



Сучасні методи вивчення якісних та кількісних параметрів кісток

Василь Пикалюк¹, Олександр Слободян², Віталій Сікора³,
Ольга Антонюк², Альона Романюк¹

¹Волинський національний університет імені Лесі Українки, Луцьк, Україна

²Буковинський державний медичний університет, Чернівці, Україна

³Сумський державний університет, Суми, Україна

Адреса для листування: pikaluk@ukr.net, med.sumdu.edu.ua, olha.antonyuk@yahoo.com, romaniuk.alona@vnu.edu.ua

Отримано: 06.03.24; прийнято до друку: 15.05.24; опубліковано: 06.06.24

Резюме. У статті розглядаються сучасні методи вивчення якісних та кількісних параметрів кісток, що відіграють ключову роль у діагностиці, лікуванні та профілактиці захворювань опорно-рухового апарату. В оглядовій статті аналізуються результати стереометричного аналізу мікроструктури кістки за результатами растрової електронної мікроскопії. Серед якісних методів особлива увага приділяється морфологічним і гістологічним дослідженням, що дозволяють оцінити структуру та стан кісткової тканини на мікроскопічному рівні. Кількісні методи включають в себе рентгенографію, комп'ютерну томографію (КТ), магнітно-резонансну томографію (МРТ), а також денситометрію, які забезпечують точне вимірювання щільності та об'єму кісткової тканини. Окремо розглянуто новітні технології, такі як тривимірна реконструкція та біомеханічне моделювання, що відкривають нові можливості для детального аналізу та індивідуального підходу до кожного пацієнта. Увага також приділяється перспективам розвитку цих методів і їх ролі у сучасній медицині. На експериментально-клінічному матеріалі аналізуються кількісні та якісні морфологічні параметри кісткової тканини. Метод лазерної поляриметрії дозволяє розглянути тонку морфоструктуру та її особливості будови кістки. Існує однозначна кореляційна залежність морфологічних параметрів кісткової тканини і станом поляризації об'єктивного лазерного поля.

Ключові слова: електронна мікроскопія, лазерна поляриметрія, кістки.

Modern methods for studying qualitative and quantitative parameters of bones

Vasil Pykalyuk¹, Oleksandr Slobodian², Vitaliy Sikora³,
Olga Antonyuk², Aliona Romaniuk¹

¹Lesia Ukrainka Volyn National University, Lutsk, Ukraine

²Bukovinian State Medical University, Chernivtsi, Ukraine

³Sumy State University, Sumy, Ukraine

Correspondence: pikaluk@ukr.net, med.sumdu.edu.ua, olha.antonyuk@yahoo.com, romaniuk.alona@vnu.edu.ua

Abstract. The article discusses modern methods for studying the qualitative and quantitative parameters of bones, which play a key role in the diagnosis, treatment, and prevention of musculoskeletal diseases. The review article analyzes the results of stereometric analysis of bone microstructure based on scanning electron microscopy. Among qualitative methods, particular attention is paid to morphological and histological studies, which allow assessing the structure and condition of bone tissue at the microscopic level. Quantitative methods include radiography, computed tomography (CT), magnetic resonance imaging (MRI), and densitometry, which provide precise measurements of bone tissue density and volume. Additionally, new technologies such as three-dimensional reconstruction and biomechanical modeling are considered, offering new opportunities for detailed analysis and personalized approaches to each patient. Attention is also given to the development prospects of these methods and their role in modern medicine. Quantitative and qualitative morphological parameters of bone tissue are analyzed based on experimental and clinical material. The laser polarimetry method allows examining the fine morphostructure

and its structural features. There is a definite correlation between the morphological parameters of bone tissue and the state of polarization of the objective laser field.

Key words: electron microscopy, laser polarimetry, bones.

ВСТУП

Растрова електронна мікроскопія кістки.

Кістка є природним матеріалом із складною ієрархічною багатомасштабною організацією, необхідною для виконання своїх функцій. Це жива біологічна динамічна тканина, яка постійно резорбується, формується та реконструюється під час росту, відновлення, старіння та захворювань. Дисбаланс синтезу і резорбції складових кістки характерний для такого системного захворювання,

як остеопороз [22]. Структури кісткової тканини складають клітинний та міжклітинний компоненти. Клітинний пул представлений трьома типами кісткових структур: остеобласти, остецити та остеокласти, взаємодія яких забезпечує морфофункціональний баланс кісткової тканини.

75 % клітин кістки – остецити, які є зрілими остеобластами. Найпоширеніші кісткові клітини, зазвичай яйцеподібної форми довжиною приблизно 15–20 мкм, оточені перицелюлярним матриксом (рис. 1) [19].

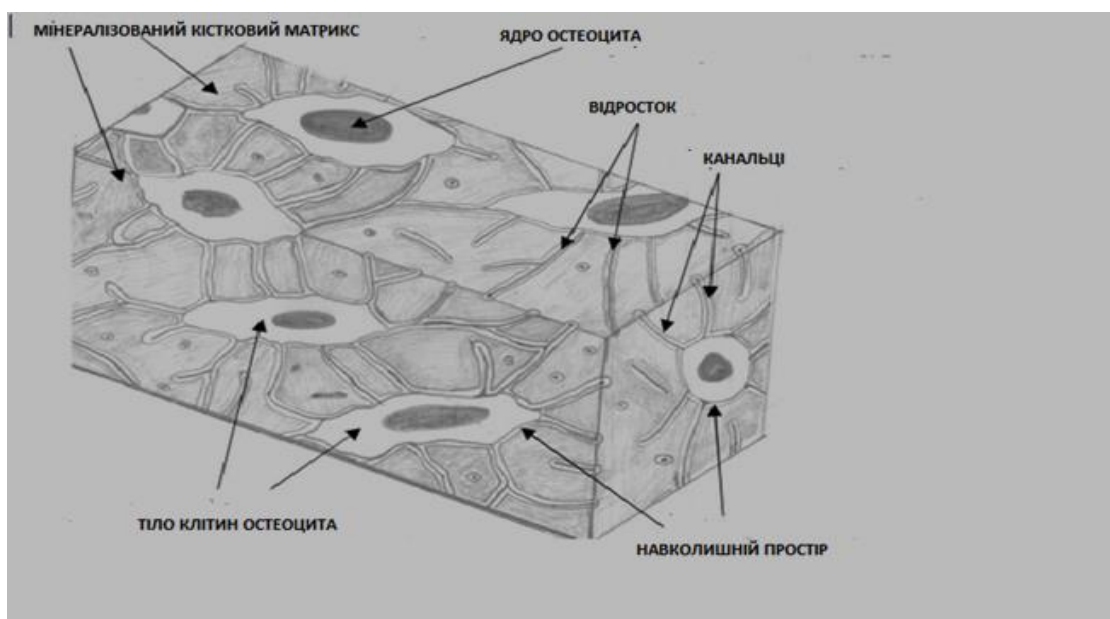


Рис. 1. Остеоцити та їхні відростки (за Goggin P., et al, 2020 [19])

Це багатофункціональні кісткові клітини, оточені мінералізованою кістковим матриксом, які ще донедавна вважалися відносно неактивними клітинами. Сьогодні відомо, що остецити є високоактивними клітинами, які є незамінними для нормального функціонування скелета, відіграючи основну роль у кількох фізіологічних процесах як усередині, так і за межами мікрооточення кістки [33]. Остеоцити виділяють склеротин-білок, який працює як негативний регулятор кісткової маси і FGF-23 (фактор росту фібробластів), найважливіший ендокринний фактор, який секретується остеоцитами, оскільки він здатний регулювати метаболізм фосфатів. Крім того, остеоцити можуть діяти як механосенсорні клітини, перетворюючи механічне напруження в хімічну сигналізацію до ефекторних клітин (остеобластів і остеокластів).

Аналіз морфології кісток на тваринних моделях щурів. Підходи кореляційної світлової та електронної мікроскопії покращують наше розуміння внутрішньоклітинних процесів, пов'язуючи молекулярну динаміку з тривимірною структурою високої роздільної здатності. Кількісне застосуван-

ня більшості методів, наразі перешкоджає обмеженням щодо точної реєстрації флуоресцентних сигналів в електронній мікроскопії [17].

