

**Wydział Lekarski I Uniwersytetu Medycznego
im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu**

Krzysztof Niciejewski

**Choroba zwyrodnieniowa stawów biodrowych w aspekcie
zmian rozkładu chemicznego oraz zmian konfiguracji
przestrzennej kolagenu badanej tkanki kostnej**

Rozprawa doktorska

wykonana
w Katedrze i Zakładzie Fizjologii

Promotor: dr hab. med. Hanna Krauss prof. nadzw. UM

Poznań 2011

Pani dr hab. med. Hannie Krauss
profesorowi Uniwersytetu Medycznego
im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu
za wsparcie i umożliwienie realizacji pracy
w Katedrze i Zakładzie Fizjologii UM,
cenne uwagi i sugestie w trakcie prowadzenia badań
i przygotowywania manuskryptu
oraz poświęcenie czasu i okazaną życzliwość
składam serdeczne podziękowania.

Praca ta mogła powstać dzięki owocnej współpracy z dr Mirosławem Szybowiczem i mgr Tomaszem Buchwaldem z Wydziału Fizyki Politechniki Poznańskiej oraz z prof. dr hab. Hanną Jackowiak z Zakładu Histologii i Embriologii Uniwersytetu Przyrodniczego w Poznaniu, a także z dr Marleną Ratajczak z Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu. Ponadto, w sposób szczególny dziękuję antropologowi dr Alicji Puch z Uniwersytetu Medycznego w Poznaniu, za cenne uwagi merytoryczne, a także dotyczące konstrukcji i ostatecznego kształtu edytorskiego pracy. Paniom i Panom składam raz jeszcze wyrazy wdzięczności

Kochanej Żonie i Rodzicom
za Waszą wyrozumiałość, cierpliwość
i okazywane wsparcie
z całego serca dziękuję

Pracę dedykuję, bezgranicznie kochanej Osobie,
mojemu Synowi Erykowi,
dla którego ciekawość odkrywania otaczającego świata
to największa pasja
i dzięki któremu my rodzice
staramy się własną ciekawość wciąż rozwijać.

I. Wstęp	8
1. Budowa stawu biodrowego	10
1.1 Budowa chemiczna i struktura tkanki kostnej	11
1.2 Biomechanika stawu biodrowego	13
2. Choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS) biodrowych	15
3. Klasyfikacje radiologiczne ChZS biodrowych	19
4. Badania spektroskopowe kości	20
II. Przegląd technik analitycznych	24
1. Spektroskopia Ramana	24
1.1 Podstawy teoretyczne	24
1.2 Parametry pasma spektralnego	26
1.3 Układ do badań ramanowskiego rozpraszania światła	27
1.4 Analiza widma Ramana	29
1.5 Komputerowe przetwarzanie danych	30
1.6 „Jakość kości” w ocenie spektroskopii Ramana	30
2. Mikroskopia elektronowa	32
2.1 Skaningowa mikroskopia elektronowa	32
2.2 Transmisyjna mikroskopia elektronowa	33
III. Założenia teoretyczne i cel pracy	34
IV. Materiał	36
V. Metody badań	40
1. Metoda klasyfikacji radiologicznej ChZS	41
2. Metody pobierania i przygotowania próbek do dalszych badań	44
3. Metody mikroskopowe	45
4. Metoda spektroskopii Ramana	46
5. Analizy statystyczne	48

VI. Wyniki	49
1. Zmiany chrzęstno-kostne w mikroskopii elektronowej	50
2. Wskaźnik mineralizacji tkanki kostnej	62
3. Wskaźnik budowy przestrzennej kolagenu	67
4. Wskaźnik hydroksyapatyt/węglanoapatytu	73
VII. Dyskusja	83
1. Nowa klasyfikacja radiologiczna ChZS biodrowych	83
2. Choroba zwyrodnieniowa stawów w mikroskopii elektronowej	86
3. Choroba zwyrodnieniowa stawów w badaniach ramanowskich	88
4. Spektroskopia Ramana, a klasyfikacja własna ChZS biodrowych	90
5. Perspektywy klinicznego wykorzystania pomiarów ramanowskich	91
VIII. Wnioski	94
IX. Streszczenie	95
X. Abstract	100
XI. Piśmiennictwo	104
Spis tabel	109
Spis rycin	110
Spis fotografii	112

I. WSTĘP

Postęp w diagnozowaniu i przewidywaniu progresji chorób zależy zarówno od lepszego zrozumienia istoty danej choroby jak i rozwoju metod diagnostycznych. W przypadku choroby zwyrodnieniowej stawów (ChZS) standardowymi metodami diagnostycznymi są różne metody obrazowania radiologicznego i biopsja tkanki kostnej. Inwazyjna metoda badania kości poprzez biopsję tkanki kostnej, pobieranej najczęściej z okolicy kolca biodrowego, jest dla pacjenta bolesnym zabiegiem, a jego wysokie koszty i stosunkowo długi czas oczekiwania na wynik, ze względu na konieczność dodatkowego utrwalania preparatu, prowokują do poszukiwania innych technik diagnostycznych.

Podobnie zaawansowane metody diagnostyki obrazowej – tomografia komputerowa, rezonans magnetyczny, czy mikroskopia elektronowa, to wprawdzie narzędzia diagnostyczne dostarczające wielu cennych informacji o badanym materiale biologicznym, jednak ze względu na wysokie koszty i w naszych warunkach znacznie ograniczony dostęp, nie są standardowo używane. Z kolei badanie zmian struktury chemicznej molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej nie jest rutynowo wykorzystywane w diagnozowaniu chorób kości i chrząstek stawowych. Jedną z takich nowych propozycji, mogących mieć zastosowanie w badaniach struktur biologicznych, a co za tym idzie najprawdopodobniej również w diagnostyce zmian chorobowych, jest metoda spektroskopii Ramana.

W związku z pojawiającymi się coraz częściej doniesieniami o próbach zastosowania tej metody do badania struktur biologicznych [Edwards i Carter 2001, Puppels 2001] dokonano przeglądu bieżącego piśmiennictwa pod kątem wykorzystania spektroskopii Ramana do analizy struktur kostnych i chrzęstnych [Carden i Morris 2000]. Jak dotąd opisane zostały widma spektralne uzyskiwane w wyniku analiz materiału kostnego głównie pochodzenia zwierzęcego [Timlin i wsp. 2000]. Pozwoliło to również na zbadanie zależności między zmianami widm spektralnych i zmianami składu chemicznego oraz struktury przestrzennej tkanki chrzęstnej i kostnej [Carden i Morris 2000]. W chwili obecnej jedynie w kilku ośrodkach naukowych (Department of Chemistry University of Michigan, BioMatrix Photonics, LLC w USA) czynione są próby wykorzystania wyników

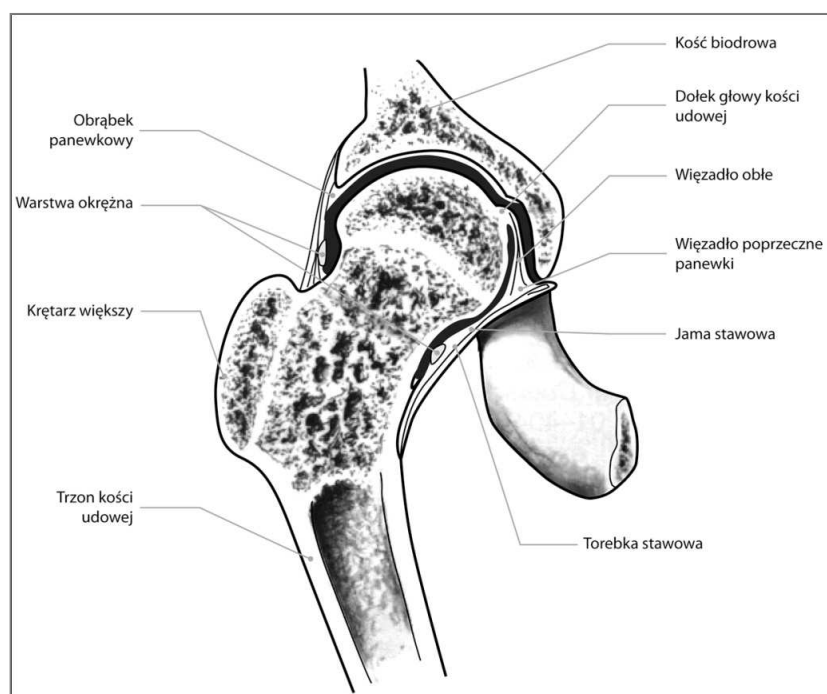
uzyskanych przy pomocy techniki ramanowskiej do diagnozowania zmian chorobowych w układzie mięśniowo-szkieletowym [Morris 2010].

Stwierdzono, że we wczesnych stadiach ChZS, które najczęściej nie są dostatecznie zdiagnozowane, następują istotne zmiany w strukturze chemicznej molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej [Day i wsp. 2004]. Te subtelne zmiany, występujące między innymi w warstwie podchrzęstnej części kości tworzących głowy i panewki stawowe, wyprzedzają zmiany morfologiczne. Dokładne ich opisanie i stworzenie norm dla różnych etapów choroby zwyrodnieniowej stawów byłoby istotne zwłaszcza dla jej wczesnych stadiów i mogłoby stanowić znaczny postęp w diagnostyce ChZS. Zastosowanie metody mikrospektroskopii ramanowskiej daje szansę na opisanie zmian na poziomie struktur chemicznych i konfiguracji przestrzennej badanych związków i mogłoby stanowić istotne uzupełnienie standardowych metod diagnostycznych, zwłaszcza we wczesnych stadiach choroby zwyrodnieniowej stawów. Wczesne wykrycie ChZS, kiedy to ani objawy kliniczne ani obrazowanie radiologiczne nie pozwalają na postawienie jednoznacznej diagnozy, byłoby niezwykle korzystne dla pacjentów, bowiem dawałoby szansę na wczesne wdrożenie terapii opóźniającej proces chorobowy.

W świetle powyższego, interesującym wydaje się zbadanie struktur kostno-stawowych na continuum zdrowie – choroba zwyrodnieniowa stawów metodami standardowymi i proponowaną nową metodą mikrospektroskopii ramanowskiej oraz próba określenia współzależności między nimi. Plan prezentowanej pracy zakłada dokonanie oceny zależności między uzyskanymi metodą spektroskopii Ramana parametrami określającymi właściwości tkanki kostnej na poziomie struktur chemicznych, a stanem zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, ocenianym według klasyfikacji radiologicznej. Na potrzeby niniejszej pracy zostały opracowane: (1) metoda preparatyki tkanki kostnej, która umożliwiła analizę warstwy podchrzęstnej i kości gąbczastej techniką mikrospektroskopii ramanowskiej oraz (2) siedmiostopniowa klasyfikacja poziomu zwyrodnienia struktur kostno-stawowych. Ponadto do oceny różnic w budowie i strukturze przestrzennej kości pobranej od osób zdrowych i od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów biodrowych wykorzystano również obrazowanie techniką mikroskopii elektronowej.

1. Budowa stawu biodrowego

Staw biodrowy jest złożonym układem biologicznym składającym się z elementów: (1) kostnych, tworzących główkę (głowa kości udowej) i panewkę (kość miedniczna), (2) chrzęstnych, pokrywających powierzchnie stawowe (3) włóknistych, w postaci więzadła wewnątrzstawowego, torebki stawowej wyścielonej od wewnątrz błoną maziową i wzmocnionej więzadłami zewnątrztorebkowymi. Schemat budowy anatomicznej stawu biodrowego przedstawiono na Ryc. 1.



Ryc.1 Schemat budowy stawu biodrowego – przekrój czołowy

Więzadła biodrowo-udowe, łonowo-udowe i kulszowo-udowe oraz warstwa okrężna i więzadło głowy kości udowej zapewniają dodatkową stabilizację stawu. Jama stawowa wypełniona jest mazią stawową wydzielaną przez błonę maziową torebki stawowej w celu zmniejszenia tarcia podczas ruchów w stawie. Struktury stawu biodrowego unerwione są przez gałęzie nerwu udowego, kulszowego i zasłonowego. Odżywianie stawu zachodzi na drodze dyfuzji z naczyń błony maziowej, pochodzących od

tętnicy okalającej udo przyśrodkowej i bocznej, tętnicy pośladkowej górnej i dolnej oraz gałęzi panewkowej tętnicy zasłonowej. Staw biodrowy jest złożoną strukturą morfofunkcjonalną, której biologiczne, chemiczne i mechaniczne właściwości oraz wynikające z nich zależności pomiędzy poszczególnymi strukturami ujawniają jego złożoną naturę zarówno w normie jak i w patologii. Badania odbywają się na wielu poziomach komplikacji budowy i funkcji, od morfologii makrostruktur poprzez poziom tkankowy, mikrostruktur komórkowych aż po strukturę chemiczną molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej.

1.1 Budowa chemiczna i struktura tkanki kostnej

Podstawową jednostką budowy dojrzałej kości drobnowłóknistej jest blaszka kostna. Zbudowana jest ze zmineralizowanej substancji międzykomórkowej a jej grubość wynosi 2-4 μm . W blaszkach znajdują się jamki kostne, a w nich leżą osteocyty (komórki kostne z długimi wypustkami cytoplazmatycznymi). Jamki połączone są siecią cienkich kanalików kostnych zawierających stykające się ze sobą wypustki osteocytów. Kanaliki kostne zawsze otwierają się do przestrzeni zawierających naczynia krwionośne. W ten sposób tlen i substancje odżywcze docierają do osteocytów otoczonych zmineralizowaną, nieprzepuszczalną substancją międzykomórkową. W każdej blaszce kostnej występują równoległe ułożone, nie tworzące pęczków, pojedyncze włókna kolagenowe spojone istotą podstawową. Włókna kolagenowe przebiegają w sąsiadujących ze sobą blaszkach pod pewnym kątem do włókien blaszki sąsiedniej, co przyczynia się do wzrostu wytrzymałości mechanicznej tej tkanki.

Tkanka kostna blaszkowata histologicznie dzieli się na tkankę kostną gąbczastą (beleczkową) i tkankę kostną zbitą (kortykalną). Kość gąbczasta tworzy kości płaskie i nieregularne oraz nasady kości długich. Zespoły równoległych blaszek kostnych układają się w nieregularne belecзки kostne tworzące sieć. Pomiędzy beleczkami znajduje się szpik kostny z naczyniami krwionośnymi. Kość zbita tworzy trzony kości długich oraz zewnętrzną warstwę nasad i pozostałych kości. Blaszkki kostne układają się koncentrycznie tworząc osteony - jednostki strukturalne kości zbitej. Osteon ma kształt walca o długości kilku milimetrów. Przez jego środek przechodzi kanał naczyniowy (kanał Haversa) zawierający cienkie naczynie krwionośne, które jest otoczone układem 6-15

koncentrycznych blaszek kostnych (blaszki systemowe). Kość zbita zbudowana jest ze ściśle ułożonych osteonów, a przestrzenie pomiędzy nimi wypełnione są przez nieregularne blaszki kostne (blaszki międzysystemowe). Wszystkie powierzchnie kości są pokryte warstwą tkanki łącznej, zwaną okostną. W miejscu wnikania naczyń krwionośnych do okostnej pokrywającej kość powstają kanały Volkmanna. Penetrują one kość zbitą w poprzek systemów Haversa, dlatego też ich długa oś jest prostopadła lub prawie prostopadła do blaszek systemowych.

Oba typy kości są tworzone przez te same komórki (osteoblasty) i resorbowane przez osteoklasty. Mikroskopowo mają podobną strukturę blaszkowatą, jednak makroskopowo znacznie się różnią. W obydwu rodzajach tkanki kostnej wyróżnia się część organiczną (pozakomórkową i komórki kostne) oraz część mineralną. Część organiczna stanowi 30%, a mineralna 70% masy kostnej. Na część organiczną składają się komórki kostne oraz tzw. macierz, którą w prawie 95 % tworzy specyficzne białko zwane kolagenem typu I, a pozostałą część stanowią białka niekolagenowe i proteoglikany. Hydroksyapatyt stanowi 95 % minerałów.

Elementy składowe tkanki kostnej to substancja międzykomórkowa i komórki kostne. Substancję międzykomórkową tworzą związki mineralne i część organiczna (niezmineralizowana macierz). Do związków mineralnych (stanowiących ok. 70 % masy kości) należą głównie fosforany wapnia (ok. 80 % związków mineralnych). Ponadto występują: węglan wapnia, cytryniany, jony magnezu i sodu oraz śladowe ilości jonów potasu, chloru i fluoru. Sole mineralne są odkładane w kości w postaci kryształów dwuhydroxyapatytu, jako małe, ale bardzo liczne kryształki fosforanów wapniowych (hydroksyapatytu) znajdują się w istocie podstawowej między fibrylami włókien kolagenowych, z którymi wiąże je osteonektyna [Olsza i wsp. 2007]. Z kolei na część organiczną (30 % masy kości) składają się włókna kolagenowe (90 %) i istota podstawowa (10%). W skład istoty podstawowej wchodzi proteoglikany (głównie siarczan chondroityny), białka niekolagenowe (osteonektyna i osteokalcyna), fosfoproteidy, sialoproteiny, lipidy i białka morfogenetyczne. Zasadniczym składnikiem włókien kolagenowych kości jest kolagen typu I, który stanowi 95% macierzy organicznej. Tworzy on zrąb późniejszej mineralizacji, determinującej wytrzymałość kości.

W dojrzałej kości dominuje sposób mineralizacji, polegający na krystalizacji i odkładaniu się minerałów na podłożu biologicznym, jakim są włókna białkowo-

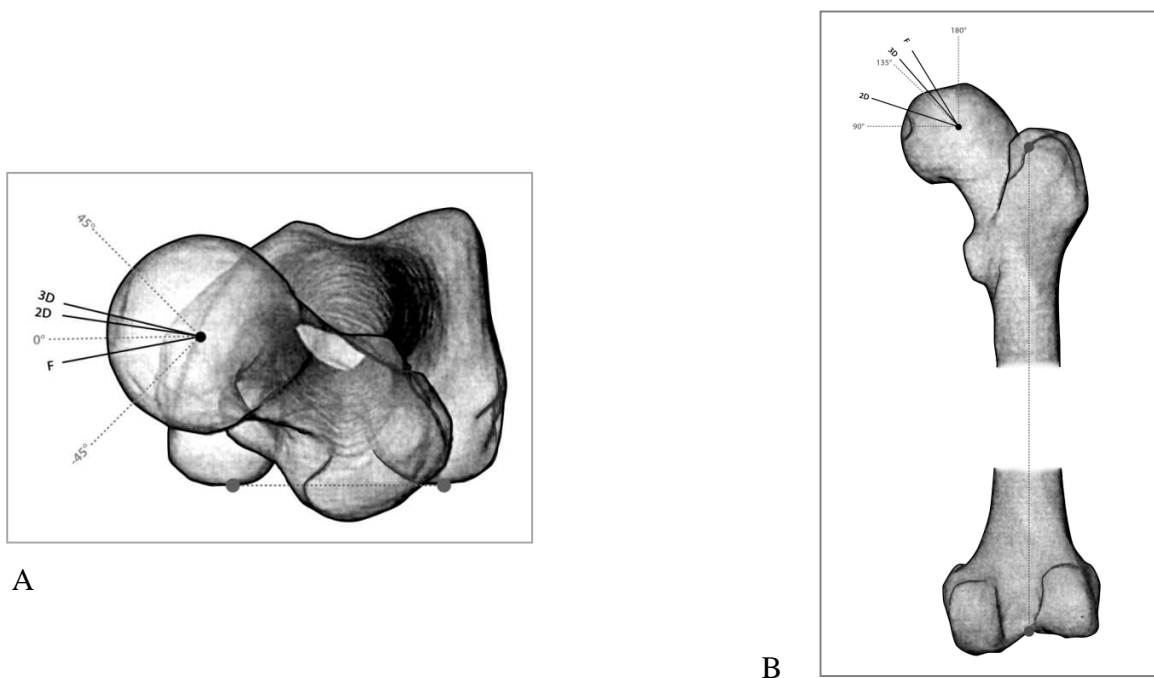
kolagenowe. Do jego krystalizacji niezbędna jest matryca biologiczna, którą jest właśnie kolagen. Włókna kolagenowe występujące w kościach, podlegające mineralizacji fosforanowej, mają szczególną budowę (defekty strukturalne). Pojawiają się one we włóknach w stałych odstępach, i w przeciwieństwie do innych odcinków włókna kolagenowego są obdarzone ładunkiem elektrycznym i mają zdolność przyciągania obdarzonych ładunkami jonów, inicjując krystalizację apatytu kostnego. Ponieważ mineralizowane apatytem włókna są spiralnie skręcone i splatają się ze sobą na kształt liny, powstaje struktura biologiczno-mineralna o bardzo dużej wytrzymałości mechanicznej. W niej tkwią, w tzw. jamkach, wokół włókien kolagenowych ułożonych w kształcie trójwymiarowej siatki. Dzięki mineralnej części kości, mającej krystaliczną strukturę hydroksyapatytu, macierz kolagenowa staje się twarda i odporna na odkształcenia. W przypadku upośledzenia mineralizacji, jak to ma miejsce w osteomalacji, kość traci twardość i łatwo ulega odkształceniu. W przypadku wadliwej macierzy kolagenowej, np. we wrodzonej łamliwości, kość jest nadmiernie krucha.

1.2 Biomechanika stawu biodrowego

Dla zrozumienia mechaniki stawu biodrowego, wiedza o wypadkowych siłach oddziałujących na głowę kości udowej podczas codziennej aktywności ruchowej ma podstawowe znaczenie. Biomechanika stawu biodrowego była i ciągle pozostaje przedmiotem licznych opracowań analizujących różne jej aspekty, w tym także uwarunkowania anatomiczne, zwłaszcza dotyczące ustawienia głowy względem innych struktur kości udowej (Ryc. 2 A, B). Ostatnio jednak coraz więcej uwagi poświęca się metodzie funkcjonalnej oceny orientacji głowy kości udowej w przestrzeni, [Wright i wsp. 2011].

Anatomicznie orientacja głowy kości udowej może być określona poprzez kąt szyjkowo-trzonowy (KSzT) i kąt antewersji szyjki kości udowej. Wartości tych parametrów decydują o tym, jak rozkładają się wektory sił w stawie oraz determinują obciążenie otaczających tkanek miękkich. Wykazano, iż orientacja głowy kości udowej może mieć udział w patogenezie ChZS [Tonnis i Heinecke 1999]. Orientacja przestrzenna głowy kości udowej definiowana przez uwzględnienie wektorów rzeczywistych sił działających na

elementy stawu biodrowego ukazują znaczne różnice w wynikach w stosunku do norm i pomiarów opartych na punktach anatomicznych [Bergmann i wsp. 2001].



Ryc. 2 Trójwymiarowe obrazowanie kąta antwersji szyjki kości udowej (A) i kąta szyjkowo-trzonowego (B), w oparciu o anatomiczne punkty referencyjne 2D i 3D oraz metodą funkcjonalną (F).

Metoda funkcjonalnej oceny orientacji, wykorzystując technikę tomografii komputerowej, do pomiaru dystrybucji gęstości tkanki kostnej podchrzęstnej w głowie kości udowej bazuje na prawie adaptacji kości do obciążeń. Wobec tego rozkład gęstości tkanki kostnej podchrzęstnej wokół głowy kości udowej może być odzwierciedleniem sumy różnorodnych obciążeń przenoszonych przez głowę podczas funkcjonowania stawu biodrowego. Zgodnie z tą koncepcją odwzorowanie rozkładu gęstości kości podchrzęstnej głowy kości udowej powinno wyjaśnić kierunek, względną wielkość i czas trwania sił przenoszonych przez staw biodrowy. Uzyskane tak wyniki pozwalają na określenie funkcjonalnej oceny orientacji głowy kości udowej.

Funkcjonalne metody oceniające orientacje wykazują inne kąty niż te zmierzone na podstawie budowy anatomicznej i pokazują, iż obciążenie głowy kości udowej nie koreluje bezpośrednio z wyżej wymienionymi kątami. Różnice między metodami wskazują, iż obciążenie przenoszone z miednicy na kość udową nie przechodzi przez geometryczny

środek głowy kości udowej. W porównaniu z wartością KSzT wyznaczanego w oparciu o pomiary anatomiczne, pomiar metodą funkcjonalną wskazuje na bardziej pionowy wektor siły (istotnie większy KSzT). Kąt antewersji mierzony na podstawie punktów anatomicznych średnio wynosi $8,6^\circ$ [Lee i wsp. 2006]. Pomiary funkcjonalnej antewersji, paradoksalnie wskazują na istnienie retrowersji szyjki kości udowej. Odwzorowanie rozkładu gęstości wskazuje na obecność obszaru wysoce gęstego na tylnej części głowy kości udowej, co jest sprzeczne z antewersją obserwowaną na podstawie pomiarów anatomicznych. Zastosowanie tej metody do ilustracji rozkładu gęstości warstwy podchrzęstnej panewki kości miednicznej potwierdziło, że funkcjonalny wektor siły jest skierowany bardziej ku górze i ku tyłowi, niż wynikałoby to z pomiarów czysto geometrycznych [Lubovsky i wsp. 2010].

2. Choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS) biodrowych

Pod pojęciem zmian zwyrodnieniowo-zniekształcających rozumie się procesy degeneracyjne komponentów tworzących połączenia maziowe, w wyniku których dochodzi do nadmiernych obciążeń przenoszonych przez kości tworzące stawy. Zgodnie z definicją choroba zwyrodnieniowa stawów (ChZS) jest przewlekłą, niezapalną chorobą stawów o etiologii wieloczynnikowej, wynikającą z zaburzenia równowagi pomiędzy procesami degradacji i regeneracji chrząstki stawowej i warstwy podchrzęstnej kości. World Health Organisation (WHO) uznała chorobę zwyrodnieniową stawów za jedną z poważniejszych chorób cywilizacyjnych. Pierwotna (idiopatyczna) ChZS powstaje bez uchwytnej przyczyn, bądź traktowana jest, jako rezultat uszkodzeń mechanicznych związanych z wiekiem. Z kolei wtórna ChZS jest wynikiem uprzednich urazów, nadwagi, chorób metabolicznych bądź uwarunkowań genetycznych.

Patogeneza choroby zwyrodnieniowej stawów (ChZS) jest niezmiernie złożona. Rozważa się czynniki genetyczne, środowiskowe jak i miejscowe uwarunkowania biomechaniczne. Tradycyjnie ChZS jest definiowana, jako ograniczony i postępujący ubytek chrząstki szklistej wraz z następczymi zmianami w leżącej poniżej kości. Proces zapoczątkowany jest niszczeniem chrząstki stawowej z następowym procesem naprawczym prowadzącym do przebudowy warstwy podchrzęstnej kości oraz tworzenia osteofitów.

Badania ostatnich lat wskazują, że ChZS to choroba wszystkich elementów stawowych, a zmiany mogą być obserwowane zarówno w chrząstce stawowej, w błonie i płynie maziowym, warstwie podchrzęstnej kości jak i we wzmacniających staw więzadłach oraz otaczających staw mięśniach, a także w strukturach układu nerwowego [Felson i Neogi 2004]. Zaburzenia w strukturze macierzy zewnątrzkomórkowej, takie jak rozpad glikozaminoglikanów czy utrata wiązań stabilizujących struktury kolagenu, są wynikiem biologicznych, mechanicznych i chemicznych procesów, które prowadzą poprzez degenerację chrząstki stawowej do utraty funkcji stawu. Objawy kliniczne, takie jak ból, obrzęk, utrata funkcji, obserwowane są u większości pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów. Brak jest natomiast korelacji obecności bądź nasilenia wyżej wymienionych objawów ze stopniem zaawansowania ChZS.

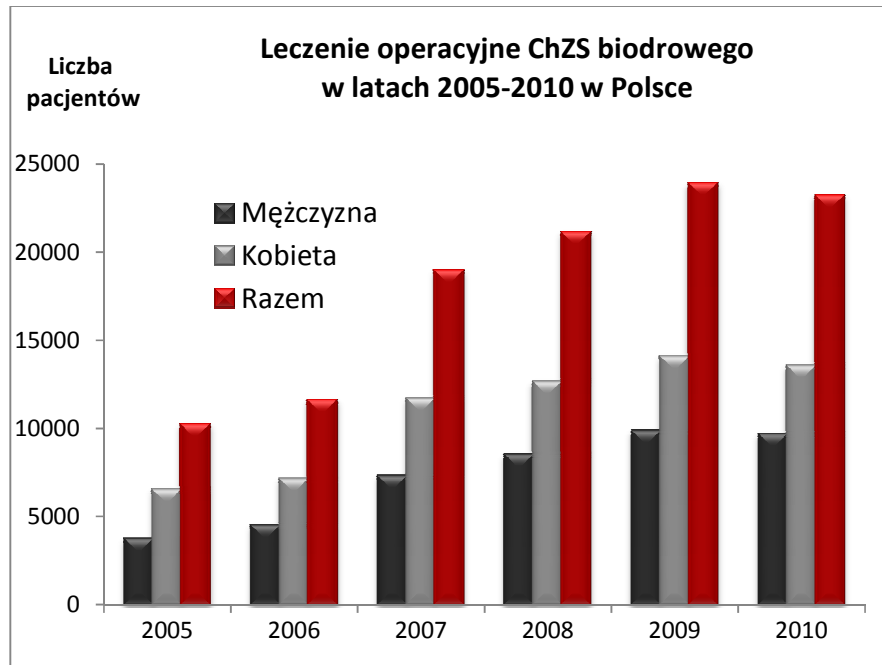
Wybór metod diagnostycznych, służących rozpoznawaniu ChZS, pozostaje wciąż poważnym wyzwaniem, ze względu na złożoną naturę tej choroby. Wśród dotychczas najczęściej stosowanych metod służących diagnozowaniu ChZS proponuje się badanie fizykalne, techniki obrazowania stawów, diagnostykę laboratoryjną a także badania genetyczne.

Dane epidemiologiczne

ChZS biodrowych jest schorzeniem powszechnie występującym i może prowadzić do znacznego stopnia inwalidztwa. Leczenie chirurgiczne poprzez implantację protezy stawu biodrowego (PSB) bólowej niedołożności z powodu ChZS wynosi w krajach rozwiniętych 50-140 na 100 000 mieszkańców [Merx i wsp. 2003]. Liczba wykonywanych implantacji nie powinna być jednak traktowana wyłącznie, jako sukces metody leczenia operacyjnego, wskazuje ona także na słabą prewencję, niską skuteczność postępowania nieoperacyjnego oraz niewielkie możliwości zapobiegania narastającym objawom ChZS biodrowych.

