

Н.О. Борзих¹
С.С. Страфун¹
С.І. Савосько²
О.М. Макаренко²
А.А. Лакша³

¹ ДУ «Інститут травматології та ортопедії НАМН України»

² Національний медичний університет імені О.О. Богомольця

³ Національний військово-медичний клінічний центр «ГВКГ» МО України, Київ

Надійшла: 19.01.2018

Прийнята: 26.02.2018

DOI: <https://doi.org/10.26641/1997-9665.2018.1.7-13>

УДК 616.71-001.5:616-001.45:537.533.35

УЛЬТРАСТРУКТУРНІ ЗМІНИ КІСТКОВОЇ ТКАНИНИ ПРИ ВОГНЕПАЛЬНІЙ ТРАВМІ НА ОСНОВІ РЕЗУЛЬТАТІВ СКАНУЮЧОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Дослідження проведено в рамках науково-дослідної роботи «Розробити технологію лікування та реабілітації хворих з бойовою поліструктурною травмою кінцівок» (номер державної реєстрації 0115U005854).

Morphologia. – 2018. – Т. 12, № 1. – С. 7-13.

© Н.О. Борзих, С.С. Страфун, С.І. Савосько, О.М. Макаренко, А.А. Лакша, 2018
✉ natashabor@ukr.net

Borzykh N.O., Strafun S.S., Savosko S.I., Makarenko O.M., Laksha A.A. The bone ultrastructural changes on combat trauma condition represented by scanning electron microscopy.

ABSTRACT. Background. The row of factors influences on a result to the regeneration, in particular weight of destruction of bone, state of regional circulation of blood, inflammation. For today one of the the least studied and difficult types of breaks there are gunshot traumas of extremities. **Objective.** The general analysis of fragments, splits character and microelement composition was carried out. Furthermore, the experimental samples were compared with the bone fragments of injury caused by household trauma. **Methods.** Using the scanning electron microscopy (SEM) we have investigated the bone fragments of injury caused by combat trauma (gunshot and mine-blast wound). **Results.** According to SEM the bone fragments contained the mineralized matrix with lacunae and tubules. A cortical zone of the bone fragments consisted of lamellar bone; the Haversian canal and osteoid plates were found on the bone splits. The character of the bone split was clearly defined by osteons' lamellas location. Into intact bone the osteons' lamellas form the continuous concentric layers around Haversian canal. Consequently, the bone split after combat trauma took place in the osteons' lamellas. The presence of such defects in the bone fragments should be considered as a factor of further bone reorganization, osteoporosis-like bone matrix transformation and instability during the osteosynthesis. **Conclusion.** The results of chemical analysis showed the statistically significant decrease of fluorine content (F) ($p < 0,01$) and the decreasing tendency of calcium (Ca), sodium (Na), phosphorus (P) in the bone fragments after combat trauma. The Ca/P ratio did not change significantly while Na/Mg, Ca/S and Ca/C ratio tended to decrease. In two bone samples the increased levels of sulfur (S) and carbon (C) to the total chemical elements composition were determined. We make an assumption that emergence of the last elements into the bone fragments may be connected with the total content of hydroxyapatite decrease and presence of combustion products residues or other sulfur-containing flammable substances. In this way, taking into account the SEM and spectrometry (energy-dispersive spectrometer) results we make a conclusion that the microcracks density into bone matrix after combat trauma is higher than after household trauma. The cause of such effect is the killer kinetic action on the bone.

Key words: SEM, bone, ultrastructure, trauma.

Citation:

Borzykh NO, Strafun SS, Savosko SI, Makarenko OM, Laksha AA. [The bone ultrastructural changes on combat trauma condition represented by scanning electron microscopy]. *Morphologia.* 2018;12(1):7-13. Ukrainian.

Вступ

Проблема лікування постраждалих з переломами кісток кінцівок була і залишається однією з найбільш складних і актуальних питань ор-

топедії та травматології. Оптимізація остеорепа-рації є головним завданням у створенні умов для загоєння переломів кісток. На результат регенерації впливають ряд чинників, зокрема тяжкість

руйнування кісткової тканини, стан регіонарного кровообігу, запалення. На сьогодні одним з найменш вивчених та складних типів переломів є вогнепальні травми кінцівок.

