

УДК 616.716.8-007.234-07

Р.Ю. ИЛЬИНА¹, Р.А. ДЗАМУКОВ², Р.В. ЛЕКСИН²¹Казанская государственная медицинская академия, 420012, г. Казань, ул. Бутлерова, д. 36²Республиканская клиническая больница МЗ РТ, 420064, г. Казань, Оренбургский тракт, д. 138

Новые методы диагностики снижения костной плотности челюстных костей

Ильина Роза Юрьевна — кандидат медицинских наук, ассистент кафедры челюстно-лицевой хирургии и хирургической стоматологии, тел. +7-917-255-43-87, e-mail: ilroza@yandex.ru

Дзамуков Родион Арсланович — кандидат медицинских наук, заведующий патологоанатомическим отделением, тел. +7-917-278-87-34, e-mail: drodion@narod.ru

Лексин Роман Валентинович — заведующий челюстно-лицевым отделением, тел. +7-987-296-89-57, e-mail: romanleksin75@gmail.com

В статье представлены результаты исследования образцов костной ткани у пациентов молодого и старшего возраста. Оценка остеопороза в образцах костной ткани проводилась новыми методами, разработанными авторами. Определяли физическую плотность костной ткани и площади межтрабекулярного пространства. В результате исследования было выявлено снижение костной плотности, увеличение площади межтрабекулярного пространства и уменьшение среднего диаметра трабекул губчатой кости у пациентов старшей возрастной группы. Сделан вывод о развитии сенильного остеопороза у лиц старшей возрастной группы. Разработанные методики рекомендуются для оценки состояния костной ткани и диагностики остеопороза.

Ключевые слова: гистоморфометрия костной ткани, остеопороз.

R.Yu. ILINA¹, R.A. DZAMUKOV², R.V. LEKSIN²¹Kazan State Medical Academy, 36 Butlerov St., Kazan, Russian Federation, 420012²Republican Clinical Hospital of the MH of RT, 138 Orenburgskiy Trakt, Kazan, Russian Federation, 420064

New methods of diagnosis of decline in bone density of the jaw bones

Irina R.Yu. — Cand. Med. Sc., Assistant of the Department of Maxillofacial Surgery and Surgical Stomatology, tel. +7-917-255-43-87, e-mail: ilroza@yandex.ru

Dzhamukov R.A. — Cand. Med. Sc., Head of Pathology Department, tel. +7-917-278-87-34, e-mail: drodion@narod.ru

Leksin R.V. — Head of Maxillofacial Surgery Department, tel. +7-987-296-89-57, e-mail: romanleksin75@gmail.com

In article the results of research bone tissue samples by the young and advanced age patients discussed. Assessment bone tissue were carried out new methods developed by authors. This methods is definition of density bone and area intrabecular spaces. In our research was revealed decrease bone density, increase areas of intrabecular spaces and reduction average diameter trabecular by spongy bone in old age patients. Conclusion was done about development senile osteoporosis by old age patients. The new methods are recommended for assessment status of bone tissue and diagnostic osteoporosis.

Key words: histomorphometry on bone tissue, osteoporosis.

Морфометрия костной ткани до сих пор остается единственным методом прямого и точного анализа механизмов ремоделирования на клеточном и тканевом уровне. В настоящее время, когда существует возможность измерить количество костной ткани с высокой точностью неинвазивно, задачи гистоморфометрического исследования кости изменились [1]. Этот метод применяется для установления диагноза костного заболевания, оценки различных механизмов, ведущих к утрате костной ткани при остеопорозе, оценки воздействий на ремоделирование кости лекарственных средств и для оценки качества костной ткани [2].

Проведение морфометрического исследования кости требует строгого соблюдения методологии,

т.к. однозначное выявление и качественное изображение структуры, подлежащее измерению, имеет решающее значение для точности и достоверности полученных результатов. Двумя обязательными требованиями, соблюдение которых обеспечивает достоверность гистоморфометрического исследования при остеопорозе, являются: использование такого метода биопсии кости, который позволяет получить неповрежденный образец ткани, и использование таких методик, которые дают возможность провести точное измерение необходимых параметров. К сожалению, в практических исследованиях не всегда представляется возможным провести адекватную биопсию костной ткани, т.к. традиционно биоптаты берут из подвздошной



Таблица. Показатели гистоморфометрии костной ткани у пациентов различного возраста (M±m)

Измеряемые параметры	Пациенты молодого возраста (11 чел.)	Пациенты старшей возрастной группы (13 чел.)
Костная плотность г/см ³	1,768±0,039	1,315±0,059*
Площадь межтрабекулярного пространства (%)	19,88±3,18	35,68±12,21**
Средний диаметр трабекул (мкм)	173,51±28,33	104,34±12,18**

Примечание: p — достоверность статистических различий между группами больных; * — p<0,05; ** — p<0,01

кости под местным обезболиванием. Данная методика является инвазивной и для продуктивного анализа требуется получить полноценный, неповрежденный стержень костной ткани. В опытных руках частота получения биоптатов, непригодных для исследования, составляет 8,8%, в неопытных же достигает 16,7% [3].

