

Шановні читачі! У рубриці „Методологія наукових досліджень” редакція публікує матеріали, що пов’язані з найважливішими аспектами наукової діяльності: організаційно-методичним забезпеченням наукових видань, загальними принципами статистичного, біометричного і математичного супроводження досліджень, а також оригінальними методичними підходами вітчизняних і зарубіжних морфологів.

В.С.Пикалюк

С.А.Кутя

Д.В.Шадуро

Крымский государственный
медицинский университет им.
С.И.Георгиевского
(Симферополь)

Ключевые слова: методика,
гистологическое исследование,
костная ткань, недекальцини-
рованные срезы.

Надійшла: 20.08.2010

Прийнята: 18.09.2010

УДК: 611.71:616-076

МОДИФИКАЦИЯ МЕТОДИКИ ГИСТОЛОГИЧЕСКОГО ИССЛЕДОВАНИЯ КОСТНОЙ ТКАНИ

Работа выполнена в рамках научно-исследовательской работы «Возрастные морфофункциональные особенности отдельных органов и систем организма под влиянием гравитационных перегрузок и различных методах их коррекции» (номер государственной регистрации 0104U002080).

Резюме. В статье приводится описание методики получения, окрашивания и последующей морфометрии недекальцинированных срезов костей.

Морфологія. – 2010. – Т. IV, № 3. – С. 72-76.

© В.С.Пикалюк, С.А.Кутя, Д.В.Шадуро, 2010

Pikalyuk V.S., Kutya S.A., Shaduro D.V. Modification of method of histological investigation of bone tissue.

Summary. Article contains description of method of undecalcified sections preparation, staining with following morphometry.

Key words: method, histologic study, bone tissue, undecalcified sections.

Введение

Гистоморфометрия является единственным методом прямого и точного анализа механизмов перестройки костной ткани. В настоящее время этот метод применяется для решения следующих основных проблем: установление диагноза патологии кости; оценка механизмов, ведущих к утрате костной ткани; оценка влияния различных экоантропогенных факторов на процессы перестройки кости; оценка качества кости (Риггз Б.Л., Мелтон III Л.Дж., 2000, Helfrich M.H., Ralston S.H., 2003, Ковешников та ін., 2004, Пикалюк В.С., 2007). С помощью гистоморфометрии можно оценить промежуточный уровень организации кости, являющийся конечным результатом активности остеобластов. При этом, применяя метод двойной тетрациклиновой метки, становится возможным получение информации о ди-

намических процессах в костной ткани, что позволяет анализировать количественные показатели во времени.

Одним из условий для решения этих проблем является возможность различать на гистологических препаратах минерализованную и неминерализованную (остеоидную) костную ткань, что осуществимо лишь на недекальцинированных срезах. Следует также подчеркнуть, что только на недекальцинированных срезах возможно проведение достоверного количественного гистоморфометрического исследования статических и динамических параметров объема, ремоделирования и минерализации костной ткани.

В большинстве исследований, проводимых за рубежом, эти задачи решаются в несколько этапов. На первом производят фиксацию кусочков костной ткани. Наиболее широко использу-

ются такие фиксаторы, как 70% этанол или 10% формалин (при pH=7,0). После обезвоживания образцы кости подвергаются заливке мономерными пластмассами, как правило, метилметакрилатом, что придает получаемым блокам прочность, аналогичную прочности кости. На следующем этапе с использованием специальных микротомов, оснащенных алмазным ножом, приготавливают срезы толщиной 1-2 мкм. В некоторых лабораториях перед окрашиванием срезов пластмассу растворяют, в других - этого не делают, желая сохранить архитектонику среза. В последующем производят окраску срезов. При выборе процедуры окраски обязательным условием является использование такого метода, который обеспечивает однозначную идентификацию остеоида и клеток костной ткани. Наиболее часто применяют метод Косса, окраску 1% раствором солюхромцианина R или трихромом Гольднера. Детальное описание этих методик приводится в соответствующих руководствах (Ромейс Б., 1953, Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996, An Y.H., Martin K.L., 2003, Helfrich M.H., Ralston S.H., 2003, Khurana J.S., 2009).

Следует отметить, что вышеупомянутые способы заливки, получения срезов и их окраски требуют наличия специального дорогостоящего оборудования и реактивов, а также отличаются сложностью и длительностью процедуры. В связи с чем этот метод практически не находит применения в Украине.

Нами разработана методика получения недекальцинированных срезов костной ткани крыс линии Вистар и их последующей окраски для изучения статических гистоморфометрических параметров, которая позволяет избежать этих неудобств. Методика основана на общеизвестных процедурах (Ромейс Б., 1953, Уикли Б.С., 1975, Саркисов Д.С., Перов Ю.Л., 1996, Пикалюк В.С., 2007), но в таком сочетании ранее не применявшихся.