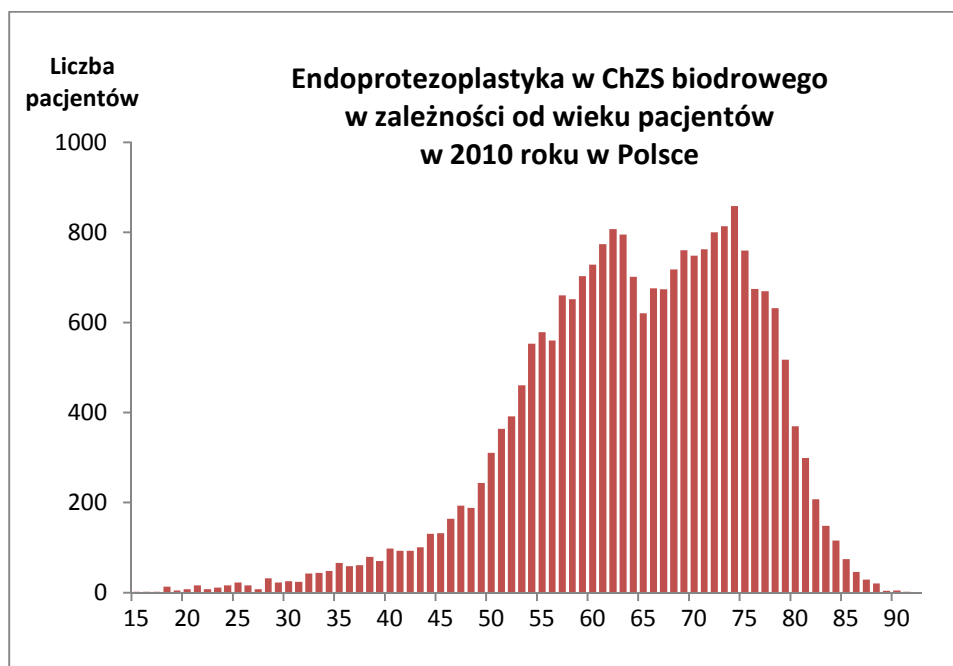
W Polsce, w ciągu ostatnich 6 lat, nastąpił ponad dwukrotny wzrost liczby zabiegów operacyjnych wykonywanych z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych (Rys. 3). W 2005 roku wykonano w skali kraju 10250 takich zabiegów, natomiast w 2009 roku – 23894. Tendencja ta wydaje się utrzymywać, co potwierdzają

dane z 2010 roku, kiedy to 23195 osób leczono operacyjnie z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych.



Ryc. 3 Liczba pacjentów według płci leczonych operacyjnie z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych w latach 2005 – 2010 w Polsce.

Kobiety, częściej niż mężczyźni, chorują i poddawane są zabiegom chirurgicznym stawu biodrowego, co potwierdzają również statystyki w naszym kraju. W 2005 roku znacznie więcej Polek leczonych było operacyjnie z powodu ChZS biodrowych. W kolejnych latach dysproporcje między kobietami i mężczyznami wykazywały tendencję spadkową. Jak wynika z danych NFZ z lat 2005-2010, na początku tego okresu proporcja leczonych operacyjnie mężczyzn (3704) do kobiet (6511), była bliska 1:2, następnie różnice między obu płciami ulegały wprawdzie stopniowemu zmniejszeniu, jednak utrzymywały się na poziomie 2:3, nadal niekorzystnym dla kobiet (Ryc. 3).



Ryc. 4 Rozkład częstości zabiegów endoprotezoplastyki z powodu ChZS biodrowych w zależności od wieku pacjentów. Dane NFZ za 2010 roku.

Na rycinie 4 przedstawiono strukturę wieku pacjentów (dla obu płci łącznie), leczonych operacyjnie metodą endoprotezoplastyki. Rozkład empiryczny, skonstruowany na podstawie danych za rok 2010, uzyskanych z Narodowego Funduszu Zdrowia, jest bimodalny i lewoskośnie umiarkowanie asymetryczny. Liczba wykonywanych zabiegów endoprotezoplastyki biodra rośnie stopniowo wraz z wiekiem. Gwałtowny, bo ponad trzykrotny, przyrost wykazuje między 45, a 55 rokiem życia (164 zabiegów – 45 lat, 579 zabiegów – 55 lat). Najwięcej zabiegów wykonywanych jest u pacjentów w grupach wiekowych matusus II i senilis. W tym okresie zarysowują się dwa wyraźne piki: w grupie wiekowej sześćdziesięciolatków (max = 808 w wieku 62 lat) i siedemdziesięciolatków (max = 851 w wieku 74 lat). Po osiemdziesiątym roku życia (późny senilis) liczba zabiegów dość gwałtownie spada, co wynika zarówno z narastających wraz z wiekiem zagrożeń, a co za tym idzie przeciwwskazań do przeprowadzania zabiegów chirurgicznych, jak i ze struktury wieku w populacji generalnej.

3. Klasyfikacje radiologiczne ChZS biodrowych.

W badaniach klinicznych i epidemiologicznych ChZS biodrowych obrazy radiologiczne służą do oceny zaawansowania choroby. Wyniki są tradycyjnie przedstawiane, jako stopnie ciężkości ChZS biodrowych, zgodnie z klasyfikacją zaproponowaną przez Kellgren'a i Lawrence'a [1957]. Klasyfikacja ta została stworzona na podstawie analizy radiogramów z populacji Leigh w hrabstwie Lancashire i zaprezentowana w postaci atlasu zdjęć rentgenowskich, obrazującego poza innymi stawami, także stan zaawansowania ChZS biodrowych na podstawie ich radiogramów wykonanych w projekcji przednio-tylnej (A-P). Autorzy uwzględnili pięć cech, obrazujących zmiany zwyrodnieniowe: zwężenie szpary stawowej, występowanie osteofitów, torbieli zwyrodnieniowych, sklerotyzację podchrzęstnej i zniekształcenia (Tab. 1). Do postawienia rozpoznania ChZS wymagane jest stwierdzenie zwężenia szpary stawowej i obecność osteofitów. Jest to klasyfikacja pięciostopniowa, gdzie 0° oznacza brak zmian o charakterze zwyrodnieniowym, a 4° bardzo nasiloną postać ChZS [Kellgren i Lawrence 1957].

Tab. 1. Skala zaawansowania zmian radiologicznych w chorobie zwyrodnieniowej stawów według Kellgren'a i Lawrence'a [1957].

Stopień	Określenie	Opis
0°	norma	staw bez zmian radiologicznych
1°	zmiany minimalne	minimalne zwężenie szpary stawowej i możliwość występowania osteofitów
2°	zmiany łagodne	osteofity, zauważalne zwężenie szpary stawowej
3°	zmiany umiarkowane	liczne wyraźne osteofity, wyraźne zwężenie szpary stawowej, umiarkowana sklerotyzacja podchrzęstna, możliwa deformacja nasad
4°	zmiany zaawansowane	duże osteofity, znaczne zwężenie szpary stawowej, znaczna sklerotyzacja podchrzęstna, wyraźna deformacja nasad

W drugiej klasyfikacji, którą od nazwisk twórców przyjęło się określać klasyfikacją wg Croft'a i Lane'a, oceny nasilenia ChZS biodrowych, oparta jest na ilościowym pomiarze minimalnej szerokości szpary stawowej [Croft i wsp. 1990, Lane i wsp. 1993]. Klasyfikacja ta odzwierciedla zasadniczą radiologiczną i patologiczną cechę ChZS biodrowych, jaką jest stopniowa utrata szpary stawowej [Resnick i Niwayama 1988]. Croft i wsp [1990] oraz Dippe [1995] postulowali, iż najlepszym radiologicznym kryterium używanym do badań epidemiologicznych i diagnozowania ChZS powinien być pomiar minimalnej szerokości szpary stawowej. Według tej klasyfikacji (Tab. 2) wyróżnia się cztery stopnie (0°-3°), przy czym stopień zerowy oznacza normę, natomiast stopnie 1-3 oznaczają stopniowe zwężanie się szpary stawu. Punkty odcięcia poszczególnych stopni zostały ustalone na: 1.5, 2.5, i 3 mm [Lane i wsp. 1993].

Tab. 2 Skala zaawansowania zmian radiologicznych w chorobie zwyrodnieniowej stawów według Croft'a i Lane'a

Stopień	Określenie	Minimalna szerokość szpary stawowej
0°	norma	≥ 3,0 mm
1°	lekkie zwężenie	≥ 2,5 mm
2°	umiarkowane zwężenie	≥ 1,5 mm
3°	zaawansowane zwężenie	< 1,5 mm

4. Badania spektroskopowe kości

Wiele metod diagnostycznych, w tym technika spektroskopii oscylacyjnej jest używanych do analizy materiału biologicznego [Panel i wsp. 2005]. Zastosowanie spektroskopii ramanowskiej oraz absorpcji w podczerwieni w badaniach biologicznych niesie z sobą różnorodne korzyści. Technika badawcza z wykorzystaniem spektroskopii pozwala uzyskać informacje o budowie i strukturze badanego materiału na poziomie mikrostrukturalnym. Badania spektroskopowe są technikami nieinwazyjnymi, co umożliwia badanie tej samej próbki różnorodnymi technikami analitycznymi [Gmerlich i

Yan 2001]. Pomimo że, obie metody badawcze (spektroskopia ramanowska i absorpcja w podczerwieni) są technikami komplementarnymi, spektroskopia Ramana posiada pewne korzyści. Spektroskopia Ramana umożliwia badania z wyższą rozdzielczością przestrzenną 0,6-1 μm w porównaniu do spektroskopii w podczerwieni 5-10 μm . Z tego powodu, technika Ramana umożliwia analizę na poziomie mikrostrukturalnym, co nie zawsze zapewnia zastosowanie badań z wykorzystaniem absorpcji w podczerwieni. W przeciwieństwie do spektroskopii w podczerwieni, spektroskopia Ramana jest znikomo wrażliwa na stopień uwodnienia badanych tkanek. Umożliwia to analizę w pełni uwodnionych próbek, przy minimalnej ingerencji w badaną próbkę związaną z jej przygotowaniem do badań. Obecnie, najnowsze systemy ramanowskie umożliwiają badanie większości tkanek biologicznych, w tym tkanki kostnej, przy wykorzystaniu w układzie eksperymentalnym lasera pracującego w zakresie światła widzialnego lub bliskiej podczerwieni. Zastosowanie tego ostatniego pozwala na wyeliminowanie w widmach ramanowskich efektów związanych z fluorescencją, zakłócających analizę pasm spektralnych [Penel i wsp. 2005].

Zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej, jako metody badawczej pozwalającej dokonać analizy ilościowej i jakościowej tkanki kostnej pozwoliło na lepsze poznanie jej budowy i powiązanie z funkcją poszczególnych elementów składowych [Garden i Morris 2000]. Spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana pozwalają uchwycić zmiany w tkance kostnej wynikające ze zmiany w budowie chemicznej, uszkodzeń mechanicznych czy defektów genetycznych. Wysoka zdolność rozdzielcza aparatury (rzędu 1 μm) ułatwia zbieranie informacji o procesach chemicznych, takich jak remineralizacja kości czy degeneracja macierzy kolagenu. Niejednokrotnie, zastosowanie innych technik, nie pozwala na obserwację tychże zmian. Spektroskopia oscylacyjna: *Fourier-transform infrared* (FT-IR) i ramanowska są metodami komplementarnymi służącymi do analizy tkanki kostnej. Obie metody w wielu przypadkach (w zależności od budowy molekularnej badanego materiału) dają informację pochodzącą z częściowo pokrywających się zakresów widm oscylacyjnych i uzupełniają się wzajemnie, wzbogacając obecną diagnostykę histologiczną i biochemiczną [Carden i Morris 2000, Faibish i wsp. 2006]. Jak wskazuje lawinowo wzrastająca liczba prac w literaturze fachowej od 2000 r., zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej do badań chrząstki stawowej oraz tkanki kostnej udowodniło jej

rolę, jako potencjalnego narzędzia diagnostycznego. Dzięki badaniom ramanowskim i FT-IR można charakteryzować składniki tkanek, takie jak kolagen czy kryształy apatytu, a uzyskane wyniki badań służą jako szkielet do oceny zmian patologicznych w tkance chrzęstno-kostnej. Spektroskopia oscylacyjna chrząstki, kości podchrzęstnej, molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej, dostarcza szczegółowej informacji o budowie chemicznej, która może być uzupełnieniem dla analiz innymi technikami histologicznymi i mikroskopowymi.

Analiza spektralna pasm, otrzymanych widm ramanowskich, struktury białek jest szczególnie użyteczna do rozróżnienia pomiędzy tkanką zdrową i patologicznie zmienioną. W omawianym przypadku nawet subtelne zmiany w budowie molekularnej badanego materiału (tkanki) powodują wykrywalne zmiany drgań oscylacyjnych, co objawia się w widmach ramanowskich pojawieniem się nowych pasm, zmianą ich położenia, czy też zmianą intensywności pasm odpowiedzialnych za konkretne drgania oscylacyjne. Zalety spektroskopii Ramana, które czynią tę technikę, jako atrakcyjną metodę do badania tkanek to: wysoka zdolność rozdzielcza 0.5- 1.0 μm i ograniczony wpływ interferencji wody. Dzięki tym zaletom, zastosowanie spektroskopii Ramana do analizy tkanek jest szeroko wykorzystywane i znajduje również coraz szersze zastosowanie w medycynie [Mahadevan-Jansen 2003, Puppels 2001].

Budowa i struktura przestrzenna kości podchrzęstnej i warstwy zmineralizowanej chrząstki stawowej zostały gruntownie zbadane za pomocą metod mikroskopowych, wybarwień oraz modeli obciążeń mechanicznych [Bailey i wsp. 2004, Burr i Schaffler 1997, Day i wsp. 2004, Ferguson i wsp. 2003, Li i Aspden 1997]. Jednak wyżej wymienione metody nie dostarczają informacji na temat budowy chemicznej, które można uzyskać przy wykorzystaniu spektroskopii oscylacyjnej. Pojawiły się nieliczne doniesienia, o tym, że wykorzystanie techniki spektroskopowej do badania: patologicznej mineralizacji kości podchrzęstnej, zmian degeneracyjnych macierzy chrząstki i samej chrząstki daje dobre rezultaty i jest techniką pozwalającą na ocenę zmian na poziomie dotychczas nieosiągalnym dla stosowanych technik. Miller i wsp. [1998], jako pierwszy opisał badania kości podchrzęstnej z wykorzystaniem absorpcji w podczerwieni. Badania te dotyczyły struktury chemicznej przekrojów kości gąbczastej, zbitej oraz kości podchrzęstnej uzyskanej od małpy. Przeprowadzono badania na przekrojach poprzecznych i podłużnych

względem osi osteonu. Zastosowanie wskaźników spektroskopowych pozwoliło na opisanie frakcji mineralnych oraz organicznych (proporcje: węglany/fosforany, minerały/macierz) w badanym materiale. Widma zarejestrowane bliżej osteonu zawierały większą zawartość macierzy (białek) wskazując na nowo powstającą kość. Z kolei widma zebrane z punktów oddalonych od osteonu charakteryzowały występowanie zwiększonej zawartości minerału wskazując tym samym na kość bardziej dojrzałą i zmineralizowaną. W rejestrowanych widmach zaobserwowano wzrost stosunku pasm węglanów do fosforanów w obszarze pogrubiałej warstwy podchrzęstnej, co wskazywało na bardziej dojrzałą i zmineralizowaną strukturę kostną. Jak widać, użycie tego wskaźnika (stosunku intensywności pasm pochodzących od węglanu do fosforanu) daje możliwość zastosowania go, jako potencjalnego markera spektroskopowego choroby zwyrodnieniowej kości. Metody spektroskopii oscylacyjnej do badania struktury kolagenu w tkankach, identyfikacji tkanek patologicznych mogą być zastosowane zarówno dla kolagenu typu I jak i typu II [Dehring i wsp. 2006].

II. PRZEGLĄD TECHNIK ANALITYCZNYCH

1. Spektroskopia Ramana

Spektroskopia zajmuje się badaniem i wyjaśnianiem oddziaływania pomiędzy materią będącą zbiorowiskiem atomów i cząsteczek a promieniowaniem elektromagnetycznym. Oddziaływanie to pozwala obserwować i analizować zmiany energii (widm) promieniowania pochłanianego, emitowanego lub rozpraszanego przez dany obiekt dając informacje o właściwościach fizycznych badanego układu. Zjawiska obserwowane w wyniku oddziaływania fali elektromagnetycznej z materią dzielą spektroskopię na absorpcyjną i emisyjną oraz niekiedy dodatkowo, osobno wydzielaną spektroskopię rozproszeniową, która obejmuje m.in. spektroskopię Ramana [Drozdowski 1996], choć właściwie spektroskopia rozproszenia jest spektroskopią emisyjną. Spektroskopia zajmuje się zarówno promieniowaniem jak i materią, ponieważ jakościowe i ilościowe zmiany w widmie promieniowania po jego oddziaływaniu z materią dają informacje o właściwościach fizycznych badanego układu.

1.1 Podstawy teoretyczne

Spektroskopia ramanowska jest rodzajem spektroskopii rozproszeniowej, której podstawy teoretyczne opracowali w 1925 roku Kramers i Heisenberg (kwantowo-mechaniczna teoria rozpraszania). Kiedy w 1928 roku hinduski fizyk Chandrasekhara Venkata Raman potwierdził doświadczalnie zjawiska przewidziane przez teoretyków, nie tylko przyczynił się do potwierdzenia teorii kwantowo-mechanicznej, ale również odkrył nowe zjawisko związane z rozpraszaniem światła. Tym samym powstał nowy rodzaj spektroskopii. Za swoje odkrycie w 1930 r. otrzymał nagrodę Nobla z fizyki [Kęcki 1975]. Mikrospektroskopia Ramana jest techniką, która bazuje na efekcie Ramana polegającym na pomiarze promieniowania rozproszonego (rozproszenie Ramana tj. nieelastycznego rozpraszania fotonów). Widmo światła rozproszonego składa się z zawsze występującej silnej linii odpowiadającej długości fali promieniowania padającego i symetrycznie

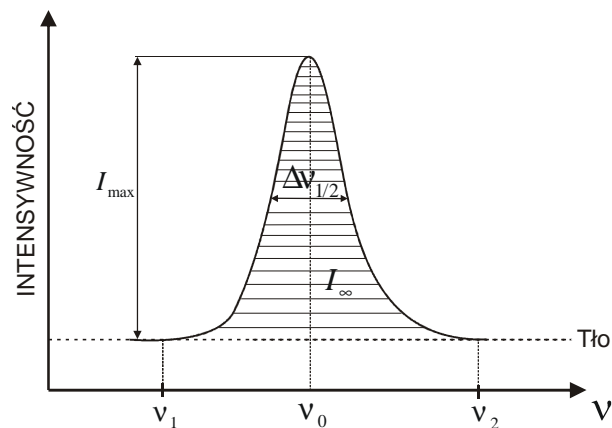
położonych po obu jej stronach słabych pasm. Silna linia odpowiada rozproszeniu rayleighowskiemu, natomiast pozostałe słabe pasma związane są z rozpraszaniem Ramana. Pasma przesunięte od linii wzbudzającej w kierunku fal dłuższych nazwano stokesowskim, natomiast przesunięte w kierunku fal krótszych antystokesowskim. Dla danej substancji położenie pasm jest stałe i niezależne od częstotliwości wiązki padającej stanowiąc unikatowy „chemiczny odcisk palców” próbki. Natężenie pasm ramanowskich jest o wiele, bo aż $10^3 - 10^4$ mniejsze od pasma rayleighowskiego. Natomiast natężenie antystokesowskiego pasma ramanowskiego jest o wiele mniejsze od stokesowskiego, z tego powodu w spektrometrii ramanowskiej częściej posługujemy się pomiarem pasm stokesowskich [Bazin i wsp. 2009]. Rozproszenie ramanowskie zachodzi podczas oddziaływania promieniowania elektromagnetycznego z cząsteczką. Promieniowanie elektromagnetyczne posiada własności korpuskularne i falowe (dualizm korpuskularno-falowy). Toteż, powstanie rozproszenia ramanowskiego można opisać na dwa sposoby. Pierwszy, oparty na klasycznej teorii elektromagnetycznej promieniowania – opis falowy, oraz drugi, oparty na teorii kwantowej – opis korpuskularny.

Teoria klasyczna rozproszenia Ramana ukazuje interakcje pomiędzy chmurą elektronową cząsteczki i promieniowaniem elektromagnetycznym, które powoduje nieelastyczne rozproszenie światła. Efekt Ramana jest obserwowany, gdy wystąpią zmiany w polaryzowalności cząsteczki, którą definiujemy, jako zdolność przemieszczania się chmury elektronowej względem jąder atomowych w polu elektrycznym. Indukowany przez promieniowanie drgający moment dipolowy jest proporcjonalny do polaryzowalności molekuly. Podczas gdy klasyczna teoria falowa pozwala opisać podstawy mechanizmu nieelastycznego rozpraszania, nie wyjaśnia zmian położenia i intensywności pasm rozpraszania w widmie Ramana. Mechanika kwantowa pozwala na wyjaśnienie tych zmian w oparciu o wykresy poziomów energetycznych. Molekuły na podstawowym poziomie oscylacyjnym (poziom zerowy $v=0$) absorbują energię, tym samym przechodząc w stan wzbudzenia. W procesie relaksacji następuje rozpraszanie promieniowania i molekula albo powraca do stanu początkowego – rozproszenie Rayleigha, albo na jeden z wyższych energetycznie poziomów oscylacyjnych – stokesowskie rozproszenie Ramana. Zmiany intensywności pasm występują ze względu na różnice ilościowe molekuł we wzbudzonym i obniżonym stanie energetycznym. W równowadze termicznej populacja zachowuje się

zgodnie ze stanem rozproszenia boltzmanowskiego i w większości znajduje się na podstawowym poziomie energetycznym. Statystycznie istnieje więcej molekuł obsadzających najniższe poziomy energetyczne, tym samym zdolnych ze stanu podstawowego przejść do stanu wirtualnego (pozornego/wzbudzonego), niż tych ze stanu wzbudzonego. Tym samym pasmo stokesowskie jest bardziej intensywne od pasma antystokesowskiego i właśnie to pasmo jest najczęściej wykorzystywane w analizie widm rozpraszania Ramana.

1.2 Parametry pasma spektralnego

Widmo spektralne to zarejestrowany obraz promieniowania rozłożony na poszczególne częstotliwości, długości fal lub energię. Przedstawiane jest najczęściej na płaszczyźnie, jako wykres intensywności pasma ramanowskiego w funkcji częstotliwości. Zarejestrowane widmo spektroskopowe powinno być złożone z wielu wąskich linii odpowiadających rozproszonym kwantom energii, w rzeczywistości jednak widmo takie nie jest liniami, ale posiada pasma o różnej intensywności i szerokości. Taka postać pasm, związana jest z niedoskonałością rejestrującej ich aparatury, a także z różną szerokością stanów energetycznych [Drozdowski 1996]. Na rycinie 5 zostały przedstawione wszystkie parametry pasma spektralnego.



Rys. 5 Pasma spektralne z naniesionymi parametrami opisowymi [za Drozdowskiem 1996]

Głównymi parametrami charakteryzującymi dane pasmo i wykorzystywanymi podczas badania struktur cząsteczek, molekuł czy kryształów są:

- częstotliwość ν_0 , odpowiadająca maksimum wysokości konturu badanego pasma
- intensywności I_{\max} , jest to wysokość konturu pasma mierzona od poziomu tła
- szerokość połówkowa $\Delta\nu_{1/2}$, jest to szerokość konturu pasma, wyznaczona w połowie jego wysokości
- intensywność integralna I_{∞} , jest to powierzchnia ograniczona konturem pasma i tłem

1.3 Układ do badań ramanowskiego rozpraszania światła

Do badań ramanowskiego rozpraszania światła w układzie klasycznym stosuje się spektroskop. W przypadku naszych badań zastosowano system mikroramanowski wyposażony w następujące elementy:

- źródła wzbudzenia w postaci lasera
- układu optycznego, którego zadaniem jest oświetlenie próbki, doprowadzenie światła wzbudzającego i zebranie promieniowania rozpraszanego
- siatki dyfrakcyjnej
- detektora promieniowania rozproszonego w postaci kamery CCD (charge coupled device)
- układu rejestrującego widma i sterującego pracą systemu (komputer + specjalistyczne oprogramowanie)

Pomiary w skali mikro umożliwia zastosowany w układzie mikroskop konfokalny sprzęgnięty z układem pomiarowym, pozwalający na zogniskowanie wiązki światła wzbudzającego (lasera) na badanym materiale, jak i zbieranie światła rozproszonego z bardzo małej objętości (rzędu kilku mikrometrów sześciennych).

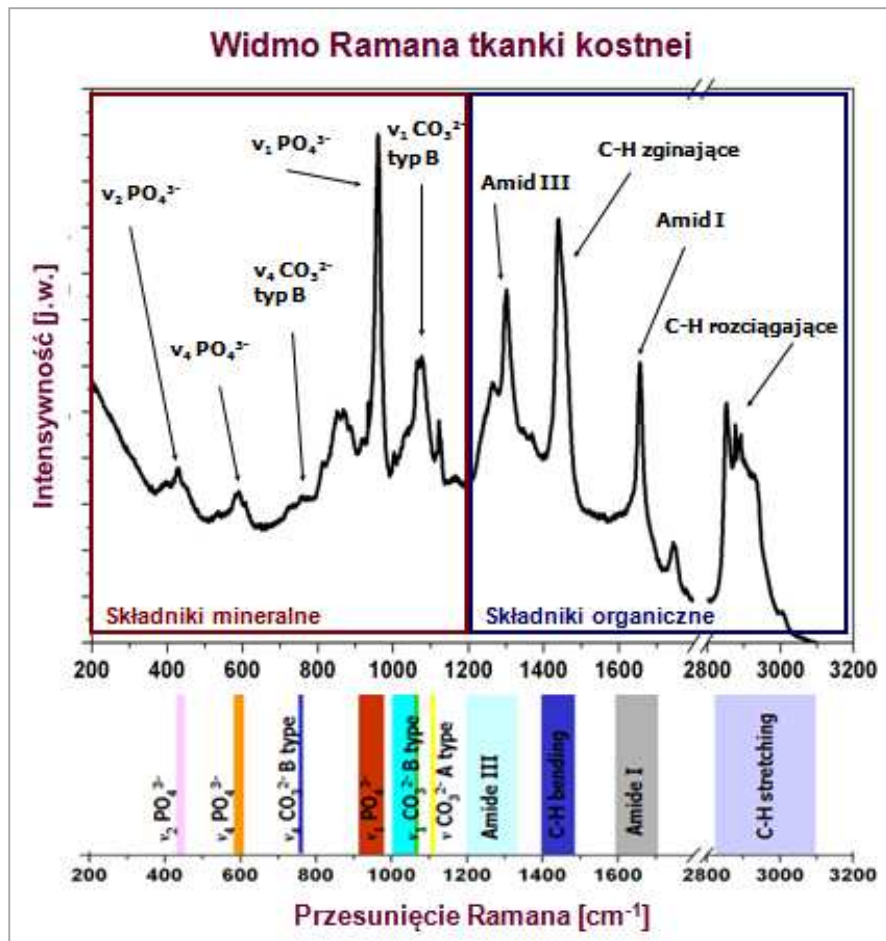


Ryc. 6 Mikro-spektroskop Ramana inVia firmy Renishaw (www.renishaw.com.pl)

Pomiary wykonane zostały przy zastosowaniu mikrospektroskopu Ramana (inVia) firmy Renishaw, w którym system ramanowski sprzęgnięty jest z mikroskopem konfokalnym (Ryc. 6). Aparatura ta umożliwia uzyskanie widm Ramana z rozdzielczością przestrzenną rzędu $1\ \mu\text{m}$. Natomiast konfokalna zdolność rozdzielcza wynosi około $2\ \mu\text{m}$. Oba parametry są ściśle związane z wyborem długości fali światła wzbudzającego, jak również rodzaju obiektywu mikroskopu użytego w eksperymencie. Aparatura wyposażona jest w dwa lasery o różnej długości fali wzbudzającej ($488\ \text{nm}$ i $785\ \text{nm}$). Wybór odpowiedniej fali wzbudzającej uzależniony jest od rodzaju badanego materiału, zastosowanej techniki pomiarowej i rodzaju przeprowadzanych badań. W omawianym układzie źródłem wiązki promieniowania wzbudzającego był laser o mocy wyjściowej $500\ \text{mW}$, pracujący na długości fali $785\ \text{nm}$, z możliwością sterowania mocą światła padającego na próbkę. Wiązka lasera była ogniskowana na próbce poprzez obiektyw o powiększeniu $\times 50$ i aperturze numerycznej obiektywu $\text{NA}=0.5$. W badaniach użyto chłodzonego powietrzem detektora CCD (Rencam) oraz siatkę dyfrakcyjną $1200\ \text{rys/mm}$.

1.4 Analiza widma Ramana

Na poniższej rycinie (Ryc. 7) przedstawiono typowe widmo Ramana uzyskane z warstwy podchrzęstnej kości.



Rys. 7 Typowe widmo Ramana warstwy podchrzęstnej kości. (udostępnione z materiałów własnych T. Buchwalda)

W widmie tym głównym, pasmom Ramana przypisano odpowiednie grupy chemiczne wchodzące w skład fazy mineralnej i fazy organicznej – zewnątrzkomórkowej macierzy tkanki kostnej. Odseparowanie w widmie Ramana kości, pasm związanych ze składnikami mineralnymi od pasm związanych ze składnikami organicznymi, pozwala na uzyskanie dokładnej analizy zmian składu chemicznego w warstwie podchrzęstnej kości.

W przeprowadzonej analizie do interpretacji widm ramanowskich użyto intensywności integralnych pasm znacznie mniej czułych na efekty orientacyjne związane m.in. z ułożeniem włókien kolagenowych w badanej tkance.

1.5 Komputerowe przetwarzanie danych

Do analizy widm zastosowano program WIRE 3.0 (Renishaw), który pozwolił otrzymać dane dotyczące intensywności integralnych pasm istotnych w ocenie zmian składu chemicznego. Na intensywność integralną pasm w widmie Ramana kości podchrzęstnej wpływa znacząco nierówność powierzchni materiału biologicznego. W celu usunięcia wpływu tego czynnika na obraz zmian składu chemicznego, przy analizie zastosowano stosunki intensywności integralnych odpowiednich pasm. Dzięki temu otrzymano informacje o względnej zmianie ilości danego składnika chemicznego badanej tkanki kostnej.

1.6 „Jakość kości” w ocenie spektroskopii Ramana

Postęp w diagnostyce i zrozumienie znaczenia poszczególnych składników tworzących kość na jej właściwości mechaniczne, pozwolił na ocenę „jakości kości” poprzez analizę określonych markerów, dających się wyodrębnić z analizowanych widm przy zastosowaniu spektroskopii ramanowskiej. Określenie „jakość kości” odnosi się do całości budowy i struktury przestrzennej elementów tkanki kostnej oraz jej zdolności do pełnienia funkcji mechanicznej [Judex i wsp. 2003]. Spektroskopia Ramana pozwala wykorzystać trzy parametry do opisu właściwości kości: stosunek ilości minerałów do macierzy, proporcję węglanów do fosforanów i wskaźnik jakości kolagenu.

Analizując widma ramanowskie tkanki kostnej wykorzystano pośrednio wyniki badań wykonanych z użyciem absorpcji w podczerwieni. Pozwoliło to na odpowiednie przypisanie pasm ramanowskich odpowiednim grupom chemicznym [Mendelshon i wsp. 1999, Boskey i Mendelshon 2005]. W spektroskopii Ramana rzadko analizuje się zachowanie intensywności maksymalnej pasma (intensywność w maksimum nie niesie żadnej informacji fizycznej). Do analizy widm wykorzystuje się, zatem intensywności

integralnych pasm, bądź stosunki intensywności integralnych odpowiednich pasm związanych z konkretnymi drganiami oscylacyjnymi. Na przykład: stosunek intensywności integralnej pasma fosforanów (występujący w obszarze drgań $\nu \sim 959 \text{ cm}^{-1}$) przez intensywność integralną pasma amidu III (obszar drgań $\nu \sim 1240 - 1300 \text{ cm}^{-1}$) co odpowiada stosunkowi minerałów do macierzy i nosi nazwę wskaźnika mineralizacji [Kazanci i wsp. 2007]. W analizie zmian ilości składnika mineralnego zastosowano intensywności integralne pasm Ramana grup fosforanowych PO_4^{2-} i węglanowych CO_3^{2-} występujące w obszarze drgań $\nu_2 \sim 429 - 450 \text{ cm}^{-1}$, $\nu_4 \sim 587 - 614 \text{ cm}^{-1}$ dla kryształów hydroksyapatytu oraz $\nu_1 \sim 1071 - 1073 \text{ cm}^{-1}$ dla kryształów węglanoapatytu [Kazanci i wsp. 2007]. Analiza w widmie ramanowskim stosunku intensywności integralnych pasm, jako stosunek węglanów do fosforanów pozwala uzyskać wgląd w budowę kości, ponieważ zmienia się on zależnie od architektury kości, wieku i krystalizacji mineralnej [Akkus i wsp. 2004, Legros i wsp. 1987, Yerramshetty i wsp. 2006].