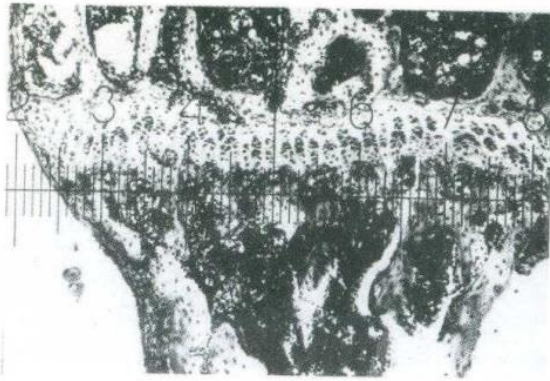
Для аналізу морфології кісток на тваринних моделях щурів проведена серія експериментів з аналізом отриманих зображень на скануючому і трансмісійному електронних мікроскопах (рис. 2–11; Пикалов В. С., 2008) [3].

Біомеханічна характеристика кістки.

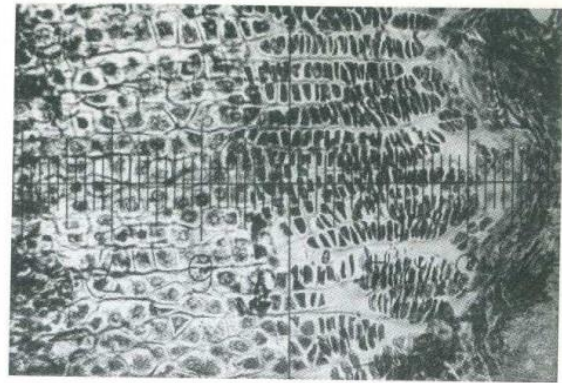
Основними параметрами кістки, які визначають її біомеханічні потенції є: *міцність кістки* – здатність чинити опір руйнуванню під дією зовнішніх сил (навантаження); *жорсткість* – можливість кістки чинити опір деформації; *пружність* – властивість тіла відновлювати початкові розміри після зняття навантаження; *пластичність* – здатність кістки отримувати великі залишкові деформації без руйнування і зберігати їх після зняття навантаження; *межа міцності (гранична напруга)* – відношення навантаження, необхідного для повного розриву (руйнування) досліджуваного зразка, до його поперечного перерізу в місці розриву; *запас міцності* – різниця максимальної міцності під

навантаженням без руйнування, що випробовується при фізіологічних умовах; *напряга* – сила, яка

приходиться на одиницю площі поперечного перерізу кістки.

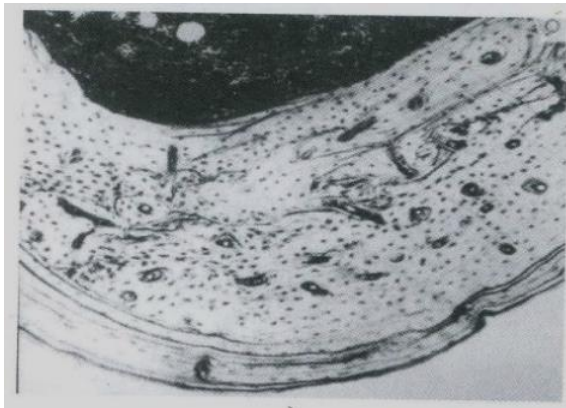


а)

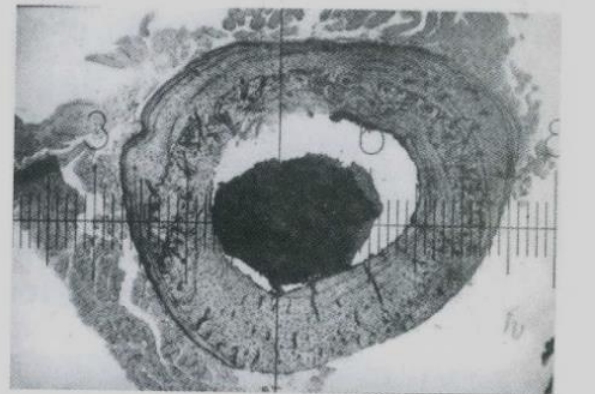


б)

Рис. 2. Типова будова метаепіфізарного хряща проксимального епіфіза великогомілкової кістки статевозрілого щура лінії Вістар. Забарвлення гематоксилін-еозином: а) зб.х60; б) зб.х200

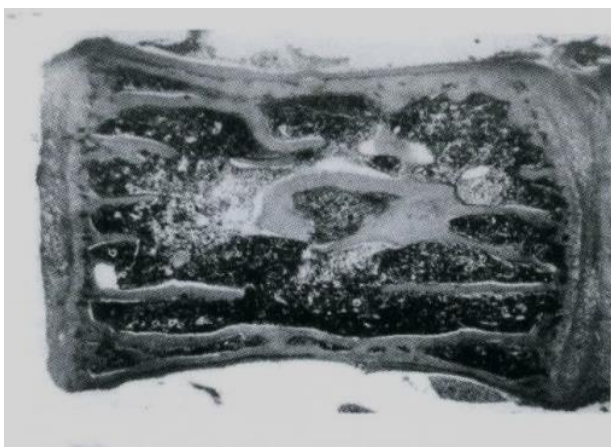


а)



б)

Рис. 3. Типова будова діяфіза великогомілкової кістки статевозрілого щура лінії Вістар. Забарвлення гематоксилін-еозином: а) зб.х60; б) зб.х200



а)



б)

Рис. 4. Типова будова третього поперекового хребця статевозрілого щура лінії Вістар. Забарвлення гематоксилін-еозином: а) зб.х60; б) зб.х200.

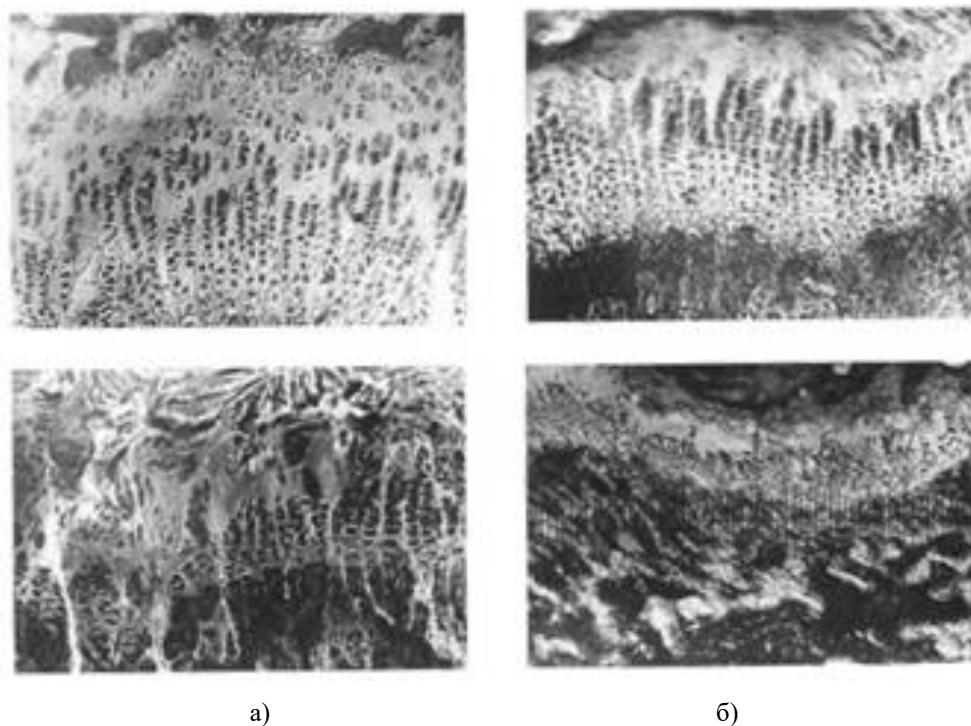


Рис. 5. Структура метаепіфізарного хряща великогомілкової кістки білого щура лінії Вістар у різні вікові періоди. Забарвлення гематоксилін-еозином. Зб. x300.