Для перелому кісток характерною є зміна фізико-хімічних характеристик кісткової тканини (зміни мінерального складу, щільності кісткового матриксу). Ці показники впливають на ризик неповноцінної отеорепарації і повторних переломів кісток. Переломи кісток не обмежуються лише фізичним дефектом, кісткова тканина піддається резорбції, демінералізації і реорганізації до хрящової тканини. Результати фундаментальних досліджень доводять залежність характеру перелому різних анатомічних типів кісток на макро- і мікрорівні від дії бойової травми. Для пошкодження довгих кісток є характерними поява тріщин і розривів, деформацій по типу лакун і каверн, гомогенізація і ущільнення кісткового матриксу [1]. Основними механізмами руйнування кісткового матриксу при цьому є зміщення пластів і його розриви.

Закономірності регенерації довгої кістки при переломі на структурному та фізіологічному рівнях досліджено на відповідному рівні, щоб впливати на процеси повноцінного відновлення кістки. Але ураження кісткової тканини при бойовій травмі (вогнепальне і мінно-вибухове поранення) недостатньо досліджено. Дослідження змін на ультраструктурному рівні, крім хімічного аналізу, зокрема співвідношення мікроелементів матриксу, може дати деяке уявлення про зміни, які відрізняють вогнепальну травму від невогнепальної. Встановлення лімітуючих факторів, які визначають характер відновлення та регенерації у uszkodженій кістковій тканині, є важливою задачею у вивченні загоєння таких травм.

Метою дослідження було вивчити ультраструктурні характеристики кісткової тканини довгих кісток із вогнепальною та невогнепальною травмами.

Матеріали та методи

Методом скануючої (растрової) електронної мікроскопії СЕМ (РЕМ) досліджували фрагменти, що вільно лежали безпосередньо біля перелому довгої кістки, поранених з вогнепальною та мінно-вибуховою травмою (n=14). Для контролю досліджували фрагменти кісток такої ж локалізації, які були виділені з ран пацієнтів при відкритих невогнепальних переломах (n=13). Фрагменти кісток фіксували у 10% нейтральному формаліні на фосфатному буфері і витримувалися 24 години. Після промивки у фізіологічному розчині проводили дегідратацію у висхідних концентраціях етанолу (25%→50%→75%→100%). Після цього матеріал висушувався в установці Samdri-780A для сушки в критичній точці CO₂ та покривався золотом товщиною 15 нм з допомогою пристрою (установки) Gatan 682 PECS. СЕМ (РЕМ) дослідження проводились з допомогою

Tescan Mira 3 LMU.

Поява сучасних технологій дозволяє отримати нові дані про структурні зміни кісткової тканини, зокрема про зміни хімічного складу. Елементний склад зразків кісток досліджували за допомогою енергодисперсійного спектрометра «X-max 80 mm²» («Oxford Instruments», Великобританія), що був інтегрований у растровий електронний мікроскоп Tescan Mira 3 LMU. Метод дозволяє одночасно визначити мікроструктуру зразка та елементарний склад. Дослідження елементного складу за допомогою енергодисперсійного спектрометра дозволяє виявити в складі зразка хімічні елементи з атомними номерами від 4 до 92 та кількісно визначити склад. Ефективність методу описано у роботі інших авторів [2].

Статистичну обробку одержаних даних проводили за загальноприйнятими методами з використанням U-критерію Манна-Уїтні. Рівень статистичної значущості був встановлений на рівні P<0,05.