Wytrzymałość kości jest charakteryzowana nie tylko stopniem mineralizacji, ale zależy także od krystaliczności występujących minerałów i od optymalnego rozdziału różnych wielkości kryształów [Boskey 2003]. Ostatnie doniesienia eksperymentalne, dotyczące pomiarów ramanowskich związanych z krystalicznością minerałów, wskazują na zastosowanie do analizy widm, innego parametru spektralnego, jak szerokości połówkowej pasm fosforanowych w obszarze drgań $\nu \sim 959 \text{ cm}^{-1}$ [Awonusi i wsp. 2007, de Mul i wsp. 1998].

Do oceny budowy kolagenu wykorzystuje się różne drgania oscylacyjne wiązań peptydowych. Obserwujemy je w widmach Ramana, jako pasma amidowe (amid I lub amid III), z których częstotliwości pasm pochodzących od amidu I i amidu III o stosunkowo dużej intensywności korelują ze strukturą wewnątrz białka, bądź z jego konformacją (zdolność do przyjmowania przez cząsteczki różnych kształtów przestrzennych). Kolagen może posiadać unikatową trójwymiarową strukturę potrójnej helisy lub nieuporządkowaną strukturę tzw. kłębka statystycznego. Pierwsza z wymienionych struktur, helisa alfa, powoduje, że sztywny szkielet tropokolagenu charakteryzuje się dużą wytrzymałością mechaniczną, natomiast kłębek statystyczny może przyjąć dowolny kształt tworząc znacznie mniej sztywną strukturę przestrzenną. Zmiany konformacyjne w cząsteczce kolagenu, tzn. przejście struktury heliakalnej w strukturę kłębka statystycznego

charakteryzuje się na podstawie interpretacji pasm amidowych I i III w widmie Ramana. W przedstawionej analizie konformacje kolagenu określiliśmy interpretując pasmo amidowe III, którego obszar występowania w widmie Ramana wynosi $\sim 1200 - 1300 \text{ cm}^{-1}$. W zakresie $\sim 1243 - 1253 \text{ cm}^{-1}$ pasmo amidowe III związane jest z strukturą kłębka statystycznego, natomiast w zakresie $\sim 1265 - 1300 \text{ cm}^{-1}$ pozwala na charakteryzowanie struktury potrójnej helisy. Zanik pasma z drugiego zakresu, można przypisać rozrywaniu wiązań wodorowych i utracie przez cząsteczkę kolagenu, swej pierwotnej naturalnej struktury helikalnej na rzecz nieuporządkowanej struktury kłębka statystycznego [Parker 1983]. W analizie dotyczącej zmian ilości kolagenu kości, jako całkowitą ilość składnika organicznego uznano sumę intensywności integralnych pasm związanych z obydwoma strukturami kolagenu.

2. Mikroskopia elektronowa

Mikroskopia elektronowa to technika obrazowania, w której światło widzialne jest zastąpione wiązką elektronów przyspieszonych pod wpływem silnego pola magnetycznego. Im większa energia elektronów, tym krótsza ich fala i większa rozdzielczość mikroskopu.

2.1 Mikroskop elektronowy skaningowy

Mikroskop skaningowy (SEM – scanning electron microscope) należy do grupy mikroskopów elektronowych, w którym wiązka elektronów omiatająca powierzchnię badanego preparatu odbija się od jego powierzchni i jest mierzona przez licznik znajdujący się obok próbki. Elektrony, które wpadają do licznika, powodują powstanie sygnału prądowego, który po wzmocnieniu jest przesyłany do monitora. Na monitorze tworzony jest, zatem obraz odpowiadający topografii powierzchni, od której zostały odbite elektrony [BSE – back-scattered mode]. Wiązka elektronów padająca na powierzchnie próbki nie tylko powoduje odbicie elektronów. Część elektronów zostaje pochłonięta a utworzony prąd może być użyty do wytworzenia obrazu elektronów pochłoniętych [SE – secondary electron mode].

SEM zastosowany do badania tkanki chrzęstno-kostnej umożliwia obserwację trójwymiarową powierzchni chrząstek stawowych, warstw granicznych chrząstka/kość, jak i przekrojów warstw tkanki chrzęstnej i kostnej. Obserwacje w skaningowym mikroskopie elektronowym pozwalają na ustalenie wzajemnego położenia komórek, elementów włóknistych oraz struktur kostnych oraz na ocenę zmian w budowie i strukturze badanej tkanki.

2.2 Mikroskop transmisyjny

W mikroskopie transmisyjnym (TEM – transmission electron microscopy) rejestrowane są elektrony przechodzące przez próbkę. Preparat w takim mikroskopie musi być cienką płytką o grubości mniejszej od 0,1 μm . Wiązka elektronów po przejściu przez preparat pada na detektor w postaci matrycy CCD, który umożliwia odczytanie obrazu, jako sygnałów elektrycznych.

TEM umożliwia poznanie budowy badanego materiału na poziomie subkomórkowym. Możliwa jest obserwacja ultrastruktury tkanki kostnej i tkanki chrzęstnej. Mikrofotografie skrawków eponowych pozwolą określić budowę tkanki kostnej (zbitej i beleczkowatej), degenerację chrząstki oraz topografię włókien kolagenowych. Na elektronogramach widoczne są poszczególne komórki oraz organelle komórkowe. Można wykazać (w zależności od jakości materiału badawczego) zaburzenia w budowie kości np. rozwój osteoporozy czy osteomalacji (niedostateczna mineralizacja), a także zmiany chorobowe występujące w stawach (analiza komórek maziowych czy też komórek tkanki łącznej).

III. ZAŁOŻENIA PRACY

Jedną z metod diagnostycznych używanych do analizy materiału biologicznego jest technika spektroskopii oscylacyjnej [Panel i wsp. 2005]. Zastosowanie spektroskopii w podczerwieni i spektroskopii ramanowskiej w badaniach biologicznych pozwala uzyskać informacje o budowie i strukturze badanego materiału na poziomie mikrostrukturalnym [Gremlich i Yan 2001]. Mimo, że obie techniki spektroskopii, jako metody komplementarne, oferują podobne wyniki w zakresie informacji z częściowo pokrywających się zakresów widm oscylacyjnych, to jednak spektroskopia Ramana jest dokładniejsza i wydaje się być metodą łatwiejszą w zastosowaniu, a co za tym idzie, mającą większe szanse na upowszechnienie.

Przewaga spektroskopii ramanowskiej nad spektroskopią w podczerwieni wynika przede wszystkim z jej wyższej rozdzielczości przestrzennej [Timlin i wsp. 1999] oraz znikomej wrażliwości na stopień uwodnienia badanych tkanek a także stosunkowo prostej minimalnej techniki przygotowywania próbek. Ze względu na wyżej wymienione zalety, metoda ta jest częściej wykorzystywana do badania tkanek biologicznych, w tym także struktur kostnych i stawowych [Panel i wsp. 2005]. Analiza tkanki kostnej z zastosowaniem spektroskopii Ramana poszerzyła wiedzę o budowie i funkcji poszczególnych elementów składowych kości [Garden i Morris 2000].

Korzystając z najnowszej literatury przedmiotu i własnych doświadczeń, na potrzeby prezentowanej pracy, przygotowano oryginalną metodę preparatyki tkanki kostnej, która umożliwiła wykorzystanie techniki mikroskopii ramanowskiej do przeprowadzenia badań spektroskopowych próbek pobranych z warstwy podchrzęstnej kości i z kości gąbczastej. Wstępnie, różnice w budowie i strukturze przestrzennej między zdrową kością i kością ze zmianami zwyrodnieniowymi, analizowano na podstawie obrazów mikroskopii elektronowej. Technika mikroskopii elektronowej ujawniła istotne różnice w strukturze między kością bez zmian i kością ze zmianami zwyrodnieniowymi, co z kolei pozwoliło na sformułowanie założenia, iż zastosowanie metody spektroskopowej (mikroskopii ramanowskiej) może również ujawnić różnice między strukturami kostnymi pobranymi z tkanek zdrowych i tkanek zmienionych chorobowo, a także pozwoli na ich zobiektywizowane opisanie za pomocą wskaźników jakościowych i ilościowych.

Aktualny stan wiedzy, wynikający z dostępnej literatury naukowej [Esmonde-White 2009], nie potwierdza jednoznacznie zmian struktury chemicznej tkanki chrzęstnej i kostnej w postępującej chorobie zwyrodnieniowej w badaniach na Dell (+/-) myszach transgenicznym. Badania tkanek ludzkich metodą spektroskopii Ramana dotyczyły preparatów np. hemoglobiny i mioglobiny [Mak 2004], natomiast jak dotąd nie opublikowano wyników badań ludzkiej tkanki kostnej, prowadzonych przez Morris [2010]. W świetle powyższego, zastosowanie techniki spektroskopowej (spektroskopia ramanowska) wydaje się być celowym i użytecznym narzędziem w badaniach porównawczych zdrowych i zmienionych chorobowo struktur kostnych i chrzęstnych, a w dalszej konsekwencji również w diagnostyce medycznej ChZS.

Cel pracy

Ocena zależności między stopniem zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych oznaczanym według własnej klasyfikacji radiologicznej i parametrami określającymi niektóre właściwości tkanki kostnej: skład i strukturę chemiczną macierzy zewnątrzkomórkowej oraz budowę przestrzenną kolagenu, uzyskanymi metodą spektroskopii Ramana.

IV. MATERIAŁ

W pierwszym etapie doboru materiału empirycznego, analizie poddano dokumentację medyczną 113 pacjentów przyjętych i leczonych w Klinice Chirurgii Urazowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim w Poznaniu oraz w Oddziale Ortopedycznym Wielkopolskiego Centrum Ortopedii i Chirurgii Urazowej im. Ireneusza Wierzejewskiego w Poznaniu w latach 2008- 2011. U wszystkich pacjentów metodą leczenia z wyboru była implantacja protezy stawu biodrowego (PSB).

W drugim etapie selekcji materiału, po wykluczeniu pacjentów z reumatoidalnym zapaleniem stawów, OB powyżej 20 mm/1h, wrodzoną bądź nabytą dysplazją, jałową martwicą głowy kości udowej pozostało 63 pacjentów. Z tej grupy do dalszych badań zakwalifikowano tych pacjentów, którzy spełniali kryteria pierwotnej choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, bądź hospitalizowanych i poddanych leczeniu PBS z powodu urazu okolicy stawu biodrowego. Dodatkowym, istotnym wymogiem zakwalifikowania danego pacjenta do badań, była bardzo dobra jakość, przynajmniej jednego radiogramu w projekcji przednio-tylnej (AP), standardowo wykonanego do celów diagnostycznych.

Ostatecznie, grupę badaną stanowiło 35 pacjentów, w tym 24 kobiety i 11 mężczyzn, w wieku od 48 do 88 lat, którzy wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w projekcie badawczym. Strukturę wieku i płci badanych pacjentów oraz stopień zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawu biodrowego według standardowo używanych klasyfikacji wg Kellgrena i Lawrence'a [1957] oraz Croft'a [1990] i Lane'a [1993], a także siedmiostopniowej klasyfikacji własnej, którą w następnym etapie analiz zredukowano do pięciu stopni.

Badaniom poddano materiał kostny pobrany od 35 pacjentów, z których pięcioro (grupa 0 wg klasyfikacji własnej) nie wykazywało żadnych klinicznych i radiologicznych oznak ChZS biodrowych. Pozostałych trzydziścioro pacjentów wykazywało oznaki ChZS biodrowych w różnym stopniu zaawansowania w zależności od zastosowanego kryterium oceny (Tab. 3). Według klasyfikacji własnej zostali zaliczeni do sześciu grup (grupy I-VI) o stopniowo narastających oznakach choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych.

Tab. 3 Charakterystyka badanych pacjentów według płci i wieku oraz stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych według trzech różnych klasyfikacji.

Lp.	Płeć	Wiek	Klasyfikacja wg Kellgren'a i Lawrence'a	Klasyfikacja wg Croft'a i Lane'a	Klasyfikacja własna
1	K	76	2	2	III
2	K	88	2	2	III
3	M	64	3	3	V
4	M	49	3	3	V
5	M	60	2	2	III
6	K	77	4	3	VI
7	M	61	2	2	III
8	K	75	3	3	V
9	K	82	1	1	I
10	K	88	2	1	II
11	K	75	3	2	IV
12	K	65	4	3	VI
13	K	84	1	1	I
14	K	63	4	3	VI
15	M	80	4	3	VI
16	K	72	1	1	I
17	K	83	3	2	IV
18	M	60	1	1	I
19	K	61	0	0	0
20	M	61	2	1	II
21	K	80	2	1	II
22	K	73	3	3	V
23	M	61	1	1	I
24	M	49	0	0	0
25	K	44	3	2	IV
26	K	46	0	0	0
27	K	63	3	3	V
28	K	69	2	2	III
29	M	51	1	0	0
30	K	71	4	3	VI
31	K	63	3	2	IV
32	M	60	2	1	II
33	K	51	2	1	II
34	K	48	0	0	0
35	K	77	3	2	IV

Pacjenci wykazujący zmiany zwyrodnieniowe zostali podzieleni na sześć grup (I-VI) według wzrastającego stopnia zaawansowania choroby. Każda z siedmiu grup liczyła ostatecznie pięcioro pacjentów. Materiał stanowiły fragmenty chrzęstno-kostne pobrane z głowy kości udowej standardowo usuwanej podczas operacji implantacji PSB. Od każdego pacjenta pobrano pięć próbek, z których dwie pochodziły z najbardziej obciążonych miejsc, kolejne dwie z mniej obciążonych miejsc głowy kości udowej do głębokości 1 cm od powierzchni stawowej chrząstki oraz jedna z okolicy części środkowej głowy kości udowej. Łącznie, badany materiał kostny liczył 175 próbek, poddanych analizie metodą mikrospektroskopii ramanowskiej.

Zagadnienia etyczne

Projekt badań został zgłoszony do Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu i uzyskał pozytywną opinię, potwierdzoną dokumentem nr 843/09. Zgodnie z wymogami, wszyscy pacjenci zostali poinformowani o celu i metodach badania i od każdego pacjenta lub upoważnionego opiekuna, uzyskano pisemną zgodę na jego przeprowadzenie.

Badania pacjentów, analiz danych medycznych oraz pobranie fragmentu chrzęstno-kostnego z usuwanej w trakcie zabiegu protezoplastyki głowy kości udowej, przeprowadzono w Klinice Chirurgii Urazowej Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Wielospecjalistycznym Szpitalu Miejskim w Poznaniu oraz w Wielkopolskim Centrum Ortopedii i Chirurgii Urazowej im. Ireneusza Wierzejewskiego w Poznaniu. Badania tkanki chrzęstno-kostnej wykonane zostały z zastosowaniem konfokalnego mikroskopu ramanowskiego inVia firmy Renishaw (system ramanowski sprzęgnięty z mikroskopem konfokalnym) w Katedrze Spektroskopii Optycznej na Wydziale Fizyki Politechniki Poznańskiej. Tkanka chrzęstno-kostna była badana z wykorzystaniem transmisyjnej mikroskopii elektronowej (TEM) w Pracowni Mikroskopii Elektronowej i Konfokalnej na Wydziale Biologii Uniwersytetu im. Adama Mickiewicza w Poznaniu, natomiast badania z wykorzystaniem mikroskopii elektronowej skaningowej (SEM) wykonano w Zakładzie Histologii i Embriologii Uniwersytetu Przyrodniczego w

Poznaniu. Ponadto w każdym z wyżej wymienionych ośrodków naukowo-badawczych uzyskano zgodę odpowiednich władz na prowadzenie określonych badań.

Pracę zrealizowano w ramach międzyuczelnianego projektu badawczego pt. „Choroba zwyrodnieniowa stawów biodrowych (koksartroza) w aspekcie zmian składu chemicznego oraz konfiguracji przestrzennej kolagenu badanej tkanki kostnej pacjentów szpitali ortopedycznych miasta Poznania” nr 501-03-01125184-044-01.

V. METODY

Metody oceny stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych przeprowadzono na podstawie zdjęć radiologicznych, z wykorzystaniem standardowo wykorzystywanych klasyfikacji oraz zaproponowanej klasyfikacji własnej. W prezentowanej pracy bezpośrednim badaniom poddane były preparaty tkanki kostnej pobrane od pacjentów z różnym nasileniem choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych. Pobranie kilku próbek kostnych z każdej amputowanej głowy kości udowej 35 pacjentów, wymagało opracowania metody ich pobierania, a następnie, metody preparatyki pobranego materiału kostnego do badań w mikroskopie elektronowym skaningowym i transmisyjnym.

Najbardziej skomplikowane i czasochłonne były przygotowania do badań materiału kostnego metodą mikrospetrokopii ramanowskiej. Podjęcie takich badań wymagało, bowiem najpierw dokonania wstępnej oceny tkanki kostnej w mikroskopie elektronowym, a następnie przystosowania analizy widma Ramana do charakterystyki jakościowej i ilościowej tkanki kostnej. Przed podjęciem zasadniczych badań podjęto próbę opracowania metody wykorzystania widma Ramana do oceny parametrów określających jakość kości. Otrzymane wyniki wstępne z badań pilotażowych przeprowadzonych w 2009 roku, poddano analizie statystycznej i na tej podstawie oraz uwzględniając aktualne doniesienia z zakresu literatury przedmiotu, uzyskano wiarygodne potwierdzenie możliwości zastosowania techniki spektroskopii Ramana do oceny tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym. Analizowano zmiany wartości trzech cech: (1) wskaźnika mineralizacji, (2) wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (3) wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu.

Wyniki z zasadniczych badań, przeprowadzonych metodą mikrospetrokopii Ramana, poddano analizie statystycznej, w celu uzyskania prawidłowych uogólnień i weryfikacji postawionych hipotez badawczych.

1. Metoda klasyfikacja radiologicznej

Istotnym elementem rozpoczynającym całą procedurę badawczą było dokonanie precyzyjnej oceny struktur okolicy stawu biodrowego na podstawie zdjęć rentgenowskich, która była wykonywana przez tego samego badacza (doświadczonego lekarza ortopedę) w odniesieniu do skal określających stan zaawansowania ChZS biodrowego według dwóch najczęściej stosowanych klasyfikacji. Jednak klasyfikacja wg Kellgren'a i Lawrence'a [1957] nie daje możliwości jednoznacznej oceny stopnia nasilenia choroby w badaniach długofalowych, a konieczność istnienia w obrazie radiologicznym osteofitów przy wzroście ciężkości ChZS biodrowych, utrudnia jednoznaczną ocenę radiogramów wg klasyfikacji Kellgren'a i Lawrence'a [Sun i wsp. 1997]. Na przykład wg tej klasyfikacji stopień 2° można zastosować wyłącznie pod warunkiem obecności osteofitów. Zastosowanie wyższego stopnia zaawansowania ChZS biodrowych bez obecnych osteofitów nie jest możliwe. Inną niedoskonałością całościowej klasyfikacji K&L jest brak możliwości osobnej oceny poszczególnych cech radiologicznych.

Niedoskonałości klasyfikacji K&L doprowadziły do powstania innych skal radiologicznych. Stąd też, obecnie coraz częściej używa się klasyfikacji zaproponowanej przez Croft'a i Lane'a która oparta jest na pomiarze minimalnej szerokości szpary stawu (SzSzS) [Dieppe 1995] i została również wykorzystana w niniejszych badaniach. Zastosowanie klasyfikacji Crofta i Lane'a (C&L), wymaga, więc dokonania pomiaru minimalnej szerokości szpary stawu biodrowego. Pomiar ten był mierzony, zawsze przez tego samego badacza, w miejscu największego przewężenia szpary stawu, przy użyciu skalowanego z dokładnością do 0,1 mm szkła powiększającego. Dodatkowo, w celu kalibracji i możliwości odtworzenia na podstawie zdjęć radiologicznych rzeczywistych wymiarów analizowanych struktur, wynik każdego pomiaru był porównany z mierzoną śródoperacyjnie rzeczywistą średnicą usuwanej głowy kości udowej danego pacjenta.

Ze względu na to, że żadna z dwóch zastosowanych klasyfikacji nie wyczerpuje w pełni znamion ChZS biodrowych w różnych jej stadiach, na użytek niniejszej rozprawy opracowano własną klasyfikację radiologiczną do oceny stopnia zaawansowania ChZS biodrowych (Tab. 4), która powstała z połączenia dwóch omówionych powyżej, powszechnie uznawanych i stosowanych klasyfikacji radiologicznych.

Tab. 4 Własna klasyfikacja radiologiczna choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, powstała z połączenia dwóch klasyfikacji K&L i C&L.

Klasyfikacja		wg Kellgren'a i Lawrence'a				
		0	I	II	III	IV
wg Croft'a i Lane'a	0	0°	0°			
	1		I°	II°		
	2			III°	IV°	
	3				V°	VI°

W zaproponowanej klasyfikacji własnej, stopień zerowy, czyli brak zmian sugerujących ChZS biodrowego, odpowiada stopniom zerowemu zarówno wg K&L jak i zerowemu w C&L. Podobnie stopień I, natomiast stopień II odpowiada II w K&L, ale tylko I° w C&L. Stopień III odpowiada drugiemu stopniowi w obydwu skalach pierwotnych, natomiast IV odpowiednio III i 2° w klasyfikacji K&L i C&L. V stopień klasyfikacji własnej odpowiada trzeciemu stopniowi w obydwu wyjściowych klasyfikacjach. Stopień VI odpowiada najwyższemu stopniowi w obydwu skalach tzn. IV w K&L i 3° w C&L.

Stworzenie, jak się wydaje nieco dokładniejszej klasyfikacji własnej (Tab. 5), w której wyróżniono 6 stopni nasilenia ChZS biodrowych, wynikało z przedstawionych niedoskonałości obu wcześniejszych szeroko stosowanych klasyfikacji, a także ze względu na prawdopodobną możliwość uchwycenia drobniejszych zmian ujawnionych w związku z zastosowaniem wysoce specjalistycznych i bardzo precyzyjnych metod analizy zmian tkanki kostnej na poziomie struktur chemicznych.

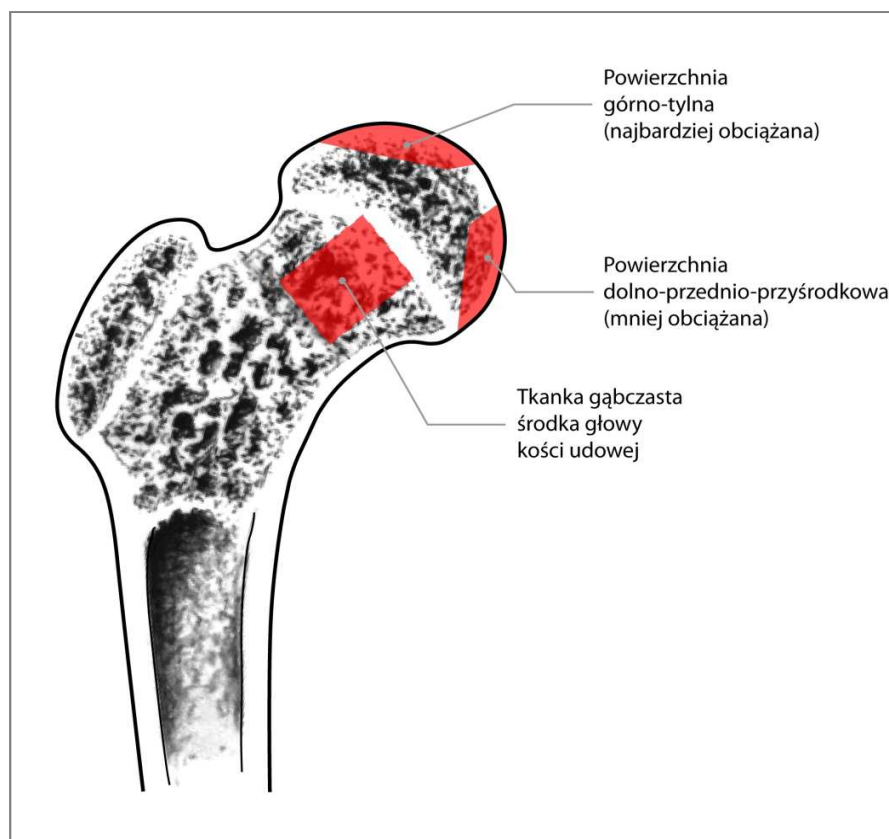
Tab. 5 Skala zaawansowania zmian radiologicznych w ChZS biodrowych według własnej klasyfikacji siedmiostopniowej.

Grupa	Stopień zaawansowania ChZS stawu	Minimalna szerokość szpary stawu (SzSzS)	Opis zmian
0	norma	SzSzS \geq 3mm	brak zmian radiologicznych ChZS, szerokość szpary stawu w normie
I	minimalny	3mm > SzSzS \geq 2,5mm	minimalne zwężenie szpary stawowej, możliwość występowania osteofitów
II	łagodny	3mm > SzSzS \geq 2,5mm	lekkie zwężenie szpary stawowej, obecne osteofity
III	umiarkowany	2,5mm > SzSzS \geq 1,5mm	umiarkowane zwężenie szpary stawowej, obecne osteofity
IV	średnio zaawansowany	2,5mm > SzSzS \geq 1,5mm	umiarkowane zwężenie szpary stawowej, liczne wyraźne osteofity, umiarkowana sklerotyzacja podchrzęstna, możliwa deformacja nasad
V	zaawansowany	SzSzS < 1,5mm	zaawansowane zwężenie szpary stawowej, liczne wyraźne osteofity, umiarkowana sklerotyzacja podchrzęstna, obecność torbieli podchrzęstnych, możliwa deformacja nasad
VI	bardzo zaawansowany	SzSzS < 1,5mm	zaawansowane zwężenie szpary stawowej, duże osteofity, znaczna sklerotyzacja podchrzęstna, obecność torbieli podchrzęstnych, cechy protruzji panewki, wyraźna deformacja nasad

W dalszej części badań posługiwano się opisaną powyżej (Tab. 5) własną siedmiostopniową klasyfikacją, określającą brak (0) lub odpowiednio wyższy (I-VI) stopień zaawansowania ChZS biodrowego.

2 Metody pobierania i przygotowania próbek do dalszych badań

Od każdego pacjenta pobrano pięć próbek, z których dwie pochodziły z najbardziej obciążonych miejsc, kolejne dwie z mniej obciążonych miejsc głowy kości udowej do głębokości 1 cm od powierzchni stawowej chrząstki oraz jedna z okolicy części środkowej głowy kości udowej (Ryc. 8). W warstwie powierzchniowej głowy kości udowej rozróżniono dwa obszary pomiarowe: tj. obszar kości podchrzęstnej najbardziej obciążony oraz obszar mniej obciążony [Wright i wsp. 2001]. W każdym w tych obszarów analizowano zarówno warstwę podchrzęstną jak i kość gąbczastą. Dodatkowo badano warstwę głęboką kości gąbczastej (piąta próbka uzyskana od tego samego pacjenta) z okolicy środka głowy kości udowej, pobraną z głębokości 2-4 cm.



Rys. 8 Miejsca pobrania materiału kostno-chrzęstnego z głowy kości udowej.

3. Metody mikroskopowe

Badania struktury na poziomie tkankowym, komórkowym i struktury chemicznej próbek kostnych pobranych z różnie obciążonych miejsc warstwy podchrzęstnej i gąbczastej głowy kości udowej, przeprowadzono z użyciem mikroskopu elektronowego skaningowego (SEM) i transmisyjnego oraz w mikrospektroskopii Ramana.

3.1 Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie skaningowym (SEM)

Wybrane próbki pobrane śródoperacyjnie, z miejsc jak opisano uprzednio, utrwalano w 4% formalinie. Tkanki odwadniano w szeregu etanolu o wzrastającym stężeniu od 70 % do 100%. Po odwadnianiu w alkoholach przeprowadzono je przez roztwory acetonu (90%-100%). Następnym etapem było suszenie próbek w aparacie do suszenia w punkcie krytycznym z użyciem dwutlenku węgla, a następnie montowano je na stolikach, pokrytych dwustronną folią węglową. Próbki orientowano w taki sposób, by widoczna była powierzchnia stawowa oraz przekroje chrząstki stawowej z beleczkami kostnymi podchrzęstnymi. Przed obserwacjami mikroskopowymi, próbki pokrywane były przez napylenie próżniowe warstwą złota o grubości ok. 20 nm (Fot. 1). Obserwacje przeprowadzono w skaningowym mikroskopie elektronowym firmy ZEISS przy napięciu przyspieszającym od 10 do 15 kV.



Fot. 1 Próbki kości przygotowane do oceny w elektronowym mikroskopie skaningowym

Skaningowy mikroskop elektronowy (SEM) umożliwia obserwację trójwymiarową powierzchni badanych komórek i tkanek. Mikrofotografie skrawków eponowych pozwoliły określić budowę tkanki kostnej (zbitej i beleczkowatej), degenerację chrząstki oraz topografię włókien kolagenowych.

3.2 Przygotowanie materiału do badań w mikroskopie transmisyjnym (TEM)

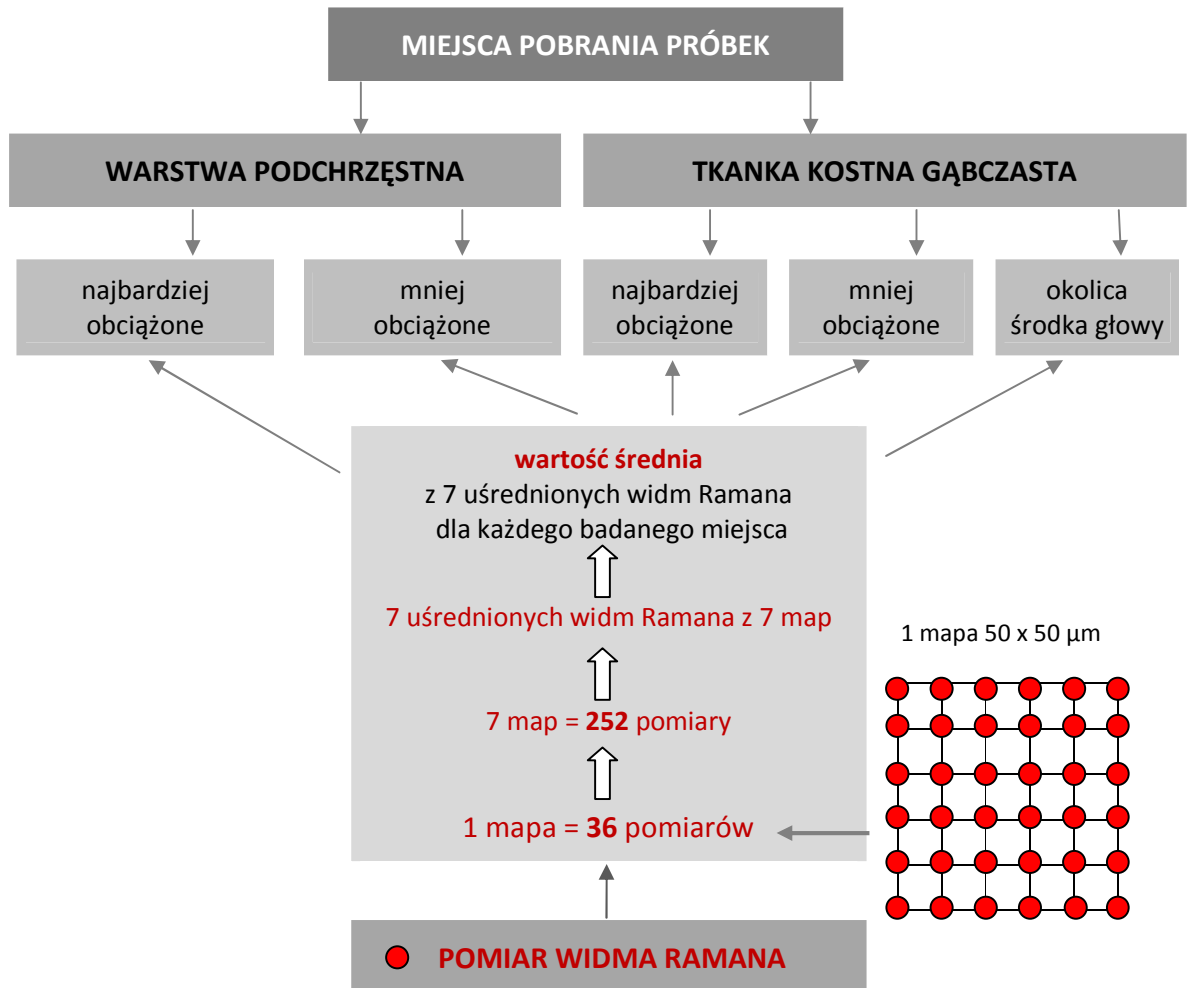
Wybrane próbki pobrane śródoperacyjnie, z miejsc opisanych powyżej, utrwalano w 2.5% aldehydzie glutarowym w buforze kakodylanowym, a następnie utrwalano w 1% czterotlenku osmu w buforze kakodylanowym. Tkanki odwadniano w szeregu etanoli o wzrastającym stężeniu od 70 % do 100%. Po odwodnieniu w alkoholach, kolejno poddawano je imersji w serii acetonów i tlenku propylenu. Tkanki zatapiano w żywicy EPON 812. Kolejno wykonano skrawki półcienkie i ultra cienkie. Skrawki ultra cienkie kontrastowano 9% octanem uranylu i 0.5% cytrynianem ołowiu. Obserwacje przeprowadzono w transmisyjnym mikroskopie elektronowym, model JEM 1200EX II.