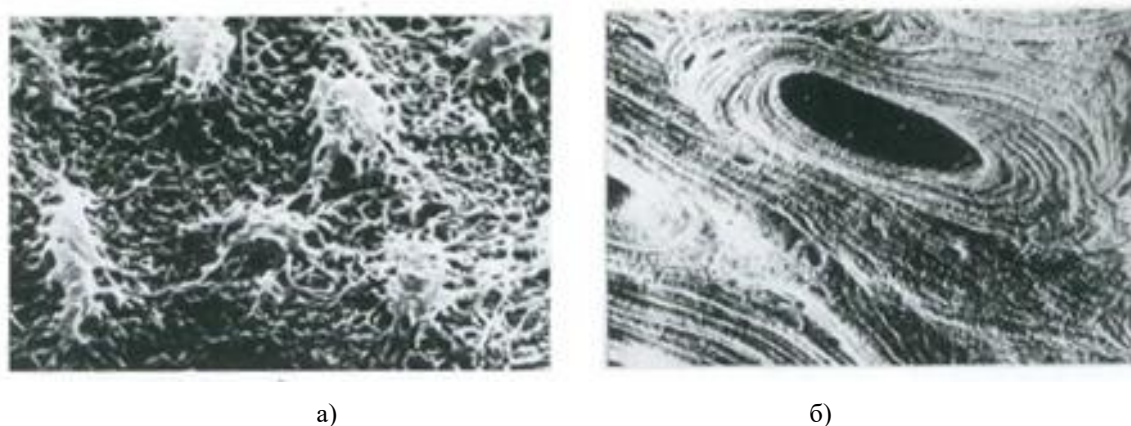


Рис. 6. Сканограма різних видів кісткової тканини скелету статевозрілого щура лінії Вістар: а) лакунарно-каналъцева система трабекулярної губчастої кістки поперекового хребця, зб. x800; б) остеонна структура діафіза великогомілкової кістки, зб. x1600.

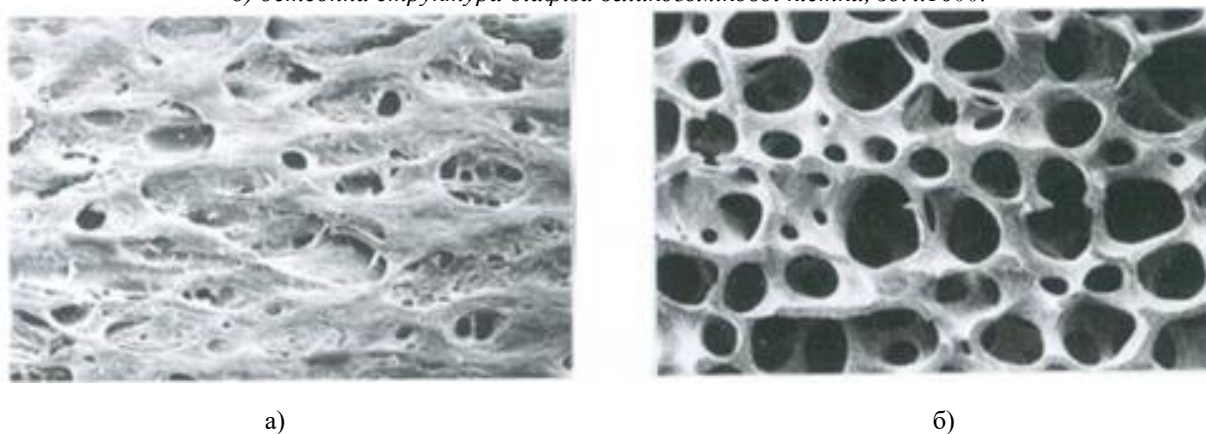


Рис. 7. Сканограма рельєфу третього поперекового хребця статевозрілого щура лінії Вістар: а) зб. x500; б) зб. x1600.

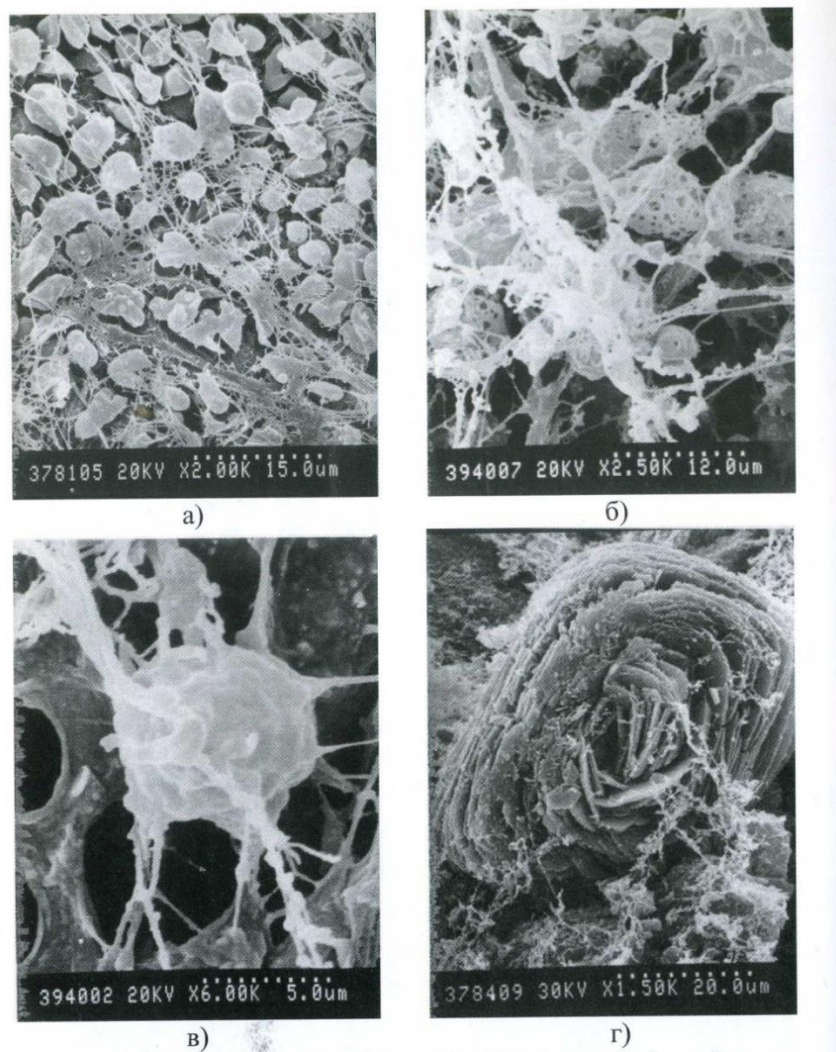


Рис. 8. Сканограма кальцитів різної форми та етіології в трабекулярних структурах великомілкової кістки статевозрілого цура лінії Вістар: а) зб.х500; б) зб.х800; в) зб.х1600; г) зб.х2500.

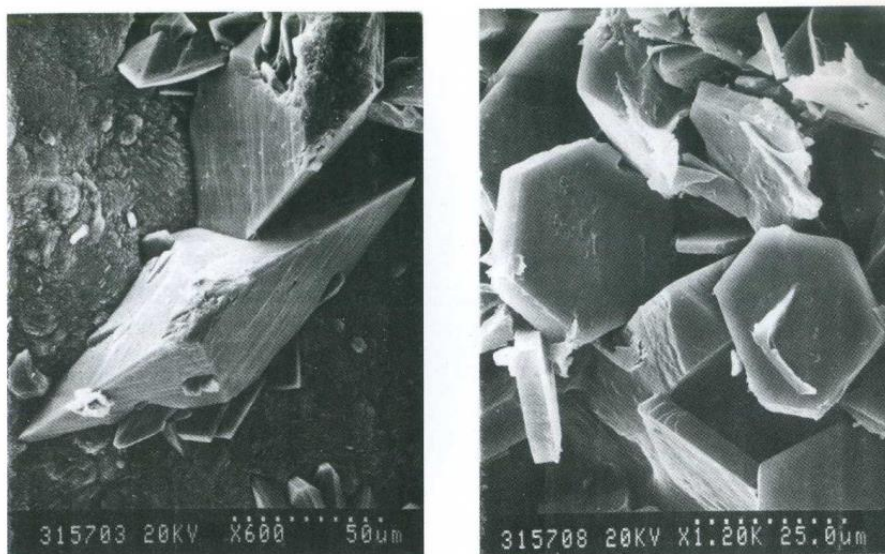


Рис. 9. Растрова сканограма кристалів гідрооксиапатиту плечової кістки людини. Пацієнт травматологічного відділення, 35 років. Зб. х1600.

