

Lekarz Paweł Kasprzak

**Analiza zmian mikrostrukturalnych kości metodą spektroskopii Ramana u kobiet
z deformacją szpotawą stawu kolanowego w przebiegu pierwotnej choroby
zwyrodnieniowej stawów kolanowych**

Rozprawa na stopień doktora w dziedzinie nauk medycznych i nauk o zdrowiu,
w dyscyplinie nauki medyczne

Promotorzy:

Prof. zw. dr hab. n. med. Maciej Głowacki

Dr hab. Mirosław Szybowicz, prof. PP



Kolegium Nauk Medycznych
Uniwersytet Medyczny im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Poznań 2021

Pracę wykonano:

w Katedrze i Klinice Ortopedii i Traumatologii Dziecięcej

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu,

Zakładzie Spektroskopii Optycznej na Wydziale Inżynierii Materiałowej
i Fizyki Technicznej Politechniki Poznańskiej

oraz w Oddziale Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu
Szpitala w Puszczykowie

Spis treści

1. Wstęp	5
1.1. Wprowadzenie	5
1.2. Anatomia, anatomia czynnościowa i kinematyka stawu kolanowego	6
1.3. Budowa i mikrostruktura tkanki kostnej	8
1.4. Choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych	10
1.5. Diagnostyka i ocena radiologiczna choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych	13
1.6. Zaburzenia osi stawu kolanowego w chorobie zwyrodnieniowej	17
1.7. Wyznaczanie osi kończyny dolnej	19
1.8. Leczenie choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych	22
2. Spektroskopia Ramana w badaniu tkanki kostnej	25
2.1. Podstawy fizyczne w spektroskopii Ramana	25
2.2. Wykorzystanie spektroskopii Ramana w badaniu tkanki kostnej	27
3. Założenia i cel pracy	32
3.1. Założenia pracy	32
3.2. Cel pracy - wprowadzenie	33
3.3. Cel pracy	33
4. Materiał	34
5. Metodyka badań	37
5.1. Ocena kliniczna	37
5.2. Metodyka oceny badania radiologicznego	37
5.3. Śródoperacyjna ocena chrząstki stawowej	40
5.4. Technika pobrania i przygotowania materiału chrzęstno – kostnego	41
5.5. Badanie z wykorzystaniem spektroskopii i systemu mikroramanowskiego	43
5.6. Opracowanie wyników badań i analiza statystyczna	45
6. Wyniki	46
6.1. Liczebność badanej próby	46
6.2. Rezultaty obserwacji klinicznej i statystyka ogólna	47
6.3. Zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych a zmiany w deformacji szpotawej	54

6.4. Zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych a wiek	58
6.5. Kąt deformacji szpotawej a nasilenie uszkodzenia chrząstki	58
6.6. Porównanie wskaźników mierzonych metodą spektroskopii ramanowskiej, w zależności od miejsca pobrania, w stosunku do poziomu deformacji	59
6.7. Porównanie wskaźników w zależności od miejsca pobrania w stosunku do zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w skali Kellgrena- Lawrence'a	73
6.8. Ocena korelacji pomiędzy BMI a kątem deformacji szpotawej	78
6.9. Stopień zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych w skali Kellgrena- Lawrence'a a BMI	78
6.10. Ocena korelacji pomiędzy początkiem objawów a uszkodzeniem chrząstki ocenianym w skali Outerbridge	79
6.11. Ocena korelacji pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami a początkiem objawów liczonym w latach	79
6.12. Ocena korelacji pomiędzy stopniem uszkodzenia chrząstki stawowej, poszczególnymi wskaźnikami a iniekcjami dostawowymi	79
7. Omówienie wyników i dyskusja	80
8. Wnioski	92
9. Streszczenie w języku polskim	93
10. Streszczenie w języku angielskim	95
11. Piśmiennictwo	97
12. Załączniki	105

BAP - hydroksyapatyt kostny (ang. bone apatite)

BMI – indeks masy ciała (ang. body mass index)

CI - wskaźnik zmiany mineralizacji (ang. change index)

CCI - wskaźnik uporządkowania włókien kolagenowych (ang. collagen configuration index)

ChZSK - choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych

cm⁻¹ – centymetr odwrotny, jednostka liczby falowej

dGEMRIC - technika obrazowania chrząstki stawowej w oparciu o opóźnione, wzmocnione działanie gadoliny (ang. delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage)

ECM – macierz zewnątrzkomórkowa (ang. extracellular matrix)

HCR - stosunek hydroksyapatytu do kolagenu (ang. hydroxyapatite – collagen ratio)

HKA – kąt biodrowo – kolanowo – skokowy (ang. hip – knee – ankle angle)

IR – spektroskopia w podczerwieni (ang. infrared spectroscopy)

K-L – skala Kellgrena – Lawrence’a

ŁZS – łuszczykowe zapalenie stawów

MI – wskaźnik mineralizacji (ang. mineralization index)

NCP – białka niekolagenowe (ang. non – collagenous proteins)

RZS – reumatoidalne zapalenie stawów

WHO – Światowa Organizacja Zdrowia (ang. World Health Organization)

ZZSK – zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa

1. WSTĘP

1.1. Wprowadzenie

Choroba zwyrodnieniowa stawu kolanowego jest jedną z głównych przyczyn przewlekłych dolegliwości bólowych, a w swoich bardziej zaawansowanych stadiach trwale upośledza narząd ruchu, ogranicza aktywność ruchową, życie zawodowe i codzienne funkcjonowanie pacjentów. W swojej istocie jest przede wszystkim zaburzeniem równowagi między procesem degeneracji i regeneracji chrząstki stawowej, przerostu warstwy podchrzęstnej kości, tworzenia osteofitów, co prowadzi do stopniowego upośledzenia funkcji stawu (Martel-Pelletier, 2004). Choroba zwyrodnieniowa stawów jest stanem, w którym dochodzi do wieloczynnikowej niewydolności wszystkich struktur budujących staw, w tym chrząstki, kości, płynu stawowego, obserwowanego na poziomie mikrostrukturalnym i makrostrukturalnym (Day i wsp., 2004). Postępująca dysfunkcja stawu powoduje ograniczenie ruchomości, wydolności poruszania się oraz przewlekłe dolegliwości bólowe (Radin, 2004).

Staw kolanowy jest drugim umiejscowieniem co do częstości wykonywania endoprotezoplastyki stawu w przebiegu choroby zwyrodnieniowej, stanowiąc tym samym istotny problem z punktu widzenia epidemiologii, szczególnie pod względem rosnącej liczby pacjentów z niesprawnością narządu ruchu (Jinks i wsp., 2007). Szacuje się, że po 30 roku życia zmiany patologiczne mogą być stwierdzone u 30% populacji. Po 65 roku życia 40 - 50% populacji zaczyna mieć kliniczne objawy choroby zwyrodnieniowej stawów. Według najnowszych doniesień szacuje się występowanie objawowej artrozy na 10% wśród dorosłych; wśród tej grupy najczęstszym problemem jest choroba zwyrodnieniowa stawu kolanowego (Swain i wsp., 2020).

Dobrze poznaną procedurą, która podlega ciągłemu udoskonalaniu i w ciągu ostatnich 30 lat wyznaczyła kolejny kamień milowy w ortopedii, jest endoprotezoplastyka stawów. Operacja polegająca na zastąpieniu objętych chorobą zwyrodnieniową powierzchni stawowych, wraz z przylegającymi fragmentami kostnymi i zastąpieniu ich implantami, jest leczeniem definitywnym i skutecznym, natomiast sama rozległość zabiegu jest dla pacjenta wysoce obciążająca. Nadal jednak dużą wagę przywiązuje się do leczenia zachowującego własny staw pacjenta, umożliwiające jak najdłuższe jego przeżycie w stanie nieupośledzającym codziennej aktywności. Wydaje się, że istotnym z punktu widzenia kwalifikacji pacjenta do

określonej procedury, w tym do leczenia operacyjnego jest znajomość etiopatogenezy choroby zwyrodnieniowej i możliwość jej diagnozowania we wczesnym stadium.

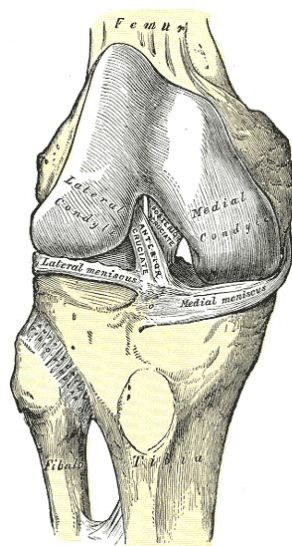
1.2. Anatomia, anatomia czynnościowa i kinematyka stawu kolanowego

Staw kolanowy jest stawem zawiasowym, umożliwiającym ruchy zgięcia i wyprostu. Funkcjonalnie na staw kolanowym składa się ruch w stawach udowo – piszczelowym oraz rzepkowo – udowym. Powierzchnie stawowe pokrywa warstwa chrząstki, elementy włókniste zapewniają stabilność statyczną stawu. Jama stawowa jest wypełniona płynem stawowym, który jest produkowany przez wysięlającą torebkę stawową błonę maziową.

Powierzchnie stawowe stawu kolanowego tworzą kłykcie kości udowej, będące lekko wypukłe w kierunku czołowym i silnie wypukłe w kierunku strzałkowym. Funkcję panewki stawowej spełniają oba kłykcie kości piszczelowej oraz rzepka. Powierzchnia stawowa kłykcia przyśrodkowego jest zdecydowanie większa, głębsza i ma kształt owalny. Kłykieć boczny jest mniejszy, płytszy oraz kształtem zbliżonym do trójkąta (Saavedra i wsp., 2012). Asymetryczna budowa stawu implikuje szpotawe ustawienie linii stawowej z nachyleniem około 3° w stronę przyśrodkową. Kolejnym, ważnym elementem dla biomechaniki stawu kolanowego jest tyłopochylenie powierzchni stawowej kości piszczelowej, wynoszące 6° – 24° , ze średnią wynoszącą $13,6^\circ$. Tyłopochylenie powierzchni stawowej piszczeli obarczone jest dużą zmiennością osobniczą, badacze nie wykazali jego korelacji z płcią i jedynie słabą korelację z wiekiem i indeksem masy ciała (BMI) pacjenta. Ustawienie w tyłopochyleniu powierzchni stawowej pozwala na odciążenie aparatu wyprostnego kolana w pełnym wyproście stawu (Medda i wsp., 2017).

Warstwa chrząstki pokrywającej powierzchnie stawowe jest sprężystą, wytrzymałą mechanicznie tkanką łączną, pokrytą ochrzęstną i płynem stawowym, od których pochodzi jej unaczynienie. Funkcją chrząstki stawowej jest zmniejszenie tarcia i zapewnienie odporności na przenoszenie obciążenia. Warstwa chrząstki grubości 2-4 mm pokrywa kłykcie kości udowej i piszczelowej; grubość chrząstki pokrywającej powierzchnię podrzepkową rzepki może wynosić do 6mm (Sophia Fox i wsp., 2009).

Opis pozostałych elementów budowy stawu kolanowego, dostępny w podręcznikach anatomicznych, nie jest istotny dla badań prowadzonych w niniejszej pracy.



Ryc. 1. Anatomia stawu kolanowego

Źródło: *Grey's Anatomy (Gupton i in., 2021)*

Za stabilizację dynamiczną stawu odpowiadają głównie dwie grupy mięśni – mięsień czworogłowy uda oraz grupa mięśni kulszowo – goleniowych. Bardzo ważną rolę w aparacie wyprostnym kolana odgrywa staw rzepkowo – udowy, przenoszący obciążenie osiowe ze ścięgna mięśnia czworogłowego na więzadło rzepki, zwiększając siłę wyprostu stawu kolanowego; wraz z aparatem więzadłowym odpowiada za zwartość stawu kolanowego w wyproście (Zlotnicki i wsp., 2016).

Płynne ruchy zgięcia i wyprostu w stawie kolanowym są możliwe dzięki dodatkowym składowym ruchu – są nimi toczenie i tylna translacja kłykci kości udowej na powierzchni stawowej kości piszczelowej w zgięciu kolana oraz rotacja piszczeli względem uda, której oś obrotu znajduje się na kłykcii przyśrodkowej kości piszczelowej (Sabatini i wsp., 2018).

Pełen zakres ruchu w stawie kolanowym nieobjętym zmianami chorobowymi wynosi od 3° przeprostu w stawie do 155° zgięcia, w optymalnych warunkach, biorąc pod uwagę masę ciała pacjenta i poziom sprawności. W badaniach w laboratoriach analizy chodu określono wartości kątowe konieczne dla podstawowych czynności współczesnego człowieka: normalny chód wymaga zakresu 0° – 70°, wchodzenie i schodzenie ze schodów to odpowiednio 0° - 83° i 0° - 90°, a wstawanie z krzesła wymaga zakresu 0° - 93°. Postępujące zmiany zwyrodnieniowe, ograniczające zakres ruchu oraz wywołujące dolegliwości bólowe przy próbie forsowania jego zakresu, już na wczesnym etapie choroby zwyrodnieniowej stawu doprowadzają do odczuwalnego ograniczenia funkcji stawu. Wraz z postępem choroby ograniczenie to staje się niepełnosprawnością i utratą możliwości samodzielnej egzystencji. (Freeman i wsp., 2005).

1.3. Budowa i mikrostruktura tkanki kostnej

Kość histologicznie jest narządem, którym podstawowym składnikiem jest tkanka kostna, a ponadto, w jej obrębie znajduje się także tkanka tłuszczowa oraz komórki krwiotwórcze.

Tkanekę kostną możemy podzielić na grubowłóknistą (splotowatą), której włókna kolagenowe mają przebieg nieuporządkowany. Tkanka ta występuje u kręgowców niższych oraz u kręgowców wyższych w fazie zarodka; u dorosłego człowieka występuje w szwach i tworzy kosteczki słuchowe. Z uwagi na specyfikę występowania, kość grubowłóknista nie będzie omawiana w niniejszej pracy (Clarke, 2008).

Drugim podtypem tkanki kostnej jest kość drobnowłóknista, inaczej blaszkowata. W przeciwieństwie do kości splotowatej, włókna kolagenowe mają uporządkowany przebieg, co istotnie wpływa na wytrzymałość mechaniczną kości. Kość drobnowłóknista tworzy szkielet kręgowców wyższych; histologicznie wyróżniamy tkankę kostną gąbczastą oraz zbitą. Oba typy odróżnia struktura przestrzennej organizacji blaszek kostnych (Clarke, 2008).

Blaszka kostna jest strukturą organizacji zmineralizowanej substancji zewnątrzkomórkowej tkanki kostnej. Mikroskopowo są to warstwy białek wysycone solami mineralnymi, przede wszystkim w formie hydroksyapatytu. Pomiędzy blaszkami przebiegają włókna kolagenowe, równolegle ułożone, spojone istotną podstawową. W zagłębieniach, tak zwanych jamkach kostnych, znajdują się osteocyty, będące otoczone zmineralizowaną strefą kości dojrzałymi osteoblastami o długich wypustkach cytoplazmatycznych, dzięki którym kontaktują się z innymi osteocytami oraz z przestrzeniami zawierającymi naczynia krwionośne, co pozwala na odżywienie komórek. Naczynia krwionośne wnikają do kości przebijając okostną, włóknistą błonę pokrywającą kość od zewnątrz w obrębie trzonów i przynasad, biegnąc w kanałach Volkmanna (Olszta i wsp., 2007).

W tkance kostnej blaszkowatej wyróżniamy tkankę kostną zbitą oraz tkankę kostną gąbczastą, które różnią się przestrzenną orientacją blaszek kostnych. W przypadku tkanki kostnej zbitej blaszki kostne układają się w osteony, czyli układ 4-20 blaszek kostnych (inaczej zwane blaszkami systemowymi), otoczonych kolejnym układem. Formacja przypomina „rurę” lub „walec”, wewnątrz którego przebiega kanał Haversa, zawierający naczynia krwionośne i nerwy. Kość zbita występuje w zewnętrznej części nasad kości długich oraz kości płaskich, tworzy także trzony kości długich. W kości gąbczastej blaszki kostne układają się nieregularnie w układ beleczek kostnych. w sieci utworzonej przez beleczki kostne znajduje się szpik kostny. Kość gąbczasta przeważa w kościach płaskich, wielokształtnych oraz w nasadach kości

długich. Warstwa podchrzęstna kości budową przypomina regularną kość korową (Weiner i wsp., 1999). Kość składa się z dwóch głównych komponentów: nieorganicznego lub mineralnego oraz organicznego. Faza mineralna stanowiąca 70% masy kostnej, to w przeważającej części drobnokrystaliczny fosforan wapnia – $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$ czyli hydroksyapatyt, w piśmiennictwie funkcjonujący pod pojęciem hydroksyapatytu kostnego, ang. bone apatite, (BAP). Masa BAP stanowi około 80 – 90% komponentu mineralnego. Poza BAP w kości występuje także węglan wapnia, jony sodu, magnezu, fluoru, cytryniany. BAP jest wiązany z włóknami kolagenowymi z pomocą białka niekolagenowego – osteonektyny (Olszta i wsp., 2007).

Część organiczna składa się głównie z kolagenu; kolagen typu I stanowi 95% macierzy organicznej. Istota podstawowa, stanowiąca 10% części organicznej, składa się z białek niekolagenowych, wspomnianej wcześniej osteonektyny oraz osteokalcyny, białek złożonych (fosfoproteiny, sialoproteiny), lipidów, enzymów, proteoglikanów (w największym stopniu siarczanu chondroityny) (Robinson, 1979).

Istotnym dla badań nad mikrostrukturą tkanki kostnej, w tym określania konfiguracji przestrzennej kolagenu, jest poznanie procesu biomineralizacji kości. Jedną z istotnych teorii mineralizacji kości, przedstawioną po raz pierwszy przez Currey w 1989 roku, jest proces polegający na zjawisku indukcji polimerowej poprzez prekursory macierzy, które przyłączają jony do otworów, „przerw”, w łańcuchach kolagenu typu I. Białkami, które były dotąd uważane za stymulatory mineralizacji to białka niekolagenowe, ang. non-collagenous proteins (NCP). W dalszym procesie, prekursory te ulegają stężeniu i krystalizacji w wyniku dehydratacji. Pojawia się struktura termodynamicznie stabilna, pozostawiając nanoskopowy osad kryształów hydroksyapatytu na włóknach kolagenowych (Currey, 1989).

Inna teoria mineralizacji kości ogranicza rolę białek NCP, dowodząc na modelach in - vitro, że kolagen jest pierwotnym szablonem dla formowania się kryształów hydroksyapatytu, a mineralizacja pomiędzy jego włóknami odbywa się bez udziału NCP (Olszta i wsp., 2007).

Struktura biologiczna przypominająca skręconą linę, wzmocniona kryształami hydroksyapatytu, w jamkach rozlokowanych wzdłuż przebiegu tychże lin, odznacza się jednocześnie dużą wytrzymałością mechaniczną jak i odpornością na odkształcenia. Choroby tkanki kostnej wpływające na proces mineralizacji upośledzają te funkcje. W przypadku osteomalacji dochodzi do zmniejszenia odporności mechanicznej, zwiększa się podatność na siły odkształcające kość. Zaburzenia budowy kolagenu, jak na przykład w osteogenesis imperfecta, doprowadzają do kruchości kości, a w konsekwencji do złamań niskoenergetycznych (Forlino i wsp., 2011; Zimmerman i wsp., 2021).

1.4. Choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych

Ogólnie przyjęta definicja choroby zwyrodnieniowej stawów przyjmuje, że jest to choroba degeneracyjna dotycząca stawów, prowadząca do stopniowej utraty chrząstki stawowej, a w następstwie przebudowy przylegającej tkanki kostnej (Hunter i wsp., 2006). Według różnych teorii początek choroby zwyrodnieniowej wiąże się przede wszystkim ze zmianami mechanicznymi i biochemicznym w obrębie stawu oraz zmianami w obrębie składu płynu stawowego. Wśród objawów klinicznych obserwowanych u pacjentów dominują ból, ograniczenie zakresu ruchu, deformacja stawu, zaburzenie osi kończyny; okresowo występują wysięki dostawowe. Stopień zaawansowania choroby, określony według skal radiologicznych, nie koreluje liniowo z nasileniem objawów. (Man i wsp., 2014). Definicja przytoczona powyżej nie oddaje całości złożonego problemu oraz wieloczynnikowości procesu, które prowadzą do powstania zmian zwyrodnieniowych (Hunter i wsp., 2006).

Definicję choroby zwyrodnieniowej rozszerzyli Kuettner i Cole, uwzględniając czynniki fizyczne zachodzące w stawie. Badacze traktowali ją jako chorobę degeneracyjną, wywołaną przez wzrost sił ścinających w stawie oraz wzrost ciśnienia hydrostatycznego pomiędzy dwiema powierzchniami stawowymi, co ostatecznie prowadzi do zniszczenia chrząstki stawowej (Kuettner i Cole, 2005). Kolejne badania określały chorobę zwyrodnieniową jako chorobę wszystkich struktur wchodzących w skład stawu kolanowego, która w wyniku wieloczynnikowego zaburzenia doprowadza do patologicznych zmian w chrząstce, kości, błonie maziowej i innych tkanek miękkich wchodzących w skład stawów (Day i wsp., 2004).

Patologiczne zmiany zachodzą głównie w chrząstce stawowej i warstwie podchrzęstnej kości. W chorobie zwyrodnieniowej zwiększa się uwodnienie tkanki chrzęstnej, zmniejsza się ilość proteoglikanów, a orientacja i organizacja włókien kolagenowych zostaje zaburzona na skutek rozpadu wiązań stabilizujących jego przestrzenną konfigurację. Produkty tego rozpadu przedostają się do płynu stawowego, powodując odpowiedź zapalną błony maziowej i wydzielania cytokin zapalnych, w tym TNF- α , IL-1 β , metaloproteinaz, prostaglandyn i tlenu azotu. Cytokiny prozapalne indukują dalszy proces degeneracji chrząstki stawowej a błędne koło zmian zwyrodnieniowych zamyka się (Łapaj i wsp., 2010; Martel-Pelletier, 2004).



Ryc. 2. Zmiany zwyrodnieniowe stawu kolanowego
Źródło: materiał własny, fotografia śródoperacyjna

Makroskopowo dochodzi do zmian również w obrębie tkanek miękkich. Wraz z postępem choroby zwyrodnieniowej dochodzi do tworzenia sieci nowych naczyń krwionośnych a ostatecznie do hiperwaskularyzacji, przerostu błony maziowej oraz torebki stawowej. Wszystkie te procesy stopniowo prowadzą do manifestacji klinicznej – bólu, wysięków w stawie, deformacji, ograniczenia zakresu ruchu, co skutkuje utratą funkcji stawu (Man i wsp., 2014).

Czynniki ryzyka prowadzące do choroby zwyrodnieniowej lub przyspieszające jej wystąpienie możemy podzielić na czynniki modyfikowalne oraz niemodyfikowalne. Wśród pierwszej grupy zasadniczą rolę odgrywają przebyte urazy stawu kolanowego, w tym, między innymi, złamania przestawowe, niestabilności pourazowe czy uszkodzenia łąkotek stawowych (Chen i wsp., 2017).

Istotne są także czynniki osobnicze pacjenta, w tym słabo rozwinięta tkanka mięśniowa, nadmierna masa ciała, zespół metaboliczny. Wśród tej kategorii czynników ryzyka wspomniany jest także wykonywany zawód i przeważający rodzaj aktywności pacjenta. Powtarzalne ruchy zgięcia stawu kolanowego korelują ze wzrostem rozwoju zmian zwyrodnieniowych (Heidari, 2011).

Czynniki niemodyfikowalne to przede wszystkim płeć; częściej zwyrodnienie stawu kolanowego rozwija się wśród kobiet. Kolejnymi czynnikami ryzyka są zaawansowany wiek chorego, czynniki genetyczne, choroby metaboliczne, zapalne, autoimmunologiczne oraz rasa. Większa zapadalność występuje wśród rasy białej i latynoskiej, niż wśród rasy afrykańskiej czy

afroamerykańskiej. Na podstawie wyżej wymienionych czynników, choroba zwyrodnieniowa dzieli się na pierwotną, inaczej idiopatyczną, która nie ma uchwytnej przyczyny oraz postać wtórną, która rozwija się na skutek zdefiniowanego czynnika (Kwiatkowski, 2004).

Pierwotna choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych jest destrukcją chrząstki stawowej w połączeniu z nadmiernym pogrubieniem warstwy podchrzęstnej kości, tworzeniem osteofitów oraz deformacją zajętego chorobą stawu (Radin, 2004). Pierwotna choroba zwyrodnieniowa w ponad 95% dotyczy przyśrodkowego przedziału piszczelowo – udowego. Pomimo jednak znanego przebiegu klinicznego choroby, etiologia i czynniki ryzyka w pierwotnym zwyrodnieniu nie zostały w pełni wyjaśnione (Nakagawa i wsp., 2015).

Badania z ostatnich lat uznają chorobę zwyrodnieniową jako chorobę stawów oraz tkanek okołostawowych, rozszerzając ją o zmiany w więzadłach, mięśniach oraz elementach układu nerwowego (Felson i wsp., 2004).

Wśród przyczyn wtórnej choroby zwyrodnieniowej stawów wyróżniamy postacie na tle reakcji wynikających z autoagresji: zeszywniającego zapalenia stawów kręgosłupa, dny moczanowej, reumatoidalnego zapalenia stawów wraz z postacią młodzieńczą, łuszczykowego zapalenia stawów i reaktywnego zapalenia stawów. Zwyrodnienie rozwija się także wtórnie do septycznego zapalenia stawu oraz jako wynik następstw urazów. Wśród rzadkich przyczyn wtórnej choroby zwyrodnieniowej wyróżniamy powikłania stawowe w przebiegu hemochromatozy i hemofilii (H. Hsu i wsp., 2021).

Choroba zwyrodnieniowa stawów jest uznana przez Światową Organizację Zdrowia za chorobę objętą priorytetowymi działaniami z powodu znacznego wpływu na dobrostan i możliwość funkcjonowania w średnim i starszym wieku. Istotny jest także aspekt ekonomiczny choroby, a więc koszty związane z niepełnosprawnością, koniecznością sprawowania opieki nad pacjentem, leczenia farmakologicznego, fizjoterapii, leczenia operacyjnego i rezygnacją z pracy wśród chorych z jej zaawansowaną postacią (Maetzel i wsp., 2004). Według badań z 2010 roku „*Global Burden of Disease Study*” ilość chorych z objawową chorobą zwyrodnieniową stawów szacowana jest na 10% - 15% w populacji powyżej 60 roku życia. Zbieżne statystyki przedstawiają także inni badacze wskazując na występowanie zwyrodnienia stawu kolanowego na poziomie 24% u kobiet w wieku 60 – 64 lat (D'Ambrosia, 2005), ze wzrostem częstości występowania do 40% w grupie wiekowej 70 – 74 lat (van Saase i wsp., 1989).

Obecnie w Stanach Zjednoczonych częstość występowania choroby szacuje się na 33,6% (12,4 miliona chorych) powyżej 65 roku życia. u kobiet częstość występowania choroby jest wyższa (42,1%) niż u mężczyzn (31,2%) (Lespasio i wsp., 2017).

1.5. Diagnostyka i ocena radiologiczna choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych

Badanie podmiotowe i przedmiotowe u pacjenta z chorobą zwyrodnieniową, rozpoczynające każdą procedurę diagnostyczną, obejmuje ocenę bólu, częstość jego występowania, obecność sztywności porannej, obrzęku stawu. Istotnym objawem jest klinicznie obserwowana deformacja stawu, zaburzenie osi kończyny i ograniczenie zakresu ruchu. Powyższe objawy pozwalają na stwierdzenie klinicznych cech choroby zwyrodnieniowej oraz wstępne określenie stopnia zaawansowania choroby.

Diagnostyka obrazowa choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego obejmuje spektrum badań, w tym rentgenodiagnostykę, ultrasonografię, tomografię komputerową, rezonans magnetyczny. Artroskopia stawu kolanowego, pozwalająca na bezpośrednią wizualizację wewnętrznych struktur stawu z uwagi na rozwój innych metod diagnostycznych, obecnie jest narzędziem przede wszystkim służącym do leczenia chorób i urazów stawu kolanowego. Ocena zmian zwyrodnieniowych podczas artroskopii operacyjnej odbywa się obok wykonywanych procedur leczniczych. Każda z metod diagnostycznych posiada ograniczenia z uwagi na określoną specyficzność, swoistość, obciążenie promieniowaniem lub wysoki koszt i ograniczoną dostępność badania.

Klasyczne badanie rentgenowskie, najczęściej wykonywane w projekcjach przednio – tylnej oraz bocznej, wedle klasyfikacji Kellgrena i Lawrence’a oraz Crofta – Lane’a, definiują chorobę na etapie zaawansowanych ubytków chrząstki stawowej, w której ubytki chrząstki doprowadzają już do wtórnych zmian w stawie.

Badanie tomografii komputerowej, z uwagi na obciążenie promieniowaniem jonizującym, nie jest badaniem uznanym za złoty standard diagnostyki wczesnych zmian zwyrodnieniowych. Rezonans magnetyczny z coraz większą precyzją mapuje chrząstkę stawową, badanie jest jednak kosztowne i wciąż o ograniczonej dostępności. Obecnie pewnym krokiem naprzód jest rozwój technologii, zwanej MRI z opóźnionym wychwytem gadoliny, ang. *delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC)*, pozwalający na nieinwazyjne uzyskanie informacji biochemicznej i biofizycznej dotyczącej powierzchni chrząstki stawowej (Bron i wsp., 2013). Badanie jest jednak trudno dostępne, a ograniczenia są spowodowane ciągle brakiem wystarczającej rozdzielczości badania MRI (Glover i wsp., 2002).

