

UDC 616.314.13+616.716.4]:611.018.2-007.17

ATOMIC-FORCE MICROSCOPY AS THE ADDITIONAL METHOD OF EXAMINATION OF FIRM TISSUES

S.N. Moskovskiy¹, Assistant Lecturer
V.P. Konev², Doctor of Medical sciences, Full Professor,
Head of a Chair
I.L. Shestel³, Candidate of Medical sciences, Senior Lecturer
A.S. Korshunov⁴, attending physician
M.A. Hamov⁵, intern
S.O. Markovskiy⁶, attending physician
Omsk State Medical Academy, Russia^{1,2,3,4,5}
MHI CCH №11, Department of maxillofacial surgery, Russia⁶

The purpose of the work: to study opportunities of application of atomic-force microscopy for morphological diagnostics of the pathology of the connecting tissue on firm tissues of teeth and bones.

Materials and research methods: the analysis of the packing extent, size and form of bone plates, enamel prisms, size of an inter-prismatic interval and its height on 30 removed teeth and the bone tissue of persons with a connecting tissue dysplasia and 27 removed teeth and the bone tissue of a control group by the nuclear-power microscopy method.

Results: research of a bone tissue and enamel of teeth is carried out in conditions of the connecting tissue pathology in comparison with patients without it. It was established that collagen configuration in conditions of the connecting tissue pathology assumes increase of an interval between fibers up to 98 nm which reduce the quantitative content of the mineral matrix in a bone. In enamel of teeth we have also determined violations of forms and sizes of enamel prisms (5.5×5.4 microns) with increasing distance between enamel prisms up to 1.6 micron.

Conclusions: 1. Results of examination of the ultra-structure and mineral structure allow to talk about violation of mineralization and organization of enamel of teeth and the bone tissue of persons with the connecting tissue pathology symptoms. 2. Use of the nuclear-power microscopy allows to study native cellular cultures, including firm tissue of teeth and the bone tissue. 3. The specified facts can be used as a basis for the diagnostics of the connecting tissue pathology and for determination of individual characteristics in the process of identification of the personality.

Keywords: connecting tissue pathology, collagen, atomic-force microscopy.

Conference participants

Введение. Исследования клеточных структур микроскопическими методами на сегодняшний день являются основополагающими для диагностики патологических процессов, и главным из них остается оптическая микроскопия [1,4,5]. При исследовании костной ткани и твердых тканей зубов, несмотря на необходимость придерживаться строгой последовательности методики изготовления микропрепаратов, требующей длительного периода времени для лучших результатов одновременной фиксации и декальцинации оптическая микроскопия остается, чуть ли не единственным способом оценки патологических изменений, даже не учитывая некоторые неизбежные изменения (набухание коллагеновых структур, микроразрушения кристал-

лической решетки гидроксиапатитов), что нежелательно, особенно в случаях патологии соединительной ткани [2,3,9].

Помимо рутинных методов микроскопии, лежащих в основе всех исследовательских программ, для изучения ультраструктур клетки и клеточных мембран в настоящее время используются электронная микроскопия, сканирующая, зондовая микроскопия. Метод электронной микроскопии известен давно, в то время как методы сканирующей микроскопии развиваются не более 2 десятилетий. Атомно-силовая микроскопия (АСМ) применяется для исследования гистологических препаратов пока чрезвычайно редко: стандартные способы подготовки образцов для АСМ позволяют исследовать поверхность образ-

UDC 616.314.13+616.716.4]:611.018.2-007.17

АТОМНО-СИЛОВАЯ МИКРОСКОПИЯ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ МЕТОД В ИССЛЕДОВАНИИ ПЛОТНЫХ ТКАНЕЙ

Московский С.Н.¹, ассистент
Конеv В.П.², д-р мед. наук, проф., зав. кафедрой
Шестель И.Л.³, канд. мед. наук, ст. преподаватель
Коршунов А.С.⁴, ординатор
Хамов М.А.⁵, интерн
Марковский С.О.⁶, ординатор
Омская государственная медицинская академия, Россия^{1,2,3,4,5}
МУЗ ГКБ №11, отделение челюстно-лицевой хирургии, Россия⁶

Цель работы: Изучить возможности применения атомно-силовой микроскопии для исследования плотных тканей (кости, зубы).