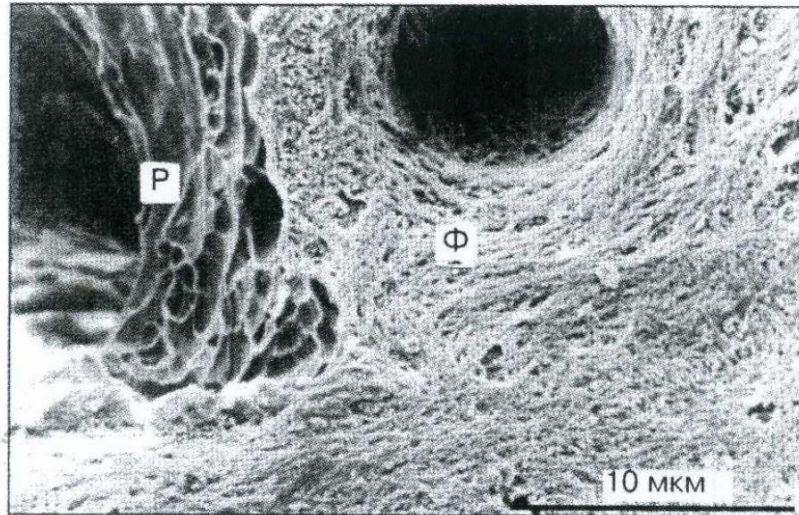


Рис. 10. Ділянки кісткової поверхні, що резорбується (Р) та формується (Ф), які прилягають до судинного отвору трабекули губчастої речовини. зб. x500

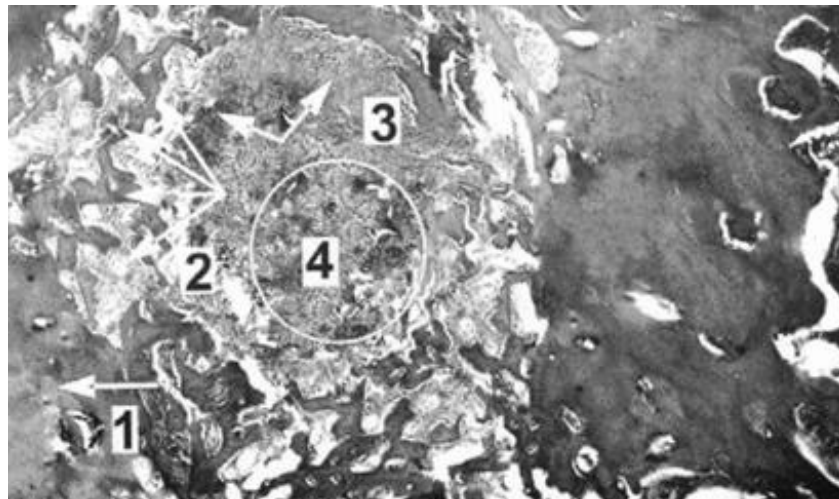


Рис. 11. Регенерат нижньої щелепи білого щура контрольної групи на 21 добу після травми. Забарвлення гемаксилін-еозином. збх50: 1 – материнська кістка; 2 – трабекулярний кістковий ренегерат; 3 – фіброретикулярна тканина; 4 – грануляційна тканина

Кістки, разом із м'язами і зв'язками, формують робочу систему, що називається кістково-м'язова, або опорно-рухова система. Клітини сполучної та хрящової тканин спеціалізуються на секреції фібрилярних білків (насамперед колагенів), які складають основу міжклітинної речовини. Клітини мезенхімального походження – фібробласти, остеобласти – синтезують протеоглікани та глікозаміноглікани, які знаходяться в матриці [2].

Для аналізу кісткової тканини використовувалися різні методи [16]. Як правило, використовують поєднання оптичної, скануючої електронної та трансмісійної електронної мікроскопії для ультраструктурного аналізу кістки від наномасштабу до макромасштабу. Поєднання методик дає кількісну оцінку вмісту кальцію, відстані між контактуючими остеоцитами, діаметр каналців остеонів, упорядкування та D-відстань колагенових

фібрил, а також орієнтацію інтрафібрилярних мінералів, що дозволяє нам реконструювати дрібні структурні деталі. На мікроструктурному рівні пластинчаста кістка, складається з ущільнених остеонів, демонструючи щільне скупчення пластинок товщиною в декілька мікрометрів, які містять мінералізовані колагенові фібрили та остецити, забезпечуючи мікро- та наноструктуру [10]. Ієрархічна структура кістки підтримується через резорбцію матриксу остеокластами та його синтез остеобlastами та остеоцитами [13, 24]. Остецити та їхні відростки утворюють мережу остеоцитів, яка розміщена в лакуно-каналцевій мережі, системі пор і каналів у кальцифікованому кістковому матриці.

Об'ємна електронна мікроскопія [3] описує набір методів візуалізації з високою роздільною здатністю, які використовуються в біомедичних

дослідженнях для виявлення тривимірної структури клітин, тканин і невеликих модельних організмів із нанометровою роздільною здатністю. Технології електронної мікроскопії використовують унікальну здатність виявляти структуру клітин і тканин із контрастом і роздільною здатністю для розрізнення клітинних мембран і подвійних мембранних шарів [29]. Скануючий електронний мікроскоп є одним з найбільш часто використовуваних інструментів для дослідження кісток, пропонуючи поєднання високої просторово-об'ємної роздільної здатності з великою глибиною різкості та широким полем огляду. Взаємодія між падаючими електронами та атомами на поверхні зразка генерує відбиті вторинні електрони та різні інші сигнали, включаючи рентгенівські промені, які передають інформацію про склад і топографічну інформацію. Шляхом вибіркового видалення або збереження специфічних компонентів тканини (органічної, неорганічної, клітинної, судинної, нервової) можна з'ясувати їхній індивідуальний внесок у загальну функціональну компетентність. З невеликими обмеженнями щодо геометрії зразка та різноманітністю застосованих маршрутів обробки, його можна зручно адаптувати для кількох аналітичних методів [31]. Скануючу електронну мікроскопію з бочною поверхнею ультраструктури можна використовувати для визначення зайнятості лакун, каналців остеоцитами та клітинними відростками, що зазвичай неможливо при використанні методів рентгенівської візуалізації. Підготовка зразків кісток для скануючої електронної мікроскопії є важливою. Негайна фіксація тканин має вирішальне значення,

припиняючи метаболізм і автолітичні зміни та фіксує молекули в їхньому біологічному положенні. Під час інтерпретації отриманих зображень необхідно враховувати зміни тканин, спричинені підготовкою зразка, включаючи усадку тканини. Природа механічного розрізання через мікротомію дає типово неізотропні набори даних (різна номінальна роздільна здатність у площині та поза площиною) і за своєю суттю є руйнівною для блоку тканини. Поки автоматизовані процедури сегментації не будуть вдосконалені, сегментація та обробка зображень залишатимуться вузьким місцем для кількісного аналізу отриманих зображень [3]. Використовуючи алмазні ножі для різання кальцинованого нативного матеріалу, у відповідних експериментальних умовах можна отримати зображення високої якості, порівнюючи серію зображень, отриманих при змінних прискорювальних напругах, тиску в камері та товщині зрізів [19].

На основі цифрової фотограметричної 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. Результати кількісного аналізу мікроструктури зразків, отриманих при стереоаналізі РЕМ-зображень за допомогою програми СТИМАН (табл. 1) показали, що загальна пористість губчастих кісток складає 40,43 % [4].

