов в единице объема кости. По своему максимальному диаметру и характерному расположению они, вероятнее всего, связаны с поверхностью коллагеновых фибрилл, в которых процесс минерализации еще не завершен (или нарушен).

◇ ЛИТЕРАТУРА

1. Денисов-Никольский Ю. И., Жилкин Б. А., Докторов А. А., Матвейчук И. В. Ультраструктурная организация минерального компонента пластинчатой костной ткани у людей зрелого и старческого возраста // Морфология. – 2002. – Т. 122. – № 5. – С. 79–83.
2. Конев В. П. Современные возможности использования атомно-силовой микроскопии в исследовании плотных тканей человека / В. П. Конев, С. Н. Московский, И. Л. Шестель // Вестник судебной медицины. – Т. 4. – № 2. – 2015 – С. 17–20.
3. Кузнецова Т. Г. Наноструктурная организация минерального матрикса костной ткани / Проблемы здоровья и экологии // Проблемы здоровья и экологии. – № 2 (8). – 2008. – С. 107–112.

4. *Московский С. Н.* Взаимоотношение органического матрикса и минерального компонента в костях и эмали зубов при дисплазии соединительной ткани / В. П. Конев, И. Л. Шестель, А. С. Коршунов, С. Н. Московский, Ю. Ю. Копылова, А. С. Лосев // Сибирский медицинский журнал. – Томск, 2011. – № 2, Т. 26. – С. 77–80.
5. *Московский С. Н.* Качественные показатели костной ткани в диагностике дисплазии соединительной ткани / Автореф. дисс. на соиск. уч. степени канд. мед. наук. – Омск. – 2016. – 22 с.
6. *Fratzl P., Groschner M., Vogl G., Plenck H., Eschberger J., Fratzl-Zelman N. et al.* Mineral crystals in calcified tissues – a comparative study by SAXS. // *J. Bone Miner Res.* – 1992. – № 7. – P. 329–334.
7. *Hassenkam T., Fantner G., Cutroni J.A., Weaver C., Hansma P.K.* High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. // *Bone.* – 2004. – V. 35. – № 1. – P. 4–10.
8. *Jaschouz D., Paris O., Roschger P., Hwang H.S., Fratzl P.* Pole figure analysis of mineral nanoparticle orientation in individual trabecular of human vertebral bone. // *J. Appl. Crystallogr.* – 2003. – V. 36. – P. 494–498.
9. *Kim H.M., Rey C., Glimcher M.J.* Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. // *J. Bone Miner Res.* – 1995. – № 10. – P. 1589–1601.
10. *Kuangshin T., Hang J.Q., Ortis C.* Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. // *J. Materials science: Materials in medicine.* – 2005. – V. 16 – № 8. – P. 1–12.
11. *Landis W.J., Song M.J., Leith A., McEwen L.* Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. // *J. Struct. Biol.* – 1993. – № 110. – P. 39–54.
12. *Landis W.J., Hodgens K.J.* Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. // *J. Struct. Biol.* – 1996. – V. 117. – C. 24–35.
13. *Lees S., Probst K.S., Ingle V.K., Kjoller K.* The loci of mineral in turkey leg tendon as seen by atomic force microscope and electron microscopy. // *Calcif. Tissue Int.* – 1994. – V. 55. – P. 180–189.
14. *Rubin M.A., Jasiuk L., Taylor J, Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P.* TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. // *Bone.* – 2003. – V. 33. – № 3. – P. 270–282.
15. *Su X., Sun K., Cui F.Z., Landis W.J.* Organization of apatite crystals in human woven bone. // *Bone.* – 2003. – V. 32. – № 2. – P. 150–162.
16. *Tong W., Glimcher M.J., Katz J.L., Kuhn L., Eppell S.J.* Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. // *Calcif. Tissue Int.* – 2003. – V. 75. – P. 592–598.
17. *Weiner S.T., Traub W., Wagner D.* Lamellar bone: structure-function relations. // *J. Struct. Biol.* – 1999. – V. 126. – № 3. – P. 241–255.
2. *Konev V.P.* Sovremennyye vozmozhnosti ispol'zovaniya atomno-silovoy mikroskopii v issledovanii plotnykh tkaney cheloveka / V. P. Konev, S. N. Moskovskiy, I. L. Shestel // *Vestnik sudebnoy meditsiny.* – Т. 4. – № 2. – 2015 – S. 17–20. (In Russian)
3. *Kuznetsova T. G.* Nanostruktornaya organizatsiya mineral'nogo matriksa kostnoy tkani / *Problemy zdorov'ya i ekologii // Problemy zdorov'ya i ekologii.* – № 2 (8). – 2008 – S. 107–112. (In Russian)
4. *Moskovskiy S. N.* Vzaimootnosheniye organicheskogo matriksa i mineral'nogo komponenta v kostyakh i emali zubov pri displazii soyedinitel'noy tkani / V. P. Konev, I. L. Shestel», A. S. Korshunov, S. N. Moskovskiy, YU.YU. Kopylova, A. S. Losev // *Sibirskiy meditsinskiy zhurnal.* – Tomsk, 2011.—№ 2, Tom 26. – S. 77–80. (In Russian)
5. *Moskovskiy S. N.* Kachestvennyye pokazateli kostnoy tkani v diagnostike displazii soyedinitel'noy tkani / Avtoref. diss. na soisk. uch. stepeni kand. med. nauk. – Omsk. – 2016. – 22 s. (In Russian)
6. *Fratzl P., Groschner M., Vogl G., Plenck H., Eschberger J., Fratzl-Zelman N. et al.* Mineral crystals in calcified tissues – a comparative study by SAXS. // *J. Bone Miner Res.* – 1992. – № 7. – P. 329–334.
7. *Hassenkam T., Fantner G., Cutroni J.A., Weaver C., Hansma P.K.* High-resolution AFM imaging of intact and fractured trabecular bone. // *Bone.* – 2004. – V. 35. – № 1. – P. 4–10.
8. *Jaschouz D., Paris O., Roschger P., Hwang H.S., Fratzl P.* Pole figure analysis of mineral nanoparticle orientation in individual trabecular of human vertebral bone. // *J. Appl. Crystallogr.* – 2003. – V. 36. – P. 494–498.
9. *Kim H.M., Rey C., Glimcher M.J.* Isolation of calcium-phosphate crystals of bone by non-aqueous methods at low temperature. // *J. Bone Miner Res.* – 1995. – № 10. – P. 1589–1601.
10. *Kuangshin T., Hang J.Q., Ortis C.* Effect of mineral content on the nanoindentation properties and nanoscale deformation mechanisms of bovine tibial cortical bone. // *J. Materials science: Materials in medicine.* – 2005. – V. 16 – № 8. – P. 1–12.
11. *Landis W.J., Song M.J., Leith A., McEwen L.* Mineral and organic matrix interaction in normally calcifying tendon visualized in three dimensions by high-voltage electron microscopic tomography and graphic image reconstruction. // *J. Struct. Biol.* – 1993. – № 110. – P. 39–54.
12. *Landis W.J., Hodgens K.J.* Mineralization of collagen may occur on fibril surfaces: evidence from conventional and high-voltage electron microscopy and three-dimensional imaging. // *J. Struct. Biol.* – 1996. – V. 117. – C. 24–35.
13. *Lees S., Probst K.S., Ingle V.K., Kjoller K.* The loci of mineral in turkey leg tendon as seen by atomic force microscope and electron microscopy. // *Calcif. Tissue Int.* – 1994. – V. 55. – P. 180–189.
14. *Rubin M.A., Jasiuk L., Taylor J, Rubin J., Ganey T., Apkarian R.P.* TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone. // *Bone.* – 2003. – V. 33. – № 3. – P. 270–282.
15. *Su X., Sun K., Cui F.Z. and Landis W.J.* Organization of apatite crystals in human woven bone. // *Bone.* – 2003. – V. 32. – № 2. – P. 150–162.
16. *Tong W., Glimcher M.J., Katz J.L., Kuhn L., Eppell S.J.* Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy. // *Calcif. Tissue Int.* – 2003. – V. 75. – P. 592–598.
17. *Weiner S.T., Traub W. and Wagner D.* Lamellar bone: structure-function relations. // *J. Struct. Biol.* – 1999. – V. 126. – № 3. – P. 241–255