Материалы и методы исследования: анализ степени упаковки размер и форму костных пластинок, эмалевых призм, а также, размер межпризменного промежутка и его высоту на 30 удаленных зубов и костной ткани у лиц с дисплазией соединительной ткани и 27 удаленных зубов и костной ткани группы контроля методом атомно-силовой микроскопии.

Результаты: Проведено исследование костной ткани и эмали зубов при патологии соединительной ткани в сравнении с пациентами без таковой. Установлено, что компоновка коллагена при патологии соединительной ткани подразумевает увеличение промежутка между волокнами до 98 нм, которые снижают количественное содержание минерального матрикса в кости. В эмали зубов также отмечается нарушения форм и размеров эмалевых призм (5,5×5,4 микрон) с увеличением расстояния между эмалевыми призмами до 1,6 микрон.

Выводы: 1. Результаты исследования ультраструктуры и минерального состава позволяют говорить о нарушении минерализации и организации эмали зубов и костной ткани у лиц с признаками патологии соединительной ткани. 2. Использование атомно-силовой микроскопии позволяет изучать нативные клеточные культуры, в т.ч. твердые ткани зуба и костную ткань. 3. Указанные факты могут быть использованы, как основа для диагностики патологии соединительной ткани, так и для определения индивидуальных характеристик при идентификации личности.

Ключевые слова: патология соединительной ткани, коллаген, атомно-силовая микроскопия.

Участники конференции

ца, но не его внутреннюю структуру [4,6,10].

Сканирующая туннельная микроскопия и АСМ являются наиболее перспективными представителями сканирующей зондовой микроскопии, причем она не требует обязательной электрической проводимости исследуемых образцов, то есть образцы не нуждаются в предварительной обработке [3,7,8].

Цель работы. Изучить возможности применения АСМ для морфологической оценки плотных тканей (кости, зубы).

Материалы и методы исследования. Исследование проводилось на 57 пациентах в возрасте от 20 до 40 лет (из них 49 мужчин и 8 женщин), у которых после травмы в области угла нижней челюсти был удален 8 зуб из

линии перелома. По результатам анкетирования и общеклинического обследования сформировано 2 группы пациентов. Основная группа пациентов с дисплазией соединительной ткани в количестве 30 (из них 25 мужчин и 5 женщин), и контрольная группа – без дисплазии соединительной ткани в количестве 27 человек (из них 23 мужчин и 4 женщины). Морфологическое исследование выполнено на 57 зубах, которые были консервированы после удаления, одномоментно помещались в нейтральный 10% раствор формалина. По разработанной методике подготовлены шлифы медиального щечного бугра, обработанные с использованием полировально-шлифовального станка Нейрис, шлифовальных кругов hermes с разной степенью зернистости, и полировальных кругов с алмазной суспензией Akasel, а также травления ортофосфорной кислотой системы марки «Eviscol».

Отсмотр образцов осуществлялся на оптическом микроскопе марки Olympus jx 41, с увеличением 1000крат, при этом изучалось микроскопическое строение костной ткани и эмали зубов нижней челюсти. Ультраструктурное строение изучалось с использованием сканирующего зондового микроскопа Solver Pro (NT – MPT, Россия). Анализ образцов АСМ–изображения осуществлялся с использованием программного модуля обработки изображения Image Analysis NT – VDT. В результате были получены цифровые снимки зубов у обследуемых лиц, по которым осуществлялся анализ степени упаковки и форму эмалевых призм, размер эмалевых призм, размер межпризменного промежутка и его высоту, размер обо-

лочки эмалевых призм у группы контроля и лиц с патологией соединительной ткани.

Морфологическое исследование 57 костных объектов (нижняя челюсть) было выполнено с применением описанной выше методики.

Результаты.

По качественным характеристикам костной ткани плотное вещество состояло из тонких костных пластинок, границы которых на поперечных шлифах кости выступали весьма четко, так как полости костных пластинок в плотном костном веществе располагались, как правило, между соседними пластинками. Местами костные пластинки соприкасались друг с другом, местами же между ними располагались вставочные пластинки.

