



Uniwersytet Jagielloński

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

ROZPRAWA DOKTORSKA

**FIZYKOCHEMICZNA CHARAKTERYSTYKA MINERALIZACJI
STRUKTUR KOLAGENOWYCH**

mgr Sylwia Orzechowska

Promotor: Prof. dr hab. Eugeniusz Rokita

KRAKÓW 2018

Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Oświadczenie

Ja niżej podpisana *Sylwia Orzechowska* (nr indeksu: *1004862*) doktorantka Wydziału Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej Uniwersytetu Jagiellońskiego oświadczam, że przedłożona przeze mnie rozprawa doktorska pt. „*Fizykochemiczna charakterystyka mineralizacji struktur kolagenowych*” jest oryginalna i przedstawia wyniki badań wykonanych przeze mnie osobiście, pod kierunkiem *Prof. dr hab. Eugeniusza Rokity*. Pracę napisałem samodzielnie.

Oświadczam, że moja rozprawa doktorska została opracowana zgodnie z Ustawą o prawie autorskim i prawach pokrewnych z dnia 4 lutego 1994 r. (Dziennik Ustaw 1994 nr 24 poz. 83 wraz z późniejszymi zmianami).

Jestem świadoma, że niezgodność niniejszego oświadczenia z prawdą ujawniona w dowolnym czasie, niezależnie od skutków prawnych wynikających z ww. ustawy, może spowodować unieważnienie stopnia nabytego na podstawie tej rozprawy.

Kraków, dnia

.....

podpis doktorantki/doktoranta

Podziękowania

Pragnę serdecznie podziękować mojemu Promotorowi, Panu Prof. dr hab. Eugeniuszowi Rokicie za opiekę naukową, nieocenioną pomoc merytoryczną, cenne wskazówki, a także za poświęcony czas, wyrozumiałość i cierpliwość.

Wyrazy wdzięczności składam dr Andrzejowi Wróblowi za bezcenną pomoc w pracy eksperymentalnej, liczne dyskusje naukowe oraz nieustanną życzliwość na każdym etapie powstawania niniejszej pracy.

Dziękuję wszystkim Pracownikom, Koleżankom i Kolegom z Zakładu Fizyki Medycznej za wsparcie, konsultacje naukowe oraz wspaniałą atmosferę.

Słowa podziękowania kieruję również do Pracowników Zakładu Biofizyki CM UJ za wskazówki i interesujące dyskusje.

Moim Rodzicom i Bliskim dziękuję za cierpliwość i nieustrudzone wsparcie.

Spis treści

1. Wstęp	4
1.1. Proces fizjologicznej i patologicznej mineralizacji	4
1.2. Fizykochemiczne modele mineralizacji tkanek miękkich	11
1.3. Mineralizacja struktur kolagenowych	17
1.4. Stenoza zastawki aortalnej i kanału kręgowego	19
1.5. Cel pracy	23
2. Materiały i Metody	24
2.1. Preparatyka próbek	24
2.2. Techniki pomiarowe	26
2.2.1. Mikrotomografia komputerowa	26
2.2.1.1. Rekonstrukcja obrazów mikrotomograficznych	27
2.2.1.2. Analiza obrazów mikrotomograficznych	30
2.2.1.3. Korekcja <i>efektu częściowego wypełnienia voxela</i>	30
2.2.2. Spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej	35
2.2.3. Spektroskopia w podczerwieni	36
2.2.4. Dyfrakcja rentgenowska	38
2.3. Analiza statystyczna	39
3. Wyniki pomiarów	40
3.1. Kość beleczkowa	40
3.2. Płatki zastawek aortalnych	45
3.3. Węzadła żółte	50
4. Dyskusja wyników	56
4.1. Zestawienie wyników z danymi literaturowymi oraz porównanie fizjologicznej i patologicznej mineralizacji	56
4.2. Analiza wyników	59
5. Model mineralizacji struktur kolagenowych	67
6. Podsumowanie	77
Dodatek- Program BmpBinarizer	79
7. Bibliografia	83
8. Streszczenie	93
9. Wykaz skrótów	97

1. Wstęp

1.1. Proces fizjologicznej i patologicznej mineralizacji

Mineralizacja w organizmie człowieka może być procesem fizjologicznym, na przykład mineralizacja kości, zębów i chrząstek lub może występować, jako zjawisko patologiczne. Dojrzała tkanka kostna zbudowana jest z blaszek kostnych, które łącząc się ze sobą tworzą dwójakiego rodzaju struktury: kość gąbczastą i kość zbitą. Blaszkki kostne istoty gąbczastej łączą się ze sobą tworząc grubsze struktury, beleczki kostne, których ułożenie uwarunkowane jest działaniem sił mechanicznych. Przestrzenie pomiędzy beleczkami wypełnia szpik kostny. Wewnątrz beleczek, w jamkach kostnych, znajdują się osteocyty, które kontaktują się z innymi komórkami za pomocą wypustek cytoplazmatycznych biegnących w kanalikach kostnych.

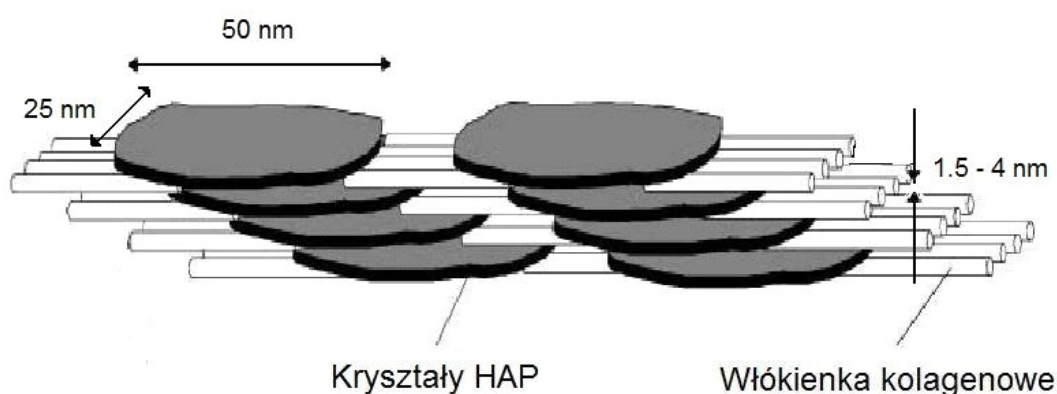
Kość zbita to struktura cylindryczna zbudowana z blaszek kostnych, które wypełniają całą objętość tkanki kostnej. Podstawowym elementem strukturalnym kości zbitej jest osteon, czyli system Haversa. System ten tworzy 4 - 20 blaszek kostnych o grubości 3 - 7 μm . W środku osteonu znajduje się kanał o średnicy $\sim 50 \mu\text{m}$, tzw. kanał Haversa, zawierający naczynia krwionośne i nerw [1, 2].

Mineralizacja kości to formowanie hydroksyapatytu na podłożu biologicznym, jakim są włókna kolagenowe. Włókna kolagenowe, występujące w kościach, mają szczególną budowę. Przejawia się ona występowaniem specyficznych przerw strukturalnych. Obszary te obdarzone są ładunkiem elektrycznym, dzięki czemu są zdolne do przyciągania naładowanych jonów, a zatem mogą być miejscami nukleacji apatyty kostnego. Mineralizacja kostna trwa około 4 - 6 miesięcy.

Włókna kolagenowe są syntetyzowane przez osteoblasty. Sam kolagen nie jest promotorem krystalizacji, a proces ten jest wspomagany przez pęcherzyki macierzy uwalniane z błony komórkowej osteoblastów. Bogate w białka, fosfolipidy, wapń i nieorganiczne fosforany, zapewniają odpowiednie stężenie Ca i P do wytrącenia kryształu. Płyny zewnątrzkomórkowe nie są naturalnie przesycone solami wapnia, co sugeruje, że hydroksyapatyt nie wytrąca się spontanicznie [3]. Nie jest wiadome, w jaki sposób pęcherzyki są przenoszone do określonych miejsc włókien kolagenowych. Nie ma jednoznacznych dowodów również na to, że wytrącanie hydroksyapatytu w procesie osteogenezy jest poprzedzone tworzeniem innych form fosforanów

wapnia [3]. Osteoblasty, otoczone matrycą organiczną, różnicują się do osteocytów, czyli dojrzałych komórek kostnych, które poprzez wypustki cytoplazmatyczne kontaktują się z innymi osteocytami oraz prowadzą wymianę substancji odżywczych i metabolitów. Regulują one także wymianę jonów z płynami zewnątrzkomórkowymi, a ponadto zachowują zdolność do ponownego różnicowania się do osteoblastów pod wpływem parathormonu lub na skutek obciążeń mechanicznych wywieranych na kość [3]. Kolejne warstwy tkanki kostnej tworzą się z udziałem osteoblastów, pozostających na powierzchni tworzonej kości.

W czasie mineralizacji kości, włókna kolagenowe oraz przerwy strukturalne agregują ze sobą wzdłuż osi długiej. Efektem takiej agregacji włókien jest tworzenie, w poprzek pęczków włókien, obszarów naładowanych ładunkiem elektrycznym, w których formują się kryształy hydroksyapatytu. Sposób agregacji włókienek kolagenowych implikuje płytkowy kształt kryształów (Rys. 1.1) [4]. Długość, szerokość i grubość płytek, zaprezentowanych na rysunku 1.1, opisano na podstawie pracy [5]. Wiadomym jest, że po rozpoczęciu nukleacji w przerwach miofibryli wzrost kryształu początkowo odbywa się wewnątrz przerwy, a następnie obejmuje obszar na zewnątrz przerwy [6].



Rys. 1.1. Pęczki włókien kolagenowych z kryształami hydroksyapatytu w kształcie płytek.

Mineralizacja kolagenu odbywa się przy udziale takich białek, jak osteokalcyna, osteonektyna, osteopontyna, trombospondyna i fosfataza alkaliczna. Fosfataza alkaliczna jest nośnikiem jonów, niezbędnych do mineralizacji kolagenu. Rola wielu z niekolagenowych białek nie została do tej pory wyjaśniona, zazwyczaj przypisuje się im wiele funkcji, w tym kontrolę aktywności komórek kostnych oraz liczby i wielkości kryształitów hydroksyapatytowych [3]. W całym okresie życia człowieka kość podlega procesowi

przebudowy, polegającym na wymianie starej tkanki kostnej na nową. Proces ten zapobiega gromadzeniu mikrouszkodzeń kości oraz pomaga dostosować kość do obciążeń mechanicznych. Jest on kluczowy w zapewnieniu homeostazy mineralnej. Balans pomiędzy kościotworzeniem a resorpcją kości jest warunkowany aktywnością osteoblastów i osteoklastów. Osteoklasty są wyposażone w wysoce aktywne kanały błonowe, służące do przenoszenia protonów do przestrzeni zewnątrzkomórkowej, czego następstwem jest obniżenie pH sprzyjające rozpuszczaniu hydroksyapatytu [5].

Faza mineralna kości stanowi 50 - 70% objętości kości, natomiast matryca organiczna zawierająca głównie kolagen typu I około 20 - 40%. Pozostałe 5 - 10% objętości kości stanowią woda i lipidy [5]. Woda pomaga ustabilizować kolagen poprzez tworzenie wiązań wodorowych z resztami hydrofilowymi [7]. Chemiczny wzór hydroksyapatytu kostnego jest następujący: $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)_6(\text{OH})_2$. Według literatury, około 8% jonów PO_4^{3-} może być zastąpiona w strukturze przez jony CO_3^{2-} , mówimy wtedy o hydroksyapatycie typu B. W przypadku, gdy aniony CO_3^{2-} zastępują grupy OH, hydroksyapatyt posiada strukturę typu A [8]. Kationy wapnia mogą być w apatycie wymieniane na Mg (ok. 0.7% mas.), Na (ok. 0.9% mas.), K (0.03% mas.) oraz pierwiastki śladowe, jak Sr, Pb, Zn, Cu, Fe. Obecność pierwiastków śladowych ma wpływ na aktywność enzymów odpowiedzialnych za funkcjonowanie komórek kostnych. Wbudowanie innych pierwiastków zależy od warunków środowiska wzrostu hydroksyapatytu [8]. Wbudowanie jonów Mg^{2+} , Sr^{2+} oraz CO_3^{2-} wpływa na obniżenie rozmiarów krystalitów i podwyższenie rozpuszczalności, natomiast zastąpienie grup OH⁻ jonami F⁻ powoduje obniżenie rozpuszczalności [8]. Liczne badania dyfrakcyjne wykazały, że struktura i skład chemiczny minerału kostnego nie są stałe i ulegają zmianom wraz z wiekiem lub pod wpływem obciążeń [4]. W związku z tym struktura kości może różnić się w zależności od lokalizacji anatomicznej. Hydroksyapatyt nie jest jedyną fazą krystaliczną, jaką rozpoznano w kościach. Stwierdzono także obecność bruszytu ($\text{CaHPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), fosforanu trójwapniowego ($\text{Ca}_3(\text{PO}_4)_2$) i ośmiowapniowego ($\text{Ca}_8\text{H}_2(\text{PO}_4)_6 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$) [9].

Oprócz kości, strukturami ulegającymi mineralizacji fizjologicznej są chrząstki i zęby. Tkanka chrzęstna zbudowana jest z chondrocytów (~1% objętości chrząstki) i z macierzy pozakomórkowej. Skład i budowa macierzy chrzęstnej decyduje o właściwościach mechanicznych i biologicznych tej tkanki. Macierz chrząstki składa się z wody (60 – 80% masy), kolagenu i innych białek oraz proteoglikanów (siarczan chondroityny, siarczan keratanu, agrekan). W porównaniu z kośćmi substancja międzykomórkowa chrząstki nie zawiera naczyń krwionośnych, limfatycznych i nerwów. Z tego powodu odżywianie chrząstki odbywa się na drodze dyfuzji z naczyń tkanki łącznej włóknistej (ochrzęstnej) lub płynu

stawowego. Grubość chrząstki jest różna w zależności od miejsca występowania i wynosi 0.5 - 2 mm [10-11]. Wapniejąca chrząstka może dać początek przyszłej kości (mineralizacja śródchrzęstna, kostnienie ochrzęstne). Kościotworzenie na podłożu chrzęstnym rozpoczyna się w trzonie zawiązka chrzęstnego kości, pod ochrzęstną. Macierzyste komórki mezenchymatyczne ochrzęstnej przekształcają się w osteoblasty, które wytwarzają pierwsze beleczki kostne układające się na kształt mankietu, otaczającego środkową część trzonu zawiązka chrzęstnego kości. W ten sposób powstaje mankiet kostny. Komórki chrząstki w tym obszarze ulegają hipertrofii i degeneracji, a jamki chrzęstne powiększeniu. Pomiędzy jamkami odkładają się sole wapnia, przy udziale białka istoty podstawowej chrząstki, chondrokalcyny. Przez mankiet kostny wnikają włosowate naczynia krwionośne i komórki macierzyste, tworzące pęczek naczyniowo - komórkowy. Jednocześnie za pomocą naczyń krwionośnych do tego obszaru przedostają się makrofagi, które niszczą chrząstkę, tworząc tym samym przestrzeń dla nowo powstałych beleczek kostnych. Natomiast komórki macierzyste różnicują się do osteoblastów, dających początek kości. W wyniku kostnienia śródchrzęstnego powstaje tzw. pierwotny punkt kostnienia. Kostnienie w obrębie mankietu kostnego i wewnątrz trzonu zawiązka chrzęstnego kości szybko postępuje i obejmuje cały trzon kości. Dzięki mineralizacji chrząstki dochodzi do wzrostu na długość i szerokość trzonów i nasad kości długich [1, 12-13].