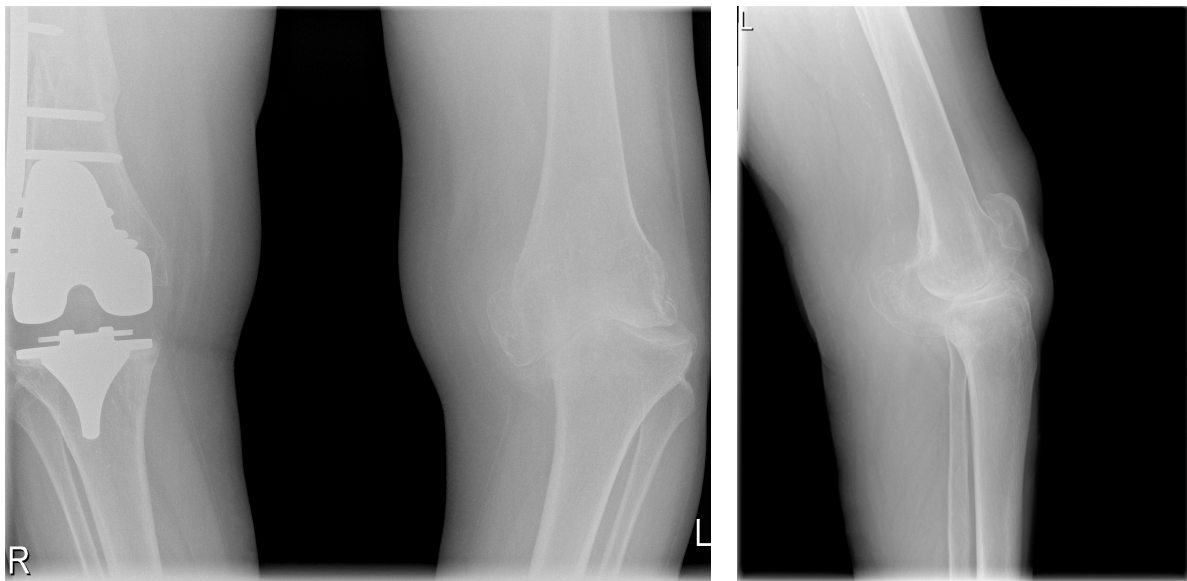
Klasyfikacja Outerbridge jest klasyfikacją odnajdującą zastosowanie w artroskopii stawu kolanowego, która bezpośrednio pozwala ocenić defekt chrząstki stawowej oraz jej powierzchowne lub głębokie strukturalne uszkodzenie. Metoda oceny makroskopowej jest

oceną inwazyjną, mającą zastosowanie najczęściej u chorych objawowych, ze zmianami w obrębie warstwy chrzęstnej i podchrzęstnej warstwy kości (Wright i MARS Group, 2014).

Do tej pory nie odkryto swoistych biomarkerów pierwotnej choroby zwyrodnieniowej, które korelowałyby z jej stopniem zaawansowania. Opisywane przez badaczy biomarkery, takie jak cytokiny, chemokiny, czy fragmenty macierzy zewnątrzkomórkowej, ang. extracellular matrix components (ECM) nie korelują istotnie ze zmianami radiologicznymi, czy objawami stwierdzanymi u pacjenta (Mobasheri i wsp., 2015); najnowsze badania sugerują jednak obecność fragmentów ECM w początkowej fazie choroby zwyrodnieniowej oraz udział cytokin prozapalnych w rozwoju choroby zwyrodnieniowej (Larsson i wsp., 2012; Łapaj i wsp., 2010).

Podstawą diagnostyki choroby zwyrodnieniowej stawów są wspomniane już wcześniej zdjęcia radiologiczne, które są najpowszechniej stosowaną metodą, podyktowaną prostotą wykonania, niskim czasem ekspozycji na promieniowanie jonizujące oraz przemawiające względy ekonomiczne. Ważnym atutem jest także powtarzalność metody, pozwalająca na systematyzację i ocenę progresji zmian. W niniejszej pracy zastosowano dwie skale służące do oceny zmian zwyrodnieniowych: skala Kellgrena - Lawrence'a oraz Crofty - Lane'a (Croft i wsp., 1990; Kellgren i Lawrence, 1957).

Do oceny jakościowej oceny zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów najczęściej używana jest skala opracowana przez Kellgrena i Lawrence'a. Autorzy skali uwzględniają w niej stwierdzenie obecności lub brak takich zmian w obrazie radiologicznym jak: zwężenie szpary stawowej, osteofity, sklerotyzacja podchrzęstna, zaburzenia osi stawu; stopień ich występowania definiuje radiologicznie chorobę zwyrodnieniową, klasyfikując ją od stopnia 0 do 4 (Kellgren i Lawrence, 1957).



Ryc. 3. Choroba zwyrodnieniowa stawu kolanowego lewego, 4 stopień zaawansowania w skali Kellgrena – Lawrence'a. W prawym stawie kolanowym przebyta endoprotezoplastyka stawu kolanowego oraz stan po zaopatrzonym złamaniu okołoprotezowym. Destrukcja kłykcia przyśrodkowego kości piszczelowej lewej uniemożliwi pobranie materiału badawczego. Rentgenogramy w pozycjach AP i bocznej.

Źródło: materiał własny

Druga klasyfikacja, opierająca się na pomiarze szerokości szpar stawowych, opisana przez Crofta i Lane'a, służy do ilościowej oceny zmian zwyrodnieniowych. Wraz ze stopniową degeneracją chrząstki stawowej dochodzi do zmniejszenia szczeliny stawowej. Skala wyróżnia stopnie 0-3, pomiaru dokonuje się w minimalnej szerokości szpary stawowej. Stopień 0 oznacza normę, stopnie 1-3 definiują poziom zwężenia szczeliny stawowej (Croft i wsp., 1990; Lane i wsp., 1993).



Ryc. 4. Zdjęcia radiologiczne stawu kolanowego. Stopień 4 artrozy w skali K-L, 3 stopień w skali Crofta – Lane'a. Widoczne całkowite zwężenie szpary stawowej w przedziale przyśrodkowym, liczne osteofity, zaburzenia osi stawu.

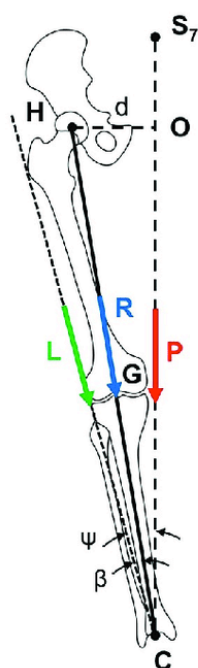
Źródło: materiał własny

1.6. Zaburzenia osi stawu kolanowego w chorobie zwyrodnieniowej

Ustawienie osiowe stawu kolanowego jest istotnym elementem całościowej oceny stawu kolanowego począwszy od diagnozy, poprzez rokowanie i planowanie przedoperacyjne, aż do oceny wyniku endoprotezoplastyki. Oś anatomiczna uda i piszczeli u zdrowego, dorosłego człowieka tworzy kąt koślawy około 6° , z odchyleniem $\pm 2^\circ$. Wyznaczona jest poprzez kąt zawarty pomiędzy prostymi przechodzącymi równolegle do kanałów szpikowych kości piszczelowej i udowej (Thienpont i Parvizi, 2016). Mechaniczna oś kończyny jest linią mierzoną od środka głowy kości udowej do boczka kości skokowej. Prosta powinna przeciąć środek stawu kolanowego w neutralnej osi kończyny. Celem określenia poziomu deformacji koślawej lub szpotawej stawu wyznacza się osobno oś mechaniczną uda i piszczeli, zwaną kątem biodrowo – kolanowo - skokowy (ang. hip – knee – ankle angle, HKA). Oś mechaniczna uda wyznaczona jest od środka głowy kości udowej do dołu międzykłykciowego uda, oś mechaniczna piszczeli od wyniosłości międzykłykciowej do punktu środkowego powierzchni stawowej boczka kości skokowej. Kąt można opisać jako kąt rozwarty zawarty między ramionami lub jako dopełnienie do kąta 180° (Moreland i wsp., 1987a; Tang i wsp., 2000).

Rozpatrując zaburzenia biomechaniki stawu kolanowego, wydaje się zasadnym wspomnieć o modelu obciążeniowym Maquet'a. W symetrycznej postawie ciała, zakładając równe obciążenie obu kończyn dolnych, u pacjenta o masie ciała 70kg, staw kolanowy jest obciążony siłą około 292N. Jest to obciążenie, które stanowi 85% masy ciała i przechodzi przez geometryczny środek stawu kolanowego. Staw kolanowy przenosi największe obciążenie stanowiące 93% masy ciała podczas stania na jednej kończynie dolnej, a największe obciążenie przenoszone jest w okresie pojedynczego podporu kończyny, która stanowi około 40% cyklu chodu (Paley i wsp., 1992).

W fazie jednostronnego podporu kończyny powstaje siła P , będąca wypadkową masy ciała i działania sił grawitacji, której wektor działa przyśrodkowo od stawu kolanowego. Siła ta, jest równoważona przez wektor siły L , będąca wypadkową siły mięśni uda, działającą bocznie do stawu kolanowego. Wypadkowa obu wektorów przypada na środek stawu kolanowego i jest określana wektorem R (Maquet, 1980). Tak więc w fizjologicznych warunkach wypadkowa siła jest neutralizowana, obciążenie przenoszone równo przez przyśrodkowy i boczny przedział stawu kolanowego. Wektor R może ulec zmianie – decyduje o tym masa ciała chorego, siła mięśni stabilizujących staw oraz obecność deformacji w płaszczyźnie czołowej kolana.



Ryc. 5. Model Maquet'a.

L – wektor siły mięśni uda

P – wektor siły masy ciała

R – wypadkowa obu wektorów, siła działająca na staw kolanowy

Źródło: za <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0227272.g001> (PLOS ONE: Evaluation and validation of 2D biomechanical models of the knee for radiograph-based preoperative planning in total knee arthroplasty, b.d.)

Choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych w większości przypadków przebiega z deformacją szpotawą i postępującą destrukcją w pierwszej kolejności przedziału przyśrodkowego. W fazie przeniesienia ciężaru, kiedy podczas normalnego chodu staw kolanowy przenosi ponad 6-krotną masę ciała (Maquet, 1980). Obciążenia wzrasta wielokrotnie podczas bardziej forsownego ruchu, jakim jest bieg lub wchodzenie po schodach (Freeman i wsp., 2005).

Zgodnie z prawem Pauwels'a, opisującego adaptację tkanki kostnej w odpowiedzi na obciążenie, zwiększenie obciążenia stawu indukuje procesy kościotwórcze. Zmniejszone obciążenie natomiast, inicjuje odwrotny proces, polegający na resorbcji tkanki kostnej. (Kummer, 1995). W pewnym okresie choroby utrata możliwości kompensacji obciążania doprowadza do procesu degeneracyjnego w obrębie chrząstki stawowej oraz warstwy podchrzęstnej kości. W następstwie dochodzi do zmiany osi mechanicznej kończyny dolnej, co jeszcze bardziej potęguje obciążenia zajętego przedziału, a w wyniku przesunięcia wektora R doprowadza do dalszych zmian zwyrodnieniowych. Powyższe zjawisko opisane zostało przez Coventry w 1965 roku (Coventry, 1965). Pierwotna choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych stanowi główną przyczynę zaburzenia osi kończyny dolnej (Peat i wsp., 2004).

1.7. Wyznaczanie osi kończyny dolnej

Ważnym czynnikiem prognostycznym w chorobie zwyrodnieniowej stawu kolanowego, jak i narzędziem do planowania przedoperacyjnego w endoprotezoplastyce stawu kolanowego, jest oś kończyny dolnej, opisywana przez wzajemną relację osi kości piszczelowej do osi kości udowej. Fizjologiczna oś kończyny determinuje prawidłowe funkcjonowanie stawów kończyny dolnej. Dlatego też, istotnym jest dążenie do anatomicznej osi stawu kolanowego podczas endoprotezoplastyki, celem uzyskania dobrych i długotrwałych wyników leczenia. Prawidłowa oś kończyny wpływa na balans tkanek miękkich, siły przenoszone przez więzadła stawu kolanowego oraz działanie mięśni.

Wzajemne ustawienie kości piszczelowej i udowej jest opisywane przez oś anatomiczną stawu kolanowego oraz oś mechaniczną. W przypadku osi anatomicznej stawu, mierzony jest kąt zawarty między liniami będącymi przedłużeniem kanałów szpikowych kości udowej i piszczelowej i zazwyczaj wynosi 6° w ustawieniu koślawym stawu (Tew i Waugh, 1985). Średnie wartości 2° koślawości uzyskano u zdrowych mężczyzn, $4^\circ - 6^\circ$ u kobiet rasy azjatyckiej i kaukaskiej (Luo, 2004).

Oś mechaniczna stawu, opisana po raz pierwszy przez Jana Mikulicza - Radeckiego, jest wyznaczona jako linia przebiegająca od centrum głowy kości udowej do środka stawu skokowego (Kielan, 2005). W przypadku kolana z osią neutralną kończyny przebiegać ona będzie przez środek stawu kolanowego; w przypadku deformacji szpotawej linia będzie przebiegać przyśrodkowo do stawu kolanowego, natomiast w przypadku deformacji koślawej bocznie (Maquet, 1972).

Inną możliwością wyznaczenia osi mechanicznej uda, jest posłużenie się kątem biodrowo – kolanowo - skokowym, który jest tworzony przez dwie linie – odpowiadające kolejno mechanicznej osi uda i mechanicznej osi piszczeli. Pierwsza wyznaczona jest od środka głowy kości udowej do środka stawu kolanowego, wyznaczonego w miejscu wcięcia okolicy międzykłykciowej kości udowej. Druga, od środka stawu kolanowego w miejscu środka plateau piszczeli do środka bloczka kości skokowej. Kąt, w ustawieniu neutralnym, wyrażony jest jako 180 stopni. w przypadku deformacji szpotawej jest niższy od 180°, natomiast w deformacji koślawej wyższy (Moreland i wsp., 1987a). W pozycji stojącej, w obciążeniu kończyny, kąt u osoby dorosłej wynosi 5° - 7° koślawości. (Cherian i wsp., 2014). Rozpiętość wartości uznanych za normę jest zależna od wysokości, szerokości miednicy, płci a także rasy.



Ryc. 6. RTG pomiarowe kończyn dolnych
u pacjentki z lekką deformacją szpotawą stawu
kolanowego.

Źródło: materiał własny



Ryc. 7. RTG pomiarowe kończyn dolnych u pacjentki z zaawansowaną deformacją szpotawą stawu kolanowego.

Źródło: materiał własny

Zagadnienie szpotawości stawu kolanowego u dorosłych było obiektem wielu publikacji na przestrzeni ostatnich 30 lat. W piśmiennictwie, jako mieszczące się w zakresie fizjologicznym, odchylenie szpotawe kończyny określa się do 3° odchylenia od osi neutralnej kończyny (Bellemans i wsp., 2012; R. W. Hsu i wsp., 1990; Moreland i wsp., 1987b; Shetty i wsp., 2014).

Za piśmiennictwem, najczęstszą deformacją osi w obrębie choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego jest deformacja szpotawa (Chou i wsp., 2012). Jedną z przyczyn przewagi tej deformacji, wymienia się naturalną oś szpotawą stawu kolanowego w ogólnej populacji (Shetty i wsp., 2014) a podwyższone BMI stanowi istotny czynnik ryzyka.

Klasyfikację, z uwzględnieniem deformacji szpotawej i koślawej na potrzeby endoprotezoplastyki stawu kolanowego, zaproponował w 2015 roku De Muyllder w badaniach na grupie 51 pacjentów, która ustanawiała podział na 5 stopni, w zależności od kąta deformacji (De Muyllder i wsp., 2015).

Na łamach *Journal of Arthroplasty* w 2016 roku Thienpont i Parvizi na podstawie badań De Muyllder opublikowali wyniki badania dokonanego na 526 pacjentach, kwalifikowanych do endoprotezoplastyki stawów kolanowych, na podstawie których zaproponowali klasyfikację kolana szpotawego. Ideą zaproponowanej klasyfikacji było lepsze zrozumienie śródoperacyjnego dążenia do przywrócenia fizjologicznej osi mechanicznej stawu kolanowego podczas endoprotezoplastyki. Autorzy w toku badań przedstawili podział szpotawości stawu ze względu na oś mechaniczną kończyny, mierzoną z użyciem kąta HKA. Ten najnowszy, pięciostopniowy podział, z użyciem kąta HKA, wykorzystano w poniższych badaniach (Thienpont i Parvizi, 2016).

W piśmiennictwie opisywane są także inne sposoby określania stopnia deformacji szpotawej, jak kąt zawarty pomiędzy kłykcami kości udowej a trzonem uda, kąt zawarty pomiędzy osią anatomiczną uda a styczną do obu kłykci kości udowej, kąt zawarty w analogiczny sposób w obrębie kości piszczelowej oraz kąt zawarty pomiędzy linią kłykciową kości udowej a plateau piszczeli (Terauchi i wsp., 1998). Z uwagi na opisywanie jedynie przebiegu szczeliny stawowej stawu kolanowego, klasyfikacje te nie zostały zastosowane w poniższym badaniu.

Klasyfikacja szpotawości jedynie z użyciem osi anatomicznej kości udowej i piszczelowej nie oddaje w pełni obciążeń przenoszonych przez staw – oś anatomiczna zależna jest od budowy anatomicznej kości i ich deformacji, nie uwzględnia wpływu sąsiednich stawów na oś kończyny.

1.8. Leczenie choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych

Leczenie choroby zwyrodnieniowej polega w pierwszym etapie na modyfikacji czynników ryzyka: zastosowaniu diety, redukcji masy ciała, zwiększeniu aktywności fizycznej czy unikaniu urazów zawodowych. Leczenie zachowawcze polega na wdrażaniu dedykowanej fizjoterapii, leczenia farmakologicznego z zastosowaniem zarówno niesteroidowych leków przeciwzapalnych, leków opioidowych zgodnie z drabiną analgetyczną oraz u wybranych pacjentów iniekcji dostawowych (Lespasio i wsp., 2017).

W wyselekcjonowanych przypadkach, z ogniskowymi ubytkami chrząstki, możliwe są małoinwazyjne przeszczepy chondrocytów lub pokrycie ubytków błonami kolagenowymi. w przypadku deformacji z zachowaną jeszcze warstwą chrząstki stawowej istnieją wskazania do osteotomii korygujących oś stawu (Michael i wsp., 2010).

W przypadku nieskuteczności powyższych metod leczenia oraz obecności nasilonych dolegliwości spowodowanych chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych, pacjenci kwalifikowani są do całkowitej endoprotezoplastyki stawu, polegającej na zastąpieniu powierzchni stawowych kłykci kości udowych, piszczelowych oraz w wybranych przypadkach powierzchni stawowej rzepki, implantami, co liczbowo prezentuje tabela 1.

Tab. 1. Statystyka wykonanych endoprotezoplastyk stawu kolanowego. Dane z NFZ z roku 2016.

Płeć	Rodzaj endoprotezoplastyki stawu kolanowego					Łącznie
	Pierwotna		Rewizyjna			
	Całkowita	Częściowa	Całkowita	Częściowa	Bez wymiany elementów	
Kobiety	14052	749	483	310	131	15725
Mężczyźni	4852	304	168	132	59	5515
Łącznie	18904	1 053	651	442	190	21 240

Biorąc pod uwagę kryterium wieku, najwięcej pacjentów zostało poddanych operacji między 60 a 79 rokiem życia. w roku 2019. Według ostatniego dostępnego raportu *Realizacji świadczeń endoprotezoplastyki stawowej* z danych Narodowego Funduszu Zdrowia wykonano 33192 endoprotezoplastyki stawu kolanowego. Biorąc pod uwagę okres jedynie 2016 – 2019, doszło do zwiększenia liczby wykonanych operacji o 40%. Liczba endoprotezoplastyk świadczy o zapotrzebowaniu na tę metodę operacyjną, która świadczy zarówno o rozpowszechnieniu choroby zwyrodnieniowej, jak i pośrednio o niskiej skuteczności innych metod leczenia.

2. SPEKTROSKOPIA RAMANA W BADANIU TKANKI KOSTNEJ

2.1. Podstawy fizyczne w spektroskopii Ramana

Spektroskopia jest nauką oraz zbiorem technik analitycznych, które zajmują się oddziaływaniem pomiędzy materią (atomy, cząsteczki), a promieniowaniem elektromagnetycznym. Oddziaływanie to pozwala obserwować i wykonywać pomiary zmian energii zarówno w zakresie widma promieniowania pochłanianego, emitowanego oraz rozpraszanego, co dzieli spektroskopię na powyższe typy. Spektroskopia rozproszeniowa obejmuje pomiar promieniowania nieelastycznego rozproszenia elektronów, w tym spektroskopię Ramana (Takahashi i wsp., 2014).

Spektroskopia ramanowska jest przykładem spektroskopii rozproszeniowej. Podstawy teoretyczne kwantowo – mechanicznej teorii rozproszenia opracowali w 1925 roku Kramers i Heisenberg. W 1928 roku hinduski fizyk Chandrasekhara Venkata Raman potwierdził w warunkach laboratoryjnych zjawiska opisywane przez teoretyków. Swoim odkryciem nie tylko włożył wkład w prace nad teorią kwantowo-mechanicznej, ale dodatkowo odkrył nowe zjawisko związane z rozpraszaniem światła, będącym nowym rodzajem spektroskopii. Za to odkrycie oraz prace dotyczące rozproszenia światła w 1930 roku otrzymał nagrodę Nobla w dziedzinie fizyki (Kęcki, 1975).

Widmem spektroskopowym nazywamy zarejestrowany obraz promieniowania rozłożonego na fale, częstotliwości lub energie. Widmo powstające na wskutek emisji, odbicia lub pochłonięcia promieniowania przez badaną substancję lub materię, dostarcza wielu cennych informacji, takich jak skład badanej próbki lub zawartość w niej konkretnych składników. Spektroskopia Ramana, jak już wspomniano, bazuje na pomiarze promieniowania rozproszonego. Widmo światła rozproszonego składa się z silnej linii, która odpowiada długości fali promieniowania padającego. Symetrycznie, po obu jej stronach obserwowane są tzw. „słabe pasma”, związane z efektem rozproszenia Ramana. Silne pasmo to rozproszenie rayleighowskie. Kolejnymi rodzajami obserwowanych fal w rozproszeniu Ramana są pasma stokesowskie i antystokesowskie. W paśmie stokesowskim wzbudzona promieniowaniem cząsteczka przenosi się na wyższy poziom oscylacyjny, a rozproszony foton ma energię niższą o różnicę poziomów oscylacyjnych. Nazwa pasma pochodzi od reguły fluorescencji Stokesa, traktującej, iż pasmo fluorescencji będzie miało niższą energię niż pasmo absorpcyjne, będzie więc przesunięte w kierunku podczerwieni. Pasma antystokesowskie powstaje w momencie zadziałania promieniowania na wzbudzoną molekułę i przeniesienia jej na zerowy poziom

oscylacyjny. Energia rozproszonego wówczas fotonu jest większa o różnicę poziomów oscylacyjnych. Bardzo istotne jest, iż położenie pasm jest stałe dla danej substancji czy molekuly oraz niezależne od częstotliwości padającej wiązki. Stanowi to tak zwany „footprint”, unikatowy „odcisk palca” badanej struktury. Pod względem natężenia pasm, największe występuje w pasmie rayleighowskim; w obrębie rozproszenia Ramana stokesowskie jest większe od antystokesowskiego, co sprawia, że w spektroskopii Ramanowskiej posługujemy się pomiarem pasm stokesowskich (Bazin i wsp., 2009).

Z uwagi na fakt, iż do zjawiska rozproszenia Ramana zachodzi podczas interakcji materii z promieniowaniem elektromagnetycznym, zjawisko może być opisane zgodnie z zasadami dualizmu korpuskularno – falowego. Powstanie rozproszenia Ramana zgodnie z teorią falową nazywamy teorią klasyczną, natomiast zgodnie z teorią korpuskularną opieramy na teorii kwantowej (Kęcki, 1975).

Teoria klasyczna opisuje oddziaływanie pomiędzy chmurą elektronową, czyli obszarem o wysokim prawdopodobieństwie znalezienia elektronu, a promieniowaniem elektromagnetycznym, powodującym nieelastyczne rozproszenie światła. Rozproszenie Ramana występuje wtedy, gdy dochodzi do zmian w polaryzacji cząsteczki – przemieszczenie chmury elektronowej względem jądra atomowego w polu elektrycznym. Drgania momentu dipolowego są wprost proporcjonalne do polaryzacji danej molekuly. Teoria kwantowa uzupełnia opis o wyjaśnienie zmian intensywności pasm rozproszenia widm Ramana oraz ich położenia. Molekuly na zerowym poziomie oscylacyjnym pochłaniają energię, przechodząc w stan wzbudzenia. W momencie relaksacji następuje rozproszenie promieniowania. Molekula wracając do stanu początkowego, emituje rozproszenie Rayleigha, lub przechodząc na wyższy poziom oscylacyjny – rozproszenie Ramana. Obserwujemy wówczas zmiany intensywności pasm. Z uwagi na fakt, iż więcej molekul zajmuje najniższe poziomy energetyczne, przechodzących z najniższego poziomu energetycznego do wzbudzonego. Powoduje to, iż pasmo stokesowe wyróżnia się większą intensywnością niż pasmo antystokesowe, co najczęściej wykorzystujemy w badaniu widm rozproszenia Ramana (Kęcki, 1975).

Zarówno spektroskopia ramanowska jak i absorpcja w podczerwieni, ang. infrared spectroscopy (IR spectroscopy), są metodami komplementarnymi, bazującymi na otrzymywaniu widm oscylacyjnych. Spektroskopia Ramana daje większe możliwości badania, z rozdzielczością 0,6 – 1,0 μm , co pozwala na mikrostrukturalną analizę. Jest także w dużym stopniu niewrażliwa na stopień uwodnienia tkanek, co odróżnia ją od spektroskopii w podczerwieni. Zapewnia to możliwość badania różnego rodzaju tkanek biologicznych. W układzie badawczym stosowany jest laser działający w spektrum podczerwieni lub

w zakresie światła widzialnego, eliminuje w ten sposób zjawiska związane z fluorescencją, zakłócające analizę widm (Penel i wsp., 2005; Bazin i wsp., 2009).

Widmo spektralne jest najczęściej prezentowane jako wykres zależności: intensywności pasma ramanowskiego i częstotliwości. Pasma różnią się między sobą intensywnością i szerokością, na co wpływ ma, po pierwsze niedoskonałość wynikająca z aparatury pomiarowej, a także różna szerokość stanów energetycznych wzbudzanych molekuł (Kęcki, 1975).

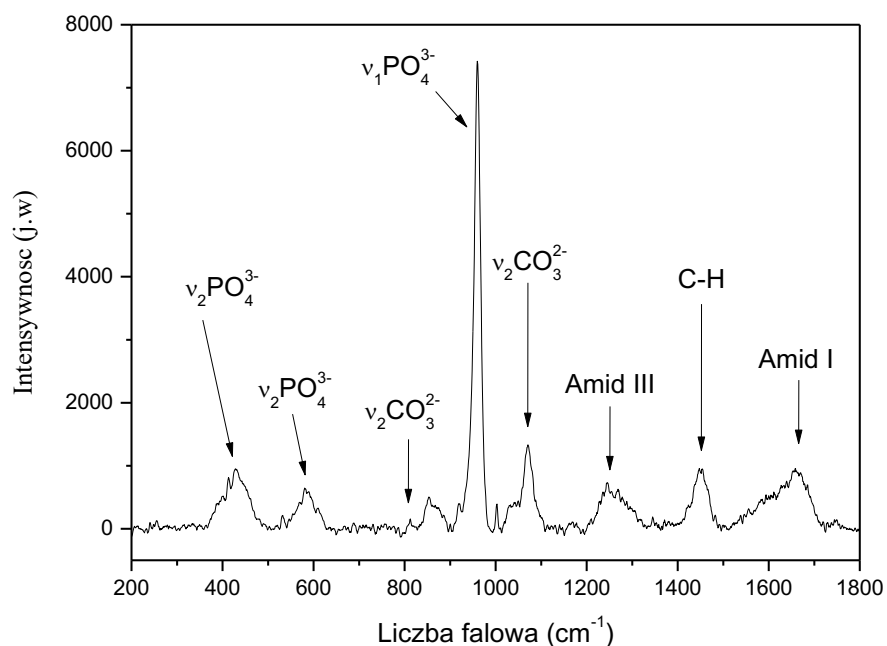
Badanie struktur cząstek i molekuł opisują parametry, będące charakterystyczne dla danego pasma:

- częstotliwość – maksymalna wysokość badanego pasma,
- intensywność – wysokość maksymalna pasma mierzona od poziomu tła,
- intensywność integralna – pole powierzchni zawierające się pomiędzy pasmem i tłem,
- szerokość pasma – inaczej szerokość połówkowa.

W niniejszej pracy porównywana będzie intensywność integralna poszczególnych pasm (Morris, 2011).

2.2. Wykorzystanie spektroskopii Ramana w badaniu tkanki kostnej

Widmo Ramana pochodzące z warstwy podchrzęstnej kości możemy podzielić na dwie główne grupy: fazę mineralną oraz fazę organiczną, czyli zewnątrzkomórkową część tkanki kostnej. Kolejnym długościom fali odpowiadają grupy chemiczne, które wchodzi w skład fazy organicznej i mineralnej kości.



Ryc. 8. Widmo rozproszenia ramanowskiego uzyskane z tkanki podchrzęstnej kości.
Źródło: materiał Zakładu Spektroskopii Optycznej Politechniki Poznańskiej

Tab. 2. Położenie odpowiednich pasm w widmie rozproszenia ramanowskiego

Liczba falowa (cm ⁻¹)	Typ drgań
430 – 450	ν ₂ PO ₄ ³⁻
587 – 604	ν ₄ PO ₄ ³⁻
855 – 857	Prolina
960 – 961	ν ₁ PO ₄ ³⁻
1003	Fenylalanina
1003	HPO ₄ ²⁻
1035 – 1048	ν ₃ PO ₄ ³⁻
1070 – 1075	ν ₁ CO ₃ ²⁻ typ B
1103	ν ₁ CO ₃ ²⁻ typ A
1243 – 1253	Amid III – kłębek statystyczny
1265 – 1300	Amid III – alfa helisa
1400 – 1470	C-H zginające
1595 – 1700	Amid I
2800 - 3100	C-H rozciągające

Kolorem szarym oznaczono typy drgań analizowane w niniejszej pracy

Poprzez przypisanie pasm ramanowskich, w konkretnej liczbie falowej, określonych grup chemicznych, możliwe jest dalsze badanie ich stosunków oraz określenie swoistej jakości kości, opisaney przez stopień mineralizacji, zawartość kolagenu oraz stopień jego uporządkowania - przestrzenną konfigurację. Jakość kości, zbliżona do biologicznej pod względem budowy oraz mikrostruktury, określa jej możliwość pełnienia funkcji mechanicznej i podporowej, zapewniając wówczas równomierne przenoszenie obciążeń (Judex i wsp., 2003). Poza masą kości i wysoką gęstością mineralną, o dobrej jakości decydują także inne czynniki, takie jak proporcje fazy mineralnej do organicznej, mikroarchitektura kości gąbczastej, konfiguracja przestrzenna i usieciowanie włókien kolagenowych, możliwości remodellingu kości i obecność mikrouszkodzeń (Weiner i wsp., 1998). Grupy chemiczne przypisane do konkretnych liczb falowych zostały już wcześniej opisane w badaniach Mendelshon'a i współautorów oraz Boskey'a i Mendelshon'a określając tym samym tak zwany „*footprint*” dla każdej grupy chemicznej, którym jest określona liczba falowa (Boskey i Mendelsohn, 2005; Mendelsohn i wsp., 1999). Dane te są wykorzystywane w wielu pracach wykorzystujących technikę badania spektroskopii Ramana, stanowią także bazę wiedzy w tej pracy.

