

TKANKA KOSTNA A MOŻLIWOŚCI DIAGNOSTYCZNE

Człowiek i Zdrowie Nr 1 (V) 2011, s. 78-84

Tomaszewski Marek^{1,2}, Tomaszewska Monika³, Olchowik Grażyna^{2,4}

¹Katedra i Zakład Anatomii Prawidłowej Człowieka Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

²Państwowa Szkoła Wyższa im. Papieża Jana Pawła II w Białej Podlaskiej

³I Zakład Radiologii Lekarskiej Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

⁴Katedra i Zakład Biofizyki Uniwersytetu Medycznego w Lublinie

Streszczenie: Ogromny postęp, jaki dokonuje się we współczesnym świecie, ujawnia się coraz to lepszymi metodami badawczymi w dziedzinie nauk medycznych. Umożliwiają one rozpoznawanie i skuteczniejsze leczenie wielu jednostek chorobowych. Metody diagnostyczne pomocne w ocenie tkanki kostnej również ulegają zmianom na lepsze. Poniższy artykuł zawiera przegląd możliwości diagnostycznych, które można brać pod uwagę do oceny tkanki kostnej.

Słowa kluczowe: tkanka kostna, radiografia cyfrowa, tomografia komputerowa, ultrasonografia ilościowa, metody densytometryczne, metody immunohistochemiczne.

Wstęp

Ogromny postęp, jaki dokonuje się we współczesnym świecie, ujawnia się coraz to lepszymi metodami badawczymi w dziedzinie nauk medycznych. Umożliwiają one rozpoznawanie i skuteczniejsze leczenie wielu jednostek chorobowych. Narzędzia diagnostyczne pomocne w ocenie tkanki kostnej również ulegają zmianom na lepsze. Obecnie coraz więcej informacji dociera do nas na temat procesów zachodzących w obrębie kości w zdrowiu i chorobie. Zaburzenia mineralizacji tej tkanki obserwowane zarówno u dzieci i dorosłych mogą wynikać bezpośrednio z patologii samej tkanki kostnej (pierwotne zaburzenia mineralizacji), bądź stanowić powikłanie innych chorób lub stosowanego leczenia (wtórne zaburzenie mineralizacji). Przyspieszone niszczenie tkanki kostnej towarzyszy chorobom zapalnym, schorzeniom o podłożu autoimmunologicznym, chorobom nowotworowym i wielu innym patologiom. Niezależnie od czynnika etiologicznego ważnymi klinicznie objawami kostnymi są: złamanie patologiczne kręgów lub innych kości, ucisk na rdzeń kręgowy, hiperkalcemia. Często stosowane jest leczenie chirurgiczne lub radioterapia z powodu klinicznych zmian w kościach [Coleman 2004, Czerwiński 2004].

Tkanka kostna jest zróżnicowaną tkanką łączną, charakteryzującą się dużą wytrzymałością i wysoką aktywnością metaboliczną. Dzięki tym właściwościom pełni funkcję ochronną dla narządów wewnętrznych. Dodatkowo stanowi "rusztowanie" dla organizmu oraz rezerwuuar związków mineralnych takich jak wapń (99% tego pierwiastka w ustroju zdeponowane jest w tkance kostnej) czy fosforany. W warunkach prawidłowych ulega ona stałej przebudowie, w której uczestniczą zarówno osteoblasty (udział w procesach odbudowy), jak i osteoklasty (udział w procesach niszczenia i usuwania). Aktywność obu rodzajów komórek jest bliska równowagi, dzięki czemu odbudowa kości jest symetryczna i wyrównana [Czerwiński 2008, Pallua i Suscheck 2010].

Metody diagnostyczne

Badanie radiologiczne jest podstawową metodą diagnostyczną w ocenie tkanki kostnej. Podstawą do analizy są klasyczne zdjęcia rentgenowskie wykonane w dwu prostopadłych do siebie płaszczyznach. W metodzie tej wykorzystuje się zjawisko pochłaniania promieniowania rentgenowskiego, które zależy od gęstości tkanki kostnej i stopnia wysycenia jej solami wapnia. Zależność ta pozwala na ocenę gęstości fizycznej i mineralnej kości [Tothil i Hannan, 2002]. Klasyczne obrazy radiologiczne umożliwiają określenie geometrii kości, grubości warstwy korowej, jamy szpikowej oraz zmian strukturalnych i odczynów okostnowych [Marchiori, 1999]. Pomimo, że klasyczne badanie obarczone jest pewną niedokładnością – albowiem trójwymiarowa struktura ciała, przedstawiona zostaje na dwuwymiarowej powierzchni błony fotograficznej – to nadal pozostaje podstawową metodą diagnostyczną. Nie jest możliwe dokładne określenie struktury tkankowej, ze względu na na-

kładanie się na siebie obrazów, wszystkich warstw ciała. Zdjęcie wykonywane w odcinku piersiowym i lędźwiowym kręgosłupa umożliwia zdiagnozowanie jedynie zaawansowanych zmian osteoporotycznych tj. zmniejszenia wysokości trzonów kręgów, ubytku beleczek kostnych o układzie horyzontalnym z dominacją beleczek o układzie pionowym oraz ścięcinie warstwy korowej. Należy jednak zaznaczyć, że zauważalny ubytek widoczny jest dopiero po utracie 30-50% masy kostnej [Pruszyński, 2001; Mirvis i wsp. 2009].

Oceny morfologii elementów uwapnionych oraz ilościowej analizy mineralizacji szkieletu można również dokonać za pomocą radiografii cyfrowej [Burda i wsp., 2002; Różyło-Kalinowska i wsp., 2003]. Metoda ta łączy elementy radiologii klasycznej z zapisem obrazu w formie bitmapy na twardym dysku komputera [Jorgensen i wsp. 2000]. W przypadku oceny mineralizacji kości płodów szczurzych, najdogodniejszą strukturą są kręgi lędźwiowe – ze względu na łatwą dostępność oraz brak rzutowania się na nie obrazów innych części kośćca. Po ekspozycji materiału biologicznego na promieniowanie rentgenowskie płytka densytometryczna (znajdująca się uprzednio pod tkanką kostną) umieszczana zostaje w skanerze, który jest częścią zestawu komputerowego. W pierwszym etapie pomiaru wykreśla się linię łączącą zewnętrzne brzegi symetrycznych punktów kostnienia łuków kręgów. Następnie ocenia się maksymalną, minimalną oraz średnią gęstość optyczną (zliczaną na podstawie wartości pikseli), wzdłuż wykreślonej uprzednio linii. Ponadto tworzony jest histogram, obrazujący rozkład gęstości w badanym obszarze. Zaletą radiografii cyfrowej jest łatwe i szybkie wykonanie pomiarów oraz stosunkowo niewielki koszt badania [Różyło i Różyło-Kalinowska, 1999].

Bardziej precyzyjną metodą diagnostyczną niż standardowe zdjęcia radiologiczne jest tomografia komputerowa. Z fizycznego punktu widzenia obraz tomograficzny jest odwzorowaniem rozkładu współczynników osłabiania promieniowania rentgenowskiego w prześwietlanej warstwie ciała. Badanie tomograficzne pozwala na wyjaśnienie problemów związanych z czynnym i biernym narządem ruchu. Umożliwia ocenę zmian w miejscach trudnodostępnych takich jak kręgosłup, mostek czy siodło tureckim [Leszczyński, 1984; Krestel, 1990; Webb i wsp. 2007].