Результати

Фрагменти кісток за даними скануючої електронної мікроскопії містили мінералізований матрикс з лакунами і каналцями. У інтактній кістковій тканині в лакунах локалізовані клітини – остеобласти, остецити і остеокласти, проте на сколах досліджуваних зразків клітинних елементів не виявлено (рис. 1А-1Г). У позаклітинному матриксі, який представляє основну речовину кістки, реєстрували численні пучки кісткового матриксу, як правило, упорядкованих з паралельних і розгалужених фібрилярних масивів (рис. 1Д-1Е). Згідно літературних даних ці фібрилярні структури утворені колагеном. Між пучками фібрил відмічено менш електроннощільний матрикс. Колагеновий матрикс кісткової тканини мінералізований гідроксидами кальцію і фосфату (гідроксиапатит) [3]. Основні іони, які складають мінеральну частину кістки, включають кальцій, фосфат, гідроксил і карбонат. Менш численними іонами є цитрат, магній, натрій, калій, фторид, хлорид, залізо, цинк, мідь, алюміній, свинець, стронцій, кремній і бор, багато з яких присутні тільки в невеликій кількості. Співвідношення та розподіл цих компонентів залежать від віку, місця розташування і фізіологічного статусу кістки. На основі змін цих структурних компонентів можна стверджувати про зміни кісткової тканини.

Кортикальна зона кісткових фрагментів представлена пластинчатою кісткою. На рисунку 2:1-2:6 відображено сколи кістки, на яких реєструються канал Гаверса та пластинки остеонів. Чітко видно характер розколу кістки за розташуванням ламел остеонів. У інтактній кістковій тканині ламели остеонів утворюють безперервні кільцеві шари навколо каналу Гаверса. Останній містить живильну магістральну судину остеона.