Вначале кусочки костной ткани фиксируют в 70% этиловом спирте в течение суток. Учитывая тот факт, что при помощи этой же методики возможно изучение динамических гистоморфометрических параметров (с предварительным двойным введением животным тетрациклина), формалин менее приемлем, так как в сравнении со спиртом, приводит к большему вымыванию тетрациклиновых меток.

После чего производят обезвоживание материала и его заливку в эпоксидную смолу по следующей схеме:

1. Поместить в 70% этанол на 2 часа.
2. Поместить в 96% этанол 2 раза по 25 минут.
3. Промыть в 100% ацетоне 2 раза по 15 минут (в закрытых банках).
4. Залить в смесь ацетон-смола в соотношении 1:1 на 1 час (в закрытых банках). Смола го-

товится следующим образом: смешиваются 9,2 мл эпона-812, 5,7 мл отвердителя ДДСА и 5,1 мл уплотнителя МНА. Полученная смесь постоянно мешается в течение 1 часа, затем к ней по каплям добавляют ускоритель ДМР-30 (14 капель).

5. Залить смолой непосредственно в желатиновых капсулах.

6. Полимеризовать капсулы в термостате при температуре 37°C – 12 часов, затем при температуре 45°C – 12 часов, затем при температуре 56°C – 12 часов.

Срезы толщиной 1-2 мкм изготавливают на ультрамикротоме «ULTRACUT» с использованием как алмазного, так и стеклянных ножей. Необходимо отметить, что качество срезов, полученных при помощи стеклянных ножей, было хуже, но, вполне достаточное для последующей морфометрии.

Полученные полутонкие срезы окрашивают по методу Косса с последующим контрастным окрашиванием. В отличие от окраски солюхромцианином R и трихромом Гольднера, этот метод отличается простотой выполнения и доступностью реактивов. Метод Косса является классическим референтным методом выявления кальция в тканях. При этом костный минерал окрашивается в черный цвет вследствие отложения серебра, а остеоид остается восприимчивым к контрастному окрашиванию.

Методика окраски

1. Срезы помещают в 1% водный раствор нитрата серебра и освещают с помощью сильного источника света (лучше всего использовать солнечный свет) в течение 2-15 минут (длительность может колебаться в зависимости от интенсивности освещения и свежести раствора).

2. Промывают в трех сменах дистиллированной воды.

3. Обрабатывают 2,5% тиосульфата натрия 2-3 минуты.

4. Хорошо промывают в дистиллированной воде.

На последующих этапах производили окрашивание клеток и остеоида.

5. Окрашивают 1% раствором метиленового синего 30-60 секунд. Методика приготовления 1% раствора метиленового синего: вначале готовится насыщенный водный раствор, который смешивается с 90% этанолом в соотношении 1:1. Затем из этого маточного раствора готовится 1% водный раствор метиленового синего.

6. Промывают в проточной воде.

7. Окрашивают 0,05% основного фуксина на 2,5% этаноле 30 секунд.

8. Промывают в проточной воде.

Результат: минерализованная ткань - коричнево-черная в виде грубых гранул, остеоид - розово-красный, ядра клеток – фиолетово-синие.

Ход окрашивания необходимо контролировать при помощи микроскопа.

На рисунках 1-3 представлены микрофотографии препаратов, полученных и окрашенных по этой методике.