Dzięki tomografii komputerowej w opcji ilościowej – QCT (ang. *Quantitative CT*), możliwa jest ocena istoty zbitej i gąbczastej kości (zwłaszcza kręgosłupa), jak również rzeczywista jej gęstość, wyrażona w g/cm^3 [Lane, 2006; Olchowik i wsp., 2007]. Tomografia komputerowa pozwala na ocenę morfologii poszczególnych beleczek kostnych. Stało się to możliwe dzięki zastosowaniu aparatów o wysokiej i ultrawysokiej rozdzielczości rzędu 100-200 μm i 60-100 μm w badaniach mikro-CT. Przy rozdzielczości rzędu 10 μm , czy nawet 1 μm , określa się ultrastrukturę kości *in vitro* i *in vivo* techniką zwaną rentgenowską mikroskopią tomograficzną (ang. *X-ray Tomographic Microscopy*) [Genant i wsp., 1999; Genant i Jiang, 2006]. Tomografia komputerowa umożliwia trójwymiarową analizę (także w opcji QTC). Tego typu rekonstruowane obrazy, w praktyce klinicznej, wykorzystuje się do oceny złożonych złamań kości, złamań panewki stawu biodrowego, czy kręgosłupa [McLean i Nelson, 1982; McLean 1999].

Warto zaznaczyć, że we wszystkich badaniach radiologicznych pacjent zawsze narażony jest na działanie promieniowania jonizującego. Metodą pozwalającą na dokładne określenie struktur tkanek i narządów, w której nie występuje czynnik jonizujący jest magnetyczny rezonans jądrowy (MRI, ang. *Magnetic Resonance Imaging*). Aczkolwiek do końca nie są poznane odległe skutki działania pola magnetycznego o dużej indukcji na organizmy żywe [Pruszyński, 2001; Rummeny, 2010].

MRI stosowany jest zwykle w diagnostyce chorób układu nerwowego i mięśniowo-szkieletowego. Podstawą tomografii MRI jest zjawisko jądrowego rezonansu magnetycznego odkryte w latach 1944-1946 przez Blocha i Purucela. W tomografii MRI wykorzystuje się stałe pole magnetyczne o indukcji 0,5 – 2,5 tesli oraz fale elektromagnetyczne zakresu częstotliwości radiowych. W ocenie tkanki kostnej rola rezonansu magnetycznego ograniczona jest do kontroli szpiku kostnego, wykrywania ognisk zapalnych i martwiczych, złamań utajonych, jak również zmian nowotworowych [Gadian, 1995; Gonet, 1997].

Podobnie jak w tomografii komputerowej, również w technice rezonansu magnetycznego, wprowadzono mikroskopię rezonansu magnetycznego (μMR , ang. *Magnetic Resonance Microscopy*), pozwalającą na analizę histomorfometryczną danego wycinka kostnego. Przy użyciu tej metody można określić ilościową zawartość poszczególnych pierwiastków w kości.

Kolejną metodą jest ultrasonografia ilościowa (QUS, ang. *Quantitative Ultrasonography*) wykorzystująca zjawisko rozproszenia i absorpcji fal ultradźwiękowych przechodzących przez kość. Klinicznie, typowym miejscem pomiaru jest kość piętowa. Ze względu na łatwość dostępu do sprzętu oraz braku narażenia na promieniowanie rentgenowskie metoda ta cieszy się dużą popularnością. Zasada pomiaru opiera się na liniowej zależności tłumienia fal ultradźwiękowych wraz ze wzrostem ich częstotliwości. Im większa jest redukcja beleczek kostnych, tym nachylenie krzywej pomiaru staje się mniejsze. Ponadto w najnowszych aparatach mierzona jest prędkość fali ultradźwiękowej, której wartość zależy od architektury i gęstości kości [Jakubowski, 1989; Kremer i Dobryński, 1996; Palmer, 1997]. Pomiary prędkości fali ultradźwiękowych i ich tłumienia

dostarczają informacji dotyczących nie tylko masy kostnej, ale również jej elastyczności, mikroarchitektury, co umożliwia oszacowanie ryzyka złamań [Herd, 1992; Bauer, 1997; Olchowik i wsp., 2007].

Obraz tkanek i narządów można uzyskać przy użyciu izotopów promieniotwórczych. W badaniu scyntygraficznym wykorzystuje się wybiórcze powinowactwo tkankowe radiofarmaceutyków [Higgins i Auffermann, 1994; Królicki, 1996]. Obrazowanie tkanki kostnej przeprowadza się przy użyciu metylenodifosfonianu technetu ($^{99m}\text{Tc-MDP}$), substancji znakowanej izotopem technetu 99m. Zwiększone wychwytywanie tego radiofarmaceutyku obserwowane jest m.in. w guzach nowotworowych, stanach zapalnych [Daniel i Prószyński 2005].

Ocenę wytrzymałości mechanicznej kości można dokonać na podstawie pomiarów gęstości mineralnej tkanki kostnej. Gęstość mineralną kości określa się metodami densytometrycznymi [Pawlikowski i Niedźwiedzki, 2002]. Wśród metod ilościowego oznaczania składników mineralnych wymienia się absorpcję wiązki fotonów o jednolitej energii (SPA, ang. *Single Photon Absorpcjometry*) oraz o dwóch różnych energiach (DPA, ang. *Dual Photon Absorpcjometry*), jak również absorpcję wiązki promieniowania rentgenowskiego o jednej energii (SXA, ang. *Single X-ray Absorptiometry*) oraz o dwóch różnych energiach (DXA, ang. *Dual X-ray Absorptiometry*) [Debrunner i Hepp 2008, Kusz 2009].

SPA opracowana przez Camerona i Sorensona w 1963 roku polega na oznaczeniu współczynnika osłabienia monoenergetycznej wiązki promieniowania gamma emitowanego przez jod 121 (I^{121}), po jej przejściu przez badaną kość [Cameron i Sorenson, 1963]. Odczyt wartości współczynnika osłabienia odbywa się przy pomocy sodowo-jodowego licznika scyntylacyjnego. Istniejąca różnica w absorpcji fotonów pomiędzy tkanką kostną a strukturami miękkimi pozwala na obliczenie masy kostnej w badanej strukturze. Jednakże, aby uzyskać dokładny pomiar, grubość tkanek miękkich powinna być taka sama jak badanej kości. Dlatego w warunkach klinicznych, badanie zawęża się do kości piętowej i obwodowej części kości przedramienia. Wyniki wyrażone są w postaci wskaźnika złamań lub wskaźnika mineralizacji wyrażonego w gramach substancji kostnej przypadającej na cm^3 [Wahner, 1987].

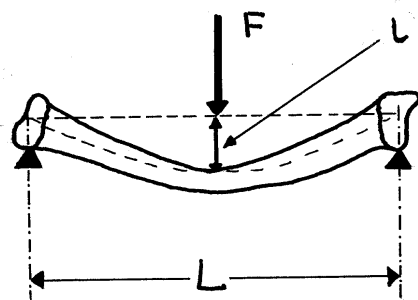
DPA polega na jednoczesnym pomiarze współczynnika osłabienia promieniowania w tkankach miękkich i w kości. Źródłem promieniowania jest radioizotop Gadolinum 153, który emituje promieniowanie o dwóch różnych spektrach. Daje to możliwość korekcji błędów, wynikającego z nakładania się współczynników osłabienia części miękkich i kostnych. Metoda ta umożliwia dokładną ocenę tych miejsc, gdzie kość otoczona jest dużą ilością tkanek miękkich na przykład w kręgosłupie lub szyjce kości udowej. Otrzymane wyniki obrazują gęstość kości (BMD, ang. *Bone Mineral Density*) wyrażoną w g/cm^2 , bądź określają zawartość masy kostnej w cm^3 badanej kości [Cann, 1988].

SXA jest metodą polegającą na absorpcji wiązki promieniowania rentgenowskiego o jednej energii. Została ona jednak wyparta przez nowszą, powszechnie już używaną metodę DXA. Obecnie pomiar gęstości mineralnej tkanki kostnej metodą DXA uznawany jest za tzw. złoty standard diagnostyczny osteoporozy [Fogelman i Blake, 2000; Gordon C.M. i wsp., 2008].