Таблиця 1

Підсумкова таблиця результатів структурного аналізу (Пикалюк, 2011 [12])

Кількість пор	281421
Пористість (%)	29,88
Загальна площа пор (мкм ²)	195774
Загальний периметр пор (мкм)	883912
Середній діаметр (мкм)/стандартне відхилення	0,66/0,47
Середня площа (мкм ²)/стандартне відхилення	0,99/0,69
Середній периметр/стандартне відхилення	3,14/0,92
Питома поверхня	1,14
Фільтраційний коефіцієнт	12,03

Зображення за допомогою зворотного розсіювання електронів є найбільш інформаційним при вивченні структури кісток, за ним йдуть аналітичні режими вторинних електронів і рентгенівського випромінювання з розсіюванням енергії [11]. У роботі розглядається підготовка та візуалізація зразків нативної кістки з 3D-деталлями на 3D-поверхні, полірованих або мікрофрезерованих, залитих смолою блокових поверхонь, а також смоляних зліпків простору в кістковій матриці; описані методи фіксації, ліофілізації, перегляду нижньої сторони кісткових клітин і покриття. Детально описано мацерацію лужною бактеріальною проназою, гіпохлоридом, перекисом водню та гідроксидом натрію або калію для видалення клітин і немінералізованої матриці. Однак, існує

потреба в тривимірній техніці високої роздільної здатності для одночасного зображення остеоцитів і матриці, в якій знаходяться ці клітини. У серійній скануючій електронній мікроскопії з бочною поверхнею ультрамікротом, встановлений у вакуумній камері мікроскопа, неодноразово розрізає залитий смолою блок тканини. Сканування розсіяних електронів поверхні блоку забезпечує набір двовимірних зображень високої роздільної здатності, які можна використовувати для візуалізації та кількісного визначення клітин і органел у 3D зображенні [19]. Звичайна скануюча електронна мікроскопія працює в умовах високого вакууму, що вимагає, щоб зразки були чистими, сухими та електропровідними. Більшість біологічних систем/матеріалів є непровідними, і щоб уникнути накопи-

чення статичного заряду, їх необхідно зробити електропровідними, для чого доступні різні стратегії, наприклад, просочення важкими металами, нанесення тонких електропровідних покриттів (Ag, Pt, Pd, C) і використання іонних рідин кімнатної температури [18].

Ремоделювання кістки залежить від узгодженої роботи остеобластів, клітин, що формують кістку, і остеокластів, клітин, що резорбують кістку. Вплив специфічних хімічних і фізичних властивостей кістки на адгезивний апарат остеокластів, прошарок ущільнювальної зони та їх зв'язок із резорбційною функцією все ще недостатньо вивчений. Метод кореляційної візуалізації дозволяє контролювати ту саму ділянку поверхні кістки за допомогою світлової мікроскопії, електронної мікроскопії та атомно-силової мікроскопії до, під час і після впливу остеокластів. Кільця ущільнювальної зони переважно розвиваються навколо поверхневих виступів з бічними розмірами в кілька мікрометрів і висотою приблизно 1 мкм. Пряме накладення пластинок зони ущільнення на резорбційні ямки на поверхні кістки показує, що кільця адаптуються до морфології ямок [32].

Розмір, стабільність і динаміка зони ущільнення кілець також залежать від поверхні: на склерозованих поверхнях на периферії клітини утворюються неповні, дуже нестабільні кільця. На кальциті кільця мають тенденцію зливатися й утворювати стабільне периферійне кільце з тривалістю життя кілька годин. У кістках, навпаки, маленькі та стабільні зони ущільнення кілець з тривалістю життя кілька годин утворюються в певних місцях під тілом клітини. Тоді виникає питання: чому стабільні кільця утворюються в певних місцях, а не в сусідніх ділянках під тією самою клітиною? Декілька факторів можуть сприяти цьому явищу, включаючи місцеві відмінності в хімічному складі поверхні кістки, топографії та органічному вмісті [14]. Основна складність полягає в досягненні одночасного зображення динамічних субклітинних процесів і морфології поверхні з адекватною просторовою та часовою роздільною здатністю. Крім того, зразки кісток повинні зберігатися вологими протягом різних етапів експериментів, оскільки вода є важливим компонентом кістки, і її видалення викликає незворотні зміни структури та хімії кістки. Використання біоматеріалів для регенерації кісток залежить від багатьох факторів, серед яких остеointegraція відіграє ключову роль. Біогран – біоактивне скло, яке зазвичай використовується як кістковий трансплантат під час стоматологічних процедур. Ділянки контакту кістки та біогран ідентифікуються за допомогою зображення зворотнорозсіяних електронів у скануючому електронному мікроскопі. Для підготовки ультратонких зразків для трансмісійного електронного мікроскопічного аналізу використовувався протокол підйому сфокусованого іонного променя *in situ* [26].

Адаптація кісткової тканини до фізичних, хімічних і біологічних подразників, яким вона

постійно піддається, відбувається завдяки скоординованій діяльності остеобластів і остеокластів. Таким чином, кістка безупинно оновлюється та реконструюється. Втрата балансу між резорбцією та відкладенням кістки може призвести до погіршення міцності та гнучкості кістки, а також до неправильної роботи інших пов'язаних тканин. Цей складний процес ремоделювання надзвичайно чутливий до місцевого середовища, в якому функціонують клітини [23, 27]. Комунікація між остеокластами та остеобластами, а також з іншими клітинами, такими як остеоцити, регулює процес ремоделювання. Регуляція відбувається на кількох рівнях, включаючи остеокластогенез, стимульований передачею сигналів остеоцитами, у певних зонах пошкодження, та скоординоване відкладення остеобластами нової кісткової матриці у відкритих лакунах резорбції.

Остеоартрит вважається захворюванням усіх компонентів суглоба: суглобових поверхонь із епіфізарним хрящем, синовіального компоненту капсули та синовіальної рідини. Але в нашому випадку аналізувалися всі компоненти без синовіальної рідини, акцентуючи увагу на структуру суглобового хряща. Основними розглянутими методами є скануюча електронна мікроскопія, нові методи світлової мікроскопії та рентгенівська мікротомографія. Ті самі зразки були повторно використані для вивчення різними методиками. Описані тканини [12], являють собою структурований гіаліновий суглобовий хрящ з його глибоким шаром, кальцифікованим суглобовим хрящем, глибока поверхня якого резорбується. Багато хто вважає, що дослідження на щурах і мишах є доцільними, але залишається дискусійним питання про те, чи можна порівняти навантаження на суглоби. Тим не менш, експериментальний зоологічний матеріал дозволяє швидко дослідити можливі генетичні фактори.

Мікроструктурні зміни кісток, які утворюють ієрархію скелетної тканини, змінюються залежно від їхньої структури, співвідношення кісткової та хрящової фракцій, функціонального біомеханічного навантаження, морфофункціональної поведінки кісткових клітин. У роботі Jeong H, et al [21] метою дослідження була оцінка мікроструктурних змін внутрішньої поверхні стегнової кістки щурів породи Sprague Dawley за умов використання скануючого електронного мікроскопа. Ці відмінності на ендокортикальній поверхні спостерігалися в характеристиках остеоцитарних каналців, кісткових волокон і шорсткості поверхні, демонструючи більш шорстку поверхню у особин старечого віку і формування моделі остеопорозу. Завдяки децелюляризації зразків можна спостерігати будову кісткового матриксу та оцінювати структурні особливості, шорсткість ендокортикальної поверхні за допомогою скануючого електронного мікроскопа. Ці результати можуть бути корисними для розвитку базового розуміння мікроструктурних змін, які відбуваються на поверхні кістки за різних умов.

Отосклероз – це патологія, яка перешкоджає проведенню вібрацій у внутрішнє вухо, викликаючи зміни в слухових кісточках і пов'язаних з ними з'єднаннях через механічне перевантаження. Це дослідження в першу чергу спрямоване на оцінку цих спричинених перевантаженням змін голівки стремінця в результаті іммобілізації основи третьої слухової кісточки у пацієнтів з отосклерозом. За допомогою скануючої мікроскопії при проведенні дослідження [34] голівки стремінця у хворих на отосклероз, порівняно з контрольною групою, не виявило істотних відмінностей у хімічному складі та наявності отосклеротичних вогнищ. Тим не менш, у всіх хворих на отосклероз на голівці стремінця відзначалися різні форми ураження поверхні кісткової тканини. Морфофункціональні зміни структури кісткової тканини спостерігалися в 90 % зразків, тоді як остеосклерозуючі процеси кісткової тканини спостерігалися в 58 % зразків. Крім того, незначні остеопітичні зміни були виявлені в 16 % зразків.