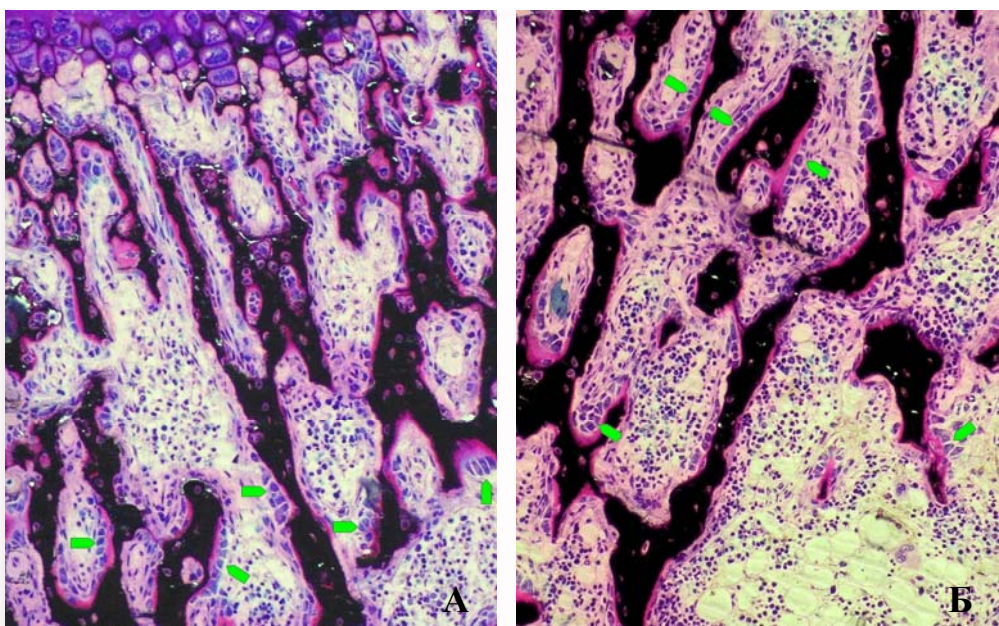


Рис. 1 А и Б. Метадиафизарная зона большеберцовой кости крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. $\times 200$. Здесь и далее: минерализованный костный матрикс окрашен в черный цвет, остеоид – в розово-красный, стрелками обозначены активные остеобласты.

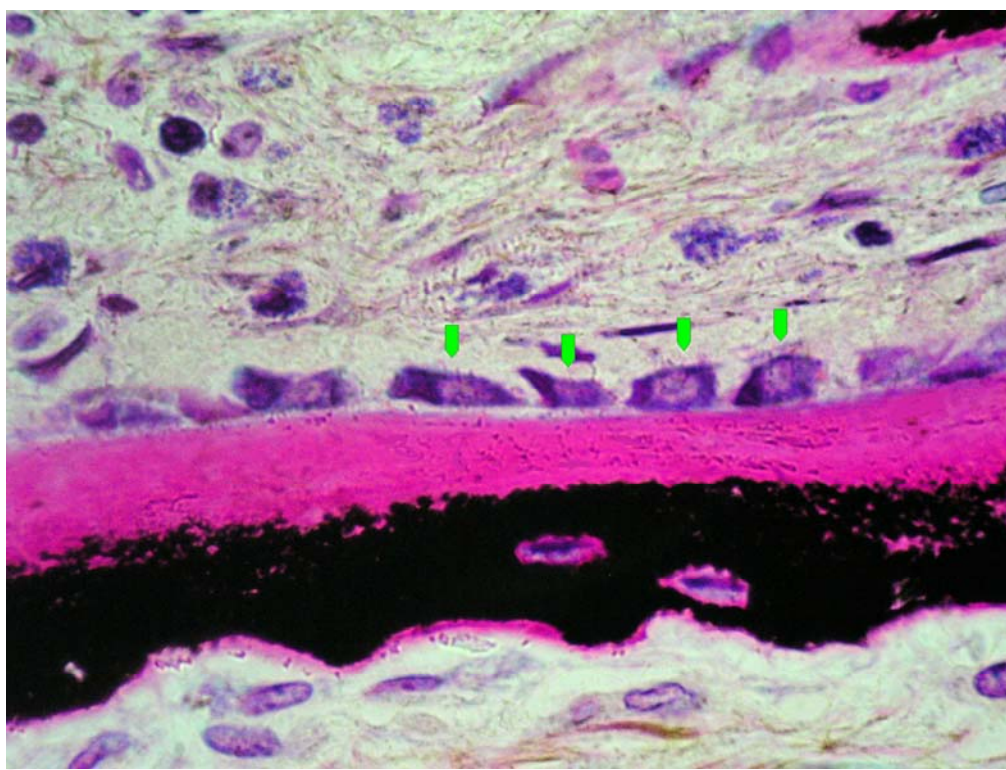


Рис. 2. Трабекула вторичной спонгиозы большеберцовой кости крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. $\times 1000$.