Zasada pomiaru DXA opiera się na wykorzystaniu wiązki promieniowania rentgenowskiego o energii 90 keV. Specjalny filtr umieszczony pomiędzy lampą a pacjentem dokonuje separacji wiązki promieniowania na dwa spektra o efektywnych energiach 45 i 75 keV. Rejestracja współczynników osłabienia odbywa się przez dwa detektory: jeden dla wiązki o wysokiej energii, drugi dla wiązki o niskiej energii. Pozwala to na zróżnicowanie otaczających struktur miękotkankowych i tkanki kostnej. Niewątpliwą zaletą tego typu badania jest wykonywanie pomiarów w dowolnym miejscu szkieletu, krótki czas akwizycji, zwiększenie dokładności pomiarów, ich powtarzalności oraz zredukowanie dawki promieniowania (90% mniej promieniowania jonizującego aniżeli przy klasycznym radiogramie klatki piersiowej) [Olchowik i wsp., 2007]. Ponadto badanie to jest bezbolesne, trwa od kilku do kilkunastu minut i nie wymaga przygotowań ze strony badanego. Wadą tej metody jest dwuwymiarowe odzwierciedlenie trójwymiarowych struktur kostnych, jak również różny współczynnik osłabiania dla tłuszczu i tkanek ubogich w tłuszcz.

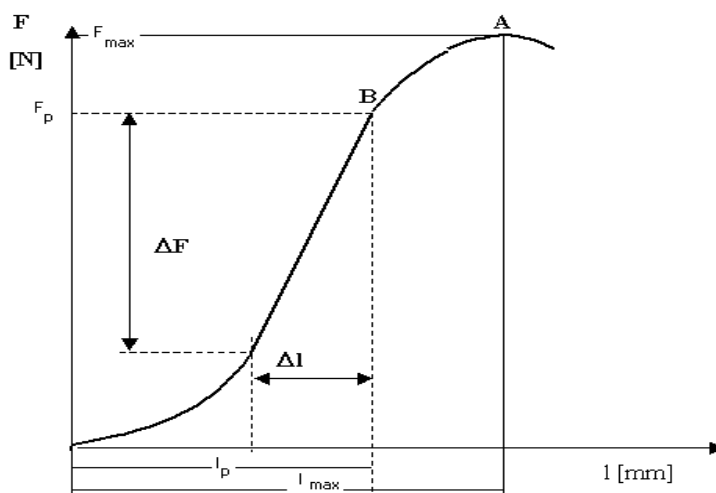
Morfometryczna absorpcjometria (ang. *Morphometric X-ray Absorptiometry*; MXA) jest odmianą DXA. Pozwala na jednoczesne zróżnicowanie gęstości tkanki kostnej od otaczających tkanek miękkich oraz ocenę morfologii badanej struktury. Ograniczeniem jest jednak mała rozdzielczość [Rea i wsp., 1998].

Z badań doświadczalnych na szczególną uwagę zasługują techniki biomechaniczne, oceniające wytrzymałość kości. Najbardziej rozpowszechnionym badaniem jest tzw. trójpunktowa próba wytrzymałościowa [Simkin i Robin, 1973]. W badaniu tym kość podparta na obu końcach i obciążona w środkowej części ulega ugięciu a następnie złamaniu (Ryc. 1).



Ryc. 1. Schemat badania wytrzymałościowego w próbie trójpunktowej [Simkin i Robin, 1973].

Biomechanikę danego materiału określają dwa podstawowe parametry – naprężenie wewnętrzne i odkształcenia, które powstają pod wpływem siły zewnętrznej przyłożonej do ciała stałego. Typowy przebieg zależności siły (F) przykładanej do środkowej części trzonu kości promieniowej w zależności od przemieszczania głowicy (l) pokazano na rycinie 2. Wartość działającej siły rejestrowana jest na osi rzędnych zaś przemieszczenie głowicy pomiarowej aparatury na osi odciętych. Najwyższy punkt wykresu (punkt A) odpowiada maksymalnej sile ($F_{\max}$), określonej najczęściej mianem wytrzymałości lub siły łamiącej. Siła ta oznacza obciążenie krytyczne pod wpływem, którego dochodzi do pęknięcia kości. Pole pod krzywą do punktu maksymalnej siły odpowiada energii sprężystej zaabsorbowanej przez kość zanim doszło do jej złamania, czyli tak zwanej energii złamania. Na podstawie zgromadzonych danych można ponadto obliczyć sztywność kości, moduł sprężystości oraz naprężenie w punkcie maksymalnego obciążenia [Einhorn, 1988; Martin, 1990; Ferretii i wsp., 1992].



Ryc. 2. Zależność odkształcenia trzonu kości udowej od obciążenia [Kaneps i wsp., 1997].

Metody strukturalne służą do oceny morfologii i struktury beleczek kostnych kości gąbczastej i zbitej. Do najczęściej stosowanych należy klasyczne preparaty histologiczne oceniane w mikroskopie świetlnym, a także takie techniki jak mikroskopia polaryzacyjna i skaningowa, absorpcyjna spektroskopia atomowa oraz rentgenowska analiza dyfrakcyjna [Pawlikowski i Niedźwiedzki, 2002].

Do ogólnej oceny struktury tkanki, wykorzystuje się powszechnie stosowane barwienie hemato-ksyliną i eozyną (H+E). W przypadku gdy metoda ta nie daje dobrych rezultatów, stosuje się technikę Schmorla [Zawistowski, 1986]. W celu uwidocznienia położenia lub ilościowego oznaczenia różnych związków chemicznych stosuje się także odpowiednie reakcje chemiczne. Aby oznaczyć enzymy komórkowe używa się reakcji zależnych od danego enzymu. Dla uwidocznienia kwasów nukleinowych DNA i RNA wykorzystuje się odpowiednio reakcje Feulgena i reakcje Bracheta. Stosując dyfuzję barwników słabo lub nierozpuszczalnych w wodzie, takich jak czerń sudanowa lub Sudan IV, wykrywa się tłuszcze. Do oceny macierzy zewnątrzkomórkowej stosuje się barwienie metodą p.a.S (ang. *Periodic acid Schiff*) oraz p.a.S z błękitem alcjanu – wykrywające glikozaminoglikany; natomiast trójbabarwienie według Massona lub barwienie Azan do oceny rozmieszczenia włókien kolagenowych [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982; Ostrowski, 1995].

Obok metod barwnych równie popularne wydają się być metody wykrywające sole wapnia. Do najczęściej wykonywanych metod histochemicznych oceniających wysycenie tkanki solami wapnia, należą mikrospopielanie oraz reakcje barwne [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982].

Mikrospopielanie jest metodą umożliwiającą wgląd w rozmieszczenie składników mineralnych w komórkach i tkankach. Podczas mikrospopielania, w poddanej działaniu wysokiej temperatury tkance, wytrącają się w tlenki wapnia. Po przeprowadzeniu reakcji Polikarda z kwasem siarkowym lub kwasem octowym, kryształy siarczanu bądź octanu wapnia wykrywane są pod mikroskopem [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982].

Spośród metod barwnych należy wymienić tworzenia barwnych lak wapniowych, a także reakcje podstawiania i chelatowania. W warunkach laboratoryjnych najczęściej stosuje się metody antrachinowe, zwłaszcza barwienie szybką czerwinią oleistą, purpuryną oraz zaadaptowaną do badań makroskopowych alizaryną. Pozostałe tj. metoda Cretina z kwasem galliko-metalddehydowym, Roehla z hemateiną oraz z ftalocyjanianem miedzi nie są obecnie stosowane, ze względu na małą swoistość i niską czułość [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982; Zawistowski, 1986].

W badaniach doświadczalnych do oceny morfologii i mineralizacji szkieletu, obok metody pojedyn-czego barwienia alizaryną, służy metoda alcjanowo-alizarynowa. Metoda ta pozwala ocenić zarówno tkankę kostną, barwiącą się na czerwono, jak również wybarwione na niebiesko błękitem alcjanu struktury chrzęstne. Wybarwienie poszczególnych struktur zależy od wielu czynników zewnętrznych m.in. czasu barwienia, czystość użytych odczynników i nasłonecznienia [WHO, 1967, 2001; Chrystian, 2001; Burdan i wsp., 2005]. Simpson i wsp. [2005] opisali ilościową analizę mineralizacji struktur kostnych w oparciu o preparaty acjanowo-alizarynowe. Autorzy zaproponowali porównanie długości pierwotnego jądra kostnienia i długości całej kości.