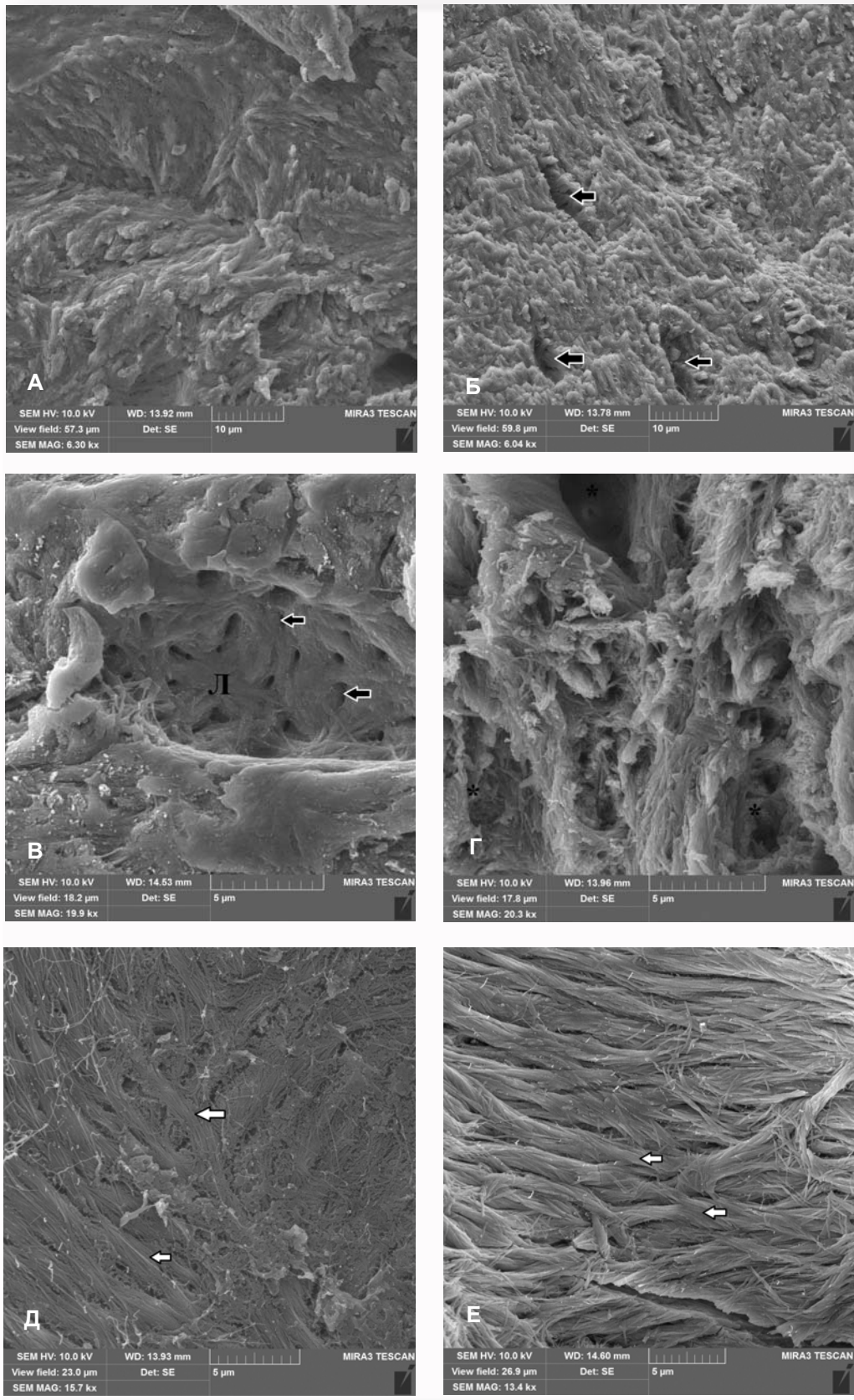


Рис. 1. Скануюча електронна мікроскопія кортикальної ділянки кісткових фрагментів після вогнепальних та невогнепальних переломів. Примітка: 1, 3, 5 – невогнепальні переломи; 2, 4, 6 – вогнепальні переломи; Л – лакуни остеоцитів; Г – канал Гаверса; ← сколи по лініям пластинок остеонів; ← кісткові каналці; ↔ пучки колагенових волокон; * ділянки деструкції, порушення щільності кісткового матриксу.