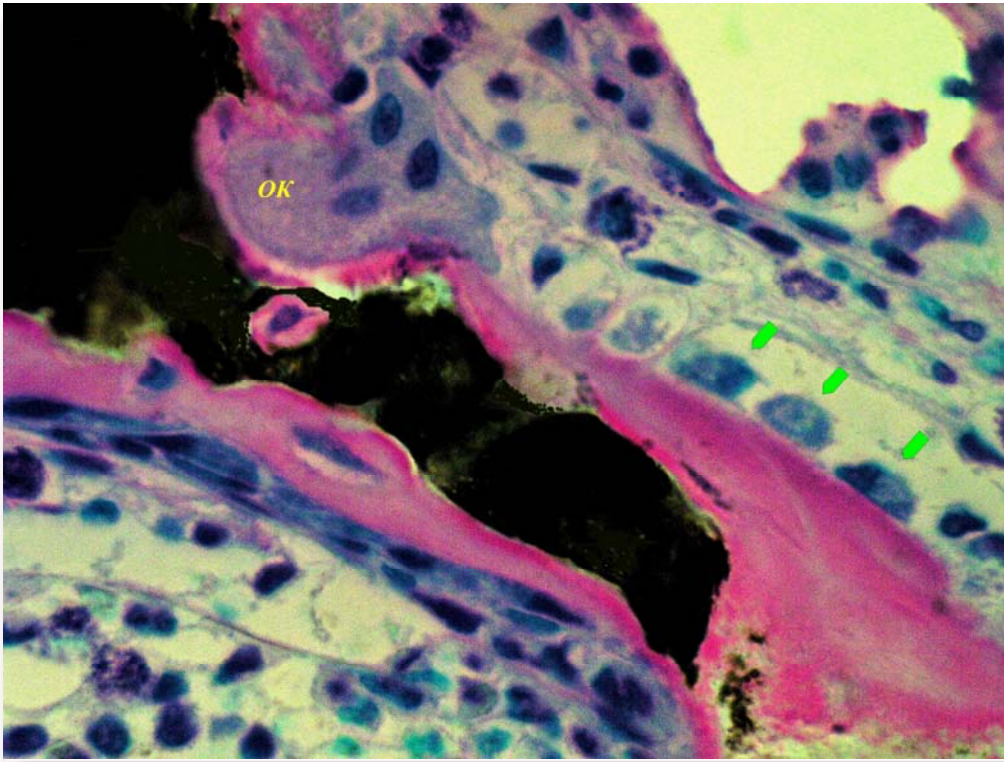


Рис. 3. Трабекула вторичной спонгиозы большеберцовой кости крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. $\times 1000$. ОК – остеокласт.

Полученные таким образом срезы позволяют определять следующие статические параметры костеобразования и резорбции, рекомендуемые номенклатурным комитетом по гистоморфометрии American Society of Bone and Mineral Research (Parfitt et al., 1987):

- 1) параметры костеобразования:
 - OV/BV – osteoid volume – объем остеоида – часть (%) губчатой костной ткани, которая не подверглась кальцификации;
 - Os/Bs – osteoid surface – поверхность остеоида – часть (%) общего периметра губчатой костной ткани, которая покрыта остеоидом;
 - O.Th – osteoid thickness – толщина остеоида – средняя толщина (мкм) пластов остеоида;
 - Ob.s/Bs – osteoblast surface – поверхность остеобластов – часть (%) общего периметра губчатой костной ткани, покрытой активными ос-

теобластами;

2) параметры резорбции:

- Es/Bs – eroded surface – эрозированная поверхность – часть (%) поверхности губчатой кости покрытой лакунами резорбции;
- Oc.s/Bs – osteoclast surface – поверхность остеокластов – часть (%) общего периметра губчатой костной ткани, покрытой остеокластами.

Вместо последнего показателя можно определять количество остеокластов N.Oc (number of osteoclasts) на квадратный миллиметр среза кости или N.Oc/Bs количество остеокластов на миллиметр поверхности губчатой кости.

Подобной методикой можно воспользоваться и для определения динамических параметров ремоделирования кости, что и будет проведено нами в дальнейшем.

Литературные источники

An Y. H. Handbook of histology methods for bone and cartilage / Y. H. An, K. L. Martin. – NY : Humana Press, 2003. – 587 p.

Bone pathology / edited by J. S. Khurana. – NY : Humana Press, 2009. – 408 p.

Bone research protocols (Methods in molecular medicine) / edited by M. H. Helfrich, S. H. Ralston. – NY : Humana Press, 2003. – 468 p.

Bone histomorphometry: standartization of

nomenclature, symbols and units / A. M. Parfitt, M. K. Drezner, F. H. Glorieux [et al.] // J. Bone Min. Res. – 1987. – Vol. 2, № 6. – P. 595-610.

Ковешніков В. Г. Метод морфометричного дослідження та оцінки структурно-функціонального стану кісток / В. Г. Ковешніков, С. А. Кащенко, В. В. Маврич // Клінічна анатомія та оперативна хірургія. – 2004. – Т. 3, № 2. – С. 59-62.

Микроскопическая техника / под ред. Д. С. Саркисова, Ю. Л. Перова. – М. : Медицина, 1996. – 544 с.

Пикалюк В. С. Методичні аспекти дослідження скелету людини і тварин / В. С. Пикалюк. – Сімферополь, 2007. – 272 с.

Риггз Б. Л. Остеопороз / Б. Л. Риггз, Л. Дж. Мелтон III. – М.–СПб : БИНОМ, Невский диа-

лект. – 2000. – 560 с.

Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М. : Издательство иностранной литературы, 1953. – 718 с.

Уикли Б. С. Электронная микроскопия для начинающих / Б. С. Уикли. – М. : Мир, – 1975. – 324 с.

Пикалюк В.С., Кутя С.А., Шадуро Д.В. Модифікація методики гістологічного дослідження кісткової тканини.

Резюме. У статті надається опис методики отримання, забарвлювання та подальшої морфометрії недекальцинованих зрізів кісток.

Ключові слова: методика, гістологічне дослідження, кісткова тканина, недекальциновані зрізи.