Reakcje podstawiania polegają na zastąpieniu jonu wapnia kationem metalu ciężkiego. W kolejnym etapie wykrywa się podstawiony metal. Do najczęściej stosowanych metod należy barwienie von Kossa z azotanem srebra oraz reakcja McGee-Russela z siarczanem miedzi i dwutiooksyamidem [Zawistowski, 1986].

Obecnie najrzadziej wykorzystuje się reakcje chelatowania, pomimo iż wykazują dużą swoistość i czułość. Do metod tych należą techniki barwne z mureksidem, kalkonem, kalceiną i morinem [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982].

Kończąc przegląd metod mikroskopowych należy również wspomnieć o technikach ultracytochemicznych, mających za zadanie uwidocznieniu na elektronogramach obecności wapnia w organellach komórkowych. Stosując reakcje podstawiania, takie jak Tandlera w modyfikacji Diculescu i Papescu z octanem ołowiu (jon wapniowy podstawiany jest ołowiem, silnie pochłaniającym elektrony) lub reakcję Yardoma i Chandlera z piroantymonianem potasu i osmem, sporządza się elektronogramy struktur o dużej gęstości elektronowej [Krygier-Stojałowska i Godlewski, 1982].

Metody immunohistochemiczne oparte są na reakcjach barwnych kompleksów antygen-przeciwciało. Przykładem takich technik jest wykrywanie immunoekspresji katepsyny K, cyklooksygenazy 1 i 2, osteo-pontyny oraz kolagenu II [Burdan, 2005]. Zwiększoną ekspresję katepsyny K obserwuje się w początko-wym etapie kostnienia, natomiast osteopontyny w końcowym. Białka te są niezbędne w procesie mineralizacji, pozwalają na jego ocenę w najwcześniejszych stadiach, gdy nie dochodzi jeszcze do mineralizacji macierzy zewnątrz-komórkowej [Burdan, 2005].

Podsumowanie

Tkanka kostna jest kształtowana przez całe życie osobnicze. Dzięki sprzężeniu dwóch przeciw-stawnych procesów: resorpcji i tworzenia, dochodzi do usuwania starej i powstawania w jej miejsce nowej kości. W ten sposób odbywa się wymiana tkanki kostnej, a jej funkcja utrzymywana jest na właściwym poziomie. Siła i wytrzymałość kości zależą od jej gęstości (BMD), którą współtworzą: predyspozycja genetyczna, aktywność fizyczna, stan hormonalny organizmu (dojrzewanie płciowe, hormonalna terapia zastępcza), odżywianie, dostępność składników mineralnych w diecie oraz narażenie na czynniki szkodliwe (tytoń, alkohol, doustna antykoncepcja hormonalna). Tym samym, oczywisty jest fakt, że zarówno w okresie prenatalnym, dzieciństwa i dojrzewania konieczne jest zapewnienie jak najlepszych warunków dla odpowiedniego rozwoju tkanki kostnej. Mając na uwadze ogromną wiedzę z dziedziny osteologii nie jesteśmy w stanie w pełni zabezpieczyć się przed różnorodnymi patologiami ze strony układu kostnego. Sygnalizując wszelkie niepokojące objawy lekarz klinicysta może zaproponować ogromny wachlarz diagnostyczny swoim pacjentom. Im wcześniej rozwiane będą obawy, tym lepsze jest rokowanie dla chorego. Wykluczenie chorób nowotworowych lub wczesne ich wykrycie poprawia przeżywalność w społeczeństwie [Pallua, Suscheck 2010].

Literatura

1. Bauer D.C. (1997). *Broadband ultrasound attenuation predicts fractures strongly and independently of densitometry in older women. A prospective study. Study osteoporotic fractures research group.* Arch Intern Med 157, str. 629.
2. Burdan F. (2005). *Development and congenial malformations of the skeleton.* Pol Merkur Lekarski 19, str. 94 – 97.
3. Burdan F., Różyło-Kalinowska I., Różyło K.T., Chahoud I. (2002). *A new rapid radiological procedure for routine teratological use in bone ossification assessment: a supplement for staining methods.* Teratology 66, str. 315 – 325.
4. Burdan F., Szumiło J., Dudka J., Klepacz R., Błaszczak M., Solecki M., Korobowicz A., Chłás A., Klepacki J., Palczak M., Zuchnik-Wrona A., Hadała-Kiś A., Urbanowicz Z., Wojtowicz Z. (2005). *Morphological studies in modern teratological investigations.* Folia Morphol (Warsz) 64, str. 1 – 8.
5. Cameron J.R., Sorenson J. (1963). *Measurement of bone mineral in vivo: an improved method.* Science 11, 142, str. 230 – 232.
6. Cann C.E. (1988). *Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review.* Radiology 166, str. 509 – 522.
7. Christian M.S. (2001). *Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology.* W: Hayes A.W. (Red): Principles and method of toxicology. Wyd. 4. Taylor and Francis. Philadelphia str. 1301 – 1381.
8. Coleman R.E. (2004). *Biophosphonates: clinical experience.* Oncologist. 9, 4, str. 14-27
9. Czerwiński E. (2004). *Zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej,* In: Szmidt J, Gruca Z, Krawczyk M et al., editors. Kraków: Medycyna Praktyczna. Str. 77-82
10. Czerwiński E., Osieleniec J., Badurski J et al. (2008). *Współczesna diagnostyka osteoporozy.* Family Medicine & Primary Care. Str. 821-829
11. Daniel B., Pruszyński B. *Anatomia radiologiczna: RTG, TK, USG, SC.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
12. Debrunner H.U., Hepp W.R. (2008). *Diagnostyka w ortopedii.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
13. Einhorn T.A. (1988). *Biomechanical properties of bone.* Triangle 27, str. 27 – 36.
14. Ferretti J.L., Vazquez S.O., Delgado C.J., Capozza R., Cointry G. (1992). *Biphasic dose – response curves of cortisol effects on rat diaphyseal bone biomechanics.* Calcif Tissue Int 50, str. 49 – 54.
15. Fogelman I., Blake G.M. (2000). *Different approaches to bone densitometry.* J Nuclear Med 41, str. 2015 – 2025.
16. Gadian D. (1995). *NMR and its applications to living systems.* Oxford Science Publications, Oxford.
17. Gonet B. (1997). *Obrazowanie magnetyczno – rezonansowe. Zasady fizyczne i możliwości diagnostyczne.* PWN, Warszawa.
18. Gordon C.M., Bachrach L.K., Carpenter T.O. i wsp. (2008). *Dual Energy X-ray Absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: The 2007 ISCD Pediatric Official Positions.* Journal of Clinical Densitometry. 11, str. 43-58.
19. Herd R.J.M. (1992). *Measurements of broad band ultrasonic attenuation in the calcaneus in premenopausal and postmenopausal women.* Osteoporos Int 2, str. 247 – 254.
20. Higgins C.B., Auffermann W. (1994). *Endocrine imaging textbook and atlas.* Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
21. Jakubowski W. (1989). *Diagnostyka ultradźwiękowa.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
22. Jorgensen J.T., Andersen P.B., Rosholm A., Bjarnason N.H. (2000). *Digital X – ray radiogrammetry: a new appendicular bone densitometric method with high precision.* Clin Physiol 20, str. 330 – 335.
23. Kaneps A.J., Stover S.M., Lane N.E. (1997). *Changes in canine cortisol and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise.* Bone 21, 5, str. 419 – 423.
24. Kremer H., Dobryński W. (1996). *Diagnostyka ultrasonograficzna.* Urban & Partner. Wrocław.
25. Krestel E. (1990). *Imaging systems for medical diagnostics.* Siemens Aktiengesellschaft, Berlin.
26. Królicki L. (1996). *Medycyna nuklearna.* Fundacja im. Ludwika Rydygiera, Warszawa.
27. Krygier-Stojałowska A., Godlewski H., (1982). *Topochemiczne metody badań komórek i tkanek.* PWN. Warszawa.
28. Kusz D. (2009). *Kompendium ortopedii.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
29. Lane N.E. (2006). *Epidemiology, etiology and diagnosis of osteoporosis.* Am J Obstet Gynecol 194, str. 3 – 11.
30. Leszczyński S. (1984). *Radiologia. Tom I.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
31. Marchiori D.M. (1999). *Radiologia kliniczna.* Wyd. Czelej, Lublin.