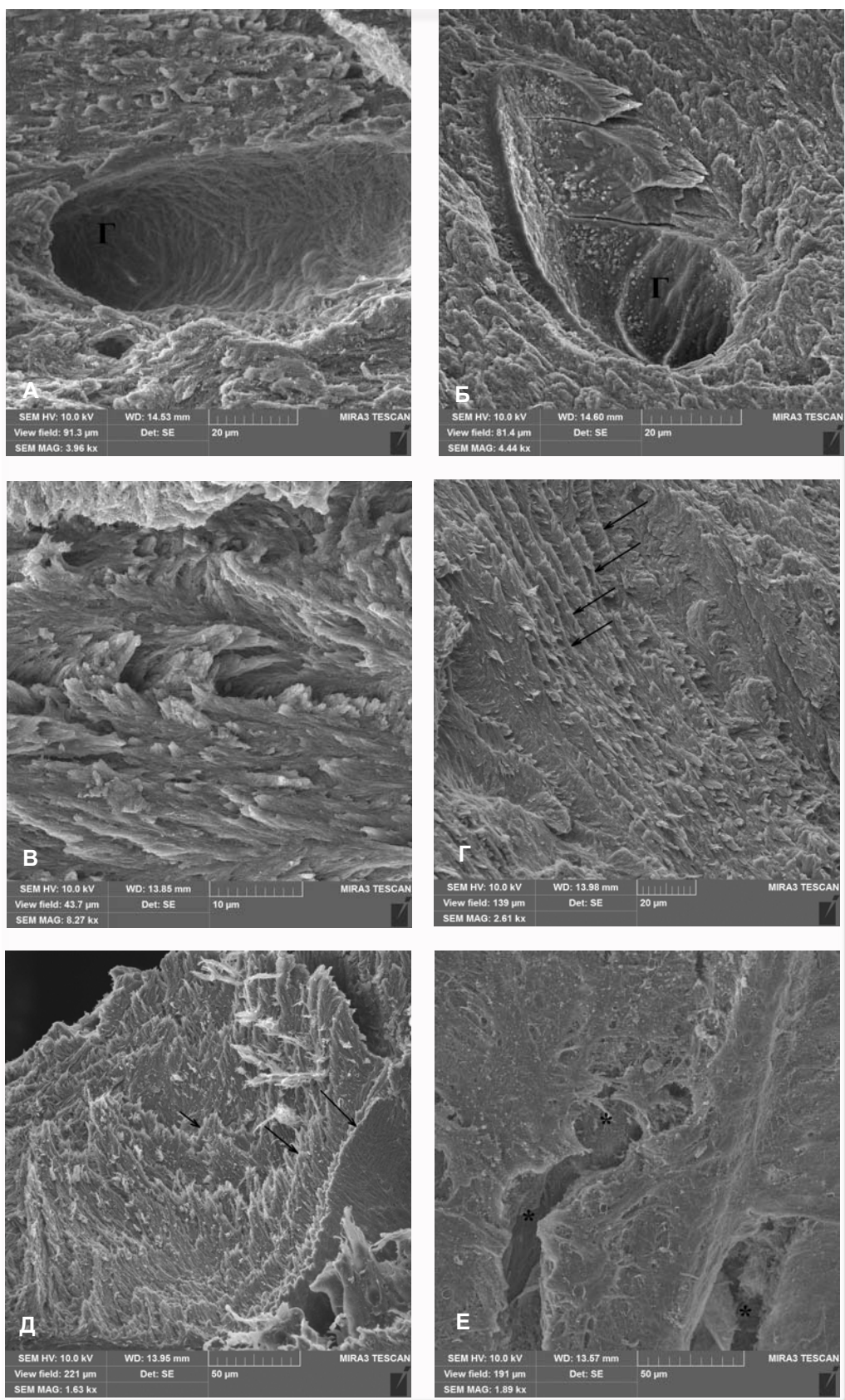


Рис. 2. Скануюча електронна мікроскопія кортикальної ділянки кісткових фрагментів після вогнепальних та невогнепальних переломів. Примітка: 1, 3, 5 – невогнепальні переломи; 2, 4, 6 – вогнепальні переломи; Л – лакуни остеоцитів; Г – канал Гаверса; ← сколи по лініям пластинок остеонів; ◀ кісткові каналці; ⇐ пучки колагенових волокон; * ділянки деструкції, порушення щільності кісткового матриксу.

Схожу картину відображають рисунки 2:2, 2:4 і 2:5. Морфологічно розриви компактної речовини у зразках після невогнепальних переломів є мікротріщини лінійної форми, які формуються переважно у ділянках з'єднання ліній остеонів. На рисунку 1:4-2:6 відмічено ділянки деструкції кісткового матриксу, а мікротріщини у каналі Гаверса (рис. 2:2). В середньому діапазон мікротріщин у зразках після вогнепальних переломів варіював від 390 нм до 1,7 мкм. Тобто характер розколу кісткової тканини після вогнепальних переломів відбувався по ламелам остеонів. Наявність таких дефектів в уламках кісток можна розглядати як чинник подальшої реорганізації кісткової тканини, остеопорозоподібної трансформації кісткового матрикса і нестабільності

при остеосинтезі.

У таблиці 1 наведено хімічний склад кісткової тканини кортикальної ділянки кісток після вогнепальних і невогнепальних переломах. Наявність у літературних джерелах не виявлено порівняльної характеристики відносного (нормованого) хімічного складу кісток людини, тому висновки про зміни мінерального складу проведено лише на основі порівняння фактичних даних між двома групами досліджуваних зразків. На основі аналізу фактичних даних можна стверджувати про статистично значуще зменшення вмісту фтору (F) ($p < 0,01$) і тенденцію зниження кальцію (Ca) і у меншій мірі натрій (Na) і фосфор (P) у зразках кісткової тканини після вогнепальних переломів.

