

УДК: 611.71:616-076

© Пикалюк В.С., Кутя С.А., 2011

## МЕТОДИКА ПОЛУЧЕНИЯ И ОКРАШИВАНИЯ СРЕЗОВ НЕДЕКАЛЬЦИНИРОВАННЫХ ОБРАЗЦОВ КОСТИ

Пикалюк В.С., Кутя С.А.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского»

Пикалюк В.С., Кутя С.А. Методика отримання та забарвлення зрізів недекальцинованих зразків кістки // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 206-207.

У статті подається описання оригінальної методики отримання та забарвлення недекальцинованих зрізів кісток щурів.

**Ключові слова:** методика, гістологічне дослідження, кістки, недекальциновані зрізи.

Пикалюк В.С., Кутя С.А. Методика получения и окрашивания срезов недекальцинированных образцов кости // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 206-207.

В статье приводится описание оригинальной методики получения и окрашивания недекальцинированных срезов костей крыс.

**Ключевые слова:** методика, гистологическое исследование, кости, недекальцинированные срезы.

Pikalyuk V.S., Kutya S.A. Method of preparation and staining of undecalcified sections of bones // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 206-207.

Article contains description of original method of preparation and staining of undecalcified sections of rat's bones

**Key words:** method, histologic study, bones, undecalcified sections.

Необходимость получения срезов недекальцинированной кости вызвана тем, что декальцинация образцов кости имеет ряд недостатков, снижающих информативность гистоморфометрии. По мнению Ю. Франке и Г. Рунге (1995) они сводятся к следующему [4]:

- невозможность различать на препаратах минерализованную и остеоидную костную ткань;
- сложность оценки связи костных клеток с костной тканью;
- невозможность использования метода двойной тетрациклиновой метки, что не позволяет изучать процессы костеобразования и минерализации во времени;
- частые проблемы с оценкой архитектоники губчатого вещества кости из-за возникновения множества артефактов.

Нами разработана методика получения недекальцинированных срезов костной ткани крыс линии Вистар и их последующей окраски. Методика основана на общеизвестных методологических приемах, но в таком сочетании и последовательности ранее не применявшихся.

Вначале кусочки костной ткани фиксируют в 70% этиловом спирте в течение суток [5]. 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 [3]:

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.
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.

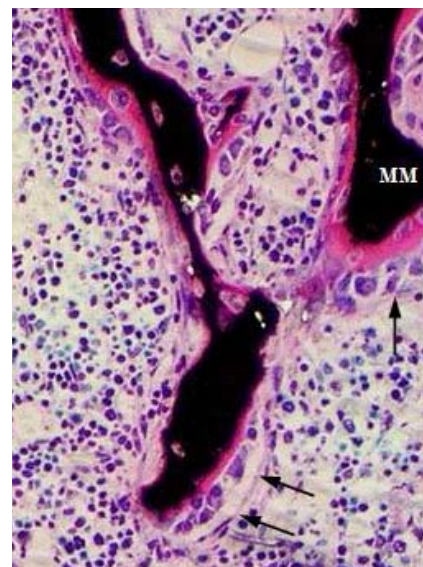
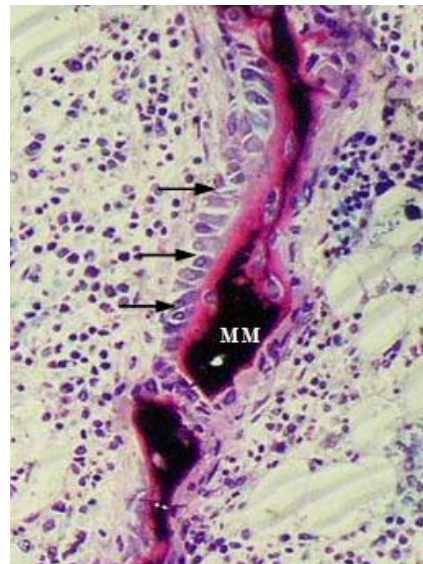
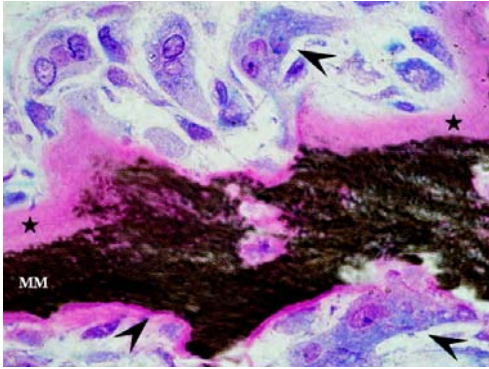
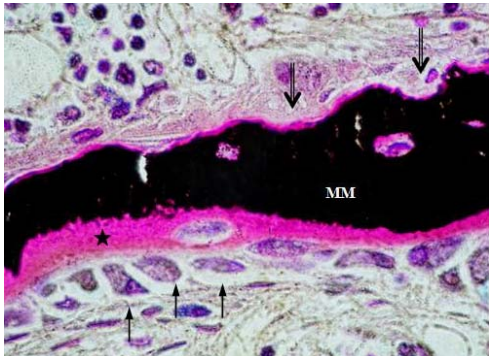


