

МОРФОЛОГІЧНІ МОЖЛИВОСТІ КІЛЬКІСНОГО СТЕРЕОМЕТРИЧНОГО АНАЛІЗУ МІКРОСТРУКТУРИ КІСТКИ ЗА РЕЗУЛЬТАТАМИ РАСТРОВОЇ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ

Пикалюк В.С.

ДУ «Кримський державний медичний університет ім. С. І. Георгієвського»

Пикалюк В.С. Морфологічні можливості кількісного стереометричного аналізу мікроструктури кістки за результатами растрової електронної мікроскопії // Український морфологічний альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С.214-216.

В статті подається оригінальна методика стереометричного аналізу мікроструктури кістки за результатами растрової електронної мікроскопії. Аналізуються кількісні та якісні площинні та об'ємні морфологічні параметри кісткової тканини, отримані автором на великому експериментально-клінічному матеріалі.

Ключові слова: кістка, стереометричний аналіз, растрова електронна мікроскопія

Пикалюк В.С. Морфологические возможности количественного стереометрического анализа микроструктуры кости по результатам растровой электронной микроскопии // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С.214-216.

В статье подается оригинальная методика стереометрического анализа микроструктуры кости по результатам растрового электронного изображения. Анализируются морфологические количественные и качественные параметры костной ткани, полученные автором на большом экспериментально-клиническом материале.

Ключевые слова: кость, стереометрический анализ, растровая электронная микроскопия.

Pikalyuk V.S. The morphological capabilities of the quantitative stereometric analysis of the bone microstructure based on the results of scanning electron microscopy // Украинский морфологический альманах. – 2011. – Том 9, № 3. – С. 214-216.

At this article own original method of stereometric analysis of the bone microstructure based on the results of the scanning electron image is presented. Obtained by the author with large experimental and clinical material, bone's quantitative and qualitative morphological parameters are analyzed.

Key words: bone, stereometric analysis, scanning electron microscopy.

Вплив екоантропофакторів (хімікотоксикологічних, підвищеної радіації та ін.) на кісткову тканину – важлива наукова проблема сучасності, що має практичне значення для розробки оптимальної тактики лікування хворих, профілактики ускладнення після радіаційного ураження людей та прогнозування екологічної екстремальності (1, 2).

Як правило, дослідження з цієї проблеми проводяться тільки в якісному плані.

Нами розроблені принципово нові (стереолого-стереометричні) методи оцінки трансформації структури кісткової тканини, зокрема її пористості, особливостей мікрорельєфу поверхневих елементів та ін. Здійснено пошуки закономірностей цих змін із широким використанням растрової електронної мікроскопії. Розроблена комп'ютерна технологія біостереометричного моделювання морфогенезу (3, 4).

Виконані нами пошукові наукові дослідження підтвердили перспективність такого напрямку в остеології і можливість отримання фундаментальних результатів на якісно вищому рівні пізнання.

Матеріал і методи дослідження. До середини 60-х років дослідження кісткової тканини на субмікронному рівні було утруднене, оскільки у дослідників не було досить надійного інструмента для вивчення надтонких структур. Світлова оптика не забезпечувала потрібної роздільної здатності для вивчення морфології кісткової тканини, її окремих компонентів, типів контактів між ними, характеру порового простору, орієнтації пор у просторі. Просвічуючий електронний мікроскоп, хоч і має високу роздільну здатність, проте в більшості випадків застосовується для вивчення субклітинних структур, органічного матриксу, кристалорафічних особливостей кісткової тканини (5, 6).