Biorąc pod uwagę charakter badanej próbki – próbki biologiczne, zawierające w swojej strukturze wodę, tłuszcze, fazy mineralne i organiczne, rzadko bada się maksymalną intensywność pasma. Zdecydowanie częściej wykorzystuje się intensywność integralną lub też stosunki intensywności pasm konkretnych liczb falowych w obrębie tego samego pomiaru (Morris, 2010, Morris 2011).

Spektroskopia Ramana dostarcza informacji zarówno o fazie organicznej, jak i mineralnej kości. W publikacjach, najczęściej wykorzystywanymi pomiarami w analizie składu chemicznego kości, są stosunki pasm pochodzących od hydroksyapatytu do pasm pochodzących od kolagenu, węglanoapatytu do hydroksyapatytu z zakresu fal fosforanu ν_2 , ν_4 , węglanu ν_1 oraz wiązań amidowych III. Parametry te opisują stopień mineralizacji tkanki kostnej, poziom substytucji węglanami w apatycie kostnym oraz przestrzenną orientację włókien kolagenowych (Morris, 2010).

Główne pasma widma Ramana warstwy podchrzęstnej kości oraz kości gąbczastej dotyczą liczby falowej odpowiadającej tym drganiom fosforanów, węglanów, macierzy organicznej wiązań amidowych I, amidowych III oraz C-H rozciągającego. Do analizy widm ramanowskich wykorzystano stosunki intensywności pasm integralnych, związanych z konkretnymi liczbami falowymi, czyli drganiami oscylacyjnymi. Stosunki te pozwalają na wyznaczenie wskaźnika mineralizacji kości, ang. mineralization index (MI). Wskaźnik ten został wyznaczony na podstawie wyznaczenia stosunku intensywności integralnych pasm

fosforanów ν_1 do intensywności pasm amidu III ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ / amide III) z obszarów drgań 960-961 cm^{-1} dla grup fosforanowych i 1243-1300 cm^{-1} dla wiązań amidowych III (Kazanci i wsp., 2007). Powyższy parametr jest szeroko stosowany w badaniach z wykorzystaniem spektroskopii ramanowskiej w badaniach tkanki kostnej, analizując zmianę składu kości, jako proporcji minerałów do macierzy oraz przesunięciu tych faz na korzyść fazy mineralnej bądź organicznej (Carden i Morris, 2000; Kazanci i wsp., 2006).

Parametrem wykorzystywanym do analizy jakościowej składu fazy mineralnej kości, posłużono się wskaźnikiem zmian mineralizacji kości, ang. change index (CI), określającym poziom substytucji fosforanów węglanami w apatycie kostnym. We wskaźniku zastosowano porównanie intensywności pasm integralnych pasm ramanowskich grup węglanowych $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ z obszaru drgań 1070 – 1075 cm^{-1} , z intensywnością pasm integralnych dla liczby falowej 960-961 cm^{-1} , która odpowiada grupom fosforanowym $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, które użyte są też we wskaźniku mineralizacji kości. Typ węglanu występujący dla powyższej liczby falowej odpowiada węglanowi ν_1 typu B. Węglan ν_1 typu A, pojawiający się jako pasmo spektralne w regionie 1103 cm^{-1} , z uwagi na niewielką intensywność tego pasma, nie pozwala on na uzyskanie informacji o zmianie składu kości. Oba pasma zawierają się w obszarze fazy mineralnej warstwy podchrzęstnej kości. Powyższy stosunek pozwala uzyskać pogląd na budowę kości. Parametr ulega zmianie zależnie od rodzaju kości, wieku pacjenta, stopniu krystalizacji (Akkus i wsp., 2004; Legros i wsp., 1987; Yerramshetty i wsp., 2006).

Kolagen typu I, występujący w fazie organicznej tkanki kostnej, jest bardziej elastyczny i odporny na złamania niż kryształy apatytu. Odporność mechaniczna zależy natomiast od jakości komponentu mineralnego. (Boivin i wsp., 2002). Osiągnięcie optymalnych właściwości biomechanicznych, zarówno warstwy korowej jak i gąbczastej kości, możliwe jest poprzez połączenie wysokiej sztywności, zapewnionej przez kryształy apatytu kostnego oraz wytrzymałości i odporności na odkształcenia kolagenu typu I (de Carmejane i wsp., 2005). Kolagen może posiadać dwie konfiguracje przestrzenne: strukturę potrójnej helisy lub nieuporządkowany kłębek statystyczny. Pierwsza, helisa alfa, sprawia, że szkielet tropokolagenu odznacza się dużą sztywnością. Kłębek statystyczny kolagenu jest niezorganizowaną strukturą przestrzenną, co za tym idzie kolagen w tej formie zapewnia znikomą wytrzymałość mechaniczną. Parametrami w spektroskopii Ramana, które pośrednio określają zmianę przestrzennej konfiguracji kolagenu ze struktury helikalnej w strukturę nieuporządkowaną przestrzennie, są drgania oscylacyjne wiązań peptydowych. Obserwowane są w mikrospektroskopii jako pasma amidowe I i III (ang. amide I, amide III). Intensywność

pasem ramanowskich koreluje ze strukturą białka, bądź ze zdolnością białka do przyjmowania przestrzennych konfiguracji (Morris 2011).

Polaryzacja światła padającego i rozproszonego oraz typ wzbudzenia w spektroskopii Ramana dostarcza dodatkowych informacji o strukturze i orientacji molekularnych składowych kości. Część widma w spektroskopii Ramana jest wrażliwa na przestrzenną konfigurację molekuł (Kazanci i wsp., 2006, 2007; Kozielski i wsp., 2011).

Parametry widma spektralnego fosforanów ν_1 i amidu I wykazują większe różnice w zależności od kierunku polaryzacji oraz promienia wzbudzającego niż parametry widm amidu III, fosforanów ν_2 i fosforanów ν_4 . Krytalograficzna oś kryształów apatytu położona jest wzdłuż włókien kolagenu i związana jest z oscylacjami fosforanów ν_1 . Struktura potrójnej helisy kolagenu determinuje położenie wiązań amidowych; wiązania C=O są ułożone prostopadle do osi długiej kolagenu. Zatem intensywność widma fosforanu ν_1 osiąga maksymalne wartości w momencie, kiedy wiązka światła wzbudzającego pada prostopadle do włókien kolagenowych (Tsuda i wsp., 1994). Widma przypisane do amidu III, fosforanów ν_2 i fosforanów ν_4 są mniej wrażliwe na efekt orientacji przestrzennej i wskazują na zmiany w fazie mineralnej i organicznej kości (Kozielski i wsp., 2011).

Zależność pomiędzy intensywnością pasma amidu I, a widmem fosforanów ν_2 oraz fosforanów ν_1 posłużyła jako ocena przestrzennej organizacji włókien kolagenowych oraz jakościowego wskaźnika mineralizacji kostnej. Do badania użyto widm pasm $1595 - 1700\text{cm}^{-1}$ odpowiadających pasmom amidu I, $960-961\text{cm}^{-1}$, która odpowiada grupom fosforanowym $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ oraz $430 - 450\text{cm}^{-1}$ dla grup fosforanowych $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$. Stosunek intensywności integralnych pasm widm $\nu_2\text{PO}_4^{3-} / \text{amid I}$ został użyty do badania konfiguracji przestrzennej kolagenu, ang. collagen configuration index (CCI). Stosunek widm $\nu_1\text{PO}_4^{3-} / \text{amid I}$ określa stosunek hydroksyapatytu do kolagenu, ang. hydroxyapatite: collagen ratio (HCR), a więc fazy organicznej do mineralnej kości (Buchwald i wsp., 2012, Morris 2011).

3. ZAŁOŻENIA I CEL PRACY

3.1 Założenia pracy

Choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych jest chorobą cywilizacyjną, a endoprotezoplastyka stawu kolanowego stanowi drugą co do częstości endoprotezoplastykę stawu, po operacji stawu biodrowego. Rozwój implantologii w ostatnich kilkudziesięciu latach znacznie poprawił funkcjonalność i przeżywalność protez stawów. Niemniej, wyniki endoprotezoplastyki stawów kolanowych nadal nie dają najwyższego poziomu satysfakcji zarówno operatorowi, jak i pacjentowi. Wydaje się, że zrozumienie zmian zachodzących w chrząstce i tkance podchrzęstnej kości, wczesna diagnostyka i możliwość wprowadzania leczenia zachowawczego lub operacji oszczędzających staw własny mogą być kluczowe dla odłożenia w czasie radykalnego leczenia przede wszystkim u młodszych pacjentów.

W ostatnich latach pojawiło się wiele doniesień dotyczących zastosowania zjawiska spektroskopii Ramana do badania materiału biologicznego (Carter i wsp., 2009). Badanie Yasuhito i innych nad mikrostrukturą chrząstki stawowej w obrębie kolagenu typu II na materiale 5 kości piszczelowych, wykazało zmiany w jej budowie mikrostrukturalnej, w porównaniu do próbki bez cech zmian zwyrodnieniowych. Autorzy pracy wysunęli wnioski, iż spektroskopia Ramana może pełnić rolę istotnego narzędzia w wykrywaniu subklinicznego stadium choroby zwyrodnieniowej, jako że istotne różnice w mikrostrukturze tkanki były zauważalne pomiędzy 1 a 2 stopniem skali radiologicznej (Takahashi i wsp., 2014). Badania były jednak przeprowadzone na niewielkiej próbie, obejmowały jedynie badanie w obrębie widma amidu III z obszaru drgań $1241 - 1269 \text{ cm}^{-1}$. Daje to jednak pewne rozeznanie, iż istotne zmiany subkliniczne mogą dotyczyć warstwy podchrzęstnej kości.

W niniejszych badaniach wykorzystano metodę spektroskopii ramanowskiej, wykazuje ona nad spektroskopią w podczerwieni przewagę, polegającą na jedynie możliwie minimalnym przygotowaniu próbek, mniejszej wrażliwości na stopień uwodnienia tkanek, co w przypadku materiału biologicznego jest niezwykle istotne, gdyż nie zaburza obrazu otrzymanych widm rozproszeniowych oraz umożliwia uzyskanie pomiarów w wyższej rozdzielczości przestrzennej (Penel i wsp., 2005; Timlin i wsp., 1999). Niebagatelnym atutem spektroskopii ramanowskiej, jest dzięki powyższym zaletom, możliwość jej użycia w modelach zarówno *in vivo* jak i *ex vivo*. Przydatność badania spektroskopowego, ze szczególnym uwzględnieniem tkanek biologicznych, została już opisana przez badaczy, poszerzając jednocześnie wiedzę o jakościową i ilościową analizę składu kości i chrząstki (Carden i Morris, 2000).

W związku z tymi danymi, zakładam, że istnieje zależność pomiędzy stopniem deformacji szpotawej, stanem klinicznym, nasileniem zmian zwyrodnieniowych a zaburzeniem mikrostruktury tkanki kostnej w badaniu z użyciem spektroskopii Ramana.

3.2. Cel pracy – wprowadzenie

Pacjentki z rozpoznąną pierwotną chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego, zakwalifikowane do leczenia operacyjnego – endoprotezoplastyki stawu kolanowego, zostały poddane ocenie klinicznej, radiologicznej oraz określeniu poziomu deformacji szpotawej stawu. Podczas leczenia operacyjnego, od 30 pacjentek, podzielonych na dwie grupy porównawcze pod względem stopnia deformacji szpotawej stawu, pobrano materiał chrzęstno – kostny, który następnie poddano badaniu z zastosowaniem techniki spektroskopii ramanowskiej. Uzyskane widma rozpraszania ramanowskiego poddano analizie poprzez pomiar poszczególnych intensywności pasm, a wyniki w postaci proporcji wybranych pasm ramanowskich, przyporządkowanych wybranym grupom chemicznym, wyrażono jako 4 wskaźniki: wskaźnik mineralizacji (MI), wskaźnik zmiany mineralizacji (CI), wskaźnik uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunek hydroksyapatytu do kolagenu (HCR). Wskaźniki te porównano do wcześniej uzyskanych danych: stopnia zwyrodnienia stawu kolanowego oraz deformacji szpotawej stawu.

3.3. Cel pracy

Ocena rozkładu chemicznego oraz konfiguracji przestrzennej kolagenu w warstwie podchrzęstnej kości, w korelacji ze stopniem zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, określonego na podstawie badania radiologicznego, w odniesieniu do wielkości deformacji szpotawej kolana i wskaźnika BMI u kobiet, z uwzględnieniem wskaźnika mineralizacji (MI), wskaźnika zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI), stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) w kłykcii bocznej i przyśrodkowej kości piszczelowej.

4. MATERIAŁ

W pracy badano materiał pochodzenia ludzkiego. W badaniu wyodrębniono dwie grupy porównawcze, liczące po 15 pacjentki.

Wstępnie poddano analizie łącznie 63 pacjentki, kobiety w wieku 50-85 lat, które miały wyznaczony termin planowej, bądź pilnej endoprotezoplastyki stawu kolanowego pomiędzy marcem 2018 roku, a grudniem 2018 roku, w Oddziale Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu Szpitala w Puszczykowie. Wstępnie kwalifikowane były pacjentki zgodnie z kolejnością zgłoszenia i wyznaczenia terminu leczenia operacyjnego. Pacjentki pochodziły z województwa wielkopolskiego i dolnośląskiego.

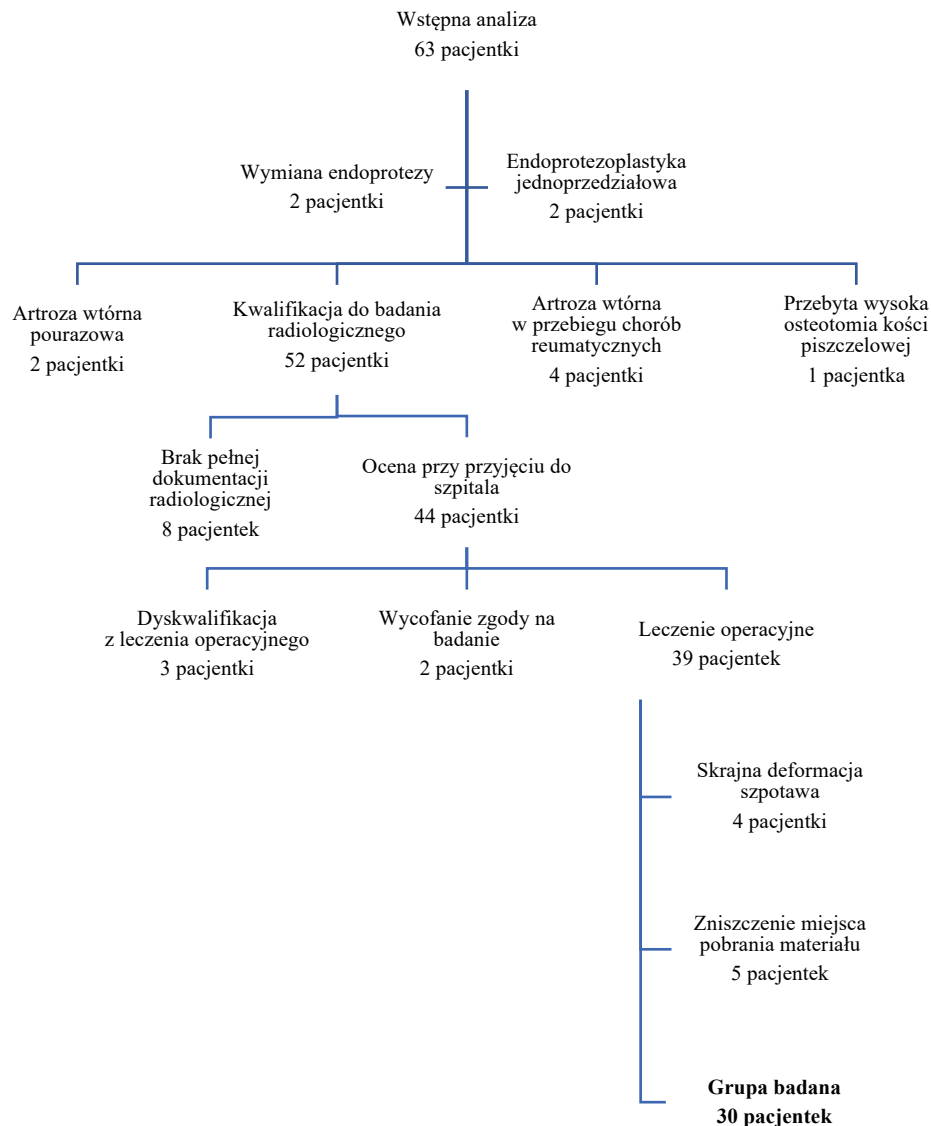
W powyższej grupie 2 pacjentki zostały zakwalifikowane do operacji rewizyjnych (wymiana endoprotezy jednoprzediałowej do całkowitej), a 2 pacjentki po dalszej diagnostyce szpitalnej i ocenie w tomografii rezonansu magnetycznego zostały zakwalifikowane do endoprotezoplastyki jednoprzediałowej.

Pozostałe pacjentki były badane na jeden miesiąc przed planowanym przyjęciem do oddziału. W etapie badania klinicznego wykluczono pacjentki z wtórną artrozą stawu kolanowego: w przebiegu chorób reumatycznych (reumatoidalne lub łuszczycowe zapalenie stawu) – 4 pacjentki, pacjentki w przebiegu artrozy pourazowej po przebytym złamaniu końca bliższego kości piszczelowej lub dalszego udowej - 2. Zdyskwalifikowano także pacjentkę po przebytej wcześniej wysokiej osteotomii kości piszczelowej, z uwagi na trudność oceny osi kończyny.

Pacjentki zakwalifikowane do badania radiologicznego pomiarowego kończyn dolnych na długiej kliszy: 52 pacjentki. Wśród tej grupy badanej 8 pacjentek do dnia przyjęcia do szpitala z przyczyn osobistych i logistycznych nie wykonała zdjęć radiologicznych pomiarowych, co ograniczyło liczbę badanych do 44 pacjentek z pełną dokumentacją medyczną przed operacją.

W dniu przyjęcia do szpitala 2 pacjentki wycofały zgodę na badanie pobranego materiału. 3 pacjentki nie były leczone operacyjnie z innych powodów.

Śródoperacyjnie 4 stawy kolanowe z uwagi na masywną destrukcję stawu w przebiegu deformacji szpotawej nie dały możliwości pozyskania próbki z kłykcia przyśrodkowego. 5 próbek zostało ostatecznie odrzuconych z uwagi na destrukcję miejsca pobrania materiału w momencie przycięcia końca bliższego kości piszczelowej.



Ryc. 9. Wykres przedstawiający kwalifikację pacjentek do badania.

Podsumowując, grupę badaną stanowiło 30 pacjentek w wieku 50-85 lat. Pacjentki wyraziły pełną i świadomą zgodę na udział w badaniu naukowym, w tym na wykonanie diagnostyki radiologicznej, wywiad, badanie przedmiotowe, przechowanie, przygotowanie i analizę materiału kostnego pobranego w trakcie endoprotezoplastyki stawu kolanowego.

Podczas operacji endoprotezoplastyki stawu kolanowego pobrano materiał z plateau piszczeli. Próbkę następnie opracowano w formie bloczków chrzęstno – kostnych, zgodnie z techniką wykorzystaną wcześniej przez innych badaczy (Takahashi i wsp., 2014).

Pobranie materiału chrzęstno – kostnego nie poszerzało zakresu operacji, stanowiło jeden z etapów leczenia operacyjnego, zgodnie z techniką operacyjną. Pacjentki o przebiegu operacji oraz pobraniu i zachowaniu materiału były informowane przed kwalifikacją do badania jak i bezpośrednio przed przystąpieniem do operacji.

Przygotowane bloczki kostne w postaci 180 próbek zostały dalej poddane analizie w pracowni spektroskopowej w Zakładzie Spektroskopii Optycznej Politechniki Poznańskiej.

W moich badaniach nie przeprowadzono grupy kontrolnej, z uwagi na brak możliwości pobrania próbek zdrowej tkanki chrzęstno – kostnej okolicy stawu kolanowego. Pobranie takiego materiału od osoby zdrowiej jest niemożliwe. Trudne jest także pobranie tkanki od zmarłego z pełnym przekonaniem o braku obecności zmian zwyrodnieniowych. Na cele pracy wyodrębniono dwie grupy porównawcze, różniące się stopniem zaawansowania szpotawości kończyny.

Na badania uzyskano zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu w Uchwale nr 1199/17 z dnia 07.12.2017r.

5. METODYKA BADAŃ

5.1. Ocena kliniczna

Z pacjentkami przeprowadzono badanie podmiotowe i przedmiotowe w celu ustalenia wskazań do dalszej diagnostyki choroby zwyrodnieniowej kolana. Po stwierdzeniu występowania typowych dla choroby zwyrodnieniowej stawów objawów i obecności klinicznej deformacji szpotawej stawu, pacjentki dalej kierowano do badań radiologicznych. Po zakwalifikowaniu i uzyskaniu pisemnej, świadomej zgody na udział w badaniu od pacjentek uzyskano następujące informacje: wiek (liczony w latach), BMI (wyrażone w kg/m^2), początek objawów (liczony w latach do dnia przyjęcia), stosowanie iniekcji dostawowych w postaci iniekcji steroidowych lub kwasu hialuronowego na maksymalnie 12 miesięcy przed planowaną operacją.

5.2. Metodyka oceny badania radiologicznego

Pacjentki zostały poddane ocenie radiologicznej zgodnie z ogólnie przyjętymi normami diagnostyki radiologicznej. Na podstawie wykonanych radiogramów w pozycji przednio – tylnej oraz bocznej określiłem skalę zaawansowania choroby zwyrodnieniowej w skalach Kellgrena – Lawrence’a oraz Crofty – Lane’a.

W pierwszej skali pacjentki zostały przypisane do odpowiedniego stopnia choroby zwyrodnieniowej, od stopnia 0 do 4, biorąc pod uwagę charakterystyczne cechy artrozy (Kellgren i Lawrence, 1957). Zdjęcia oceniono w wersji cyfrowej na ekranie przystosowanym do oceny radiogramów oraz z użyciem specjalistycznego oprogramowania służącego do cyfrowego odczytu zdjęć radiologicznych.

Tab. 3. Skala wg Kellgrena – Lawrence’a

Stopień	Opis	Charakterystyka
0°	Norma	Nie stwierdza się zmian radiologicznych
1°	Drobne zmiany	Drobne osteofity. Możliwe niewielkie zwężenie szpary stawowej.
2°	Lekka	Wyraźne osteofity. Zwężenie szpary stawowej obecne.
3°	Umiarkowana	Duże i/lub liczne osteofity. Szpara stawowa zwężona umiarkowanie. Umiarkowana sklerotyzacja podchrzęstna.
4°	Zaawansowana	Duże i/lub liczne osteofity. Szpara stawowa znacznie zwężona. Deformacja stawu. Sklerotyzacja podchrzęstna.

W skali Crofty i Lane’a pacjentki zostały ocenione pod kątem szerokości szczeliny stawowej. W zaproponowanej skali mierzy się najmniejszą szerokość, co oznacza najwęższe miejsce na obrazie radiologicznym (Dieppe, 1995). Pomiaru dokonano w wersji cyfrowej po wcześniejszym kalibrowaniu obrazu i określeniu szerokości stawu w systemie metrycznym. Zgodnie z systemem klasyfikacji pacjent zostaje zakwalifikowany do stopnia 0 – 3.

Tab. 4. Skala wg Crofty – Lane’a

Stopień	Opis	Najmniejsza szerokość szpary stawowej
0°	Norma	$\geq 3,0\text{mm}$
1°	Lekkie zwężenie	$\geq 2,5\text{mm}$
2°	Umiarkowane zwężenie	$\geq 1,5\text{mm}$
3°	Zaawansowane zwężenie	$< 1,5\text{mm}$

W ostatnim etapie oceny radiologicznej, wykreślono oś mechaniczną operowanej kończyny dolnej. Pomiaru dokonano na zdjęciach radiologicznych na długiej kliszy pomiarowej, w formie cyfrowej. Pomiar był wykonany w pozycji stojącej, z pełnym obciążeniem kończyn. Badanie radiologiczne obejmowało obszar anatomiczny od talerzy biodrowych do stóp, z koniecznym uwzględnieniem głów kości udowych oraz bloczków kości skokowych obustronnie.

Do pomiarów wykorzystano sposób wykreślenia osi mechanicznej kończyny dolnej, z wykorzystaniem kąta HKA, z klasyfikacją deformacji szpotawej zastosowaną w *The Journal of Arthroplasty* (Thienpont i Parvizi, 2016), gdzie kąt HKA równy i mniejszy niż 177° jest uważany za deformację szpotawą stawu z podziałem na stopnie zaawansowania, zaprezentowane w poniższej tabeli. Dla zachowania przejrzystości stopień deformacji określono jako kąt dopełniający do kąta 180° . Taka metoda prezentowania danych zastosowana została również przez autorów pracy.

Tab. 5. Ocena stopnia deformacji szpotawej na podstawie kąta HKA

Kąt HKA	Opis stopnia deformacji szpotawej
$< 3^\circ$	Norma
$4^\circ - 10^\circ$	Nieznaczna deformacja
$11^\circ - 20^\circ$	Znaczna deformacja
$21^\circ - 30^\circ$	Istotna deformacja
$> 30^\circ$	Skrajna deformacja

Pomiar osi kończyny w I etapie został wykonany przeglądowo – wykonano pomiar osi mechanicznej od środka głowy kości udowej do środka bloczka kości skokowej. W przypadku osi neutralnej, oś stawu przechodzi przez środek stawu kolanowego. W przypadku osi szpotawej – przyśrodkowej do środka, w osi koślawej bocznie. Pomiar wstępny potwierdzał obecność deformacji szpotawej stawu.

W II etapie wyznaczono dokładny pomiar osi kończyny dolnej zgodnie z przedstawioną wcześniej klasyfikacją. Pomiar został wykonany poprzez wyznaczenie linii biegnącej od środka głowy kości udowej do stawu kolanowego oraz od środka stawu kolanowego do środka bloczka kości skokowej a następnie pomiarze kąta pomiędzy wyznaczonymi liniami oraz przypisaniem do odpowiedniego kąta HKA, opisanego powyżej.

Z uwagi na duże różnice w destrukcji tkanki chrzęstnej i kostnej, pacjentki z uwagi na deformację stawu kolanowego podzielono na 2 grupy na potrzeby niniejszej rozprawy: deformację szpotawą lekką i deformację szpotawą zaawansowaną.

Do grupy deformacji lekkiej zakwalifikowano pacjentki z grupy deformacji nieznacznej, czyli $4^\circ - 10^\circ$ kąta HKA.

Do grupy deformacji zaawansowanej zakwalifikowano pacjentki z kątem HKA $11^\circ - 30^\circ$ stopni, opisywanych jako deformację znaczną i istotną. Plateau piszczele w deformacjach osiągających powyżej 30 stopni, cechowały się całkowitą destrukcją kłykcia przyśrodkowego,

nie dając możliwości pobrania bloczka kostnego. W tym stopniu deformacji nie było także możliwe użycie standardowego, pierwotnego implantu piszczelowego.

Do obu grup porównawczych zakwalifikowano po 15 pacjentek.

5.3. Śródoperacyjna ocena chrząstki stawowej

Podczas przeprowadzanej operacji endoprotezoplastyki, po wyeksponowaniu końca bliższego kości piszczelowej, przed przeprowadzeniem dalszych kroków operacyjnych oceniono chrząstkę stawową zgodnie z klasyfikacją Outerbridge (Slattery i wsp., 2018).

Tab. 6. Ocena stopnia uszkodzenia chrząstki stawowej wg klasyfikacji Outerbridge

Stopień	Opis chrząstki stawowej
0	Chrzątka normalna
1	Spluszowacenie, zmiękczenie i obrzęk chrząstki.
2	Pęknięcia i fragmentacja niepełnej grubości. Średnica nieprzekraczająca 1,5cm.
3	Pęknięcia do warstwy podchrzęstnej, średnica przekraczająca 1,5cm
4	Ekspozycja warstwy podchrzęstnej.

Zgodnie z klasyfikacją Outerbridge na podstawie dokonanej in vivo oceny jakości i uszkodzeń chrząstki przyporządkowano miejsca na kłykcium, do stopnia 0 – 4. Inspekcji głębokości uszkodzenia dokonano z użyciem pęset anatomicznych, natomiast pomiaru średnicy uszkodzenia dokonano z użyciem sterylnej linijki operacyjnej z błędem pomiaru 1mm.

5.4. Technika pobrania i przygotowania materiału chrzęstno – kostnego

Po przycięciu plateau piszczeli, zgodnie z techniką operacyjną, oznaczono planowane miejsca pobrania próbek. Materiał pobrany w trakcie operacji, pod postacią 30 plateau piszczeli, był oczyszczany mechanicznie z tkanek miękkich, poddany płukaniu roztworem soli fizjologicznej celem usunięcia tłuszczu i krwi a następnie wysuszony i niezwłocznie zamrażany do czasu badania. Próbki zamrażano w temperaturze -20°C w środowisku jałowym, w zamrażarce laboratoryjnej niskotemperaturowej.



Ryc. 10. Przycięty fragment końca bliższego kości piszczelowej.

Widoczne miejsca uszkodzenia i braku chrząstki stawowej.

Źródło: materiał własny

Bezpośrednio przed badaniem metodą spektroskopii ramanowskiej próbki były rozmrażane, w warunkach laboratoryjnych przycinane do bloczków o wymiarach 5x5mm, kolejno z części przedniej, środkowej i tylnej kłykcia przyśrodkowego piszczeli (KPP, KPŚ, KPT) oraz części przedniej, środkowej i tylnej kłykcia bocznego piszczeli (KBP, KBŚ, KBT). Do wyznaczenia miejsca pobrania bloczka kostnego użyto techniki zaproponowanej przez Y. Takahashi, gdzie próbka odpowiadająca środkowi kłykcia przyśrodkowego oznaczona jako KPŚ przypada na powierzchnię najbardziej obciążaną, następnie próbka KPP odpowiada przedniej części kłykcia a próbka KPT jego tylnej części. Analogicznie oznaczono miejsca pobrania w obrębie kłykcia bocznego kości piszczelowej (Takahashi i wsp., 2014).