Таким образом, гистоморфометрический анализ образцов костной ткани, полученных нетрадиционным методом и небольшого размера, в классическом методе практически невозможен. Поэтому, столкнувшись с проблемой количественной оценки костной ткани при работе с нестандартными образцами, мы поставили следующую цель нашего исследования.

Цель исследования — разработать методики гистоморфометрической оценки костной ткани при остеопорозе для работы с небольшими костными фрагментами.

Материалы и методы исследования

Для гистоморфометрического исследования использовались образцы костной ткани альвеолярного отростка нижней челюсти, полученные при операции удаления дистопированных зубов мудрости у пациентов челюстно-лицевого отделения РКБ. Образцы содержали фрагменты губчатого вещества и кортикальной пластинки наружной косой линии угла нижней челюсти. Размер фрагментов варьировал от 0,3×0,4×0,2 до 0,5×1,4×1,5 см. Образцы были получены от 11 пациентов обеих полов в возрасте от 18 до 26 лет (средний возраст 21,69±4,73 года) и 13 образцов больных в возрасте от 46 до 72 лет (61,98±9,86).

Для определения плотности полученных образцов костной ткани их промывали от сгустков крови, высушивали и взвешивали. Затем последовательно взвешивали шприц заполненный дистиллированной водой и этот же шприц, но с помещенным в воду образцом костной ткани. Далее плотность образца ρ определяли по формуле:

$$\rho = \frac{B}{(A + B - C \times \rho_0)}$$

где A — вес шприца с дистиллированной водой, B — вес образца, C — вес шприца с водой и погруженной костью.

Приведем вывод данной формулы. Вес C складывается из веса образца B и веса воды со шприцем A, за минусом веса воды, которую вытеснил образец. Вес вытесненной воды равен плотности воды (ρ_0), умноженной на объем образца ($P_b \times V$).

Таким образом, $C = B + A - \rho_0 \times V$;

Объем образца равен: $V = (A + B - C) / \rho_0$;

Плотность объекта равна: $\rho = B \times \rho_0 / (A + B - C)$. Так как ρ дистиллированной воды = 1 г/см³, то конечная формула упрощается до приведенной выше.

Взвешивание осуществляли на электронных весах, за счет чего повышалась точность определения плотности при сохранении оперативности исследования.

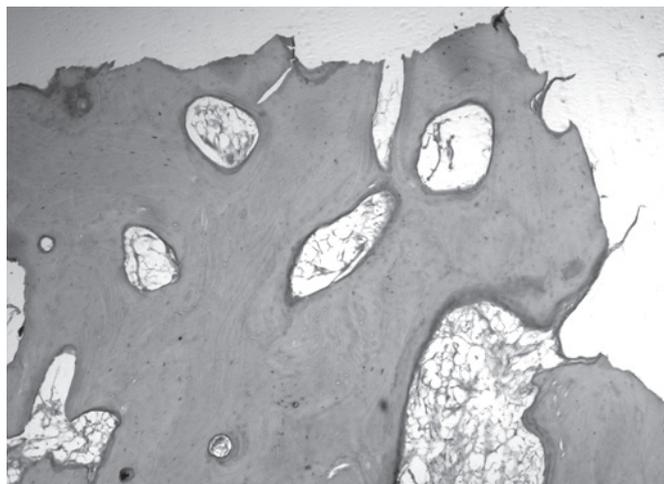
Для определения площади межтрабекулярного пространства в губчатой кости была разработана методика автоматизированного подсчета по цифровым фотографиям. Для этого образцы ткани фиксировали в нейтральном забуференном формалине, декальцинировали, обезжировали и заливали в парафин по стандартной гистологической методике. Из парафиновых блоков готовили микротомные срезы толщиной 5-7 мкм, которые окрашивали гистохимически гематоксилином и эозином. Затем производилось тотальное микроскопическое сканирование полученных гистологических срезов кости цифровым фотоаппаратом. Полученные изображения обрабатывались компьютерной программой PhotoM-1.21 в два этапа: 1) цветная фотография переводилась в высококонтрастное черно-белое изображение; 2) автоматически определялась площадь черного и белого цветов на фотографии в процентах, что соответствовало площади костных балок и межбалочных пространств (полостей). Таким образом, чем больший процент приходится на полости в костной ткани, тем вероятнее диагноз «остеопороз».