Принципово новий етап у мікроструктурних дослідженнях почався з використанням растрової електронної мікроскопії. Нами виконані пошукові дослідження по розробці оригінальних стерео-

остеометричних кількісних методів, які основані на цифровій фотограмметричній обробці РЕМ-зображень. Вони дозволяють отримати фундаментальні результати на якісно вищому рівні пізнання. Спосіб базується на поєднанні принципів електронної мікротомографії та стереовимірювань, що виводить нас на новий рівень кількісної інтерпретації архітектури загиблених фрагментів неоднорідного за композицією та дисперсністю об'єкта. Розв'язання оберненої задачі комп'ютерної томографії по реконструкції внутрішньої будови об'єкта за даними енергетичних спектрівідбитих електронів за алгоритмами, розробленими для стереозображень, є абсолютно оригінального методикою (7, 8).

Використовуючи інформацію про мікрогеометрію поверхні фрагментів кісток, можна говорити про розміри мікроагрегатів та часток, характер контакту між ними, їх роль в організації структури, стійкість елементів структури. Дати кількісну оцінку цієї інформації можна шляхом вимірювання розмірів елементів рельєфу, обліком їх відносного розміщення. Врахувати такі деталі можна тільки за допомогою побудови цифрових моделей мікрорельєфу поверхні зразка та наступного аналізу. Велика глибина фокуса і висока роздільна здатність РЕМ дозволяють ефективно використовувати стереоскопічну зйомку для одержання їх об'ємного відтворення. При цьому використовуються напівтонові зображення, отримані в режимі вторинної електронної емісії (9, 10).

Для РЕМ аналізу під час хірургічних втручань та біопсії відібрали зразки кісткової тканини у 50 пацієнтів ортопедичного відділення ВМГО віком від 4 до 24 років. Спектр клінічних діагнозів кісткової патології включає в себе більше десяти нозологій (хвороба Патерса, солітарна та дистрофічна кістка, кістково-хрящові екзостози, остеоми різної локалізації, патологічні переломи та остеохондропатії, вроджені вади скелету). Експериментальний матеріал для дослідження наданий інститутом зоології НАГУ (проф. Н.

В. Радіонова), науково-технічним центром міжнародних досліджень у м. Чорнобилі (к.б.н. М. Ю. Алексіна).

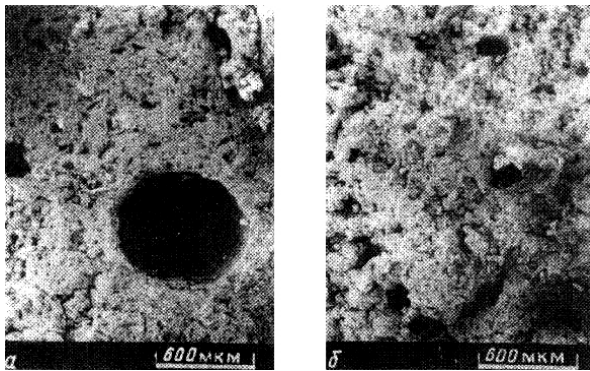
Растрова стереомікроскопія дозволила провести просторову реконструкцію поверхневого мікрорельєфу, побудували її об'ємну цифрову модель, а мікрофотографія в режимі відбитих електронів дозволила віалізувати підповерхневі багатошарові мікроструктури. Для окремих випадків проведена кількісна оцінка глибоких мікроструктур. Результати стереомікротомографічної реконструкції представлені у вигляді тривимірних блок-діаграм, карт ізоліній мікрорельєфу та набору поперечних січень підповерхневої мікроструктури вздовж заданих напрямів, за якими ми визначали розміри досліджуваного мікро-

об'єкта (поровий простір, макропора, мікрофібрила, кісткова клітина чи її органоїд тощо). Отримана об'ємна цифрова модель з метою контролю якості багаторівневих інтегральних мікросхем підлягала подальшому автоматичному аналізу.