Таблиця 1

Нормований склад хімічних елементів у дослідних зразках кісток

Дослідні зразки / хімічний елемент	Невогнепальні переломи	Вогнепальні переломи
C	43,8±2,00	50,1±4,76
N	13,2±1,15	11,4±0,44
O	31,1±2,06	28,1±3,94
F	0,37±0,01	0,20±0,04*
Na	0,28±0,01	0,23±0,04
Mg	0,13±0,01	0,12±0,01
Al	0,04±0,008	0,05±0,01
P	4,43±0,58	3,64±0,71
S	0,08±0,01	0,18±0,07
Ca	6,67±0,52	5,77±1,16
Всього	100,0±0,0	100,0±0,0

Примітка: * - статистично значуща різниця щодо групи порівняння з вогнепальними переломами за У-критерієм Манна-Уїтні ($p < 0,01$)

Дані співвідношення хімічних елементів, які наведено у таблиці 2, яскраво демонструють зменшення рівня кальцію щодо магнію і сірки, натрію щодо магнію і фтору щодо кальцію. Співвідношення Ca/P, основних елементів гідроксиапатиту ($Ca_{10}(PO_4)_6(OH)_2$), залишилось без суттєвих змін. Співвідношення Na/Mg, Ca/S і Ca/C мало тенденцію до зменшення у зразках кісткової тканини після вогнепальних переломів.

У 2-х зразках кісток після вогнепальних переломів реєстрували підвищений рівень сірки (S) і вуглецю (C) до загального складу хімічних елементів. Можна висунути припущення, що поява останніх елементів в уламках кісток після вогнепальних переломів може бути пов'язана з зменшенням загального вмісту гідроксиапатиту і наявністю залишків продуктів горіння або інших сірковмісних горючих сполук.

Таблиця 2

Співвідношення основних мікроелементів кісткової тканини в кортикальній ділянці досліджуваних фрагментів кісток

Дослідні зразки / пара хімічних елементів	Невогнепальні переломи	Вогнепальні переломи
Ca/P	1,52±0,09	1,58±0,09
Ca/Mg	48,9±0,55	45,3±8,97
Na/Mg	2,09±0,29	1,90±0,36
Ca/F	18,1±1,98	29,6±4,87
Ca/S	90,7±19,3	61,4±30,25
Ca/C	0,15±0,005	0,12±0,02

Таким чином, на основі результатів СЕМ та спектроскопії (енергодисперсійного спектрометра) зроблено висновок про більшу щільність мікротріщин у матриці кісткової тканини яка розташована безпосередньо біля міста вогнепального перелому порівняно з побутовою травмою, що пояснюється наслідком дії снаряду, що ранило, на кістку.

Обговорення

Аналіз літературних джерел наукової інформації по вивченню бойової травми свідчить, що більшість авторів вказують на зв'язок між ступенем ураження кісток і тяжкістю вогнепальних поранень та ступенем розсіювання енергії по тканинам кінцівки [4-6]. Спостереження авторів засвідчили, що переломи з тяжким вогнепальним пораненням знаходяться під загрозою незадовільної регенерації кістки. У власному дослідженні було зроблено спробу виявити структурні основи вогнепальних переломів довгих кісток, на основі яких можна пояснити зміни біомеханічних властивостей кісткової тканини та складність остеорепаративних процесів. Нажаль, у окремих спостереженнях та дослідженнях з малою кількістю фактичного матеріалу не можна в повній мірі визначити весь набір факторів, які характеризують кінетичну та балістичну складову поранення. Кінетична енергія розповсюджується за межі локальної дії вражаючого елемента, спричинює зміни матриксу тканини на молекулярному рівні [7]. Результати власних досліджень кісткової тканини після вогнепального перелому показали, що зразках, що досліджувались, наявні чисельні мікротріщини на межі ламел остеонів. У кістковому матриксі чітко реєстрували волокнисті компоненти. Останні представлені колагеном та в деякій мірі неколагеновими білками. За даними авторів, кісткова тканина досить легко піддається резорбції, а демінералізований колагеновий матрикс має відносно низькі механічні властивості [8]. Мінеральна складова формує міцний зв'язок з колагеном. Розміри кристалів гідроксиапатиту досягають довжини 50 нм і мають тов-

щину 2-5 нм [9]. Мінімальний розмір виявлених мікротріщин починався від 390 нм, а роз'єднання матриксу відбувалося пластами ламелярних структур. Кристали гідроксиапатиту орієнтовані вздовж колагенових волокон [10], але деякі зразки мали аморфний контур, що може бути пов'язано з впливом кінетичної енергії та змінами кристалічного матриксу кісткової тканини. Тому отримані дані вказують на те, що пошкодження кісткової тканини при вогнепальних переломах є мультифакторним. На це також вказують результати мінерального аналізу, що засвідчив тенденцію зменшення вмісту фтору і магнію.