Модель цукрового діабету на тваринах. Порушення механізмів кісткової регенерації у хворих на цукровий діабет, їх висока поширеність, кількість ускладнень і труднощі лікування потребують подальшого вивчення та глибшого розуміння механізмів репаративного остеогенезу при хронічній гіперглікемії та пошуку нових ефективних і доступних підходів до їх лікування. В дослідженні [15] вивчалися гістологічні, ультрамікроскопічні та гістоморфометричні особливості репаративного остеогенезу у щурів із модельованою хронічною гіперглікемією, а також простежена можливість використання збагаченої тромбоцитами плазми у ділянці перелому з метою корекції негативного впливу хронічною гіперглікемією на процеси репаративного остеогенезу. Дослідження проводили на 70 білих лабораторних щурах статевозрілих самців, дві експериментальні групи – тварини з посттравматичним дефектом великогомілкової кістки (друга група) і тварини з посттравматичним дефектом великогомілкової кістки і тромбоцитарною терапією (третья група). Щурам із змодельованим посттравматичним дефектом на фоні експериментальної хронічної гіперглікемії вводили PRP (PRP – плазма, що багата на тромбоцити) в кістковий дефект для оцінки гомеостазу глюкози та підтвердження змодельованої хронічної гіперглікемії. У порівняльному аспекті дослідження використано гістоморфометричні показники кісткової тканини. Гіперглікемія дестабілізує морфофункціональне співвідношення клітинного та структурного матриксів, пригнічує остеобластичні процеси через звуження зони проліферації (на 3,36–6,24 %) та зменшення кількості остеобластів (3,33–5,37 %) [3]. Експериментальне локальне використання тромбоцитарної плазми стимулює остеобластичні процеси пригнічуючи остеосклеротичні та остеонекротичні зміни. Світлову мікроскопію проводили за допомогою мікроскопа Olympus BH-2 (Японія).

Ультрамікроскопічне дослідження проводили за допомогою скануючого електронного мікроскопа PEM-102. Статистичний аналіз проведено за допомогою програмного комплексу SPSS-17.

Імплантація зубів. Оссеоінтеграція зубних імплантів з навколишньою кістковою тканиною визначає клінічний ефект дентоімплантації. Доступний широкий спектр імплантів з різною топографією поверхні та хімічним складом. Оцінено [28] два частково модифіковані лазером імпланти нижньої щелепи людини після двох з половиною місяців загоєння. За допомогою світлової оптичної та трансмісійної електронної мікроскопії проводився аналіз роздільної здатності оцінки міжфазного потенціалу зв'язувати кістки як на мікро-, так і на нано- рівнях. Це спостереження перевірено за допомогою тривимірної Z-контрастної електронної томографії, що дозволило візуалізувати шар апатиту з іншим напрямком кристалів порівняно з апатитом у кістковій тканині, що охоплює наноструктурований оксид.

Остеопороз – захворювання скелета, що характеризується зниженням міцності кісток, викликаючи підвищений ризик переломів. Остеопороз пов'язаний зі зниженням щільності та порушення структури кісток. Аналіз морфології кісток за допомогою електронної мікроскопії може дозволити зрозуміти характеристики та процеси остеопорозу [30].

Взаємозв'язок між мінеральним компонентом кістки та пов'язаним з ним колагеном є предметом постійних дискусій. McNally, et al [25] використовували трансмісійну електронну мікроскопію криогенно подрібнених зрізів повністю мінералізованої кортикальної кістки для вивчення просторового та топологічного зв'язку між мінералом і колагеном [5]. Гідрооксипатит зустрічається в основному у вигляді подовжених пластинчастих структур, які є зовнішніми та орієнтованими паралельно колагеновим фібрилам. Зображення в темному полі свідчать про те, що структури є полікристалічними. Вони мають товщину приблизно 5 нм, ширину 70 нм і довжину кілька сотень нм. Енергодисперсійний рентгенівський аналіз показав, що приблизно 70 % гідрооксипатиту зустрічається у вигляді зовнішніх мінеральних структур по відношенню до фібрил [11]. Продукти процесу ремоделювання, вторинні та фрагментарні остеони, вивчені за допомогою традиційних двовимірних (2D) методів. Однак тривимірні методи візуалізації мають потенціал для забезпечення більш повного розуміння мікроархітектури кісток. Візуалізація та аналіз кістки за допомогою 3D-зображення з високою роздільною здатністю покращить поточне розуміння біології кістки та матиме численні застосування як у біологічній антропології, так і в біомедицині [9, 20].

Лазерна поляриметрична діагностика кістки. Оптичні властивості кісткових тканин моделюються двокомпонентною аморфно-кристалічною матрицею [6, 7]. У межах такого методологічного підходу вперше розглянуті оптичні властивості

сукупності кісткової та мезенхімальної тканин. Активна кісткова мінеральна матриця складається з кристалів гідроксиапатиту, поперечні розміри яких майже на два рівні менші від діаметру колагенових волокон паралельно до яких орієнтовані довгі осі кристалів. Вони розташовані між мікрофібрилами, фібрилами і колагеновими волокнами, утворюють самостійну неперервну мінеральну фазу. Крім того, колагенові волокна сприймаються як просторово розміщені елементи в мінеральній матриці. Їх орієнтація для кісткових трабекул впорядкована і паралельна її площині. Для остеонів кісткової тканини властива просторово спіральна орієнтація колагенових волокон. Останні у різних ламелах остеону мають різні кути підвищення спіралей, але в кожній ламелі вони орієнтовані в одному напрямку. У сусідніх ламелах волокна спрямовані під кутом від 30° – 90° вздовж поздовжньої осі остеону. Таким чином, модельна схема біоструктури кісткової тканини, як композита складається, з двох фаз: органічної та неорганічної. Перша містить колаген I типу і невелику кількість неколагенових білків, кислих глікопротеїнів і малих протеогліканів. Основною частиною неорганічної фази кістки є гідроксиапатит і трикальційфосфат із включенням карбонату, цитрату, натрію, магнію, хлору та фтору [1].

В основу роботи покладено такі методологічні складові в моделюванні поляризаційних властивостей двоприменезаломлюючої структури біологічної тканини (БТ) [8]:

1. БТ як об'єкт дослідження моделюється плоскопаралельним шаром (сполучна, м'язова або епітеліальна тканини) з однотипними оптичними властивостями.

2. Поляризаційні властивості такого шару моделюються сукупністю оптично-одноосних дво-

применезаломлювальних фібрил, які утворюють архітектонічну сітку.

3. Механізми взаємодії лазерного випромінювання з архітектонікою БТ описують за допомогою матриці Мюллера.

4. Поляризаційні параметри (азимут α та еліптичність β визначаються за певними алгоритмами.

Умови експерименту підбиралися так, щоб практично усунути просторово-кутову апертурну фільтрацію при формуванні зображень БТ. Це забезпечується узгодженням кутових характеристик індикатрис розсіювання світла зразками БТ ($\Omega_{\text{БТ}}=16^{\circ}$) і кутової апертури мікрооб'єктива $\Delta\omega=20^{\circ}$, де $\Omega_{\text{БТ}}$ – кутовий конус індикатрис, у якому сконцентровано 98 % всієї енергії розсіюваного випромінювання. За допомогою аналізатора обертанням осі на кути $\theta=0^{\circ}$ – 180° визначали масиви мінімальних і максимальних рівнів інтенсивностей. Зображення БТ для кожного окремого пікселя (mn) фіксувались CCD-камерою. На першому етапі об'єкти дослідження використовували два типи оптично тонких (коефіцієнт ослаблення $\tau \leq 0.1$) гістологічних зрізів БТ: структурована тканина гомілкової кістки (приведена для порівняння) (рис. 12 а, б); тканина брижі (рис. 12 в, г). Вибрані для дослідження об'єкти поєднує наявність оптично анізотропної складової з показниками двоприменезаломлення $\Delta n=1.5 \times 10^{-1}$ і $\Delta n=1.5 \times 10^{-3}$, яка візуалізується в перехрещених поляризаторі-аналізаторі (рис. 12 б, г). Морфологічна будова архітектоніки таких БТ різна. Гомілкова кістка утворена «квазіупорядкованими структурами» двоприменезаломлювальних колагенових пучків, мінералізованих кристалами гідроксиапатиту (рис. 12 б). Тканина брижі містить «острівкові включення» анізотропного колагену (рис. 12 г).