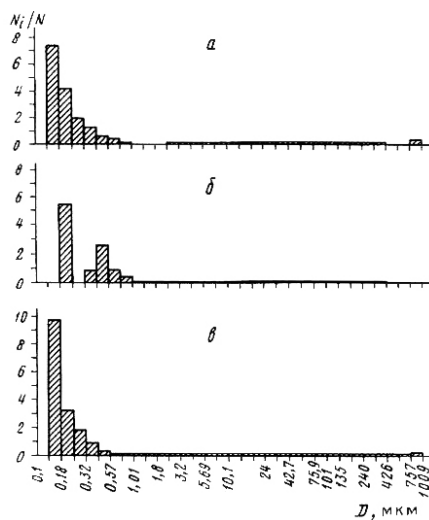
Результати власних спостережень. Результати кількісного аналізу мікроструктури зразків, отриманих при стереоаналізі РЕМ-зображень по програмі СТІМАН (табл. 1, мал.1, 2) показали, що загальна пористість губчастих кісток складає 40,43 %, а сам поровий простір представлений 4 категоріями пор: а) ультрамікропори Δ_1 – з Δ 0,1030 – 0,4591 мкм; б) тонкі мікропори Δ_2 – з Δ – 0,4591 – 0,8680 мкм; в) дрібні пори Δ_3 – з Δ 0,8680 – 9,4595 мкм; г) великі пори Δ_4 – з Δ 9,4595 – 74,3715 мкм.

Таблиця 1. Підсумкова таблиця результатів структурного аналізу

Кількість пор	281421
Пористість (%)	29,88
Загальна площа пор (мкм ²)	195774
Загальний периметр пор (мкм)	883912
Середній діаметр (мкм)/середнє квадратичне відхилення	0,470336/0,6645
Середня площа (мкм ²)/ середнє квадратичне відхилення	0,695663/9864,1
Середній епіметр/середнє квадратичне відхилення	3,14089/91,652
Піттома поверхня	1,14142
Фільтраційний коефіцієнт	12,0271



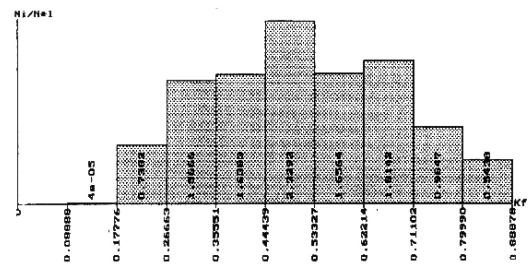
Мал. 1. Зображення окремих ділянок з макропорою (а) і без макропори (б)



Мал. 2. Результати кількісного морфологічного аналізу мікроструктури зразка: а – показано на мал. 1а; б – на мал 1б; в – узагальнені результати кількісного морфологічного аналізу по 10 ділянкам.

За допомогою гістограм розподілу пор по площі оцінено вклад кожного виду пор в загальний поровий простір. Найбільш численні ультрамікропори Δ_1 , через свої маленькі розміри складають лише 6,7

% загального порового простору; Δ_2 (тонкі) – 2,8%, Δ_3 – 37,5 %, а Δ_4 , хоч і найменше за кількістю, але через великі розміри займають 53 % об'єму.



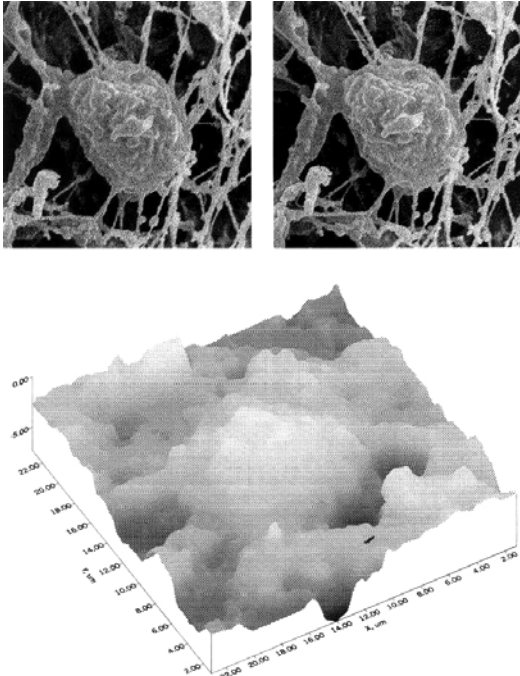
Мал. 3. Гістограма розподілу за факторами форми