Przykładem struktur fizjologicznie zmineralizowanych są również tkanki twarde zęba (zębina, szkliwo i cement). Zębinę tworzą składniki organiczne (28% masy), głównie kolagen typu I w postaci cienkich włókien, o grubości do 4 μm przebiegających zgodnie z długą osią zęba, oraz białka niekolagenowe. 72% masy zębiny stanowią składniki nieorganiczne, głównie kryształy hydroksyapatytu o szerokości, grubości i długości wynoszącej odpowiednio 35 x 10 x 100 nm^3 [14]. Mineralizacja zębiny dokonuje się wieloogniskowo, co oznacza, że kryształy grupują się w kuliste agregaty (kalkosferyty). W miejscach, gdzie kalkosferyty nie agregują ściśle ze sobą, pozostają rejony niezmineralizowane istoty organicznej, które są odpowiedzialne za nierównomierną mineralizację kolejnych warstw zębiny w czasie jej wzrostu. Szkliwo jest najbardziej zmineralizowanym elementem budulcowym zęba. Zawiera ono 95 – 98% składników nieorganicznych. W przeciwieństwie do kości i zębiny nie ma zdolności do przebudowy. Zbudowane jest z pryzmatów, czyli wydłużonych strukturalnych podjednostek szkliwa o szerokości $\sim 5 \mu\text{m}$ oraz z istoty międzypryzmatycznej. Głównym materiałem budulcowym pryzmatów są kryształy hydroksyapatytu, w postaci śrubowo skręconych płytek o szerokości 60 nm i grubości 30 nm. Kryształy zawierają ponadto reszty węglanowe podstawiające grupy fosforanowe, magnez w miejscu wapnia oraz fluor w pozycji grup hydroksylowych. Zastąpienie w strukturze hydroksyapatytu reszty hydroksylowej jonem

fluorowym zwiększa twardość kryształów. Składniki organiczne szkliwa występują w ilości śladowej i są to specyficzne białka takie, jak amelogeniny, enameliny, ameloblastyny i tufteliny [14]. Mineralizacja szkliwa polega na formowaniu się drobnych kryształów, a następnie na ich wzroście. Wapnienie odbywa się na obwodzie każdego pryzmatu i postępuje ku środkowi pryzmatu. Rolą amelogenin i enamelin jest kontrolowanie procesu wapnienia szkliwa, w tym długości, budowy i orientacji przestrzennej kryształów [15]. Cement jest strukturą, która składem znacznie bardziej przypomina tkankę kostną. Zbudowany jest w 65% z fazy nieorganicznej, która w obrazie mikroskopowym ma postać nieregularnych blaszek. Fazę organiczną stanowią włókna kolagenowe. Pomiędzy blaszkami cementu znajdują się jamki zawierające cementocyty, przypominające osteocyty. Powierzchnia cementu jest niezmineralizowana i pokryta przez cementoblasty, a także odontoklasty, odpowiedniki osteoklastów [14].

Patologiczna mineralizacja tkanek znana także, jako kalcyfikacja ektopowa, polega na odkładaniu się fosforanów wapnia w tkankach miękkich, w których w warunkach normalnych one nie występują, jak również w postaci złogów mineralnych w nerkach (tzw. kamienie nerkowe) i w pęcherzyku żółciowym. Przez wiele lat uważano ją za bierny proces degeneracyjny tkanek. Obecnie, wykorzystanie zaawansowanych technik pomiarowych pozwala na bardziej szczegółową analizę obszarów objętych mineralizacją. Prace ostatnich lat coraz częściej wskazują na podobieństwa patologicznej mineralizacji z aktywnie sterowanymi procesami zachodzącymi w kościach. Zasadniczo mówi się o dwóch rodzajach mineralizacji patologicznej. Pierwszy z nich i najczęściej spotykany - mineralizacja dystroficzna, występuje przy zachowaniu prawidłowego stężenia wapnia i fosforu w tkankach i dotyczy zazwyczaj tkanek nekrotycznych, nowotworów, blaszek miażdżycowych, kalcyfikacji naczyń. Drugi typ to mineralizacja metastatyczna. Pojawia się wówczas, gdy poziom wapnia i fosforu jest podwyższony, obejmuje zdrowe tkanki i towarzyszy stanom chorobowym takim, jak nadczynność tarczycy, zespół mleczno-alkaliczny itp. [16].

Mechanizmy regulujące proces patologicznej mineralizacji nie są jednoznacznie potwierdzone, jednak znanych jest kilka czynników metabolicznych i środowiskowych przyczyniających się do zainicjowania tego procesu. Wśród nich podaje się choroby o określonym fenotypie, związane z wystąpieniem konkretnego genu. Za przykład może posłużyć dziecięca mineralizacja tętnic, związana z obecnością genu ENPP1, FAM20A lub genu ABCC6, objawiająca się zwapnieniem płuc i oczu [17]. Na podstawie badań genetycznych ustalono, że za kostnienie więzadeł żółtych odpowiedzialne są geny: COL6A2, COL6A1 i COL11A1, znajdujące się na chromosomie 21 [18]. Zaburzona ekspresja genów

COL wpływa na produkcję nieprawidłowego kolagenu typu IV. Ponadto stwierdzono wpływ polimorfizmu receptora dla witaminy D (VDR), a konkretnie dominującego allelu genu dla VDR, który występuje częściej u osób chorujących na zwapnienie więzadeł kręgosłupa [19]. Dodatkowo stwierdzono, że zaburzenia metaboliczne, jak na przykład hiperglikemia, otyłość i fluoroza, powodują różnicowanie się komórek osteoblasto-podobnych, a także wzrost stężenia fosfatazy alkalicznej i osteokalcyny. Podobnie u osób cierpiących na chroniczną niewydolność nerek rozpoznano szybko postępującą kalcyfikację tkanek miękkich [16]. Udowodniono ponadto znacząco wyższy poziom leptyny i ekspresji mRNA dla receptora leptyny (charakterystyczne dla pacjentów z otyłością) w komórkach zmineralizowanych więzadeł żółtych [20]. Otyłość często predysponuje do cukrzycy typu II, która manifestuje się zwiększonym stężeniem insuliny we krwi. Wykazano wpływ insuliny na wzrost wewnątrzkomórkowej absorpcji wapnia i osteogenezę [21].

Podobieństwo patologicznej mineralizacji z fizjologicznym procesem wapnienia kości zauważono na podstawie analizy zwapniałych płatków zastawek aortalnych, w których zidentyfikowano blaszki kostne z elementami hematopoetycznymi, podobnymi jak w szpiku kostnym [22]. Wzrost kości nie jest procesem biernym, a w jego przebieg zaangażowanych jest wiele czynników. Podobnie kalcyfikacje zastawek zawierają czynniki typowe dla wzrostu kości, jak na przykład zewnątrzkomórkowe białko macierzy kostnej (BMP), osteopontyny, osteonektyny. Oszacowano, że elementy kostne z osteoblastami i osteoklastami wystąpiły w 13% zastawek aortalnych, jako efekt aktywnego procesu nieprawidłowej naprawy tkanek [22]. Sekwencja zdarzeń, które prowadzą do wytworzenia struktur kostnych w tkankach miękkich obejmuje także tworzenie się naczyń krwionośnych (neowaskularyzacja) i degradację macierzy zewnątrzkomórkowej (obecność naczyniowego czynnika wzrostu śródbłonna oraz czynnika wzrostu fibroblastów) [23].

Dane literaturowe wskazują na bezsporny udział hormonów w patogenezie kalcyfikacji. Wzrost stężenia parathormonu w przewlekłej chorobie nerek jest istotnym czynnikiem ryzyka w odkładaniu się złogów mineralnych w naczyniach krwionośnych poprzez hamowanie produkcji osteoprotegryny (czynnika zapobiegającego kościotworzeniu) [24]. Parathormon reguluje poziom stężenia wapnia we krwi poprzez stymulację osteoklastów. Wzrost poziomu parathormonu sprzyja resorpcji wapnia z kości i wzrostowi jego stężenia w surowicy krwi, natomiast jego niedobór powoduje spadek stężenia wapnia w surowicy. Z tego powodu jest on uważany za jedną z przyczyn mineralizacji więzadeł kręgosłupa [25]. Hormony kalciotropowe, regulujące metabolizm witaminy D3, mają pośredni wpływ na produkcję metaloproteaz - kluczowych enzymów w przebudowie naczyń. Nadmierna podaż witaminy D3

i nadprodukcja metaloproteaz przyczynia się do degradacji elastyny, co w efekcie prowadzi do kalcyfikacji naczyń krwionośnych, czego skutkiem jest usztywnienie ich ścian [26].

Często przyczynę wapnienia tkanek upatruje się w lokalnym stanie zapalnym tkanki. Przejawem dysfunkcji śródbłonna naczyń jest zmniejszona dostępność tlenu i azotu i prostacykliny. Uważa się, że cząsteczki te modulują stan zapalny naczyń. Podobnie mineralizacja zastawek aortalnych może być związana ze stanem zapalnym i rozwijać się w połączeniu z dysfunkcją śródbłonna. Badania potwierdzały obecność limfocytów T i makrofagów w zwapnieniach płatków zastawek, nawet na wczesnym etapie choroby, a obecność cytokin prozapalnych wskazywała na rozpoczęcie procesu „uszkodzenie - naprawa” i rozwój choroby [23].

Dużą rolę w procesie kostnienia tkanek przypisuje się stresowi mechanicznemu (kumulacji mikrourazów). Sugeruje się, że pod wpływem ruchów rotacyjnych (obrotowych względem osi kręgosłupa) i naprężenia podłużnego, prowadzącego do rozciągania, może dochodzić do proliferacji tkanki chrzęstnej przekształcającej się w tkankę kostną w więzadłach kręgosłupa [27-28]. Analiza przeprowadzona na pacjentach, narażonych na naprężenia podłużne i ruchy rotacyjne wokół osi kręgosłupa, wykazała wzrost poziomu cytokin związanych z procesem kościotworzenia (BMP, TGF- β , ALP) [29]. Znana jest także hipoteza dotycząca wpływu patologicznych krzywizn kręgosłupa, zwłaszcza kifozy piersiowej, na rozwój mineralizacji w więzadłach żółtych. Nieprawidłowa krzywizna kręgosłupa prowadzi do zmian w rozkładzie obciążeń, szczególnie w dolnych odcinkach kręgosłupa piersiowego, a zatem w miejscu gdzie najczęściej występują kalcyfikacje więzadeł [30].

Wpływ lipidów na proces mineralizacji tkanek był postulowany przez wiele dekad. Wyniki wskazują, że lipidy mogą stymulować mineralizację. Dużą rolę przypisuje się cholesterolowi, ponieważ stwierdzono obecność produktów jego utleniania takich, jak 25-hydroksycholesterol, zarówno w płatkach zastawek jak i tętnicach wieńcowych [16].

Kilka lat temu pojawiły się także prace na temat związku mineralizacji tkanek, zwłaszcza zastawek serca, z nanobakteriami. Nanobakteriami nazwano struktury bakterio-podobne o wielkości 0.1 - 0.5 μm , wyselekcjonowane z obszarów zastawek aortalnych objętych mineralizacją i ułatwiające odkładanie się i wzrost kryształów fosforanu wapnia [31-32].

Jednym z procesów, sprzyjających kalcyfikacji tkanek miękkich, jest proces osteoporozy kości. Zjawisko to polega na długotrwałej przewadze procesów resorpcji kości nad procesami kościotworzenia. W celu utrzymania stałej masy kostnej, dynamika kościotworzenia powinna równoważyć ilość zresorbowanej tkanki kostnej [33]. Na skutek przewagi resorpcji kości nad procesem kościotworzenia, wapń z apatytu kostnego jest odprowadzany do krwi, co w

konsekwencji prowadzi do gromadzenia złogów wapniowych przede wszystkim w naczyniach krwionośnych [16, 33].

Istnieje wiele teorii dotyczących powstawania depozytów mineralnych w tkankach miękkich, podobnie jak wiele czynników i chorób jest kojarzonych z mineralizacją. Żadna z opublikowanych dotąd prac nie podaje jednoznacznie rozwiązania mechanizmu patologicznej mineralizacji, a jego złożoność nakłania do kolejnych badań.