Висновки

На основі використання скануючої (растрової) електронної мікроскопії встановлено, що навколо вогнепальних переломів довгих кісток, на відміну від невогнепальних, відбувається руйнація кортикального шару кісткової тканини на ультраструктурному рівні з утворенням мікротріщин у кістковому матриксі, що пояснюється результатом високоенергетичного впливу снаряду, який ранило.

Аналіз отриманих даних свідчить про статистично значуще зменшення вмісту фтору (F) ($p < 0,01$) і тенденцію до зниження кальцію (Ca) і у меншій мірі натрію (Na) і фосфору (P) у зразках кісткової тканини розташованих безпосередньо біля вогнепального перелому. Дані співвідношення хімічних елементів демонструють зменшення рівня кальцію (Ca) щодо магнію (Mg) і сірки (S), натрію (Na) щодо магнію (Mg) і фтору (P) щодо кальцію (Ca).

Перспективи подальших досліджень пов'язані з розробкою патоморфологічно- та біомеханічно- обґрунтованого лікування поранених з вогнепальними переломами кінцівок.

Подяка

Автори висловлюють подяку за допомогу у проведенні растрової електронної мікрофотографії М.А. Скорику (ТОВ «Наномедтех», Київ, Україна).

Літературні джерела References

1. Gaidash AA, Bashirov PC, Kolkutin VV, Tolmachyov NA, Tyurin MV, Bozhchenko AP, Denisov AB. [New data on the morphogenesis of gunshot damage]. *Sudebno-meditsinskaya ekspertiza*. 2010;4(53):4-7. Russian.
2. Tkachenko IM, Skoryk M. [Structural features of enamel with increased and physiological stiffening of teeth]. *Ukrayins'kyu stomatolohichnyy al'manakh*. 2011;6:15-21. Ukrainian.
3. Clarke KI, Graves SE, Wong ATC, Triffitt JT, Francis MJO, Czernuszka JT. (1993) Investigation into the formation and mechanical properties of a

- bioactive material based on collagen and calcium phosphate. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*. 1993;4:107-10. DOI:10.1007/BF00120378.
4. Dicipinigitis PA, Koval KJ, Tejwani NC, Egol KA. Gunshot wounds to the extremities. *Bull NYU Hosp Jt Dis*. 2006;64(3-4):139-55.
5. Farrugia A, Raul JS, Geraut A, Tortel MC, Ludes B. Destabilization and intracranial fragmentation of a full metal jacket bullet. *J Forensic Leg Med*. 2009;16(7):400-2.
6. Long WT, Chang W, Brien EW. Grading sys-

tem for gunshot injuries to the femoral diaphysis in civilians. Clin Orthop Relat Res. 2003;(408):92–100.

7.Kieser JA, Tahere J, Agnew C, Kieser DC, Duncan W, Swain MV, Reeves MT. Morphoscopic analysis of experimentally produced bony wounds from low velocity ballistic impact. Forensic Sci Med Pathol. 2011;7(4):322-32. DOI: 10.1007/s12024-011-9240-y.

8.Venugopal J, Prabhakaran MP, Zhang Y, Low S, Choon AT, Ramakrishna S. Biomimetic hydroxyapatite-containing composite nanofibrous substrates for bone tissue engineering. Philos Trans A

Math Phys Eng Sci. 2010;368(1917):2065-81. DOI: 10.1098/rsta.2010.0012.

9.Sachlos E, Gotoro D, Czernuszka JT. Collagen scaffolds reinforced with biomimetic composite nano-sized carbonate-substituted hydroxyapatite crystals and shaped by rapid prototyping to contain internal microchannels. Tissue Engineering. 2006;12:2479–87. DOI: 10.1089/ten.2006.12.2479.