Ryc. 11. Plateau piszczeli z oznaczonymi miejscami pobrania materiału.

Źródło: materiał własny

Każdy z bloczków kostnych miał określony śródoperacyjnie stopień uszkodzenia chrząstki stawowej w klasyfikacji Outerbridge.



Ryc. 12. Opracowany bloczek chrzęstno – kostny.

Źródło: materiał własny

Pobranie, ocena oraz opracowanie materiału chrzęstno – kostnego zostało wykonane przez autora niniejszej pracy.

5.5. Badanie materiału z wykorzystaniem spektroskopii i systemu mikroramanowskiego

Do badań spektroskopowych wykorzystano system mikroramanowski inVia firmy Renishaw, wyposażony w mikroskop konfokalny Leica. Jako źródło światła wzbudzającego użyto lasera pracującego na długości fali 785 nm. W badaniach zastosowano obiektyw x50 o długiej ogniskowej (ang. long working distance – CCD).

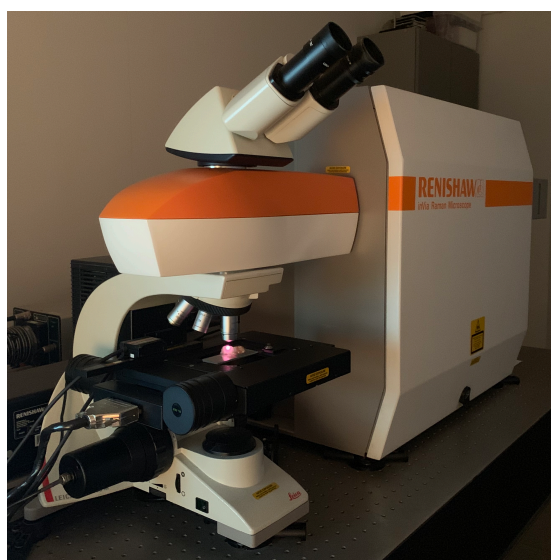
W badaniu mikrospektroskopii obszar widma Ramana z tkanki podchrzęstnej kości uzyskano w zakresie spektralnym 200-1800 cm^{-1} . Badania dokonano uśredniając wyniki z 3 pomiarów: pomiar w wyznaczonym mikroskopowo punkcie środkowej części wyznaczonego bloczka oraz punktów 10 μm powyżej i poniżej tego punktu. Pomiary niespełniające fizycznego lub jakościowego standardu badania powtarzano.

Wykorzystany do badań spektroskop pracuje w geometrii rozpraszania typu rozpraszania wstecznego (ang. back scattering).

Spektroskop jest używany w klasycznym układzie rozproszenia światła.

W przypadku badania na cele pracy wykorzystano następujący system będący wyposażeniem Zakładu Spektroskopii Optycznej Politechniki Poznańskiej:

- laser pracujący w trybie ciągłym będący źródłem wzbudzającym,
- mikroskop konfokalny, sprzęgnięty z układem pomiarowym, pozwalający na bardzo precyzyjne zogniskowanie wiązki lasera na wybranej strukturze lub warstwie, z dokładnością do kilku mikrometrów sześciennych,
- układ optyczny działający na zasadzie oświetlenia próbki, doprowadzenia światła wzbudzającego i zebrania promieniowania rozproszonego,
- siatka dyfrakcyjna,
- kamera CCD (ang. Charge Coupled Device) – detektor promieniowania,
- układ rejestrujący sygnał,
- specjalistyczne oprogramowanie pozwalające na dalszą obróbkę danych.



Ryc. 13. Układ pomiarowy Renishaw inVia Zakładu Spektroskopii Politechniki Poznańskiej.
Źródło: materiał własny

W obróbce danych zastosowano program komputerowy WIRE 3.0. firmy Renishaw, który pozwala na otrzymanie wartości matematycznych w oparciu o pomiary intensywności pasm w widmie Ramana. Z uwagi na charakter badanych próbek – materiał biologiczny o nierównej powierzchni, cechujący się licznymi jamkami, ubytkami, w badaniu analizowano stosunki poszczególnych pasm widma spektralnego, tak by w maksymalnym stopniu ograniczyć wpływ jakości badanej próbki na wyniki badania. Informacje uzyskane w wyniku badania stanowią stosunki poszczególnych intensywności pasm, odpowiadające składnikom tkanki kostnej, które dalej stanowią o jej jakości bądź zmianie proporcji na poziomie mikrostrukturalnym.

Badania z użyciem techniki spektroskopii Ramana oraz pomiary i analiza widma zostały wykonane w całości przez autora rozprawy pod nadzorem merytorycznym i technicznym doświadczonej w tej technice badawczej osoby – Kierownika Zakładu Spektroskopii Politechniki Poznańskiej.

5.6. Opracowanie wyników badań i analiza statystyczna

Zmienne jakościowe opisano za pomocą liczebności (n) i częstości (%). Zmienne mierzalne (dyskretne i ciągłe) opisano za pomocą podstawowych parametrów: średnia arytmetyczna, odchylenie standardowe (odch. std.), mediana oraz wartość minimalna i maksymalna (min. i maks.).

Do sprawdzenia istotności różnicy w dwóch grupach użyto:

- testu t-Studenta w przypadku spełnienia warunków normalności rozkładu i jednorodności wariancji,
- testu Cochran-Coxa w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu i braku jednorodności wariancji,
- testu U Manna-Whitneya w przypadku braku normalności rozkładu.

Do sprawdzenia istotności różnicy w co najmniej trzech grupach użyto testu Kruskala-Wallisa. Do dokładnego sprawdzenia, pomiędzy którymi parami grup występują istotne różnice zastosowano test porównań wielokrotnych Kruskala-Wallisa.

Korelacje między zmiennymi opisanymi co najmniej na skali porządkowej zbadano testem istotności współczynnika korelacji rang Spearmana.

Porównanie wskaźników z wykorzystaniem analizy ANOVA:

- ANOVA (analiza wariancji) – w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu i warunku jednorodności wariancji,
- ANOVA z poprawką testu Welcha – w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu i niespełnienia warunku jednorodności wariancji,
- ANOVA Kruskala-Wallisa – w przypadku niespełnienia warunku normalności rozkładu.

Poziomy prawdopodobieństwa p wyniku testu NIR (test post-hoc).

Za istotną statystycznie przyjęto wartość $p < 0,05$. Obliczenia statystyczne przeprowadzono przy użyciu pakietu statystycznego STATISTICA 10 PL.

6. WYNIKI

6.1. Liczebność badanej próby

W Szpitalu w Puszczykowie, w roku 2018, czyli w roku pozyskiwania materiału badawczego, wykonano łącznie 127 operacji endoprotezoplastyk stawu kolanowego wśród kobiet i mężczyzn.

Poddano analizie łącznie 63 pacjentki, kobiety, w wieku 50-85 lat, które miały wyznaczony termin planowej bądź pilnej endoprotezoplastyki stawu kolanowego pomiędzy marcem 2018 roku a grudniem 2018 roku.

Na podstawie danych statystycznych oraz częstości występowania choroby zwyrodnieniowej opisywanej w literaturze (Lespasio i wsp., 2017), określono liczebność minimalną badanej próby.

Tab. 7. Liczebność populacji Wielkopolski i Polski na podstawie rocznika statystycznego (stan za 2018 r.) Oszacowano liczebność populacji osób z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych (ChZSK), liczoną na podstawie danych: od 50 lat - 19,2% populacji; 140 kobiet na 100 mężczyzn

		Wielkopolska		Polska	
		N	N z ChZSK	N	N z ChZSK
WIEK od 50 lat	ogółem	1 228 259	235 826	14 291 822	2 744 030
	mężczyźni	545 963	98 261	6 317 112	1 143 346
	kobiety	682 296	137 565	7 974 710	1 600 684

Na podstawie danych statystycznych określono minimalną liczebność próby oraz poziom ufności w tabeli 8.

Tab. 8. Minimalna liczebność próby kobiet liczona względem wszystkich kobiet od 50 lat, przyjmując za frakcję wartość 20% dla występowania ChZSK

Obszar		Wielkopolska	Polska
Liczebność kobiet od 50 lat, N		682 296	7 974 710
Poziom ufności		0,95	
		Minimalna liczebność próby, n	
Błąd maksymalny, d	1%	6 091	6 142
	2%	1 533	1 536
	3%	682	683
	4%	384	384
	5%	246	246
	6%	171	171
	7%	125	125
	8%	96	96
	9%	76	76
	10%	61	61
	11%	51	51
	12%	43	43
	13%	36	36
	14%	31	31
	15%	27	27
	16%	24	24
	17%	21	21
	18%	19	19

Według danych z piśmiennictwa, maksymalny błąd statystyczny przy badaniu korelacji nie powinien być większy niż 15%. W pracy badano próbki materiału pochodzącego od 30 pacjentek (łącznie 180 próbek), co obarczone jest błędem maksymalnym 14%; powoduje to, że zachowana jest granica akceptowalnego błędu szacunku dla tego rodzaju pracy badawczej, a uzyskane wyniki można rozciągnąć na całą populację kobiet z deformacją szpotawą w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego (Zasępa, 1991).

6.2. Rezultaty obserwacji klinicznej i statystyka ogólna

W tabelach 9 i 10 przedstawiono charakterystykę opisową badanej próby. W badaniu uwzględniono następujące czynniki: wiek, BMI, czas od początku objawów. Uwzględniono także, czy w czasie do maksymalnie 12 miesięcy przed operacją do stawu kolanowego zostały podane leki, preparat steroidowy lub kwas hialuronowy.

Tab. 9. Statystyki opisowe wieku, wskaźnika BMI oraz początku objawów u pacjentów

Zmienna	n	Średnia	Odch. Std.	Mediana	Min.	Maks.
Wiek [lata]	30	69,0	8,0	69,5	52	83
BMI [kg/m ²]	30	33,05	4,31	33,42	24,17	40,63
Początek objawów [lata]	30	5,2	2,8	5,0	1	15

Wyniki: mediana chorych kwalifikowanych do endoprotezoplastyki mieści się wśród 2 najczęstszych grup operowanych chorych według statystyk Polskiego Rejestru Endoprotezoplastyk, który wskazuje na grupy 60-70 lat i 70-80 lat.

Tab. 10. Liczebność i częstość pacjentów z podziałem na iniekcje dostawowe

Iniekcje dostawowe	n	%
Iniekcje steroidowe	10	33,3
Kwas hialuronowy	11	36,7
Brak iniekcji	9	30,0

Iniekcje wykonane do maksymalnie 12 miesięcy przed operacją.

W tabelach 11 i 12 przedstawiono charakterystykę wyznaczonego kąta HKA, obliczonego na tej podstawie kąta deformacji szpotawej oraz przyporządkowania do odpowiedniego poziomu deformacji.

Tab. 11. Statystyki opisowe kąta deformacji szpotawej i kąta HKA u pacjentów

Zmienna	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.
Kąt deformacji szpotawej	30	11,3	7,3	10,5	4	30
Kąt HKA	30	168,7	7,3	169,5	150	176

Tab. 12. Liczebność i częstość pacjentów z podziałem na poziom deformacji

Poziom deformacji szpotawej	n	%
Lekka od 4° do 10°	15	50,0
Zaawansowana od 11° do 30°	15	50,0

Poziom lekki obejmuje, zgodnie z zastosowanym wcześniej podziałem na 2 grupy porównawcze, deformację szpotawą 4 - 10 stopni, natomiast poziom zaawansowany 11 - 30 stopni.

W tabelach 13 i 14 przedstawiono ogólną statystykę występowania wśród pacjentów stopnia zwyrodnienia stawu, wyrażonego w skalach Kellgrena – Lawrence’a oraz Crofty – Lane’a. W tabelach 15 i 16 opisano częstość występowania uszkodzenia chrząstki stawowej, w zależności od miejsca na kłykciach kości piszczelowej, opisanego w 5-stopniowej skali Outerbridge.

Tab. 13. Liczebność i częstość pacjentów z podziałem na poziom skali Kellgrena-Lawrence'a

Skala Kellgrena-Lawrence'a	n	%
1	7	23,3
2	6	20,0
3	8	26,7
4	9	30,0

Tab. 14. Liczebność i częstość pacjentów z podziałem na poziom skali Crofty – Lane’a

Skala Crofty – Lane’a	n	%
1	8	26,7
2	11	36,7
3	11	36,7

Pacjenci kwalifikowani do endoprotezoplastyki stawu kolanowego oceniani byli w obu powyższych skalach. W trakcie prowadzenia badań i analizy statystycznej wyników, znacząco większą przydatnością okazała się skala wg Kellgrena – Lawrence’a. Uzasadnia to fakt możliwości wykorzystania 4 grup w przypadku radiologicznych cech choroby

zwyrodnieniowej stawów kolanowych, zamiast 3 w skali Crofty – Lane’a, przy symetrycznym rozkładzie częstości wykorzystania każdej z nich. Ponadto, w pierwotnej chorobie zwyrodnieniowej stawu kolanowego, przebiegającej ze szpotawością stawu, zwężenie szczeliny stawowej po stronie przyśrodkowej jest znacząco większe niż po stronie bocznej.

Tab. 15. Liczebność i częstość pacjentów z podziałem na poziom skali Outerbridge

Miejsce badania	Skala Outerbridge	n	%
KPP	1	2	6,7
	2	7	23,3
	3	8	26,7
	4	13	43,3
KPŚ	2	2	6,7
	3	8	26,7
	4	20	66,7
KPT	2	7	23,3
	3	9	30,0
	4	14	46,7
KBP	0	2	6,7
	1	8	26,7
	2	14	46,7
	3	5	16,7
	4	1	3,3
KBŚ	1	6	20,0
	2	16	53,3
	3	6	20,0
	4	2	6,7
KBT	0	2	6,7
	1	9	30,0
	2	11	36,7
	3	6	20,0
	4	2	6,7

KPP – kłykiec przyśrodkowy przód, KPŚ – kłykiec przyśrodkowy środek, KPT – kłykiec przyśrodkowy tył, KBP – kłykiec boczny przód, KBŚ – kłykiec boczny środek, KBT – kłykiec boczny tył

Tab. 16. Statystyki opisowe skali Outerbridge

Miejsce badania	n	Skala Outerbridge				
		Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.
KPP	30	3,07	0,98	3,0	1	4
KPŚ	30	3,60	0,62	4,0	2	4
KPT	30	3,23	0,82	3,0	2	4
KBP	30	1,83	0,91	2,0	0	4
KBŚ	30	2,13	0,82	2,0	1	4
KBT	30	1,90	1,03	2,0	0	4

Wnioski: skala Outerbridge śródoperacyjnej oceny chrząstki stawowej wskazuje na większą destrukcję w obrębie przedziału przysrodkowego stawu niż bocznego.

W tabeli 17 wyszczególniono średnią i medianę poszczególnych badanych wskaźników, w zależności od miejsca pobrania próbki. Przedstawione wyniki są średnią wyliczoną z kilku pomiarów z danego miejsca.

Tab. 17. Statystyki opisowe wskaźnika mineralizacji (MI), wskaźnika zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR)

Wskaźnik	Miejsce badane	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.
MI	KPP	30	3,28	1,81	3,11	1,11	8,65
	KPŚ	30	3,45	1,68	3,09	0,75	7,53
	KPT	30	3,41	2,01	3,47	0,49	9,23
	KBP	30	3,05	2,38	2,35	0,24	9,59
	KBŚ	30	3,88	2,82	2,80	0,80	12,87
	KBT	30	2,77	1,55	2,43	0,83	7,93
CI	KPP	30	0,283	0,347	0,209	0,114	2,063
	KPŚ	30	0,213	0,142	0,164	0,093	0,785
	KPT	30	0,210	0,112	0,155	0,106	0,522
	KBP	30	0,321	0,333	0,209	0,099	1,530
	KBŚ	30	0,205	0,090	0,174	0,113	0,529
	KBT	30	0,249	0,121	0,210	0,105	0,524
CCI	KPP	30	3,21	2,81	2,69	0,09	15,70
	KPŚ	30	2,65	0,96	2,58	0,92	5,50
	KPT	30	2,81	1,31	3,06	0,81	5,46
	KBP	30	2,65	1,47	2,61	0,23	5,58
	KBŚ	30	3,65	2,11	3,01	1,12	10,71
	KBT	30	2,91	1,59	2,65	0,78	7,62
HCR	KPP	30	1,57	1,30	1,06	0,44	6,16
	KPŚ	30	1,45	0,81	1,37	0,54	4,33
	KPT	30	1,55	1,02	1,24	0,38	5,31
	KBP	30	1,83	2,13	1,15	0,50	9,86
	KBŚ	30	1,40	0,79	1,21	0,48	3,69
	KBT	30	2,02	2,35	1,30	0,51	12,92

Wyniki: rozpiętość wyników minimalnych i maksymalnych spowodowana jest różnicą w stopniu zaawansowania zmian zwyrodnieniowych oraz zasadniczych różnic w stopniu destrukcji powierzchni stawowych.

W tabeli 18 określono wartości średnie poszczególnych wskaźników zależnie od miejsca badania na kłykiec boczny lub przyśrodkowy.

Tab. 18. Statystyki opisowe wskaźnika mineralizacji (MI), wskaźnika zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR).

Wskaźnik	Miejsce badane	n	Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.
MI	KP	30	3,38	1,40	3,11	1,08	6,64
	KB	30	3,23	1,76	2,92	1,20	8,73
CI	KP	30	0,235	0,143	0,194	0,126	0,793
	KB	30	0,258	0,152	0,199	0,120	0,780
CCI	KP	30	2,89	1,21	2,77	0,87	6,87
	KB	30	3,07	1,17	3,04	1,05	6,39
HCR	KP	30	1,52	0,72	1,37	0,62	3,01
	KB	30	1,75	1,27	1,34	0,62	5,70

KP – kłykiec przyśrodkowy

KB – kłykiec boczny

6.3. Zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych a zmiany w deformacji szpotawej

Oceniono korelację między zaawansowaniem zmian zwyrodnieniowych w skali K-L oraz Crofty – Lane’a a kątem deformacji szpotawej.

Tab. 19. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między kątem deformacji szpotawej a skalą Kellgrena-Lawrence'a i skalą Crofty – Lane’a

Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
Kąt deformacji szpotawej a Skala Kellgrena-Lawrence'a	30	0,723	5,54	0,0000
Kąt deformacji szpotawej a Skala Crofty – Lane’a	30	0,768	6,35	0,0000

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

n – liczebność, Rs – współczynnik korelacji rang Spearmana, t – wartość testu istotności, p – poziom prawdopodobieństwa

Wyniki: między kątem deformacji szpotawej a skalą Kellgrena - Lawrence'a występuje istotna statystycznie dodatnia korelacja o wysokiej sile ($R_s=0,723$). Im większy kąt deformacji szpotawej, tym większy poziom zaawansowania radiologicznego zmian zwyrodnieniowych. Między kątem deformacji szpotawej a skalą Crofty - Lane’a występuje istotna statystycznie dodatnia korelacja o wysokiej sile ($R_s=0,768$).

Im większy kąt deformacji szpotawej, tym większy poziom zwężenia szpary stawowej w ocenie radiologicznej. Wynik potwierdza ogólnie przyjęte założenia.

Poniżej przedstawiono analizę istotności różnic w wielkości kąta deformacji szpotawej w kategoriach skali Kellgrena - Lawrence'a.

Tab. 20. Statystyki opisowe kąta deformacji szpotawej w poszczególnych poziomach skali Kellgrena-Lawrence'a oraz wynik testu Kruskala-Wallisa

Skala Kellgrena-Lawrence'a	n	Kąt deformacji szpotawej					Test Kruskala-Wallisa	
		Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	H	p
1	7	4,7	1,1	4,0	4	7	15,2	0,0016
2	6	8,7	5,8	7,0	4	19		
3	8	11,4	5,1	11,5	4	18		
4	9	18,0	7,3	16,0	10	30		

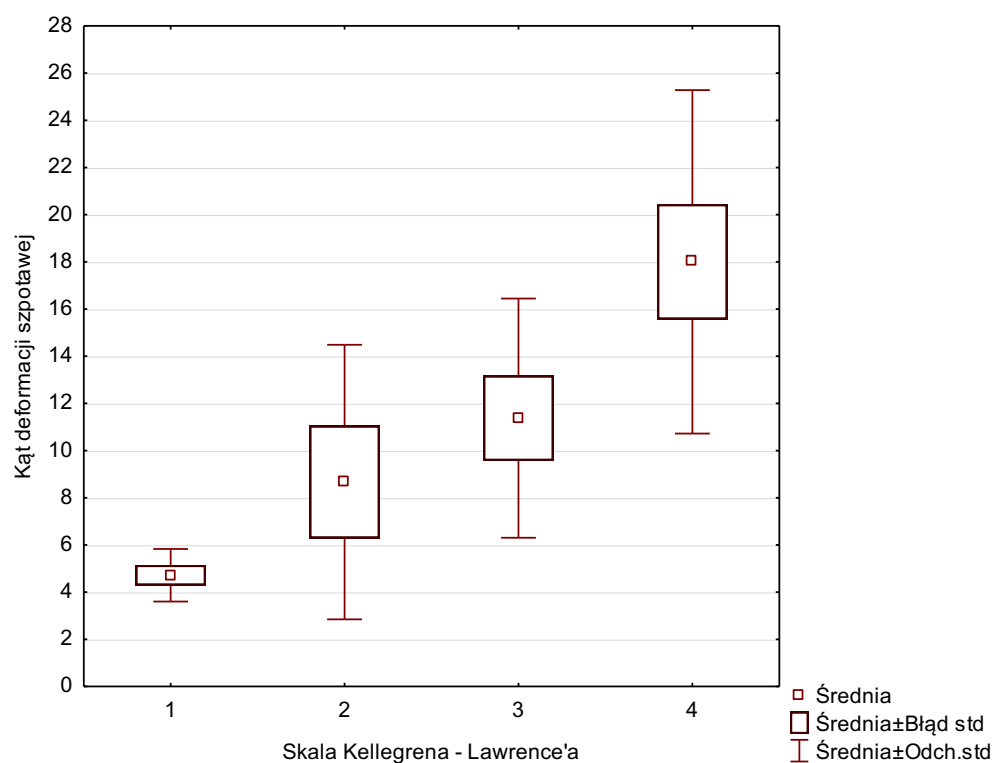
Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

H – wartość testu Kruskala-Wallisa, p – poziom prawdopodobieństwa

Wyniki: test Kruskala-Wallisa wykazał istotną statystycznie różnicę w wielkości kąta deformacji szpotawej między poszczególnymi poziomami skali Kellgrena - Lawrence'a ($p=0,0016$).

Wraz ze zwiększaniem się stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej, zwiększa się kąt określający wielkość deformacji szpotawej stawu, co jest potwierdzeniem przyjętych założeń.

Sprawdzono, czy między kątami deformacji szpotawej istnieją istotne statystycznie różnice w zależności od poziomu zwyrodnienia, określonego w skali K-L.



Ryc. 14. Wykres ramka-wąsy kąta deformacji szpotawej w poszczególnych poziomach skali Kellgrena-Lawrence'a

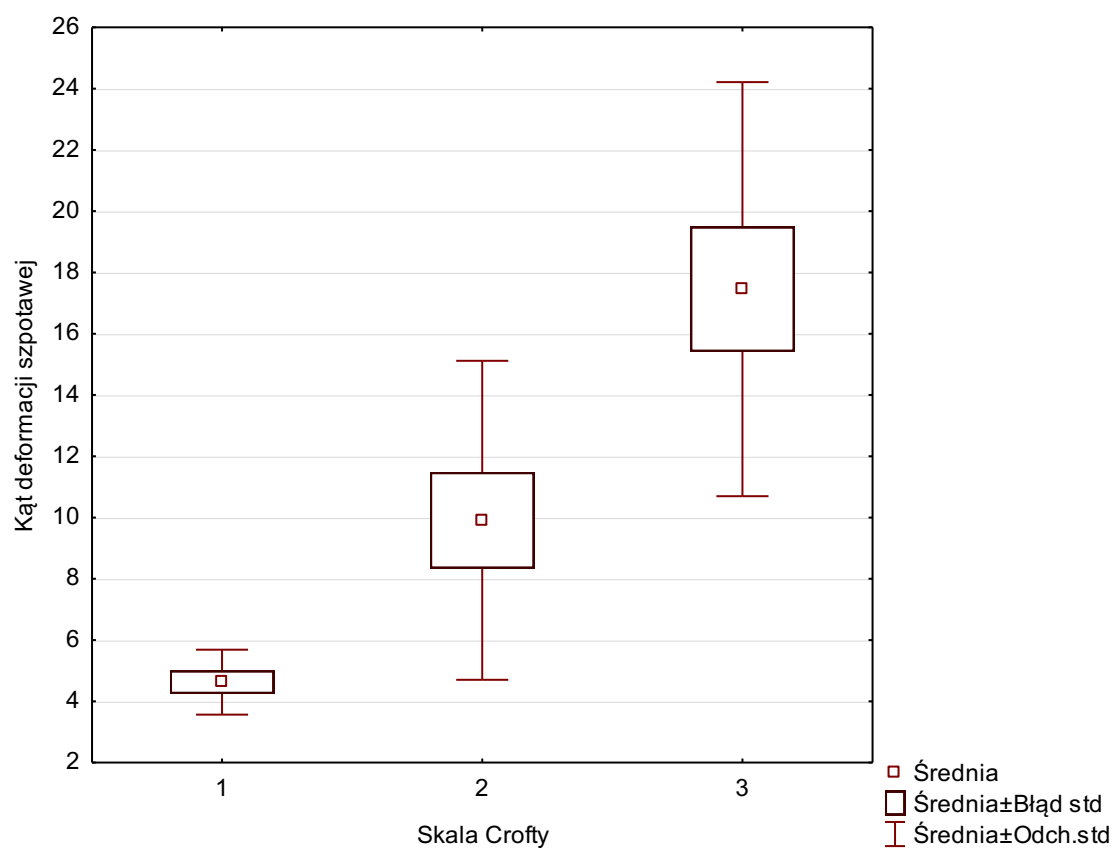
Wyniki: istotna statystycznie różnica w wielkości kąta deformacji szpotawej wystąpiła tylko między poziomem 1 a 4 ($p=0,0011$). Średnia jak i mediana kąta deformacji szpotawej była większa w poziomie 4 niż w poziomie 1 skali Kellgrena-Lawrence'a.

Analogicznie, podobne porównanie przeprowadzono dla skali Crofty – Lane'a, wyniki przedstawia tabela 21.

Tab. 21. Statystyki opisowe kąta deformacji szpotawej w poszczególnych poziomach skali Crofty oraz wynik testu Kruskala-Wallisa

Skala Crofty	n	Kąt deformacji szpotawej					Test Kruskala-Wallisa	
		Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	H	p
1	8	4,6	1,1	4,0	4	7	17,2	0,0002
2	11	9,9	5,2	9,0	4	19		
3	11	17,5	6,8	16,0	10	30		

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p<0,05$



Ryc. 15. Wykres ramka-wąsy kąta deformacji szpotawej w poszczególnych poziomach skali Crofty – Lane’a.

Wyniki: test Kruskala-Wallisa wykazał istotną statystycznie różnicę w wielkości kąta deformacji szpotawej między poszczególnymi poziomami skali Crofty – Lane’a ($p=0,0002$). Zarówno skala K-L jak i Crofty – Lane’a wykazują dużą użyteczność w ocenie zmian zwyrodnieniowych, a także korelują istotnie statystycznie z poziomem deformacji szpotawej, określonym na podstawie kąta HKA.

6.4. Zaawansowanie zmian zwyrodnieniowych a wiek

W tabeli 22 przedstawiono korelację pomiędzy wiekiem pacjentek a poziomem zwyrodnienia w obu skalach.

Tab. 22. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między wiekiem pacjentów a skalą Kellgrena-Lawrence'a i skalą Crofty – Lane'a

Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
Wiek [lata] a Skala Kellgrena-Lawrence'a	30	0,099	0,52	0,6040
Wiek [lata] a Skala Crofty – Lane'a	30	-0,013	-0,07	0,9449

Wyniki: między wiekiem pacjentów a skalą Kellgrena-Lawrence'a nie występuje istotna statystycznie korelacja ($p>0,05$).

Między wiekiem pacjentów a skalą Crofty – Lane'a nie występuje istotna statystycznie korelacja ($p>0,05$). Pozwala to więc sądzić, że zmiany zwyrodnieniowe stawów kolanowych nie są w liniowy sposób zależne od wieku. Wiek nie jest jedynym, pojedynczym czynnikiem ryzyka artrozy.

6.5. Kąt deformacji szpotawej a nasilenie uszkodzenia chrząstki

W tabeli 23 przedstawiono wynik porównania kąta deformacji szpotawej ze stopniem uszkodzenia chrząstki stawowej.

Tab. 23. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między kątem deformacji szpotawej a skalą Outerbridge w poszczególnych miejscach badania

Para zmiennych	Miejsce badania	n	Rs	t(n-2)	p
Kąt deformacji szpotawej a Skala Outerbridge	KPP	30	0,413	2,40	0,0232
	KPŚ	30	0,238	1,30	0,2053
	KPT	30	0,513	3,17	0,0037
	KBP	30	0,305	1,69	0,1014
	KBS	30	0,128	0,68	0,5004
	KBT	30	0,200	1,08	0,2881

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p<0,05$

Wyniki: istotne statystycznie korelacje między kątem deformacji szpotawej a skalą Outerbridge wystąpiły dla:

- kłykcia przyśrodkowego przód KPP – dodatnia korelacja o umiarkowanej sile ($R_s=0,413$). Wyższej wartości kąta deformacji szpotawej towarzyszył wyższy poziom skali uszkodzenia chrząstki stawowej.
- kłykcia przyśrodkowego tył KPT – dodatnia korelacja o umiarkowanej sile ($R_s=0,513$). Wyższej wartości kąta deformacji szpotawej towarzyszył wyższy poziom skali uszkodzenia chrząstki stawowej.

Wyniki oddają przewidywaną prawidłowość, wraz z postępującą szpotawością dochodzi do większych uszkodzeń chrząstki w obrębie kłykcia przyśrodkowego.