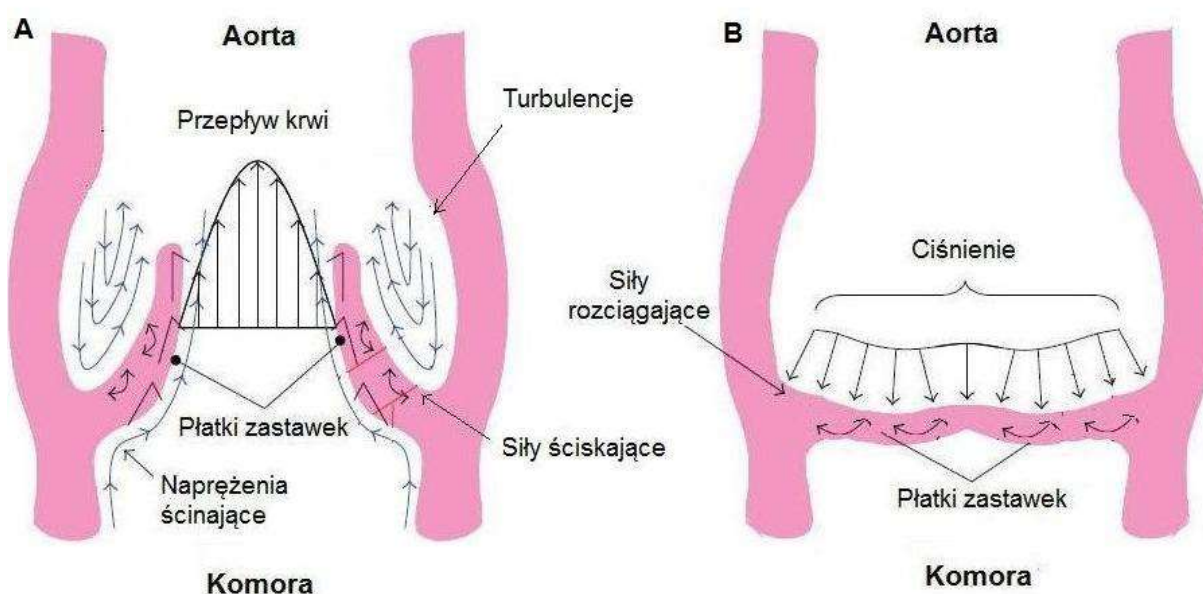
1.2. Fizykochemiczne modele mineralizacji tkanki miękkiej

Mechanizm tworzenia depozytów mineralnych w tkankach jest opisywany w literaturze za pomocą kilku modeli [34-37]. Jedną z koncepcji jest udział pęcherzyków macierzy pozakomórkowej, którym przypisuje się kluczową rolę w patologicznej mineralizacji, jak również w mineralizacji kości i chrząstek. Ponadto postulowane są teorie z udziałem czynników genetycznych, proapoptycznych i oksydacyjnych [38-40]. Poniżej przedstawiono najczęściej cytowane w literaturze modele mineralizacji tkanek miękkich. W pierwszym modelu opisano rolę biomechanicznych czynników wapnienia tkanki miękkiej na przykładzie zastawki aortalnej, które potencjalnie mogą zapoczątkować proces mineralizacji. Następnie przedstawiono model mineralizacji z udziałem czynników biochemicznych i reakcji zapalnej w tkance. Omówione modele mają szczególne znaczenie w przypadku stenotycznych zastawek aortalnych, które ulegają przerostowi wywołującemu zmiany hemodynamiczne i przeciążenie ciśnieniowe. Mineralizacja będąca następstwem reakcji zapalnej tkanki, może także uzasadniać odkładanie się depozytów w więzadłach kręgosłupa na skutek obciążeń lub urazów mechanicznych.

W biomechanicznym modelu mineralizacji rozważono rolę ciśnienia wywieranego na płatki zastawki aortalnej, które różni się podczas skurczu i rozkurczu komory serca. W warunkach normalnych zamknięte płatki zastawki utrzymują ciśnienie 80 - 120 mmHg. Naprężenie jest utrzymywane dzięki warstwie włóknistej płatków. W czasie skurczu krew przepływa przez otwartą zastawkę aortalną z prędkością 1.35 ± 0.35 m/s. W przypadku stenozы aortalnej wzrasta gradient ciśnienia między aortą a lewą komorą serca, co skutkuje wzrostem szybkości przepływu krwi przez zastawkę do około 4 m/s [41].

Podczas skurczu i rozkurczu lewej komory serca, płatki zastawek pozostają pod wpływem działania kilku sił. W czasie skurczu komory serca, na płatki zastawki działają następujące siły:

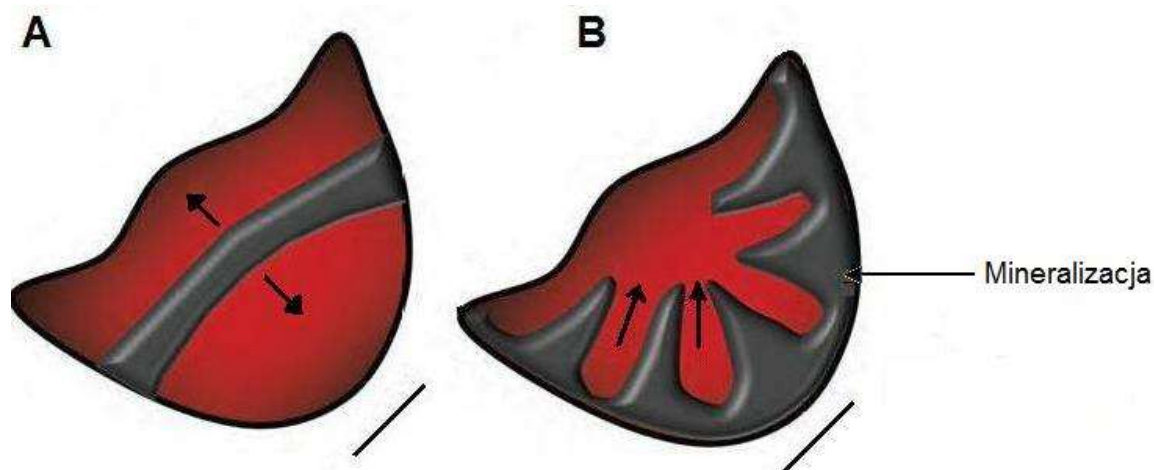
od strony komory serca, płatki są pod wpływem sił ścinających, a od strony aorty poddawane są ściskaniu. W czasie rozkurczu komory serca na płatek wywierane jest ciśnienie skierowane prostopadłe do powierzchni płatka. Ciśnienie powoduje odkształcenie płatków, które od strony komory ulegają rozciąganiu, dzięki czemu możliwe jest utrzymanie zamknięcia zastawki (Rys. 1.2) [42].



Rys. 1.2. Schematyczny rozkład sił działających na zastawkę aortalną podczas skurczu (A) i rozkurczu (B) komory serca.

Lokalizacja zwapnień może zostać skojarzona z określonymi siłami, działającymi na płatki zastawek podczas przepływu krwi. W modelu przedstawionym w pracy [41] wykazano, że kalcyfikacje zlokalizowane są najczęściej w dwóch obszarach: 1) w części centralnej płatka oraz 2) na brzegach w miejscach przyczepu płatka do pierścienia włóknistego i rozchodzą się promieniście w kierunku centralnym płatka (Rys. 1.3). Miejsca, w których płatek jest połączony z pierścieniem włóknistym, są pod wpływem ciągłego ruchu i mogą być szczególnie narażone na mineralizację. Występowanie mineralizacji we wspomnianych miejscach jest prawdopodobnie związane z uszkodzeniem włókien matrycy kolagenowej na skutek działania sił podczas skurczu i rozkurczu komory serca. Wolne wiązania chemiczne, występujące w miejscach uszkodzeń matrycy, są zdolne do przyłączania jonów i stanowią potencjalne centra krystalizacji. Wskutek pogrubienia płatka (jak w przypadku stenozы) i zmniejszenia pola powierzchni przepływu przez zastawkę, wzrasta gradient ciśnienia krwi pomiędzy aortą a lewą

komorą serca. W takiej sytuacji wartość siły, powodującej rozciąganie płotka podczas rozkurczu komory serca, może być niewystarczająca do utrzymania odpowiedniego zamknięcia płatków.



Rys. 1.3. Model wzrostu kalcyfikacji płatków zastawki aortalnej w centralnej części płotka (A) i brzegowo od miejsca przyczepu w kierunku centralnym (B). Czarną linią zaznaczono miejsce przyczepu płotka do pierścienia włóknistego.

Gwałtowny spadek elastyczności płatków następuje w wieku dojrzewania między 15 a 25 rokiem życia, a następnie przebiega stopniowo o około 1 - 4% na rok [42]. Głównym powodem tego zjawiska jest wzrost średnicy włókien kolagenowych. Wzrost liczby grubych włókien kolagenowych wymaga generowania coraz większej siły, aby uzyskać takie same otwarcie jak dla płatków o niezmięionej strukturze.

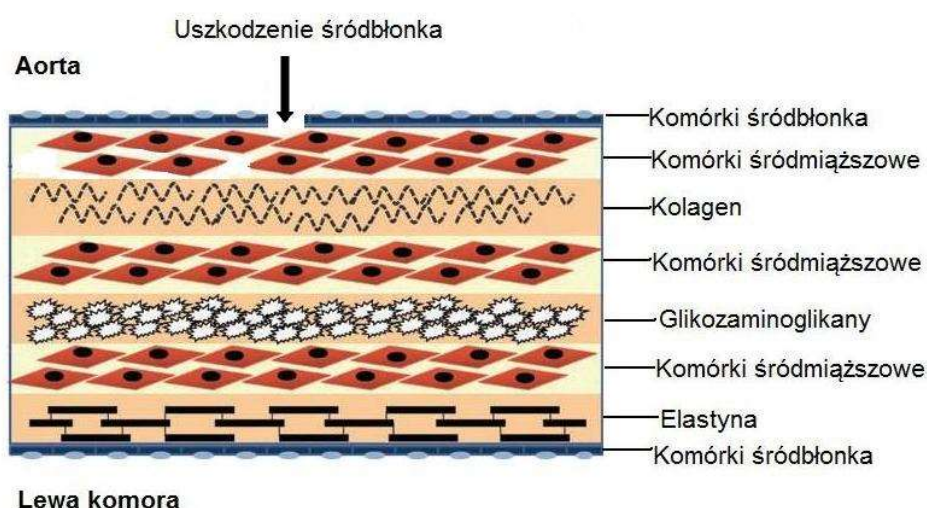
Drugi model przedstawia koncepcję powstawania zwapnień z udziałem czynników prozapalnych i szlaków biochemicznych w czasie dysfunkcji śródbłónka zastawki aortalnej [43]. W wielu pracach postuluje się wapnienie tkanek miękkich, jako efekt synergiczny pomiędzy czynnikami biomechanicznymi i ścieżką sygnałów prozapalnych [41-43]. Stan zapalny może być kluczowym krokiem promującym proces odkładania się soli wapnia. Uszkodzenie śródbłónka może być następstwem ekspozycji zastawki na czynniki biochemiczne w przebiegu hipercholesterolemii i hiperglikemii, jak również może być konsekwencją wzrostu naprężeń ścinających występujących, między innymi, w przebiegu nadciśnienia tętniczego. Mineralizacja, opisana na podstawie przedstawionego modelu, nie polega na biernym odkładaniu soli wapnia w miejscu uszkodzenia śródbłónka, lecz jest to aktywny proces, w który zaangażowane są komórki, układ krążenia i liczne czynniki biochemiczne, jak cytokiny, białka

enzymatyczne, czynniki transkrypcyjne. Na Rys. 1.4 przedstawiono przekrój przez płatek zastawki aortalnej. Należy zwrócić uwagę, że pomiędzy warstwami zawierającymi włókna kolagenowe, elastynowe i glikozaminoglikany, występują komórki śródmiażdżowe, czyli niewyspecjalizowane totipotencjalne komórki, zdolne do przemieszczania się pomiędzy warstwami. Istotną cechą komórek śródmiażdżowych jest wrażliwość na mediatory typowe dla osteogenezy, czyli białka BMP, pełniące kluczową rolę w patogenezie kalcyfikacji zastawki. Powinowactwo do białek BMP powoduje, że komórki śródmiażdżowe mają zdolność do różnicowania się do komórek osteoblasto-podobnych [43].

Uszkodzenie warstwy śródbłónka może powodować modyfikację szlaków sygnałowych i wzrost aktywności białek BMP. W modelu eksperymentalnym wykazano, że komórki śródbłónka w odpowiedzi na uszkodzenie lub zmianę naprężeń ścinających podczas przepływu krwi przez zastawkę, wydzielają białka BMP-2 i BMP-4. Białka BMP są z kolei wykrywane przez komórki śródmiażdżowe i przyłączane do błony komórkowej, aktywując szlak przemian biochemicznych [43]. Ponadto, w komórkach śródbłónka rozpoznano białka Wnt (glikolipoproteiny) [44]. Białka Wnt biorą udział w fizjologicznych procesach takich, jak różnicowanie, przeżywalność i proliferacja, zachodzących w prawidłowych komórkach organizmu. Jednakże liczne prace wskazują, że ścieżka Wnt może zostać ponownie aktywowana w stanach chorobowych tkanki, a jej rolą jest wtedy aktywacja i regulacja proliferacji komórek śródmiażdżowych w celu naprawy uszkodzeń [45]. Sugeruje się ponadto, że szlak białek Wnt jest zaangażowany w regulację reakcji zapalnej w śródbłónku [46]. Udowodniono, że szlak Wnt bierze udział nie tylko w procesach zachodzących w śródbłónku, ale także we wszystkich komórkach linii osteoblastycznej. Klasyczny szlak białka Wnt, zależny od β -kateniny, zostaje uruchomiony w odpowiedzi na obciążenia mechaniczne kości i uczestniczy w procesie naprawy uszkodzeń kostnych [47]. Przedstawiony model wskazuje, zatem, na dwa główne szlaki sygnałowe zaangażowane w proces mineralizacji tkanki: szlak białek BMP oraz białek Wnt (Rys. 1.5).