Рис. 1. А и Б. Трабекулы вторичной спонгиозы большеберцовой кости крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. Ув. 400. Здесь и далее: MM – минерализованный матрикс, стрелками обозначены активные остеобласты.



**Рис. 2.** Трабекулы тела позвонка крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. Ув. 1000. Стрелками обозначены остеокласты, звездочкой (здесь и далее) – остеоид.



**Рис. 3.** Трабекулы тела позвонка крысы линии Вистар. Окраска по предлагаемой методике. Ув. 1000. Стрелками в верхней части рисунка обозначены резорбционные лакуны, а в нижней – активные остеобласты.

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

Полученные полутонкие срезы окрашиваются по методу Косса, являющимся 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.

Процедура окраски следующая [2]:

1. Поместить срезы 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. Промыть в трех сменах дистиллированной воды.

3. Обработать 2,5% тиосульфата натрия 2 – 3 минуты.

4. Хорошо промыть в дистиллированной воде.

На последующих этапах производили окрашивание клеток и остеоида.

5. Окрасить 1% раствором метиленового синего 30 – 60 секунд. Методика приготовления 1% раствора метиленового синего: вначале готовится насыщенный водный раствор (на дистиллированной воде), который смешивается через 2 дня с 90% этанолом в соотношении 1:1. Затем из этого маточного раствора готовится 1% водный (на проточной воде) раствор метиленового синего [1].

6. Промыть в проточной воде.

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

8. Промыть в проточной воде.

Длительность экспозиции указана приблизительно, поэтому ход окрашивания необходимо контролировать при помощи микроскопа.

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

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

Предлагаемая методика может быть полезна в морфологических исследованиях как для оценки гистологической структуры костной ткани, так и для постановки гистохимических реакций, включая лектино- и иммуногистохимию.

#### ЛИТЕРАТУРА:

1. Микроскопическая техника / под ред. Д.С. Саркисова, Ю.А. Перова. – М.: Медицина, 1996. – 544 с.
2. Ромейс Б. Микроскопическая техника / Б. Ромейс. – М.: Издательство иностранной литературы, 1953. – 718 с.
3. Уикли Б.С. Электронная микроскопия для начинающих / Б.С. Уикли. – М.: Мир, – 1975. – 324 с.
4. Франке Ю. Остеопороз / Ю. Франке, Г. Рунге ; пер. с нем. А.Ю. Болотина и Н.М. Мылов. – М.: Медицина, 1995. – 304 с.
5. An Y.H. Handbook of histology methods for bone and cartilage / Y.H. An, K.L. Martin. – NJ: Humana Press, 2003. – 587 p.

Надійшла 07.09.2011 р.

Рецензент: проф. В.І.Лузін

УДК 546.815/.819: 616. 94+034.4: 615.015.25

© Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А., 2011

## БАЛАНС МИКРОЭЛЕМЕНТОВ РЕГЕНЕРАТА НИЖНЕЧЕЛЮСТНОЙ КОСТИ НА ФОНЕ СВИНЦОВОГО ОТРАВЛЕНИЯ И АНТИТОКСИЧЕСКОЙ КОРРЕКЦИИ Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А.

ГУ «Крымский государственный медицинский университет им. С.П. Георгиевского»

**Пикалюк В.С., Мостовой С.О., Плеханова К.А., Верченко И.А.** Баланс микроэлементов регенерата нижней челюстной кости на фоне свинцового отравления и антитоксической коррекции // Украинський морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 207-210.

В статье представлены результаты исследования химического состава регенерата нижней челюсти на фоне свинцовой интоксикации и проведенной антитоксической коррекции. С помощью методов вариационной статистики определены показатели, которые наиболее полно характеризуют процессы оссификации, протекающие в регенерате в разные сроки исследования.

**Ключевые слова:** регенерат, Pb, "МагнеВ6", "Тетрацин-кальций", рентгено-флюорисцентный анализ.