6.6. Porównanie wskaźników mierzonych metodą spektroskopii ramanowskiej, w zależności od miejsca pobrania, w stosunku do poziomu deformacji

Wskaźnik mineralizacji

Wskaźnik Mineralizacji, mierzony jako proporcja pasma widma grup fosforanowych do pasma amidu III, oddaje poziom zmineralizowania warstwy podchrzęstnej kości. Badano wskaźnik mineralizacji dla kolejnych miejsc pobrania próbek w porównaniu do poziomu deformacji.

Tab. 24. Statystyki opisowe wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testów: t-Studenta/Cochrana-Coxa/U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik mineralizacji (MI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KPP	lekka	15	3,93	2,14	3,59	1,26	8,65	0,0481 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	2,62	1,13	2,06	1,11	4,74	
KPŚ	lekka	15	4,19	1,84	4,55	0,75	7,53	0,0133 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	2,71	1,13	2,66	1,23	5,11	
KPT	lekka	15	3,68	2,43	3,74	0,49	9,23	0,4753 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	3,14	1,53	3,24	0,51	5,91	
KBP	lekka	15	3,92	2,73	3,72	0,79	9,59	0,0251 ⁽³⁾
	zaawansowana	15	2,19	1,63	2,00	0,24	7,09	
KBS	lekka	15	4,39	3,07	4,25	1,30	12,87	0,3615 ⁽³⁾
	zaawansowana	15	3,38	2,54	2,80	0,80	9,71	
KBT	lekka	15	3,34	1,78	2,83	0,83	7,93	0,0442 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	2,20	1,05	1,77	0,95	3,87	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

⁽¹⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu Cochran-Coxa

⁽²⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu t-Studenta

⁽³⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu U Manna-Whitneya

Wyniki: istotne statystycznie różnice w poziomie wskaźnika mineralizacji (MI) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną wystąpiły dla:

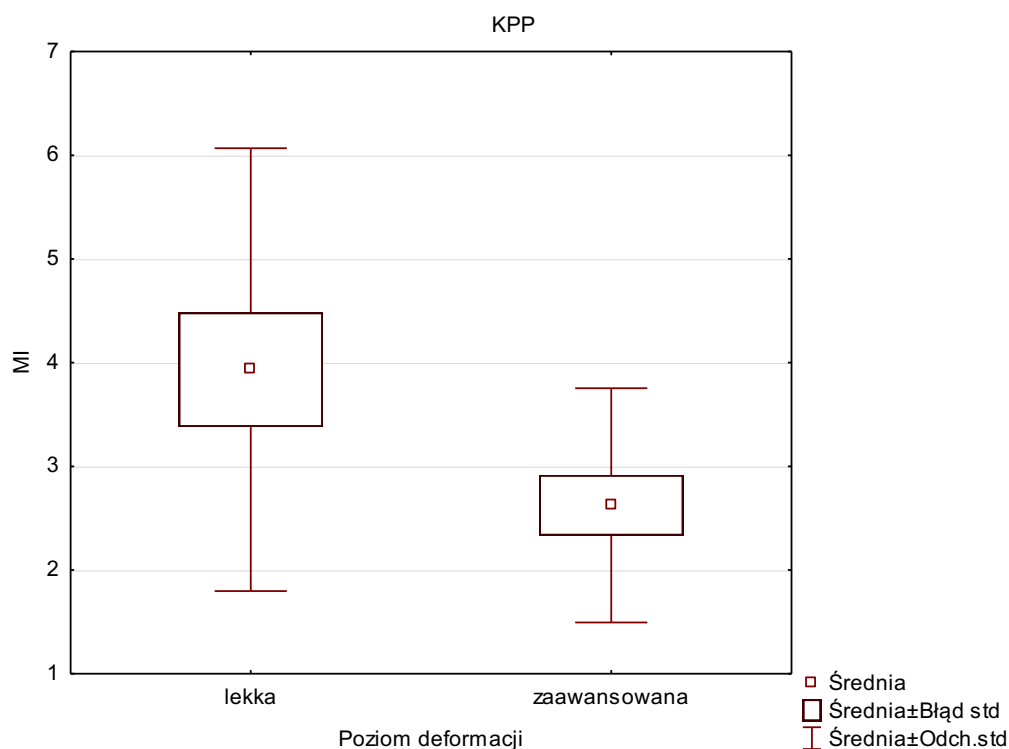
- kłykcia przyśrodkowego przód KPP ($p=0,0481$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z deformacją lekką.

- kłykcia przyśrodkowego środek KPŚ ($p=0,0133$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z deformacją lekką.

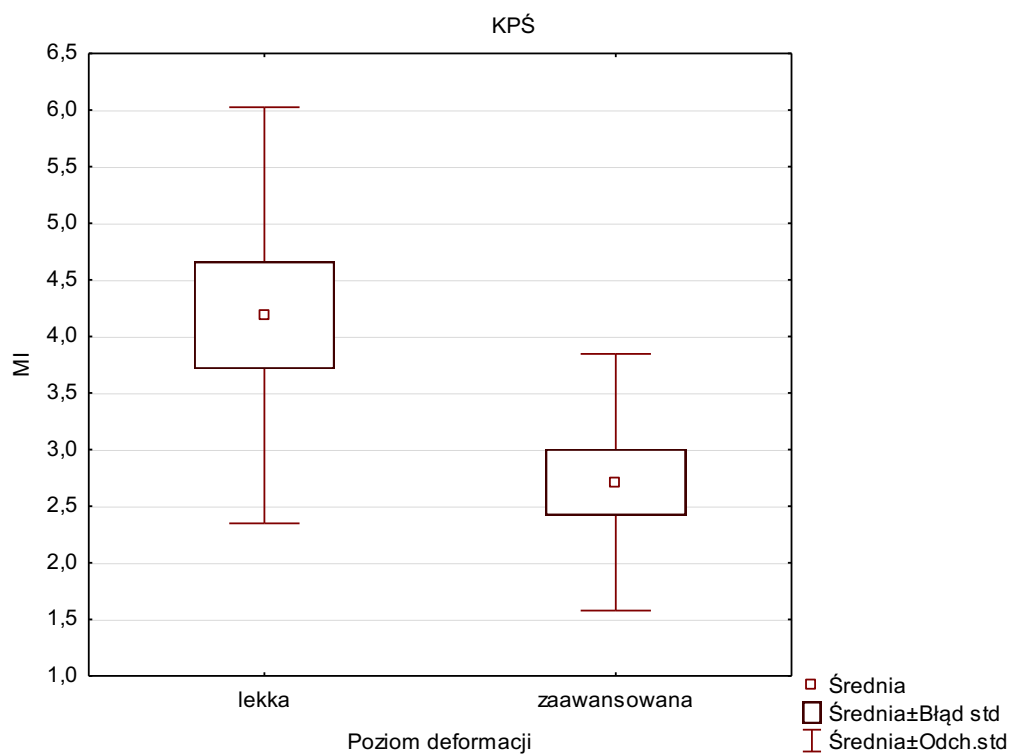
- kłykcia boczno przód KBP ($p=0,0251$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z lekką deformacją.

- kłykcia boczno tył KBT ($p=0,0442$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z lekką deformacją.

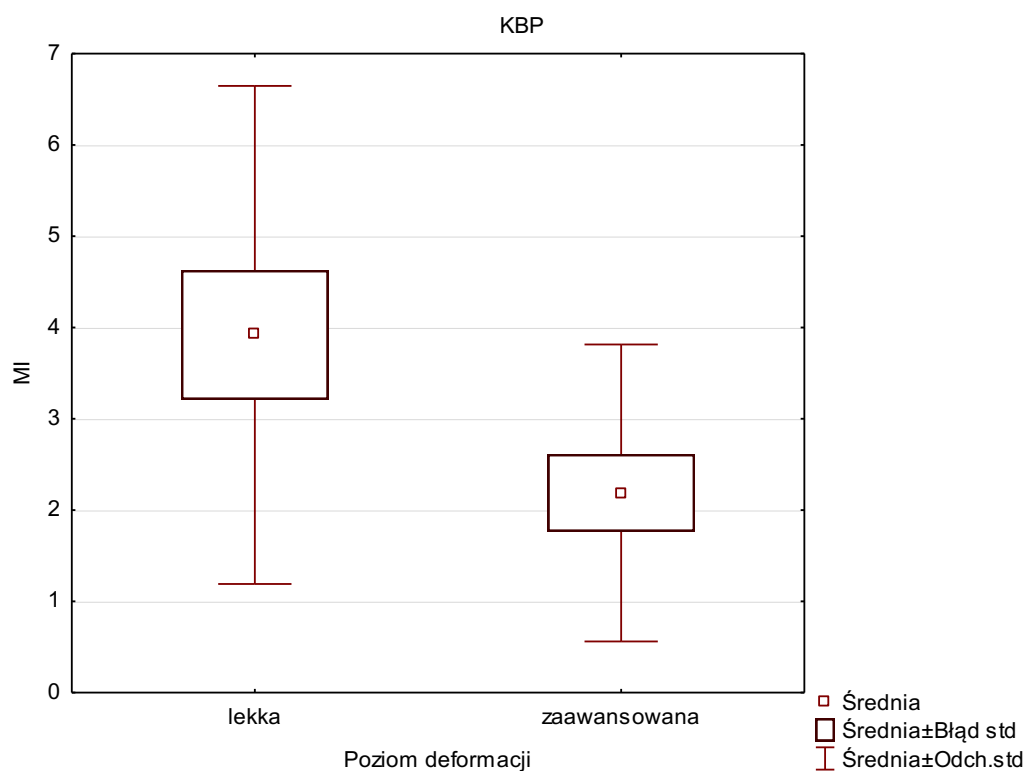
Średnia wskaźnika mineralizacji obniża się w obrębie jednego kłykcia przy wzroście deformacji. W obrębie badanego miejsca dochodzi do obniżenia MI wraz ze wzrostem poziomu deformacji. Większe różnice zauważalne są w obrębie kłykcia przyśrodkowego niż bocznego. W obrębie kłykcia przyśrodkowego największe zmiany występują w obrębie części o największym obciążeniu, w środkowej części kłykcia. Deformacja szpotawa także wpływa na obniżenie wskaźnika mineralizacji w kłycku bocznym; zmiana ta jest jednak mniejsza.



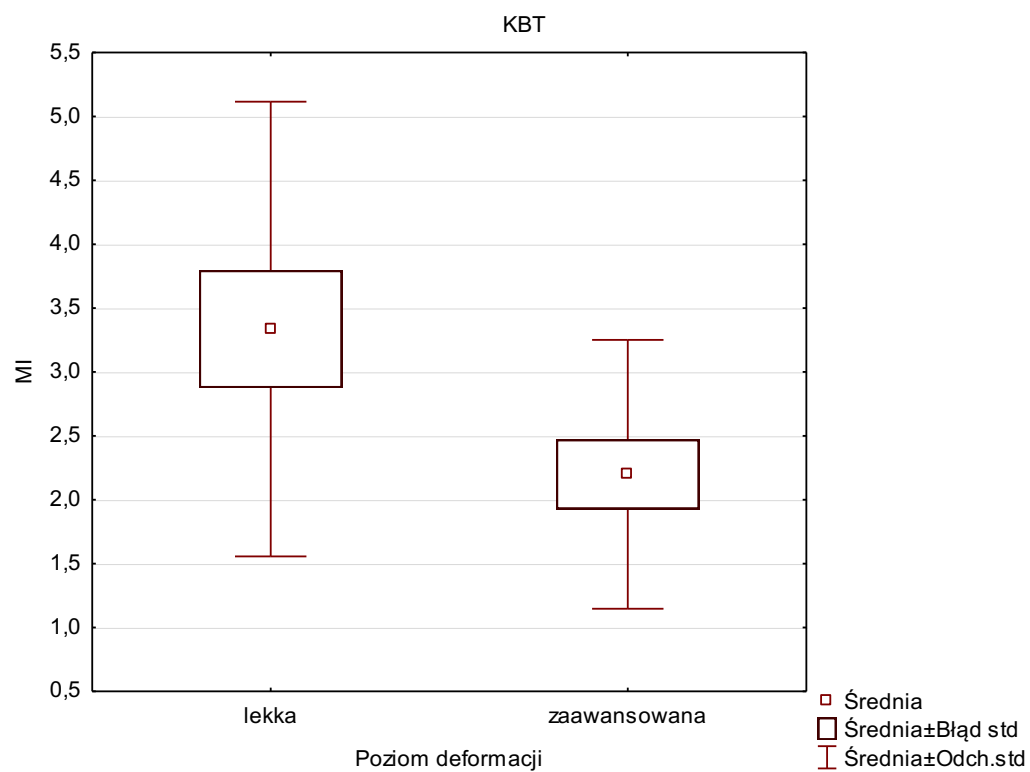
Ryc. 16. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłycku przyśrodkowym przód KPP



Ryc. 17. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłykciu przyśrodkowym środek KPŚ



Ryc. 18. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłykciu bocznym przód KBP



Ryc. 19. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłykciu bocznym tył KBT

Wyniki: wraz z postępem deformacji, maleje stopień mineralizacji tkanki kostnej.

Wskaźnik zmiany mineralizacji

Tab. 25. Statystyki opisowe wskaźnika zmiany mineralizacji (CI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testów U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik zmiany mineralizacji (CI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KPP	lekka	15	0,214	0,100	0,166	0,114	0,467	0,2628
	zaawansowana	15	0,352	0,479	0,221	0,133	2,063	
KPŚ	lekka	15	0,195	0,167	0,156	0,093	0,785	0,1585
	zaawansowana	15	0,231	0,116	0,211	0,112	0,537	
KPT	lekka	15	0,205	0,070	0,179	0,121	0,338	0,2290
	zaawansowana	15	0,216	0,144	0,138	0,106	0,522	
KBP	lekka	15	0,219	0,132	0,166	0,099	0,563	0,1466
	zaawansowana	15	0,423	0,435	0,236	0,103	1,530	
KBŚ	lekka	15	0,186	0,062	0,174	0,113	0,296	0,4306
	zaawansowana	15	0,223	0,111	0,175	0,121	0,529	
KBT	lekka	15	0,217	0,103	0,181	0,105	0,428	0,1249
	zaawansowana	15	0,280	0,132	0,256	0,105	0,524	

Wyniki: test U Manna-Whitneya nie wykazał istotnych statystycznie różnic w poziomie CI między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną dla żadnego miejsca badania ($p > 0,05$).

Natomiast średnia i mediana badań wskazują na obniżenie wskaźnika zmiany mineralizacji. CI zmniejsza się w obrębie kłykcia przyśrodkowego i bocznego wraz z postępowaniem deformacji, co informuje o substytucji grup fosforanowych grupami węglowymi wraz z narastaniem szpotawości stawu.

Wskaźnik uporządkowania włókien kolagenowych

Tab. 26. Statystyki opisowe wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testów: t-Studenta/U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KPP	lekka	15	4,00	3,72	3,39	0,09	15,70	0,1249 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	2,42	1,07	2,28	0,60	4,93	
KPŚ	lekka	15	2,75	1,07	2,60	0,92	5,50	0,5911 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	2,55	0,85	2,55	0,97	3,92	
KPT	lekka	15	2,78	1,17	3,07	0,81	4,09	1,0000 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	2,84	1,47	2,64	1,04	5,46	
KBP	lekka	15	3,36	1,40	2,99	0,67	5,58	0,0062 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	1,95	1,20	2,02	0,23	3,95	
KBŚ	lekka	15	3,82	2,53	3,10	1,12	10,71	0,9669 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	3,49	1,65	2,92	1,53	7,84	
KBT	lekka	15	3,01	1,48	2,89	0,79	5,60	0,5338 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	2,81	1,74	2,10	0,78	7,62	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

⁽¹⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu U Manna-Whitneya

⁽²⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu t-Studenta

Wyniki: istotna statystycznie różnica w poziomie stosunku wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI), między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną, wystąpiła tylko dla kłykcia bocznego przód KBP ($p = 0,0062$). Średnia jak i mediana wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych była większa u pacjentów z deformacją lekką.

Średnia i mediana badań wskazują na obniżenie wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych. CCI zmniejsza się w obrębie kłykcia przysrodkowego i bocznego, wraz z postępowaniem deformacji. Świadczy to o zwiększaniu się ilości kolagenu o niezorganizowanej strukturze wraz z nasileniem szpotawości stawu. Zmiany jednak nie wykazują istotnych statystycznie różnic w obrębie badanego materiału.

Stosunek hydroksyapatyt : kolagen

Wskaźnik hydroksyapatyt : kolagen pośrednio informuje o przesunięciu składu kostnego z fazy mineralnej w fazę organiczną. Tabela 27 wskazuje na zmianę wskaźnika HCR w zależności od poziomu deformacji.

Tab. 27. Statystyki opisowe stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testów: t-Studenta/U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Stosunek hydroksyapatyt : kolagen (HCR)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KPP	lekka	15	1,82	1,76	0,96	0,44	6,16	0,7400 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	1,31	0,52	1,07	0,58	2,27	
KPŚ	lekka	15	1,58	0,95	1,32	0,66	4,33	0,5338 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	1,32	0,64	1,41	0,54	2,51	
KPT	lekka	15	1,87	1,11	1,54	0,81	5,31	0,0279 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	1,24	0,83	0,92	0,38	3,02	
KBP	lekka	15	1,32	0,68	1,15	0,50	2,96	0,6783 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	2,34	2,89	1,15	0,52	9,86	
KBŚ	lekka	15	1,55	0,88	1,22	0,53	3,69	0,3119 ⁽²⁾
	zaawansowana	15	1,25	0,67	0,89	0,48	2,58	
KBT	lekka	15	2,56	3,16	1,18	0,57	12,92	0,5614 ⁽¹⁾
	zaawansowana	15	1,48	0,91	1,36	0,51	3,79	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

⁽¹⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu U Manna-Whitneya

⁽²⁾ – poziom prawdopodobieństwa testu t-Studenta

Wyniki: istotna statystycznie różnica w poziomie stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną, wystąpiła tylko dla kłykcia przyśrodkowego tył KPT ($p = 0,0279$).

Średnia jak i mediana Wskaźnika stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) była większa u pacjentów z deformacją lekką, co wskazuje na przesunięciu fazy w kierunku organicznej, wraz z nasileniem deformacji.

W dalszej analizie określono związek pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami dla kłykcia przyśrodkowego i kłykcia bocznego, wraz ze zmianą poziomu deformacji. W badaniu porównano pary zmiennych: kolejno części przednie, środkowe i tylne obu kłykci kości piszczelowych.

Deformacja lekka

Tab. 28. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana dla wskaźnika mineralizacji (MI), wskaźnika zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI), stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) między kłykciem przyśrodkowym a kłykciem bocznym (przód, środek, tył) u pacjentów z deformacją lekką

Deformacja lekka					
Wskaźnik	Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
MI	KPP a KBP	15	-0,036	-0,13	0,8994
	KPŚ a KBŚ	15	0,364	1,41	0,1819
	KPT a KBT	15	-0,650	-3,08	0,0087
CI	KPP a KBP	15	-0,125	-0,45	0,6571
	KPŚ a KBŚ	15	0,125	0,45	0,6571
	KPT a KBT	15	-0,146	-0,53	0,6025
CCI	KPP a KBP	15	-0,032	-0,12	0,9095
	KPŚ a KBŚ	15	-0,157	-0,57	0,5760
	KPT a KBT	15	-0,132	-0,48	0,6387
HCR	KPP a KBP	15	-0,207	-0,76	0,4588
	KPŚ a KBŚ	15	-0,161	-0,59	0,5672
	KPT a KBT	15	0,004	0,01	0,9899

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: wśród pacjentów z deformacją lekką istotna statystycznie ujemna korelacja o wysokiej sile ($R_s = -0,650$) wystąpiła tylko dla wskaźnika mineralizacji (MI) między kłykciem przyśrodkowym tył a kłykciem bocznym tył (KPT a KBT).

W deformacji szpotawej o niskim stopniu nie zaobserwowano istotnych statystycznie różnic pomiędzy poszczególnymi badanymi miejscami, dla żadnego ze wskaźników. Wyniki wskazują, że przy niewielki stopniu deformacji, nie ma istotnej różnicy pomiędzy oboma badanymi kłykcami.

Deformacja zaawansowana

Tab. 29. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana dla wskaźnika mineralizacji (MI), wskaźnika zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) między kłykiem przyśrodkowym a kłykiem bocznym (przód, środek, tył) u pacjentów z deformacją zaawansowaną

Deformacja zaawansowana					
Wskaźnik	Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
MI	KPP a KBP	15	0,561	2,44	0,0297
	KPŚ a KBŚ	15	-0,086	-0,31	0,7613
	KPT a KBT	15	-0,154	-0,56	0,5848
CI	KPP a KBP	15	0,589	2,63	0,0208
	KPŚ a KBŚ	15	0,214	0,79	0,4431
	KPT a KBT	15	0,186	0,68	0,5075
CCI	KPP a KBP	15	0,279	1,05	0,3147
	KPŚ a KBŚ	15	0,082	0,30	0,7710
	KPT a KBT	15	0,746	4,04	0,0014
HCR	KPP a KBP	15	0,296	1,12	0,2834
	KPŚ a KBŚ	15	0,136	0,49	0,6296
	KPT a KBT	15	0,629	2,91	0,0121

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: wśród pacjentów z deformacją zaawansowaną istotne statystycznie korelacje wystąpiły dla:

- Wskaźnika mineralizacji (MI) między kłykiem przyśrodkowym przód a kłykiem bocznym przód (KPP a KBP) – dodatnia korelacja o umiarkowanej sile ($R_s=0,561$),
- wskaźnika zmiany mineralizacji (CI) między kłykiem przyśrodkowym przód a kłykiem bocznym przód (KPP a KBP) – dodatnia korelacja o umiarkowanej sile ($R_s=0,589$),
- wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) między kłykiem przyśrodkowym tył a kłykiem bocznym tył (KPT a KBT) – dodatnia korelacja o wysokiej sile ($R_s=0,746$),
- stosunku hydroksyapatyt : kolagen (HCR) między kłykiem przyśrodkowym tył a kłykiem bocznym tył (KPT a KBT) – dodatnia korelacja o wysokiej sile ($R_s=0,629$).

W deformacji zaawansowanej, w większej ilości badanych miejsc dochodzi do istotnych statystycznie różnic.

W tabelach 30 - 33 przedstawiono wyniki badań zależności MI, CI, CCI i HCR w zależności od poziomu deformacji. Sprawdzono różnicę w badanych wskaźnikach osobno dla kłykcia bocznego i kłykcia przyśrodkowego piszczeli.

Wskaźnik mineralizacji

Tab. 30. Statystyki opisowe wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testu t-Studenta

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik mineralizacji (MI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KP	lekka	15	3,93	1,60	3,90	1,43	6,64	0,0278
	zaawansowana	15	2,83	0,93	2,93	1,08	4,04	
KB	lekka	15	3,88	2,10	3,13	1,37	8,73	0,0426
	zaawansowana	15	2,59	1,05	2,42	1,20	4,74	

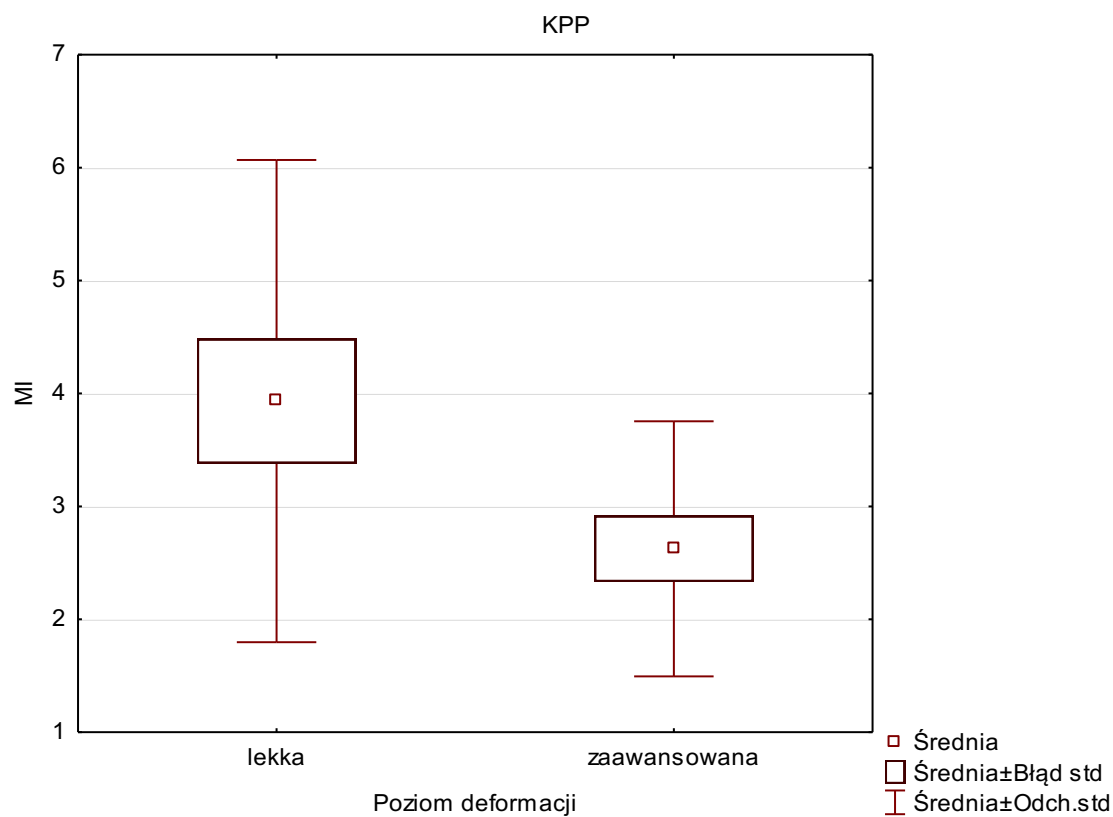
Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: istotne statystycznie różnice w poziomie wskaźnika mineralizacji (MI) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną wystąpiły dla:

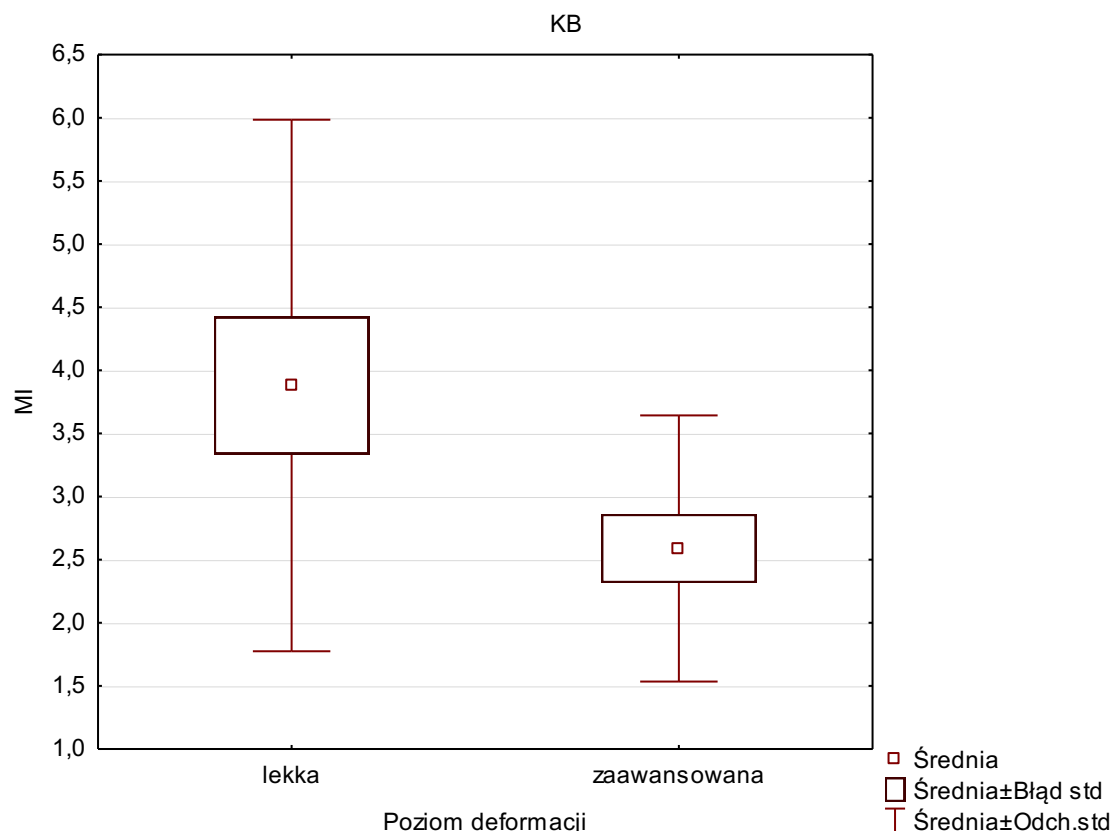
- kłykcia przyśrodkowego KP ($p=0,0278$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z deformacją lekką.

- kłykcia bocznego KB ($p=0,0426$). Średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów z lekką deformacją.

Zarówno w obrębie kłykcia przyśrodkowego jak i bocznego, dochodzi do istotnych statystycznie różnic w obrębie MI, który wraz z postępującą szpotawością ulega zmniejszeniu.



Ryc. 20. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłykciu przyśrodkowym KPP



Ryc. 21. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną w kłycku bocznym KB

Wskaźnik zmiany mineralizacji

Tab. 31. Statystyki opisowe wskaźnika zmiany mineralizacji (CI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testu U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik zmiany mineralizacji (CI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KP	lekka	15	0,205	0,099	0,179	0,129	0,530	0,2998
	zaawansowana	15	0,266	0,175	0,217	0,126	0,793	
KB	lekka	15	0,207	0,078	0,182	0,120	0,417	0,0971
	zaawansowana	15	0,309	0,191	0,223	0,128	0,780	

Wnioski: test U Manna-Whitneya nie wykazał istotnych statystycznie różnic w poziomie wskaźnika zmiany mineralizacji (CI) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną dla żadnego miejsca badania ($p > 0,05$).

Wskaźnik uporządkowania włókien kolagenowych

Tab. 32. Statystyki opisowe wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testu t-Studenta

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik uporządkowania włókien kolagenowych (CCI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KP	lekka	15	3,18	1,45	3,05	0,87	6,87	0,1993
	zaawansowana	15	2,60	0,86	2,58	1,43	4,00	
KB	lekka	15	3,40	1,29	3,06	1,99	6,39	0,1301
	zaawansowana	15	2,75	0,97	2,95	1,05	4,06	

Wyniki: test t-Studenta nie wykazał istotnych statystycznie różnic w poziomie stosunku wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną dla żadnego miejsca badania ($p>0,05$).