4. Metoda spektroskopii Ramana

Próbki kostne, pobrane od każdego pacjenta z pięciu różnie obciążonych obszarów amputowanych głów kości udowych, poddawano wielokrotnemu płukaniu w roztworze soli fizjologicznej, w celu usunięcia resztek krwi. Po wysuszeniu poszczególne próbki przechowywano w temperaturze około 4°C. Próbki poddawano analizie w układzie do badań ramanowskiego rozpraszania światła w temperaturze pokojowej.

Widma Ramana tkanki kostnej uzyskano w obszarze spektralnym 200 - 1800 cm^{-1} . Pomiary widm Ramana dla każdej próbki wykonano na powierzchni 50 x 50 μm^2 , z krokiem 10 μm , w różnych miejscach warstwy podchrzęstnej kości oraz tkanki kostnej gąbczastej (bezpośrednio pod warstwą podchrzęstną oraz ze środka głowy kości udowej). W każdym z tych obszarów dokonano pomiaru siedmiu map widm Ramana z wybranych losowo miejsc. Pojedyncze, uśrednione widmo z danego obszaru otrzymano z sumy wszystkich widm z jednej mapy widm ramanowskich. Na podstawie siedmiu widm oceniono skład chemiczny i strukturę przestrzenną kolagenu badanego obszaru tkanki

kostnej, jako średnia wartość z tych widm. Schemat uzyskiwania widm z próbek pobranych w różnych miejscach obciążenia głowy kości udowej przedstawiono na rycinie 9.



Ryc. 9 Ilości wykonanych pomiarów widm Ramana wg miejsca pobrania tkanki.

Dla wszystkich próbek pobranych z najbardziej i mniej obciążonych miejsc w warstwie podchrzęstnej oraz tkance kostnej gąbczastej, a także dla próbki z okolicy środka głowy kości udowej wykonano po 36 pomiarów widma Ramana na 7 mapach, każda o wymiarach 50x50 μm. Z uśrednionych wartości widm Ramana z każdej z 7 map wyliczono wartość średnią dla każdej próbki. Ostatecznie dla uzyskania jednej średniej wartości danej cechy wykonano 252 pomiary widm.

5. Analizy statystyczne

Uzyskane wyniki z analizy pobranego materiału kostnego metodą mikrospektroskopii ramanowskiej poddano analizie statystycznej. Obliczono wartości średnie trzech analizowanych wskaźników w normie i w sześciu grupach zaawansowania ChZS biodrowych oraz wartości minimalne i maksymalne, a także odchylenia standardowe i współczynniki zmienności. Rozkłady badanych cech poddano analizie statystycznej za pomocą testu Kołmogorova-Smirnova, który potwierdził zgodność wyników próbek z rozkładem normalnym (krzywą Gaussa). Następnie przeprowadzono analizę wariancji ANOVA. Istotność różnic międzygrupowych i między miejscami o różnym poziomie obciążenia głowy kości udowej oceniano testami t-Studenta, Friedman'a i Dunn'a. Do oceny wielokrotnych porównań wartości średnich zastosowano test Tukeya-Kramera. Poziom istotności ustalono na $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne zostały wykonane w Katedrze Spektroskopii Optycznej Politechniki Poznańskiej oraz w Zakładzie Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej Uniwersytetu Medycznego im. K. Marcinkowskiego w Poznaniu. Do analiz wykorzystano oprogramowanie GraphPad InStat.

VI. WYNIKI

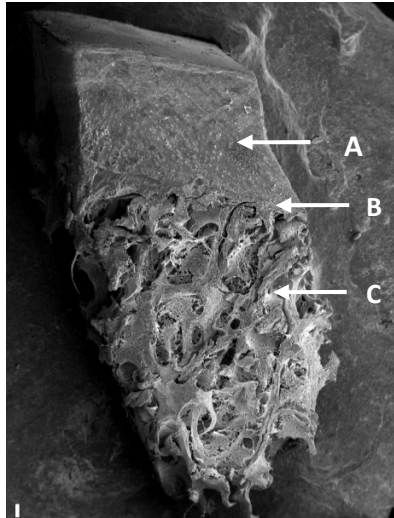
Proporcja płci badanych pacjentów odzwierciedlała tendencję panującą w populacji osób poddanych zabiegom endoprotezoplastyki i wynosiła około 2:3. W grupie osób, u których nie stwierdzono zmian zwyrodnieniowych znalazły się trzy kobiety i dwóch mężczyzn natomiast wśród osób z oznakami ChZS biodrowych 21 kobiet i 9 mężczyzn. Średni wiek pacjentów ChZS ze zmianami zwyrodnieniowymi w obrazie radiologicznym wynosił 67,94 (+/- 11,39), przy czym kobiety były przeciętnie starsze od mężczyzn o ponad 10 lat, bowiem średnia wieku badanych mężczyzn wynosiła 61, 78 (+/- 8,61), natomiast kobiet – 72,33 (+/- 11,29) lata. Struktura wieku badanych pacjentów według stopnia zaawansowania ChZS biodrowych nie wykazywała zróżnicowania. Średnie wieku w trzech wstępnie wyróżnionych grupach: (1) zmiany łagodne (I+II stopień wg klasyfikacji własnej), (2) zmiany umiarkowane (III+IV) i (3) zmiany zaawansowane (V+VI) wynosiły odpowiednio 69,9 (+/-12,87), 69,6 (+/- 12,95) i 68,0 (+/-9,09) lat. Średni wiek osób, u których nie stwierdzono oznak ChZS biodrowych był przeciętnie niższy, bowiem wahał się w granicach 46-61 lat. Szczegółowe obliczenia statystyczne przeprowadzono kładąc główny nacisk na zasadniczy cel prezentowanej pracy, jakim było uchwycenie ewentualnych różnic wielkości trzech ramanowskich miar, określających jakość kości: wskaźnika mineralizacji wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu i wskaźnika hydroksyapatytu/węglanoapatytu, w zależności od nasilenia zmian zwyrodnieniowych w obrazie radiologicznym. Dalsze analizy wykonane zostały wyłącznie z uwzględnieniem głównego kryterium podziału materiału, a mianowicie stopnia zaawansowania ChZS biodrowych, niezależnie od płci badanych pacjentów.

1. Zmiany chrzęstno-kostne w mikroskopie elektronowym

Badania tkanki chrzęstno-kostnej przy użyciu mikroskopii elektronowej pozwoliły na poszerzenie wiedzy o budowie i zmianach zachodzących w poszczególnych elementach tworzących jej strukturę architektoniczną. Obserwacja tkanek w mikroskopie elektronowym z wykorzystaniem obrazowania w trybie SE (*secondary electron mode*) ujawniła trójwymiarową strukturę warstwy chrzęstnej oraz znajdujących się poniżej warstwy podchrzęstnej i kości gąbczastej. Analizie poddano próbki pobrane z głów kości udowych zarówno osób zdrowych jak i z ChZS biodrowych. Obrazy uzyskane z mikroskopu elektronowego pozwoliły na opis ultrastruktury elementów chrząstki, topografię sieci włókien kolagenowych oraz charakterystykę kondycji komórek chrzęstnych. Różnice w budowie warstwy podchrzęstnej między kością zdrową i ze zmianami zwyrodnieniowymi uwiarydociły się, jako wzmożona porowatość beleczek kostnych oraz zniszczenie i nadłamania w obrębie tkanki gąbczastej. Na przedstawionych niżej elektronogramach zaobserwować można cechy mikrostrukturalne o charakterze chondromalacji i degeneracji obszarów podchrzęstnych wraz ze zniszczeniem sieci beleczek kości gąbczastej w następstwie zaawansowanej artrozy.

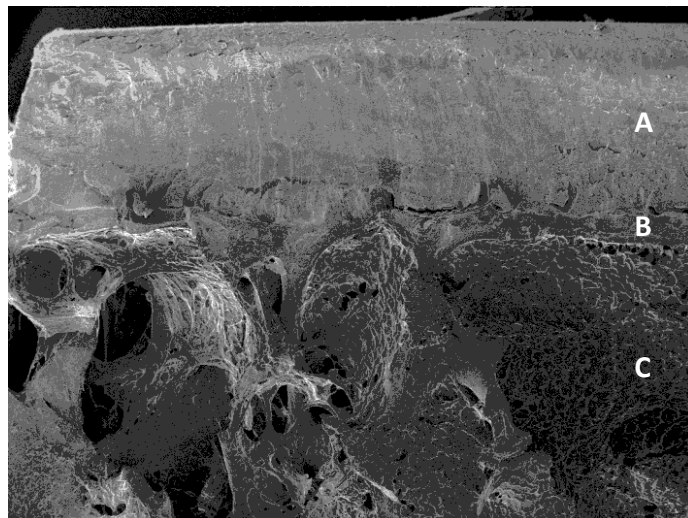
1.1 Wizualizacja tkanek głowy kości udowej u osób zdrowych

Analiza próbek z najbardziej i mniej obciążanych miejsc głowy kości udowej od osób z grupy zerowej (wg własnej klasyfikacji ChZS biodrowych) nie wykazała różnic. Na Fot. 2 przedstawiono przekrój poprzeczny wycinka głowy kości udowej, na którym widoczne są: chrząstka szklista, warstwa podchrzęstna i tkanka gąbczasta.



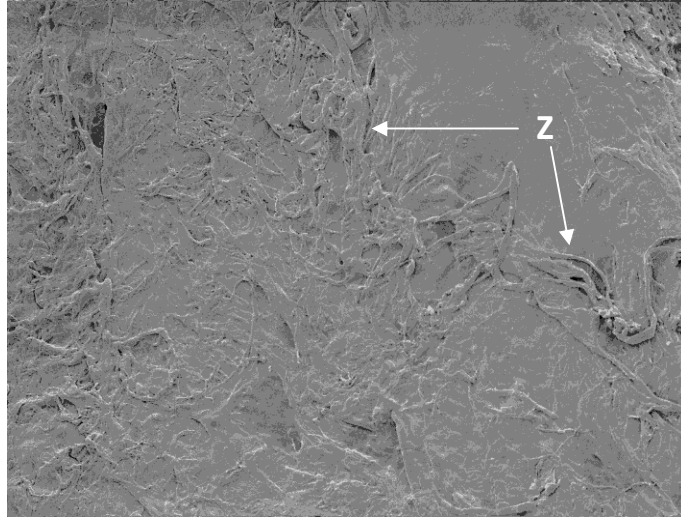
Fot. 2 Wycinek chrzęstno-kostny pobrany z głowy kości udowej osoby zdrowej. A – chrząstka szklista, B – warstwa podchrzęstna, C – tkanka gąbczasta.

Kość gąbczasta ma układ regularnych beleczek odchodzących arkadowo od chrząstki stawowej. Warstwa podchrzęstna kości, tworząca struktury osteonopodobne, znajduje się między poniżej leżącą kością gąbczastą, a chrząstką szklistą stawową (Fot. 3).

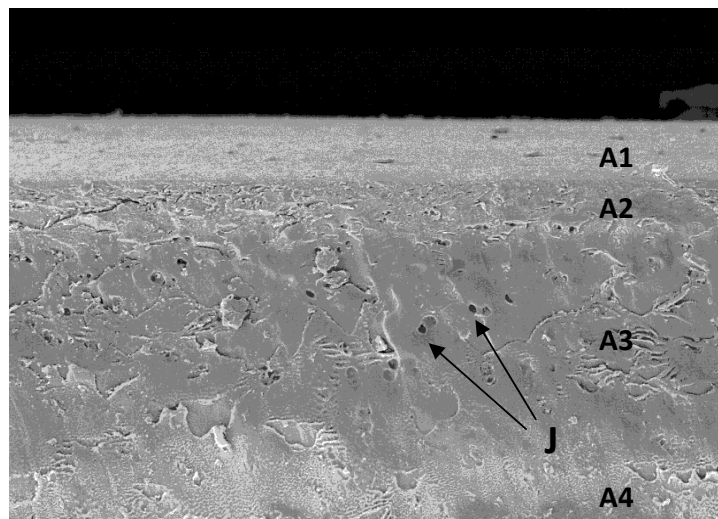


Fot. 3 Przekrój poprzeczny przez: A – chrząstkę stawową, B – warstwę podchrzęstną i C – kość gąbczastą. (SEM powiększ. x 43)

Powierzchnia chrząstki szklistej jest strukturą ciągłą, z typowymi złuszczeniami, które są wynikiem funkcji mechanicznej stawu biodrowego (Fot. 4).



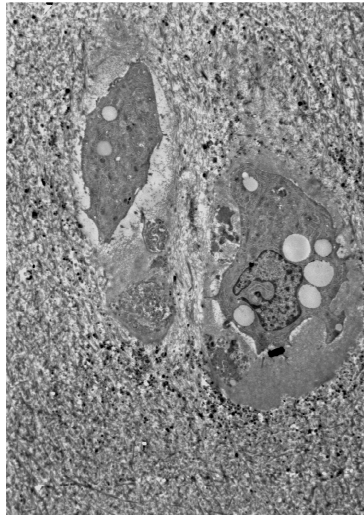
Fot. 4 Powierzchnia chrząstki stawowej z widocznymi Z – złuszczeniami. (SEM, powiększ. x 83)



Fot. 5 Przekrój chrząstki z widocznymi regularnie ułożonymi jamkami chrzęstnymi. A1 – warstwa przypowierzchniowa, A2 – warstwa pośrednia, A3 – warstwa głęboka, A4 – warstwa zmineralizowana, J – jamki chondrocytów (SEM powiększ. x 142)

Na zdjęciach, przedstawiających preparaty chrząstki stawowej osób bez radiologicznych oznak ChZS biodrowych, zaobserwowano typowy układ trójwarstwowy obejmujący: płaską warstwę przypowierzchniową, warstwę pośrednią oraz warstwę głęboką. W warstwie głębokiej chrząstki stawowej widoczne są liczne jamki chondrocytów. W chrząstce wyróżnia się ponadto czwartą warstwę „przejściową”, której najgłębsza warstwa, częściowo zwapniała, zwana warstwą zmineralizowaną chrząstki, jest ściśle związana z warstwą podchrzęstną kości (Fot.5).

W warstwie głębokiej chrząstki stawowej na obrazach otrzymanych z mikroskopu transmisyjnego uwidoczniły się: typowe chondrocyty i substancja pozakomórkowa z włóknkami kolagenowymi (Fot. 6).



Fot. 6 Elektonogram chondrocytu i substancji pozakomórkowej z włóknkami kolagenowymi w części głębokiej chrząstki. (TEM, powiększ. x 2000)

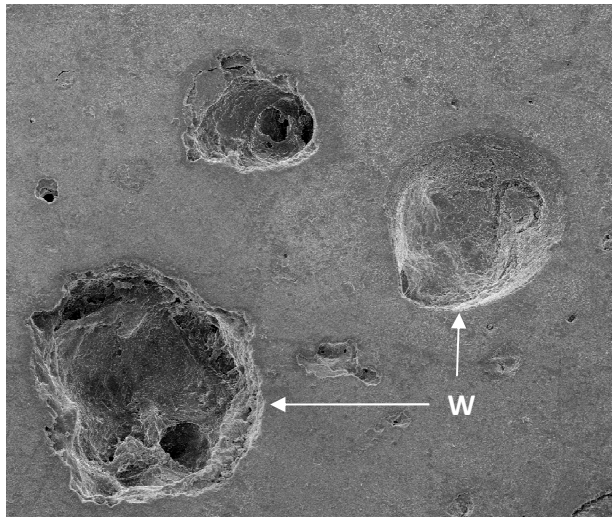
1.2 Wizualizacja tkanek głowy kości udowej pacjentów z ChZS biodrowego.

W zależności od stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej zaobserwowano zmiany w strukturze chrząstno-kostnej polegające na: (1) degradacji układu typowych warstw chrząstki szklistej (2) zmianach w układzie włókien kolagenowych charakteryzujących się rozszczepieniem kompaktowo ułożonych pęczków

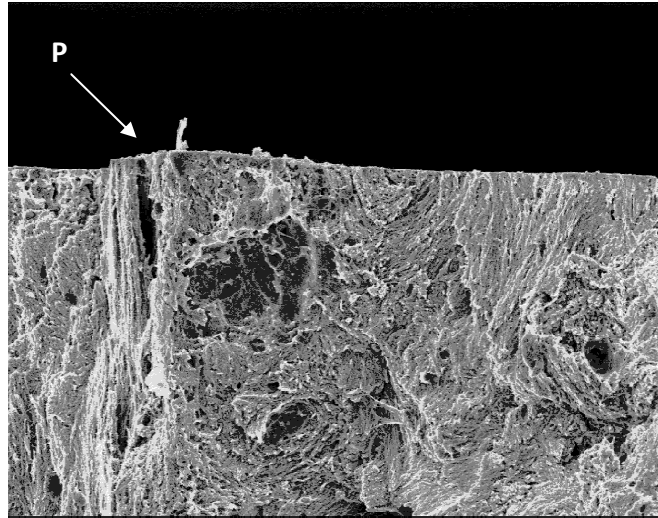
(3) pogrubieniu warstwy podchrzęstnej kości (4) obecności licznych otworów na powierzchni beleczek tej warstwy oraz (5) zniszczeniu struktury architektonicznej sieci beleczek kości gąbczastej. Przeprowadzono oddzielną analizę obrazów mikroskopowych struktur chrzęstno-kostnych dla mniej i bardziej zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych.

Obraz mniej nasilonych zmian zwyrodnieniowych

Chrzątka pobrana z głowy kości udowej z miejsc najbardziej obciążanych wykazywała na swej powierzchni obecność niewielkich wgłębień (kawern), widocznych na Fot. 7, oraz pęknięć (Fot. 8).

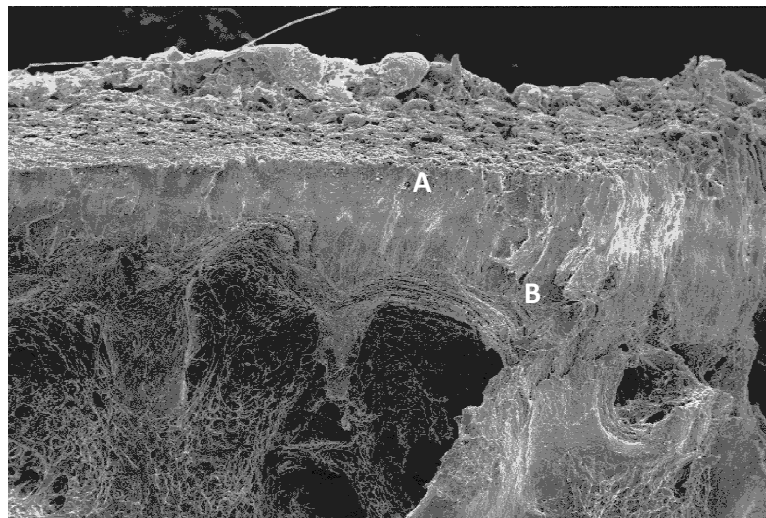


Fot. 7 ·Powierzchnia chrząstki stawowej z zagłębieniami: W – wgłębienia (kawerny).
(SEM powiększ. X 89).



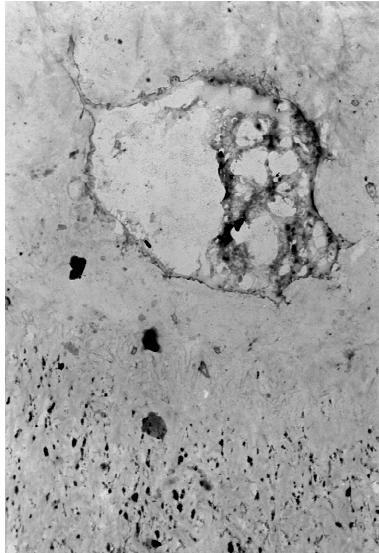
Fot. 8 Pęknięcia w warstwie przypowierzchniowej chrząstki szklistej: P - pęknięcie (SEM, powiększ. x 371.)

Grubość warstwy chrzęstnej uległa zmniejszeniu, przy zachowaniu wyraźnej warstwy włóknistej przy obszarze podchrzęstnym. Zauważyć można, że zarówno w warstwie podchrzęstnej jak i w kości gąbczastej jest więcej „kości w kości”, o czym mogą świadczyć grubsze beleczki kostne, tworzące bardziej gęstą sieć przestrzenną (Fot. 9).



Fot. 9 Przekrój zredukowanej chrząstki opierającej się na arkadach beleczek kostnych (SEM) powiększ. x 43. A – chrząstka szklista B – warstwa podchrzęstna

Na obrazach wykonanych techniką mikroskopii elektronowej transmisyjnej, zaobserwowano liczne zdegenerowane chondrocyty w warstwie głębokiej chrząstki stawowej (Fot. 10).



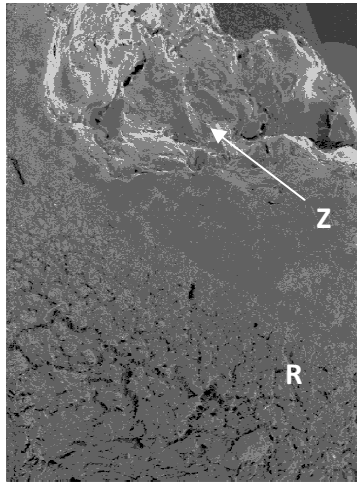
Fot. 10 Elektonogram zdegenerowanego chondrocytu w warstwie przylegającej do obszaru podchrzęstnego. (TEM, powiększ. x 2000)

Obraz zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych

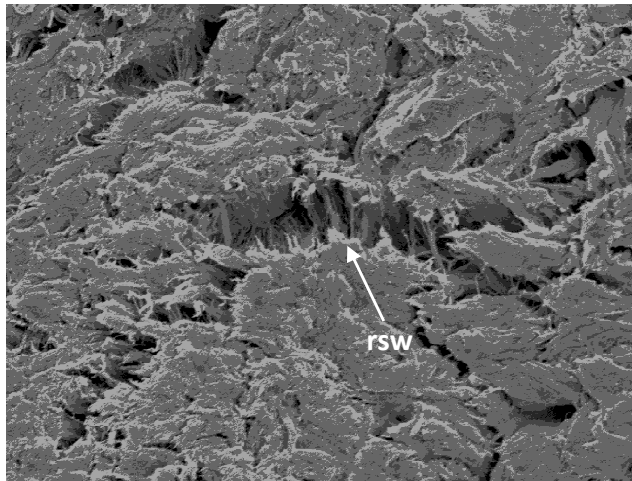
W próbach pochodzących od pacjentów z zaawansowanymi zmianami zwyrodnieniowymi stawów biodrowych stwierdzono różnice w strukturze tkanek w zależności od miejsca pobrania preparatu. Próbki z miejsc mniej obciążanych (poniżej podpunkt A) charakteryzują się częściowym zniszczeniem chrząstki, natomiast w miejscach najbardziej obciążonych (podpunkt B) dochodzi do prawie całkowitego wytarcia chrząstki stawowej i odkrycia warstwy kostnej podchrzęstnej, z zauważalnymi strukturami osteonopodobnymi.

A. Zmiany z obszarów mniej obciążanych – z zachowaną chrząstką

W warstwie przypowierzchniowej chrząstki szklistej stwierdzono zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe polegające na powiększaniu się zagłębień w chrząstce, w której dochodzi do oddzielania się płytek zawierających materiał fibrylarny. W warstwach środkowych i bazalnych widoczne są pęknięcia i rozwarstwienia chrząstki (Fot. 11 i 12).

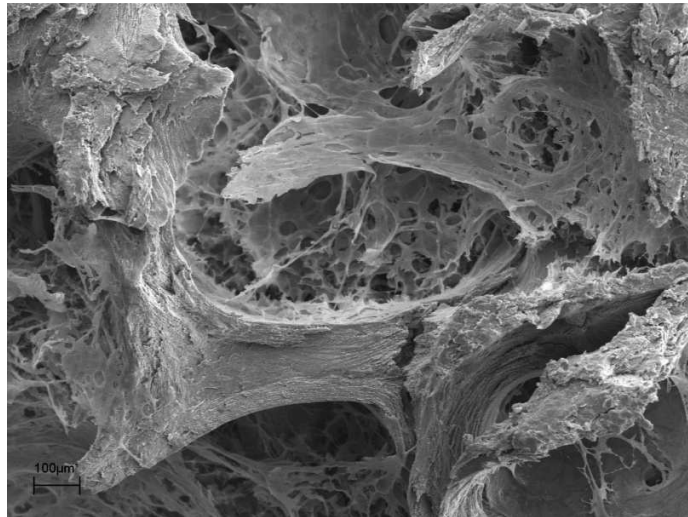


Fot. 11 Przekrój powierzchni głowy kości udowej z licznymi obszernymi zagłębieniami (Z) i rozwłóknioną (R) częścią bazalną chrząstki. (SEM, powiększ. x 33).



Fot. 12 Przekrój chrząstki stawowej, przedstawiający rsw – rozszczepienie struktury włóknistej w części bazalnej chrząstki (SEM powiększ. x 628).

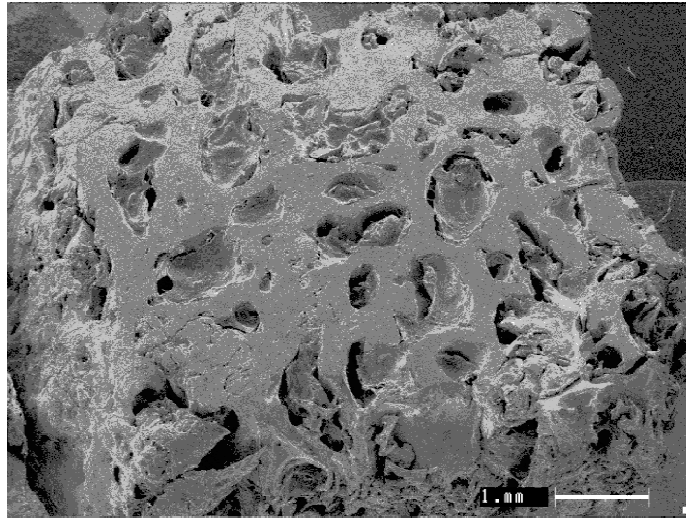
Ponadto powierzchnia beleczek kostnych ma strukturę chropowatą i sprawia wrażenie porowatej (Fot. 13), przy czym średnice większych otworów są wielkości ok. 10-20 μm , która odpowiada wielkości lakuny po osteoblaście tworzącym kość [Boyde i wsp. 1986]



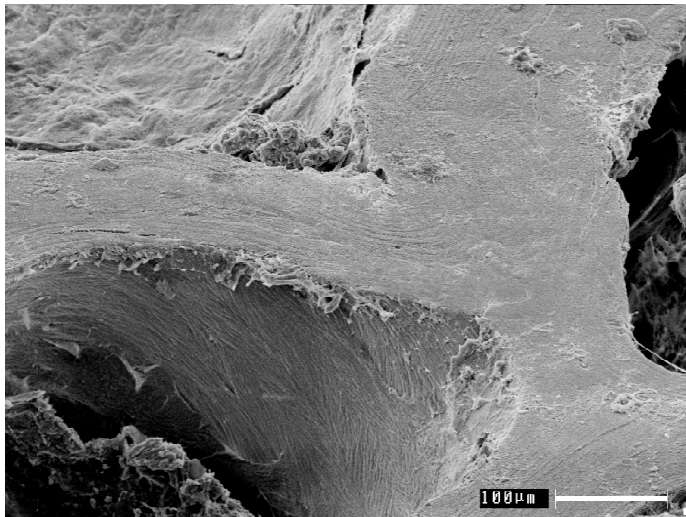
Fot. 13 Obrazowanie struktury tkanki kostnej warstwy podchrzęstnej z zauważalną „porowatością” (SE mode powiększ. x 192).

B. Zmiany z miejsc maksymalnie obciążanych – całkowity brak chrząstki

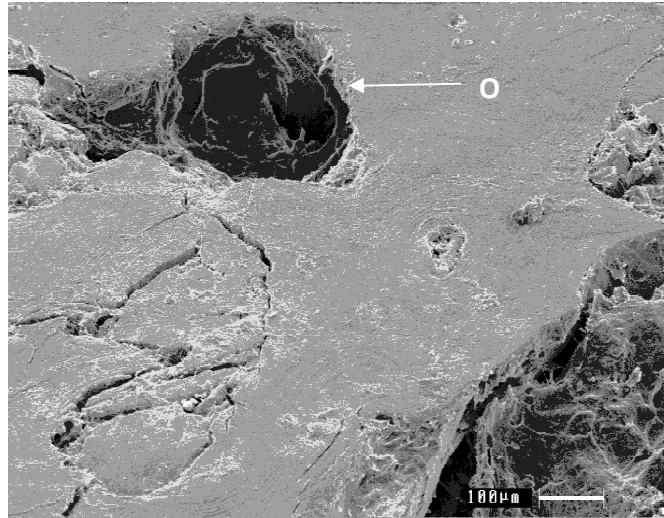
Fotografia 14 przedstawia powierzchnię głowy kości udowej w miejscu najbardziej obciążonym po całkowitym wytarciu chrząstki stawowej. Po zniszczeniu chrząstki szklistej widoczna jest płaska powierzchnia z zarysami osteonów i blaszek kostnych (Fot. 15) oraz popękanych odłamów kostnych utworzonych z beleczek warstwy podchrzęstnej (Fot. 16). Miejscowo stwierdzono także pokruszone fragmenty kostne o wielkości ok. 20 -50 μm .



Fot. 14 Obraz powierzchni głowy kości udowej całkowicie pozbawionej chrząstki szklistej. (SEM, powiększ. x 31).