W pierwszym szlaku sygnałowym białka BMP przyłączają receptor BMPR i grupę fosforanową, a następnie aktywują białka Smad. Białka Smad z kolei stymulują transkrypcyjne czynniki osteoblastyczne Runx2, prowadząc do aktywacji białek charakterystycznych dla kalcyfikacji, czyli osteopontyny i osteokalcyny. Białka BMP promują także szlak sygnałowy Wnt. Ligandy Wnt wiążą się z receptorami lipoproteinowymi, w wyniku czego aktywowany jest szlak sygnałowy β -katenin, tak zwany szlak kanoniczny. Prowadzi on do wydzielania fosfatazy zasadowej będącej, między innymi, nośnikiem jonów niezbędnych do mineralizacji. Oba szlaki sygnałowe promują przekształcenie komórek śródmiażdżowych do komórek

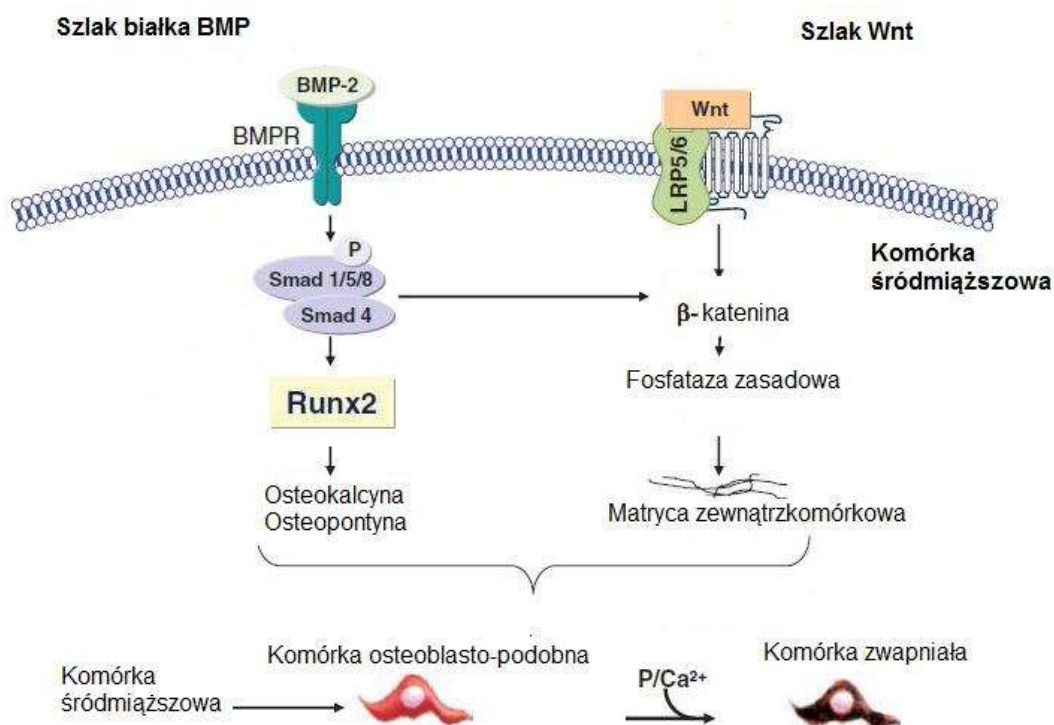
osteoblasto-podobnych, które są zdolne do wapnienia w obecności fosforu i wapnia [43]. Śródbłonek, uszkodzony na skutek działania czynników prozapalnych lub w wyniku zmian ciśnienia krwi, mobilizuje progenitorowe komórki śródmiaższowe głównie przez lokalne niedotlenienie. Komórki progenitorowe są zdolne do różnicowania się w komórki śródbłonkowe (EPC, *ang. endothelial progenitor cells*), które migrują do uszkodzonych miejsc lub parakrynnie stymulują komórki sąsiednie uczestnicząc, tym samym, w procesie naprawy. Należy przy tym zaznaczyć, że tylko dojrzałe EPC są zdolne do różnicowania się i naprawy, natomiast rolą wczesnych EPC jest wydzielanie czynników ułatwiających migrację innych komórek, a także funkcja waskulogenna i angiogenna [48]. Równocześnie liczne prace wskazują, że liczba i funkcja EPC są zaburzone w nadciśnieniu, cukrzycy i reumatoidalnym zapaleniu stawów [48]. A zatem dysfunkcja EPC, polegająca na utracie zdolności do migracji i różnicowania się, wpływa bezpośrednio na proces naprawy uszkodzeń śródbłonna. Sprzyja to, tym samym, wapnieniu tkanki w miejscach uszkodzenia.



Rys. 1.4. Przekrój przez płatek zastawki aortalnej. Uszkodzenie warstwy śródbłonna aktywuje komórki śródmiaższowe zdolne do różnicowania się w komórki osteoblasto-podobne.

W procesie angiogenezy tworzone są drogi transportu dla komórek prozapalnych. W miejscu uszkodzenia śródbłonna stwierdzono obecność cytokin prozapalnych, w tym martwiczego czynnika- α (TNF- α , *ang. tumor necrosis factor- α*), interleukiny 1- β (IL-1 β), aktywatora receptora jądrowego czynnika κ -B (NF κ B, *ang. nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*). Obecne są także makrofagi, które uwalniają metaloproteazy

matrycowe i endoproteazy cysteinowe, mające zdolność trawienia martwych komórek śródbłonna. Równocześnie enzymy te mogą degradować kolagen i elastynę. Produkty degradacji elastyny same pełnią rolę centrów krystalizacji. Opisane powyżej efekty, zarówno transformacja komórek śródmiąższowych do komórek osteoblasto-podobnych, jak i dysfunkcja komórek progenitorowych promują proces kalcyfikacji.



Rys. 1.5. Szlak sygnałowy białka BMP i Wnt w zastawkowych komórkach śródmiąższowych. Oba szlaki sygnałowe promują przemianę komórki śródmiąższowej do komórki osteoblasto-podobnej, zdolnej do mineralizacji w obecności jonów Ca i P. Szczegółowy opis szlaków w tekście.

1.3. Mineralizacja struktur kolagenowych

Białko kolagenowe stanowi jedną trzecią ludzkiego proteomu i jest głównym białkiem tkanki łącznej, nadającym wytrzymałość mechaniczną i elastyczność takim strukturom, jak ścięgna, więzadła, kości i inne. Praktycznie wszystkie tkanki, oparte strukturalnie na kolagenie są zorganizowane w hierarchiczne struktury, gdzie najniższy poziom zajmują cząsteczki potrójnej helisy kolagenu (Rys. 1.6).



Rys. 1.6. Struktura hierarchiczna kolagenu.

Kolagen charakteryzują dwie nietypowe cechy, odróżniające go od innych białek. Po pierwsze zawiera nietypowy skład aminokwasowy, z dużą ilością proliny i glicyny oraz dwa aminokwasy, nie pochodzące bezpośrednio z translacji w rybosomach (hydroksylizynę i hydroksyprolinę). Drugą rzadką cechą jest regularność rozmieszczenia aminokwasów w każdym łańcuchu (Gly-X-Y, Gly – glicyna, X i Y -inne aminokwasy). Dzięki tej regularności łańcuchy mają tendencję do przyjmowania ściśle określonej konformacji. Każda cząsteczka kolagenu składa się z trzech łańcuchów peptydowych, które tworzą śrubowo skręconą nić o długości 300 nm. Cząsteczki kolagenu agregują ze sobą tworząc włókienko kolagenowe.

Średnica włókienek w więzadłach i ścięgnach waha się pomiędzy 100 – 500 nm. Gęstość odwodnionego kolagenu wynosi 1.34 g/cm³ [49].

Znaczenie matrycy kolagenowej w formowaniu się struktury mineralnej nie zostało jeszcze dobrze poznane. Przypuszcza się, że kolagen kieruje mineralizacją poprzez nadawanie kierunku do wzrostu kryształów i ograniczanie ich rozmiarów [50].

Zjawisko mineralizacji struktur kolagenowych rozpoznano w wielu tkankach miękkich. Do najczęściej wapniejących struktur zaliczane są płatki zastawek aortalnych, ściany tętnic oraz ścięgna (zwykle Achillesa). Przykłady tkanek, w których zidentyfikowano kalcyfikacje, wraz ze strukturą chemiczną depozytów zebrano w tabeli 1.1

Miejsce występowania kalcyfikacji	Struktura chemiczna depozytów
Zastawki ^[51-53]	CHAP, DCPD
Więzadła kręgosłupa ^[54-55]	CPPD, TCP, HAP, DCPD
Naczynia krwionośne ^[56]	HAP, CHAP
Ścięgna (np. Achillesa) ^[57-58]	CPPD, TCP, OCP, HAP
Piersi/ Nowotwory piersi ^[59]	Dwuwodny szczawian wapnia, HAP
Nerki ^[60]	Szczawian wapnia, kwas moczowy, struwit (fosforan magnezowo-amonowy), DCPD, HAP
Stawy ^[61-64]	CPPD, OCP, CHAP, TCP
Wątroba ^[65-67]	Polimorficzny węglan wapnia, węglan wapnia CaCO ₃ , CHAP, palmitynian wapnia
Prostata/Nowotwór prostaty ^[68-71]	CHAP, DCPD, czterowodny cytrynian wapnia, TCP
Rogówka ^[72]	HAP
Skóra, Mięśnie ^[72]	CHAP

Tab. 1.1. Najczęściej występujący skład chemiczny depozytów w różnych tkankach miękkich.

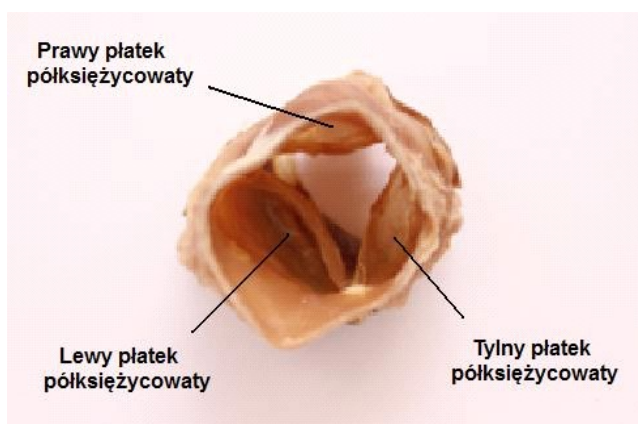
HAP- hydrokypatyt, CHAP- węglano-hydrokypatyt, CPPD- dwuwodny pirofosforan wapnia, TCP- fosforan trójwapniowy, OCP- fosforan ośmiowapniowy, DCPD- bruzyt (2-hydrat wodorofosforanu wapnia).

Hydroksyapatyt, odkładający się w strukturach kolagenowych, najczęściej odbiega od stechiometrii. Do takich minerałów należą hydroksyapatyty z niedoborem wapnia (niestechiometryczne), w których stwierdza się obecność jonów HPO_4^{2-} . Zaliczamy do nich apatytowe fosforany wapnia o stosunku molowym Ca/P w zakresie 1.5 - 1.67. Hydroksyapatytowi stechiometrycznemu odpowiada stosunek molowy Ca/P równy 1.67 [8]. Gęstość hydroksyapatytu wynosi 3.156 g/cm^3 [8]. W środowisku żywego organizmu hydroksyapatyt ulega bardzo słabemu rozpuszczaniu. Hydroksyapatyt jest praktycznie nierozpuszczalny w zasadach, za to dobrze rozpuszcza się w kwasach. Rozpuszczalność hydroksyapatytów niestechiometrycznych o stosunku Ca/P <1.67 jest wyższa niż hydroksyapatytu stechiometrycznego.

1.4. Stenoza zastawki aortalnej i kanału kręgowego

W sercu człowieka wyróżniamy cztery zastawki. Dwie z nich umiejscowione są pomiędzy przedsionkami i komorami (zastawka trójdzielna i dwudzielna), a pozostałe dwie w ujściach tętnic z komór serca (zastawka aortalna i zastawka pnia płucnego). Zastawka aortalna (AV, ang. *aortic valve*) zlokalizowana jest w ujściu aorty z lewej komory serca. Ujście zastawki aortalnej zamykają trzy płatki półksiężycowate (Rys. 1.7). Każdy płatek zbudowany jest z włóknistego zrębu tkanki łącznej pokrytej od strony komory wsierdziem, a od strony naczynia warstwą komórek śródbłonna i leżącej pod nimi luźnej tkanki łącznej. Wypukłość płatków zwrócona jest ku komorze, a wklęsłość ku tętnicy. Wypukły brzeg obwodowy płatków przyczepiony jest do pierścienia włóknistego, obejmującego ujście tętnicze. W chwili rozkurczu komór płatki uwypuklają się ku komorom i wolne brzegi płatków stykają się ze sobą szczelnie zamykając ujście tętnicze [73]. Stenoza zastawki aortalnej polega na zmniejszeniu powierzchni lewego ujścia tętniczego o około 2.5 cm^2 , wskutek czego utrudniony jest wypływ krwi z lewej komory serca do aorty (Rys. 1.8). Zwężenie o ponad $1/3$ powierzchni zastawki wywołuje następstwa hemodynamiczne, prowadząc do przeciążenia ciśnieniowego i kompensacyjnego koncentrycznego przerostu mięśnia lewej komory serca. Zwiększona masa mięśnia przy niezmiennym krążeniu wieńcowym prowadzi do większego zapotrzebowania na tlen, przy czym zmniejszenie przepływu przez naczynia wieńcowe prowadzi do bólów dławicowych, dysfunkcji rozkurczowej i skurczowej oraz zastoju w krążeniu płucnym. Wśród głównych przyczyn wystąpienia stenozy aortalnej podaje się zmiany degeneracyjne, związane

z wiekiem, zmiany reumatyczne oraz wrodzone (zastawki dwupłatkowe aorty ulegają szybciej zwyrodnieniu niż trójpłatkowe).



Rys. 1.7. Fotografia zastawki aortalnej z dobrze widocznymi trzema płatkami półksiężycowatymi.

Coraz częściej, jako przyczynę stenozы u osób starszych sugeruje się wapnienie zastawki, na skutek zaburzeń gospodarki wapniowej, miażdżycy, niewydolności nerek, nadciśnienia i cukrzycy [74]. Badania ostatnich lat zaliczają wapnienie zastawek do aktywnego biologicznie procesu, dającego histologiczne dowody na współdziałanie stanu zapalnego i przebudowy macierzy zewnątrzkomórkowej, prowadzących do formowania minerałów [75].

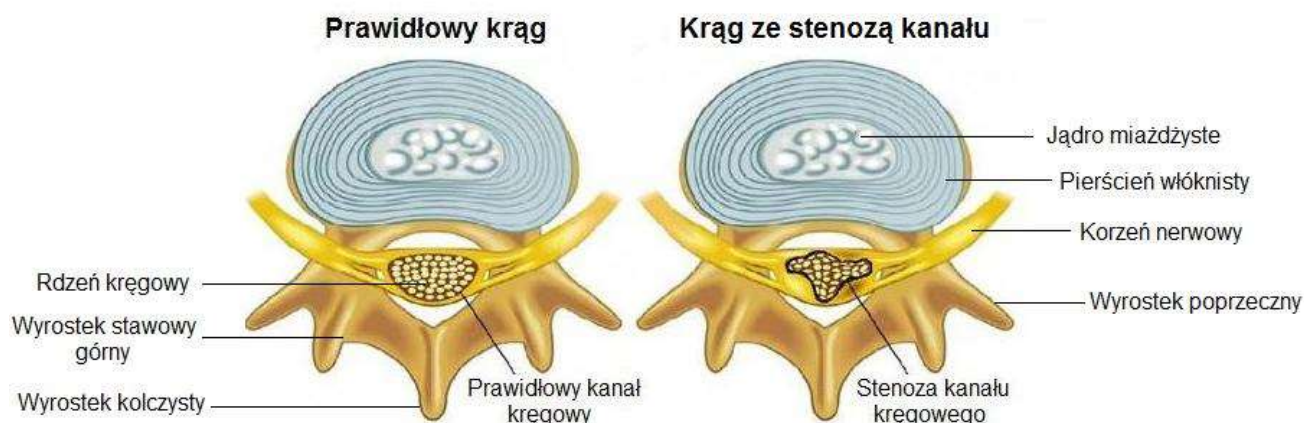
Zwężenie kanału kręgowego jest to stan, w którym dochodzi do dysproporcji pomiędzy objętością kanału a objętością rdzenia kręgowego, prowadząc do ucisku korzeni rdzeniowych (Rys. 1.9). Zwężenie może być spowodowane zarówno przez tkankę kostną jak i przez tkanki miękkie, czyli więzadła i oponę [76]. Miejsce ucisku może być zlokalizowane centralnie wewnątrz kanału, w obrębie zachyłka bocznego lub otworu międzykręgowego [77]. Schorzenie to wynika najczęściej z rozwoju zmian zwyrodnieniowych kręgosłupa i występuje zazwyczaj u osób po 40 roku życia. Do zmian zwyrodnieniowych, prowadzących do zwężenia kanału, zalicza się między innymi zwyrodnienia krążków międzykręgowych, kręgozmyk, osteofity na krawędziach trzonów, przerost więzadła żółtego i podłużnego tylnego. Ucisk na worek oponowy, korzenie nerwowe i lokalne naczynia krwionośne wywołuje ból i zaburzenia czucia w kończynach dolnych. Głównym parametrem diagnostycznym stenozы kanału kręgowego jest wartość średnicy kanału, określana zwykle z użyciem tomografii komputerowej lub metodą obrazowania rezonansu magnetycznego. Przyjmuje się, że normalna średnica na poziomie

kręgów L1/S1 wynosi >12.5 mm, podczas gdy średnica o wartości <12 mm jest uważana za stenotyczną [78].