◇ REFERENCES

1. *Denisov-Nikol'skiy YU.I., Zhilkin B. A., Doktorov A. A., Matveychuk I. V.* Ul'trastruktornaya organizatsiya mineral'nogo komponenta plastinchatoy kos noy tkani u lyudey zrelogo i starcheskogo vozrasta // *Morfologiya.* – 2002. – Т. 122. – № 5. – S. 79–83. (In Russian)

Для корреспонденции

КОНЕВ Владимир Павлович – д.м.н., проф., заслуженный работник высшей школы РФ, заведующий кафедрой судебной медицины, правоведения Омского государственного медицинского университета • 644043, г. Омск, ул. Партизанская, д. 20 • +7(923) 674-95-06 • vpkonev@mail.ru

МОСКОВСКИЙ Сергей Николаевич – к.м.н., доцент кафедры судебной медицины, правоведения Омского государственного медицинского университета • 644043, г. Омск, ул. Партизанская, д. 20 • +7(960) 997-63-13 • moscow-55@mail.ru

ШЕСТЕЛЬ Игорь Леонидович – к.м.н., доцент кафедры судебной медицины, правоведения Омского государственного медицинского университета • 644043, г. Омск, ул. Партизанская, д. 20 • +7(923) 674-95-06 • vpkonev@mail.ru

ШИШКИНА Юлия Олеговна – ассистент кафедры судебной медицины, правоведения Омского государственного медицинского университета • 644043, г. Омск, ул. Партизанская, д. 20 • +7(960) 997-63-13 • moscow-55@mail.ru

КОРШУНОВ Андрей Сергеевич – ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии Омского государственного медицинского университета • 644043, г. Омск, ул. Партизанская, д. 20 • +7(960) 997-63-13 • moscow-55@mail.ru