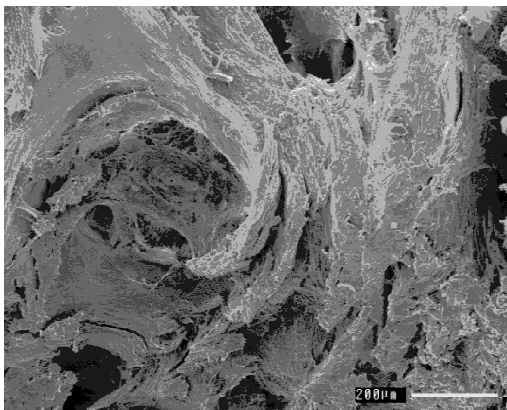


Fot. 15 Struktury osteonopodobne utworzone przez blaszki kostne warstwy podchrzęstnej (SEM – SE mode).

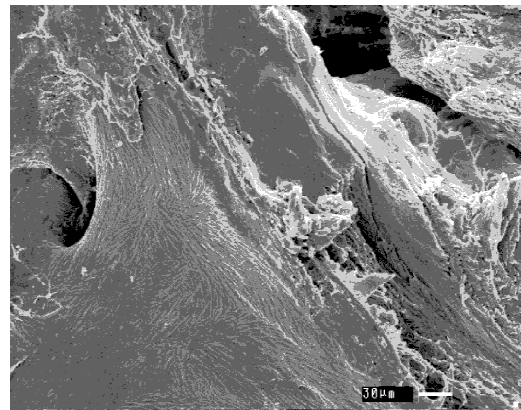


Fot. 16 Obraz powierzchni stawu z widocznym osteonem (O) oraz pokruszonymi odłamami kostnymi beleczek warstwy podchrzęstnej. (SEM, powiększ. x 225)

Na przekrojach poprzecznych obserwowano beleczki kostne, których struktura ulega rozwarstwianiu doprowadzając do oddzielania się części bocznych beleczek (Fot 17 A i B).



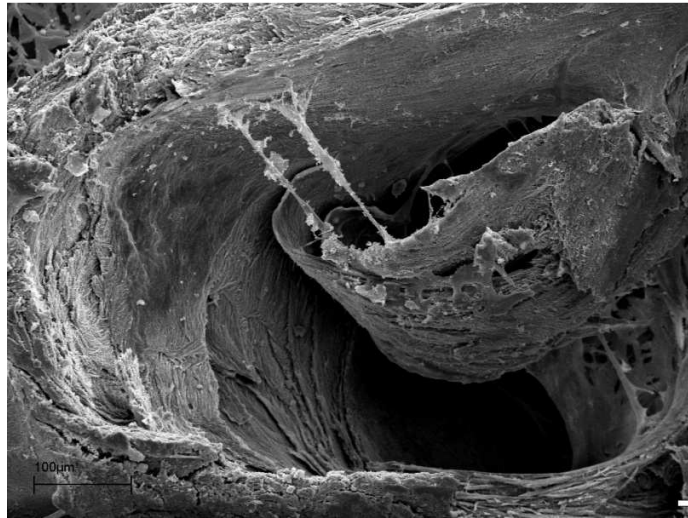
A



B

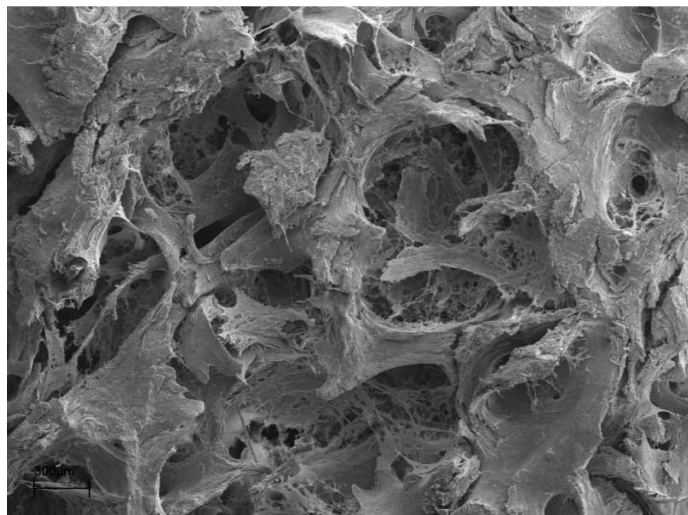
Fot. 17 Powiększenia beleczek kostnych z częściowo zachowanym regularnym układem kolagenu i miejscami rozszczepienia litej blaszki włóknistej. (SEM A – powiększ. x 192, B – powiększ. x 501).

Pojedynczą blaszkę włóknistą warstwy podchrzęstnej powstałą po oddzieleniu się od beleczki kostnej uwidoczniiono na Fot. 18.



Fot. 18 Obraz rozszczerzonej blaszki włóknistej w warstwie podchrzęstnej. (SEM powiększ. x 192).

Pozostałości nietypowego tworzenia tkanki kostnej w postaci mikrobeleczkowych wtrętów wypełniających liczne pory (Fot. 19) są kolejną cechą różniącą warstwę podchrzęstną w ChZS od obrazów tkanki prawidłowej. Pomędzy zniszczonymi beleczkami kostnymi, oprócz nowotworzonej tkanki kostnej, widoczne są otwarte do jamy stawu przestrzenie, wypełnione lipocytami powstałymi po stłuszczeniu szpiku.



Fot. 19. Mikrobeleczkowe wtręty wypełniające liczne pory wraz z lipocytami w tkance kostnej podchrzęstnej.

2. Wskaźnik mineralizacji tkanki kostnej (WMTK)

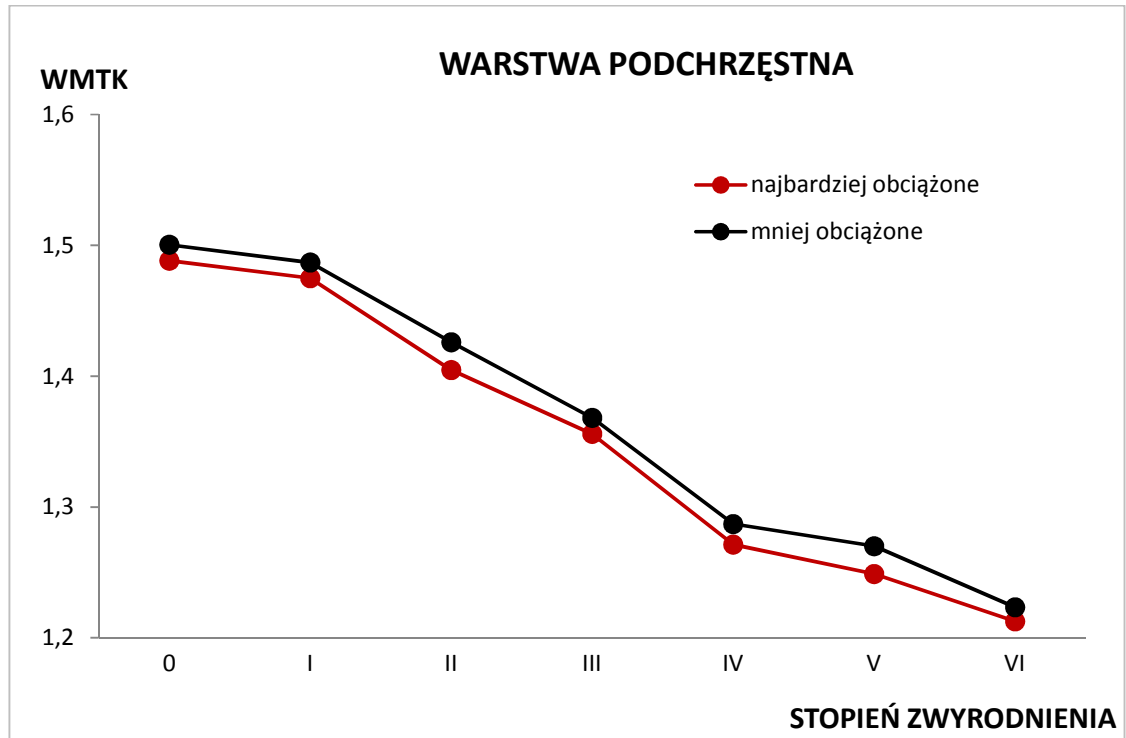
Wskaźnik WMTK, określający proporcję hydroksyapatytu do kolagenu, oceniano w warstwie podchrzęstnej w miejscu maksymalnego obciążenia i w obszarze mniej obciążonym, natomiast w tkance kostnej gąbczastej poza wyżej wymienionymi miejscami dodatkowo z części środkowej głowy kości udowej. Średnie wartości WMTK w warstwie podchrzęstnej kości w siedmiu badanych grupach (0-VI), różniących się stopniem nasilenia choroby zwyrodnieniowej i z uwzględnieniem obszarów pobrania tkanki kostnej przedstawiono w tabeli 6.

Tab. 6. Statystyki opisowe dla wskaźnika mineralizacji w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach (0-VI) zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	1,488	0,055	1,559	1,412	3,67
	Obszar mniej obciążony	1,501	0,049	1,543	1,417	3,29
I	Obszar najbardziej obciążony	1,475	0,009	1,486	1,463	0,62
	Obszar mniej obciążony	1,487	0,013	1,497	1,464	0,90
II	Obszar najbardziej obciążony	1,405	0,035	1,439	1,354	2,47
	Obszar mniej obciążony	1,426	0,021	1,422	1,392	1,45
III	Obszar najbardziej obciążony	1,356	0,033	1,392	1,308	2,45
	Obszar mniej obciążony	1,368	0,041	1,402	1,301	3,01
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,271	0,029	1,318	1,251	2,30
	Obszar mniej obciążony	1,287	0,053	1,345	1,227	4,13
V	Obszar najbardziej obciążony	1,249	0,052	1,302	1,175	4,16
	Obszar mniej obciążony	1,270	0,051	1,323	1,187	4,00
VI	Obszar najbardziej obciążony	1,213	0,041	1,281	1,179	3,37
	Obszar mniej obciążony	1,223	0,034	1,279	1,199	2,75

Wartości średnie wskaźnika mineralizacji pokazują, iż w miejscu maksymalnego obciążenia w warstwie podchrzęstnej u osób ze zwyrodnieniem stawu biodrowego następuje zmniejszenie jego wartości wraz ze wzrostem nasilenia zmian zwyrodnieniowych (grupy 0-VI). We wszystkich siedmiu grupach stwierdzono przeciętnie nieco wyższe

wartości WMTK w miejscach mniej obciążonych tej samej warstwy, przy czym kierunek zmian wraz ze wzrostem zaawansowania zwyrodnienia jest taki sam jak w przypadku miejsc maksymalnie obciążonych (Ryc. 10).



Ryc. 10 Zmiany średnich wartości wskaźnika mineralizacji (WMTK) w grupach o różnym stopniu zaawansowaniu ChZS biodrowych w miejscach najbardziej i mniej obciążonych warstwy podchrzęstnej.

Wartości analizowanego wskaźnika wahały się w granicach od min. 1,175 w grupie V (zaawansowane zmiany ChZS biodrowych) do max 1,559 w grupie 0 (brak oznak ChZS biodrowych). Wartości odchylenia standardowego (SD) dla obydwu obszarów pobrania tkanki kostnej i we wszystkich siedmiu grupach są bardzo małe, co świadczy zarówno o dużej jednorodności badanych prób jak i wysokiej dokładności pomiarów. Ponadto zwraca uwagę fakt, iż miara zróżnicowania rozkładu analizowanego parametru, w postaci współczynnika zmienności (V%), dla wszystkich grup waha się w granicach 0,62% – 4,16%. Wykres na rycinie 1 pokazuje, że minimalne i maksymalne wartości wskaźnika odbiegają od jego wartości średniej w granicach błędu pomiarowego. Analiza wartości

średnich wskaźnika mineralizacji w warstwie podchrzęstnej wykazała, że w świetle testu t-Studenta wartości te dla miejsc najbardziej obciążonych nie różnią się istotnie od wartości dla miejsc mniej obciążonych tej samej warstwy, z wyjątkiem grupy IV i I (Tab. 7).

Tab. 7 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0-VI) i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika mineralizacji (WMTK) w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK MINERALIZACJI. WARSTWA PODCHRZĘSTNA															
GRUPA	UPA	0		I		II		III		IV		V		VI	
		MPP	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1
0	1		ns ¹	ns	ns	<0,05	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns ¹		ns	ns	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I	1	ns	ns		ns ¹	<0,001	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns	ns	ns ¹		<0,001	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
II	1	ns	<0,01	<0,001	<0,001		ns ¹	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	<0,05	<0,001	ns	<0,05	ns ¹		<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
III	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001		ns ¹	ns	ns	<0,001	<0,05	<0,001	<0,001
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns ¹		ns	ns	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001
IV	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns		<0,01 ¹	<0,05	ns	<0,001	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,01 ¹		ns	<0,001	<0,001	<0,05
V	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	ns		<0,05 ¹	ns	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	ns	<0,001	<0,05 ¹		ns	<0,05
VI	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns		ns ¹
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	<0,05	ns	<0,05	ns ¹	

¹ test t-Studenta

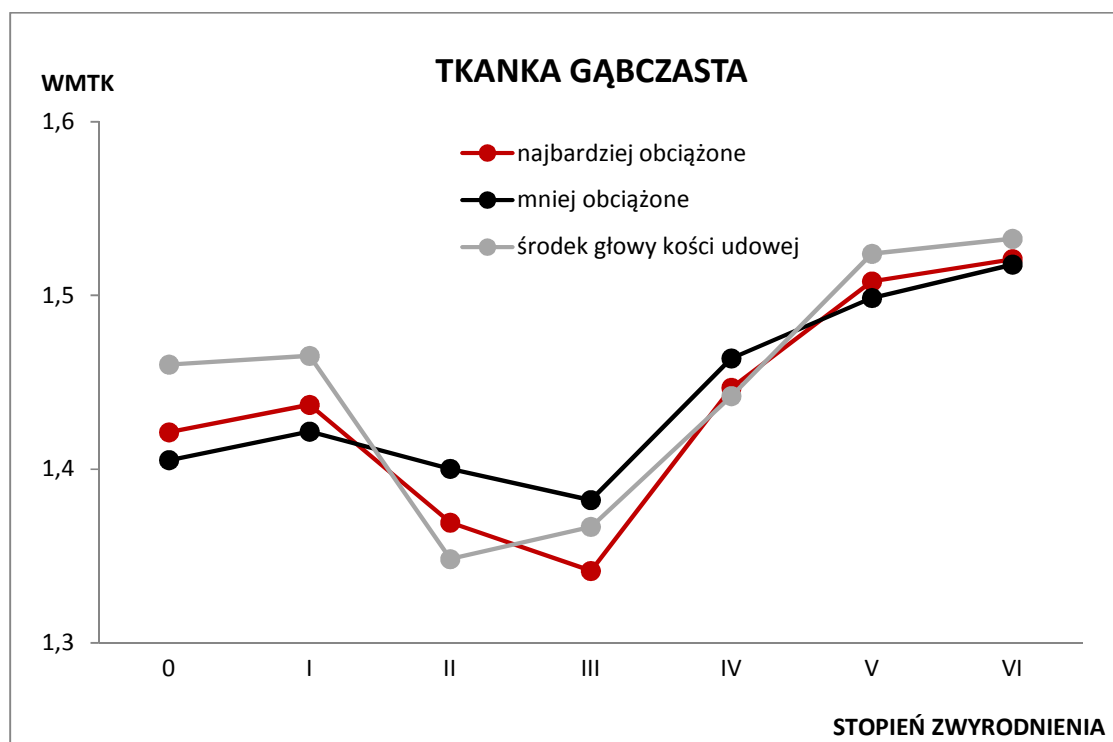
W świetle analizy wariancji i testu Tukeya-Kramera, dla wielokrotnych porównań wartości średnich, różnice WMTK między grupami o różnym stopniu zaawansowania ChZS, prawie we wszystkich przypadkach, są statystycznie wysoce istotne na poziomie $p < 0,001$. Jednak różnice między grupą 0 (bez oznak ChZS) i grupą I (minimalne zmiany zwyrodnieniowe) oraz między grupą III (zmiany łagodne) i IV (zmiany umiarkowane), a także między grupą V (zmiany zaawansowane) i VI (zmiany bardzo zaawansowane) nie osiągnęły wymaganego poziomu istotności $p < 0,05$ (Tab. 7).

Z kolei w tkance gąbczastej średnie wartości wskaźnika mineralizacji nie wykazują statystycznie istotnego zróżnicowania, ani w zależności od miejsca pobrania próbki, ani od stopnia zaawansowania ChZS biodrowych, co potwierdziły wyniki przeprowadzonej analizy wariancji i ocena istotności różnic testem Tukeya-Kramera oraz testami Friedman'a i Dunn'a. Statystyki opisowe dla tkanki gąbczastej przedstawiono w Tab. 8.

Tab. 8 Statystyki opisowe dla wskaźnika mineralizacji w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	1,421	0,232	1,721	1,187	16,30
	Obszar mniej obciążony	1,405	0,274	1,851	1,129	19,53
	Środek głowy kości udowej	1,460	0,150	1,672	1,297	10,25
I	Obszar najbardziej obciążony	1,437	0,043	1,510	1,401	2,99
	Obszar mniej obciążony	1,422	0,036	1,468	1,378	2,54
	Środek głowy kości udowej	1,465	0,037	1,511	1,409	2,52
II	Obszar najbardziej obciążony	1,369	0,046	1,432	1,303	3,37
	Obszar mniej obciążony	1,400	0,059	1,475	1,323	4,22
	Środek głowy kości udowej	1,348	0,058	1,412	1,270	4,32
III	Obszar najbardziej obciążony	1,341	0,059	1,421	1,265	4,41
	Obszar mniej obciążony	1,382	0,054	1,452	1,301	3,92
	Środek głowy kości udowej	1,367	0,056	1,436	1,298	4,21
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,447	0,084	1,536	1,310	5,80
	Obszar mniej obciążony	1,464	0,095	1,591	1,330	6,47
	Środek głowy kości udowej	1,442	0,086	1,541	1,314	5,98
V	Obszar najbardziej obciążony	1,508	0,038	1,558	1,453	2,53
	Obszar mniej obciążony	1,499	0,052	1,589	1,462	3,44
	Środek głowy kości udowej	1,524	0,030	1,562	1,487	1,95
VI	Obszar najbardziej obciążony	1,521	0,032	1,572	1,488	2,10
	Obszar mniej obciążony	1,518	0,017	1,544	1,498	1,12
	Środek głowy kości udowej	1,533	0,025	1,563	1,498	1,66

Na rycinie 11 przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi WMTK w kości gąbczastej. We wszystkich badanych grupach miary rozproszenia są małe, z wyjątkiem grupy 0, w której odchylenie standardowe jest największe, a więc wartość analizowanego wskaźnika w tej grupie wykazuje największy rozrzut (Ryc. 11), na co wskazują również wyższe wielkości współczynnika zmienności sięgające powyżej 19 %.



Ryc. 11 Zmiany średnich wartości wskaźnika mineralizacji (WMTK) w grupach różnego zaawansowania ChZS biodrowych w trzech miejscach pobrania tkanki z warstwy gąbczastej głowy kości udowej.

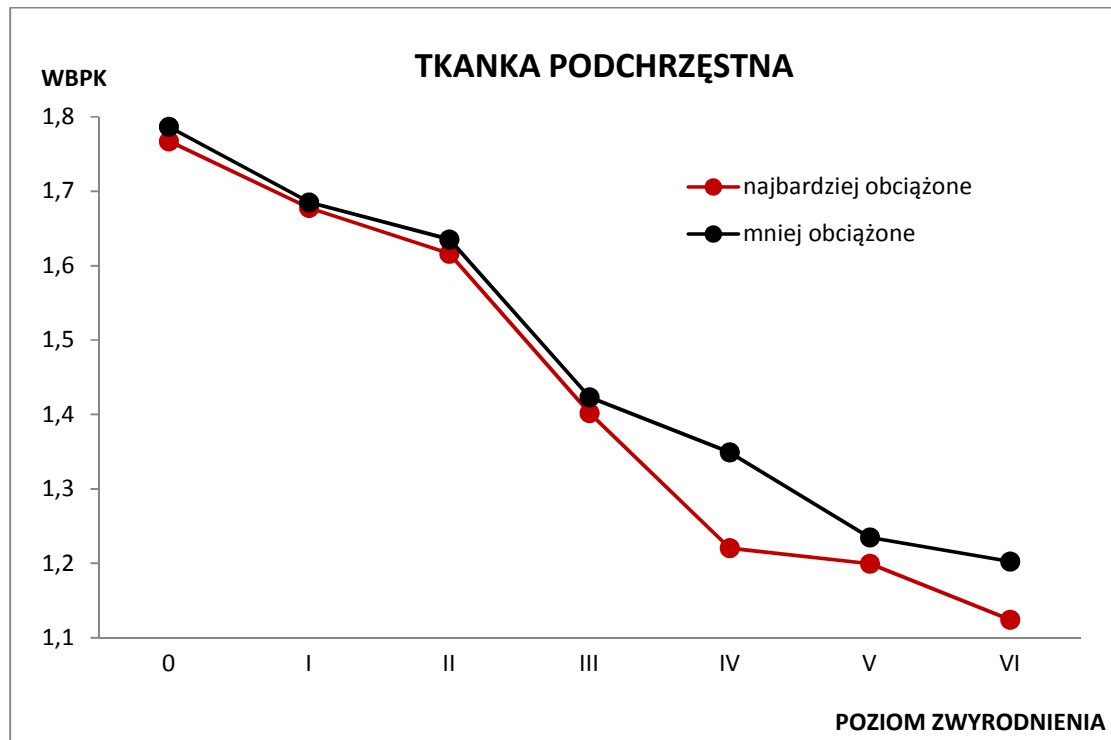
3. Wskaźnik budowy przestrzennej kolagenu (WBPK).

Wartości średnie wskaźnika WBPK, określającego proporcje kolagenu o strukturze helikalnej do kolagenu o nieuporządkowanej strukturze tzw. kłęбка statystycznego, ulegają stopniowemu zmniejszeniu wraz z narastaniem zmian zwyrodnieniowych w siedmiu badanych grupach (0-VI). Niewielkie wartości miar rozproszenia określone poprzez odchylenie standardowe i współczynnik zmienności oraz wartości minimalne i maksymalne wskazują na jednorodność prób (grup) i wysoką powtarzalność pomiarów (Tab. 9).

Tab. 9 Statystyki opisowe dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	1,767	0,141	1,923	1,598	7,95
	Obszar mniej obciążony	1,787	0,107	1,944	1,644	6,01
I	Obszar najbardziej obciążony	1,678	0,121	1,832	1,499	7,18
	Obszar mniej obciążony	1,685	0,134	1,847	1,489	7,95
II	Obszar najbardziej obciążony	1,616	0,156	1,832	1,405	9,65
	Obszar mniej obciążony	1,635	0,128	1,825	1,489	7,81
III	Obszar najbardziej obciążony	1,402	0,085	1,512	1,302	6,04
	Obszar mniej obciążony	1,423	0,076	1,522	1,322	5,32
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,221	0,108	1,353	1,064	8,85
	Obszar mniej obciążony	1,349	0,088	1,429	1,202	6,50
V	Obszar najbardziej obciążony	1,200	0,081	1,328	1,108	6,79
	Obszar mniej obciążony	1,235	0,047	1,307	1,199	3,83
VI	Obszar najbardziej obciążony	1,124	0,073	1,223	1,020	6,45
	Obszar mniej obciążony	1,203	0,066	1,294	1,129	5,45

Spadek wartości średnich WPBK w warstwie podchrzęstnej wraz z narastaniem zmian zwyrodnieniowych dotyczy obszarów głowy kości udowej zarówno najbardziej jak i mniej obciążanych (Ryc. 12).



Ryc. 12 Porównanie zmian wartości WPBK w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w warstwie podchrzęstnej kości z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.

Wartości średnie wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu w warstwie podchrzęstnej kości z miejsc najbardziej obciążonych we wszystkich badanych grupach są mniejsze niż te, otrzymane z warstw mniej obciążanych, przy czym w grupach pacjentów o wyższym stopniu zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, obserwowane różnice między wartościami analizowanego wskaźnika z miejsc o różnym obciążeniu są większe niż u tych w początkowych stadiach choroby (Ryc. 3). Jednak w świetle testu t-Studenta, różnice wielkości WPBK w warstwie podchrzęstnej między miejscami różnie obciążanymi, są nieistotne statystycznie, z wyjątkiem grup III i IV, o

umiarkowanych i średnio zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych w stawach biodrowych (Tab. 10).

Tab. 10 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0-VI) między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika przestrzennej budowy kolagenu (WPBK), w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK BUDOWY PRZESTRZENNEJ KOLAGENU. WARSTWA PODCHRZĘSTNA															
GR R U P A	UPA MPP	0		I		II		III		IV		V		VI	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	1		ns ¹	ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns ¹		ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I	1	ns	ns		ns ¹	ns	ns	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns	ns	ns ¹		ns	ns	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
II	1	ns	ns	ns	ns		ns ¹	ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns	ns	ns	ns	ns ¹		ns	<0,01	ns	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001
III	1	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	ns	ns		<0,05 ¹	ns	ns	ns	ns	<0,01	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,05	<0,01	ns	<0,01	<0,05 ¹		ns	ns	ns	ns	ns	<0,01
IV	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	ns		<0,05 ¹	ns	ns	ns	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	<0,05 ¹		ns	ns	<0,05	ns
V	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	ns	ns	ns	ns		ns ¹	ns	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	ns	ns ¹		ns	ns
VI	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	ns	ns	<0,05	ns	ns		ns ¹
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	<0,01	ns	ns	ns	ns	ns ¹	

¹ test t-Studenta

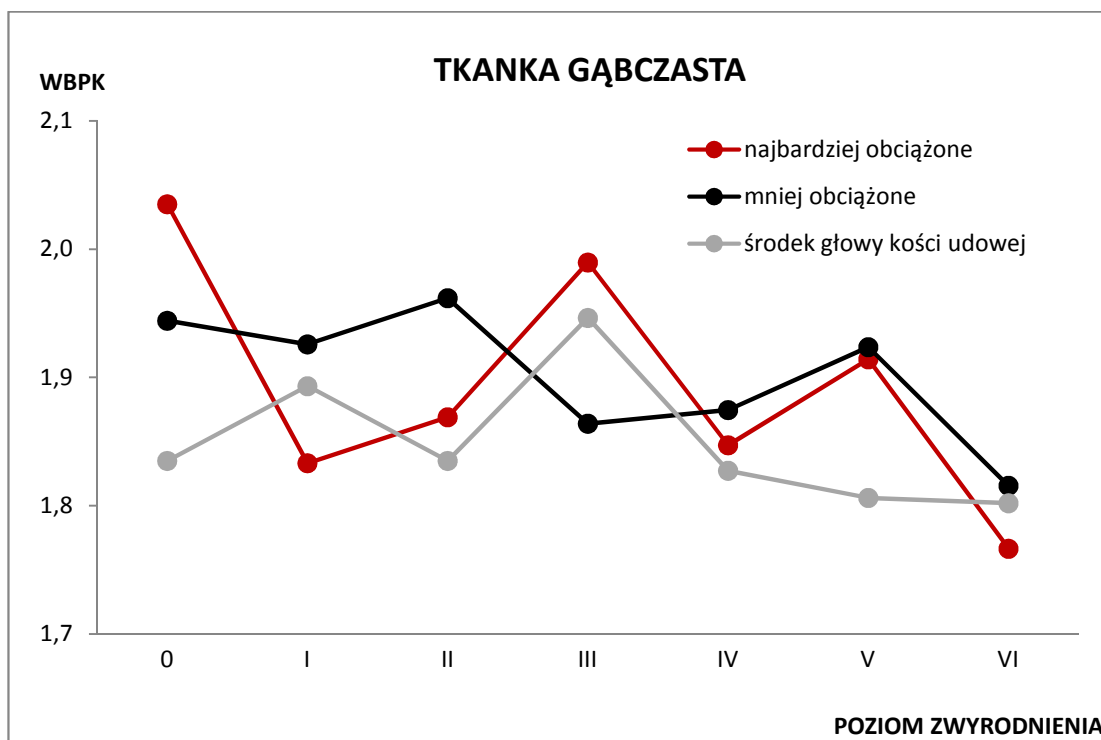
Wysocze istotne różnice na poziomie $p < 0,001$ zaobserwowano między odległymi od siebie grupami, w sensie stopnia zaawansowania zmian zwyrodnieniowych, np. między grupą 0 (brak oznak ChZS) i grupami III-VI (umiarkowane – bardzo zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych), lub grupą II (łagodne zmiany zwyrodnieniowe) i grupami IV-VI (średnio – bardzo zaawansowanych zmian zwyrodnieniowych). Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami bezpośrednio ze sobą sąsiadującymi (Tab. 10).

Analiza porównawcza wartości WBPK w próbkach pobranych z różnych miejsc obciążenia kości gąbczastej nie wykazała większego zróżnicowania (Tab. 11), jakkolwiek w odniesieniu do obszaru najbardziej obciążanego można zaobserwować tendencję do zmniejszenia się jego wartości wraz z narastającym stopniem zwyrodnienia.

Tab. 11 Statystyki opisowe dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WBPK) w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	2,035	0,136	2,218	1,881	6,67
	Obszar mniej obciążony	1,944	0,087	2,055	1,823	4,48
	Środek głowy kości udowej	1,835	0,252	2,167	1,546	13,74
I	Obszar najbardziej obciążony	1,833	0,094	1,960	1,696	5,14
	Obszar mniej obciążony	1,926	0,085	2,011	1,798	4,43
	Środek głowy kości udowej	1,893	0,128	2,028	1,701	6,78
II	Obszar najbardziej obciążony	1,869	0,137	2,050	1,729	7,35
	Obszar mniej obciążony	1,962	0,032	1,997	1,921	1,63
	Środek głowy kości udowej	1,835	0,114	1,955	1,713	6,19
III	Obszar najbardziej obciążony	1,990	0,089	2,123	1,886	4,47
	Obszar mniej obciążony	1,864	0,088	1,987	1,743	4,72
	Środek głowy kości udowej	1,946	0,047	2,003	1,890	2,40
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,847	0,060	1,941	1,779	3,22
	Obszar mniej obciążony	1,875	0,033	1,921	1,827	1,79
	Środek głowy kości udowej	1,827	0,031	1,869	1,783	1,67
V	Obszar najbardziej obciążony	1,914	0,058	1,975	1,853	3,01
	Obszar mniej obciążony	1,924	0,056	1,995	1,864	2,93
	Środek głowy kości udowej	1,806	0,062	1,879	1,713	3,45
VI	Obszar najbardziej obciążony	1,767	0,046	1,812	1,698	2,63
	Obszar mniej obciążony	1,816	0,117	1,899	1,618	6,46
	Środek głowy kości udowej	1,802	0,077	1,895	1,699	4,29

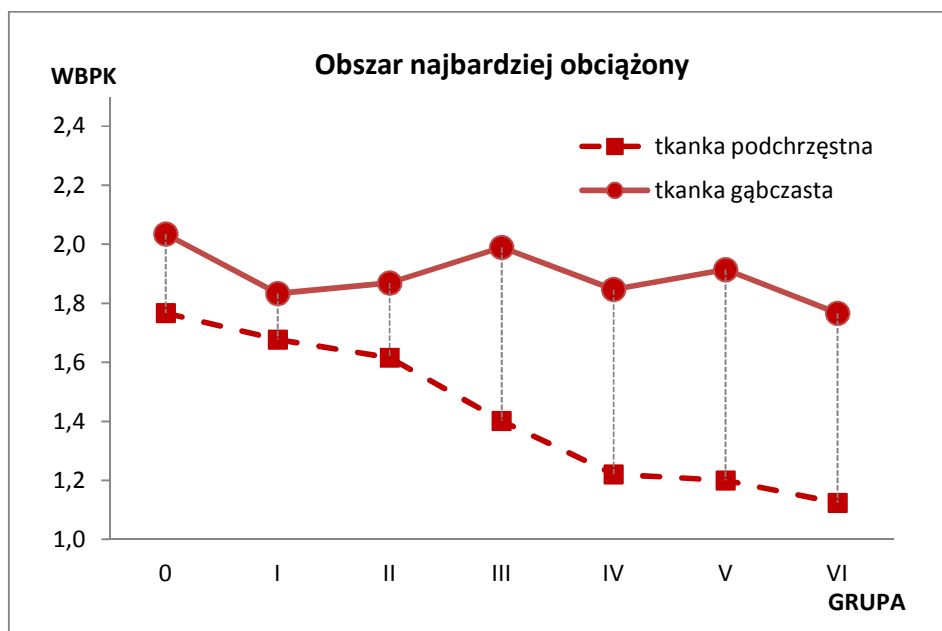
Ponadto stwierdzono, że w mniej obciążonych miejscach głowy kości udowej, wartości tego wskaźnika są przeważnie przeciętnie wyższe niż w próbkach pobranych z miejsc najbardziej obciążonych (Ryc. 13).