32. Martin R.B. (1990). *Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats*. J Biomech 23, str. 1021 – 1029.
33. McLean J.D. (1999). *Specjalistyczne metody obrazowania*. W: Marchiori D.M. (Red): Radiologia kliniczna. Czelej, Lublin.
34. McLean J.D., Nelson G.D.A. (1982). *High – resolution n – beam lattice images of hydroxyapatite*. Micron 13, str. 409 – 413.
35. Mirvis S.E., Shanmuganathan K., Miller L.A., Sliker C.W. *Emergency radiology*. Elsevier Health Sciences
36. Olchowik G., Tomaszewska M., Tomaszewski M., Chadaj-Polberg E., Siek E. (2007). *Czynniki ryzyka i diagnostyka osteoporozy*. Problemy Osób Niepełnosprawnych. Biała Podlaska str. 151 – 154.
37. Ostrowski J. (1995). *Histologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
38. Pallua N., Suscheck C.V. (2010). *Tissue engineering: from lab to clinic*. Springer
39. Palmer P.E.S. (1997). *Diagnostyka ultrasonograficzna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
40. Pawlikowski M., Niedźwiedzki T. (2002). *Mineralogia kości*. Polska Akademia Nauk Oddział w Krakowie, Kraków.
41. Pruszyński B. (2001). *Radiologia – diagnostyka obrazowa: RTG, TK, USG, MR i radioizotopy*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
42. Rea J.A., Steiger P., Blake G.M., Potts E., Smith I.G., Fogelman I. (1998). *Morphometric X – ray absorptiometry: reference data for vertebral dimensions*. J Bone Miner Res 13, str. 464 – 474.
43. Różyło T.K., Różyło-Kalinowska I. (1999). *The evaluation of root canal width by means of digital radiography*. Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med] 54, str. 369 – 371.
44. Różyło-Kalinowska I., Michalska A., Burdan F. (2003). *Optimisation of analysis of skeletal ossification of laboratory animals by means of digital radiography software options*. Ann Univ. Mariae.Curie Skłodowska [Med] 58, str. 95 – 100.
45. Rummeny E., Reimer P., Heindel W. (2010). *Obrazowanie ciała metodą rezonansu magnetycznego*. Medipage
46. Simkin A., Robin G. (1973). *The mechanical testing of bone in bending*. J Biomech 6, str. 31 – 39.
47. Simpson M.E., Duggal S., Keiver K. (2005). *Prenatal ethanol exposure has differential effects on fetal growth and skeletal ossification*. Bone 36, str. 521 – 532.
48. Tothill P., Hannan W.J. (2002). *Bone mineral and soft tissue measurements by dual – energy X – ray absorptionmetry during growth*. Bone 31, str. 429 – 496.
49. Wahnar H. (1987). *Technical aspects and clinical interpretation of bone mineral measurements*. Public Health Report Supplement. Sept – Oct 27 – 30.
50. Webb W.R., Brant W.E., Major N.M.. (2007). *Tomografia komputerowa- zastosowanie kliniczne*. Elsevier Urban & Partner. Wrocław
51. WHO (1967). World Health Organization. Principles of the testing of drugs for teratogenicity. World Health Organization Technical Report. Series No 364. Geneva.
52. WHO (2001). World Health Organization. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. Environ Health Criteria 225, 1 – 185.
53. Zawistowski S. (1986). *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.

BONE AND DIAGNOSTIC POSSIBILITIES

Human and Health No. 1 (V), p. 85-91

Tomaszewski Marek^{1,2}, Tomaszewska Monika³, Olchowik Grażyna^{2,4}

¹Department of Human Anatomy Medical University of Lublin

²Pope John Paul II State School of Higher Education in Biała Podlaska

³Department of Radiology Medical University of Lublin

⁴Department of Biophysics Medical University of Lublin

Summary: A huge progress made in the modern world reveals itself more and better methods of research in medical science. They allow more effective diagnosis and treatment of many diseases. Diagnostic tools to evaluate bone also are changing for the better. The following article provides an overview of diagnostic possibilities that can be taken into account to evaluate the bone tissue.

Keywords: bone tissue, digital radiography, computed tomography, quantitative ultrasound, densitometry methods, immunohistochemical methods.

Introduction

The enormous progress made in the modern world reveals itself more and better methods of research in medical science. They allow more effective diagnosis and treatment of many diseases. Diagnostic tools to evaluate bone also are changing for the better. Currently, more and more information comes to us about the processes taking place within the bone in health and disease. Mineralization of this tissue disorders seen in both children and adults may be attributed to the pathology of the bone (primary mineralization disorder), or a complication of other diseases or therapy (secondary mineralization disorder). Accelerated destruction of bone tissue is accompanied by inflammatory diseases, autoimmune diseases, cancer and many other pathologies. Regardless of the etiologic agent of clinically important events are bone: pathologic fracture of vertebrae or other bones, spinal cord compression, hypercalcemia, or need for surgery or radiotherapy because of clinical changes in bone [Coleman, 2004; Czerwinski, 2004].

Bone tissue is differentiated tissue, characterized by high strength and high metabolic activity. With this feature serves as protection for internal organs. Additionally, a "scaffold" for the body and the reservoir of minerals such as calcium (99% of this element in the body is deposited in bone tissue) or phosphates. In normal conditions it undergoes constant remodeling, which involves both osteoblasts (participation in the processes of recovery) and osteoclasts (involved in the processes of destruction and removal). The activity of both types of cells is close to equilibrium, so that reconstruction of bone is symmetrical and aligned [Czerwinski, 2008; Pallu and Suscheck, 2010].

Diagnostic methods

Diagnostic radiology examination is the primary diagnostic method in the evaluation of bone tissue. The basis for the analysis of conventional X-rays are taken in two perpendicular planes. In this method uses X-ray absorption phenomenon, which depends on bone density and degree of saturation of calcium salts. This relationship allows for the assessment of physical density and bone mineral [Tothil and Hannan, 2002]. The classic radiographic images allow you to specify the geometry of the bone, cortical thickness, marrow cavities and structural changes and periosteal reactions [Marchiori, 1999]. Although the classic study is burdened with some uncertainty - for three-dimensional structure of the body, is presented on two-dimensional surface of photographic film - it still remains the basic diagnostic method. It is not possible to determine the exact structure of the tissue due to the overlap of images, all layers of the body. Photo made in the thoracic and lumbar spine can diagnose only advanced changes such as reducing the amount of osteoporotic vertebral bodies, loss of trabecular

bone horizontally with dominance of vertical trabeculae and cortical thinning. It should be noted, however, that a noticeable decrease is visible only after 30-50% loss of bone mass [Pruszyński, 2001; Mirvis et al, 2009].

Evaluation of morphology of calcified elements, and quantitative analysis of the mineralization of the skeleton can also be done using digital radiography [Burdan et al, 2002; Różyło-Gray et al, 2003]. This method combines elements of classical radiology record in the form of a bitmap image on your hard drive [Jorgensen et al, 2000]. For the assessment of fetal rat bone mineralization, the most convenient structure of the lumbar vertebrae are - because of easy availability and lack of projection images at no other skeletal parts. After the exposure of biological material for X-ray plate Densitometric (previously located under the bone) is placed in the scanner, which is part of its computer. In the first stage of measurement plotted line connecting the outer edges of symmetric points of ossification of vertebral arches. Then the estimated maximum, minimum and average optical density (counted on the basis of pixel values), along the lines previously plotted. In addition, creating a histogram showing the density distribution in the area. The advantage of digital radiography is a quick and easy measurements and a relatively low cost of [Różyło and Różyło-Gray, 1999].