По качественным характеристикам эмалевых призм зуба, у лиц без патологии соединительной ткани имело место постоянство структуры в виде упорядоченных шестигранных и даже семигранных, с аркообразными формами эмалевых призм. В исследуемой группе с патологией соединительной ткани призм были расположены хаотично, они имели и пятигранную и шестигранную структуру, с разнообразными формами в виде различных геометрических фигур. При зондовой микроскопии эмали зубов на нижней челюсти видно, что у лиц с патологией соединительной ткани эмалевые призм отличались меньшими размерами, как в горизонтальной, так и вертикальной плоскостях. Параллельно этому следовало уменьшение эмалевых призм в единице объема, что говорит о менее плотной их упаковке. Достоверное увеличение расстояния между эмалевыми призмами, увеличе-

ние высоты межпризменного промежутка у данной категории пациентов говорит об увеличении общей доли органического вещества в полностью прорезавшихся зубах. Величина оболочки эмалевой призмы у лиц с патологией соединительной ткани отличалась большими размерами (табл.1).

При зондовой микроскопии костной ткани нижней челюсти видно, что молекулы коллагена не были связаны между собой “конец в конец”, а между ними имелся промежуток в 35 - 40 нм. Предполагается, что в костной ткани эти промежутки играют роль центров минерализации, где откладываются кристаллы фосфата кальция. При атомно-силовой микроскопии фиксированные и контрастированные фибриллы коллагена выглядели поперечно исчерченными с периодом 67 нм, который включает одну темную и одну светлую полоски, с диаметром в среднем 100 нм. Считают, что такое строение максимално повышает сопротивление всего агрегата растягивающим нагрузкам. При этом, у лиц с патологией соединительной ткани, мы наблюдали, что сопоставимые измерения длины и поперечника коллагеновых волокон сильно варьировали, с увеличением промежутка между волокнами до 98 нм (в среднем 84 нм), и уменьшения поперечного размера волокон до 40 нм (в среднем 56 нм). При этом, сопоставление размеров минеральных пластин между коллагеновыми волокнами в костной ткани нижней челюсти как у лиц с патологией соединительной ткани, так и в группе сравнения, статистически достоверной разницы не наблюдалось (табл. 2).

Таблица 1.

Количественные характеристики минерального матрикса эмали зубов у обследуемых лиц (зондовая микроскопия)

Параметры /Группы обследуемых лиц	Размер эмалевых призм в горизонтальной плоскости (dx), микрон	Размер эмалевых призм в вертикальной плоскости (dy), микрон	Количество эмалевых призм в ед. объема (10*10 микрон)	Расстояние между эмалевыми призмами, микрон	Величина оболочки призмы, микрон	Высота межпризменного промежутка микрон
Группа пациентов без ДСТ (n = 27)	6,3 ± 0,2	6,25 ± 0,3	6,2 ± 0,2	0,32±0,02	0,19±0,03	19,8 ± 2,5
Группа пациентов с ДСТ (n = 30)	5,5 ± 0,3*	5,4 ± 0,1*	5,2± 0,1*	1,5 ± 0,1*	0,8 ± 0,2*	84,5 ± 2,9*

Примечание: * Достоверность различий между основной (пациенты с ДСТ) и контрольной группами p<0,05

Таблица 2.

Количественные характеристики минерального матрикса у обследуемых лиц (зондовая микроскопия)

Параметры/Группы обследованных	Размер коллагеновых волокон в горизонтальной плоскости (dx), нм	Размер коллагеновых волокон в вертикальной плоскости (dy), нм	Размер минеральных пластинок в горизонтальной плоскости (dx), нм	Размер минеральных пластинок в вертикальной плоскости (dy), нм
группа пациентов без ДСТ (n = 27)	61,4 ± 8,5	98,7 ± 23,3	61,4 ± 9,5	5,4 ± 1,3
группа пациентов с ДСТ (n = 30)	84,7 ± 14,2*	56,0 ± 17,4*	74,7 ± 9,4*	9,0 ± 2,3*

Примечание: * Достоверность различий между основной (пациенты с ДСТ) и контрольной группами p<0,05

При оценке результатов исследования костной ткани видно, что основным различием между группой контроля и пациентами с патологией соединительной ткани является наличие пустот, что влечет за собой изменения структуры залегания минеральных элементов кости, изменение формирования костных пластинок, а также изменение количества минеральных компонентов в единице объема кости.

По результатам исследования эмали зубов видно, что основным различием между группой контроля и пациентами с патологией соединительной ткани является наличие гипоминерализованной структуры кристаллической решетки гидроксиапатитов, неправильной их пространственной ориентацией, что влечет за собой изменение залегания органического матрикса, нарушение формирования полноценной структуры эмали, вследствие нарушения нормального взаимоотношения органического матрикса и минерального компонента, несвойственных данному периоду созревания эмали зубов.