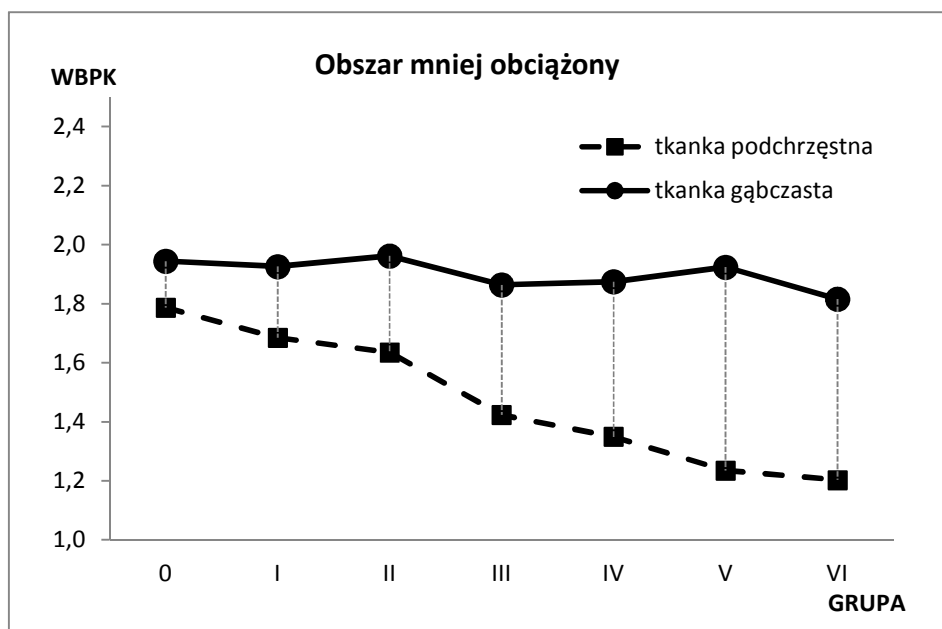
Ryc. 13. Porównanie zmian wartości WBPk w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.

Jednak w świetle przeprowadzonych analiz statystycznych z zastosowaniem testu t-Studenta dla porównania dwóch średnich i testu Tukeya-Kramera dla wielokrotnych porównań wartości średnich, ani zaobserwowane różnice międzygrupowe, ani różnice wartości średnich wskaźnika WBPk dla próbek pobranych z obszarów o różnym stopniu obciążenia, nie osiągały wymaganego poziomu istotności statystycznej $p < 0,05$.

Dokonano również porównania wartości średnich wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu między tkanką podchrzęstną i tkanką gąbczastą z próbek pobranych w miejscach największego obciążenia i mniejszego obciążenia głowy kości udowej. Stwierdzono, że w miejscach najbardziej obciążonych, bez względu na stopień zaawansowania ChZS biodrowych, w tkance kostnej gąbczastej wartości wskaźnika zawsze są wyższe niż w tkance podchrzęstnej (Ryc. 14). Podobne różnice, między tkanką gąbczastą i warstwą podchrzęstną kości, stwierdzono dla obszaru mniej obciążonego, we wszystkich siedmiu grupach (Ryc. 15)



Ryc. 14 Porównanie średnich wartości wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WBPK) dla obszaru najbardziej obciążonego w tkance podchrzęstnej i gąbczastej w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS biodrowych.



Ryc. 15 Porównanie średnich wartości wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WBPK) dla obszaru mniej obciążonego w tkance podchrzęstnej i gąbczastej w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS biodrowych.

4. Wskaźnik hydroksypatytu do węglanoapatytu (WH/W)

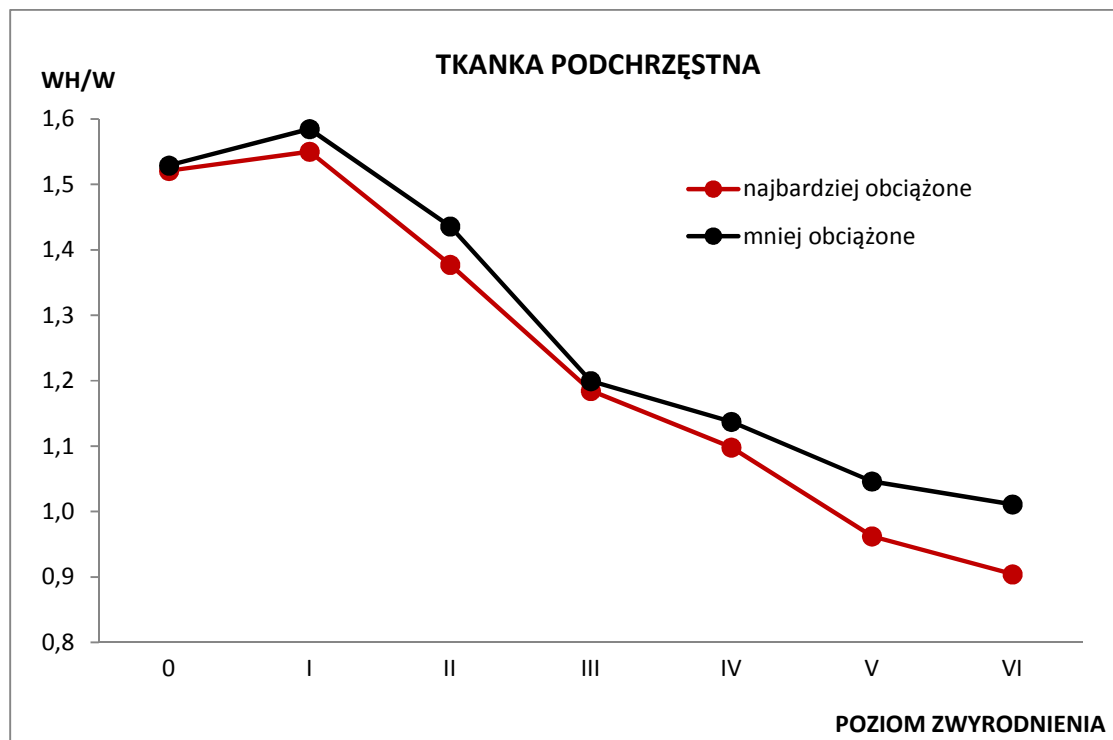
Analiza wskaźnika WH/W, określającego proporcje hydroksypatytu do węglanoapatytu w warstwie podchrzęstnej wykazała, że jego wartości średnie ulegają stopniowemu zmniejszeniu wraz z postępującym zwyrodnieniem (grupa I do VI). Wartości średnie i miary rozproszenia według miejsca pobranych próbek i stopnia zaawansowania ChZS biodrowych przedstawiono w tabeli 12. Małe wielkości miar rozproszenia wskazują na niewielki rozrzut wartości analizowanego wskaźnika wokół średniej.

Tab. 12 Statystyki opisowe dla wskaźnika hydroksypatytu do węglanoapatytu WH/W w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	1,521	0,027	1,552	1,483	1,78
	Obszar mniej obciążony	1,529	0,022	1,561	1,509	1,43
I	Obszar najbardziej obciążony	1,550	0,010	1,564	1,538	0,65
	Obszar mniej obciążony	1,585	0,021	1,612	1,561	1,29
II	Obszar najbardziej obciążony	1,377	0,060	1,456	1,312	4,32
	Obszar mniej obciążony	1,436	0,029	1,468	1,395	2,01
III	Obszar najbardziej obciążony	1,185	0,121	1,320	0,989	10,25
	Obszar mniej obciążony	1,200	0,082	1,291	1,070	6,84
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,098	0,031	1,146	1,068	2,78
	Obszar mniej obciążony	1,137	0,020	1,161	1,111	1,76
V	Obszar najbardziej obciążony	0,962	0,035	0,999	0,925	3,59
	Obszar mniej obciążony	1,046	0,055	1,112	0,987	5,21
VI	Obszar najbardziej obciążony	0,904	0,064	0,989	0,824	7,12
	Obszar mniej obciążony	1,011	0,079	1,123	0,902	7,81

Wartości wskaźnika wahały się w badanym materiale z warstwy podchrzęstnej w granicach od min. 0,82 w grupie VI (najwyższy stopień zaawansowania ChZS) do max 1,61 w grupie I (początkowe stadium choroby). Wartości odchylenia standardowego (SD) dla obydwu obszarów pobrania tkanki kostnej i we wszystkich siedmiu grupach są małe, co

świadczy zarówno o dużej jednorodności badanych prób jak i dokładności pomiarów. Współczynnik zmienności (V%) osiąga maksymalnie wartość 10,25, co świadczy o dużym skupieniu wartości WH/W wokół średniej. Ponadto stwierdzono, że wartości średnie WH/W w warstwie podchrzęstnej zmniejszają się wraz z postępowaniem ChZS, zarówno w najbardziej jak i mniej obciążonych miejscach głowy kości udowej (Ryc. 16).



Ryc. 16 Porównanie zmian wartości WH/W w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w warstwie podchrzęstnej kości z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.

Podobnie jak w przypadku analizowanych powyżej wskaźników, również w odniesieniu do wskaźnika proporcji hydroksyapatytu do węglanoapatytu, oceny istotności zaobserwowanych różnic międzygrupowych potwierdziła, że grupy odległe na osi stopnia zaawansowania ChZS biodrowych różnią się wysoce istotnie ($p < 0,001$) natomiast różnice

między grupami blisko lub bezpośrednio sąsiadującymi zwykle nie osiąają założonego poziomu istotności $p < 0,05$ (Tab. 13).

Tab. 13 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0-VI) i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W), w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK HYDROKSYAPATYT/WĘGLANOAPATYT. WARSTWA PODCHRZĘSTNA															
GR R U P A	MPP	0		I		II		III		IV		V		VI	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0	1		ns ¹	ns	ns	ns	ns	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns ¹		ns	ns	<0,05	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
I	1	ns	ns		ns ¹	ns	ns	<0,01	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns	ns	ns ¹		ns	ns	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
II	1	ns	<0,05	ns	ns		ns ¹	ns	ns	<0,001	<0,01	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
	2	ns	ns	ns	ns	ns ¹		ns	ns	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001
III	1	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	ns	ns		ns ¹	ns	ns	<0,01	ns	<0,001	<0,001
	2	<0,01	<0,01	<0,01	<0,001	ns	ns	ns ¹		<0,05	ns	<0,01	<0,05	<0,001	<0,001
IV	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns		ns ¹	ns	ns	ns	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,001	ns	<0,05	ns ¹		ns	ns	ns	ns
V	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,01	<0,01	ns	ns		ns ¹	ns	ns
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	<0,05	ns	ns	ns ¹		ns	ns
VI	1	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	ns		<0,001 ¹
	2	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	<0,001	ns	ns	ns	ns	<0,001 ¹	

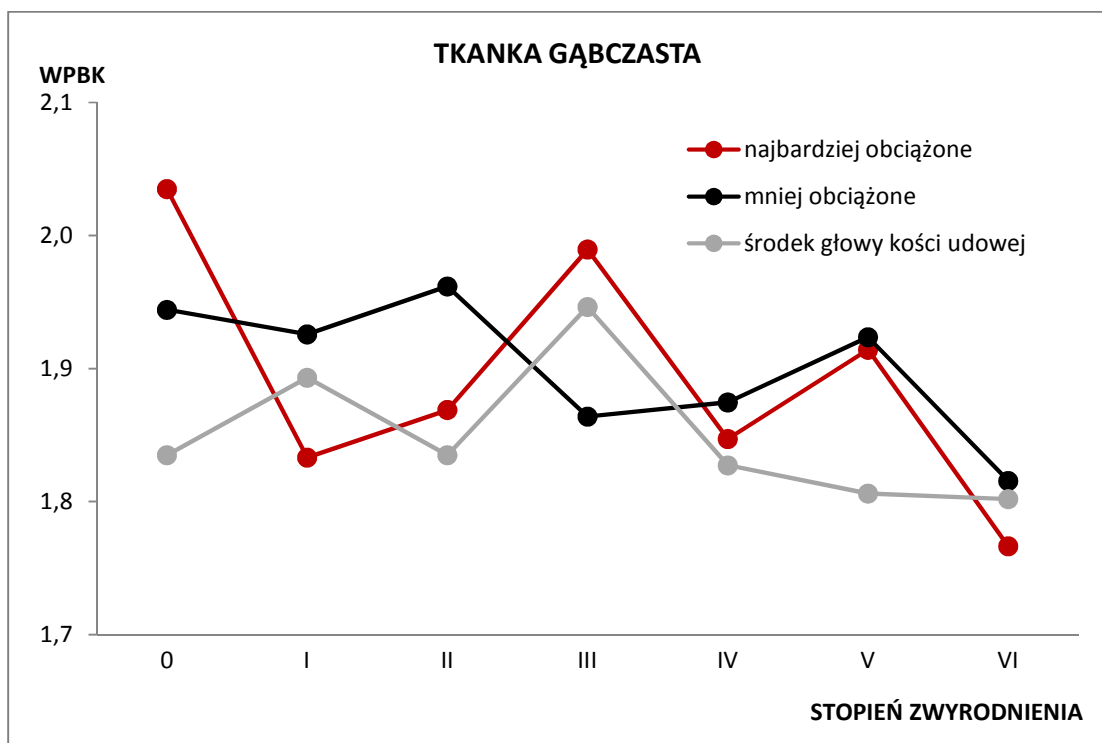
¹ test t-Studenta

Z kolei w kości gąbczastej nie stwierdzono zróżnicowania średnich wartości analizowanego wskaźnika, ani w zależności od stopnia zaawansowania ChZS, ani od miejsca pobrania tkanki (Tab. 14). Zaobserwowane różnice sugerują pewien spadek wartości wskaźnika WH/W we wstępnych fazach ChZS biodrowych w stosunku do pacjentów nie wykazujących zmian zwyrodnieniowych, a następnie wzrost wartości w grupach o zaawansowanych zmianach zwyrodnieniowych. Jednak ocena statystyczna międzygrupowych różnic W/HW nie potwierdziła ich statystycznej istotności, również w odniesieniu do porównań między próbkami z trzech różnych miejsc obciążania głowy kości udowej. Tabele przedstawiające poziomy istotnych różnic nie zostały zamieszczone ze względu na brak istotnych różnic.

Tab. 14 Statystyki opisowe dla wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W) w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	średnia	SD	max	min	V [%]
0	Obszar najbardziej obciążony	1,450	0,302	1,807	1,023	20,82
	Obszar mniej obciążony	1,447	0,140	1,610	1,298	9,67
	Środek głowy kości udowej	1,452	0,263	1,766	1,155	18,09
I	Obszar najbardziej obciążony	1,411	0,032	1,458	1,376	2,26
	Obszar mniej obciążony	1,433	0,025	1,459	1,399	1,76
	Środek głowy kości udowej	1,422	0,016	1,439	1,401	1,13
II	Obszar najbardziej obciążony	1,295	0,154	1,465	1,120	11,92
	Obszar mniej obciążony	1,360	0,062	1,443	1,297	4,56
	Środek głowy kości udowej	1,250	0,076	1,351	1,150	6,12
III	Obszar najbardziej obciążony	1,290	0,127	1,466	1,154	9,83
	Obszar mniej obciążony	1,270	0,100	1,398	1,145	7,86
	Środek głowy kości udowej	1,325	0,095	1,442	1,198	7,20
IV	Obszar najbardziej obciążony	1,281	0,062	1,386	1,229	4,80
	Obszar mniej obciążony	1,302	0,067	1,387	1,202	5,16
	Środek głowy kości udowej	1,270	0,048	1,328	1,210	3,77
V	Obszar najbardziej obciążony	1,320	0,026	1,350	1,289	1,99
	Obszar mniej obciążony	1,321	0,054	1,389	1,254	4,11
	Środek głowy kości udowej	1,322	0,062	1,392	1,245	4,69
VI	Obszar najbardziej obciążony	1,307	0,030	1,342	1,273	2,29
	Obszar mniej obciążony	1,298	0,025	1,332	1,269	1,89
	Środek głowy kości udowej	1,297	0,019	1,324	1,274	1,45

Na rycinie 17 przedstawiono wartości średnie wraz z odchyleniami standardowymi WH//W w kości gąbczastej. We wszystkich badanych grupach miary rozproszenia są małe, z wyjątkiem grupy 0, w której odchylenie standardowe jest największe, a więc wartość analizowanego wskaźnika w tej grupie ma największy rozrzut, na co wskazują również wyższe wielkości współczynnika zmienności sięgające powyżej 20 %.



Ryc. 17. Porównanie zmian wartości WH/W wg stopnia zaawansowania ChZS biodrowych w tkance gąbczastej z miejsc o różnym stopniu obciążenia głowy kości udowej.

Obliczenia statystyczne przeprowadzone z uwzględnieniem podziału badanego materiału, według klasyfikacji własnej, dla siedmiu grup różniących się stopniem nasilenia zmian zwyrodnieniowych wykazały, że grupy te różnią się między sobą, przy czym różnice między nimi rosły wraz z narastającym stopniem zaawansowania zmian zwyrodnieniowych. Analizy poziomu istotności tych różnic, nie we wszystkich przypadkach pozwoliły na ich statystyczne potwierdzenie i wykazały, że wartości średnie badanych trzech, ramanowskich wskaźników, wyliczone dla grupy 0 (bez oznak ChZS) i grupy I (minimalne zmiany zwyrodnieniowe) były nieistotnie. Podobnie średnie wartości wszystkich trzech wskaźników wyliczone dla grupy V (zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe) i grupy VI (bardzo zaawansowane zmiany zwyrodnieniowe).

W związku z powyższym wykonano dodatkowe obliczenia zmieniając pierwotnie siedmiostopniową klasyfikację własną na pięciostopniową, która powstała po połączeniu grupy 0 z grupą I oraz grupy V z grupą VI. W celu odróżnienia nowej wersji pięciostopniowej klasyfikacji własnej, nowopowstałe grupy oznaczono symbolem „prim”. Grupa 0', do której zaliczono osoby bez żadnych oznak ChZS biodrowych i osoby z minimalnymi zmianami, powstała z połączenia wcześniejszych grup 0 i I. Z kolei grupa IV', w której znaleźli się pacjenci z zaawansowanymi i bardzo zaawansowanymi zmianami powstała z połączenia V i VI grupy. Natomiast nowym grupom I', II' i III' odpowiadały kolejno grupy II, III i IV z pierwotnej siedmiostopniowej klasyfikacji.

Wyniki obliczeń, przeprowadzonych dla wskaźnika mineralizacji w tkance podchrzęstnej, według nowej pięciostopniowej skali nasilenia ChZS wykazały, że w najbardziej obciążonych obszarach głowy kości udowej jego wartości są przeciętnie mniejsze niż w obszarach mniej obciążonych. Potwierdziła się również, wcześniej zaobserwowana tendencja, do zmniejszania się wartości średnich WMTK wraz z narastającym stopniem zmian zwyrodnieniowych w stawach biodrowych (Tab. 15).

Tab. 15 Statystyki opisowe dla wskaźnika mineralizacji (WMTK) w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach (0'-IV') zaawansowania ChZS wg zmodyfikowanej pięciostopniowej klasyfikacji własnej.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	N	średnia	SD	max	min	V [%]
0' (0+1)	Obszar najbardziej obciążony	10	1,537	0,026	1,483	1,564	1,709
	Obszar mniej obciążony	10	1,553	0,033	1,509	1,612	2,118
I' (II)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,377	0,060	1,312	1,456	4,321
	Obszar mniej obciążony	5	1,436	0,029	1,395	1,468	2,005
II' (III)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,185	0,121	0,989	1,320	10,248
	Obszar mniej obciążony	5	1,200	0,082	1,070	1,291	6,843
III' (IV)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,098	0,031	1,068	1,146	2,783
	Obszar mniej obciążony	5	1,137	0,020	1,111	1,161	1,764
IV' (V+VI)	Obszar najbardziej obciążony	10	0,933	0,058	0,824	0,999	6,166
	Obszar mniej obciążony	10	1,029	0,067	0,902	1,123	6,473

Nowy podział badanego materiału, według skali pięciostopniowej, ujawnił statystycznie istotne różnice między nowoutworzoną grupą 0' i grupą I' oraz między grupą III' i nowoutworzoną grupą IV' (Tab. 16). Różnice wartości średnich WMTK między grupą II' – z umiarkowanymi i grupą III' – ze średnio zaawansowanymi zmianami nie były statystycznie istotne.

Tab. 16 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0'-IV') i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika mineralizacji (WMTK), w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK MINERALIZACJI. WARSTWA PODCHRZĘSTNA											
GRUPA	MPP	0		I		II		III		IV	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0' (0+1)	1		p<0,05 ¹	p<0,001	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2	p<0,05 ¹		p<0,001	p<0,05	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
I' (II)	1	p<0,001	p<0,001		ns ¹	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2	ns	p<0,05	ns ¹		p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
II' (III)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001		ns ¹	ns	ns	p<0,001	p<0,001
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns ¹		ns	ns	p<0,001	p<0,001
III' (IV)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	ns		p<0,01 ¹	p<0,001	ns
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	ns	p<0,01 ¹		p<0,001	p<0,05
IV' (V+VI)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001		p<0,01 ¹
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,05	p<0,01 ¹	

¹ test t-Studenta

Zgodnie z oczekiwaniami, w przypadku pozostałych dwóch wskaźników WBPK i WH/W zastosowanie zmodyfikowanej pięciostopniowej klasyfikacji nie wpłynęło na zmianę poziomu istotności różnic między wartościami średnimi. Różnice między nowoutworzoną grupą 0' (bez oznak ChZS) i bezpośrednio z nią sąsiadującą grupą I' (łagodne zmiany) oraz między nowoutworzoną grupą IV' (zaawansowane zmiany) i jej najbliższą grupą III' (średniozaawansowane zmiany) nadal pozostawały statystycznie nieistotne (Tab.17-20).

Tab. 17 Statystyki opisowe dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WBPk) w warstwie podchrzęstnej, z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach (0'-IV') zaawansowania ChZS, wg zmodyfikowanej pięciostopniowej klasyfikacji własnej.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	N	średnia	SD	max	min	V [%]
0' (0+1)	Obszar najbardziej obciążony	10	1,722	0,132	1,499	1,923	7,670
	Obszar mniej obciążony	10	1,736	0,126	1,489	1,944	7,280
I' (II)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,616	0,156	1,405	1,832	9,649
	Obszar mniej obciążony	5	1,635	0,128	1,489	1,825	7,815
II' (III)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,402	0,085	1,302	1,512	6,036
	Obszar mniej obciążony	5	1,423	0,076	1,322	1,522	5,316
III' (IV)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,221	0,108	1,064	1,353	8,846
	Obszar mniej obciążony	5	1,349	0,088	1,202	1,429	6,503
IV' (V+VI)	Obszar najbardziej obciążony	10	1,162	0,083	1,020	1,328	7,128
	Obszar mniej obciążony	10	1,219	0,057	1,129	1,307	4,639

Tab. 18 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0'-IV') i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika przestrzennej budowy kolagenu (WBPk), w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK BUDOWY PRZESTRZENNEJ KOLAGENU. WARSTWA PODCHRZĘSTNA											
GRUPA	MPP	0'		I'		II'		III'		IV'	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0' (0+1)	1		ns ¹	ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2	ns ¹		ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
I' (II)	1	ns	ns		ns ¹	ns	ns	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001
	2	ns	ns	ns ¹		p<0,05	ns	p<0,001	p<0,01	p<0,001	p<0,001
II' (III)	1	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,05		p<0,05 ¹	ns	ns	p<0,01	ns
	2	p<0,001	p<0,001	ns	ns	p<0,05 ¹		ns	ns	p<0,01	p<0,05
III' (IV)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	ns		p<0,01 ¹	ns	ns
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,01	ns	ns	p<0,01 ¹		ns	ns
IV' (V+VI)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,01	p<0,01	ns	ns		p<0,05 ¹
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,05	ns	ns	p<0,05 ¹	

¹ test t-Studenta

Tab. 19 Statystyki opisowe dla wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W) w warstwie podchrzęstnej, z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach (0'-IV') zaawansowania ChZS wg zmodyfikowanej pięciostopniowej klasyfikacji własnej.

Grupa	Miejsce pobrania próbki	N	średnia	SD	max	min	V [%]
0' (0+1)	Obszar najbardziej obciążony	10	1,482	0,038	1,412	1,559	2,541
	Obszar mniej obciążony	10	1,494	0,035	1,417	1,543	2,329
I' (II)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,405	0,035	1,354	1,439	2,475
	Obszar mniej obciążony	5	1,426	0,021	1,392	1,442	1,447
II' (III)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,356	0,033	1,308	1,392	2,448
	Obszar mniej obciążony	5	1,368	0,041	1,301	1,402	3,011
III' (IV)	Obszar najbardziej obciążony	5	1,271	0,029	1,251	1,318	2,299
	Obszar mniej obciążony	5	1,287	0,053	1,227	1,345	4,133
IV' (V+VI)	Obszar najbardziej obciążony	10	1,231	0,048	1,175	1,302	3,902
	Obszar mniej obciążony	10	1,247	0,047	1,187	1,323	3,807

Tab. 20 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0'-IV') i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WH/W), w warstwie podchrzęstnej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK HYDROKSYAPATYT/WĘGLANOAPATYT. WARSTWA PODCHRZĘSTNA											
GRUPA	MPP	0'		I'		II'		III'		IV'	
		1	2	1	2	1	2	1	2	1	2
0' (0+1)	1		p<0,05 ¹	p<0,05	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2	p<0,05 ¹		ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
I' (II)	1	p<0,05	p<0,01		ns ¹	ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
	2	ns	ns	ns ¹		ns	ns	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001
II' (III)	1	p<0,001	p<0,001	ns	ns		ns ¹	p<0,05	ns	p<0,001	p<0,001
	2	p<0,001	p<0,001	ns	ns	ns ¹		ns	p<0,05	p<0,001	p<0,001
III' (IV)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,05	ns		ns ¹	ns	ns
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	p<0,05	ns ¹		ns	ns
IV' (V+VI)	1	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	ns		p<0,05 ¹
	2	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	p<0,001	ns	ns	p<0,05 ¹	

¹ test t-Studenta

Wszystkie trzy ramanowskie wskaźniki, badane w tkance gąbczastej, podobnie jak w pierwotnej siedmiostopniowej klasyfikacji, nie wykazywały istotnego statystycznie zróżnicowania ani w zależności od zaawansowania ChZS, ani od miejsca pobrania próbki. Jedynie w przypadku wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu ujawniły się pewne różnice między grupą I' i IV' oraz między II' i IV' to znaczy między zaawansowanym, a łagodnym i między zaawansowanym, a umiarkowanym stopniem zwyrodnieniowych zmian w stawach biodrowych (Tab. 21).

Tab. 21 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0'-IV') i między różnymi miejscami pobrania próbki (MPP): 1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony, 3 – okolica środka głowy kości udowej, dla wskaźnika hydroksyapatyt do węglanoapatyt (WH/W), w tkance gąbczastej, wg oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.

WSKAŹNIK HYDROKSYAPATYT/WĘGLANOAPATYT. TKANKA GĄBCZASTA																
GRUPA	MPP	0'			I'			II'			III'			IV'		
		1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3	1	2	3
0' (0+1)	1		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	2	ns		<0,05	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	3	ns	<0,05		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
I' (II)	1	ns	ns	ns		<0,05	<0,01	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05
	2	ns	ns	ns	<0,05		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	ns	<0,01	ns		ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05	ns	<0,05
II' (III)	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns		<0,01	<0,05	ns	ns	ns	<0,05	ns	<0,01
	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	<0,01		ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	p<0,05	ns		ns	ns	ns	ns	ns	<0,05
III' (IV)	1	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns	ns
	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns	ns
	3	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns	ns
IV' (V+VI)	1	ns	ns	ns	ns	ns	<0,05	p<0,05	ns	ns	ns	ns	ns		ns	ns
	2	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns	ns		ns
	3	ns	ns	ns	<0,05	ns	<0,05	<0,01	ns	<0,05	ns	ns	ns	ns	ns	

VI. OMÓWIENIE I DYSKUSJA WYNIKÓW

Badania właściwości ludzkiej tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym metodą mikrospektroskopii Ramana jest istotnym novum prezentowanej pracy i według informacji z portalu Nauka Polska zostały w kraju przeprowadzone po raz pierwszy. Wprawdzie wcześniej metoda ta została wykorzystana do badania innych biologicznych struktur: mioglobiny i hemoglobiny [Mak 2004], jednak jak dotąd nie odnaleziono w Polskiej Bibliografii Lekarskiej prac na temat wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do badania zdrowych i zmienionych chorobowo struktur kostnych.

Głównymi osiągnięciami niniejszego opracowania są: (1) wiarygodne potwierdzenie możliwości zastosowania techniki spektroskopii Ramana do oceny tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym i (2) potwierdzone statystycznie zróżnicowanie wartości trzech analizowanych cech (wskaźnika mineralizacji, wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu i wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu) w zależności od stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, (3) stwierdzenie, że zmiany składu i struktury chemicznej macierzy zewnątrzkomórkowej w zależności od nasilenia zmian zwyrodnieniowych ujawniają się w warstwie podchrzęstnej głowy kości udowej.

Ponadto wydaje się, iż dotychczas stosowane klasyfikacje stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych nie wyczerpują jej znamion, zwłaszcza w perspektywie możliwości zastosowania wysoce precyzyjnych technik analitycznych. Dlatego otwartą kwestią pozostaje stworzenie takiej klasyfikacji, która odzwierciedli współzależności między obrazem radiologicznym, objawami klinicznymi i wynikami badań metodą spektroskopii Ramana.

1. Własna klasyfikacja radiologiczna ChZS biodrowych

W badaniach klinicznych i epidemiologicznych ChZS biodrowych diagnostyka radiologiczna służy do oceny zarówno stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej jak również do monitorowania progresji choroby. Tradycyjnie ocena nasilenia zmian zwyrodnieniowych wykonywana jest z wykorzystaniem pięciostopniowej klasyfikacji wg

Kellgren'a i Lawrence'a [1957] lub czterostopniowej wg Croft'a i Lane'a [Croft i wsp. 1990, lane i wsp. 1993]. Podstawą pierwszej jest opis zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych, natomiast w przypadku drugiej cechą różnicującą poszczególne stopnie zaawansowania ChZS biodrowych jest szerokość szpary stawowej.