More accurate diagnostic method than conventional radiographs is computed tomography. From a physical point of view, the image is a mapping tomograph distribution of X-ray attenuation coefficients in examine layer of the body. CT-SCAN allows you to explain the problems associated with active and passive organ motion. Allows the assessment of changes in confined areas such as the spine, sternum, or Turkish saddle [Leszczyński, 1984; Krestel, 1990, Webb et al 2007].

With computed tomography in the quantitative options - QCT (called Quantitative CT), it is possible to assess the essence compact and spongy bone (especially the spine), as well as its actual density expressed in g/cm^3 [Lane, 2006; Olchowik et al, 2007]. Computed tomography allows the evaluation of individual trabecular bone morphology. This is made possible through the use of cameras with high and ultra-high resolution of the order of 100-200 microns and 60-100 microns in micro-CT studies. With a resolution of 10 microns or even 1 micron, determined the ultrastructure of bone in vitro and in vivo technique called X-ray tomographic microscopy [Genant et al, 1999; Genant and Jiang, 2006]. Computed tomography allows three-dimensional analysis (also in options QTC). These types of reconstructed images, in clinical practice, is used to evaluate complex fractures, acetabular fractures or spine [McLean and Nelson, 1982; McLean, 1999].

It is noteworthy that in all radiological studies always patient is exposed to ionizing radiation. Method for the precise structures of tissues and organs in which there is no ionizing agent is a magnetic resonance imaging (MRI). Although not fully understood are the long-term effects of high magnetic field induction on living organisms [Pruszyński, 2001; Rummeny, 2010].

MRI is usually used in the diagnosis of diseases of the nervous system and musculo-skeletal disorders. The basis of MRI, CT is the phenomenon of nuclear magnetic resonance discovered in the years 1944-1946 by Bloch and Purucela. The MRI tomography uses a constant magnetic field with induction 0.5 - 2.5 Tesla and the electromagnetic spectrum. In assessing the role of bone tissue magnetic resonance imaging is limited to control bone marrow, detection of inflammatory and necrotic foci, occult fractures, and neoplastic changes [Gadian, 1995; Gonet, 1997].

Like computed tomography, also in the technique of magnetic resonance imaging, magnetic resonance microscopy was introduced (μMR , called Magnetic Resonance Microscopy), allowing it to stretch histomorphometric analysis of bone. Using this method we can specify the quantitative content of different elements in the bone.

Another method is quantitative ultrasound (QUS) uses the phenomenon of scattering and absorption of ultrasonic waves passing through the bone. Clinically, a typical point of measurement is the calcaneus. Due to the ease of access to equipment and lack of exposure to X-rays, this method is very popular. The measurement principle is based on the linear dependence of ultrasonic wave attenuation with increasing frequency. The greater the reduction in trabecular bone, the slope of measurement becomes smaller. Moreover, in the latest cameras is measured ultrasonic wave velocity, whose value depends on the architecture and bone density [Jakubowski, 1989; Kremer and Dobryński, 1996; Palmer, 1997]. Measurements of ultrasonic wave velocity and attenuation provide information concerning not only bone mass but also its elasticity, microarchitecture, which enables estimation of fracture risk [Herd, 1992; Bauer, 1997; Olchowik et al, 2007].

Picture of tissues and organs can be obtained by using radioactive isotopes. The study used scintigraphy tissue affinity selective radiopharmaceuticals [Higgins and Auffermann, 1994; Królicki, 1996]. Bone imaging is performed using metylenodifosfonianu technetium ($^{99\text{m}}\text{Tc-MDP}$), a radiolabeled substance technetium $^{99\text{m}}$. Increased uptake of the radiopharmaceutical is observed, among others in tumors, inflammatory conditions [Daniel and Prószyński, 2005].

The assessment of bone strength may be based on measurements of bone mineral density. Bone mineral density determined by methods densytometrycznymi [Pawlikowski and Niedźwiedzki, 2002]. Among the

methods for the quantitative determination of minerals lists the absorption of photons by a single beam of energy (SPA, called Single Photon Absorpcjometry) and two different energies (DPA, called Dual Photon Absorpcjometry), as well as the absorption of X-ray beam of one energy (SXA, called Single X-ray Absorptiometry) and two different energies (DXA, called dual X-ray Absorptiometry) [Debrunner and Hepp, 2008; Kush, 2009].

SPA developed by Cameron and Sorenson in 1963, is the determination of the coefficient of weakening of the monoenergetic beam of gamma rays emitted by iodine-121 (I^{121}), after passing through the test bone [Cameron and Sorenson, 1963]. Read value of the coefficient of weakening is done with sodium iodine scintillation counter. The existing difference in photon absorption between bone and soft structures allows the calculation of bone mass in the test structure. However, to obtain an accurate measurement, the thickness of the soft tissues should be the same as the study of bones. Therefore, in the clinical setting, the study narrows down to the calcaneus and peripheral parts of the bones of the forearm. The results are expressed as a pointer or indicator of fracture mineralization of the substance expressed in grams per cm^3 bone [Wahner, 1987].

DPA is the simultaneous measurement of the extinction coefficient in soft tissue and bone. The source of radiation is a radioisotope Gadolinium 153, which emits radiation at two different spectrums. This gives the opportunity to correct an error resulting from the overlapping factors weaken the soft parts and bones. This method allows an accurate assessment of those places where the bone is surrounded by plenty of soft tissues such as the spine or femoral neck. The results obtained show the density (BMD, Bone Mineral Density in English), expressed in g/cm^2 , or specify the contents of bone in the bone test cm^3 [Cann, 1988].

SXA is a method involving the absorption of X-ray beam of one energy. However, it was supplanted by a newer, widely used method for DXA already. Currently, measurement of BMD using DXA is considered to be „gold standard” for diagnosis of osteoporosis [Fogelman and Blake, 2000; Gordon et al, 2008].

DXA measurement principle is based on the use of X-ray beam with an energy of 90 keV. A special filter placed between the lamp and the patient makes separation of the radiation beam into two spectra with effective energies of 45 and 75 keV. Registration is weakening coefficients by two detectors: one for high-energy beam, one for low beam energy. This allows the differentiation of surrounding structures soft tissue and bone. An important advantage of this type of research is to perform measurements at any skeletal site, a short acquisition time, increase accuracy, repeatability and reducing the radiation dose (90% less radiation than the classic chest radiograph) [Olchowik et al, 2007]. Moreover, this test is painless, lasts from a few to several minutes and requires no preparation on the part of the test. The disadvantage of this method is two-dimensional three-dimensional skeletal structures reflected, as well as different attenuation coefficient for fat and poor in fat tissue.

Morphometric absorptiometry (called Morphometric X-ray Absorptiometry, MXA) is a variation of DXA. Allows for the simultaneous differentiation of bone density from the surrounding soft tissue morphology and evaluation of the test structure. A limitation, however, is low resolution [Rea et al, 1998].

From experimental studies deserve special attention biomechanical techniques, evaluating bone strength. The most common test is called „three-point strength attempt” [Simkin and Robin, 1973]. In this study, the bone supported on both ends and loaded at the center of deflection is then broken (Fig. 1).

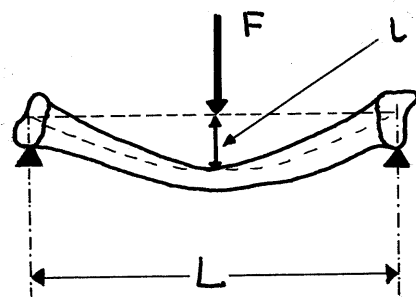


Fig. 1. Study design strength in three-point attempt [Simkin and Robin, 1973].