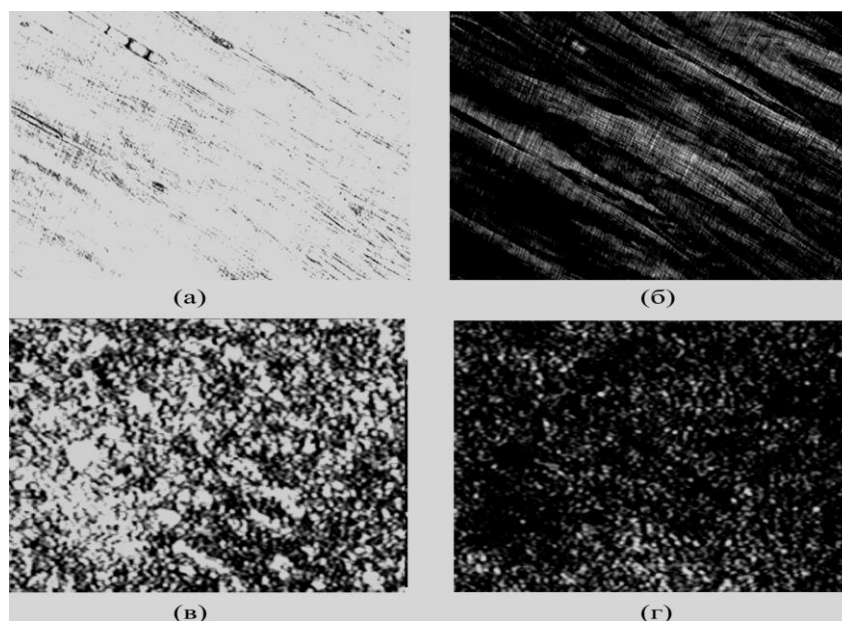


Рис. 12. Поляризаційні зображення кісткової тканини гомілки (а, б) та тканини брижі (в, г) у співосних (а, в) і перехрещених (б, г) поляризаторі-аналізаторі

Отримані дані ілюструють факт, що зображення обох типів БТ поляризаційно неоднорідні з ймовірно розподіленими значеннями поляризаційних параметрів α , β світлових коливань. Аналіз даних показує, що поляризаційна мапа кісткової

тканини сформована ансамблями (100–200 мкм) монополяризованих ($\{\alpha(r_i); \beta(r_i)\} \approx const$) ділянок (поляризаційних доменів) (рис. 13 а, б).

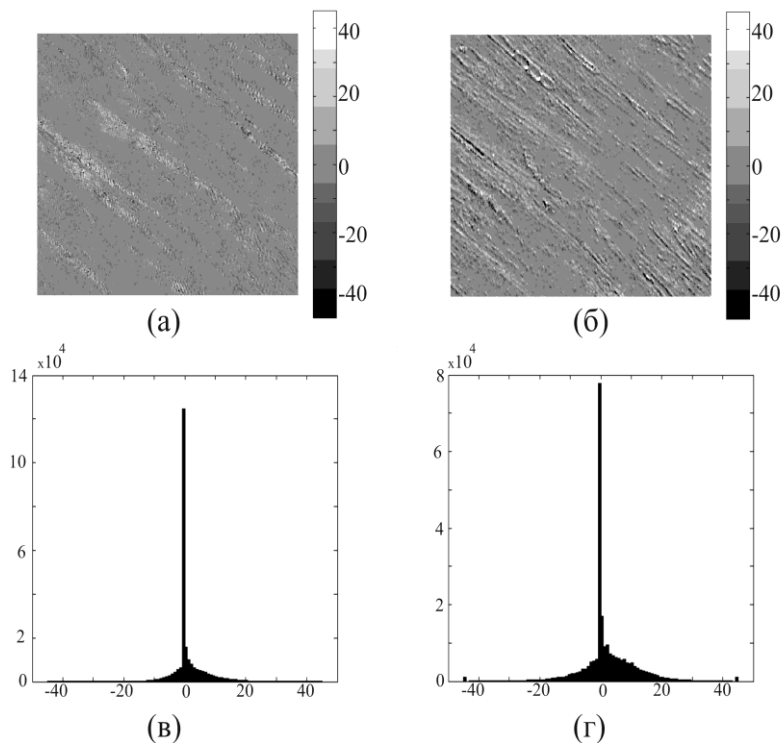


Рис. 13. Поляризаційні мапи кісткової тканини. Фрагменти (а, б) відповідають двовимірним розподілам азимутів та еліптичностей відповідно, (в, з) – гістограми таких розподілів

Здатність до перетворення поляризаційної структури лазерного випромінювання мають двопронезаломлювальні колагенові волокна і кристали гідроксиапатиту. Оптичне моделювання просторової організації кісткової тканини включає три формуючі рівні: мікрокристалічний, макрокристалічний та архітектонічний.

Мікрокристалічний рівень. Основними оптично активними структурами цього рівня є неорганічні кристали гідроксиапатиту і колагенові фібрили. Геометричні розміри перших складають величину 7–25 нм, других – 60–110 нм. З точки зору кристалооптики ці речовини мають загальну характеристику – двопронезаломлення, тобто здатність до перетворення типу і форми поляризації випромінювання, що розповсюджується в них. З іншого боку, просторова симетрія кристалооптичної структури неорганічної та органічної мікрокомпонентів кісткової тканини ідентична – це оптично одноосні кристалічні структури. У першу чергу визначають ρ – кут орієнтації оптичної осі біокристалічного утворення (орієнтація більшого розміру мікрокристала гідроксиапатиту і відповідного укладення фібрил колагенових волокон); δ – величина фазового зсуву між ортогональними компонентами поляризації, що вноситься мікрокристалічними структурами. Потім знаходимо величину δ показує відношення двопронезалом-

лення Δn , щодо геометричних розмірів оптично активних структур:

$$\delta = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \Delta n \cdot l$$

де λ – довжина хвилі лазерного випромінювання, l – товщина біооб'єкта.

Величина двопронезаломлення кристалів гідроксиапатиту на два рівні вища за аналогічний параметр речовини колагену, але орієнтація оптичних осей аналогічні. Можна вважати, що кристалічні властивості кісткової тканини переважно визначаються речовиною гідроксиапатиту.

Макрокристалічний рівень. Під мінімальним рівнем цієї організації вважається структурні утворення, розміри яких сумісні з довжиною хвилі лазерного випромінювання. У першу чергу, це колагенові фібрили, згруповані в пучки фібрил діаметром 0,5–2,0 мкм, які із стрижнеподібними кристалами утворюють багатосухожилкові пучки, розміри змінюються від 100 до 200 мкм. Такий рівень організації представляють ділянки переважно впорядкованої структури мінералізованих волокон – кісткові трабекули і ламели остеонів. Їхні оптичні властивості можуть бути описані матричним оператором, а величина фазового зсуву визначається за формулою:

$$\delta_1 = \frac{2\pi}{\lambda} \cdot \Delta n \cdot d \cdot C,$$

де d – геометрична товщина кісткової трабекули, C – концентрація кристалічного гідроксиапатиту.

Для системи ламел остеонів ситуація дещо відмінна. У кожній структурній одиниці (ламели) кісткової тканини орієнтація мінералізованих колагенових пучків складає певний кут з площиною її поперечного перетину. Макрокристалічний рівень організації кісткової тканини представлений у вигляді сукупності фазовозсуваючих оптично одновісних структур з орієнтацією їх осей площини поперечного перетину. При проходженні крізь такі біокристалічні структури поле лазерного випромінювання зазнає перетворення фотометричних і поляризаційно-фазових характеристик. Внаслідок цього формується об'єктне поле з розподілом типів і форм поляризації, зумовлених орієнтаційною і мінералізаційною структурою колагенових волокон.

Архітектонічний рівень. Такий рівень оптичної організації вивчає просторову структуру кісткових трабекул і ламел остеонів, які мають

фрактальну дифракційну структуру. У цьому випадку відбувається модуляція фази і поляризація лазерних пучків, які перетворені біокристалічними кістковою тканини, і утворення різних поляризованих парціальних фронтів. Аналіз поляризаційного модульованого об'єктного лазерного поля вимагає вимірювання координатного розподілу його інтенсивностей за всією площиною кісткової тканини. Поляризаційна структура граничного поля може бути візуалізована у вигляді топологічного розподілу інтенсивностей.

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.

2. Оптичне моделювання структури кісткової тканини включає три організаційні рівні: мікрোকристалічний, макрокристалічний та архітектонічний.