Dla realizacji celu niniejszego opracowania, skonstruowano bardziej szczegółową, bo siedmiostopniową klasyfikację własną, która powstała z połączenia dwóch wyżej opisanych. Potrzeba stworzenia nowej klasyfikacji wynikała z trzech przyczyn: (1) zastosowanie wyłącznie klasyfikacji wg Kellgren'a i Lawrence'a utrudniało jednoznaczną ocenę zmian obserwowanych na radiogramach, a brak w obrazie radiologicznym osteofitów przy wzroście ciężkości ChZS biodrowych, uniemożliwiał klasyfikację zwyrodnienia na wyższy stopień zaawansowania choroby, (2) użycie klasyfikacji wg Croft'a i Lane'a zawężyło możliwości oceny stopnia nasilenia zwyrodnienia stawów biodrowych do trzech grup, co powodowało, iż dana grupa była bardzo niejednorodna pod względem korelacji obrazu radiologicznego z objawami klinicznymi, (3) zastosowanie spektrometrii Ramana – metody o wysokiej precyzji oceny jakości kości, sugerowało konieczność zastosowania dokładniejszej klasyfikacji stopnia zaawansowania ChZS, która pozwoliłaby na wyróżnienie mniejszych jednorodnych grup i dokonanie analizy współzależności z ramanowskimi wskaźnikami.

Propozycja klasyfikacji obrazów radiologicznych pacjentów leczonych operacyjnie z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych na siedem grup/stopni zaawansowania, pozwoliła lepiej przyporządkować pacjentów z różnym nasileniem ChZS w oparciu o potwierdzone wskaźniki opracowanych statystycznie wyników dotyczących interpretacji jakości tkanki kostnej. W dalszej części badań stopień zaawansowania choroby zwyrodnieniowej oceniany jest w skali siedmiostopniowej (grupa 0–VI). Analiza wyników badań „jakości kości”, wyrażonej wskaźnikami określającymi zawartość i jakość składnika mineralnego oraz składnika organicznego, a także strukturę konformacyjną kolagenu, w zaproponowanej skali siedmiostopniowej, wykazała istnienie różnic międzygrupowych dla wartości średnich wszystkich trzech wskaźników w warstwie podchrzęstnej i brak zróżnicowania w kości gąbczastej. Jednak w świetle zastosowanych testów statystycznych nie wszystkie różnice osiągnęły wymaganych poziom istotności statystycznej. Dotyczyło to zwłaszcza wielkości różnic między bezpośrednio sąsiadującymi

ze sobą grupami. Najwięcej statystycznie istotnych różnic, między kolejnymi grupami o rosnącym stopniu zaawansowania zmian zwyrodnieniowych, zarejestrowano dla wskaźnika mineralizacji. W przypadku pozostałych dwóch wskaźników WBPK i WH/W statystycznie istotnie różniły się między sobą grupy odległe pod względem stopnia zaawansowania ChZS. Ze względu na to, że dwie pierwsze 0 i I oraz dwie ostatnie V i VI grupy nie różniły się statystycznie istotnie w żadnym z analizowanych wskaźników, zaproponowana siedmiostopniowa skala okazała się zbyt szczegółowa i została zredukowana do pięciu stopni. Uznano, że najprawdopodobniej zmiany w obrazie radiologicznym u pacjentów z grupy I były jednak zaledwie na granicy normy i patologii. Dokonano, więc połączenia grupy 0 (bez zmian zwyrodnieniowych w obrazie radiologicznym) z grupą I, traktowaną pierwotnie jako minimalnie patologiczną. Podobnie postąpiono w przypadku dwóch grup z przeciwnego krańca continuum zaawansowania ChZS (grupy V i VI), łącząc je w jedną grupę traktowaną dalej jako najwyższy stopień zaawansowania zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych w stawie biodrowym. Dzięki zastosowanej procedurze połączenia, nie różniących się statystycznie istotnie grup, uzyskano wprawdzie nieco jaśniejszy obraz zmian wartości średnich analizowanych wskaźników w zależności od nasilenie zmian zwyrodnieniowych, (najwyraźniej w przypadku wskaźnika mineralizacji), jednak nie do końca zadowalający, bowiem nadal część różnic pozostała nieistotna statystycznie. Wydaje się, że siedmiostopniowa skala natężenia ChZS biodrowych nie spełnia warunku współzmienności ze wskaźnikami uzyskanymi metodą spektroskopii Ramana ze względu na zbytne jej rozbudowanie, ale nie można również wykluczyć kwestii małej liczebności badanej próby.

Ostatecznie uznano, iż w świetle uzyskanych wyników, zastosowana do oceny stopnia zaawansowania ChZS biodrowych, własna siedmiostopniowa, a następnie pięciostopniowa klasyfikacja radiologiczna, obie utworzone na podstawie dwóch wcześniej stosowanych skal: wg Kellgren'a i Lawrence'a [1953] oraz wg Croft'a i Lane'a [Croft i wsp. 1990 Lane i wsp. 1993], powinny być jeszcze dodatkowo zmodyfikowane i następnie zweryfikowane na większym materiale radiologicznym w połączeniu z wynikami badań metodą spektroskopii ramanowskiej.

2. Choroba zwyrodnieniowa stawów w mikroskopii elektronowej

Do oceny w mikroskopie elektronowym warstwy podchrzęstnej i kości gąbczastej otrzymanej z głowy kości udowej użyto próbek pobranych od pacjentów przyporządkowanych, wg własnej siedmiostopniowej klasyfikacji nasilenia choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, do skrajnych grup: 0 – bez zmian zwyrodnieniowych w obrazie radiologicznym i VI – bardzo zaawansowane zmiany wytwórcze ze szparą stawową poniżej 1,5mm.

Analiza porównawcza obrazów uzyskanych z mikroskopu elektronowego skaningowego i transmisyjnego między próbkami ocenianymi z najbardziej i mniej obciążanych obszarów głowy kości udowej nie wykazała żadnych wyraźnych różnic, ani w warstwie podchrzęstnej, ani w tkance kostnej gąbczastej. Natomiast zaobserwowano różnice w strukturze chrzęstno-kostnej między próbkami pobranymi z kości zdrowych i z zaawansowaną ChZS, które uwidoczniły się jako poszerzenie warstwy podchrzęstnej, wzmożona porowatość beleczek kostnych oraz zniszczenie i nadłamania w obrębie tkanki gąbczastej oraz zmiany mikrostrukturalne o charakterze chondromalacji i degeneracji obszarów podchrzęstnych wraz ze zniszczeniem sieci beleczek kości gąbczastej w następstwie zaawansowanej artrozy.

Ogólnie struktura kości z ChZS jest bardziej porowata z większą liczbą włókienek, co wskazuje na mniej ściśle związaną strukturę. Ta jakościowa ocena koreluje z wynikami ilościowych badań nad składem i sztywnością warstwy podchrzęstnej kości [Li i Aspden, 1997a], które wykazały mniejszą gęstość i zawartość mineralną, obniżenie sztywności w porównaniu do kości zdrowych, a zmiany te nie były ograniczone tylko do warstwy podchrzęstnej kości, wykazano je także w tkance gąbczastej wewnątrz głowy kości udowej.

Warstwę podchrzęstną normalnej kości, na obrazie w mikroskopii elektronowej, cechuje zauważalna w BSE ciemna warstwa przy powierzchni chrząstki. Ta warstwa charakteryzuje się pofałdowaną strukturą powierzchni przełomu w porównaniu z leżącą poniżej kością, która w BSE ukazuje się jako warstwa jasna. W obrazie SE, przy tym samym powiększeniu, widać wyraźniej szorstkość powierzchni przekroju, a przy większym zbliżeniu, zauważalna jest także włókienkowa natura warstwy leżącej powyżej. Obrazy pokazują także oddziaływanie pomiędzy jasną i ciemną warstwą, gdzie granica między

nimi wydaje się bardzo ostra, a struktura przejścia jest szerokości kilku mikrometrów. Nieco odmiennie wygląda to przy przejściu z warstwy podchrzęstnej kości w warstwę gąbczastą, gdzie granica wydaje się być bardziej rozmyta, a beleczki kostne wydają się płynnie przechodzić w struktury charakterystyczne dla tkanki gąbczastej.

Jamki resorpcyjne obserwowane w beleczkach kostnych odpowiadają obrazom opisywanym uprzednio przez Jonesa i wsp. [1984, 1993]. W obrazach uzyskanych z próbek od pacjentów z ChZS występowało ich znacznie więcej niż w grupie zdrowych. To może sugerować, albo większą liczbę aktywnych osteoklastów albo, że zagłębienia pozostawione przez osteoklasty nie są wypełniane wystarczająco szybko bądź efektywnie. Bez udokumentowania aktywności osteoblastycznej nie można stwierdzić czy jest to wynik zwiększonego obrotu kostnego (bone remodeling) czy zwiększonej resorpcji kostnej. Jednakże, zwiększone odtwarzanie tkanki kostnej obserwowane w ChZS mogłoby sugerować przewagę aktywności osteoblastów nad osteoklastami, co jednak nadal nie wyjaśnia dlaczego zagłębienia (lakuny) po osteoklastach są obecne w tak dużej liczbie w ChZS w porównaniu do kości u pacjentów bez oznak ChZS biodrowych.

Warstwa zmineralizowana (uwapniona) chrząstki stanowi obszar przejściowy między poddającą się naciskowi niezmineralizowaną chrząstką, a sztywną kością i przypuszczalnie nie dopuszcza do nadmiernej koncentracji siły/obciążenia na powierzchnię oddziaływania. Brak tej warstwy w grupie VI wg klasyfikacji własnej ChZS może wynikać z faktu, iż u tych pacjentów rozpoznano końcowe stadia choroby, charakteryzujące się niszczeniem chrząstki i odtwarzaniem tkanki kostnej w kierunku dośrodkowym głowy kości udowej, a w konsekwencji obu tych procesów dochodzi do zniszczenia warstwy uwapnionej chrząstki.

Podsumowując, warstwa podchrzęstna kości u pacjentów z ChZS, oprócz zwiększenia ilości tkanki kostnej, czego oczekiwano, charakteryzuje się również większą liczbą nadłamań beleczek powierzchniowych w kości podchrzęstnej i w obrębie kości gąbczastej. Ponadto obserwujemy w tej grupie większą liczbę zagłębień i jamek resorpcyjnych. Wszystkie te obserwacje są zgodne z hipotezą o istnieniu zaburzeń w strukturze kości u pacjentów z maksymalnym stopniem zwyrodnienia, a obserwowane zmiany nie dają się łatwo wytłumaczyć jako wtórny skutek utraty chrząstki stawowej. Znacząco więcej tkanki kostnej znajduje się, zarówno w warstwie podchrzęstnej jak i w

warstwie gąbczastej kości, gdzie beleczki kostne wydają się grubsze i przechodzą jedna w drugą. Kolejne różnice także są widoczne. Kość wydaje się być bardziej porowata, średnica większych otworów osiąga wielkość rzędu ~10-20 μm , co odpowiada typowej lakunie pozostałej po osteocycie [Boyde i wsp. 1986, Jones i Boye, 1993]. Dodatkowo obserwuje się zwiększoną liczbę jamek resorpcyjnych w wielu miejscach są w znacznie większej ilości niż w kościach pacjentów klasyfikowanych do grupy 0. Obserwuje się również wzmoczoną przebudowę kości, o czym świadczą mikrobelczki kostne wypełniające niektóre pory. Ostatecznie analizowane pod mikroskopem elektronowym SEM i TEM preparaty kostne z głów kości udowych z ChZS biodrowych różnią się od preparatów z tkanek bez zmian zwyrodnieniowych: (1) znaczną degradacją układu typowych warstw chrząstki szklistej, (2) zmianami w układzie włókien kolagenowych charakteryzującymi się rozszczepieniem kompaktowo ułożonych pęczków, (3) pogrubieniem warstwy podchrzęstnej kości, (4) obecnością licznych otworów na powierzchni beleczek tej warstwy oraz (5) zniszczeniem struktury przestrzennej sieci beleczek w tkance kostnej gąbczastej.

Obserwowane zmiany w kości podchrzęstnej i w obrębie kości gąbczastej są raczej trudne do wytłumaczenia bez zastosowania znacznie dokładniejszych badań na poziomie mikrostrukturalnym, tzn. określenia zawartości i jakości składnika mineralnego oraz składnika organicznego, a także struktury konformacyjnej kolagenu. Dlatego w kolejnym zasadniczym etapie badań oceniano „jakość” badanych kości przez zastosowanie metody mikrospektroskopii Ramana do analizy warstwy podchrzęstnej i tkanki kostnej gąbczastej głowy kości udowej.

3. Choroba zwyrodnieniowa stawów w badaniach ramanowskich

W badaniach własnych metodą spektroskopii Ramana wykazano, że w chorobie zwyrodnieniowej stawów biodrowych w warstwie podchrzęstnej głowy kości udowej następuje spadek mineralizacji tkanki, spadek zawartości kolagenu o strukturze helikalnej na rzecz kolagenu o nieuporządkowanej strukturze tzw. kłębka statystycznego i zmiana proporcji fosforanów do węglanów w hydroksyapatycie.

Zmiany w mineralizacji w miejscach sklerotyzacji tkanki kostnej i w osteofitach badane przez Ueno i wsp [2003], na podstawie próbek uzyskanych z kości piszczelowej dotkniętej chorobą zwyrodnieniową, wykazywały pewne zróżnicowanie. Badaniom poddano próbki z miejsc sklerotyzacji warstwy podchrzęstnej, z przylegających osteofitów, z osteofitów wolnych oraz z kości gąbczastej leżącej poniżej warstwy podchrzęstnej u pacjentów z osteoartrozą stawu kolanowego. Równocześnie badano także próbki z tkanki kostnej zbitej i gąbczastej zdrowych kości piszczelowych. Analizy przeprowadzono wykorzystując widma FT-IR i porównując względem hydroksyapatyów i kolagenu typu I. Ogólnie, patologiczne próbki kości były mniej zmineralizowane niż zdrowa kość zbita i kość gąbczasta. Miejsca sklerotyczne były bardziej zmineralizowane niż przylegające bądź oddalone osteofity. Autorzy sugerują dwa mechanizmy mające wyjaśniać obserwowane różnice w mineralizacji: (1) podchrzęstna remineralizacja była indukowana przez kwaśne środowisko płynu maziowego, lub (2) remineralizacja na podłożu odkładania jonów mineralnych przez układ naczyniowy. Jednak obie hipotezy nie zostały jeszcze ostatecznie potwierdzone.

Mineralizacja chrząstki przylegającej do warstwy podchrzęstnej zachodzi przy udziale rozmaitych biologicznych, chemicznych i mechanicznych czynników. Mechanizm patologicznych depozytów minerałów w pęcherzykach macierzy chrząstki z osteoartrozą był badany in-vitro z użyciem analizy enzymatycznej, radiometrycznej Ca^{45} , metodą spektroskopii w podczerwieni i w mikroskopie w świetle spolaryzowanym przez Derfus i wsp. 1998]. Widma FT-IR zidentyfikowały dwuwodnian pyrofosforanu i kryształy minerału apatyty, które były produkowane w pęcherzykach macierzy chrząstki z OA, mającej znaczenie w postępującej osteoartrozie.

Heger i wsp [2006] sugerowali mechanizm, w którym mineralizacja chrząstki indukowana laserem jest odpowiedzialna za długotrwałą stabilność strukturalną i ten mechanizm może być przeniesiony na proces mineralizacji biologicznej. Modyfikowana laserem, wewnątrz- i zewnątrzkomórkowa mineralizacja chrząstki małżowiny usznej, była badana przy zastosowaniu spektroskopii Ramana. Siarczan wapnia i węglan wapnia w postaci kryształów znajdowano wewnątrz komórek, natomiast kryształy fosforanu wapnia – w przestrzeniach wewnątrzkomórkowych. Autorzy sugerują, iż oprócz zmniejszenia

obciążenia tkanki chrzęstnej terapia laserem powodowała apoptozę komórek i uwolnienie pęcherzyków macierzy pośredniczących w mineralizacji.

Wcześniejsze badania ramanowskie kości wykazały, iż wzrost wskaźnika określającego proporcje węglanów do fosforanów odpowiada wzrostowi sztywności kości [Akkus i wsp. 2004, Busa i wsp. 2005]. Warstwa podchrzęstna kości w ChZS jest bardziej sztywna niż w normalnej kości, co jest zgodne z wynikami uzyskanymi dla wskaźnika węglany/fosforany w badaniach spektroskopowych Ramana [Mkukuma 2005]. Podobnie Timlin i wsp. [2000] w badaniach metodą spektroskopii Ramana nad zmianą struktury kości wykazali, że wskaźnik węglany/fosforany ulega zmianie po uszkodzonej stronie.

4. Spektroskopia Ramana, a klasyfikacja własna ChZS biodrowych

Wykonano badania tkanki kostnej gąbczastej oraz warstwy podchrzęstnej głowy kości udowej pacjentów sklasyfikowanych w siedmiu grupach nasilenia ChZS biodrowych. Porównano zmiany w składzie i strukturze tkanki kostnej gąbczastej oraz warstwy podchrzęstnej głowy kości udowej. Zmiany te dotyczyły stosunku zawartości kryształów hydroksyapatytu do kryształów węglanoapatytów i kryształów hydroksyapatytu do kolagenu oraz stosunku zawartości struktury helikalnej kolagenu do struktury kłębka statystycznego kolagenu. W warstwie podchrzęstnej kości zawartość hydroksyapatytu w porównaniu do zawartości węglanoapatytu oraz hydroksyapatytu w porównaniu do zawartości kolagenu zmniejsza się wraz ze wzrostem stopnia zwyrodnienia osiągając wartości najmniejsze w grupie VI. Ponadto w warstwie podchrzęstnej zaobserwowano, że wraz ze zwiększaniem się stopnia nasilenia zwyrodnienia, stosunek struktury uporządkowanej alfa helisy do nieuporządkowanej struktury kłębka statystycznego jest zwiększona się. Stwierdzono, że w przypadku tkanki kostnej gąbczastej z obszaru przy warstwie podchrzęstnej kości nie występują opisane wyżej różnice dla poszczególnych grup nasilenia ChZS biodrowych, co jest również ważnym wynikiem przeprowadzonych badań, jednak brak zróżnicowania między grupami nie daje podstaw do akceptowania zaproponowanej lub tworzenia nowej klasyfikacji stopnia zaawansowania zmian zwyrodnieniowo-wytwórczych w ChZS biodrowych. Jak już wspomniano wcześniej zaproponowana siedmiostopniowa klasyfikacja stopnia zaawansowania ChZS biodrowych,

a także w wersji zredukowanej do 5 stopni, choć nie okazała się doskonała, to jednak częściowo sprawdziła się, zwłaszcza w przypadku warstwy podchrzęstnej. Wydaje się, iż po dokonaniu pewnych modyfikacji i zweryfikowaniu na większym materiale jedna z wersji klasyfikacji własnej będzie precyzyjniej ustalić zależność między wartościami wskaźników ramanowskich i nasileniem choroby zwyrodnieniowej i być może pozwoli na określenie zakresów zmienności poszczególnych wskaźników dla poszczególnych stopni zaawansowania ChZS biodrowych.

5. Perspektywy klinicznego wykorzystania pomiarów ramanowskich

Zakończone sukcesem, dotychczasowe próby zastosowania spektroskopii ramanowskiej do pomiarów określonych parametrów opisujących budowę chemiczną i strukturę przestrzenną tkanki chrzęstno-kostnej oraz wzbogacenie tej metody nowymi technikami optycznymi (światłowody, sondy skanujące, itp.) daje coraz szersze możliwości wykorzystania jej, jako nowej metody diagnostycznej w chorobach układu kostno-stawowego. Ważnym argumentem, przemawiającym za kontynuowaniem badań nad możliwościami wprowadzenia i upowszechniania spektroskopii Ramana, jako metody diagnostycznej, jest jej niedestrukcyjny charakter w odniesieniu do pobranych próbek kości, które mogą być następnie wykorzystane do innych badań np. pod mikroskopem elektronowym. Obecnie bardzo intensywnie rozwija się nowa technologia zwana *Fiber-optic probe*, która pozwala na uzyskanie widm Ramana w tkankach biologicznych (metoda nieinwazyjna na żywym organizmie – *in vivo*) [Matousek i wsp. 2006]. W badaniach klinicznych technologia *Fiber-optic probe*, wraz z aparaturą endoskopową pozwala, podczas standardowo wykonywanych zabiegów artroskopowych stawów (kolanowych, biodrowych, ramiennych czy skokowych), na dodatkową ocenę analizowanych tkanek chrzęstno-kostnych poprzez analizę wskaźników spektroskopowych. Całkowicie niedestrukcyjny charakter metody, wysoka czułość na subtelne zmiany tkankowe, czynią tę metodę atrakcyjnym uzupełnieniem powszechnie stosowanych już zabiegów endoskopowych. Spektroskopia Ramana mogłaby być standardowo wykorzystana, jako połączenie obrazowania artroskopowego z pomiarem widm ramanowskich uzyskiwanych poprzez specjalnie zaprojektowane systemy optyczne. Badania z wykorzystaniem

prototypowej aparatury są obecnie na etapie prób klinicznych. Oprócz wziernikowania stawów również w innych dziedzinach medycyny próbuje się wykorzystać możliwości, jakie oferuje ta metoda diagnostyczna. Technologia *silica fiber-optic* jest wykorzystywana do oceny kalcyfikacji naczyń wieńcowych w klinicznych badaniach eksperymentalnych [Brennan i wsp. 1997] jak również w modelach zwierzęcych celem diagnostyki komórek dysplastycznych w chorobach nowotworowych [Bakker Schut i wsp. 2000]. Metoda spektroskopii Ramana, oprócz opisanego powyżej jej niedestrukcyjnego charakteru w odniesieniu do pobranych próbek tkankowych, może być również wykorzystana, jako metoda całkowicie nieinwazyjna w stosunku do organizmu badanego pacjenta [Schulmerich i wsp. 2006]. Stosowane są wtedy umiejscowione na skórze pacjenta, specjalnie ku temu zaprojektowane przystawki, które połączone są z aparaturą do pomiaru ramanowskiego rozpraszania światła za pomocą optyki z włókna szklanego (światłowodem). Technika ta zwie się *spatially offset Raman spectroscopy* (SORS) [Schulmerich i wsp. 2007]. Wykorzystując technikę SORS, konwencjonalny układ do badań ramanowskiego rozpraszania światła jest używany razem ze specjalnie zaprojektowanym urządzeniem optycznym zbudowanym na bazie światłowodu. Pomiar dokonywane są przez skórę pacjenta, a więc bez ingerencji w organizm i dzięki tej technice uzyskuje się wydzielenie widm ramanowskich z interesujących obszarów znajdujących się na różnej głębokości od powierzchni skóry. Następnie z otrzymanego widma ramanowskiego, wydziela się pasma ramanowskie zebrane na powierzchni skóry (główny obszar wzbudzenia światłem laserowym), jak również te z części podskórnej, gdzie wzbudzenie laserowe jest o wiele mniejsze (np. z kości). Urządzenia tego typu są urządzeniami przenośnymi i zminiaturyzowanymi. Dzięki wykorzystaniu tej techniki możliwe jest także określanie składu chemicznego oraz tomografia niskiej rozdzielczości. Ponieważ promieniowanie odbite przez tkanki rozprasza się we wszystkich kierunkach, pomiar promieniowania rozpraszania Ramana powyżej pewnej głębokości jest niezwykle trudny i wymaga bardzo dużej czułości aparatury. Z tego powodu spektroskopia Ramana powierzchniowo leżących kości, z miejsc istotnych klinicznie np.: nasada dalsza kości promieniowej, może być łatwiej dostępna niż pomiar z okolic głębiej położonych np.: z szyjki kości udowej. Pierwsze porównawcze badania *in vivo* prowadzone na zwierzętach (myszy laboratoryjne) pokazały wysoką zgodność pomiędzy wynikami uzyskanymi z

pomiarów metodami przez skórnymi, a pomiarami z eksponowanej kości [Schulmerich i wsp. 2009]. Czasy pomiarów, pojedynczego widma ramanowskiego, dla prototypowych systemów pomiarowych pierwszej generacji wahały się pomiędzy 2 a 3 minutami. Nawet na wstępnym etapie wdrożenia tego systemu, stosowalność tej metody, jako metody diagnostycznej ciągle wzrasta. Jednakże trudno jest nadal ocenić, czy testowane systemy ramanowskie spełniają oczekiwania diagnostyczne, czy też technika ta musi ulec jeszcze znacznemu ulepszeniu w celu wykorzystania jej choćby do przewidywania ryzyka złamań kości osteoporotycznych, bądź oceny zmian składu i struktury przestrzennej na tkankach ludzkich z odpowiednią dokładnością.

Podsumowując można, więc przytoczyć kilka praktycznych zastosowań wykorzystujących spektroskopię Ramana, jako narzędzie diagnostyczne. Dla klinicystów rysuje się możliwość przewidzenia ryzyka złamań kości, poddając ją analizie z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej. Możliwa jest także identyfikacja martwej tkanki kostnej (nekroza głowy kości udowej), określenie składu chemicznego oraz struktury przestrzennej kości, co znacznie może ułatwić ocenę „jakości kości”.

Rodzi się także konieczność, porównania metody spektroskopowej z innymi metodami diagnostycznymi pozwalającymi na ocenę kości i chrząstki. W wielu przypadkach taka ocena porównawcza jest niemożliwa, ponieważ spektroskopia ramanowska dostarcza informacji, których nie można uzyskać innymi metodami badawczo-diagnostycznymi. W opinii autora wyniki uzyskane dzięki spektroskopii ramanowskiej będą raczej uzupełniać, niż zastępować obecną diagnostykę, która dostarcza informację na temat samej budowy kości, nie odnosząc się przy tym do jej składu chemicznego. Stąd też prowadzone są dalsze intensywne badania połączone z próbą klinicznego wykorzystania spektroskopii ramanowskiej w celu uzyskania należytej odpowiedzi, czy nowa technika dostarcza zupełnie nowych i unikalnych informacji, czy raczej potwierdza wyniki uzyskane pośrednio, bądź bezpośrednio dzięki innym, stosowanym powszechnie metodom diagnostycznym. Wydaje się jednak, że wykorzystanie techniki ramanowskiej, jako narzędzia diagnostycznego stosowanego przeżyciowo do badania tkanki kostnej, może okazać się najdokładniejszą metodą jej oceny na poziomie mikrostrukturalnym.

VIII. WNIOSKI

1. Technika mikrospektroskopii Ramana jest właściwym narzędziem do określenia składu chemicznego i struktury tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym.
2. Ramanowskie wskaźniki: mineralizacji tkanki kostnej (WMTK), przestrzennej budowy kolagenu (WBPK) i proporcji hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W) są precyzyjnym wyznacznikiem stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych.
3. Badania techniką spektrometrii ramanowskiej wykazały istotne zmiany składu i struktury chemicznej tkanki podchrzęstnej głowy kości udowej związane z postępującym zwyrodnieniem stawu biodrowego. W tkance kostnej gąbczastej nie znaleziono zmian zwyrodnieniowych.
4. Zasadność zastosowania własnej klasyfikacji stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych do analizy zmian wartości średnich wskaźników ramanowskich, określających jakość kości potwierdzono częściowo metodami statystycznymi.
5. Przeprowadzone badania zmian struktur chrzęstno-kostnych w przebiegu zwyrodnienia stawu biodrowego mogą mieć wpływ na wdrożenie leczenia hamującego rozwój choroby.

IX. STRESZCZENIE

W przypadku choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych standardowymi metodami diagnostycznymi są metody obrazowania radiologicznego i biopsja tkanki kostnej. Inwazyjność metody badania kości poprzez biopsję oraz wysokie koszty i ograniczony dostęp do zaawansowanych metod diagnostyki obrazowej powodują, że nie są one powszechnie wykorzystywane zwłaszcza we wczesnych etapach ChZS biodrowych. Jedną z nowych propozycji, mogących mieć zastosowanie w badaniach struktur biologicznych, a co za tym idzie najprawdopodobniej również w diagnostyce zmian chorobowych, jest metoda spektroskopii Ramana. Jak dotąd opisane zostały widma spektralne uzyskiwane w wyniku analiz materiału kostnego głównie pochodzenia zwierzęcego [Timlin i wsp. 2000]. Stwierdzono, że we wczesnych stadiach ChZS, które najczęściej nie są dostatecznie zdiagnozowane, następują istotne zmiany w strukturze chemicznej molekuł macierzy zewnątrzkomórkowej [Day i wsp. 2004], które wyprzedzają zmiany morfologiczne. Dokładne ich opisanie i stworzenie norm dla różnych etapów ChZS jest istotne zwłaszcza dla jej wczesnych stadiów, kiedy to ani objawy kliniczne ani obrazowanie radiologiczne nie pozwalają na postawienie jednoznacznej diagnozy, a co za tym idzie byłoby niezwykle korzystne dla pacjentów, bowiem dawałoby szanse na wczesne wdrożenie terapii opóźniającej proces chorobowy. Aktualny stan wiedzy nie potwierdza, w jednoznaczny sposób, zmian struktury chemicznej ludzkiej tkanki chrzęstnej i kostnej w postępującej chorobie zwyrodnieniowej. Zastosowanie techniki spektroskopii Ramana wydaje się być celowym i użytecznym narzędziem w badaniach porównawczych zdrowych i zmienionych chorobowo struktur kostnych i chrzęstnych, a w dalszej konsekwencji również w diagnostyce ChZS. Badanie właściwości ludzkiej tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym metodą mikrospektroskopii Ramana jest istotnym novum prezentowanej pracy. Przegląd literatury przedmiotu, nie ujawnił, bowiem w polskim piśmiennictwie prac na temat wykorzystania spektroskopii ramanowskiej do badania i różnicowania zdrowych i chorobowo zmienionych struktur kostnych. W chwili obecnej jedynie w kilku ośrodkach naukowych w USA czynione są próby wykorzystania wyników uzyskanych przy pomocy techniki ramanowskiej do diagnozowania zmian chorobowych w układzie mięśniowo-szkieletowym [Morris 2010].

Celem pracy była ocena zależności między stopniem zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych oznaczanym według własnej klasyfikacji radiologicznej i uzyskanymi metodą spektroskopii Ramana parametrami określającymi właściwości tkanki kostnej: skład i strukturę chemiczną macierzy zewnątrzkomórkowej i strukturę przestrzenną kolagenu.

Materiał stanowiła grupa 35 pacjentów, w tym 24 kobiety i 11 mężczyzn, w wieku od 48 do 88 lat, którzy wyrazili pisemną zgodę na uczestnictwo w projekcie badawczym. Badaniom poddano materiał kostny pobrany z amputowanych głów kości udowych od 35 pacjentów, z których pięcioro nie wykazywało żadnych klinicznych i radiologicznych oznak ChZS biodrowych natomiast u pozostałych trzydziściorga, stwierdzono zmiany zwyrodnieniowe w różnym stopniu zaawansowania.

Metody badań. Z głów kości udowych pobrano pięć próbek, dwie z najbardziej i dwie z mniej obciążonych miejsc w warstwie podchrzęstnej i tkance gąbczastej oraz jedną z okolicy części środkowej głowy kości udowej. Badania struktury na poziomie tkankowym, komórkowym i struktury chemicznej pobranych próbek kostnych przeprowadzono z użyciem mikroskopu elektronowego skaningowego (SEM) i transmisyjnego (TEM) oraz w mikrospektroskopii Ramana. Badania mikroskopowe przeprowadzono dla dwóch skrajnych grup z siedmiostopniowej skali zaawansowania zmian zwyrodnieniowych stawów biodrowych. Zastosowanie techniki spektroskopii Ramana do oceny tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym, pozwoliło na zanalizowanie zmian wartości trzech badanych cech spektroskopowych: wskaźnika mineralizacji (WMTK), wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WBPK) i wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W) w zależności od miejsca pobrania próbek i oddzielnie dla warstwy podchrzęstnej i tkanki kostnej gąbczastej.

Wyniki badań w mikroskopii elektronowej SEM i TEM. W zależności od stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej zaobserwowano zmiany w strukturze chrząstki kostnej polegające na: (1) degradacji układu typowych warstw chrząstki szklistej (2) zmianach w układzie włókien kolagenowych charakteryzujących się rozszczepieniem kompaktowo ułożonych pęczków (3) pogrubieniu warstwy podchrzęstnej kości (4) obecności licznych otworów na powierzchni beleczek tej warstwy oraz (5) zniszczeniu struktury architektonicznej sieci beleczek kości gąbczastej.