Stosunek hydroksypatyt : kolagen

Tab. 33. Statystyki opisowe stosunku hydroksypatyt : kolagen (HCR) u pacjentów z deformacją lekką i zaawansowaną oraz wyniki testu U Manna-Whitneya

Miejsce badania	Poziom deformacji	n	Wskaźnik Hydroksypatyt : Kolagen (HCR)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KP	lekka	15	1,82	1,76	0,96	0,44	6,16	0,0815
	zaawansowana	15	1,31	0,52	1,07	0,58	2,27	
KB	lekka	15	1,81	1,28	1,48	0,71	5,70	0,6482
	zaawansowana	15	1,69	1,31	1,32	0,62	5,04	

Wyniki: test U Manna-Whitneya nie wykazał istotnych statystycznie różnic w stosunku hydroksypatyt : kolagen (HCR) między pacjentami z deformacją lekką a pacjentami z deformacją zaawansowaną dla żadnego miejsca badania ($p>0,05$).

6.7. Porównanie wskaźników w zależności od miejsca pobrania w stosunku do zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w skali Kellgrena-Lawrence'a

Tab. 34. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między skalą Kellgrena-Lawrence'a a wskaźnikiem mineralizacji (MI), wskaźnikiem zmiany mineralizacji (CI), wskaźnikiem uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunkiem hydroksyapatyt : kolagen (HCR) dla kłykcia przyśrodkowego KP i kłykcia bocznego KB

Para zmiennych	Miejsce badania	n	Rs	t(n-2)	p
Skala Kellgrena-Lawrence'a a MI	KP	30	-0,396	-2,28	0,0303
	KB	30	-0,509	-3,13	0,0041
Skala Kellgrena-Lawrence'a a CI	KP	30	0,266	1,46	0,1549
	KB	30	0,258	1,41	0,1683
Skala Kellgrena-Lawrence'a a CCI	KP	30	-0,271	-1,49	0,1473
	KB	30	-0,264	-1,45	0,1590
Skala Kellgrena-Lawrence'a a HCR	KP	30	-0,250	-1,36	0,1833
	KB	30	0,057	0,30	0,7636

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: istotne statystycznie korelacje ze skalą Kellgrena-Lawrence'a wystąpiły dla:

- wskaźnika mineralizacji (MI) w kłykciu przyśrodkowym KP – ujemna korelacja o słabej sile ($R_s = -0,396$),
- wskaźnika mineralizacji (MI) w kłykciu bocznym KB – ujemna korelacja o umiarkowanej sile ($R_s = -0,509$).

MI ulega stopniowemu zmniejszeniu wraz z postępowaniem zmian zwyrodnieniowych, określonym w skalach radiologicznych.

Na podstawie powyższych analiz wydaje się, że najbardziej czuły na zmiany w mikrostrukturze kości jest wskaźnik mineralizacji, dający istotne statystycznie wyniki zarówno w zależności od poziomu deformacji, jak i stopnia zwyrodnienia stawu kolanowego. W związku z dotychczasowymi wynikami, poniżej zastosowano dodatkową analizę dla *wskaźnika mineralizacji*.

Porównanie wskaźników w zależności od miejsca pobrania w stosunku do zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w skali K-L z wykorzystaniem analizy ANOVA:

- ANOVA (analiza wariancji) – w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu i warunku jednorodności wariancji,

- ANOVA z poprawką testu Welcha – w przypadku spełnienia warunku normalności rozkładu i niespełnienia warunku jednorodności wariancji,

- ANOVA Kruskala-Wallisa – w przypadku niespełnienia warunku normalności rozkładu.

Tab. 35. Statystyki opisowe wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów o różnej skali Kellgrena-Lawrence'a oraz wyniki analizy wariancji ANOVA

Miejsce badania	Skala Kellgrena-Lawrence'a	n	Wskaźnik mineralizacji (MI)					p
			Średnia	Odch. std.	Mediana	Min.	Maks.	
KP	1	7	3,44	1,49	3,14	1,43	6,16	0,0049
	2	6	4,97	1,24	4,89	3,37	6,64	
	3	8	3,05	1,13	3,44	1,08	4,15	
	4	9	2,57	0,79	2,78	1,50	3,94	
KB	1	7	4,54	1,84	4,40	2,45	7,91	0,0421
	2	6	3,85	2,55	3,31	1,37	8,73	
	3	8	2,40	0,80	2,35	1,33	3,54	
	4	9	2,55	1,05	2,42	1,20	4,74	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: istotne statystycznie różnice w poziomie wskaźnika mineralizacji (MI) między pacjentami o różnej skali K-L wystąpiły dla:

- kłykcia przyśrodkowego KP ($p=0,0049$)

- kłykcia bocznego KB ($p=0,0421$).

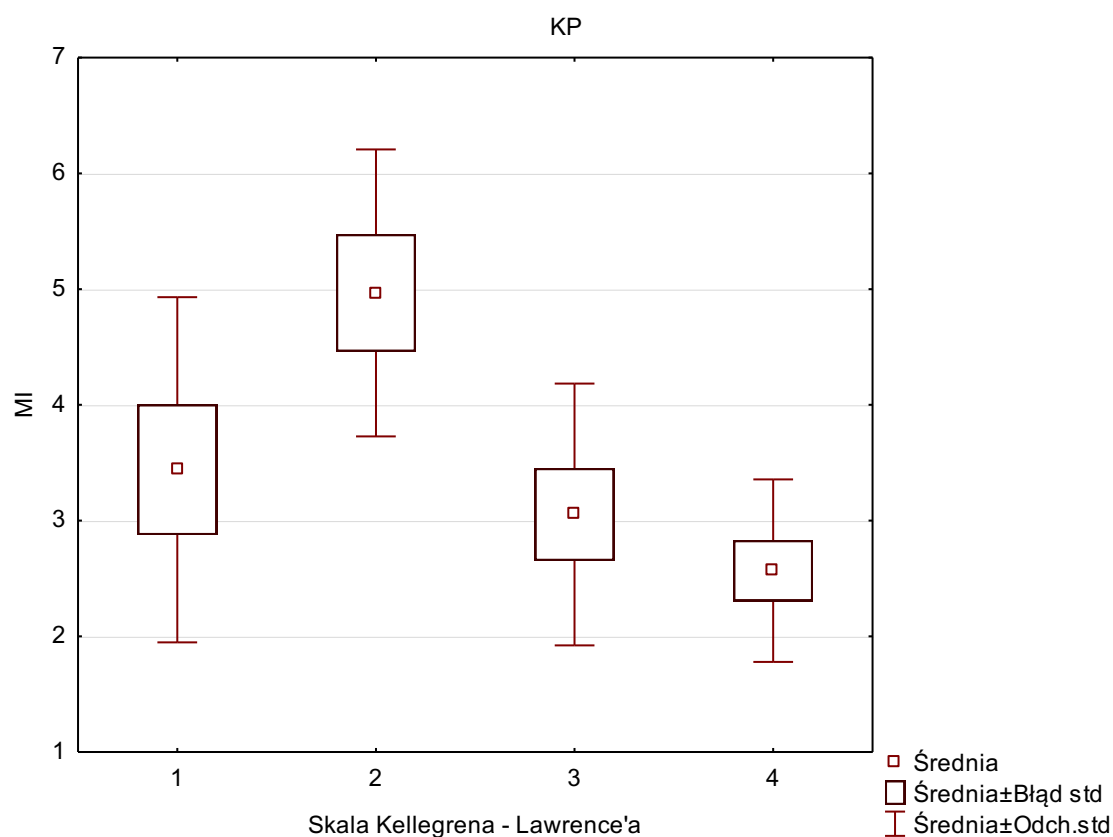
Tab. 36. Poziomy prawdopodobieństwa p wyniku testu NIR (test post-hoc) dla wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów o różnej skali Kellgrena-Lawrence'a w kłykcii przyśrodkowym.

KP				
Skala Kellgrena-Lawrence'a	1	2	3	4
1		0,0256	0,5255	0,1477
2	0,0256		0,0051	0,0006
3	0,5255	0,0051		0,3966
4	0,1477	0,0006	0,3966	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: test NIR wykazał istotne różnice w poziomie wskaźnika mineralizacji między kategorią skali K-L:

- 1 a 2 ($p=0,0256$) - średnia jak i mediana Wskaźnika Mineralizacji była większa u pacjentów o kategorii 2 skali K-L,
- 2 a 3 ($p=0,0051$) - średnia jak i mediana Wskaźnika Mineralizacji była większa u pacjentów o kategorii 2 skali K-L,
- 2 a 4 ($p=0,0006$) - średnia jak i mediana Wskaźnika Mineralizacji była większa u pacjentów o kategorii 2 skali K-L.



Ryc. 22. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów o różnej skali Kellgrena-Lawrence'a w kłykcii przyśrodkowym KP

Tab. 37. Poziomy prawdopodobieństwa p wyniku testu NIR (test post-hoc) dla wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów o różnej skali Kellgrena-Lawrence'a w kłykcii bocznej KB

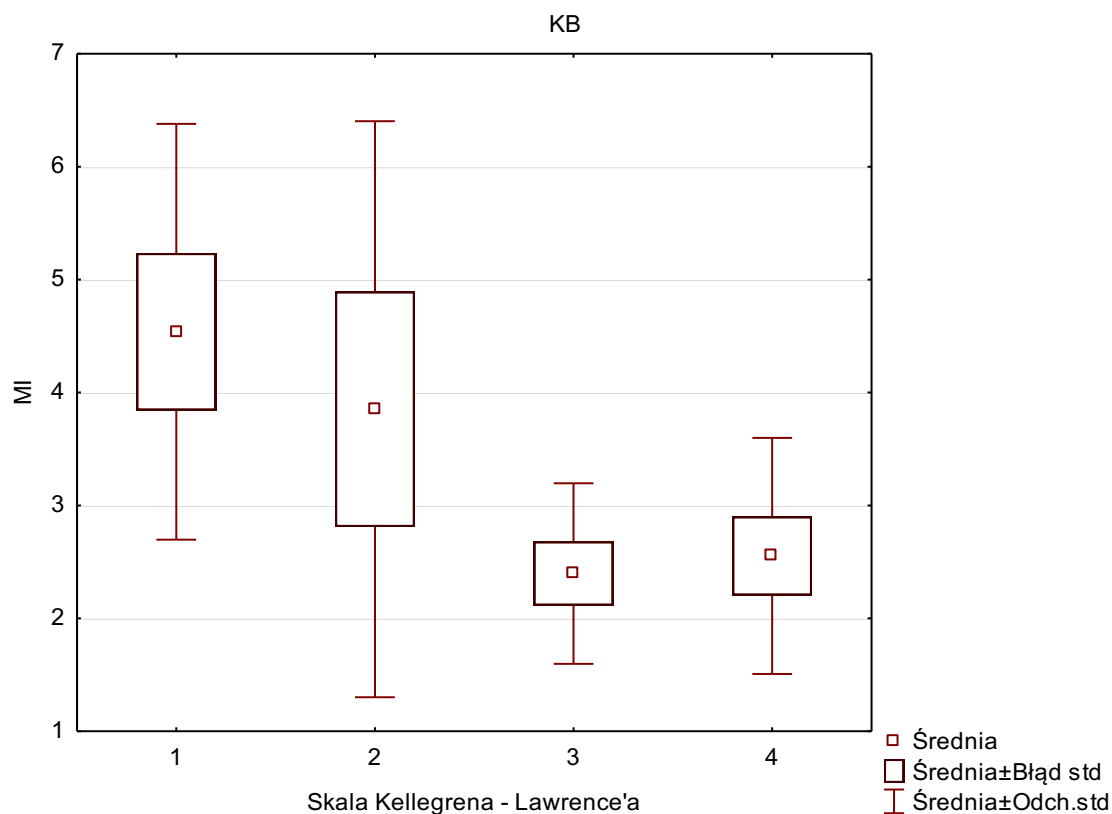
KB				
Skala Kellgrena-Lawrence'a	1	2	3	4
1		0,4461	0,0153	0,0204
2	0,4461		0,1030	0,1343
3	0,0153	0,1030		0,8418
4	0,0204	0,1343	0,8418	

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Test NIR wykazał istotne różnice w poziomie wskaźnika mineralizacji między kategorią skali K-L:

- 1 a 3 ($p=0,0153$) - średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów o kategorii 1 skali K-L,

- 1 a 4 ($p=0,0204$) - średnia jak i mediana wskaźnika mineralizacji była większa u pacjentów o kategorii 1 skali K-L.



Ryc. 23. Wykres ramka-wąsy wskaźnika mineralizacji (MI) u pacjentów o różnej skali Kellgrena-Lawrence'a w kłykcium bocznym KB

Wyniki: w kolejnych stadiach zaawansowania zmian zwyrodnieniowych dochodzi do spadku poziomu mineralizacji w obu kłykciach kości piszczelowej.

6.8. Ocena korelacji pomiędzy BMI a kątem deformacji szpotawej

Tab. 38. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między wskaźnikiem BMI pacjentów a kątem deformacji szpotawej

Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
BMI [kg/m ²] a Kąt deformacji szpotawej	30	0,482	2,91	0,0069

Na czerwono zaznaczono istotny statystycznie, $p < 0,05$

Wyniki: między wskaźnikiem BMI pacjentów a kątem deformacji szpotawej występuje istotna statystycznie dodatnia korelacja o umiarkowanej sile ($R_s = 0,482$). Im wyższe BMI u pacjentów, tym większy kąt deformacji szpotawej.

6.9. Stopień zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych w skali Kellgrena – Lawrence’a a BMI

Tab. 39. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między wskaźnikiem BMI pacjentów a skalą Kellgrena-Lawrence'a

Para zmiennych	n	Rs	t(n-2)	p
BMI [kg/m ²] a Skala Kellgrena-Lawrence'a	30	0,054	0,29	0,7751

Wyniki: między wskaźnikiem BMI pacjentów a skalą Kellgrena-Lawrence'a nie występuje istotna statystycznie korelacja ($p > 0,05$).

6.10. Ocena korelacji pomiędzy początkiem objawów a uszkodzeniem chrząstki ocenianym w skali Outerbridge

Tab. 40. Wyniki testu istotności współczynnika korelacji rang Spearmana między początkiem objawów a skalą Outerbridge

Para zmiennych	Miejsce badania	n	Rs	t(n-2)	p
Początek objawów [lata] a Skala Outerbridge	KPP	30	0,058	0,31	0,7601
	KPŚ	30	0,115	0,61	0,5468
	KPT	30	0,031	0,16	0,8718
	KBP	30	0,236	1,29	0,2086
	KBS	30	0,021	0,11	0,9126
	KBT	30	-0,131	-0,70	0,4913

Wyniki: między początkiem objawów a skalą Outerbridge nie wystąpiły istotne statystycznie korelacje dla żadnego miejsca badania.

6.11. Ocena korelacji pomiędzy poszczególnymi wskaźnikami a początkiem objawów liczonym w latach

Wyniki: między początkiem objawów a wskaźnikiem mineralizacji (MI), wskaźnikiem zmiany mineralizacji (CI), stosunkiem hydroksyapatyt : kolagen (HCR) oraz wskaźnikiem uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) nie wystąpiły istotne statystycznie korelacje dla żadnego miejsca badania.

6.12. Ocena korelacji pomiędzy stopniem uszkodzenia chrząstki stawowej, poszczególnymi wskaźnikami a iniekcjami dostawowymi

Wyniki: w żadnej z grup badanych wskaźników nie wystąpiła korelacja z faktem podania iniekcji dostawowej steroidowej lub kwasu hialuronowego.

7. OMÓWIENIE WYNIKÓW I DYSKUSJA

Choroba zwyrodnieniowa, będąca postępującą chorobą stawów, jest jednym z głównych wyzwań cywilizacyjnych współczesnej ortopedii. Pierwotna choroba zwyrodnieniowa stawów kolanowych jest chorobą o wieloczynnikowej etiologii, o do tej pory nieustalonych bezpośrednich czynnikach sprawczych. Teorie enzymatyczne, genetyczne, nakładanie się czynników ryzyka, nie wyczerpują zagadnienia etiologii pierwotnej choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego. Rozwój nowych technologii diagnostycznych daje możliwość coraz dokładniejszego śledzenia zmian w kości, toczących się na poziomie mikroskopowym. Poznanie mechanizmów prowadzących do patologii daje nadzieję na wcześniejsze rozpoznanie, skuteczniejsze leczenie lub możliwość stosowania leczenia nieoperacyjnego, pozwalającego na dłuższe, bezobjawowe, „przeżycie” własnego stawu pacjenta.

Przybliżając i podsumowując problematykę zawartą w pracy należy podkreślić, że kryteriami kwalifikacji do badania są: wskazanie do endoprotezoplastyki stawów kolanowych z powodu pierwotnej choroby zwyrodnieniowej oraz towarzyszącej deformacji szpotawej stawu kolanowego. Kryteria wejścia są ze sobą zbieżne – im większy stopień zaawansowania zmian zwyrodnieniowych ocenianych na zdjęciach radiologicznych, tym bardziej nasiona deformacja szpotawa stawu, oceniana na radiogramach pomiarowych kończyn dolnych. W badaniach nie wykazano istotnie statystycznej różnicy pomiędzy wiekiem pacjentów a stopniem zaawansowania zmian zwyrodnieniowych ocenianych radiologicznie. Według najnowszej wiedzy, wiek pacjenta nie jest głównym czynnikiem ryzyka wystąpienia zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego (Chen i wsp., 2017). Użyta w badaniu skala Kellgrena- Lawrence’a okazała się na potrzeby powyższego badania bardziej użyteczna niż skala Crofty - Lane’a. Ostatecznie uznano, że skala Kellgrena- Lawrence’a, przy założeniach pracy, wyczerpuje kwestię określenia stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej.

W badaniu zdecydowano o połączeniu 2 grup uwzględniających poziom deformacji, z uwagi na konieczność wykluczenia chorych ze skrajną szpotawością, powyżej 30 stopni; w tej grupie próbki przez wzgląd na poziom destrukcji tkanek w przebiegu choroby były technicznie niemożliwe do zbadania. Podjęto decyzję o połączeniu grupy o znacznym stopniu deformacji ze stopniem istotnym, reprezentowanym łącznie przez taką samą liczbę pacjentek jak grupa z deformacją nieznaczną. Dzięki porównaniu jedynie dwóch grup, uzyskano istotne statystycznie wyniki. Nie można jednak wykluczyć, że liczebność grupy badanej pozostaje ograniczeniem pracy.

Nawiązując do liczebności badanej grupy należy jednak wziąć pod uwagę fakt bardzo czasochłonných badań z użyciem wykorzystanej techniki. Badania na materiale 30 badanych pacjentów (łącznie 180 próbek – opracowanych blozków chrzęstno - kostnych) nie odbiegają w istotny sposób od badań prowadzonych przez innych badaczy. W badaniach Nakahara z 2018 roku, badano różnice w stosunkach fenyloalaniny i sfingomieliny w obrębie głowy kości udowej, objętej jałową martwicą kości, w przebiegu nadużycia alkoholu i stosowania leków sterydowych. Na podstawie oceny materiału – 13 głów kości udowych uzyskano wyniki – w strefie nekrotycznej uzyskano wzrost proporcji wskaźników związanych z tłuszczami, do wskaźników związanych z białkami, natomiast odwrotną zależność zaobserwowano w jałowej martwicy głowy kości udowej związanej z przewlekłym nadużywaniem alkoholu (Nakahara i wsp., 2018).

Takahashi, badając zmiany w obrębie pasma intensywności $1241-1269\text{ cm}^{-1}$ (dublet amidu III), który wiązany jest z przestrzenną konformacją kolagenu typu II, składowego chrząstki stawowej. Autor pracy badania przeprowadził na materiale 5 pleateau piszczeli objętych chorobą zwyrodnieniową oraz jednej piszczeli od zmarłego dawcy, bez cech zwyrodnienia. Opisał zmiany degeneracyjne w obrębie badanego czynnika wraz z postępowaniem makroskopowego uszkodzenia chrząstki (Takahashi i wsp., 2014).

W badaniach wykorzystujących badanie spektroskopię Ramana, do oceny jakości kości w przypadku choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych, materiał badany stanowiło łącznie 35 pacjentów (Buchwald i wsp., 2012).

Należy więc zwrócić uwagę, iż wielkość badanego materiału w mojej pracy nie różni się w istotny sposób od prac innych badaczy na tym polu. Na wielkość badanego materiału w mojej ocenie wpływ ma trudność w pobraniu materiału wystandaryzowanego, o wystarczająco dobrej jakości. Materiał dyskwalifikują uszkodzenia mechaniczne i termiczne, mogące wystąpić w trakcie operacji, w tym uszkodzenie piłą, strefy oparzenia kości w miejscach o zwiększonym tarcu, bardzo duże ubytki kości. Aby uzyskać wiarygodne wyniki z użyciem techniki spektroskopii Ramana, w każdym miejscu wykonano mapę co najmniej 3 pomiarów, uzyskując wartości średnie z miejsc oddalonych od siebie o $10\mu\text{m}$. Łączna ilość pomiarów wykonanych samodzielnie w obrębie tej pracy wyniosła 540 pomiarów, nie licząc pomiarów powtarzanych z powodów technicznych lub fizycznych. Pomiary zostały wykonane przez autora rozprawy, za każdym razem według tej samej procedury badania próbek.

Interpretacja wyników spektroskopowych także została wykonana przez autora rozprawy, co wpływa na stopień obiektywizacji otrzymanych wyników i wysoką

powtarzalność metody. Należy również zwrócić uwagę, iż przedstawiony maksymalny błąd analizy mieści się w dopuszczalnych normach statystycznych (Zasępa, 1991).

Największe zmiany w obrębie chrząstki stawowej, mierzone *in vivo*, zgodnie ze skalą Outerbridge, stosowaną w artroskopowej ocenie uszkodzenia chrząstki stawowej, były istotne statystycznie dla powierzchni obciążanej kłykcia przyśrodkowego – głównie jego części środkowej i tylnej – im większa deformacja szpotawa, tym bardziej istotne uszkodzenie lub ubytki w obrębie chrząstki. Metoda pobrania materiału chrzęstno – kostnego, zaproponowana przez Takahashi, okazała się być metodą intuicyjną, pozwalającą na uzyskanie materiału z miejsc bardziej i mniej obciążanych obu kłykci kości piszczelowej (Takahashi i wsp., 2014). Pobrane zgodnie z tą techniką materiały wykazywały zróżnicowanie w zależności od obciążenia danego miejsca, zarówno w skali Outerbridge, jak i w badaniu metodą spektroskopii Ramana. Różnice pomiędzy strefami uszkodzenia w obrębie kłykcia bocznego i przyśrodkowego zależą od uwarunkowań anatomicznych oraz złożoności ruchu w stawie kolanowym, obejmującego, poza ruchami zgięcia i wyprostu, także translację i rotację. W pracach innych autorów także opisywane są różnice w obszarach uszkodzenia chrząstki stawowej, co znajduje odzwierciedlenie w niniejszej pracy (Nakagawa i wsp., 2015).

Spektroskopia oscylacyjna jest narzędziem wykorzystywanym zarówno do badania mikrostruktury materiału biologicznego, jak i narzędziem diagnostycznym, które pozwala na analizę budowy, struktury i procesów toczących się w tkance (Buchwald i wsp., 2012). Spektroskopia w podczerwieni oraz spektroskopia Ramana jest w stanie określić tak subtelne zmiany w tkance kostnej jak procesy remineralizacji, czy dezorganizacji włókien kolagenowych. Począwszy od badań Carden i Morris w 2000 roku, zastosowanie spektroskopii oscylacyjnej do analizy budowy i zmian w obrębie kości, chrząstki czy szkliwa zaczęło odrywać dużą rolę w badaniach nad składem ilościowym i jakościowym tkanek (Carden i Morris, 2000; McCreadie i wsp., 2006).

Technika ta odgrywa coraz większą rolę jako narzędzie diagnostyczne oraz uzupełnienie badań biochemicznych, obrazowych i histologicznych. Spektroskopia umożliwia utworzenie swojego rodzaju map, uwzględniających skład chemiczny tkanki zdrowej, zmienionej patologicznie oraz zmian zachodzących w tkankach na granicy powyższych. Zmiany w tkance powodują pojawienie się nowych widm, przesunięciem pasm lub zmianą intensywności.

Morris w pracy przeglądowej *Raman Assessment of Bone Quality* w 2011 roku zwrócił uwagę, iż badacze za najbardziej użyteczne wskaźniki oceny jakości kości wskazują proporcje MI oraz CI, a wyniki korespondują ze „sztywnością” kości, odpornością na siły zginające,

ściągające i rozciągające. W badaniach przeprowadzonych w mojej pracy uzyskano podobne, miarodajne wyniki w obrębie wskaźnika mineralizacji oraz zmiany mineralizacji. (Morris, 2011). Badania Akkus nad kośćmi udowymi u myszy wykazały także różnicę w stopniu mineralizacji oraz substytucji węglanoapatytem w zależności od wieku myszy. Proces mineralizacji zwalniał wraz z wiekiem myszy, zwiększała się proporcja węglanoapatytu do hydroksyapatytu w warstwie korowej kości myszy (Akkus i wsp., 2004). Do podobnych konkluzji doszli także autorzy badający te czynniki w obrębie ludzkich kości, w grupie mężczyzn po 60 roku życia, obserwując porównywalne zmiany prezentowane w badaniach nad mysimi preparatami (Yerramshetty i wsp., 2006). Powyższe wnioski płynące z wcześniejszych doniesień, w uzupełnieniu o wyniki moich badań, mogą dać przestrzeń na kolejne prace nad etiopatogenezą choroby zwyrodnieniowej i odpowiedź na pytanie, czy zmiany mineralizacji kości postępującej wraz z wiekiem mogą być podłożem dla rozwoju zwyrodnienia stawów.

Z uwagi na złożoność mikrostruktury tkanki kostnej, obecność macierzy organicznej i mineralnej, przestrzennej orientacji i krzyżowania się włókien kolagenowych, mikrouszkodzenia, zjawisko remodellingu kostnego oraz zmiany zwyrodnieniowe sprawiają, że ocena struktury i składu kości jest procesem niezwykle wymagającym (Weiner i Wagner, 1998). Możliwości badania tkanki kostnej na poziomie mikrostrukturalnym umożliwia spektroskopia ramanowska poprzez wykorzystywanie analizy światła rozproszonego w wyniku działania wiązki lasera, umożliwiając obserwację widm wibracyjnych struktur organicznych i mineralnych tkanki kostnej.

Skuteczność spektroskopii ramanowskiej w analizie składu materiału biologicznego, w tym kości, została potwierdzona w wielu badaniach (Bi i wsp., 2011; Carter i wsp., 2009; Morris, 2010; Nyman i wsp., 2011) i pozwoliła określić swoisty „footprint” poszczególnych związków chemicznych tkanki kostnej (Penel i wsp., 2005; Raghavan i wsp., 2010). Dzięki znajomości położenia poszczególnych pasm widma spektralnego i wiedząc, że pozycje pasm są stałe, w badaniu możliwa jest zarówno analiza jakościowa jak i ilościowa związków chemicznych.

Autorzy w niezależnych pracach wysuwają dwie teorie, które próbują wytłumaczyć wzajemny wpływ zmian chrząstki stawowej i kości w ujęciu etiologii zmian zwyrodnieniowych.

Jedna z teorii, wysunięta przez Radin w 1972 roku głosi, iż zwiększone obciążenie stawu prowadzi do stopniowego zaadaptowania kości z pogrubieniem warstwy podchrzęstnej. Nowa, bardziej sztywna konstrukcja, jest mniej efektywna w absorpcji wstrząsów, a co za tym idzie, zmienia się dystrybucja sił przenoszonych przez zajęty chorobą staw. Następnym etapem

procesu są wtórne zmiany chrząstki stawowej, której destrukcja pogłębia się w miejscach o największym obciążeniu stawu (Radin El i wsp., 1972). Biorąc pod uwagę mechaniczną koncepcję doprowadzającą do wtórnych zmian w obrębie chrząstki i kości, teoria zakłada, iż nowo powstała kość nie wykazuje zmian w budowie chemicznej. W niniejszej pracy uwagę zwraca fakt, iż warstwa podchrzęstna kości udowej ulega przejściowemu, w okresie drugiego stopnia zwyrodnienia w skali K-L, wzroście stopnia mineralizacji. W konsekwencji, dalszy spadek poziomu mineralizacji może być spowodowany brakiem możliwości dalszej kompensacji tego procesu.

Badania nad stanem mineralizacji w grupie kobiet ze złamaniem osteoporotycznym w porównaniu do grupy bez złamania wykazały istotną substytucję węglanoapatytu w stosunku do grup fosforowych. Autorzy opisali, iż kość w miejscu złamania była zdemineralizowana oraz charakteryzowała się większą zawartością węglanoapatytu (McCreadie i wsp., 2006). Podobne wyniki prezentowane w tej pracy, pozwalają wysnuć tezę, iż zmiana w mikrostrukturze kości pełni istotną rolę dla wytrzymałości kości, co odzwierciedlają zmiany w mineralizacji oraz zmiany w rozkładzie chemicznym kości w próbkach kości o wyższym stopniu zwyrodnienia oraz większej deformacji stawu kolanowego.

W kontekście dalszych badań nad etiopatogenezą choroby zwyrodnieniowej wydają się być badania nad białkami NCP, które mogą stanowić cel obiekt badań z użyciem spektroskopii.

Inna teoria postuluje, że zmiany chemiczne w macierzy kostnej są częścią postępującej choroby zwyrodnieniowej. Teoria ta znajduje oparcie w badaniach nad zmianami w budowie kolagenu. Badacze wskazali, że w kości zmienionej zwyrodnieniowo występują cząsteczki tropokolagenu, składające się z 3 łańcuchów $\alpha 1$, zamiast 2 łańcuchów $\alpha 1$ i 1 łańcucha $\alpha 2$. Homotrimer kolagenu ma mniejszą odporność mechaniczną i mniejszy stopień mineralizacji w kości. Te zmiany w warstwie podchrzęstnej kości mogą mieć istotne znaczenie w patogenezie zmian zwyrodnieniowych (Bailey i wsp., 2002).

W niniejszej pracy wykazano, iż budowa kolagenu zmienia się na rzecz pojawiania się kolagenu o niezorganizowanej strukturze oraz przewadze macierzy organicznej nad mineralną, w miarę postępu choroby zwyrodnieniowej i deformacji szpotawej stawu. W świetle badań Bailey, badania te wydają się zbieżne. Kolagen, wraz z wzrostem frakcji niezorganizowanej, traci odporność mechaniczną a w dalszej perspektywie spada poziom mineralizacji tkanki podchrzęstnej kości (Bailey i wsp., 2002).