Аналіз гістограм розподілу пор по фактору форми (мал 3) і графіка залежності фактора форми пор від їх площі (мал 4) показав, що в поровому просторі превалюють подовжені ізометричні великі та дрібні мікропори. Рідше зустрічаються видовжені та щільні тонкі та ультрамікропори.

Досліджені зразки мають ізотропну (К – 5,6%, 4,0%, 3,7%), слабоізотропну (К – 11,0%, 8,7%) і анізотропну (К – 31,4 %) мікроструктуру. Остання свідчить про інтенсивність перебудови структури кісткової тканини, викликаної побічними факторами. Спостерігається також суттєва різниця в розподілі пор за фактором форми. Для кістки в ембріональний період розвитку значний процент (39 %) складають пори $F=0,43 - 0,45\%$, для постнатального – 20 – 26 %. Спостерігається різниця в розмірах пор. Максимального значення середній діаметр досягає в ембріональних зразках (0,91 – 1,18 мкм), в постнатальних – 0,29 – 0,35 мкм. Очевидно, процес формування стабільного діаметра пор не закінчується в цей період, а триває, напевно, весь ростовий період, хоча, можливо, терпить певні кількісно-характеристичні зміни протягом усього життєвого циклу. Виявлені особливості мікроструктури кістки і, перш за все, особливості порового простору, в основному і визначають її специфічні міцнісні і деформаційні властивості.

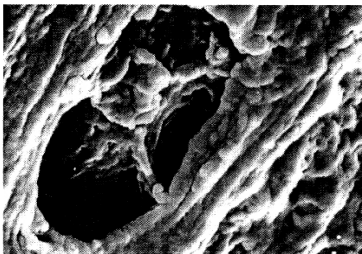
Об'ємний стереоаналіз РЕМ зображень виявив вікові (філогенетичні) та онтогенетичні трансфор-

маїї мікроструктури поверхні кістки, стереологічних характеристик порового простору, зайнятого органічним матриксом та водою; тривимірних (об'ємних) структур кісток – кристалічних апатитних решіток; взаємодію щільності мінералізованого, органічного і клітинного компонентів; клітинного складу кісткової тканини та хряща, їх просторово-об'ємних співвідношень.

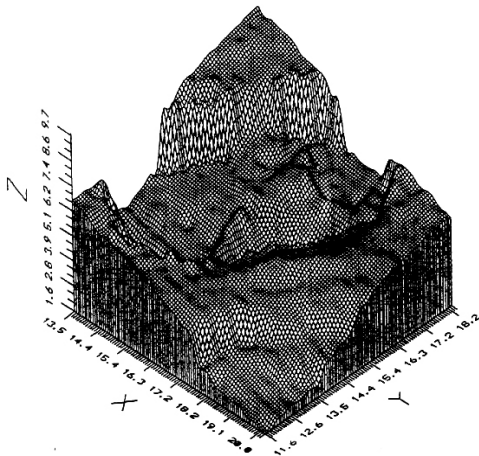


Мал. 4. Приклад РЕМ-стереопари губчастої кістки. Ізометрична блок-діаграма тривимірної моделі мікрорельєфу

а)



б)



Мал. 5. Мікрофотографія ураженої кісткової тканини (а). Тривимірна модель для визначення об'ємних характеристик (б).

Ендогенні чи екзогенні фактори змінюють динаміку диференціювання і функціональну активність

клітин остеобластного диферону, що веде до коливань їх синтезуючої здатності і модифікацій ультраструктури кістки.