Wyniki badań w spektroskopii Ramana. W miejscu maksymalnego obciążenia w warstwie podchrzęstnej u osób z ChZS biodrowych następuje zmniejszenie wartości średnich WMTK wraz ze wzrostem nasilenia zmian zwyrodnieniowych (grupy 0-VI). We wszystkich siedmiu grupach stwierdzono przeciętnie nieco wyższe wartości WMTK w miejscach mniej obciążonych tej samej warstwy, przy czym kierunek zmian wraz ze wzrostem zaawansowania zwyrodnienia jest taki sam jak w przypadku miejsc maksymalnie obciążonych. Wysoce istotne różnice na poziomie $p < 0,001$ zaobserwowano w wartościach średnich WBPK między odległymi od siebie grupami, w sensie stopnia zaawansowania zmian zwyrodnieniowych, np. między grupą 0, a grupami III-VI lub grupą II, a grupami IV-VI. Natomiast nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic między grupami bezpośrednio ze sobą sąsiadującymi. Podobnie jak w przypadku analizowanych powyżej wskaźników, również w odniesieniu do WH/W, oceny istotności zaobserwowanych różnic międzygrupowych potwierdziła, że grupy odległe na osi stopnia zaawansowania ChZS biodrowych różnią się wysoce istotnie ($p < 0,001$), natomiast różnice między grupami blisko lub bezpośrednio sąsiadującymi zwykle nie osiągają założonego poziomu istotności $p < 0,05$. Zredukowanie klasyfikacji siedmiostopniowej skali zaawansowania ChZS do pięciostopniowej, spowodowało uzyskanie proporcjonalnie większej liczby istotnych statystycznie różnic międzygrupowych w warstwie podchrzęstnej. Natomiast wszystkie trzy ramanowskie wskaźniki, badane w tkance gąbczastej, zarówno w pierwotnej siedmiostopniowej klasyfikacji, tak i w zmodyfikowanej – pięciostopniowej, nie wykazywały statystycznie istotnego zróżnicowania, ani w zależności od zaawansowania ChZS, ani od miejsca pobrania próbki. Jedynie w przypadku WH/W ujawniły się pewne różnice między zaawansowanym, a łagodnym i między zaawansowanym, a umiarkowanym stopniem zwyrodnieniowych zmian w stawach biodrowych.

Potrzeba stworzenia nowej klasyfikacji wynikała z trzech przyczyn: (1) zastosowanie wyłącznie klasyfikacji wg Kellgren'a i Lawrence'a utrudniało jednoznaczną ocenę zmian obserwowanych na radiogramach, a brak w obrazie radiologicznym osteofitów przy wzroście ciężkości ChZS biodrowych, uniemożliwiał klasyfikację zwyrodnienia na wyższy stopień zaawansowania choroby, (2) użycie klasyfikacji wg Croft'a i Lane'a zawężyło możliwości oceny stopnia nasilenia zwyrodnienia stawów biodrowych do trzech grup, co powodowało, iż dana grupa była bardzo niejednorodna pod

względem korelacji obrazu radiologicznego z objawami klinicznymi, (3) zastosowanie spektrometrii Ramana – metody o wysokiej precyzji oceny jakości kości, sugerowało konieczność zastosowania dokładniejszej klasyfikacji stopnia zaawansowania ChZS, która pozwoliłaby na wyróżnienie mniejszych, jednorodnych grup i dokonanie analizy współzależności z ramanowskimi wskaźnikami.

Głównymi osiągnięciami niniejszego opracowania są: (1) wiarygodne potwierdzenie możliwości zastosowania techniki spektroskopii Ramana do oceny tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym i (2) potwierdzone statystycznie zróżnicowanie wartości trzech analizowanych cech (wskaźnika mineralizacji, wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu i wskaźnika hydroksyapatytu do węglanoapatytu) w zależności od stopnia zaawansowania ChZS biodrowych, (3) stwierdzenie, że zmiany składu i struktury chemicznej macierzy zewnątrzkomórkowej w zależności od nasilenia zmian zwyrodnieniowych ujawniają się w warstwie podchrzęstnej głowy kości udowej. Ponadto ustalono, że dotychczas stosowane klasyfikacje stopnia zaawansowania ChZS biodrowych w tym klasyfikacja własna nie wyczerpują jej znamion, zwłaszcza w perspektywie możliwości zastosowania wysoce precyzyjnych technik analitycznych. Dlatego otwartą kwestią pozostaje stworzenie takiej klasyfikacji, która odzwierciedli współzależności między obrazem radiologicznym, objawami klinicznymi i wynikami badań metodą spektroskopii Ramana.

Wnioski

1. Technika mikrospektroskopii Ramana jest właściwym narzędziem do określenia składu chemicznego i struktury tkanki kostnej na poziomie subkomórkowym.
2. Ramanowskie wskaźniki: mineralizacji tkanki kostnej (WMTK), przestrzennej budowy kolagenu (WBPK) i proporcji hydroksyapatytu do węglanoapatytu (WH/W) są precyzyjnym wyznacznikiem stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych.
3. Badania techniką spektrometrii ramanowskiej wykazały istotne zmiany składu i struktury chemicznej tkanki podchrzęstnej głowy kości udowej związane z postępującym zwyrodnieniem stawu biodrowego. W tkance kostnej gąbczastej nie znaleziono zmian zwyrodnieniowych.

4. Zasadność zastosowania własnej klasyfikacji stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych do analizy zmian wartości średnich wskaźników ramanowskich, określających jakość kości potwierdzono częściowo metodami statystycznymi.
5. Przeprowadzone badania zmian struktur chrzęstno-kostnych w przebiegu zwyrodnienia stawu biodrowego mogą mieć wpływ na wdrożenie leczenia hamującego rozwój choroby.

IX. ABSTRACT

The standard diagnostic methods of the hip joint osteoarthritis are X-ray imaging and biopsy of the bone tissue. The biopsy of the bone is highly invasive method as well as high costs and limited access to the advanced diagnostic imaging methods, means that they are not widely used, especially at the early stages of hip joint osteoarthritis. Raman spectroscopy is one of the new propositions, which could be used in examining of the biological structures and therefore also in diagnosing of osteoarthritis. So far only optical spectra from the analysis of the bone material, mainly from animals, were described [Timlin et al. 2000]. It was discovered that at the early stages of OA, usually seldom diagnosed, there are some important changes in the chemical structure of the molecules of the extracellular matrix [Day et al. 2004], which precede morphological changes. The detailed description, as well as creating norms for different stages of OA would be important, especially when it comes to its early stages, when neither the clinical symptoms, nor X-Ray imaging allow for the unequivocal diagnosis. Therefore it would be highly beneficial to the patients. It would allow the early start of the therapy slowing down the progress of the disease. The current state of knowledge does not confirm unambiguously the changes in the chemical structure of the human cartilage and bone in the progressing OA. Raman spectroscopy seems to be an advisable and useful tool in comparative examination of the healthy and pathological bone and cartilage structures, in a longer perspective also in diagnosing OA. The examination of the human bone tissue on a subcellular level using the Raman microspectroscopy is an important innovation novelty of this dissertation. Literature review revealed no publications in the base of the Polish Medical Bibliography, on the use of spectroscopy to study and differentiate healthy and pathological bone structures. Researching the writing in Poland on the subject does not show works on using Raman spectroscopy to diagnose and differentiate healthy and pathological bone structures. Right now only in a few research centers in the USA there are attempts to use the results of using Raman technique for diagnosing pathological changes in the musculoskeletal system [Morris 2010].

This aim of the study is to evaluate the relations between the hip joint osteoarthritis severity, estimated based on own X-ray classification and the bone tissue parameters

(composition and chemical structure of the extracellular matrix, and also the spatial structure of collagen, obtained while using Raman spectroscopy.

Material

The material was a group of 35 patients, 24 women and 11 men, aged between 48 and 88, who gave written informed consent to participate in the research project. Also researched was the Bone material from amputated femoral heads from these 35 patients has been examined. Five of all patients had no clinical or radiological signs of hip joint osteoarthritis, and the other 30 there were pathological changes in different severity.

Methods

Five samples were taken from each femoral heads: two from their most loaded and two from less loaded areas in subchondral layer and in spongy bone tissue and also one sample from the central part of the spongy tissue of the femoral heads. Examining the structure of the bone sample on the tissue, cellular and chemical composition levels was performed with a Scanning Electron Microscope (SEM) and Transmission Electron Microscope (TEM), as well as Raman microspectroscopy. Microscopic examinations were conducted for two extreme groups of own seven-point scale of progressive osteoarthritis in hip joint. Using Raman spectroscopy to evaluate bone tissue on the subcellular level allowed analysis of changes in three measured spectroscopy indexes: BTMI – bone tissue mineralization index (*Polish WMTK*) CSSI – collagen spatial structure index (*Polish WBPK*) and HCR – hydroxyapatite to carbon-apatite ratio (*Polish WH/W*) depending on the place of sampling and separately for the subchondral layer and spongy bone tissue.

Results

The results of using Electron Microscopy: SEM and TEM. Depending on the level of advancement of the OA, there were changes in the cartilage-bone structure: (1) degradation of the structure of typical layers of hyaline cartilage, (2) changes in the structure of the collagen fibers - splitting the compactly arranged bundles (3) thickening of the subchondral layer, (4) presence of numerous openings on the trabeculae of the subchondral layer, and (5) the architecture of the trabecular network destruction in the spongy bone.

The results of Raman spectroscopy. In the area of maximum load of the femoral head in persons with hip osteoarthritis the mean values of BTMI in subchondral layer are

decreased with increasing of OA severity (groups 0-VI). In all seven study groups there were on average slightly higher levels of BTMI in all areas of a lesser load in the same layer, however the direction of the changes as the pathological changes get bigger is the same, as in the case of the areas of maximum load. Highly statistically significant ($p < 0,001$) differences of CSSI mean values were observed between opposite groups in the sense of the advancement of the pathological changes, e.g. between group 0 and groups III-VI or between group II and groups IV-VI. However there were no statistically significant differences between the groups bordering with each other directly. As in the case of indicators analyzed above, also in case of HCI the assessment of the statistical significance of observed intergroup differences proved that the groups distant on the axis of the hip joint osteoarthritis severity differ highly significantly ($p < 0,001$), but the differences between the groups directly bordering with each other or close usually did not reach the required level ($p < 0,05$) of statistical significance

Reducing the seven-grade classification scale of osteoarthritis severity to five-grade resulted in proportionally higher number of statistically significant intergroup differences in the subchondral layer. However all three Raman indicators examined in the spongy bone tissue, both in the seven-grade classification and in the modified five-grade one did not show statistically important differentiation neither depending on the advancement level of OA or the area where the sample was taken from. Only in case of HWR there were some differences between advanced and mild and between advanced and moderate levels of osteoarthritis changes in the hip joint.

Discussion

The need to create a new classification system had three reasons: (1) applies only classification by Kellgren and Lawrence made it difficult to unequivocally evaluate the changes observed in radiograms, and the lack of osteophytes in the radiological imaging in more advanced cases of hip joint osteoarthritis made it impossible to classify them to the higher stage of the disease, (2) use of the classification system according to Croft and Lane narrowed the assessment of the level of advancement of the hip joint degeneration to three groups only, what meant that the particular group was highly non-homogenous in terms of correlation of the radiological imaging and clinical symptoms, (3) use of Raman spectrometry – the method of high-precision assessment of bone quality, , suggested need

to apply more detailed classification of hip joint osteoarthritis severity which would allow to differentiate smaller and more homogenous groups and analyze correlations with Raman indexes.

The main achievements of this dissertation are: (1) feasible confirmation of usefulness of Raman spectroscopy technique to assess bone tissue on the subcellular level, (2) statistically proven differentiation of the levels of three analyzed indicators (bone tissue mineralization, spatial structure of collagen and the ratio of hydroxyapatite to carbon-apatite) depending on the advancement level of OA of the hip, (3) recognition of the fact that the chemical composition and structure of the extracellular matrix in correlation with the advancement of the degeneration manifests in the subchondral bone of the head of the femoral. On top of that it was established that the previously used systems of the classification of the advancement of the OA of the hips, including own one, are not exhaustive, especially when highly precise analytical methods are available. Therefore it still remains open to create a classification system that would reflect correlations between the radiological imaging, clinical symptoms and the results of using Raman spectroscopy.

Conclusions

1. Raman microspectroscopy is an efficient tool to determine the chemical composition and bone tissue structure on the subcellular level.
2. Raman indicators: of bone tissue mineralization (BTMI), of collagen spatial structure (CSSI) and of the hydroxyapatite to carbon-apatite ratio (HCR) are precise measures of the stage of the hip joint osteoarthritis.
3. Raman spectrometry shows that there are important alterations of the composition and chemical structure in the subchondral layer of the femoral head as the degeneration of the hip progresses, but there are no such changes in the spongy bone tissue.
4. The usefulness of own classification of the hip osteoarthritis stages for the analysis of the changes of the Raman indexes mean values, describing the bone quality, was partially confirmed by statistical methods.
5. Using Raman spectroscopy to examine the cartilage-bone structures of hip joint osteoarthritis, especially in its early stages, can affect the treatment, inhibiting the further development of the disease, and could improve the quality of life of patients.

XI PIŚMIENNICTWO

1. Akkus O, Adar F, Schaffler MB: Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cartilage bone. *Bone*. 2004;34:443-453
2. Awonusi A, Morris MD, Tecklenburt MM: carbonate assignment and calibration in the Raman spectrum of apatite. *Calcif Tissur Int*. 2007;81:46-52
3. Bailey AJ, Mansell JP, Sims TJ, Banse X: Biochemical and mechanical properties of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology* 2004, 41(3-4):349-358
4. Bakker Schut TC, Witjes MJH, Sterenborg HJCM, Speelman OC, Roodenburg JLN, Marple ET, Bruining HA, Puppels GJ: In Vivo Detection of Dysplastic Tissue by Raman Spectroscopy. *Anal Chem* 2000, 72(24):6010-6018
5. Bazin D, Chappard C, Combes C, Carpenter X, Rouziere S, Andre G, Matzen G, Allix M, Thiaudiere D, Reguer S, Jungers P, Daudon M: Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bone. *Osteoporosis Int*.2009;20:1065-1075
6. Bergmann G, Deuretzbacher G, Heller M, Graichen F, Rohlmann A, Strauss J, Duda G: Hip contact forces and gait patterns from routine activities. *J Biomech*. 2001;34:859-871]
7. Boskey A, Mendelsohn R: Infrared analysis of bone in health and disease. *J Biomed Opt*. 2005;10:031102
8. Boskey A: Bone mineral crystal size. *Osteoporos Int*. 2003;14(Suppl 5)516-520
9. Boyde A, Maconachie E, Reid SA, Delling G, Mundy R: Scanning electron microscopy in bone pathology: review of methods, potential and applications. *Scanning Electron Microscopy* 1996, 1537-1554
10. Brennan JF, Wang Y, Dasari RR, Feld MS: Near-infrared Raman Spectrometer System for Human Tissue Studies. *Applied Spectroscopy* 1997, 51(2):201-208
11. Burr DB, Schaffler MB: The involvement of subchondral mineralized tissues in osteoarthritis: Quantitative microscopic evidence. *Microscopy Research and Technique* 1997, 37(4): 343-257
12. Busa B, Miller L, Rubin C, Qin YX, Judex S: Rapid Establishment of Chemical and Mechanical Properties during Lamellar Bone Formation. *Calcified Tissue International* 2005, 77(6):386-394
13. Carden A, Morris MD: Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of Biomedical Optics* 2000, 5(3):259-268.

14. Croft P, Cooper C, Wickham C, Coggon D: Defining osteoarthritis of the hip epidemiologic studies. *Am J Epidemiol.*1990;132:514-522
15. Day JS, van der Linden JC, Bank RA, Ding M, Hvid I, Sumner DR, Weinans H: Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology* 2004, 41(3-4):259-368
16. de Mul FFM, Otto C, Greve J, Arends J, ten Bosch JJ: Calculation of the Raman line broadening on carbanation in synthetic hydroxyapatite. *J Raman Spectrosc.*1998;19:13-21
17. Dehring KA, Smukler AR, Roessler BJ, Morris MD: Correlating Changes in Collagen Secondary Structure with Ageing and Defective Type II Collagen by Raman Spectroscopy. *Applied Spectroscopy* 2006, 60(4):366-37
18. Derfus B, Kranendonk S, camacho N, mandel N, Kushnaryov V, Lynch K, Ryan L: Human Osteoarthritic Cartilage Matrix Vesicles Generate both Calcium Pyrophosphate Dihydrate and Apatite In Vivo. *Calcified Tissue International* 1998, 63(3):258-262
19. Dieppe PA: Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints; *Osteoarthritis Cartilage* 1995;3:73-7
20. Drozdowski M: *Spektroskopia ciała stałego*, WPP, Poznań 1996
21. Edwards HGM, Carter EA: *Biological Applications of Raman Spectroscopy*, vol. 24. New York:Marcel Dekker Inc.; 2001
22. Esmonde-White KA, Raman spectroscopy detection of molecular changes associated with osteoarthritis. PhD dissertation. 2009; The University of Michigan. http://deepblue.lib.umich.edu/bitstream/2027.42/64589/1/kareshni_1.pdf
23. Faibish JJ, Orr SM, Boskey AL: Mineral changes in osteoporosis: a review. *Clin Orthop Relat Res.* 2006;443:28-38
24. Felson DT, Neogi T: Osteoarthritis: Is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis & Rheumatism* 2004, 50(2):341-344.
25. Ferguson VL, Bushby AJ, Boyde A: Nanomechanical properties and mineral concentration in articular calcified cartilage and subchondral bone. *Journal of Anatomy* 2003, 203:191-202
26. Garden A, Morris M.D.: Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissue(review). *Journal of Biomedical Optics* 2000, 5(3):259-268.
27. Gremlich H-U, Yan B: *Infrared and Raman Spectroscopy of Biological Materials*, Tennessee, USA, 2001

28. Heger M, Mordon S, Leroy G, Fleurisse L, Creusy C: Raman microspectrometry of laser-reshaped rabbit articular cartilage: preliminary study on laser-induced cartilage mineralization. *Houranal of Biomedical Optics* 2006, 11(2):024003-024008.
29. Jones SJ, Boyde A, Ali NN: The resorption of biological and nonbiological substrates by cultered avian and mammalian osgteoclasts. *Anatomy & Embriology* 1984, 170, 247-256
30. Jones SJ, Boyde A: Histomorphometry of Howship's lacunae formed in vivo and in vitro: depths and volumes measured by scanning electron and confocal microscopy. *Bone* 1993, 14, 455-460
31. Judex S, Boyd S, Qin Y-X, Miller L, Muller R, Rubin C: Combining high-resolution micro-computed tomography with material composition to define the quality of bone tissue. *Curr Osteoporos Rep.* 2003;1:11-19
32. Kęcki Z: *Podstawy spektroskopii molekularnej*, PWN 1975, Warszawa
33. Kellgren J H, Lawrence J S: Radiological assesment of osteoarthritis . *Ann Rheum Dis.* 1957;16: 494- 502
34. Lane NE, Nevitt MC, Genant HK, hochberg MC: Reliability of new indices of radiographic osteoarthritis of the hand and hip and lumbar disc degeneration. *J Rheumatol* 1993;20:1911-8
35. Lee YS, Oh SH, Seon JK, Song EK, Yoon TR: 3D femoral neck anteversion measurements based on the posterior femoral plane in ORTHODOC system. *Med Biol Eng Comput.*2006;44:895-906]
36. Legros R, Balmain N, Bonel G: Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcif Tisur Int.* 1987;41:137-144
37. Li B, Aspden RM: Composition and Mechanical Properties of Calcellous Bone from the Femoral Head of Patients with Osteoporosis or Osteoarthritis. *Journal of Bone and Mineral Research* 1997, 12(4):641-651
38. Lubovsky O, Wright D, Hardisty M, Kiss A, Kreder HJ, Whyne C: importance of the dome and posterior wall as evidenced by bone density mapping in the acetabulum.; *Clin Biomech.* 2010doi: 10. 1016/j.clinbiomech.2010.11.002.]
39. Mahadevan-Jansen A: Raman Spectroscopy: From Benchtop to Bedside. In: *Biomedical Photonics Handbook*. Edited by Vo-Dinh T. Boca Raton : CRC Press; 2003
40. Mak P. *Badania struktur mioglobiny, hemoglobiny i jej hybryd metodami rezonansowej spektroskopii Ramana*. Praca doktorska. 2004; Uniwersytet Jagielloński. Kraków

41. Matousek P, Draper ER, Goodship AE, Clark IP, Ronayne KL, Parker AW. Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo. *Appl Spectrosc.* 2006;60:758-763
42. Mendelsohn R, Paschalis EP, Boskey AL: Infrared spectroscopy, microscopy and microscopic imaging of mineralizing tissues: spectra-structure correlations from human iliac crest biopsies. *J Biomed Opt.* 1999;4:14-21.
43. Merx H, Dreinhofer K, Schrader P, Stürmer T, Puht W, Günther K-P, et al. International variation in hip replacement rates. *Ann Rheum Dis* 2003;62:222-6
44. Miller LM, Carlson CS, Carr GL, Chance MR: A method for examining the chemical basis for bone disease: synchrotron infrared microspectroscopy. *Cellular and Molecular Biology (Noisy le Grand)* 1998, 44(1): 117-127
45. Mkukuma LD, Imrie CT, Skakle JMS, Hukins DWL, Aspden RM: Thermal stability and structure of cancellous bone mineral from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Ann Rheum Dis* 2005, 64(2):222-225].
46. Morris MD. Transcutaneous Raman spectroscopy of murine bone in vivo. *Appl Spectrosc.* 2009; 63:286-295].
47. Morris MD: Raman Assessment of Bone Quality. *Clin Orthop Relat Res*, 2010
48. Olsza M, Cheng X, Jee S, Kumar R, Kim Y: Bone structure and formation: A new perspective, *Materials Science and Engineering R* 2007(58):77-116
49. Panel G, Delfosse C, Descamps M, Leroy G: *Bone*, 2005, (36): 893-901
50. Puppels GJ: In Vivo Raman Spectroscopy. In: *Handbook of Raman Spectroscopy: From the Research Laboratory to the Process Line*. Edited by Lewis IR, Edwards HMG. New York: Marcel Dekker; 2001
51. Resnick N, Niwayama G: *Degenerative Diseases. Diagnosis of Bone and Joint Disorders*. Philadelphia, PA: W.B. Saunders Company; 1988
52. Schulmerich MV, Cole JH, Kreider JM, Esmonde-White F, Dooley KA, Goldstein SA,
53. Schulmerich MV, Dooley KA, Banasse TM, Goldstein SA, Morris MD. Subsurface and transcutaneous Raman spectroscopy and mapping using concentric illumination rings and collection with a circular fiber-optic array. *Appl Spectrosc.* 2007;61:671-678.
54. Schulmerich MV, Dooley KA, Morris MD, Vanasse TM, Goldstein SA. Transcutaneous fiber optic Raman spectroscopy of bone using annular illumination and a circular array of collection fibers. *J Biomed Opt.* 2006;11:060502.

55. Sun Y, Gunther KP, Brenner H: Reliability of radiographic grading of osteoarthritis of the hip and knee. *Scand J Rheumatol* 1997;26:155-65
56. Timlin J, Carden A, Morris M.D., *Appl Spect*, 1999, 53, 1429-1435
57. Timlin JA, Carden A, Morris MD, Rajachar RM, Kohn D: raman spectroscopic imaging markers for fatigue-related microdamage in bovine bone. *Anal Chem* 2000, 72:2229-2236.
58. Tonnis D, Heinecke A: Acetabular and femoral anteversion: relationship with osteoarthritis of the hip. *J Bone Joint Surg Am.* 1999;81:1747-1770
59. Ueno M, Shibata A, Yasui S, Yasuda K, Ohsaki K: A proposal on the cartilage tissue remineralization in osteoarthritis of the knee joint investigated by FT-IR spectrometry. *Cellular and Molecular Biology* 2003, 49(4):613-619.
60. Wright D, Whyne C, Hardisty M, Kreder H, Lubovsky O: Functional and Anatomic Orientation of the Femoral Head; *Clinical Research*, I 2011
61. Yerramshetty JS, Lind C, Akkus O: The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone* 2006;39:1236-1243

Spis tabel

- Tab. 1 Skala zaawansowania zmian radiologicznych w chorobie zwyrodnieniowej stawów według Kellgren'a i Lawrence'a [1957].
- Tab. 2 Skala zaawansowania zmian radiologicznych w chorobie zwyrodnieniowej stawów według Croft'a i Lane'a
- Tab. 3 Charakterystyka badanych pacjentów według płci i wieku oraz stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych według trzech różnych klasyfikacji.
- Tab. 4 Własna klasyfikacja radiologiczna choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, powstała z połączenia dwóch klasyfikacji K&L i C&L.
- Tab. 5 Skala zaawansowania zmian radiologicznych w ChZS biodrowych według własnej klasyfikacji siedmiostopniowej.
- Tab. 6 Statystyki opisowe dla wskaźnika mineralizacji w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.
- Tab. 7 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0-VI) i między różnie obciążonymi miejscami (1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony) dla wskaźnika mineralizacji w warstwie podchrzęstnej, według oceny testem Tukeya-Kramera.
- Tab. 8 Statystyki opisowe dla wskaźnika mineralizacji w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.
- Tab. 9 Statystyki opisowe dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu w warstwie podchrzęstnej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.
- Tab. 10 Poziom istotności różnic międzygrupowych (0-VI) i między różnie obciążonymi miejscami (1 – obszar najbardziej obciążony, 2 – obszar mniej obciążony) dla wskaźnika przestrzennej budowy kolagenu (WPBK), w warstwie podchrzęstnej, według oceny testem t-Studenta i testem Tukeya-Kramera.
- Tab. 11 Statystyki opisowe dla wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu (WPBK) w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce pobrania próbek w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS.

Spis rycin

- Ryc. 1 Schemat budowy stawu biodrowego – przekrój czołowy
- Ryc. 2 Trójwymiarowe obrazowanie kąta antewersji szyjki kości udowej (A) i kąta szyjkowo-trzonowego (B), w oparciu o anatomiczne punkty referencyjne 2D i 3D oraz metodą funkcjonalną (F).
- Ryc. 3 Liczba pacjentów według płci leczonych operacyjnie z powodu choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych w latach 2005 – 2010 w Polsce.
- Ryc. 4 Rozkład częstości zabiegów endoprotezoplastyki z powodu ChZS biodrowych w zależności od wieku pacjentów. Dane NFZ za 2010 roku.
- Rys. 5 Pasma spektralne z naniesionymi parametrami opisowymi [za Drozdowski 1996]
- Rys. 6 Mikro-spektroskop Ramana inVia firmy Renishaw (www.renishaw.com.pl)
- Rys. 7 Typowe widmo Ramana warstwy podchrzęstnej kości (udostępnione z materiałów własnych T. Buchwalda)
- Rys. 8 Miejsca pobrania materiału kostno-chrzęstnego z głowy kości udowej.
- Ryc. 9 Liczba wykonanych pomiarów widm Ramana wg miejsca pobrania tkanki kostnej.
- Ryc. 10 Zmiany średnich wartości wskaźnika mineralizacji w grupach różnego zaawansowania ChZS biodrowych w miejscach najbardziej i mniej obciążonej warstwy podchrzęstnej.
- Ryc. 11 Zmiany średnich wartości wskaźnika mineralizacji w grupach różnego zaawansowania ChZS biodrowych w trzech miejscach pobrania tkanki z warstwy gąbczastej głowy kości udowej.
- Ryc. 12 Porównanie zmian wartości WBPk w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w warstwie podchrzęstnej kości z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.
- Ryc. 13 Porównanie zmian wartości WSPk w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.
- Ryc. 14 Porównanie średnich wartości wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu dla obszaru najbardziej obciążonego w tkance podchrzęstnej i gąbczastej w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS biodrowych.

- Ryc. 15 Porównanie średnich wartości wskaźnika budowy przestrzennej kolagenu dla obszaru mniej obciążonego w tkance podchrzęstnej i gąbczastej w poszczególnych grupach zaawansowania ChZS biodrowych.
- Ryc. 16 Porównanie zmian wartości WH/W w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w warstwie podchrzęstnej kości z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.
- Ryc. 17 Porównanie zmian wartości WH/W w grupach zaawansowania ChZS biodrowych w kości gąbczastej z uwzględnieniem podziału na miejsce obciążenia.

Spis fotografii

- Fot. 1 Próbkę kości przygotowane do oceny w elektronowym mikroskopie skaningowym
- Fot. 2 Wycinek chrzęstno-kostny pobrany z głowy kości udowej osoby zdrowej. A – chrząstka szklista, B – warstwa podchrzęstna, C – tkanka gąbczasta.
- Fot. 3 Przekrój poprzeczny chrząstki stawowej, warstwy podchrzęstnej oraz kości gąbczastej (SEM) powiększ. x 43
- Fot. 4 Powierzchnia chrząstki stawowej (SEM) powiększ. x 83. Z - złuszczenia
- Fot. 5 Przekrój chrząstki z widocznymi regularnie ułożonymi jamkami chrzęstnymi (SEM) powiększ. x 142. A1 – warstwa przypowierzchniowa, A2 – warstwa pośrednia, A3 – warstwa głęboka, A4 – warstwa zmineralizowana, J – jamki chondrocytów
- Fot. 6 Elektronogram chondrocytu i substancji pozakomórkowej z włóknkami kolagenowymi w części głębokiej chrząstki (TEM) powiększ. x 2000
- Fot. 7 Powierzchnia chrząstki stawowej z zagłębieniami (SEM) powiększ. x 89. W – wgłębienia (kawerny)
- Fot. 8 Pęknięcia w warstwie przypowierzchniowej chrząstki szklistej (SEM) powiększ. x 371. P - pęknięcie
- Fot. 9 Przekrój zredukowanej chrząstki opierającej się na arkadach beleczek kostnych (SEM) powiększ. x 43. A – chrząstka szklista B – warstwa podchrzęstna
- Fot. 10 Elektronogram zdegenerowanego chondrocytu w warstwie przylegającej do obszaru podchrzęstnego (TEM) powiększ. x 2000
- Fot. 11 Przekrój powierzchni głowy kości udowej z obszernymi zagłębieniami (Z) i rozwłókniona (R) częścią bazalną chrząstki (SEM) powiększ. x 33.
- Fot. 12 Przekrój chrząstki przedstawiający rozszczepienie struktury włóknistej w części bazalnej chrząstki (SEM) powiększ. x 628.
- Fot. 13 Obrazowanie struktury tkanki kostnej podchrzęstnej z jej zauważalną „porowatością” (SE mode powiększ. x 192).
- Fot. 14 Obraz powierzchni głowy kości udowej pozbawionej chrząstki. (SEM powiększ. x 31).
- Fot. 15 Struktury osteonopodobne utworzone przez blaszki kostne warstwy podchrzęstnej (SEM – SE mode).

- Fot. 16 Obraz powierzchni stawu z widocznym osteonem oraz pokruszonymi odłamami kostnymi beleczek warstwy podchrzęstnej (SEM powiększ. x 225)
- Fot. 17 Powiększenia beleczek kostnych z częściowo zachowanym regularnym układem kolagenu i miejscami rozszczepienia litej blaszki włóknistej (SEM A – powiększ. x 192, B – powiększ. x 501).
- Fot. 18 Obraz rozszczepionej blaszki włóknistej w warstwie podchrzęstnej. (SEM powiększ. x 192).
- Fot. 19. Mikrobeczkowe wtręty wypełniające liczne pory wraz z lipocytami w tkance kostnej podchrzęstnej.