Biomechanics of the material define the two basic parameters - the internal stress and deformation that arise under the influence of external forces applied to the solid. A typical course of the force (F), the applied to the center of the shaft radius, depending on the movements of the head (l) is shown in Figure 2. The value of the force is recorded on the y-axis measuring head and the displacement of the apparatus along the abscissa. The highest point of the chart (point A) corresponds to the maximum force (F_{max}), often referred to as breaking strength or force. This force is the critical load under the influence, which comes to bone fractures. Area under the curve to the point of maximum force corresponds to the elastic energy absorbed by the bone before the

fracture occurred -called fracture energy. Based on the collected data can also calculate the stiffness of bone, modulus and strain at the point of maximum load [Einhorn, 1988; Martin, 1990; Ferretii et al, 1992].

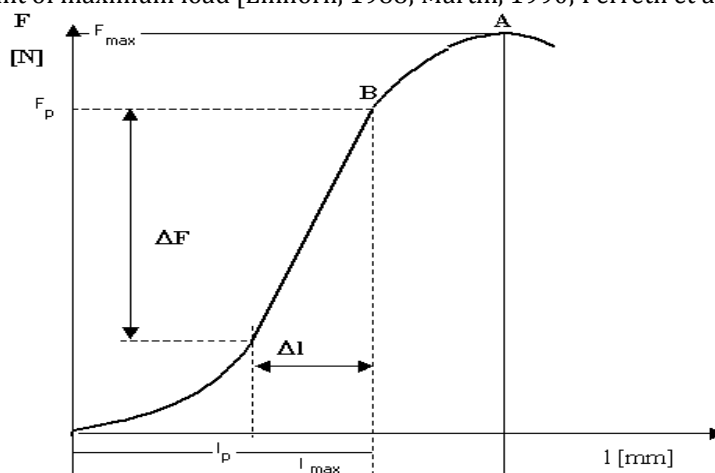


Fig. 2. Strain dependence of the femoral shaft load [Kaneps et al, 1997].

Structured methods are used to evaluate the morphology and structure of trabecular bone and compact. The most commonly used classical histological preparations should be evaluated in light microscopy, as well as techniques such as microscopy and scanning polarization, atomic absorption spectroscopy and X-ray diffraction study [Pawlikowski and Niedźwiedzki, 2002].

For an overall assessment of tissue structure, is used commonly used staining with hematoxylin and eosin (H & E). If this method does not give good results, is used the technique of Schmorla [Zawistowski, 1986]. In order to visualize the location and quantification of various chemical compounds used as the corresponding chemical reactions. To determine the cellular enzymes are used depending on the reaction of the enzyme. To visualize the nucleic acids DNA and RNA are used respectively Feulgen reactions and reactions Brachet. Using dye diffusion poorly or insoluble in water, such as Sudan black or Sudan IV fat is detected. To assess the extracellular matrix staining method used PAS (Periodic Acid Schiff) and a strip of blue alcjan - detecting glycosaminoglycans, while trichromatic staining according to Masson and Azan staining to evaluate the distribution of collagen fibers [Krygier-Stojałowska and Godlewski, 1982; Ostrowski, 1995].

In addition to the methods of color also seem to be popular methods for detection of calcium salts. The most commonly performed histochemical methods for assessing tissue saturation of calcium salts, are the colored reactions and microincineration [Krygier-Stojałowska and Godlewski, 1982].

Microincineration is a method that allows an insight into the distribution of minerals in the cells and tissues. During microincineration in high temperature treated tissue, precipitated in oxides of calcium. After the Policard's reaction with sulfuric acid or acetic acid, crystals of calcium sulphate or acetate are detected under a microscope [Krygier-Stojałowska and Godlewski, 1982].

Among the colorful methods we have creating colorful replace calcium lake, and the reactions of substitution and chelation. In the laboratory, the most commonly used method antrachin particularly fast red staining of the oily, purpuryną and adapted to the study of macroscopic alizarin. The other method such as acid Cretin-metaldehydowym galliko, Roehl of ftalocyjanianem hemateiną and copper are not currently used, due to the low specificity and low sensitivity [Krygier-Stojałowska and Godlewski, 1982; Zawistowski, 1986].

In experimental studies to evaluate the morphology and mineralization of the skeleton, in addition to a single method of alizarin staining, serves alcjanowo-alizarin method. This method allows us to evaluate both bone tissue, staining is red, and blue stained blue alcjan structure of cartilage. Staining of individual structures depends on many external factors such as dyeing time, the purity of the reagents used, and sunshine [WHO, 1967, 2001, Christian, 2001; Burdan et al, 2005]. Simpson et al [2005] described quanti-tative analysis of mineralization of bone structures based on alcjan-alizarin preparations. The authors proposed a comparison of the original kernel length and length of the ossification of bone.

Substitution reactions involve the replacement of calcium ions of heavy metal cation. In the next stage of the substituted metal is detected. The most commonly used methods of von Kossa staining to be of silver nitrate and McGee-Russell reaction with copper sulphate and twotiooksyamid [Zawistowski, 1986].

Currently, most rarely used in chelation reactions, although show high specificity and sensitivity. These methods include techniques of color mureksid, kalkon, Calcein and Morin [Krygier-Stojałowska and Godlewski, 1982].

Concluding review of the microscopic method should also mention ultracytochemicznych techniques, designed to raise the electrogram the presence of calcium in cellular organelles. Using the substitution reactions, such as the modification Diculescu Tandler and Papescu with lead acetate (calcium ion is substituted for lead, strongly absorbing electrons) or a reaction Yardoma and Chandler with potassium and osm's piroantymonian, prepared elektronogram structures with high electron density [Krygier-Stożalska and Godlewski, 1982].

Immunohistochemical methods are based on color reactions of antigen-antibody complexes. Examples of such techniques is the detection of cathepsin K immunoekspressji, cyclooxygenase 1 and 2, osteoponthyn and collagen II [Burdan, 2005]. Increased expression of cathepsin K is observed in the initial stage of ossification, while osteoponthyn- in the final. These proteins are essential in the process of mineralization, resulted in an assessment in the earliest stages, when there is not yet mineralized extracellular matrix [Burdan, 2005].

Conclusions

Bone tissue is formed lifelong interindividual. By coupling the two opposing processes: resorption and formation, it comes to removing the old and the formation of new bone in its place. In this way, is the exchange of bone tissue, and its function is maintained at an appropriate level. The strength and bone strength depends on its density (BMD), which make up: genetic predisposition, physical activity, the body's hormonal status (puberty, hormone replacement therapy), nutrition, availability of minerals in the diet and exposure to harmful factors (tobacco, alcohol, oral hormonal contraception). Thus, it is clear that both in the prenatal period, childhood and adolescence is necessary to ensure the best possible conditions for the adequate development of bone tissue. Given the wealth of knowledge in the field of osteology, we can not fully protect against the various pathologies of the skeletal system. Indicate any alarming symptoms clinician can offer a huge range of diagnosis to their patients. The sooner you will be allayed fears, the better the prognosis for the patient. Exclusion of cancer or early detection improves their survival in society [Pallu and Suscheck, 2010].