Rys. 1.8. Zdrowa i zdegenerowana zastawka aortalna na skutek stenozы aortalnej.

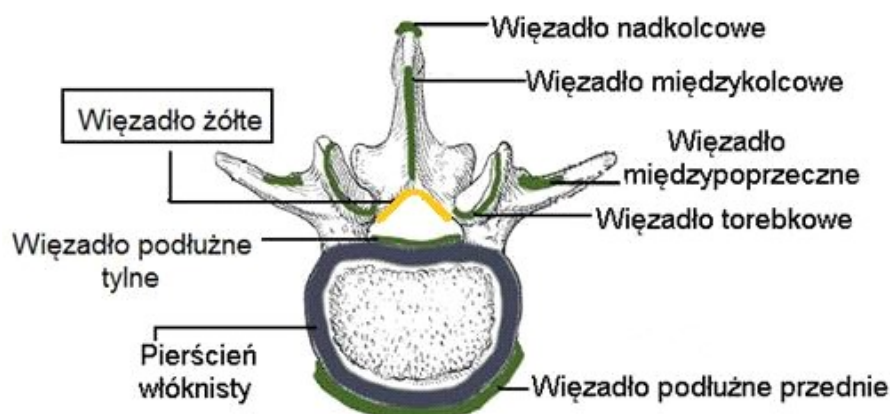
Wskutek zwężenia kanału kręgowego dochodzi do zagięcia więzadeł żółtych, które ulegają przerostowi i kalcyfikacji [79]. Wielu autorów wskazuje, że mineralizacja więzadła żółtego jest skorelowana ze stenozą kanału kręgowego. Sugeruje się, że mineralizacja więzadła może być przyczyną stenozы kanału lub odwrotnie- jest wynikiem zmian zwyrodnieniowych [55, 80]. Wyniki badań histologicznych wskazują, że zmiany degeneracyjne więzadeł żółtych objawiają się spadkiem ilości elastyny oraz wzrostem zawartości kolagenu. Proces ten tłumaczony jest mikro-uszkodzeniami i naprężeniem mechanicznym w więzadłach żółtych, skutkującymi dalszymi uszkodzeniami, a w efekcie fragmentacją elastyny i proliferacją kolagenu [55]. Najbardziej aktywny proces mineralizacji zaobserwowano w sąsiedztwie powierzchni stawowych stawów międzykręgowych i miejscu połączenia torebki stawowej z więzadłem (Rys. 1.9 i Rys. 1.10) [81].



Rys. 1.9. Anatomia kręgu wraz z obrazem prawidłowego i zwężonego kanału kręgowego.

Więzadła żółte (LF, ang. *ligamenta flava*) to struktury zlokalizowane pomiędzy łukami sąsiednich kręgów. Zamykają one kanał kręgowy od tyłu (Rys. 1.10). Zbudowane są z tkanki łącznej sprężystej i mają zabarwienie żółtawe. Dzięki swej sprężystości mają duże znaczenie dla statyki i mechaniki kręgosłupa stabilizując kręgosłup w płaszczyźnie strzałkowej i zapobiegając nadmiernemu zgięciu ku przodowi [2]. Więzadło żółte posiada wyjątkowe właściwości mechaniczne odróżniające je od pozostałych więzadeł. Więzadła podłużne przednie i tylne mają podobną strukturę, składają się głównie z równolegle ułożonych włókien kolagenowych biegnących wzdłuż osi kręgosłupa i przeplatających się z zewnętrzną warstwą pierścienia włóknistego. Sucha masa więzadła podłużnego tylnego kręgosłupa szyjnego zawiera 67% włókien kolagenowych i 6% włókien elastyny. Natomiast w przypadku więzadła żółtego stosunek elastyny do kolagenu wynosi 2:1. Większa zawartość włókien elastyny (mniej sztywne od kolagenu) sprawia, że są one bardziej zdolne do wydłużania niż więzadła podłużne przy tym samym obciążeniu [82].

Według przyjętych norm w tomografii komputerowej grubość więzadła żółtego wynosi 4 - 5 mm [79]. Grubość więzadła, które uległo urazowi, wzrasta do 8 mm. Miejsce urazu w procesie regeneracji ulega włóknieniu, co skutkuje znacznym pogrubieniem więzadła i utratą elastyczności. Przerost więzadła staje się przyczyną ucisku korzeni nerwów, co często wymaga szerokiego wycięcia więzadła lub foraminotomii (poszerzenie otworu międzykręgowego) [83].



Rys. 1.10. Układ więzadłowy stabilizujący kręgosłup

1.5. Cel pracy

Celem niniejszej pracy była fizykochemiczna i morfologiczna analiza depozytów mineralnych w tkankach miękkich. Przedmiotem badań były mineralizacje w stenotycznych zastawkach aortalnych oraz w więzadłach żółtych kręgosłupa, którym towarzyszyła stenoza kanału kręgowego. Podjęto próbę ustalenia czy kalcyfikacja jest bezpośrednim następstwem zjawiska stenozy i czy obie patologie powinny być kojarzone ze sobą. Materiałem porównawczym w przeprowadzonej analizie były kości i zęby, należące do struktur fizjologicznie zmineralizowanych.

W celu redukcji błędów w obliczeniach parametrów morfologicznych napisano program komputerowy, który pozwolił na wykonanie korekcji artefaktu *partial volume effect* w pomiarach mikrotomograficznych, zwanego w pracy efektem częściowego wypełnienia voxela. Mając na uwadze fakt, że badane materiały są niejednorodne, wymieniony artefakt prowadzi do efektu rozmycia, zwłaszcza na brzegach struktury, prowadząc tym samym do nieścisłości w wartościach parametrów morfologicznych (np. objętości struktury).

Narzędziem do określenia czasu wzrostu mineralizacji w tkankach był modelowy opis zjawiska, oparty na równaniu dyfuzji jonów.

2. Materiały i Metody

2.1. Preparatyka próbek

Kości beleczkowe, jako przykład struktury podlegającej mineralizacji fizjologicznej, stanowiły materiał kontrolny w analizie mineralizacji zastawek aortalnych i więzadeł kręgosłupa. Umożliwiło to wskazanie cech wspólnych i różnic w aspekcie fizykochemicznym pomiędzy fizjologiczną i patologiczną mineralizacją. Przedmiotem badań była struktura beleczkowa ludzkich kręgów lędźwiowych, pozyskanych dzięki współpracy z Zakładem Biofizyki Collegium Medicum Uniwersytetu Jagiellońskiego. Kość beleczkowa jest strukturą zbudowaną z beleczek kostnych składających się głównie z włókien kolagenowych i hydroksyapatytu. Przeanalizowano 6 próbek kości beleczkowych wypreparowanych z kręgów lędźwiowych, pobranych sekcyjnie od osób w wieku (24 – 81) lat. Określono zależność pomiędzy wiekiem a strukturą fizykochemiczną. Wyekstrahowane kręgi przechowywano w propanolu (C_3H_8O). Po osuszeniu kręgów pod wyciągiem laboratoryjnym, wycięto przy pomocy precyzyjnej piły automatycznej (Isomet 1000, Buehler, USA) fragmenty kości gąbczastej o wielkości $0.5 \times 0.5 \times 0.2 \text{ cm}^3$. Ze względu na niekorzystny wpływ szpiku kostnego w próbkach kości beleczkowych zarówno, na jakość histogramów w mikrotomografii (znaczny udział maksimum pochodzącego od szpiku w stosunku do maksimum pochodzącego od struktury nieorganicznej) jak i na jakość widm w podczerwieni (znaczny udział pasm lipidowych), wykonano separację szpiku od struktury kostnej. W celu wyekstrahowania szpiku z próbek kości beleczkowych poddano je 10-krotnemu płukaniu w 70% chloroformie i suszono pod wyciągiem przez 3 dni. Następnie wykonano skany mikrotomograficzne próbek kości. Obliczono parametr BV/TV (*bone volume / total volume*), który wyraża procentowy udział struktury kostnej w próbce kości beleczkowej. Obliczenia przeprowadzono zgodnie z procedurą opisaną w pracy [84]. Próbki kości utarto na proszek w młynie planarnym i poddano analizie z użyciem spektroskopii fluorescencji rentgenowskiej (XRF) i spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera (FTIR).

Dodatkowym materiałem porównawczym było 5 zębów, pozyskanych od pacjentów w wieku (60 ± 5) lat w przebiegu rutynowej ekstrakcji. Niezwłocznie po ekstrakcji zęby były

płukane w soli fizjologicznej i przechowywane w formaldehydzie. W celu wyznaczenia gęstości struktur zęba wykonano skany mikrotomograficzne, a następnie przy pomocy piły automatycznej wycięto fragmenty szkliwa i zębiny o wielkości $0.2 \times 0.1 \times 0.05 \text{ cm}^3$ i utarto na proszek w młynie planarnym, po czym wykonano analizę FTIR według takiej samej procedury jak dla kości.

Materiałem badawczym były depozyty mineralne zidentyfikowane w płatkach zastawek aortalnych oraz więzadłach żółtych kręgosłupa, które stanowią przykład patologicznie zmineralizowanych tkanek. Analizie poddano 30 zastawek aortalnych, pobranych od pacjentów w wieku 65 ± 11 lat (10 kobiet, 20 mężczyzn) w trakcie zabiegu chirurgicznego wykonanego z powodu stenozы aortalnej. Grupę kontrolną stanowiło 5 zastawek aortalnych pobranych sekcyjnie. Niezwłocznie po pobraniu, zastawki były płukane w soli fizjologicznej, wyekstrahowano z nich płatki, a następnie przechowywano w formaldehydzie. Płatki zostały poddane analizie mikrotomograficznej, a następnie suszone pod wyciągiem przez 3 dni. Po wysuszeniu płatków wyekstrahowano z nich, za pomocą ostrza chirurgicznego, duże depozyty mineralne o objętości powyżej 0.1 cm^3 . Depozyty utarto w moździerzku na proszek w celu analizy chemicznej z użyciem technik XRF i FTIR.

Próbki 24 więzadeł żółtych chirurgicznie wyekstrahowano z kręgosłupa lędźwiowego na poziomie kręgów L1 - L5. Grupę badawczą stanowiło 15 próbek więzadeł pozyskanych od pacjentów, w wieku (55 – 81) lat, zakwalifikowanych do operacji z powodu stenozы kanału kręgowego. Grupa kontrolna zawierała 9 próbek więzadeł, pobranych od pacjentów w wieku (20 – 53) lat, którzy ulegli mechanicznemu urazowi kręgosłupa. Niezwłocznie po usunięciu chirurgicznym, więzadła były płukane w soli fizjologicznej i przechowywane w formaldehydzie do czasu pomiarów mikrotomograficznych. Po wykonaniu pomiarów mikrotomograficznych, wyekstrahowano pod mikroskopem największe depozyty mineralne (o objętości powyżej 0.13 mm^3), a następnie suszono pod wyciągiem przez 3 dni i ucierano w moździerzku. Sproszkowane próbki depozytów mineralnych analizowano z użyciem dyfraktometrii rentgenowskiej (XRD), XRF i FTIR. Preparatyka próbek AV i LF została przeprowadzona zgodnie ze standardami, opisanymi w pracach [85-86].

2.2. Techniki pomiarowe

2.2.1. Mikrotomografia komputerowa

Mikrotomografia komputerowa (μ -CT) należy do nieinwazyjnych metod trójwymiarowego obrazowania struktury obiektów. Metoda ta pozwala na obrazowanie obiektów z rozdzielczością nawet poniżej 1 μ m.

W przedstawionej pracy mikrotomografia pozwoliła na szczegółowe zobrazowanie struktury beleczkowej kręgów lędźwiowych, zębów oraz mineralnych depozytów, zidentyfikowanych w płatkach zastawek aortalnych i w więzadłach żółtych kręgosłupa. Badania zostały wykonane z użyciem mikrotomografu SkyScan 1172 (SkyScan, Belgia), który pozwala na określenie struktury obiektów o maksymalnej średnicy 6 cm i wysokości 9 cm, przy czym w pojedynczym pomiarze można dokonać rejestracji projekcji próbki o maksymalnej szerokości 3 cm i wysokości 2 cm. W przypadku większych próbek oprogramowanie tomografu składa wyniki pojedynczych skanów 3 x 2 cm². Mikrotomograf jest wyposażony w lampę rentgenowską o mocy 8 W i napięciu maksymalnym 80 kV. Kolejne projekcje obrazu rejestrowane są przy pomocy ciałostalowego detektora dysponującego matrycą 4024 x 2680 pikseli. Krok obrotu próbki wynosi od 0.25° do 0.70° w zależności od wymaganej rozdzielczości. Wielkość piksela na obrazie można ustalić w granicach (0.2 – 27) μ m. Wybór wielkości piksela realizowany jest poprzez wzajemne ustawienie źródła, detektora i próbki. Najwyższą zdolność rozdzielczą (najmniejsza wielkość piksela) uzyskuje się poprzez maksymalne zbliżenie źródła promieniowania do próbki, przy jednoczesnym maksymalnym odsunięciu detektora. Przykładowe czasy pojedynczego pomiaru próbki kości, o szerokości i wysokości odpowiednio 3 cm x 2 cm, i czasy rekonstrukcji przedstawia tabela 2.1.

