

Методика выявления остеоидных зон в костной ткани на полутонких срезах недекальцированной кости

Ю.М. Ирьянов, Е.Н. Горбач

The technique to reveal osteoid zones of bone tissue in half-thin sections of non-decalcified bone

Y.M. Irianov, E.N. Gorbach

Государственное учреждение науки

Российский научный центр "Восстановительная травматология и ортопедия" им. академика Г. А. Илизарова, г. Курган (генеральный директор — заслуженный деятель науки РФ, член-корреспондент РАМН, д.м.н., профессор В.И. Шевцов)

При исследовании процессов костеобразования необходимо дифференцировать на срезах остеоид и минерализованную костную ткань. За основу метода была принята одна из модификаций трехцветной окраски по Массону для декальцированных парафиновых и целлоидиновых срезов (С.Н.Асонова, Н.С.Мигалкин, 1996г). Индивидуально для каждого этапа нами определено время и условия окрашивания. Этапы обезвоживания в спиртах, просветления в карбол-ксилоле и ксилоле были заменены высушиванием окрашенных срезов на воздухе. Полутонкие срезы обрабатывали смесью Буэна, окрашивали раствором бибрихского алого и кислого фуксина. Под микроскопом срезы дифференцировали в смеси растворов фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот, затем окрашивали раствором анилинового голубого, дифференцировали в 1% растворе уксусной кислоты, промывали водопроводной, затем - дистиллированной водой, высушивали на воздухе и заключали в полистирол. Результат: остеоидная ткань - интенсивно розовая, минерализованная костная ткань - синяя.

Ключевые слова: костеобразование, остеоид, минерализация, полутонкие срезы, окрашивание, световая микроскопия, рентгеновский электронно-зондовый микроанализ.

While studying osteogenesis processes differentiation of osteoid and mineralized bone tissue in sections is necessary. A modification of three-colour Masson staining for decalcified paraffin and celloidin sections was taken as a basis. Time and conditions of staining were determined by us for each stage individually. The stages of dehydration in spirits, clarifying in carboxylol and xylole were replaced by drying of the stained sections with air. Half-thin sections were treated with Buen mixture, stained with solution of Biebrich scarlet red and acid red (fuchsin). Microscopically sections were differentiated in the mixture of solutions of phosphomolybdenic and phosphotungstenic acids, then they were stained with solution of aniline blue, differentiated in 1% solution of acetic acid, washed in supplied water and then – in distilled water, dried with air and enclosed in polystyrene. As a result osteoid tissue was intensively pink, mineralized bone tissue – blue.

Keywords: osteogenesis, osteoid, mineralization, half-thin sections, staining, light microscopy, roentgen electron-probe microanalysis.

ВВЕДЕНИЕ

При проведении количественного анализа процесса репаративного костеобразования возникает необходимость дифференцировать на срезах остеоидные зоны, являющиеся участками аппозиционного роста костной ткани. Одной из немногочисленных методик, позволяющих дифференцировать по цвету минерализованную костную ткань и остеоид, является трехцветная окраска по Массону. Оригинальный метод Массона и некоторые его модификации, предло-

женные для окрашивания парафиновых срезов, описаны в монографиях Б.Ромейса [1] и Р.Лилли [2]. Описана модификация этого метода для окрашивания парафиновых и целлоидиновых срезов декальцированной костной ткани. [3].

Цель исследования - разработка методики для окрашивания остеоида на полутонких срезах недекальцированной кости.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Использовали материал новообразованных участков коркового слоя диафизов большебер-

цовых костей 7 взрослых собак при удлинении голени через 1 месяц после снятия аппарата.

Кусочки регенератов объемом 1-2 мм³ фиксировали в 2% забуференных растворах параформальдегида и глутаральдегида, дофиксировали в 1% растворе четырехоксида осмия, обезвоживали и заливали в аралдит. Полутонкие срезы толщиной 2 мкм изготавливали на ультратоме "LKB 2188 Ultratome NOVA". Окра-

шенные срезы изучали при помощи фотомикроскопа фирмы "Opton". После изготовления срезов поверхности блоков исследовали при помощи рентгеновского зондового микроанализатора "ЛИНК 860-500", установленного на сканирующем электронном микроскопе "JSM-840".