Выводы.

1. По результатам исследования ультраструктуры и минерального состава можно говорить о нарушении минерализации и организации эмали зубов и костной ткани у лиц с признаками патологии соединительной ткани. Это объясняется недостаточно плотной упаковкой эмалевых призм, костных пластинок в единице объема, их хаотичным расположением, недостаточно организованным и минерализованным органическим матриксом.

2. Достоинством этого метода является возможность изучения мик-

рорельефа поверхности без предварительной обработки, деформирующей клеточные структуры. Исследования срезов на АСМ дают возможность получать изображения, сопоставимые с малым увеличением (менее ~25000) просвечивающего электронного микроскопа. Дальнейшее развитие методик позволит использовать АСМ как основной метод исследования тканей, используемый в сочетании с другими видами микроскопии.

3. Результаты демонстрируют возможность использования АСМ для изучения нативных клеточных культур, в т.ч. твердых тканей зуба и костной ткани как в судебно-медицинской так и стоматологической практиках с возможностью определения индивидуальных характеристик, так и в клинике – диагностика патологических процессов и контроль качества лечения пациентов с патологией соединительной ткани. Вопрос об использовании АСМ для исследования особенностей костной ткани и твердых тканей зубов при диспластических процессах, таких как синдром Педжетта, синдром Марфана, синдром Элерса-Данло и т.д., заслуживает дальнейшего изучения.

References:

1. Cadet ER, Gafni RI, McCarthy EF, McCray DR, Bacher JD, Barnes KM, et al. Mechanisms responsible for longitudinal growth of the cortex: coalescence of trabecular bone into cortical bone, *J Bone Jt Surg, Am* – 2003., Vol. 85., pp. 39–48.
 2. Chiego D.J. The early distribution and possible role of nerves during odontogenesis, *Int. J. Develop. Biol.*

– 1995., Vol. 39, No 1., pp. 191 – 194.

3. Gao HJ, Ji BH, Jager IL, Arzt E, Fratzl P. Materials become insensitive to flaws at nanoscale: lessons from nature, *PNAS.* – 2003., Vol. 100., pp. 597– 600.

4. Gutschmann T, Fantner GE, Venturoni M, Ekani-Nkodo A, Thompson JB, Kindt JH, et al. Evidence that collagen fibrils in tendons are inhomogeneously structured in a tubelike manner, *Biophys J.* – 2003. Vol. 84., pp. 93–103.

5. Moskovskij S.N. Patologija kostnoj tkani u lic s displaziej soedinitel'noj tkani i zloupotrebljajushih alkogolem: sudebno-medicinskaja ocenka [Bone tissue pathology among patients with the connective tissue dysplasia and alcohol abusers: forensic medical evaluation], *Moskovskij S.N., Konev V.P., Goloshubina V.V., Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian medical journal], Volume 26,1 Tomsk – 2011., pp. 27-30.*

6. Lees S. Mineralization of type I collagen, *Biophys J.* –2003., Vol. 85. No 20., pp. 4–7.

7. Ng L, Grodzinsky AJ, Patwari P, Sandy J, Plaas A, Ortiz C. Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy, *J Struct Biol.* – 2003., Vol. 143, No 2., pp. 42– 57.

8. Roschger P, Gupta HS, Berzanovich A, Ittner G, Dempster DW, Fratzl P, et al. Constant mineralization density distribution in cancellous human bone, *Bone.* – 2003., Vol. 32, No 3., pp. 16– 23.

9. Rubin MA, Jasiuk L, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian RP. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular

bone, Bone. – 2003., Vol.33, No 3., pp. 270–82.

10. Venturoni M, Gutschmann T, Fantner GE, Kindt JH, Hansma PK. Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy, Biochem Biophys Res Commun. – 2003. Vol.30, No 50., pp. 8–13.

11. Tong W, Glimcher MJ, Katz JL, Kuhn L, Eppell SJ. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy, Calcif Tissue Int. – 2003., Vol. 75, No 59., pp. 2–8.

Литература:

1. Cadet ER, Gafni RI, McCarthy EF, McCray DR, Bacher JD, Barnes KM, et al. Mechanisms responsible for longitudinal growth of the cortex: coalescence of trabecular bone into cortical bone // J Bone Jt Surg, Am – 2003. – Vol. 85. – P. 39–48.