Кроме этого, определялась средняя толщина трабекул губчатой кости на гистологических препаратах под увеличением $\times 200$. Подсчитывалось среднее значение в мкм для каждого вида образца.

Для уточнения диагноза всем оперированным пациентам проводили оценку минеральной плотности костной ткани методом ультразвуковой остеоденситометрии с помощью системы Sunlight Omnisense TM 7000 S. Исследования проведены в отделении ультразвуковой диагностики РКБ МЗ РТ (г. Казань). Скорость распространения ультразвуковых волн определяли на дистальной трети лучевой кости в виде показателя T. Показатель T отображает отношение значения скорости распространения ультразвуковых волн к данным, полученным для здоровых молодых взрослых.

Полученные результаты подвергнуты статистической обработке при помощи пакета программ

Рисунок 1. Гистологический срез костной ткани пациента 23 лет (x200)



SPSS-14 for Windows с определением статистической значимости различий выборок между собой с использованием критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона.

Результаты исследования

При анализе результатов, полученных при определении плотности костной ткани и подсчете площади межтрабекулярного пространства, была получена согласованность обеих методик. У пациентов старшей возрастной группы определялась низкая костная плотность, по сравнению с образцами пациентов более молодого возраста (см. табл.).

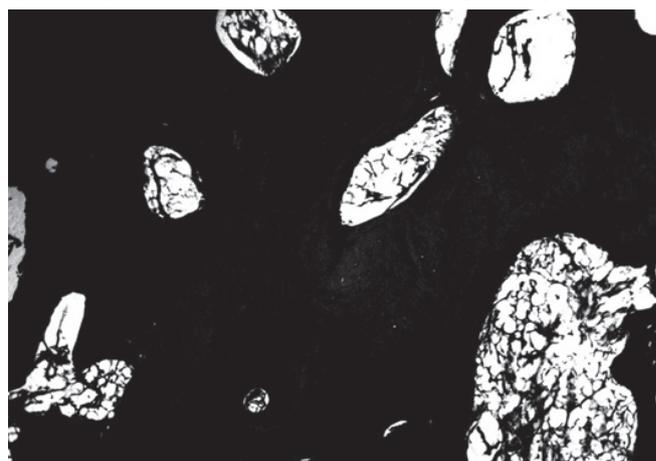
У пациентов более молодого возраста костная плотность была больше в 1,34 раза по сравнению со 2-й группой. Значит, у пациентов старшего возраста кость была более порозной, с большим объемом межтрабекулярного пространства. Данное предположение было подтверждено нашими данными (табл. 1). У образцов костной ткани пациентов старшей возрастной группы площадь межтрабекулярного пространства была больше в 1,8 раза по сравнению с образцами пациентов более молодого возраста.

Средний диаметр трабекул у пациентов молодого возраста также была толще в 1,66 раза, чем у па-

Рисунок 3. Гистологический срез костной ткани пациента 62 лет (x200)



Рисунок 2. Гистологический срез костной ткани пациента 23 лет, бинарная обработка фото препарата с «Рисунка 1» (x200)



циентов в старшей возрастной группе (см. табл.). Таким образом, с возрастом идет потеря костной массы, что согласуется с данными литературы [4]. Толщина стенок трабекулярных базисных единиц с возрастом существенно уменьшается, тогда как скорость оппозиции остеоида — не изменяется [5]. Происходящее с возрастом уменьшение толщины трабекул свидетельствует о том, что по мере старения человека популяция остеобластов становится все менее способной восстанавливать ранее резорбированную костную ткань. Таким образом, мы можем судить о признаках сенильного остеопороза у пациентов старшей возрастной группы. Все использованные нами методы согласуются между собой и позволяют определить как количественные, так и качественные характеристики костной ткани в образцах небольшого размера.

На рис. 1 и 2 представлена костная ткань пациента молодого возраста с переводом изображения в черно-белый вариант. На рис. 3 и 4 — костная ткань пациента старшей возрастной группы.

Результаты ультразвуковой денситометрии подтвердили наличие изменений в костной плотности у пациентов старшей возрастной группы. Так, у 61,2% пациентов (8 чел.) показатель T был более 2,5 стандартных отклонений, что интерпретиру-

Рисунок 4. Гистологический срез костной ткани пациента 62 лет, бинарная обработка фото препарата с «Рисунка 3» (x200)





ется как «остеопороз». У 30,8% больных старшей возрастной группы показатель Т варьировал от 1,5 до 2,5 стандартных отклонений, т.е. определялась остеопения. В группе пациентов молодого возраста показатель Т не превышал 1,5 стандартных отклонений, т.е. плотность костной ткани соответствовала возрастной норме.