ЛІТЕРАТУРА

1. Пикалок, В. С.; Кутя, С. А.; Верченко, І. А. Мікроелементи та кісткова тканина. *Таврійський медико-біологічний вісник*, 2008, 11(3, ч. 1). С. 168–173.
2. Пикалок, В. С.; Мостовий, С. О. Сучасні уявлення про біологію та функцію кісткової тканини. *Таврійський медико-біологічний вісник*, 2006, 9(3, ч. 1). С. 186–195.
3. Пикалок, В. С. Методичні аспекти дослідження скелету людини і тварин. Науково-методичне видання, Сімферополь. 2008. 272 с.
4. Пикалок, В. С. Морфологічні можливості кількісного стереометричного аналізу мікроструктури кістки за результатами растрової електронної мікроскопії. *Український морфологічний альманах*, 2011. (3). С. 214–216.
5. Пикалок, В. С. Фракційний склад органічного матрикса, мінерального компонента і механіко-пластичні властивості кістки. *Проблеми, досягнення та перспективи*. Сімферополь, 2007. 146(IV). С. 68–74.
6. Ушенко, О. Г.; Ахтемічук, Ю. Т.; Антонюк, О. П.; Балащенко В. О. Лазерна поляриметрия біологічних тканин. *Науковий вісник Ужгородського університету. Серія: Медицина*. Ужгород. Видавництво УжНУ “Говерла”, 2010. 38. С. 153–161.
7. Ушенко, О. Г.; Олар, О. І.; Антонюк, О. П. Лазерна поляриметрия анізотропної складової біологічних тканин. *Клінічна анатомія та оперативна хірургія*. 2006. 5(2). С. 98–99.
8. Ушенко, О. Г.; Павлов, С. В.; Вуйцік, В. Т.; Кушнерик, Л. Я., Заболотна, Н. І.; Ушенко, Ю. О.; Дуболазов, О. В.; Ангельська, А. О.; Томка, Ю. Я.; Ушенко, В. О. Методи і засоби поляризаційної поляриметрії біологічних тканин. Том 1: монографія / за редакцією Олександра Ушенка, Сергія Павлова, Вальдемара Вуйціка. Вінниця, 2019. 269 с.
9. Andronowski, J. M.; Crowder, Ch.; Martinezb, M. S. Recent advancements in the analysis of bone microstructure: New dimensions in forensic anthropology. *Forensic Sci Res.*, 2018. 3(4). P. 278–293.
10. Bensamoun, S.; Gherbezza, J. M.; de Belleval, J. F.; Ho Va Tho, M. C. Transmission scanning acoustic imaging of human cortical bone and relation with the microstructure. *Clin Biomech (Bristol, Avon)*, 2004. 19(6). P. 639–647.
11. Boyde, A. Scanning electron microscopy of bone. *Methods Mol Biol.*, 2012. 816. P 365–400.
12. Boyde, A. The Bone Cartilage Interface and Osteoarthritis. *Calcif Tissue Int.*, 2021. 109(3). P. 303–328.
13. Buenzli, P. R.; Thomas, C. D.; Clement, J. G.; Pivonka, P. Endocortical bone loss in osteoporosis: the role of bone surface availability. *Int J Numer Method Biomed Eng.*, 2013. 29(12). P. 1307–1322.
14. Delaisse, J. M. The reversal phase of the bone-remodeling cycle: cellular prerequisites for coupling resorption and formation. *Bonekey Rep.*, 2014. 3. P. 561.
15. Dudchenko, Y. S.; Maksymova, O. S.; Pikaliuk, V. S.; Muravskyi, D. V.; Kyptenko, L. I.; Tkach, G. F. AnalMorphological Characteristics and Correction of Long Tubular Bone Regeneration under Chronic Hyperglycemia Influence. *Cell Pathol (Amst)*, 2020. 6:2020:5472841.
16. Eren, E. D.; Nijhuis, W. H.; van der Weel, F.; Eren, A. D.; Ansari, S.; Bomans, P. H. et al. Multiscale characterization of pathological bone tissue. *Microsc Res Tech.*, 2022. 85(2). P. 469–486.
17. Fermie, J.; de Jager, L.; Foster, H. E.; Veenendaal, T.; de Heus, C.; van Dijk, S. et al. Bimodal endocytic probe for three-dimensional correlative light and electron microscopy. *Cell Rep Methods.*, 2022. 2(5). P. 100220.
18. Georgiadis, M.; Müller, R.; Schneider, P. Techniques to assess bone ultrastructure organization: orientation and arrangement of mineralized collagen fibrils. *J.R. Soc. Interface.*, 2016. 13:20160088.
19. Goggin, P.; Ho, E. M.; Gnaegi, H.; Searle, S.; Oreffo, R. O.; Schneiders Ph. Development of protocols for the first serial block-face scanning electron microscopy (SBF SEM) studies of bone tissue. *Bone.*, 2020. 131:115107.
20. Imagawa, N.; Inoue, K.; Matsumoto, K.; Ochi, A.; Otori, M.; Yamamoto, K. et al. Mechanical, Histological, and Scanning Electron Microscopy Study of the Effect of Mixed-Acid and Heat Treatment on Additive-Manufactured Titanium Plates on Bonding to the Bone Surface. *Materials (Basel)*, 2020. 13(22). P. 5104.
21. Jeong, H.; Asai, J.; Ushida, T.; Furukawa, K. S. Assessment of the Inner Surface Microstructure of Decellularized Cortical Bone by a Scanning Electron Microscope. *Bioengineering (Basel)*, 2019; 6(3). P. 86.
22. Knothe, Tate M. L.; Adamson, J. R.; Tami, A. E.; Bauer, T. W. The osteocyte. *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, 2004. 36. P. 1–8.
23. Lanyon, L. E.; Sugiyama, T.; Price, J. S. Regulation of Bone Mass: Local Control or Systemic Influence or Both? *IBMS BoneKEy*, 2009. 6. P. 218–226.
24. Malo, M. K.; Rohrbach, D.; Isaksson, H.; Töyräs, J.; Jurvelin, J. S.; Tamminen, I. S.; Kröger, H.; Raum, K. Longitudinal elastic

- properties and porosity of cortical bone tissue vary with age in human proximal femur. *Bone.*, 2013. 53(2). P. 451–458.
25. McNally, E.A.; Schwarcz, H. P.; Botton, G. A.; Arsenault, A. L. A Model for the Ultrastructure of Bone Based on Electron Microscopy of Ion-Milled Sections. *PLoS One.*, 2012. 7(1). P. e29258.
 26. Micheletti, Ch.; Gomes-Ferreira, P. H.; Casagrande, T.; Lisboa-Filho, P. N.; Okamoto, R.; Grandfield, K. From tissue retrieval to electron tomography: nanoscale characterization of the interface between bone and bioactive glass. *JR Soc Interface.*, 2021. 18(182). 20210181.
 27. Mulcahy, L. E.; Taylor, D.; Lee, T. C.; Duffy, G. P. RANKL and OPG Activity is Regulated by Injury Size in Networks of Osteocyte-like Cells. *Bone.*, 2011. 48(2). P. 182–188.
 28. Palmquist, A.; Grandfield, K.; Norlindh, B.; Mattsson, T.; Brånemark, R.; Thomsen, P. Bone – titanium oxide interface in humans revealed by transmission electron microscopy and electron tomography. *JR Soc Interface.*, 2012. 9(67). P. 396–400.
 29. Peddie, Ch. J.; Genoud, Ch.; Kreshuk, A.; Meechan, K.; Micheva, K. D.; Narayan, K. et al. Volume electron microscopy. *Nat Rev Methods Primers.*, 2022. 2. P. 51.
 30. Sapundani, Rum. Analysis of Osteoporosis by Electron Microscopy Submitted: 16 February 2022 Reviewed: 21 March 2022 Published: 07 May 2022.
 31. Shah, F. A.; Ruscsák, K.; Palmquist, A. 50 years of scanning electron microscopy of bone – a comprehensive overview of the important discoveries made and insights gained into bone material properties in health, disease, and taphonomy. *Bone Res.*, 2019. 7. P. 15.
 32. Shemesh, M.; Addadi, S.; Milstein, Y.; Geiger, B.; Addad, L. Study of Osteoclast Adhesion to Cortical Bone Surfaces: A Correlative Microscopy Approach for Concomitant Imaging of Cellular Dynamics and Surface Modifications. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2016. 8(24). P. 14932–14943.
 33. Tresguerres, F. G.; Torres JLópez-Q.; Hernández, G.; Vega, J. A.; Tresguerres, I. F. The osteocyte: A multifunctional cell within the bone. *Ann Anat.*, 2020. 230. 151510.
 34. Wiatr, A.; Wiatr, M. Impact of Otosclerosis on Auditory Ossicle Remodeling: A Scanning Electron Microscopy Analysis of Stapes Head Overloads. *Med Sci Monit.*, 2023. 29. P. e939679-1–e939679-8.

Для нотаток