Niekwestionowaną zaletą spektroskopii Ramana jest możliwość badania nieutralowanego materiału biologicznego, co zostało wykorzystane w tej pracy. Próbkę były płukane 0,9% roztworem NaCl, oczyszczane z tkanek miękkich, a następnie mrożone.

Wcześniej wnioski takie wysunęli także badacze, uzyskując szczegółowe wyniki pomiarów tkanki kostnej niepoddanej wcześniej obróbce czy utrwalaniu (Bi i wsp., 2011; Iwasaki i wsp., 2011). Daje to szansę na zastosowanie techniki w warunkach *in vivo*, poszerzając możliwości diagnostyczne. Możliwość badania w pełni uwodnionych struktur wykorzystał Esmonde - White, przenosząc spektroskopię Ramana do wymiaru klinicznego. W swoich badaniach na preparatach ludzkich użył dostosowanego do artroskopii układu optycznego, dającego możliwość oceny chrząstki i warstwy podchrzęstnej kości (Esmonde-White i wsp., 2011). Podobne badania z użyciem autorskiego *Fiber-optic Probe*, która pozwala na nieinwazyjne badanie tkanek podczas endoskopii lub artroskopii. W połączeniu z obrazowaniem wideoskopowym tkanek, stanowi cenne uzupełnienie analizy struktur chrzęstno – kostnych o wskaźniki spektroskopowe, oceniające jakość tkanek (Matousek i wsp., 2006). Badania te otwierają nowe możliwości diagnostyczne w zmianach w obrębie powierzchni stawowych w stadium subklinicznym.

Zmiany w badanych w tej pracy wskaźnikach korelują ze stadium zaawansowania zmian zwyrodnieniowych oraz poziomem deformacji osi kończyny. W przebiegu badania dowiedziono, iż zmiana stopnia zaawansowania zmian zwyrodnieniowych oraz poziomu deformacji ma odzwierciedlenie w mikrostrukturze kości. Badane wskaźniki mineralizacji kości, zmiany mineralizacji, konfiguracji przestrzennej kolagenu oraz stosunku macierzy organicznej do mineralnej zależą od stopnia zwyrodnienia oraz poziomu deformacji.

W powyższym badaniu dowiedziono, iż w strukturze warstwy podchrzęstnej kości dochodzi do szeregu zmian, które nasilają się wraz z postępującą szpotawością i stopniem zwyrodnienia. Dochodzi do stopniowego spadku mineralizacji tkanki kostnej, na rzecz kolagenu o uporządkowanej strukturze pojawia się postać niezorganizowana. Wraz ze spadkiem poziomu mineralizacji, grupy fosforowe zastępowane są przez węglowe.

Istotne zmiany w obrębie warstwy podchrzęstnej kości korelują ze stopniem szpotawej deformacji kończyny. Wskaźnikiem, który w sposób najbardziej powtarzalny reaguje na zmiany w strukturze warstwy podchrzęstnej kości, jest wskaźnik mineralizacji, czyli wyrażona przez stosunek intensywności integralnych pasm fosforanów ν_1 do intensywności pasm amidu III ($\nu_1\text{PO}_4^{3-}$ / amide III) z obszarów drgań $960\text{-}961\text{ cm}^{-1}$ dla grup fosforanowych i $1243\text{-}1300\text{ cm}^{-1}$ dla wiązań amidowych III. Jego wartość zmniejsza się wraz ze stopniem zaawansowania deformacji dla wszystkich stopni zaawansowania deformacji szpotawej oraz dla obu kłykci. W lekkiej deformacji szpotawej MI kształtuje się na podobnym poziomie, z niewielkim obniżeniem dla kłykcia przyśrodkowego, natomiast w deformacji zaawansowanej, spadek MI jest bardziej zaznaczony w obrębie kłykcia przyśrodkowego niż bocznego. Indeks ten wskazuje

na spadek mineralizacji kostnej – zaburzenie osi kończyny nasila ten proces. Jest to zbieżne z badaniami innych badaczy, którzy w tym procesie upatrują remodellingu kostnego warstwy podchrzęstnej kości wraz z nasileniem zmian zwyrodnieniowych i deformacji stawu (Buchwald i wsp., 2012).

Wskaźnik zmiany mineralizacji, czyli stosunek węglanoapatytu do foforanoapatytu, badany poprzez porównanie intensywności pasm integralnych pasm ramanowskich grup węglanowych $\nu_1\text{CO}_3^{2-}$ z obszaru drgań $1070 - 1075\text{cm}^{-1}$, z intensywnością pasm integralnych dla liczby falowej $960-961\text{cm}^{-1}$, która odpowiada grupom fosforanowym $\nu_1\text{PO}_4^{3-}$, nie wykazał istotnej statystycznie różnicy pomiędzy analogicznymi miejscami na kłykcii bocznej i przyśrodkowej. Natomiast wartości średnie węglanoapatytu do hydroksyapatytu ulegają stopniowemu zwiększeniu, wraz z narastaniem zmian deformacji szpotawej, co oznacza zmianę mineralizacji na większy udział węglanoapatytu niż hydroksyapatytu. Substytucja węglanoapatytem jest czynnikiem opisywanym w tkance kostnej ulegającej procesowi starzenia oraz degeneracji. Wcześniejsze badania w obrębie warstwy podchrzęstnej wykazały, że zwiększenie ilości węglanoapatytu istotnie wpływa na „sztywność” i zmniejszenie podatności kości na odkształcenie (Akkus i wsp., 2004; Busa i wsp., 2005). Także inne badania wykazały zależność wzrostu proporcji węglanów do fosforanów w uszkodzonej tkance kostnej, co jest zbieżne z badaniem własnym (Mkukuma i wsp., 2005; Timlin i wsp., 1999). Substytucja grupami węglanowymi określana jest efektem równoważącym spadek mineralizacji podchrzęstnej tkanki kostnej (Pavlou i wsp., 2018).

Współczynnik uporządkowania włókien kolagenowych, wyrażony jako stosunek intensywności integralnych pasm widm $\nu_2\text{PO}_4^{3-}$ / amid I został użyty do badania orientacji przestrzennej kolagenu. CCI istotnie statystycznie różnił się jedynie dla kłykcii bocznego w części przedniej pomiędzy deformacją lekką a zaawansowaną. Utrzymuje się natomiast tendencja wzrostowa: wraz ze wzrostem deformacji rośnie zawartość kolagenu o nieuporządkowanej strukturze dla obu kłykci. Stosunek hydroksyapatyt : kolagen (HCR) istotnie statystycznie koreluje ze stopniem deformacji dla kłykcii przyśrodkowego w części tylnej. Wraz ze stopniem zaawansowania deformacji szpotawej, zwiększa się zawartość kolagenu w stosunku do hydroksyapatytu. Badanie dwóch powyższych wskaźników nie wykazało istotnych statystycznie wyników. Ograniczeniem badania może być trudność lub wręcz niemożność wychwycenia subtelnych różnic w przestrzennej konfiguracji kolagenu, z uwagi na zbyt duże małe różnice w kontraście pomiędzy substancjami chemicznymi z użyciem wykorzystanej metody badawczej. Podobne wyniki uzyskali także inni autorzy (Pavlou i wsp., 2018), co może potwierdzać, iż współczynniki HCR i CCI przy prezentowanej

w niniejszej pracy technice obróbki oraz technice analitycznej nie stanowią narzędzia diagnostycznego.

W dalszej części analizy, poddano badaniu zmianę współczynników w zależności od miejsca badania, osobno dla deformacji szpotawej lekkiej jak i zaawansowanej. W deformacji lekkiej nie wykryto zależności między kłykiem bocznym a przyśrodkowym, która wnosiłaby istotność statystyczną.

W deformacji zaawansowanej w obrębie wszystkich wskaźników występuje korelacja w obrębie wskaźników pomiędzy kłykiem bocznym a przyśrodkowym w części obciążanej. Różnice w składzie chemicznym zmieniają się w obrębie warstwy podchrzęstnej kości wraz z narastaniem deformacji szpotawej.

Biorąc pod uwagę natomiast stopień zaawansowania choroby zwyrodnieniowej, ocenianej na podstawie radiogramów w skali Kellgrena – Lawrence’a, wskaźnik mineralizacji ulega stopniowemu zmniejszeniu. Różnice dla kłykcia przyśrodkowego i bocznego są istotne statystycznie pomiędzy stopniem zwyrodnienia 1 i 2 oraz 3 i 4.

W obrębie badanych obszarów kłykcia przyśrodkowego dochodzi do przejściowego wzrostu mineralizacji w 2 stopniu wg K-L, następnie w 3 i 4 stopniu w skali K-L dochodzi do jednakowego obniżenia wartości mineralizacji w obrębie zarówno kłykcia przyśrodkowego jak i bocznego. W obrębie pozostałych badanych wskaźników, nie uzyskano istotnych statystycznie wyników pomiędzy kłykiem przyśrodkowym i bocznym w korelacji ze stopniem zwyrodnienia.

Istotne badania w kierunku oceny zmian mikrostrukturalnych kości, w zależności od stopnia uszkodzenia chrząstki stawowej i stopnia zwyrodnienia stawów, przeprowadził Kern w 2014 roku, porównując 10 wyznaczonych obszarów plateau piszczeli z 4 stopniem uszkodzenia chrząstki stawowej w skali Outerbridge, z analogicznymi obszarami w obrębie plateau piszczeli z nienaruszoną chrząstką. Technika spektroskopii Ramana PCA (ang. principal components analysis) oraz PCA-LADA (ang. PCA - linear discriminant analysis) możliwe było odróżnienie materiału z cechami artrozy od materiału bez cech zwyrodnienia. Dopiero szczegółowa analiza pasm dawała możliwość rozróżnienia zmian pomiędzy kłykiem przyśrodkowym i bocznym kości piszczelowej. Największe zmiany zachodziły w intensywności pasm odpowiadających fosforanom, fenyloalaninie i amidowi I. W obrębie kłykcia przyśrodkowego, pomiędzy objętym zmianami zwyrodnieniowymi a obszarami bez zmian, dochodziło do zmian w obrębie widma fosforanów i amidu I. W przypadku podobnego porównania w obrębi kłykcia bocznego, największe zmiany zarejestrowano w obrębie hydroksyproliny/proliny oraz amidu I i fosforanów. Badacze wysunęli hipotezę o zmianie

struktury kolagenu wraz z wystąpieniem zmian zwyrodnieniowych. Podczas tych samych badań wykazali zmiany w mineralizacji warstwy podchrzęstnej kości, z jednoczesnym pogrubieniem warstwy podchrzęstnej w badaniu obwodowej tomografii objętościowej, ang. peripheral quantitative tomography (pQCT). Wynikiem tych badań była obserwacja, iż zmiana w obrębie strefy podchrzęstnej kości nie leży jedynie w pogrubieniu warstwy, do zmian dochodzi także na poziomie mikrostrukturalnym (Kerns i wsp., 2014). Badania przedstawione w powyższej pracy prowadzą do podobnych obserwacji. Badanie próbek zależnych także od poziomu deformacji szpotawej u kobiet, czyli na jednorodnej grupie badawczej, pozwoliło zaobserwować przejściowe zwiększenie mineralizacji w obrębie kłykcia przyśrodkowego, co może odpowiadać kompensacji na rosnące obciążenie. Dalej, w przebiegu postępowania zmian zwyrodnieniowych, poziom mineralizacji obniża się jednakowo, gwałtownie w obrębie obu kłykci kości piszczelowej. Wartym uwagi jest także fakt, że MI w badaniu zależnym od poziomu deformacji prezentuje podobne wartości dla kłykcia przyśrodkowego jak i bocznego, spadek mineralizacji jest także obserwowany na podobnym poziomie.

Można więc, z zachowaniem dużej ostrożności, sądzić, iż deformacja szpotawa stawu kolanowego wiąże się pierwotnie z czynnikami mechanicznymi, w drugiej kolejności dochodzi do zmian w mineralizacji kostnej oraz substytucji grupami węglowymi. Postęp zmian w obrębie składu chemicznego kości nasila się wraz z destrukcją powierzchni stawowej. Podobną korelację pomiędzy uszkodzeniem chrząstki stawowej a zmianami warstwy podchrzęstnej zaobserwowali także badacze w innych pracach (Bobinac i wsp., 2003). Inni badacze, w swoich opracowaniach, wskazują wręcz na istotną korelację pomiędzy mineralizacją warstwy podchrzęstnej kości a poziomem zwężenia szczeliny stawowej oraz określają stan warstwy podchrzęstnej kości za czynnik prognostyczny dla progresji zmian zwyrodnieniowych (Bruyere i wsp., 2003). Wyniki badań przedstawione w powyższej pracy prowadzą do podobnych konkluzji.

Nadal kwestią dalszych badań winno być określenie dokładnych zmian w obrębie kolagenu i jego udziale w postępowaniu zmian zwyrodnieniowych. W przeciwieństwie do innych badań nad strukturą przestrzennej konfiguracji kolagenu, w moich badaniach nie udało się uzyskać jednoznacznych i istotnie statystycznych wyników.

W badaniu ujęto także inne czynniki. Pomiędzy BMI a kątem deformacji szpotawej istnieje istotna statystycznie korelacja, co jest zgodne z opisanym wcześniej modelem Maquet'a. BMI nie wpływa natomiast na stopień zaawansowania zmian zwyrodnieniowych w skalach radiologicznych. Uwagę zwraca natomiast fakt, iż mediana BMI wynosi 33,42kg/m², co jest zgodne z najnowszą wiedzą, uznającą nadwagę i otyłość jako istotny czynnik ryzyka

choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych. Nadwaga i otyłość stanowią względne przeciwwskazanie do endoprotezoplastyki stawu kolanowego. Niemniej, każdy pacjent kwalifikowany do endoprotezoplastyki poddawany jest indywidualnej ocenie. W przypadku nasilonych objawów klinicznych oraz dysfunkcji narządu ruchu w stopniu uniemożliwiającym poruszanie się, pacjent jest kwalifikowany do leczenia operacyjnego. Wraz ze wzrostem BMI spada wynik endoprotezoplastyki, wyrażony w całościowym zadowoleniu pacjenta oraz ryzyku konieczności operacji rewizyjnej. Punktem, w którym ryzyko wczesnej operacji rewizyjnej i osteolizy wokół implantu istotnie wzrasta, jest poziomom 40kg/m^2 (Spicer i wsp., 2001). Pacjenci z otyłością III stopnia nie byli kwalifikowani do leczenia operacyjnego, pacjenci z II stopniem otyłości jedynie przy znacznej dysfunkcji narządu ruchu. Z uwagi na dużą rozpiętość w BMI wśród pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych, do kwalifikacji pacjentów w praktyce szpitalnej stosujemy klasyfikację opartą na podziale na 3 stopnie otyłości (Nuttall, 2015).

Początek objawów, liczony w latach, w świetle powyższych badań, nie wpływa istotnie na stopień uszkodzenia chrząstki stawowej, pacjentki operowane były zazwyczaj około 5 lat od wystąpienia pierwszych objawów.

Iniekcje dostawowe w wywiadzie, zarówno kwas hialuronowy jak i leki steroidowe, nie wpływały w sposób istotny statystycznie na wskaźniki. Należy jednak zwrócić uwagę, iż brak dokładnej dokumentacji medycznej informującej o użytym preparacie, stężeniu substancji czynnej i ilości iniekcji, nie pozwala na jednoznaczne wyciągnięcie wniosków. Z uwagi na luki w ambulatoryjnej dokumentacji medycznej, informującej o leku, dawce, stężeniu oraz regularności przyjmowania, oraz braku konsekwentnego leczenia lekami z kategorii niesteroidowych leków przeciwzapalnych, nie udało się ustalić rzetelnej listy leków, które mogłyby wpływać na stan warstwy podchrzęstnej kości.

Podsumowując, w świetle powyższych badań, najbardziej przydatnym w obrazowaniu zmian w mikrostrukturze kości jest wskaźnik mineralizacji tkanki kostnej oraz, na co wskazują także wyniki innych autorów, którzy wykorzystywali badanie pasma $960\text{-}961\text{cm}^{-1}$, odpowiadającemu grupom fosforowym, jako najbardziej wrażliwego na zmiany w obrębie nieutralizowanej tkanki kostnej. Wiele informacji niesie także stosunek węglanoapatytu do hydroksyapatytu. Spektroskopia Ramana otwiera nowe możliwości analityczne i diagnostyczne dzięki możliwości badania nieutralizowanych preparatów. Wrażliwość metody, nie tylko na obecność lub brak zmian zwyrodnieniowych, ale także możliwość określenia progresji lub zaawansowania zwiększa użyteczność tej metody. Konieczne są natomiast dalsze badania kliniczne, które umożliwiłyby zastosowanie metody nie tylko w chorobie

zwyrodnieniowej, ale także w diagnostyce martwiczo zmienionej kości, diagnostyce nowotworowej czy możliwość predykcji złamań osteoporotycznych.

Novum pracy jest stworzenie jednolitych grup badawczych, uwzględniających jedynie chorobę zwyrodnieniową stawów kolanowych przebiegającą z deformacją szpotawą stawu, co dało możliwość obiektywnego porównania bardziej obciążonego kłykcia przyśrodkowego kości piszczelowej do mniej obciążonego bocznego.

Osiągniętym celem pracy jest wykazanie zależności pomiędzy poziomem deformacji i zwyrodnienia stawu kolanowego, wyrażonej w skalach opartych o badanie radiologiczne, do współczynników określających zmiany w mikrostrukturze kości. Badanie wykazało również zmiany mineralizacji toczące się w kłykciu przyśrodkowym i bocznym, wraz z postępem zwyrodnienia stawu kolanowego.

Sygnalizowanym już wcześniej ograniczeniem pracy jest relatywnie niewielka liczebność ocenianej grupy chorych, kompensowana jej jednorodnością, a także dużą liczbą próbek poddanych analizie z użyciem metody spektroskopii Ramana.

Wartością praktyczną badań jest zwrócenie uwagi na zachodzące zmiany w obrębie warstwy podchrzęstnej kości w przebiegu choroby zwyrodnieniowej. Biorąc pod uwagę fakt obniżenia mineralizacji, spadku zawartości hydroksyapatytu w warstwie podchrzęstnej kości, istotnym wydaje się być pytanie, czy endoprotezoplastyka bezcementowa stawu kolanowego w bardziej zaawansowanych stadiach choroby zwyrodnieniowej ma możliwość dać zadowalający dla pacjenta i długotrwały efekt leczniczy. Można spekulować, iż zmiany te mogą negatywnie wpływać na sposób osteointegracji endoprotezy i przyspieszyć proces obluzowania endoprotezy. Należy zwrócić uwagę, iż pomimo klinicznego pogrubienia warstwy podchrzęstnej kości oraz sklerotyzacji widocznej w rentgenogramach, warstwa ta ma znacznie zmienioną mikrostrukturę. Badania pokazują, iż należy także z dużą ostrożnością kwalifikować pacjentów do jednoprzeczałowej endoprotezoplastyki przy jednoczasowo dużych zmianach radiologicznych w obrębie warstwy podchrzęstnej kości.

Spektroskopia wykorzystująca efekt Ramana jest narzędziem dającym możliwość badania tkanek i udowadnia swoją przydatność w medycynie. Wydaje się, że zastosowanie spektroskopii Ramana w badaniu tkanki chrzęstnej i kostnej przynosi wiele istotnych informacji, a zatem, powinno być polem do dalszych badań w tym obszarze.

8. WNIOSKI

Stopień deformacji szpotawej i zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego, wraz z wyższymi wartościami BMI, wiąże się z obniżeniem mineralizacji tkanki kostnej, zaburzeniami proporcji pomiędzy węglanami a fosforanami, a także ze zmianą orientacji kolagenu w strukturę nieuporządkowaną.

Spośród czynników istotnych statystycznie w początkowej fazie zmian zwyrodnieniowych stawu kolanowego, przebiegającego z deformacją szpotawą, współczynnik mineralizacji jest wyższy dla kłykcia bocznego niż przyśrodkowego kości piszczelowej.

9. STRESZCZENIE W JĘZYKU POLSKIM

Celem badania jest określenie zależności pomiędzy poziomem deformacji, stopniem zwyrodnienia stawu kolanowego, a zmianą w mikrostrukturze tkanki kostnej objętej chorobą zwyrodnieniową, w badaniu z użyciem metody spektroskopii Ramana. Dodatkowym celem pracy było wykazanie parametrów, które w sposób obiektywny i powtarzalny będą w stanie wykryć procesy toczące się w warstwie podchrzęstnej kości.

Do badania zakwalifikowano pacjentki z rozpoznaną pierwotną chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego, z obecną szpotawością stawu, planowane do leczenia operacyjnego – endoprotezoplastyki stawu kolanowego, w Szpitalu w Puszczykowie, w roku 2018. Pacjentki poddano ocenie klinicznej i radiologicznej z użyciem standardowych radiogramów stawów kolanowych w pozycjach przednio – tylnej i bocznej oraz określeniu poziomu deformacji szpotawej stawu na podstawie zdjęć radiologicznych pomiarowych kończyn dolnych.

Podczas leczenia operacyjnego od 30 pacjentek pobrano materiał chrzęstno – kostny z plateau piszczeli, który następnie poddano opracowaniu oraz badaniu z zastosowaniem techniki spektroskopii ramanowskiej w Zakładzie Spektroskopii Politechniki Poznańskiej przy użyciu systemu mikroramanowskiego inVia Renishaw, sprzęgniętego z mikroskopem konfokalnym. Materiał był pobierany w przebiegu standardowej techniki operacyjnej. Uzyskane widma rozpraszania ramanowskiego poddano analizie poprzez pomiar poszczególnych intensywności pasm, a wyniki w postaci proporcji wybranych pasm ramanowskich, przyporządkowanych wybranym grupom chemicznym, wyrażono jako 4 wskaźniki: wskaźnik mineralizacji (MI), wskaźnik zmiany mineralizacji (CI), wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych (CCI) oraz stosunku hydroksyapatytu do kolagenu (HCR). Wskaźniki te porównano do wcześniej uzyskanych danych klinicznych, stopnia zwyrodnienia stawu kolanowego w skali Kellgrena – Lawrence’a oraz poziomu deformacji szpotawej stawu.

Pacjentki podzielono na dwie grupy, obejmujące szpotawość stawu 3-10 stopni oraz 11-30 stopni. Pacjentki podzielono także na IV grupy w zależności od stopnia zwyrodnienia w skali Kellgrena – Lawrence’a. Pacjentki w stopniu 0 nie były kwalifikowane do endoprotezoplastyki, a co za tym idzie, do dalszego badania.

Uzyskano istotne statystycznie wyniki ($p < 0,05$) w obrębie obciążanych stref kłykcia przyśrodkowego i bocznego, opisujących spadek mineralizacji (MI) w przedniej i środkowej części kłykcia przyśrodkowego oraz środkowej i tylnej kłykcia bocznego wraz

z postępowaniem deformacji szpotawej stawu. Wskaźnik zmiany mineralizacji (CI) nie wykazał istotnych statystycznie różnic w zależności od poziomu deformacji, natomiast średnia i mediana wskazują na stopniowe obniżenie wskaźnika. Badania w obrębie wskaźnika uporządkowania włókien kolagenowych oraz stosunek hydroksyapatyt : kolagen były istotne statystycznie jedynie dla niektórych punktów, natomiast średnia wyników wykazywała stopniowe przesunięcie w kierunku kolagenu o strukturze nieuporządkowanej i przesunięciu fazy w kierunku organicznej wraz z nasileniem deformacji.

W początkowej fazie choroby zwyrodnieniowej (poziom 1 i 2 wg skali K-L) poziom mineralizacji, wyrażony współczynnikiem mineralizacji, jest istotnie statystycznie wyższy ($p < 0,05$) dla kłykcia bocznego niż przyśrodkowego. Wraz z postępowaniem choroby zwyrodnieniowej, współczynnik mineralizacji ulega zmniejszeniu i jest podobny dla obu badanych kłykci kości piszczelowej. W zależności od poziomu deformacji szpotawej stawu współczynnik mineralizacji obniża się jednakowo w obrębie obu kłykci. Taka sama zależność występuje w relacji do stopnia zmian zwyrodnieniowych, wyrażonych w skali Kellgrena – Lawrence’a.

Osiągniętym celem pracy jest wykazanie zależności pomiędzy poziomem deformacji i zwyrodnienia stawu kolanowego, wyrażonej w skalach opartych o badanie radiologiczne, do współczynników określających zmiany w mikrostrukturze kości. Badanie wykazało również zmiany mineralizacji toczące się w kłykciu przyśrodkowym i bocznym wraz z postępem zwyrodnienia stawu kolanowego. Technika spektroskopii Ramana jest użytecznym narzędziem w dalszych badaniach nad patogenezą i przebiegiem choroby zwyrodnieniowej stawów i może mieć wpływ na wczesną diagnostykę oraz leczenie choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych.

10. STRESZCZENIE W JĘZYKU ANGIELSKIM

The aim of the study was to determine the relationship between the level of deformation, the degree of degeneration of the knee joint and the change in the microstructure of the bone tissue affected by osteoarthritis in a study with application of Raman Spectroscopy. An additional aim of the study was to demonstrate the parameters that will be able to objectively and reproducibly detect the processes taking place in the subchondral layer of the bone.

Female patients diagnosed with primary osteoarthritis of the knee joint, with the presence of varus joint deformity, planned for surgical treatment - knee arthroplasty at the Puszczkowsko Hospital in 2018, were qualified for the study. The patients were assessed clinically, radiographically using standard radiographs of the knee joint in antero-posterior and lateral positions, and the level of varus deformity of the joint was determined on the basis of radiographic measurements of the lower limbs.

During the surgical treatment of 30 patients, cartilage and bone material was collected from the tibial plateau, which was then processed and examined using the Raman spectroscopy technique at the Department of Spectroscopy of the Poznań University of Technology, using the inVia Renishaw microscope system cooperating with a confocal microscope. The material was collected in the course of standard surgical technique. The obtained Raman scattering spectra were analyzed by measuring individual band intensities, and the results in the form of proportions of selected Raman bands assigned to selected chemical groups were expressed as 4 indicators: mineralization index (MI), mineralization change index (CI), collagen configuration index (CCI) and hydroxyapatite to collagen ratio (HCR). These indicators were compared to the previously obtained clinical data, the degree of degeneration of the knee joint on the Kellgren - Lawrence scale and the level of varus deformity of the joint.

In the initial stage of degenerative disease (level 1 and 2 according to the K-L scale), the level of mineralization expressed by the mineralization index is statistically significantly higher ($p < 0.05$) for the lateral condyle than for the medial one. As the degenerative disease progresses, the mineralization rate decreases and is similar for both tibial condyles tested. The mineralization change index (CI) showed no statistically significant differences depending on the level of deformation, while the mean and median indicate a gradual decrease in the index. The studies within the collagen configuration index and the hydroxyapatite: collagen ratio was statistically significant only for some points, while the mean of the results showed a gradual

shift towards disordered collagen and a phase shift towards organic with the severity of deformation.

In the initial stage of degenerative disease (level 1 and 2 according to the K-L scale), the level of mineralization expressed by the mineralization index is statistically significantly higher ($p < 0.05$) for the lateral condyle than for the medial one. As the degenerative disease progresses, the mineralization rate decreases and is similar for both tibial condyles tested. Depending on the level of varus deformation of the joint, the mineralization index decreases equally in both condyles. The same relationship occurs in relation to the degree of degenerative changes, expressed on the Kellgren - Lawrence scale.

The aim of the study was to demonstrate the relationship between the level of deformation and degeneration of the knee joint, expressed in scales based on radiological examination, to the coefficients determining changes in the bone microstructure. The study also showed changes in mineralization in the medial and lateral condyles with the progression of degeneration of the knee joint. The Raman spectroscopy technique is a useful tool in further studies on the pathogenesis and course of arthrosis and may have an impact on the early diagnosis and treatment of early knee osteoarthritis.

11. PIŚMIENNICTWO

- Akkus, O., Adar, F., Schaffler, M. B. (2004). Age-related changes in physicochemical properties of mineral crystals are related to impaired mechanical function of cortical bone. *Bone*, 34(3), 443–453.
- Bailey, A. J., Sims, T. J., Knott, L. (2002). Phenotypic expression of osteoblast collagen in osteoarthritic bone: Production of type I homotrimer. *The International Journal of Biochemistry and Cell Biology*, 34(2), 176–182.
- Bazin, D., Chappard, C., Combes, i wsp. (2009). Diffraction techniques and vibrational spectroscopy opportunities to characterise bones. *Osteoporosis International: a Journal Established as Result of Cooperation between the European Foundation for Osteoporosis and the National Osteoporosis Foundation of the USA*, 20(6), 1065–1075.
- Bellemans, J., Colyn, W., Vandenuecker, H., Victor, J. (2012). The Chitranjan Ranawat award: Is neutral mechanical alignment normal for all patients? The concept of constitutional varus. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 470(1), 45–53.
- Bi, X., Patil, C. A., Lynch, C. i wsp. (2011). Raman and mechanical properties correlate at whole bone and tissue levels in a genetic mouse model. *Journal of biomechanics*, 44(2), 297–303.
- Bobinac, D., Spanjol, J., Zoricic, S., Maric, I. (2003). Changes in articular cartilage and subchondral bone histomorphometry in osteoarthritic knee joints in humans. *Bone*, 32(3), 284–290.
- Boivin, G., Meunier, P. J. (2002). Effects of bisphosphonates on matrix mineralization. *Journal of Musculoskeletal and Neuronal Interactions*, 2(6), 538–543.
- Boskey, A. L., Mendelsohn, R. (2005). Infrared analysis of bone in health and disease. *Journal of Biomedical Optics*, 10(3), 031102.
- Bron, E. E., van Tiel, J., Smit, H. i wsp. (2013). Image registration improves human knee cartilage T1 mapping with delayed gadolinium-enhanced MRI of cartilage (dGEMRIC). *European Radiology*, 23(1), 246–252.
- Bruyere, O., Dardenne, C., Lejeune, E. i wsp. (2003). Subchondral tibial bone mineral density predicts future joint space narrowing at the medial femoro-tibial compartment in patients with knee osteoarthritis. *Bone*, 32(5), 541–545.
- Buchwald, T., Kozielski, M., Szybowicz, M. (2012). Determination of Collagen Fibers Arrangement in Bone Tissue by Using Transformations of Raman Spectra Maps. *Spectroscopy: An International Journal*, 27(2), 107–117.
- Buchwald, T., Niciejewski, K., Kozielski i wsp. (2012). Identifying compositional and structural changes in spongy and subchondral bone from the hip joints of patients with osteoarthritis using Raman spectroscopy. *Journal of Biomedical Optics*, 17(1), 017007.