Обсуждение результатов исследования

Методы автоматизированного и полуавтоматизированного анализа изображения костной ткани с использованием компьютера значительно сокращают время анализа при гистоморфометрии. Измерение различных структур препаратов костной ткани основывается на анализе различных оттенков серого цвета. Известны зарубежные компьютеризированные устройства для полуавтоматического анализа гистологических срезов костной ткани: Videoplan, Biosom. Но данные устройства отличаются дороговизной и сложны для проведения скринингового исследования. Наша методика является достаточно простой и эффективной, не требует специального оборудования. При использовании этого метода достигаются следующие цели: получается точное цифровое значение объема полостей в каждом образце костной ткани; облегчается гистоморфометрическая оценка костной ткани при диагностике остеопороза; экономится время анализа и расчета изображения, по сравнению с ручным методом. Кроме того, в классических методиках ведется подсчет объема губчатой кости, который невозможен в биоптатах неправильной формы и небольших размеров. В нашей методике не требуется большого объема костной ткани, а по параметру «площади межтрабекулярного пространства» можно судить о порозности кости, т.е. структуре. Конечно, данный вид исследования не позволяет установить вид остеопороза (трабекулярный, кортикальный или смешанная форма), но позволяет поставить предварительный диагноз.

Снижение минеральной плотности челюстных костей происходит одновременно с другими костями скелета организма. Системным остеопорозом поражаются все костные структуры, где-то более выражено, например, в шейке бедренной кости, телах позвонков, где-то менее заметно — например, в челюстных костях. Тем не менее процесс идет системно, поэтому результаты ультразвуковой

денситометрии подтверждают снижение минеральной плотности костной ткани у пациентов старшей возрастной группы.

Метод определения костной плотности также является экспресс анализом на определение остеопороза костной ткани. В литературе встречаются описания различных вариантов данной методики [6, 7]. Но в них используются или специальные мерные пробирки или сложные формулы расчета костной плотности. Наша методика отличается простотой и точностью, т.к. для измерения используется обычный шприц, а вес фиксируется на электронных весах, что позволяет получить точные результаты. Кроме того, наш метод позволяет работать с абсолютно разными размерами образцов костной ткани — от самых мелких до крупных.

Вывод

На основании наших методик определения плотности костной ткани и площади межтрабекулярного пространства можно выявить у пациентов нарушение минерализации костной ткани, поставить предварительный диагноз — остеопороз. Данные методики позволяют работать с небольшими по размеру образцами костной ткани, поэтому не требуется специального проведения инвазивной биопсии. Мы рекомендуем использование данных методов для количественной и качественной оценки костной ткани.

ЛИТЕРАТУРА

1. Лоренс Риггз Б., Джозеф Мелтон Л. Остеопороз: Этиология, диагностика, лечение / Пер. с англ. / Под редакцией проф. Е.А. Лепарского. — М.: Бином, 2000. — С. 321-328.
2. Meunier P.J. Bone biopsy in diagnosis of metabolic bone disease / In: Cohn D.V., Talmage R.V., Mathews J.L. Hormonal control of calcium metabolism. — Amsterdam: Excerta Merlica, 1981. — P. 109-117.
3. Duncan H., Rao S.D., Parfitt A.M. Complications of bone biopsies / In: Jee W.S.S., Parfitt A.M., ed. // Bone Histomorphometry. — 1980, Paris, Armour Montagu: 1981. — P. 483-486.
4. Courpron P., Meunier P., Edouard C. Donnees histologiques quantitatives le vieillissement osseux humain // Rev. Thum. — 1973. — Vol. 40. — P. 469-483.
5. Жилкин Б.А. Морфологическая характеристика минеральной фазы кости, при старении и остеопорозе: автореф. дис. ... канд. мед. наук. — М., 2000. — 28 с.
6. Темерханов Ф.Т., Щетинин В.В., Архаров С.Л. Неинвазивный метод определения плотности костной ткани альвеолярных отростков челюстей в местах последующей имплантации // Казанский вестник стоматологии. — 1996. — №2. — С. 132.
7. Мухамеджанова Л.Р. Способ диагностики генерализованного пародонтита / Л.Р. Мухамеджанова, И.А. Латфуллин. — Патент РФ №2004100478. 2004.