2. Chiego D.J. The early distribution and possible role of nerves during odontogenesis // Int. J. Develop. Biol. – 1995. – Vol. 39, №1. - P. 191–194.

3. Gao HJ, Ji BH, Jager IL, Arzt E, Fratzl P. Materials become insensitive to flaws at nanoscale: lessons from nature // PNAS. – 2003. – Vol. 100. – P. 597–600

4. Gutschmann T, Fantner GE, Venturoni M, Ekani-Nkodo A, Thompson JB, Kindt JH, et al. Evidence that collagen fibrils in tendons are inhomogeneously structured in a tubelike manner // Biophys J. – 2003. Vol. 84. – P. 93–103.

5. Московский С.Н. Патология костной ткани у лиц с дисплазией соединительной ткани и злоупотребляющих алкоголем: судебно-медицинская оценка / Московский С.Н., Конев В.П., Голошубина В.В. // Сибирский медицинский журнал, Том 26,1 Томск – 2011 с. 27-30.

6. Lees S. Mineralization of type I collagen // Biophys J. –2003.- Vol. 85. №20. – P. 4–7.

7. Ng L, Grodzinsky AJ, Patwari P, Sandy J, Plaas A, Ortiz C. Individual cartilage aggrecan macromolecules and their constituent glycosaminoglycans visualized via atomic force microscopy // J Struct Biol. – 2003. – Vol. 143, №2. – P. 42–57.

8. Roschger P, Gupta HS,

Berzanovich A, Ittner G, Dempster DW, Fratzl P, et al. Constant mineralization density distribution in cancellous human bone // Bone. – 2003. – Vol. 32, № 3. - P. 16–23.

9. Rubin MA, Jasiuk L, Taylor J, Rubin J, Ganey T, Apkarian RP. TEM analysis of the nanostructure of normal and osteoporotic human trabecular bone // Bone. – 2003. – Vol. 33, № 3. - P. 270–82.

10. Venturoni M, Gutschmann T, Fantner GE, Kindt JH, Hansma PK. Investigations into the polymorphism of rat tail tendon fibrils using atomic force microscopy // Biochem Biophys Res Commun. – 2003. Vol.30, № 50. – P. 8–13.

11. Tong W, Glimcher MJ, Katz JL, Kuhn L, Eppell SJ. Size and shape of mineralites in young bovine bone measured by atomic force microscopy // Calcif Tissue Int. – 2003. – Vol. 75, №59. – P. 2–8.

Information about authors:

1. Sergey Moskovskiy - Assistant Lecturer, Omsk State Medical Academy; address: Russia, Omsk city; e-mail: moscow-55@mail.ru

2. Vladimir Konev - Doctor of Medical sciences, Full Professor, Head of a Chair, Omsk State Medical Academy; address: Russia, Omsk city; e-mail: vpkonev@mail.ru

3. Igor Shestel - Candidate of Medical sciences, Senior Lecturer, Omsk State Medical Academy; address: Russia, Omsk city; e-mail: moscow-55@mail.ru

4. Andrey Korshunov - attending

physician, Omsk State Medical Academy; address: Russia, Omsk city; e-mail: andrey_k_180588@mail.ru

5. Michail Hamov – intern, Omsk State Medical Academy; address: Russia, Omsk city; e-mail: moscow-55@mail.ru

6. Sergey Markovskiy - attending physician, МНН ССН №11, Department of maxillofacial surgery; address: Russia, Omsk city; e-mail: moscow-55@mail.ru

Сведения об авторах:

1. Московский Сергей - ассистент, Омская государственная медицинская академия; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: moscow-55@mail.ru

2. Конев Владимир - доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой, Омская государственная медицинская академия; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: vpkonev@mail.ru

3. Шестель Игорь - кандидат медицинских наук, старший преподаватель, Омская государственная медицинская академия; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: moscow-55@mail.ru

4. Коршунов Андрей - ординатор, Омская государственная медицинская академия; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: andrey_k_180588@mail.ru

5. Хамов Михаил - интерн, Омская государственная медицинская академия; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: moscow-55@mail.ru

6. Марковский Сергей - ординатор, МУЗ ГКБ №11, отделение челюстно-лицевой хирургии; адрес: Россия, Омск; электронный адрес: moscow-55@mail.ru