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

За основу предлагаемого метода была принята одна из модификаций трехцветной окраски по Массону для декальцинированных парафиновых и целлоидиновых срезов [3]. Для каждого этапа окрашивания нами определены оптимальное время и условия. Этапы обезвоживания в спиртах, просветления в карбол - ксилоле и ксилоле были заменены высушиванием окрашенных срезов на воздухе с целью исключения обесцвечивания красителей. Полутонкие срезы в течение 90 минут обрабатывали смесью Буэна (75 мл насыщенного раствора пикриновой кислоты, 25мл 10% формалина, 5 мл ледяной уксусной кислоты), окрашивали 1 мин. при t -57 градусов красящим раствором, который состоял из бибрихского алого и кислого фуксина (1% водный раствор бибрихского алого - 90 мл, 1% раствор кислого фуксина - 10мл, ледяная уксусная кислота - 1мл). Под микроскопом срезы дифференцировали в смеси 2,5%-ных растворов фосфорно-молибденовой и фосфорно-вольфрамовой кислот, затем в течение 2-х минут окрашивали раствором анилинового голубого (2г анилинового голубого, 2мл ледяной уксусной кислоты и 100мл дистиллированной воды), 2 минуты дифференцировали в 2-х порциях 1%-ного раствора уксусной кислоты, промывали по 5 минут в 3-х порциях водопроводной, затем - дистиллированной воды, высушивали на воздухе и заключали в полистирол. Результат: остеидная ткань окрашивается в интенсивно розовый или малиновый цвета вследствие образования "кальциевого лака" [1], минерализованная костная ткань, в зависимости от степени минерализации, принимает различные оттенки синего цвета – от интенсивно синего (менее минерализованные участки) до голубого (полностью минерализованные зоны) (рис. 1).

Для контроля специфичности окрашивания при помощи рентгеновского зондового микроанализатора исследовали поверхности блоков, с которых были изготовлены полутонкие срезы недекальцинированной костной ткани. Сравнивали и анализировали карты рентгеновского электронно-зондового микроанализа, полученные в характеристическом рентгеновском излучении кальция (рис. 2) и окрашенные по предлагаемому методу полутонкими срезами (рис. 1). Установлено, что участки, окрашенные на полутонких срезах в разные оттенки синего цвета,

соответствовали (на картах микроанализа) минерализованным участкам кости, а окрашенные в ярко-розовый или малиновый цвет - остеиду.

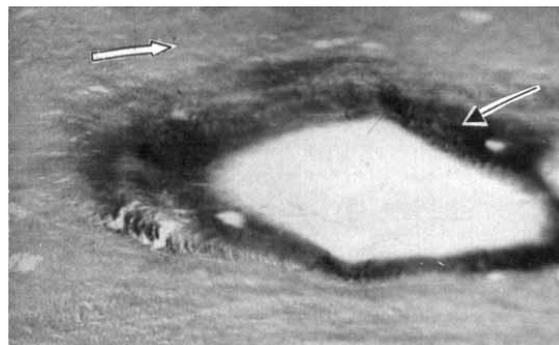


Рис. 1. Полутонкий срез участка новообразованного коркового слоя диафиза большеберцовой кости при удлинении голени по Илизарову через 32 дня после снятия аппарата. Остеидная кайма по периферии гаверсова канала четко контрастирует с более бледно окрашенными участками минерализованной костной ткани. Наиболее темные участки среза на фото соответствуют в оригинале малиновому цвету, более светлые - голубому. Тонкой стрелкой обозначен остеид, толстой - минерализованная костная ткань. Модифицированная окраска по Массону. Объектив x 40, окуляр x 10. Увеличение x 400.

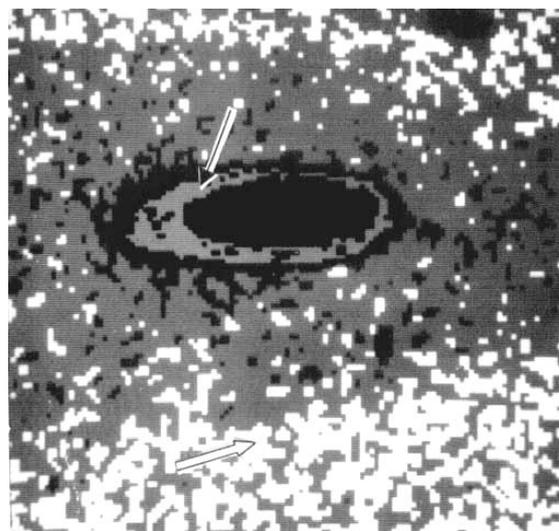


Рис. 2. Поверхность блока после изготовления полутонкого среза. Карта рентгеновского электронно-зондового микроанализа. Изображение в характеристическом рентгеновском излучении кальция. Четко визуализирована расположенная по периферии гаверсова канала зона остеидной ткани (тонкая стрелка), значительно отличающаяся по степени кальцификации от более минерализованных участ-

ков (толстая стрелка) и соответствующая остеоидной кайме на рисунке 1. Увеличение x 250.

Таким образом, разработанная нами методика позволяет дифференцировать остеоидную и минерализованную костную ткань на полутонких срезах недекальцинированной кости, что обеспечивает возможность проведения количе-

ственных исследований репаративного костеобразования при помощи метода компьютерной морфометрии изображений и, в частности, позволяет изучить количественные показатели остеогенной активности в регенерате и в костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ромейс Б. Микроскопическая техника. - М., 1953. - 712 с.
2. Лилли Р. Патогистологическая техника и практическая гистохимия. - М.: Мир, 1969. - 624 с.
3. Асонова С.Н., Мигалкин Н.С. Использование трихромного метода Массона для окраски декальцинированной костной ткани // Архив патологии. - 1996. - №1. - С. 66-67.

Рукопись поступила 09.01.01.