Мас-спектральний аналіз, проведений в тих же гістоструктурах, виявив зростання у 3 – 10 разів концентрацію іонів Mg, Sr, Mn, Zn, Co і у 20-3 рази понижений вміст K і Fe.

Висновки: 1. На основі цифрової фотограмметричної обробки РЕМ-зображень можна розробити коректні якісні та кількісні критерії морфологічної оцінки впливу антропогенного навантаження на ріст, будову, структуру, формування кісткової тканини, виявити вікові та патогенетичні морфологічні зміни у мікроструктурі сполучної тканини під впливом екзогенних та ендогенних факторів різної етіології.

2. Кінцеві результати визначення просторових морфологічних параметрів структурних елементів хряща чи кістки дозволяє виявити тонкі етіопатогенетичні механізми різних нозологій, прослідкувати характер і ареал ураженості, достовірно оцінити вікові та патологічні екоантропогенні морфологічні зміни структури тканини, що є вкрай необхідним для вироблення практичної оптимальної тактики терапії, реабілітації та прогнозування.

3. Об'ємний кількісний стереоаналіз РЕМ-зображень дозволяє виявити вікові філо- та онтогенетичні трансформації мікроструктури кістки, описати кількісні стереометричні характеристики порового простору, зайнятого органічним матриксом і водою, встановити об'ємно-цифрові параметри співвідношень мінерального, органічного і клітинного компонентів кістки.

ЛІТЕРАТУРА:

1. Пикалюк В. С., Мельник В. М., Клімова Р. О., Функціональний взаємозв'язок інтенсивності радіоактивного забруднення із захворюваністю скелета жителів контрольованої зони Волині // IX конгрес СФУАТ – Луганськ – Київ – Чикаго. – 2002. – с. 450.
2. Пикалюк В. С., Клімова Р. О., Шевчук Т. Я., Музиченко О. С. Структурно-метаболичні наслідки екзогенного впливу на організм остеотропних антропогенних факторів // Тавричеський медико-біологічний журнал. – 2002, т.5, в.5, №3. – С.140 – 142.
3. Пикалюк В. С., Мельник В. М. Рем-стереометрична характеристика об'ємно-просторової організації структури довгих кісток скелету // Акт. питання морфології. – Тернопіль, Укрмедкнига, 2002. – С. 233 – 234.
4. Мельник В. М., Пикалюк В. С. Стереометричний аналіз РЕМ-зображень мікроструктури поверхні кістки // Укр. мед. альманах. – 1998, №3. – С. 14-16.
5. L. Jacobson. Om Primordial Craniet. – Forh. vid. de Skand. aturstredge Mote. – Stockholm. – 1842.
6. Пикалюк В. С. Морфологічно-функціональні аспекти поняття росту та мінералізації кістки // Науковий вісник ВДУ, серія «Біологія. Медицина». – 1998, №4. – с. 5-10.
7. Мельник В. М., Лихотоп Р. Пространственное моделирование и применение современных методов стереологической и стереометрической оценок в биологии и медицине // Укр. журнал медичної техніки і технології. – 1998, №3. – С. 9 – 20.
8. Пикалюк В. С., Мельник В. М., Клімова Р. О. Стереолого-стереометричний аналіз неоднорідних полідисперсних структур кісткової тканини дітей з патологією опорно-рухового апарату // Проблеми остеології, 2001, т.4, №3. – С. 80-81.
9. Пикалюк В. С. Об'ємно-просторова характеристика структури кістки за даними растрової електронної мікроскопії // Укр. медичний альманах. – 2003, №2. – С. 117 – 121.
10. Пикалюк В. С. Якісна та кількісна характеристика стереометричної структури кістки за даними растрової електронної мікроскопії // Труды Крымского государственного медицинского университета им. С. И, Георгиевского, 2006, т. 142, ч. 1. – С. 60 – 62.

Надійшла 15.09.2011 р.
Рецензент: проф. В.І.Лузін