10.Weiner S, Traub W. Crystal size and organization in bone. Connective Tissue Research. 1989;21:589–95. DOI: 10.3109/03008208909050015.

Борзих Н.О., Страфун С.С., Савосько С.І., Макаренко О.М., Лакша А.А. Ультроструктурні зміни кісткової тканини при вогнепальній травмі на основі результатів скануючої електронної мікроскопії.

Реферат. Методом скануючої електронної мікроскопії (СЕМ) досліджували фрагменти, що вільно лежали безпосередньо біля перелому довгої кістки, поранених з вогнепальною та мінно-вибуховою травмою) та уламки кісток, які були виділені з ран пацієнтів із відкритими невогнепальними переломами. Провели загальний аналіз уламків, характеру розколів та мікроелементного складу. На основі використання скануючої (растрової) електронної мікроскопії встановлено, що навколо вогнепальних переломів довгих кісток, на відміну від невогнепальних, відбувається руйнація кортикального шару кісткової тканини на ультроструктурному рівні з утворенням мікротріщин у кістковому матриксі, що пояснюється результатом високоенергетичного впливу снаряду, який ранив. На основі використання скануючої (растрової) електронної мікроскопії встановлено, що навколо вогнепальних переломів довгих кісток, на відміну від невогнепальних, відбувається руйнація кортикального шару кісткової тканини на ультроструктурному рівні з утворенням мікротріщин у кістковому матриксі, що пояснюється результатом високоенергетичного впливу снаряду, який ранив. Аналіз отриманих даних свідчить про статистично значуще зменшення вмісту фтору (P) ($p < 0,01$) і тенденцію до зниження кальцію (Ca) і у меншій мірі натрію (Na) і фосфору (P) у зразках кісткової тканини розташованих безпосередньо біля вогнепального перелому. Дані співвідношення хімічних елементів демонструють зменшення рівня кальцію (Ca) щодо магнію (Mg) і сірки (S), натрію (Na) щодо магнію (Mg) і фтору (P) щодо кальцію (Ca).

Ключові слова: СЕМ, кістка, ультроструктура, травма.

Борзых Н.А., Страфун С.С., Савосько С.И., Макаренко А.Н., Лакша А.А. Ультроструктурные изменения костной ткани при огнестрельных травм на основе результатов сканирующей электронной микроскопии.

Реферат. Методом сканирующей электронной микроскопии (СЭМ) исследовали свободнолежащие фрагменты (непосредственно в зоне перелома) у пациентов с огнестрельной и мінно-взрывной травмой и отломки костей, которые были взяты из ран пациентов при открытых неогнестрельных переломах. Провели общий анализ отломков, характера расколов и микроэлементного состава. На основе использования сканирующей электронной микроскопии установлено, что в зоне огнестрельных переломов длинных костей, в отличие от неогнестрельных, происходит разрушение кортикального слоя костной ткани на ультроструктурном уровне с образованием микротрещин в костном матриксе, что объясняется результатом высокоэнергетического воздействия ранящего снаряда. На основе использования сканирующей (растровой) электронной микроскопии установлено, что вокруг огнестрельных переломов длинных костей, в отличие от неогнестрельных, происходит разрушение кортикального слоя костной ткани на ультроструктурном уровне с образованием микротрещин в костном матриксе, что объясняется результатом высокоэнергетического воздействия ранящего снаряда. Анализ полученных данных свидетельствует о статистически значимом уменьшении содержания фтора (P) ($p < 0,01$), тенденцию к снижению кальция (Ca), в меньшей степени натрия (Na) и фосфора (P) в образцах костной ткани расположенных непосредственно у огнестрельного перелома. Данные соотношения химических элементов демонстрируют снижение уровня кальция (Ca) по отношению к магнию (Mg) и сере (S), натрия (Na) к (Mg), а фтора (P) к кальцию (Ca).

Ключевые слова: СЭМ, кость, ультроструктура, травма.