- Busa, B., Miller, L. M., Rubin, C. T., Qin, Y.-X., Judex, S. (2005). Rapid Establishment of Chemical and Mechanical Properties during Lamellar Bone Formation. *Calcified Tissue International*, 77(6),
- Carden, A., Morris, M. D. (2000). Application of vibrational spectroscopy to the study of mineralized tissues (review). *Journal of Biomedical Optics*, 5(3), 259–268.
- Carter, E. A., Tam, K. K., Armstrong, R. S., Lay, P. A. (2009). Vibrational spectroscopic mapping and imaging of tissues and cells. *Biophysical Reviews*, 1(2), 95–103.
- Chen, D., Shen, J., Zhao, W. i wsp. (2017). Osteoarthritis: Toward a comprehensive understanding of pathological mechanism. *Bone Research*, 5, 16044.
- Cherian, J. J., Kapadia, B. H., Banerjee, S. i wsp. (2014). Mechanical, Anatomical, and Kinematic Axis in TKA: Concepts and Practical Applications. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 7(2), 89–95.
- Chou, P.-H., Chen, W.-M., Chen, C.-F. i wsp. (2012). Clinical comparison of valgus and varus deformities in primary total knee arthroplasty following midvastus approach. *The Journal of Arthroplasty*, 27(4), 604–612.
- Clarke, B. (2008). Normal Bone Anatomy and Physiology. *Clinical Journal of the American Society of Nephrology : CJASN*, 3(Suppl 3), S131–S139.
- Coventry, M. B. (1965). Osteotomy of the upper portion of the tibia for degenerative arthritis of the knee. a preliminary report. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 47, 984–990.
- Croft, P., Cooper, C., Wickham, C., Coggon, D. (1990). Defining osteoarthritis of the hip for epidemiologic studies. *American Journal of Epidemiology*, 132(3), 514–522.
- Currey, J. D. (1989). Biomechanics of Mineralized Skeletons. w *Skeletal Biomineralization: Patterns, Processes and Evolutionary Trends* (s. 11–25). American Geophysical Union (AGU).
- D'Ambrosia, R. D. (2005). Epidemiology of osteoarthritis. *Orthopedics*, 28(2 Suppl), s201–205.
- Day, J. S., Van Der Linden, J. C., Bank, R. A. i wsp. (2004). Adaptation of subchondral bone in osteoarthritis. *Biorheology*, 41(3–4), 359–368.
- de Carmejane, O., Morris, M. D., Davis, M. K. i wsp. (2005). Bone chemical structure response to mechanical stress studied by high pressure Raman spectroscopy. *Calcified Tissue International*, 76(3), 207–213.
- De Muylder, J., Victor, J., Cornu, O., Kaminski, L., Thienpont, E. (2015). Total knee arthroplasty in patients with substantial deformities using primary knee components. *Knee Surgery, Sports Traumatology, Arthroscopy: Official Journal of the ESSKA*, 23(12), 3653–3659.

- Dieppe, P. A. (1995). Recommended methodology for assessing the progression of osteoarthritis of the hip and knee joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 3(2), 73–77.
- Esmonde-White, K. A., Esmonde-White, F. W. L., Morris, M. D., Roessler, B. J. (2011). Fiber-optic Raman spectroscopy of joint tissues. *Analyst*, 136(8), 1675–1685.
- Felson, D. T., Neogi, T. (2004). Osteoarthritis: Is it a disease of cartilage or of bone? *Arthritis and Rheumatism*, 50(2), 341–344.
- Forlino, A., Cabral, W. A., Barnes, A. M., Marini, J. C. (2011). New perspectives on osteogenesis imperfecta. *Nature Reviews Endocrinology*, 7(9), 540–557.
- Freeman, M. a. R., Pinskerova, V. (2005). The movement of the normal tibio-femoral joint. *Journal of Biomechanics*, 38(2), 197–208.
- Glover, P., Mansfield, S. P. (2002). Limits to magnetic resonance microscopy. *Reports on Progress in Physics*, 65(10), 1489–1511.
- Gupton, M., Imonugo, O., Terreberry, R. R. (2021). Anatomy, Bony Pelvis and Lower Limb, Knee. w *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK500017/>
- Heidari, B. (2011). Knee osteoarthritis prevalence, risk factors, pathogenesis and features: Part I. *Caspian Journal of Internal Medicine*, 2(2), 205–212.
- Hsu, H., Siwiec, R. M. (2021). Knee Osteoarthritis. w *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK507884/>
- Hsu, R. W., Himeno, S., Coventry, M. B., Chao, E. Y. (1990). Normal axial alignment of the lower extremity and load-bearing distribution at the knee. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 255, 215–227.
- Hunter, D. J., Felson, D. T. (2006). Osteoarthritis. *BMJ: British Medical Journal*, 332(7542), 639–642.
- Iwasaki, Y., Kazama, J. J., Yamato, H., Fukagawa, M. (2011). Changes in chemical composition of cortical bone associated with bone fragility in rat model with chronic kidney disease. *Bone*, 48(6), 1260–1267.
- Jinks, C., Jordan, K., Croft, P. (2007). Osteoarthritis as a public health problem: The impact of developing knee pain on physical function in adults living in the community: (KNEST 3). *Rheumatology (Oxford, England)*, 46(5), 877–881.
- Judex, S., Boyd, S., Qin, X.-Y. i wsp. (2003). Combining high-resolution micro-computed tomography with material composition to define the quality of bone tissue. *Curr Osteoporos Rep.*, 1, 11–19.
- Kazanci, M., Roschger, P., Paschalis, E. P., Klaushofer, K., Fratzl, P. (2006). Bone osteonal tissues by Raman spectral mapping: Orientation-composition. *Journal of Structural Biology*, 156(3), 489–496.

- Kazanci, M., Wagner, H. D., Manjubala, N. I. i wsp. (2007). Raman imaging of two orthogonal planes within cortical bone. *Bone*, 41(3), 456–461.
- Kellgren, J. H., Lawrence, J. S. (1957). Radiological assessment of osteo-arthritis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 16(4), 494–502.
- Kerns, J. G., Gikas, P. D., Buckley, K. i wsp. (2014). Evidence from Raman spectroscopy of a putative link between inherent bone matrix chemistry and degenerative joint disease. *Arthritis a Rheumatology (Hoboken, N.J.)*, 66(5), 1237–1246.
- Kęcki Z. (1975). *Podstawy spektroskopii molekularnej*. PWN, Warszawa, 11-34, 84-107.
- Kielan W, Lazarkiewicz B, Grzebieniak Z, Skalski A, Zukrowski P. Jan Mikulicz-Radecki: one of the creators of world surgery. *Keio J Med*. 2005 Mar;54(1):1-7.
- Kozielski, M., Buchwald, T., Szybowicz, M. i wsp. (2011). Determination of composition and structure of spongy bone tissue in human head of femur by Raman spectral mapping. *Journal of Materials Science. Materials in Medicine*, 22(7), 1653–1661.
- Kuettner, K. E., Cole, A. A. (2005). Cartilage degeneration in different human joints. *Osteoarthritis and Cartilage*, 13(2), 93–103.
- Kummer, B. (1995). [Basics of Pauwels' theory of the functional adaptation of bones]. *Der Orthopade*, 24(5), 387–393.
- Kwiatkowski, K. (2004). [Gonarthrosis—Epidemiology and risk factors]. *Polski merkuriusz lekarski*, 17(100), 410–414.
- Lane, N. E., Nevitt, M. C., Genant, H. K., Hochberg, M. C. (1993). Reliability of new indices of radiographic osteoarthritis of the hand and hip and lumbar disc degeneration. *The Journal of Rheumatology*, 20(11), 1911–1918.
- Larsson, S., Englund, M., Struglics, A., Lohmander, L. S. (2012). The association between changes in synovial fluid levels of ARGS-aggrekan fragments, progression of radiographic osteoarthritis and self-reported outcomes: a cohort study. *Osteoarthritis and Cartilage*, 20(5), 388–395.
- Legros, R., Balmain, N., Bonel, G. (1987). Age-related changes in mineral of rat and bovine cortical bone. *Calcified Tissue International*, 41(3), 137–144.
- Lespasio, M. J., Piuizzi, N. S., Husni, M. E. i wsp. (2017). Knee Osteoarthritis: a Primer. *The Permanente Journal*, 21, 16–183.
- Luo, C.-F. (2004). Reference axes for reconstruction of the knee. *The Knee*, 11(4), 251–257.
- Łapaj, Ł., Markuszewski, J., Wierusz-Kozłowska, M. (2010). [Current views on the pathogenesis of osteoarthritis]. *Chirurgia Narzadow Ruchu i Ortopedia Polska*, 75(4), 248–260.
- Maetzel, A., Li, L., Pencharz, J., Tomlinson, G., Bombardier, C. (2004). The economic burden associated with osteoarthritis, rheumatoid arthritis, and hypertension: a comparative

study. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 63(4), 395–401.

Man, G. S., Mologhianu, G. (2014). Osteoarthritis pathogenesis—A complex process that involves the entire joint. *Journal of Medicine and Life*, 7(1), 37–41.

Maquet, P. (1972). Biomechanics of gonarthrosis. *Acta Orthopaedica Belgica*, 38 Suppl 1, 33–54.

Maquet, P. (1980). The biomechanics of the knee and surgical possibilities of healing osteoarthritic knee joints. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 146, 102–110.

Martel-Pelletier, J. (2004). Pathophysiology of osteoarthritis. *Osteoarthritis and Cartilage*, 12, 31–33.

Matousek, P., Draper, E. R. C., Goodship, A. E. i wsp. (2006). Noninvasive Raman spectroscopy of human tissue in vivo. *Applied Spectroscopy*, 60(7), 758–763.

McCreadie, B. R., Morris, M. D., Chen, T. i wsp. (2006). Bone tissue compositional differences in women with and without osteoporotic fracture. *Bone*, 39(6), 1190–1195.

Medda, S., Kundu, R., Sengupta, S., Pal, A. K. (2017). Anatomical variation of posterior slope of tibial plateau in adult Eastern Indian population. *Indian Journal of Orthopaedics*, 51(1), 69–74.

Mendelsohn, R., Paschalis, E. P., Boskey, A. L. (1999). Infrared spectroscopy, microscopy, and microscopic imaging of mineralizing tissues: Spectra-structure correlations from human iliac crest biopsies. *Journal of Biomedical Optics*, 4(1), 14–21.

Michael, J. W.-P., Schlüter-Brust, K. U., Eysel, P. (2010). The Epidemiology, Etiology, Diagnosis, and Treatment of Osteoarthritis of the Knee. *Deutsches Arzteblatt International*, 107(9), 152–162.

Morris M.D., Gurjit S., (2011). Raman Assessment of Bone Quality. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 469(8): 2160–2169.

Mkukuma, L. D., Imrie, C. T., Skakle, J. M. S., Hukins, D. W. L., Aspden, R. M. (2005). Thermal stability and structure of cancellous bone mineral from the femoral head of patients with osteoarthritis or osteoporosis. *Annals of the Rheumatic Diseases*, 64(2), 222–225.

Mobasheri, A., Henrotin, Y. (2015). Biomarkers of (osteo)arthritis. *Biomarkers*, 20(8), 513–518.

Moreland, J. R., Bassett, L. W., Hanker, G. J. (1987a). Radiographic analysis of the axial alignment of the lower extremity. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 69(5), 745–749.

Moreland, J. R., Bassett, L. W., Hanker, G. J. (1987b). Radiographic analysis of the axial alignment of the lower extremity. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 69(5), 745–749.

- Morris, M. (2010). Raman Spectroscopy of Bone and Cartilage. M. D. Morris (Red.), *Emerging Raman Applications and Techniques in Biomedical and Pharmaceutical Fields* (s. 347–364). Springer.
- Nakagawa, Y., Mukai, S., Yabumoto, H., Tarumi, E., Nakamura, T. (2015). Cartilage Degeneration and Alignment in Severe Varus Knee Osteoarthritis. *CARTILAGE*, 6(4), 208–215.
- Nakahara, E., Zhu, W., Pezzotti, G. i wsp. (2018). Raman spectroscopy reveals differences in molecular structure between human femoral heads affected by steroid-associated and alcohol-associated osteonecrosis. *International Orthopaedics*, 42(7), 1557–1563.
- Nuttall, F. Q. (2015). Body Mass Index. *Nutrition Today*, 50(3), 117–128.
- Nyman, J. S., Makowski, A. J., Patil, C. A. i wsp. (2011). Measuring Differences in Compositional Properties of Bone Tissue by Confocal Raman Spectroscopy. *Calcified tissue international*, 89(2), 111–122.
- Olszta, M. J., Cheng, X., Jee, S. S. i wsp. (2007). Bone structure and formation: a new perspective. *Materials Science and Engineering: R: Reports*, 58(3), 77–116.
- Paley, D., Tetsworth, K. (1992). Mechanical axis deviation of the lower limbs. Preoperative planning of uniapical angular deformities of the tibia or femur. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 280, 48–64.
- Pavlou, E., Zhang, X., Wang, J., Kourkouvelis, N. (2018). Raman spectroscopy for the assessment of osteoarthritis. *Annals of Joint*, 3(0), Article 0.
- Peat, G., Thomas, E., Handy, J. i wsp. (2004). The Knee Clinical Assessment Study—CAS(K). a prospective study of knee pain and knee osteoarthritis in the general population. *BMC Musculoskeletal Disorders*, 5, 4.
- Penel, G., Delfosse, C., Descamps, M., Leroy, G. (2005). Composition of bone and apatitic biomaterials as revealed by intravital Raman microspectroscopy. *Bone*, 36(5), 893–901.
- Radin, E. L. (2004). Who gets osteoarthritis and why? *The Journal of Rheumatology. Supplement*, 70, 10–15.
- Radin E. L., Paul I. L., Rose R. M. (1972). *Role of Mechanical Factors in Pathogenesis of Primary Osteoarthritis*. Lancet (London, England); Lancet. 6736(72)90179-1
- Raghavan, M., Sahar, N., Wilson, R. i wsp. (2010). Quantitative polarized Raman spectroscopy in highly turbid bone tissue. *Journal of biomedical optics*, 15, 037001.
- Robinson, R. A. (1979). Bone tissue: Composition and function. *The Johns Hopkins Medical Journal*, 145(1), 10–24.
- Saavedra, M. Á., Navarro-Zarza, J. E., Villaseñor-Ovies, P. i wsp. (2012). Clinical anatomy of the knee. *Reumatologia Clinica*, 8 Suppl 2, 39–45.
- Sabatini, L., Risitano, S., Parisi, G. i wsp. (2018). Medial Pivot in Total Knee Arthroplasty:

Literature Review and Our First Experience. *Clinical Medicine Insights. Arthritis and Musculoskeletal Disorders*, 11.

Shetty, G. M., Mullaji, A., Bhayde, S., Nha, K. W., Oh, H. K. (2014). Factors contributing to inherent varus alignment of lower limb in normal Asian adults: Role of tibial plateau inclination. *The Knee*, 21(2), 544–548.

Slattery, C., Kweon, C. Y. (2018). Classifications in Brief: Outerbridge Classification of Chondral Lesions. *Clinical Orthopaedics and Related Research*, 476(10), 2101–2104.

Sophia Fox, A. J., Bedi, A., Rodeo, S. A. (2009). The Basic Science of Articular Cartilage. *Sports Health*, 1(6), 461–468.

Spicer, D. D., Pomeroy, D. L., Badenhausen, W. E. i wsp. (2001). Body mass index as a predictor of outcome in total knee replacement. *International Orthopaedics*, 25(4), 246–249.

Swain, S., Sarmanova, A., Mallen, C. i wsp. (2020). Trends in incidence and prevalence of osteoarthritis in the United Kingdom: Findings from the Clinical Practice Research Datalink (CPRD). *Osteoarthritis and Cartilage*, 28(6), 792–801.

Takahashi, Y., Sugano, N., Takao, M. i wsp. (2014). Raman spectroscopy investigation of load-assisted microstructural alterations in human knee cartilage: Preliminary study into diagnostic potential for osteoarthritis. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, 31, 77–85.

Tang, W. M., Zhu, Y. H., Chiu, K. Y. (2000). Axial alignment of the lower extremity in Chinese adults. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 82(11), 1603–1608.

Terauchi, M., Shirakura, K., Katayama, M., Higuchi, H., Takagishi, K. (1998). The influence of osteoporosis on varus osteoarthritis of the knee. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 80(3), 432–436.

Tew, M., Waugh, W. (1985). Tibiofemoral alignment and the results of knee replacement. *The Journal of Bone and Joint Surgery. British Volume*, 67(4), 551–556.

Thienpont, E., Parvizi, J. (2016). a New Classification for the Varus Knee. *The Journal of Arthroplasty*, 31(10), 2156–2160.

Timlin, J. A., Carden, A., Morris, M. D. (1999). Chemical Microstructure of Cortical Bone Probed by Raman Transects. *Applied Spectroscopy*, 53(11), 1429–1435.

Tsuda, H., Arends, J. (1994). Orientational Micro-Raman Spectroscopy on Hydroxyapatite Single Crystals and Human Enamel Crystallites. *Journal of Dental Research*, 73(11), 1703–1710.

van Saase, J. L., van Romunde, L. K., Cats, A., Vandenbroucke, J. P., Valkenburg, H. A. (1989). Epidemiology of osteoarthritis: Zoetermeer survey. Comparison of radiological osteoarthritis in a Dutch population with that in 10 other populations. *Annals of the Rheumatic*

Diseases, 48(4), 271–280.

Weiner, S., Traub, W., Wagner, H. D. (1999). Lamellar bone: Structure-function relations. *Journal of Structural Biology*, 126(3), 241–255.

Weiner, S., Wagner, H. D. (1998). The material bone: Structure-Mechanical Function Relations. *Annual Review of Materials Science*, 28(1), 271–298.

Wright, R. W. MARS Group. (2014). Osteoarthritis Classification Scales: Interobserver Reliability and Arthroscopic Correlation. *The Journal of Bone and Joint Surgery. American Volume*, 96(14), 1145–1151.

Yerramshetty, J. S., Lind, C., Akkus, O. (2006). The compositional and physicochemical homogeneity of male femoral cortex increases after the sixth decade. *Bone*, 39(6), 1236–1243.

Zasępa, R. (1991). *Zarys metody reprezentacyjnej*, GUS, Warszawa, 52.

Zimmerman, L., a McKeon, B. (2021). Osteomalacia. w *StatPearls*. StatPearls Publishing. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK551616/>

Zlotnicki, J. P., Naendrup, J.-H., Ferrer, G. A., Debski, R. E. (2016). Basic biomechanic principles of knee instability. *Current Reviews in Musculoskeletal Medicine*, 9(2), 114–122.

12. ZAŁĄCZNIKI

Załącznik 1: Informacja dla pacjenta oraz formularz świadomej zgody na udział w badaniu

Badający: lek. Paweł Kasprzak

Projekt badawczy: Analiza zmian mikrostrukturalnych kości metodą spektroskopii Ramana u kobiet z deformacją szpotawą stawu kolanowego w przebiegu pierwotnej choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych.

INFORMACJA DLA PACJENTA ORAZ FORMULARZ ŚWIADOMEJ ZGODY

Rozwój inwazyjnego leczenia choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, jaką jest endoprotezoplastyka stawu kolanowego przyczynił się do poprawy komfortu i powrotu do aktywności wielu pacjentów. Endoprotezoplastyka stawu jest definitywną formą leczenia choroby zwyrodnieniowej. By zgłębić mechanizm choroby szczególnie w jego początkowej fazie i przyspieszyć postawienie diagnozy choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego a tym samym wdrożyć leczenie mające na celu spowolnienie choroby, proponuję udział w poniższym badaniu.

Zostanie Pani poddana badaniu radiologicznemu RTG obu stawów kolanowych w dwóch projekcjach - projekcji przednio-tylnej i projekcji bocznej oraz RTG obu kończyn na długiej kliszy. Na podstawie obrazu radiologicznego zostanie określone stadium choroby wg klasyfikacji Kellgrena - Lawrence'a oceniającej stadium zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów na podstawie charakterystyki radiologicznej oraz skalą Crofta - Lane'a biorącą pod uwagę poziom zwężenia szpary stawowej. Wyznaczona także zostanie oś kończyny.

Podczas operacji endoprotezoplastyki stawu kolanowego, w warunkach sali operacyjnej i pełnej aseptyki pobrany zostanie od Pani materiał kostny - 6 próbek z końca bliższego kości piszczelowej, z powierzchni tworzącej staw kolanowy, które są standardowo usuwane zgodnie z użytą techniką operacyjną i instrumentarium. Pobranie materiału nie poszerza ani nie przedłuża zabiegu. Pobranie materiału nie stanowi żadnego uszczerbku na zdrowiu pacjenta, gdyż są to fragmenty kostne objęte procesem zwyrodnieniowym i są standardowo usuwane podczas operacji. W/w próbki zostaną poddane badaniu pomiaru widma Ramana i ocenie składu chemicznego kości w warunkach laboratoryjnych.

Badanie jest dobrowolne i istnieje możliwość wycofania się przez Panią z niego na każdym etapie jego trwania z prawem dalszego leczenia w tym samym ośrodku.

Badanie gwarantuje poufność danych osobowych.

Podczas leczenia podlegać będzie Pani szczegółowemu nadzorowi medycznemu.

Pobranie materiału nie stanowi żadnego uszczerbku na zdrowiu, nie zwiększa ryzyka okołoperacyjnego i nie stanowi źródła powikłań, gdyż są to fragmenty kostne objęte procesem chorobowym i są usuwane podczas operacji.

Na każdym etapie badania ma Pani prawo do zadawania pytań prowadzącemu badanie i uzyskania odpowiedzi na te pytania.

Wszystkie dane osobowe podczas prowadzenia badania są poufne a historia choroby objęta jest tajemnicą lekarską.

W razie szkody poniesionej podczas badania objęta jest Pani polisą OC szpitala oraz polisą OC lekarza prowadzącego badanie.

ZGODA NA UDZIAŁ W BADANIU

Po zapoznaniu się z charakterem i celem badania oraz wyjaśnieniu wszystkich jego aspektów przez lekarza wyrażam świadomą zgodę na udział w tym badaniu oraz pobranie 6 próbek materiału kostnego podczas operacji endoprotezoplastyki stawu kolanowego i poddanie go badaniu w warunkach laboratoryjnych.

Nazwisko i imię badanego:

Data:

Podpis:

Nazwisko i imię lekarza (badającego):

Data:

Podpis:

Załącznik 2: Karta badania i obserwacji śródoperacyjnej

Pacjent:

Lat:

Ocena radiologiczna RTG AP w skali wg Kellgrena - Lawrence'a

.....

Ocena radiologiczna RTG AP w skali wg Crofty – Lane'a

.....

Wyznaczona oś kończyny dolnej

.....

Lokalizacja	Klasyfikacja Outerbridge
Kłykieć przyśrodkowy przód	
Kłykieć przyśrodkowy środek	
Kłykieć przyśrodkowy tył	
Kłykieć boczny przód	
Kłykieć boczny środek	
Kłykieć boczny tył	

Iniekcje:

Początek dolegliwości:

BMI:

Załącznik 3: Zgoda Komisji Bioetycznej



UNIwersytet Medyczny Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Komisja Bioetyczna przy Uniwersytecie Medycznym
Im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Collegium Stomatologicum
ul. Bukowska 70
60-812 Poznań

tel. (+48 61) 854 73 36
www.bioetyka.ump.edu.pl

Uchwała nr 1199/17

Na podstawie przepisów Ustawy z dnia 5 grudnia 1996 r. o zawodach lekarzy i lekarzy dentysty (t.j. Dz. U. z 2017, poz. 125 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Zdrowia i Opieki Społecznej z dnia 11 maja 1999r. w sprawie szczegółowych zasad powoływania i finansowania oraz trybu działania komisji bioetycznych (Dz. U. Nr 47, poz. 480); Ustawy z dnia 6 września 2001r. Prawo farmaceutyczne (t.j. Dz. U. z 2016, poz. 2142 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. 2004 nr 101, poz. 1034 z późn. zm.); Rozporządzenia Ministra Finansów z dnia 18 maja 2005r. zmieniające rozporządzenie w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej badacza i sponsora (Dz. U. Nr 101, poz. 845); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 30 kwietnia 2004r. w sprawie zgłaszania niespodziewanego ciężkiego niepożądanego działania produktu leczniczego (Dz. U. Nr 104, poz. 1108); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 17 lutego 2016 r. w sprawie wzorów wniosków związanych z badaniem klinicznym wyrobu medycznego lub aktywnego wyrobu medycznego do implantacji oraz wysokości opłat za złożenie tych wniosków (Dz. U. z 2016 r., poz. 208); Ustawy z dnia 20 maja 2010 r. o wyrobach medycznych (t.j. Dz. U. z 2017r. poz. 211, z późn. zm.); Rozporządzenie Ministra Finansów z dnia 6 października 2010 r. w sprawie obowiązkowego ubezpieczenia odpowiedzialności cywilnej sponsora i badacza klinicznego w związku z prowadzeniem badania klinicznego wyrobów (Dz. U. 2010, Nr 194 poz. 1290); Ustawy z dnia 18 marca 2011 r. o Urzędzie Rejestracji Produktów Leczniczych, Wyrobów Medycznych i Produktów Biobójczych (t.j. Dz. U. z 2016 r., poz. 1718); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie Dobrej Praktyki Klinicznej (Dz. U. 2012, poz. 489); Rozporządzenia Ministra Zdrowia z dnia 2 maja 2012r. w sprawie wzorów dokumentów przedkładanych w związku z badaniem klinicznym produktu leczniczego oraz w sprawie wysokości i sposobu uiszczania opłat za złożenie wniosku o rozpoczęcie badania klinicznego (Dz. U. 2012, Nr 0 poz. 491); w oparciu o Deklarację Helsińską - Zasady Etycznego Postępowania w Eksperymentach Medycznych z Udziałem Ludzi oraz przepisy ICH GCP.

Komisja Bioetyczna, na posiedzeniu w dniu 07 grudnia 2017 r.

rozpatrzyła wniosek dotyczący prowadzenia badań naukowych.

Kierownicy projektu:

prof. zw. dr hab. n.med. Maciej Głowacki
dr hab. Mirosław Szybowicz prof. nadzw. PP

Miejsce prowadzenia badań:

**Oddział Ortopedii i Traumatologii Narządu Ruchu,
Szpital w Puszczykowie im. prof. S.T. Dąbrowskiego S.A.**

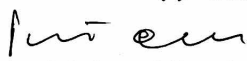
Główny badacz: lek. med. Paweł Kasprzak

Temat badań:

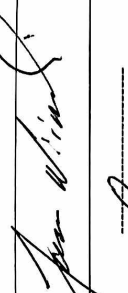
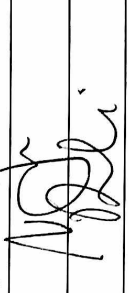
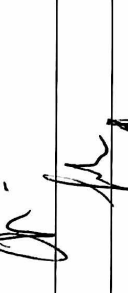
„Analiza zmian mikrostrukturalnych kości metodą spektroskopii Ramana u kobiet z deformacją szpotawą stawu kolanowego w przebiegu pierwotnej choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych”.

Komisja wydała uchwałę o pozytywnym zaopiniowaniu tego wniosku

Przewodniczący Komisji


prof. zw. dr hab. med. Paweł Chęciński

Podpisy członków Komisji Bioetycznej podejmujących Uchwałę nr 1199/17 z dnia 07.12.2017r.

Lp.	Imię i Nazwisko	Specjalność	Miejsce Pracy	Podpis
1.	Przewodniczący Komisji prof. dr hab. Paweł Chęciński	chirurgia ogólna, naczyniowa i angiologia	Klinika Chirurgii Ogólnej i Naczyniowej oraz Angiologii UMP, ZOZ MSWiA, ul. Dojazd 34, 60-631 Poznań.	
2.	Z-ca Przewodniczącego Komisji prof. dr hab. Janusz Wiśniewski	filozof	Wydział Nauk Politycznych i Dziennikarstwa UAM, ul. Umultowska 89A, 61-614 Poznań.	
3.	prof. dr hab. Zygmunt Adamski	dermatologia i wenerologia	Katedra i Klinika Dermatologii UMP, ul. Przybyszewskiego 49, 60-355 Poznań	
4.	dr Krystyna Babiak	prawnik	Kancelaria Rady Prawnego, dr Krystyna Babiak, ul. Czaratoria 1/2, 61-102 Poznań.	
5.	prof. dr hab. Maciej Krawczyński	genetyka kliniczna, okulistyka	Katedra i Zakład Genetyki Medycznej UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
6.	mgr Jolanta Łojko-Kołodziejczak	pielęgniarka	Pielęgniarka Oddziałowa Izby Przyjęć Pediatрії Szpitala Klinicznego im. Karola Jonschera UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
7.	mgr Krystyna Malinger	farmaceuta	Apteka Ginekologiczno-Położniczego Szpitala Klinicznego UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
8.	prof. dr hab. Andrzej Marszałek	patomorfologia	Katedra i Zakład Patologii i Profilaktyki Nowotworów UMP, ul. Garbary 15, 61-866 Poznań.	
9.	prof. dr hab. Maciej Owecki	choroby wewnętrzne, endokrynologia	Zakład Zdrowia Publicznego UMP, ul. Dąbrowskiego 79, 60-529 Poznań.	
10.	prof. dr hab. Wojciech Szulc	pediatria, neurologia dziecięca, choroby zakaźne	Klinika Chorób Zakaźnych i Neurologii Dziecięcej UMP, ul. Szpitalna 27/33, 60-572 Poznań.	
11.	prof. dr hab. Robert Spaczyński	ginekologia i położnictwo	Klinika Niepłodności i Endokrynologii Rozrodo UMP, ul. Polna 33, 60-535 Poznań.	
12.	dr med. Piotr Tomczak	onkologia kliniczna, radioterapia	Klinika Onkologii UMP, ul. Szamarzewskiego 82/84, 60-569 Poznań.	
13.	prof. dr hab. Joanna Twarowska-Hauser	psychiatria	Klinika Psychiatrii Dorosłych, Zakład Genetyki w Psychiatrii UMP, ul. Rokietnicka 8, 60-806 Poznań.	
14.	ks. prof. dr hab. Jerzy Troska	teologia, etyka	Wydział Teologiczny UAM, ul. Wieżowa 2/4, 61-111 Poznań.	
15.	prof. dr hab. Henryk Wysocki	choroby wewnętrzne, kardiologia	Wyższa Szkoła Pedagogiki i Administracji im. Mieszka I w Poznaniu, ul. Bułgarska 55, 60-320 Poznań.	