Wielkość piksela	Wielkość danych	Czas pomiaru	Czas rekonstrukcji
27 μ m	0.4 GB	18 min	15 min
13 μ m	2.5 GB	54 min	1 godzina
0.5 μ m	16.7 GB	10 godzin	> 7 godzin

Tab. 2.1. Czas pomiaru i rekonstrukcji μ -CT dla różnych zdolności rozdzielczych.

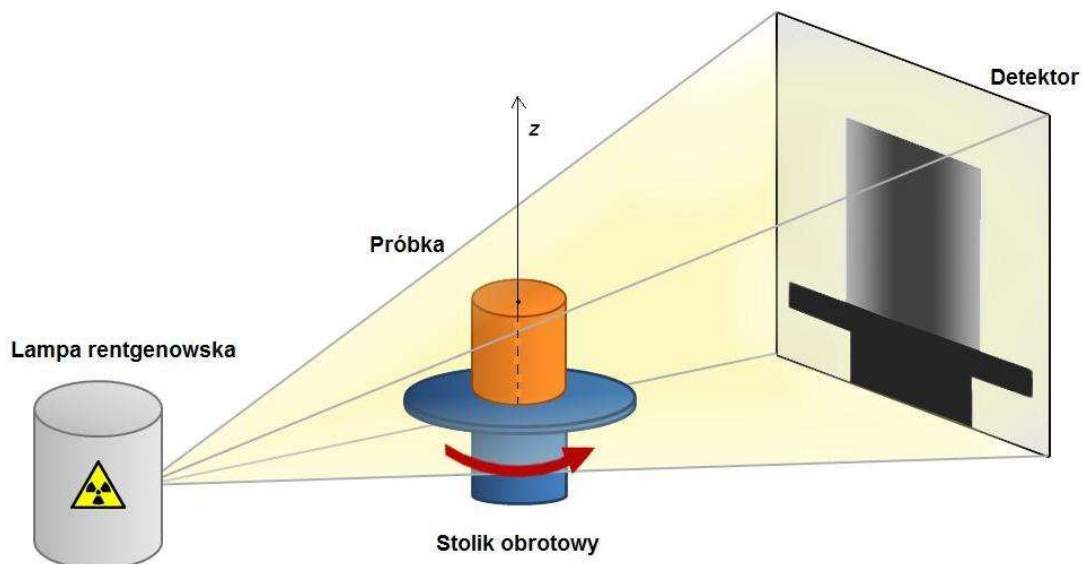
Mikrotomograf SkyScan 1172 obsługiwany jest przez komputer DELL Precision T5400, pracujący pod systemem operacyjnym Windows 7. Komputer posiada dwa procesory Intel XEON 5460 (3.16 GHz, 1333 MHz FSB, 4 MB Quad Core), pamięć operacyjną 4 GB (DDR2 667 MHz) oraz dysk twardy o pojemności 1.3 TB. Oprogramowanie umożliwia rekonstrukcję obrazu na podstawie zmierzonych projekcji, jego trójwymiarową wizualizację a także obliczanie parametrów struktury.

Pomiary depozytów mineralnych zostały przeprowadzone z rozdzielczością 13.5 μm i przy napięciu lampy 40 kV. Parametry te zostały dobrane eksperymentalnie, aby uzyskać jak najlepszą jakość obrazu. Dla kilku regionów każdej próbki pomiary zostały powtórzone z rozdzielczością 2 μm w celu zobrazowania szczegółów struktury. Pomiary kości beleczkowych przeprowadzono z rozdzielczością 13.5 μm i przy napięciu 80 kV. Ze względu na niewielką objętość próbek więzadeł żółtych i płatków zastawek aortalnych opracowano metodę mającą za zadanie zapobieganie wysychaniu próbek w trakcie pomiarów mikrotomograficznych. W tym celu próbki były powlekane olejem o sprawdzonej czystości (L-HV Specol, Polska), a następnie umieszczane pomiędzy dwoma foliami o regularnych kształtach. Dla każdej rekonstrukcji obrazu wybierano obszar przeznaczony do analizy (*ROI, ang. Region of interest*) zawierający próbkę z pominięciem folii.

2.2.1.1. Rekonstrukcja obrazów mikrotomograficznych

Rekonstrukcja obrazu jest procedurą mającą na celu wyznaczenie trójwymiarowego rozkładu liniowego współczynnika osłabienia promieniowania rentgenowskiego, na podstawie projekcji, wykonanych pod różnymi kątami. Algorytmy rekonstrukcyjne stosowane w mikrotomografii i tomografii medycznej różnią się od siebie, co wynika z odmiennego sposobu pomiaru [87-88]. W μ -CT układ lampa rentgenowska - detektory pozostają nieruchome, natomiast próbka wykonuje obroty w osi z (Rys. 2.1). W tomografach medycznych układ lampa rentgenowska - detektory wykonuje obrót wokół pacjenta, a dodatkowo pacjent przesuwany jest ruchem jednostajnym w kierunku osi równoległej do osi ciała. Pomiary poszczególnych projekcji są, zatem, położone na spirali otaczającej badany fragment ciała pacjenta [89]. Dzięki zastosowaniu tomografii spiralnej czas badania tomograficznego ulega skróceniu. Dodatkowo w tomografii medycznej istotnym parametrem jest dawka promieniowania, pochłonięta przez

ciało pacjenta. Wykorzystuje się, zatem, algorytmy prowadzące do minimalizacji dawki podczas badania tomograficznego.



Rys. 2.1. Schemat układu pomiarowego w μ -CT z zastosowaniem wiązki stożkowej.
Próbka wykonuje obroty w osi z.

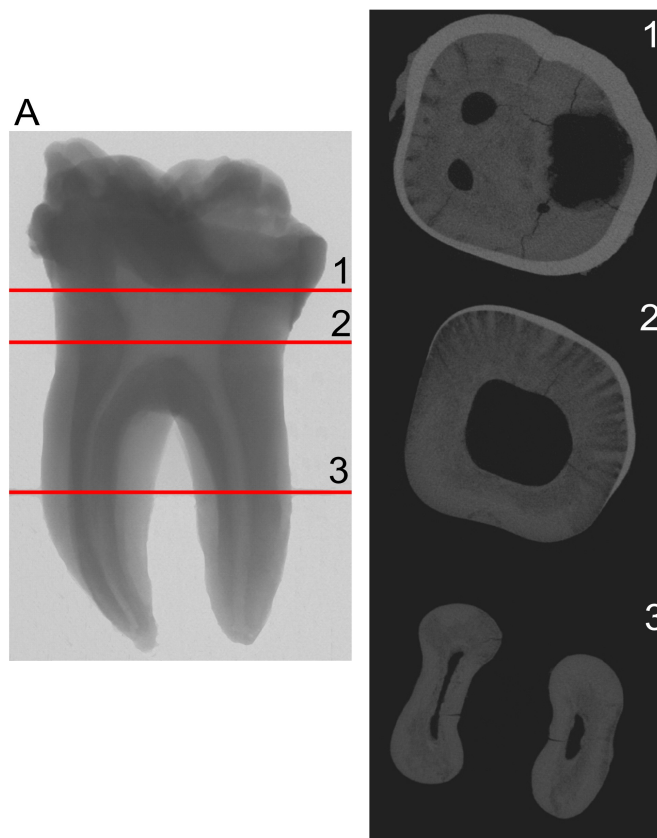
Najczęściej stosowaną metodą rekonstrukcji w tomografii komputerowej jest algorytm filtrowanej wstecznej projekcji [89]. Metoda sprowadza się najpierw do filtrowania projekcji dla danego kąta pomiaru, a następnie wykonania wstecznego rzutowania zmienionych projekcji [89]. Procedura filtrowania polega na obliczeniu odwrotnej transformaty Fouriera projekcji w ograniczonym zakresie częstości (założenie o skończonej liczbie składowych transformaty Fouriera). Następnie projekcje, zmierzone przy różnych kątach, są kolejno dodawane, dzięki czemu otrzymujemy obraz sumacyjny, który w kolejnym kroku zostaje znormalizowany. Obraz sumacyjny różni się od przedmiotu, ponieważ punktowy przedmiot jest odtwarzany jak funkcja $1/r$, gdzie r to odległość od punktu. W związku z tym, w rekonstrukcji 2D, liczba projekcji przypadająca na jednostkę obwodu koła, otaczającego analizowany punkt, spada wraz z odległością od punktu. Metody rekonstrukcji oparte na wstecznej projekcji zmierzają, zatem, do eliminacji wpływu funkcji $1/r$ na wynik rekonstrukcji.

W mikrotomografii komputerowej najczęściej wykorzystywana jest stożkowa wiązka promieniowania X, która omiata cały skanowany obiekt. Taki rodzaj wiązki promieniowania wymaga rozszerzonego podejścia do zagadnienia rekonstrukcji z wykorzystaniem wstecznej

projekcji. W przypadku wiązki wachlarzowej zakłada się, że źródło, detektor i dany przekrój obiektu są położone w tej samej płaszczyźnie, a zatem informacje z punktów położonych na wybranej płaszczyźnie rejestrowane są przez pojedynczy rząd detektorów. Takie podejście jest niedokładne w przypadku wiązki stożkowej, bowiem przy zwiększaniu kąta stożkowego informacje z danego przekroju obiektu mogą być rejestrowane przez więcej niż jeden rząd detektorów. Jak w większości tomografów w celu uwzględnienia geometrii stożkowej wykorzystano algorytm Feldkampa, Davisa i Kresa [90-91]. Promienie padające na dwuwymiarowy detektor tworzą stożek o podstawie znajdującej się w płaszczyźnie detektora i wierzchołku zlokalizowanym na źródle promieniowania (Rys 2.1). Stożkową wiązkę promieniowania można potraktować, jako złożenie wielu wiązek w kształcie wachlarza, leżących na płaszczyznach nachylonych pod różnymi kątami w stosunku do płaszczyzny centralnej, prostopadłej do detektora [89, 92].

Korzystając z założenia, że wiązka stożkowa jest zbiorem wiązek wachlarzowych, możliwe stało się zarejestrowanie informacji z przekrojów w płaszczyznach, na których położone były składowe wiązki wachlarzowe. Przy założeniu równoległości wiązek wachlarzowych, centralny wiersz detektorów rejestruje informacje z punktów położonych na płaszczyźnie centralnej, natomiast dla każdej następnej płaszczyzny, nachylonej do płaszczyzny centralnej pod pewnym kątem, uwzględnia się dłuższą drogę promieni biegnących w nachylonych płaszczyznach. Dane uzyskane z punktów, oddalonych od płaszczyzny centralnej, będą zawierały coraz więcej artefaktów wraz z rosnącym kątem rozwarcia stożka. Całkowity współczynnik osłabienia w danym voxelu jest określony, jako suma wartości współczynników z określoną wagą, obliczonych dla punktów leżących na składowych płaszczyznach promieniowania. Zmierzona projekcja podlega, w pierwszej kolejności, filtrowaniu. Wartości przefiltrowanych projekcji zostają następnie odniesione do układu współrzędnych, opisujących płaszczyzny równoległe do płaszczyzny centralnej, za pomocą zależności geometrycznych występujących pomiędzy kątami mierzonymi na płaszczyźnie centralnej a kątami opisującymi płaszczyzny do niej nachylone. Ostatecznie wartości przefiltrowanych projekcji są poddawane projekcji wstecznej [92].

Przykładowy wynik rekonstrukcji obrazu, zmierzonego z wykorzystaniem wiązki stożkowej, przedstawiono na Rys. 2.2.



Rys. 2.2. Przykładowa rekonstrukcja obrazu trzech wybranych przekrojów zęba trzonowego, zaznaczonych na rysunku A. Pomiar wykonany z rozdzielczością 13.5 μm , przy maksymalnym napięciu 80 kV, z filtrem Al-Cu.

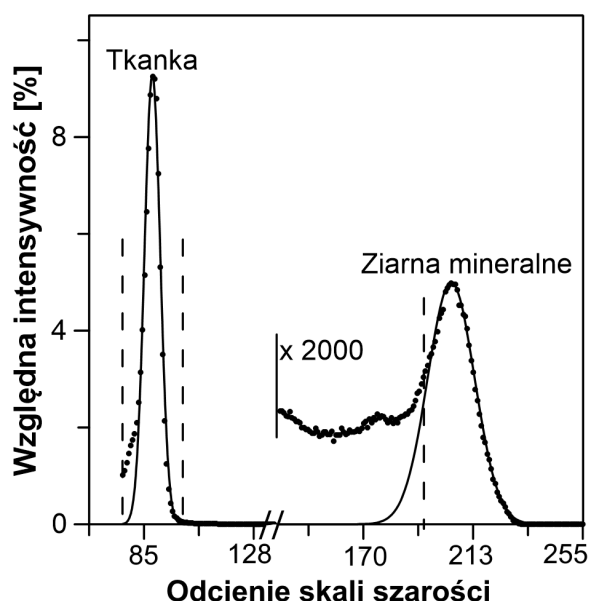
2.2.1.2. Analiza obrazów mikrotomograficznych

Kolejnym krokiem po rekonstrukcji obrazu było przeprowadzenie procedury segmentacji obrazu w skali odcieni szarości. Najprostszym sposobem segmentacji obrazu jest binaryzacja, którą wykonano w trzech wymiarach. W przypadku zmineralizowanych tkanek binaryzacja polega na wydzieleniu w próbce voxelów reprezentujących tkankę oraz voxelów odpowiadających strukturze mineralnej. W tym przypadku rozdzielenie obu struktur nie stanowi problemu ze względu na różnice wartości na skali szarości, co można zaobserwować na histogramie (Rys. 2.3). Najłatwiejszym sposobem binaryzacji jest progowanie z użyciem histogramu rozkładu stopni szarości. Procedura ta polega na wyznaczeniu zakresu wartości zaczerwienienia cechujących analizowane struktury. Po określeniu zakresu wartości zaczerwienienia stopień szarości każdego voxelu jest porównywany z tym zakresem, a następnie każdemu

voxelowi przypisana zostaje binarna wartość zaczernienia (0 lub 1). Voxelom odpowiadającym matrycy organicznej przypisano wartość 0 (kolor czarny), a odpowiadającym fazie mineralnej wartość 1 (kolor biały).