References:

1. Bauer D.C. (1997). *Broadband ultrasound attenuation predicts fractures strongly and independently of densitometry in older women. A prospective study. Study osteoporotic fractures research group.* Arch Intern Med 157, str. 629.
2. Burdan F. (2005). *Development and congenial malformations of the skeleton.* Pol Merkur Lekarski 19, str. 94 – 97.
3. Burdan F., Różyło-Kalinowska I., Różyło K.T., Chahoud I. (2002). *A new rapid radiological procedure for routine teratological use in bone ossification assessment: a supplement for staining methods.* Teratology 66, str. 315 – 325.
4. Burdan F., Szumiło J., Dudka J., Klepacz R., Błaszczak M., Solecki M., Korobowicz A., Chłás A., Klepacki J., Palczak M., Zuchnik-Wrona A., Hadała-Kiś A., Urbanowicz Z., Wojtowicz Z. (2005). *Morphological studies in modern teratological investigations.* Folia Morphol (Warsz) 64, str. 1 – 8.
5. Cameron J.R., Sorenson J. (1963). *Measurement of bone mineral in vivo: an improved method.* Science 11, 142, str. 230 – 232.
6. Cann C.E. (1988). *Quantitative CT for determination of bone mineral density: a review.* Radiology 166, str. 509 – 522.
7. Christian M.S. (2001). *Test methods for assessing female reproductive and developmental toxicology.* W: Hayes A.W. (Red): Principles and method of toxicology. Wyd. 4. Taylor and Francis. Philadelphia str. 1301 – 1381.
8. Coleman R.E. (2004). *Biophosphonates: clinical experience.* Oncologist. 9, 4, str. 14-27
9. Czerwiński E. (2004). *Zaburzenia metabolizmu tkanki kostnej,* In: Szmidt J, Gruca Z, Krawczyk M et al., editors. Kraków: Medycyna Praktyczna. Str. 77-82
10. Czerwiński E., Osieleniec J., Badurski J et al. (2008). *Współczesna diagnostyka osteoporozy.* Family Medicine & Primary Care. Str. 821-829
11. Daniel B., Pruszyński B. *Anatomia radiologiczna: RTG, TK, USG, SC.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
12. Debrunner H.U., Hepp W.R. (2008). *Diagnostyka w ortopedii.* Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
13. Einhorn T.A. (1988). *Biomechanical properties of bone.* Triangle 27, str. 27 – 36.

14. Ferretti J.L., Vazquez S.O., Delgado C.J., Capozza R., Cointry G. (1992). *Biphasic dose – response curves of cortisol effects on rat diaphyseal bone biomechanics*. Calcif Tissue Int 50, str. 49 – 54.
15. Fogelman I., Blake G.M. (2000). *Different approaches to bone densitometry*. J Nuclear Med 41, str. 2015 – 2025.
16. Gadian D. (1995). *NMR and its applications to living systems*. Oxford Science Publications, Oxford.
17. Gonet B. (1997). *Obrazowanie magnetyczno – rezonansowe. Zasady fizyczne i możliwości diagnostyczne*. PWN, Warszawa.
18. Gordon C.M., Bachrach L.K., Carpenter T.O. i wsp. (2008). *Dual Energy X-ray Absorptiometry interpretation and reporting in children and adolescents: The 2007 ISCD Pediatric Official Positions*. Journal of Clinical Densitometry. 11, str. 43-58.
19. Herd R.J.M. (1992). *Measurements of broad band ultrasonic attenuation in the calcaneus in premenopausal and postmenopausal women*. Osteoporos Int 2, str. 247 – 254.
20. Higgins C.B., Auffermann W. (1994). *Endocrine imaging textbook and atlas*. Georg Thieme Verlag, Stuttgart.
21. Jakubowski W. (1989). *Diagnostyka ultradźwiękowa*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
22. Jorgensen J.T., Andersen P.B., Rosholm A., Bjamason N.H. (2000). *Digital X – ray radiogrammetry: a new appendicular bone densitometric method with high precision*. Clin Physiol 20, str. 330 – 335.
23. Kaneps A.J., Stover S.M., Lane N.E. (1997). *Changes in canine cortisol and cancellous bone mechanical properties following immobilization and remobilization with exercise*. Bone 21, 5, str. 419 – 423.
24. Kremer H., Dobryński W. (1996). *Diagnostyka ultrasonograficzna*. Urban & Partner. Wrocław.
25. Krestel E. (1990). *Imaging systems for medical diagnostics*. Siemens Aktiengesellschaft, Berlin.
26. Królicki L. (1996). *Medycyna nuklearna*. Fundacja im. Ludwika Rydygiera, Warszawa.
27. Krygier-Stojałowska A., Godlewski H., (1982). *Topochemiczne metody badań komórek i tkanek*. PWN. Warszawa.
28. Kusz D. (2009). *Kompendium ortopedii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL. Warszawa
29. Lane N.E. (2006). *Epidemiology, etiology and diagnosis of osteoporosis*. Am J Obstet Gynecol 194, str. 3 – 11.
30. Leszczyński S. (1984). *Radiologia. Tom I*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
31. Marchiori D.M. (1999). *Radiologia kliniczna*. Wyd. Czelej, Lublin.
32. Martin R.B. (1990). *Effects of simulated weightlessness on bone properties in rats*. J Biomech 23, str. 1021 – 1029.
33. McLean J.D. (1999). *Specjalistyczne metody obrazowania*. W: Marchiori D.M. (Red): Radiologia kliniczna. Czelej, Lublin.
34. McLean J.D., Nelson G.D.A. (1982). *High – resolution n – beam lattice images of hydroxyapatite*. Micron 13, str. 409 – 413.
35. Mirvis S.E., Shanmuganathan K., Miller L.A., Sliker C.W. *Emergency radiology*. Elsevier Health Sciences
36. Olchowik G., Tomaszewska M., Tomaszewski M., Chadaj-Polberg E., Siek E. (2007). *Czynniki ryzyka i diagnostyka osteoporozy*. Problemy Osób Niepełnosprawnych. Biała Podlaska str. 151 – 154.
37. Ostrowski J. (1995). *Histologia*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
38. Pallua N., Suscheck C.V. (2010). *Tissue engineering: from lab to clinic*. Springer
39. Palmer P.E.S. (1997). *Diagnostyka ultrasonograficzna*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
40. Pawlikowski M., Niedźwiedzki T. (2002). *Mineralogia kości*. Polska Akademia Nauk Oddział w Krakowie, Kraków.
41. Pruszyński B. (2001). *Radiologia – diagnostyka obrazowa: RTG, TK, USG, MR i radioizotopy*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL, Warszawa.
42. Rea J.A., Steiger P., Blake G.M., Potts E., Smith I.G., Fogelman I. (1998). *Morphometric X – ray absorptiometry: reference data for vertebral dimensions*. J Bone Miner Res 13, str. 464 – 474.
43. Różyło T.K., Różyło-Kalinowska I. (1999). *The evaluation of root canal width by means of digital radiography*. Ann Univ Mariae Curie Skłodowska [Med] 54, str. 369 – 371.
44. Różyło-Kalinowska I., Michalska A., Burdan F. (2003). *Optimisation of analysis of skeletal ossification of laboratory animals by means of digital radiography software options*. Ann Univ. Mariae.Curie Skłodowska [Med] 58, str. 95 – 100.
45. Rummeny E., Reimer P., Heindel W. (2010). *Obrazowanie ciasta metodą rezonansu magnetycznego*. Medipage
46. Simkin A., Robin G. (1973). *The mechanical testing of bone in bending*. J Biomech 6, str. 31 – 39.
47. Simpson M.E., Duggal S., Keiver K. (2005). *Prenatal ethanol exposure has differential effects on fetal growth and skeletal ossification*. Bone 36, str. 521 – 532.
48. Tothill P., Hannan W.J. (2002). *Bone mineral and soft tissue measurements by dual – energy X – ray absorptiometry during growth*. Bone 31, str. 429 – 496.

49. Wahnar H. (1987). *Technical aspects and clinical interpretation of bone mineral measurements*. Public Health Report Supplement. Sept – Oct 27 – 30.
50. Webb W.R., Brant W.E., Major N.M.. (2007). *Tomografia komputerowa- zastosowanie kliniczne*. Elsevier Urban & Partner. Wrocław
51. WHO (1967). World Health Organization. Principles of the testing of drugs for teratogenicity. World Health Organization Technical Report. Series No 364. Geneva.
52. WHO (2001). World Health Organization. Principles for evaluating health risks to reproduction associated with exposure to chemicals. Environ Health Criteria 225, 1 – 185.
53. Zawistowski S. (1986). *Technika histologiczna, histologia oraz podstawy histopatologii*. Wydawnictwo Lekarskie PZWL Warszawa.