Na podstawie obrazu wygenerowano histogram rozkładu stopni szarości w skali 0-255 (Rys. 2.3). Na histogramie obserwowano dwa dobrze rozdzielone maksima, pierwsze odnoszące się do matrycy organicznej, a drugie związane z fazą nieorganiczną (ziarnami mineralnymi). Wybór wartości progowania oparty jest o kształt histogramu. Procedura progowania polegała na dopasowaniu do histogramu dwóch funkcji Gaussa. Zakres dla matrycy organicznej został określony, jako $(\mu - \sigma; \mu + \sigma)$, gdzie μ - średnia wartość, σ - odchylenie standardowe. Ze względu na niemal identyczne wartości μ dla matrycy organicznej zdecydowano o wyborze, jednakowego dla wszystkich próbek, zakresu progowania, który wynosił (73 – 105). Zakres dla fazy mineralnej został ustalony dla każdej próbki osobno z uwagi na znacząco różne wartości μ i został obliczony, jako $(\mu_i - \sigma_i; \text{maksymalna wartość skali szarości} = 255)$, gdzie μ_i - średnia wartość dla próbki i , σ_i - odchylenie standardowe dla próbki i . Dopasowanie funkcji Gaussa przeprowadzono przy użyciu programu Origin 9.1.

Ziarno mineralne zdefiniowano jako zbiór połączonych voxelów, scharakteryzowanych przez dobrze określoną wartość zaczernienia. Na podstawie histogramu rozkładu stopni szarości możliwe było wybranie i zliczenie voxelów wchodzących w skład ziarna. Analogicznie obliczenia przeprowadzono dla tkanki miękkiej. Obliczenia objętości, a także liczby ziaren zostały przeprowadzone z użyciem programu ImageJ z dodatkiem BoneJ (imagej.nih.gov/ij/index.html) według procedury opisanej w pracy [93]. Liczbę ziaren obliczono na podstawie zbinaryzowanych obrazów. Program zliczał jedynie te obiekty, które były ziarnami dzięki wyeliminowaniu szumów. Szumy zostały wyeliminowane przez ustalanie wysokiej wartości progowania dla ziaren mineralnych. Ponadto zastosowano korekcję artefaktu pojedynczych punktów, które mogłyby zostać zaklasyfikowane do ziaren, a w rzeczywistości były szumami. W tym celu wykorzystano filtr medianowy. Rolą filtra medianowego jest sortowanie zbioru wartości pikseli, wyznaczonych przez okno przetwarzania, a następnie wybór wartości środkowej z ciągu pikseli. W kolejnym kroku wartość analizowanego piksela zostaje zastąpiona przez medianę. [94]. Rozmiar okna przetwarzania wynosił 3 x 3 piksele i został dobrany eksperymentalnie tak, aby otrzymać obraz o jak najlepszej jakości (brak rozmycia). Program dokonuje obliczeń liczby obiektów skanując cały obraz lub obrysowany obszar na obrazie do momentu natrafienia na krawędź obiektu, następnie zarysowuje i wypełnia go tak, aby obiekt nie został powtórnie policzony.



Rys. 2.3. Histogram rozkładu stopni szarości w próbce. Prawa strona histogramu przemnożona przez 2000. Zakres wartości progowania dla matrycy organicznej w skali odcieni szarości wynosi (73 - 105), a dla ziaren mineralnych (193 – 255).

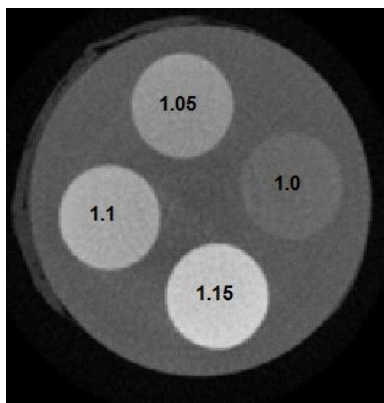
Objętość, obliczoną w voxelach, wyrażono za pomocą jednostek układu SI w następujący sposób:

$$\begin{aligned}
 1 \text{ piksel} &= 13.5 \mu\text{m} \times 13.5 \mu\text{m} \\
 1 \text{ voxel} &= (13.5)^3 \mu\text{m}^3 = 2460.4 \mu\text{m}^3 \\
 2460.4 \mu\text{m}^3 * \text{Liczba voxel} &= \text{Objętość obiektu (V)}
 \end{aligned}$$

Następnie obliczono objętość ziaren przypadającą na 100 mm^3 próbki (V_g/V) oraz liczbę ziaren w 100 mm^3 próbki (N/V).

Obrazy tomograficzne w skali odcieni szarości (0-255) reprezentują liniowy współczynnik osłabienia promieniowania X. Gęstość materiału jest proporcjonalna do liniowego współczynnika osłabienia, co z kolei jest proporcjonalne do wartości stopnia szarości. Umożliwia to przekonwertowanie 256 odcieni szarości na skalę gęstości. Kalibracja gęstości została przeprowadzona według metody kalibracyjnej dla kości, opisanej wcześniej [95]. Fantom przedstawiony na Rys. 2.4 przedstawia gęstości zbliżone do gęstości tkanki miękkiej. Fantom w postaci walca z pleksi z czterema otworami o średnicy 1 mm został wypełniony wodnymi roztworami wodorofosforanu potasu (K_2HPO_4) o stężeniach: 1.05 g/cm^3 ,

1.11 g/cm³ oraz 1.15 g/cm³. Czwarty otwór został wypełniony wodą destylowaną, o dobrze znanej gęstości (1.00 g/cm³). Rozpuszczalność K₂HPO₄ nie pozwala jednak na osiągnięcie większej wartości gęstości. W związku z tym dodatkowo przeprowadzono pomiary pręta aluminiowego o średnicy 1 mm i znanej gęstości (2.7 g/cm³) zbliżonej do gęstości szkliwa zębowego. Aluminium w procedurze kalibracyjnej mogło zostać wykorzystane z uwagi na liniową zależność współczynnika osłabienia μ od gęstości mierzonej próbki.



Rys. 2.4. Rekonstrukcja obrazu mikrotomograficznego fantomu z zaznaczonymi gęstościami poszczególnych roztworów w g/cm³.

Równanie kalibracyjne gęstości, ustalone dla obrazów bmp miało postać:

$$\delta \text{ [g/cm}^3\text{]} = 0.0091 * I + 0.68, \quad (2.6)$$

gdzie δ - gęstość obiektu, I – wartość odcienia szarości. Wartość stopni szarości dla każdego voxela została przeliczona na gęstość. Gęstość ziarna została ustalona na podstawie średniej gęstości wszystkich voxelów wchodzących w skład ziarna.

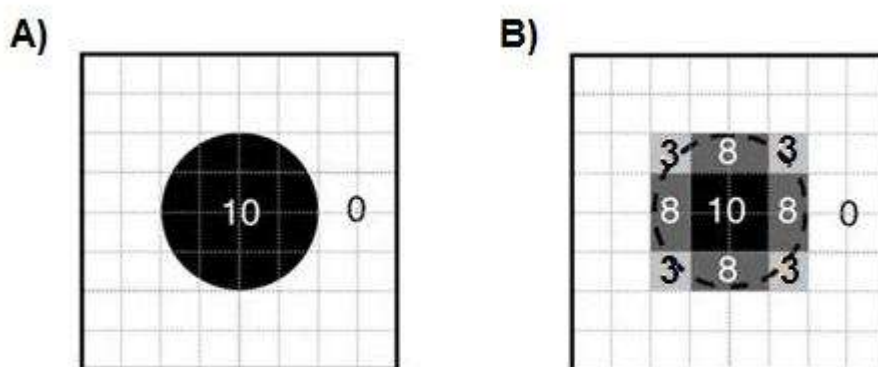
Przeprowadzono obliczenia procentowego udziału hydroksyapatytu w ziarnie według następującego równania:

$$X * \delta_{HAP} + (1-X) \delta_{Tk} = \delta, \quad (2.7)$$

gdzie X - procentowa zawartość hydroksyapatytu w ziarnie, δ - całkowita gęstość ziarna, δ_{HAP} - gęstość hydroksyapatytu (3.16 g/cm³), δ_{Tk} - gęstość kolagenu (1.34 g/cm³).

2.2.1.3. Korekcja efektu częściowego wypełnienia voxela

Zaczernienie każdego voxela jest proporcjonalne do średniej wartości liniowego współczynnika osłabienia danego fragmentu próbki, który ten voxel reprezentuje. Jednakże warto pamiętać o efekcie częściowego wypełnienia voxela (PVE, *ang. partial volume effect*). Jeżeli w obrębie voxela znajduje się tylko jednorodna substancja, wówczas obraz tomograficzny reprezentuje współczynnik osłabienia tej substancji. Jeśli natomiast w obrębie voxela jest obecny więcej niż jeden materiał (np. na granicy tkanki i ziarna mineralnego), obraz tomograficzny przedstawia uśrednioną wartość liniowych współczynników osłabienia tych substancji, co w efekcie wprowadza rozmycie obrazu na brzegach struktury [96-97]. Omawiany efekt przedstawiono na Rys. 2.5. Częściowe wypełnienie voxela może mieć znaczenie ilościowe i jakościowe. Konsekwencją PVE może być odmienna gęstość i rozmiar badanego obiektu od wartości faktycznych. W przypadku ziaren mineralnych, występujących w tkankach miękkich, PVE może wprowadzać zafałszowanie w wartościach objętości i gęstości.



Rys. 2.5. Wpływ częściowego wypełnienia voxela na obraz badanego obiektu. A) obiekt rzeczywisty, B) rekonstrukcja obiektu; widoczne uśrednienie wartości zaczernienia dla pikseli znajdujących się na krawędzi obiektu. Cyfry 0-10 reprezentują wartości zaczernienia.

W celu oszacowania wpływu PVE na parametry strukturalne oraz umożliwienia korekcji artefaktu skonstruowano program, którego celem jest przeprowadzenie binaryzacji lokalnej. Binaryzacja lokalna oparta jest na *analizie sąsiedztwa* pikseli. Podstawą tej binaryzacji jest ustalenie wartości progowania w oparciu o dopasowanie funkcji Gaussa do maksimum na histogramie rozkładu stopni szarości. Ustalenie wartości progowania zostało oparte o dwa kryteria. W pierwszym kryterium zakres progowania wyznaczono jako wartość średnią i

odchylenie standardowe ($\mu-\sigma$; $\mu+\sigma$). Jeżeli wartość zaczernienia analizowanego voxela spełnia pierwsze kryterium, wówczas voxel jest przypisany do struktury badanego obiektu. Jeśli voxel nie spełnia pierwszego kryterium, zakres progowania zostaje poszerzony i wynosi ($\mu-2\sigma$; $\mu+2\sigma$). Jeżeli wartość zaczernienia analizowanego voxela oraz voxel z nim sąsiadujących znajduje się w zakresie określonym przez drugie kryterium, wówczas analizowany voxel zostaje zaliczony do struktury obiektu. W przeciwnym wypadku voxel nie zostaje wliczony do struktury. Szczegółowy opis programu wraz z wynikami testowymi został zamieszczony w *Dodatku*. Korekcja PVE została przeprowadzona jedynie dla pomiarów wykonanych z rozdzielczością 2 μm . Przy rozdzielczości 13.5 μm poszerzenie zakresu progowania ma nieznaczny wpływ na wartości parametrów, co zostało oszacowane w *Dodatku*.

2.2.2. Spektroskopia fluorescencji rentgenowskiej

Analiza fluorescencyjna promieniowania rentgenowskiego (XRF, X-ray Fluorescence) pozwala na określenie składu pierwiastkowego substancji. Analiza XRF zaliczana jest do metod nieniszczących, tanich i stosunkowo szybkich, dlatego też jest często wykorzystywana przy pomiarach dużej liczby próbek.

Pomiar składu pierwiastkowego depozytów mineralnych oraz kości bełczkowej został wykonany z użyciem spektrometru Oxford 2000 (Oxford Instruments, UK) wyposażonego w lampę rentgenowską ze srebrną anodą oraz półprzewodnikowy detektor krzemowy domieszkowany litem o powierzchni 30 mm² i grubości kryształu 3 mm. Zastosowano maksymalną energię 5 keV i natężenie prądu lampy 1000 μA dla określenia zawartości pierwiastków lekkich (Mg, P, S, Cl, K, Ca) oraz energię 30 keV i natężenie prądu 100 μA z filtrem Ag dla pierwiastków ciężkich ($Z>20$). Limity detekcji wynosiły od kilkudziesięciu ppm (part per milion - 10⁻⁴%) dla pierwiastków lekkich do kilku ppm dla pierwiastków ciężkich.

W celu zmierzenia składu pierwiastkowego depozytów mineralnych, próbki zostały sproszkowane, zważone i zmieszane z czystą parafiną w formie krystalicznej w stosunku 1:10. Sporządzoną mieszaninę przeniesiono do pastylkarki o średnicy matrycy 10 mm i umieszczono pod prasą o nacisku 2 ton i czasem nacisku ~1 minuty. Przygotowane pastylki zostały naniesione na ramkę z pleksi pokrytą membraną polimerową (Formvar) o grubości kilku mikrometrów, a następnie umieszczone w podajniku spektrometru. Stężenia pierwiastków zostały obliczone przy pomocy programu Axil (IAEA Laboratories Seibersdorf, Austria) na podstawie standardów: nr.1486 Bone Meal oraz nr.1577c Bovine Liver (National Institute of

Standards and Technology, USA) z wykorzystaniem procedury obliczeniowej opisanej w pracach [85, 98].

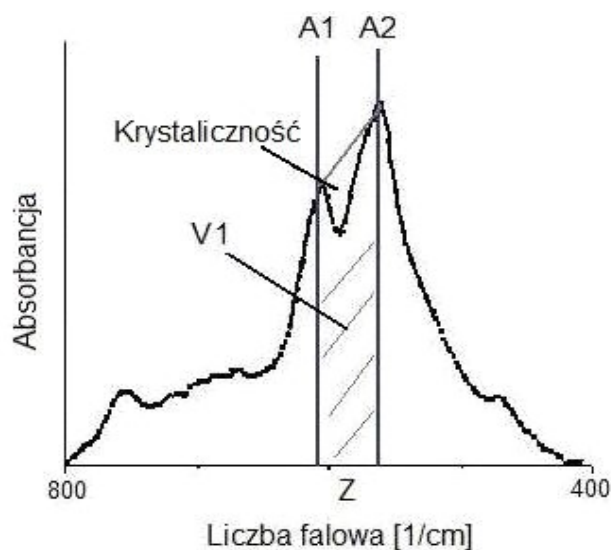
2.2.3. Spektroskopia w podczerwieni

Spektroskopia w podczerwieni jest metodą umożliwiającą analizę drgań cząsteczek związków chemicznych. Dostarcza informacji o strukturze chemicznej związków poprzez identyfikację grup funkcyjnych, jak również pozwala na ilościowe oznaczenie danej substancji w próbce bez konieczności rozdzielania mieszaniny.

Pomiary zostały wykonane z użyciem spektrometru Nicolet 6700 (Thermo Scientific, USA) wyposażonego w zestaw detektorów na zakres $(12000\text{--}50)\text{ cm}^{-1}$ oraz dwa źródła promieniowania, wybierane i przełączane komputerowo, w tym źródło zbudowane z kwarcowej lampy halogenowej z włóknem wolframowym o maksymalnej temperaturze pracy 3000 K emitującej promieniowanie w zakresie bliskiej podczerwieni oraz źródło ceramiczne o temperaturze pracy 1575 K emitujące promieniowanie z zakresu średniej i dalekiej podczerwieni, które pokrywają łącznie zakres $(27000\text{--}20)\text{ cm}^{-1}$. Spektrometr Nicolet 6700 posiada interferometr Michelsona, justowany dynamicznie w trakcie skanowania z częstotliwością odpowiadającą częstotliwości przejść przez zero sygnału lasera, nawet przy maksymalnej szybkości skanowania. Mechanizm dynamicznego justowania wykorzystuje wiązkę lasera He-Ne do monitorowania i utrzymywania idealnego względnego położenia kąтового zwierciadeł interferometru.

Pomiary przeprowadzono w absorbancji wykonując 32 skany każdej próbki z rozdzielczością 4 cm^{-1} . Próbkę do pomiarów FTIR zostały przygotowane techniką pastylki KBr. Zmieszano każdorazowo 2 mg sproszkowanej próbki z 200 mg KBr. Mieszaninę umieszczano w pastylkarce, a następnie w prasie pod naciskiem 6 ton, podłączonej do pompy próżniowej przez czas około 2 minut. Przy każdej serii pomiarów wykonano pomiar widma tła (pastylka KBr). Przygotowane pastylki natychmiast umieszczano w uchwycie magnetycznym spektrometru. Analiza widmowa została przeprowadzona przy pomocy oprogramowania OMNIC [99]. Wczytane widma zostały poddane automatycznej korekcji linii bazowej i wygładzaniu z użyciem filtra Savitzky-Golay [100]. Za pomocą kursora wybrano zakres widma $(1950\text{--}400)\text{ cm}^{-1}$ zawierającego pasma amidowe i linie widmowe od fazy nieorganicznej. W analizie widm skupiono uwagę na pasmach PO_4 ($450\text{--}650$ i $900\text{--}1200$) cm^{-1} pochodzących od potrójnie zdegenerowanych antysymetrycznych drgań rozciągających P-O oraz P_2O_7 (850--

1250) cm^{-1} pochodzącym od fazy nieorganicznej, a także na pasmach amidowych: Amid I (1580-1720) cm^{-1} i Amid II (1480-1580) cm^{-1} , związanych z matrycą organiczną. Powierzchnię pasm amidowych wyznaczono metodą całkowania. Procedury obliczeniowe zostały przedstawione w materiałach do oprogramowania OMNIC [99]. Podobnie postępowano licząc powierzchnię pasm PO_4 i CO_3 . W celu wyznaczenia zawartości frakcji mineralnej w stosunku do materiału organicznego obliczono stosunek powierzchni pasm $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ (900–1200 / 1580–1720) cm^{-1} . Stosunek zawartości węglanów do fosforanów (CO_3/PO_4) został wyrażony, jako stosunek powierzchni pasm w zakresach (850–900) cm^{-1} i (900–1200) cm^{-1} . Obliczono także powierzchnię pasma HPO_4 przy 1145 cm^{-1} oraz stosunek pasm (HPO_4/PO_4) (1145 cm^{-1} / (900-1200) cm^{-1}). Grupa PO_4 wykazuje obecność dwóch pasm w zakresie (450–650) cm^{-1} , związanych z potrójnie zdegenerowanymi drganiami zginającymi O-P-O. Rozszczepienie pasma w tym zakresie jest miarą krystaliczności struktury [98]. PO_4 w formie amorficznej nie wykazuje rozszczepienia na widmach w podczerwieni. Krystaliczność minerałów została zdefiniowana w pracy [98]. Obliczenia przeprowadzono według równania (2.8) i (2.9) oraz zgodnie z oznaczeniami na Rys. 2.6.



Rys. 2.6. Fragment widma FTIR w zakresie pasma $\nu_4\text{PO}_4$ przedstawiający sposób obliczania krystaliczności minerału. A1, A2- wysokość maksimów, V1- pole powierzchni pasma pomiędzy maksimami, Z- zakres wartości liczb falowych pomiędzy maksimami.

$$\frac{A1+A2}{2} * Z = T \quad (2.8)$$

$$T - V1 = \text{Krystaliczność} \quad (2.9)$$

2.2.4. Dyfraktometria rentgenowska

Dyfraktometria rentgenowska jest rutynowo stosowaną techniką, służącą do wyznaczania struktury krystalograficznej substancji. Wraz ze spektroskopią FTIR została wykorzystana do analizy strukturalnej depozytów mineralnych. Badania dyfrakcyjne przeprowadzono na Wydziale Chemii Uniwersytetu Jagiellońskiego z wykorzystaniem dyfraktometru proszkowego X'Pert PRO MPD (PANalytical, Holandia) o geometrii pomiarowej Bragg-Brentano (źródło promieniowania, próbka oraz detektor umieszczone są na jednym okręgu ogniskowania o zmiennym promieniu) ze źródłem promieniowania $\text{CuK}\alpha$ (długość fali $\lambda = 1.54 \text{ \AA}$). Sproszkowane próbki wprasowano w uchwyt krzemowy. Próbki zostały zmierzone w temperaturze 298 K, zakresie kątowym 2θ od 10° do 70° i krokiem pomiarowym 0.01° . Napięcie na lampie rentgenowskiej wynosiło 40 kV, natężenie 30 mA. Ze względu na to, że głównym celem było ustalenie, jakie fazy krystaliczne wchodziły w skład próbek, analizowano tylko pozycje maksimów dyfrakcyjnych. Dlatego też nie stosowano procedury wygładzania widma i analizy intensywności pasm.

Obrazy dyfrakcyjne analizowano z wykorzystaniem baz danych PDF-4+ (Powder Diffraction Files) [101]. Bazy te są tworzone i aktualizowane w Międzynarodowym Centrum Danych Dyfrakcyjnych (ICDD) w Pensylwanii. Identyfikacja polegała na dopasowaniu obrazu dyfrakcyjnego na podstawie pozycji maksimów do danych, zawartych w bazie PDF. Zbiór danych dla konkretnego związku zawiera informacje o nazwie związku, wzorze sumarycznym, odległościach międzypłaszczyznowych ze wskaźnikami Millera, intensywności refleksów itp. Opracowanie wyników wykonano z użyciem oprogramowania X'pert HighScore [X'Pert HighScore v. 2.2.5; PANalytical B. V., Almelo, Holandia. 2009.] i OriginPro 7.5.

2.3. Analiza statystyczna

Analizie statystycznej zostały poddane parametry morfologiczne, parametry FTIR oraz skład pierwiastkowy. Różnice istotne statystycznie zostały obliczone z użyciem testu Fisher'a (LSD, *ang. Least Significant Difference*). Test polega na odszukaniu najmniejszej różnicy dwóch średnich, która przy określonym poziomie ufności uznawana jest za istotną statystycznie. Wszystkie różnice pomiędzy parami średnich są następnie porównane z wartością LSD. Jeśli bezwzględna wartość różnicy średnich z próby jest większa niż wartość LSD, to można uznać, że jest ona istotna statystycznie [102]. Dodatkowo określono współczynnik korelacji Pearson'a i częściowe współczynniki korelacji w celu wyeliminowania wpływu wieku pacjentów. Analiza statystyczna została przeprowadzona z użyciem programu Statgraphic Centurion XVI ver. 16.1.18 (Statpoint Technologies, Warrenton, USA), z poziomem ufności 0.05.

3. Wyniki pomiarów

3.1. Kość beleczkowa

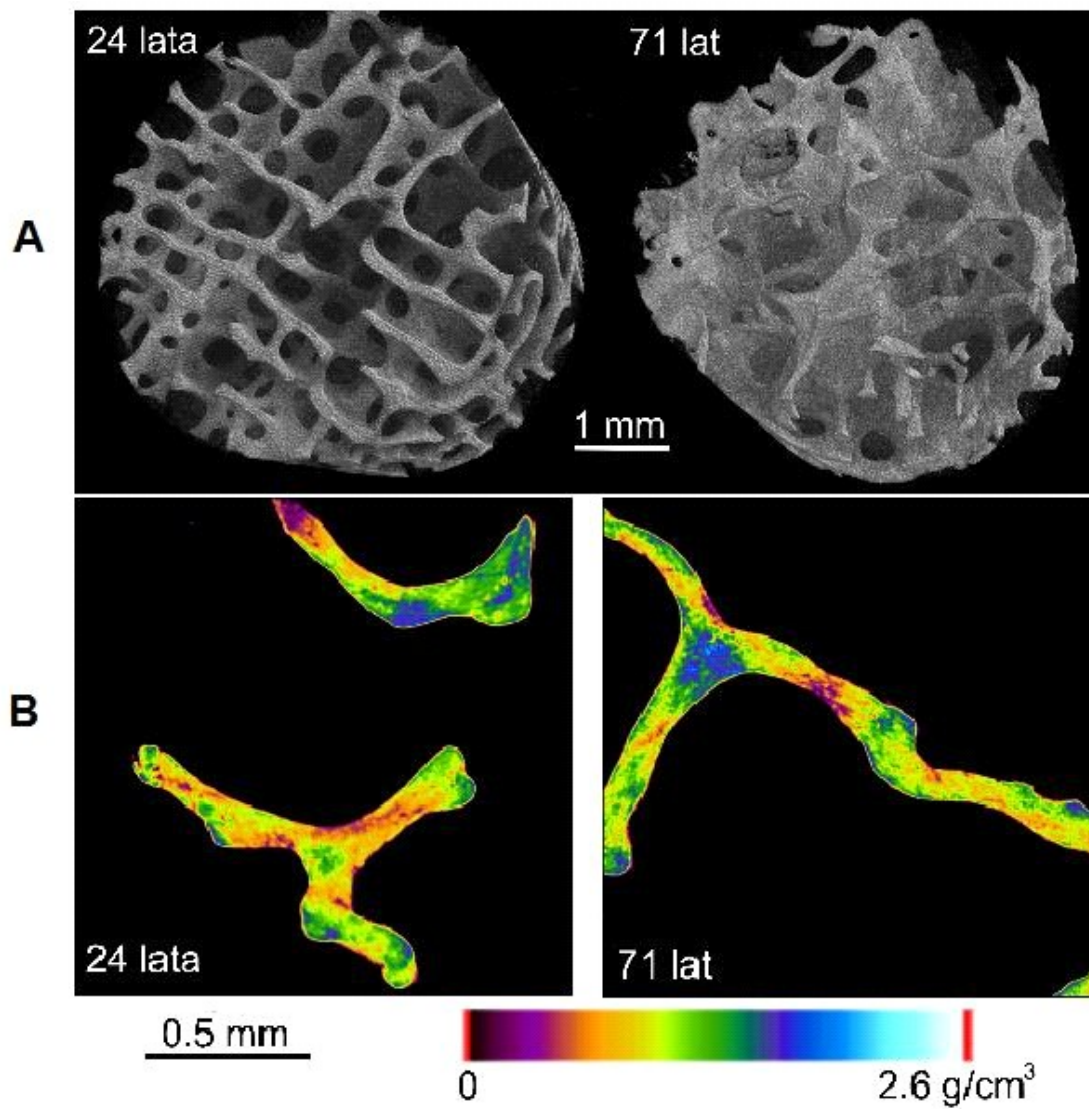
Trójwymiarowe obrazy μ -CT kości beleczkowych pacjentów młodych (24 – 50 lat) i w podeszłym wieku (70 – 81 lat), wykazały znaczącą różnicę w budowie struktury beleczkowej (Rys. 3.1 A). Zasadniczą różnicą pomiędzy porównywanymi grupami pacjentów był zanik beleczek kostnych u osób starszych. Wyniki nie wykazały różnic w gęstości beleczek kostnych pomiędzy grupami pacjentów (Rys. 3.1 B), natomiast zdecydowanie można stwierdzić spadek procentowej objętości kości beleczkowej u starszych pacjentów. Wartość parametru BV/TV wyniosła 21.3% dla młodych i 11.8% dla starszych pacjentów.

Pomiary XRF kości beleczkowych wykazały obecność Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn, Sr we wszystkich próbkach. Dodatkowo w dwóch próbkach wystąpiły Ni, Br i Rb. Średnią zawartość pierwiastków wraz z odchyleniem standardowym dla pacjentów w dwóch grupach wiekowych oraz porównanie z wartościami literaturowymi dla pacjentów w wieku 15 - 60 lat zebrano w tabeli 3.1 (str. 42). Przykładowe widmo charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego kości przedstawiono na Rys. 3.2 (str. 43).

Wysoki współczynnik korelacji Ca – P ($R = 0.97$) jednoznacznie wskazuje, że kość zbudowana jest ze związków wapniowo-fosforanowych. Odnotowano niską korelację Mg – Ca ($R = 0.54$) oraz Sr – Ca ($R = 0.4$). Statystycznie znaczące korelacje pomiędzy pozostałymi pierwiastkami nie zostały zaobserwowane. Nie odnotowano istotnych statystycznie różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy grupami pacjentów z wyjątkiem zawartości Ca i P.

Przykładowe widmo FTIR kości beleczkowej (wiek 40 i 71 lat) w zakresie (2000–400) cm^{-1} zaprezentowano na Rys. 3.3 (str. 44). Otrzymane widma wskazują na występowanie grupy PO_4 i materiału organicznego w badanych próbkach kości. Dla młodych pacjentów, najintensywniejsze pasma absorpcyjne pochodzą od grupy fosforanowej, których maksima mieszczą się w zakresie (1035–1040) cm^{-1} . W przypadku starszych pacjentów najintensywniejsze pasmo stwierdzono dla materiału organicznego. O obecności grupy PO_4 świadczą również pasma (470–650) cm^{-1} . Materia organiczna w badanych próbkach jest reprezentowana przez pasma amidowe w zakresie (1500–1800) cm^{-1} . Obliczono średnie wartości parametrów PO_4/Amid , CO_3/PO_4 , HPO_4/PO_4 oraz krystaliczność próbki. Otrzymane

wyniki zamieszczono w tabeli 3.2 (str. 43). Statystycznie istotne korelacje zanotowano dla P – PO₄/Amid I (R = 0.60), P – krystaliczność (R = 0.63), Ca – PO₄/Amid I (R = 0.5) oraz Ca – krystaliczność (R = 0.62).

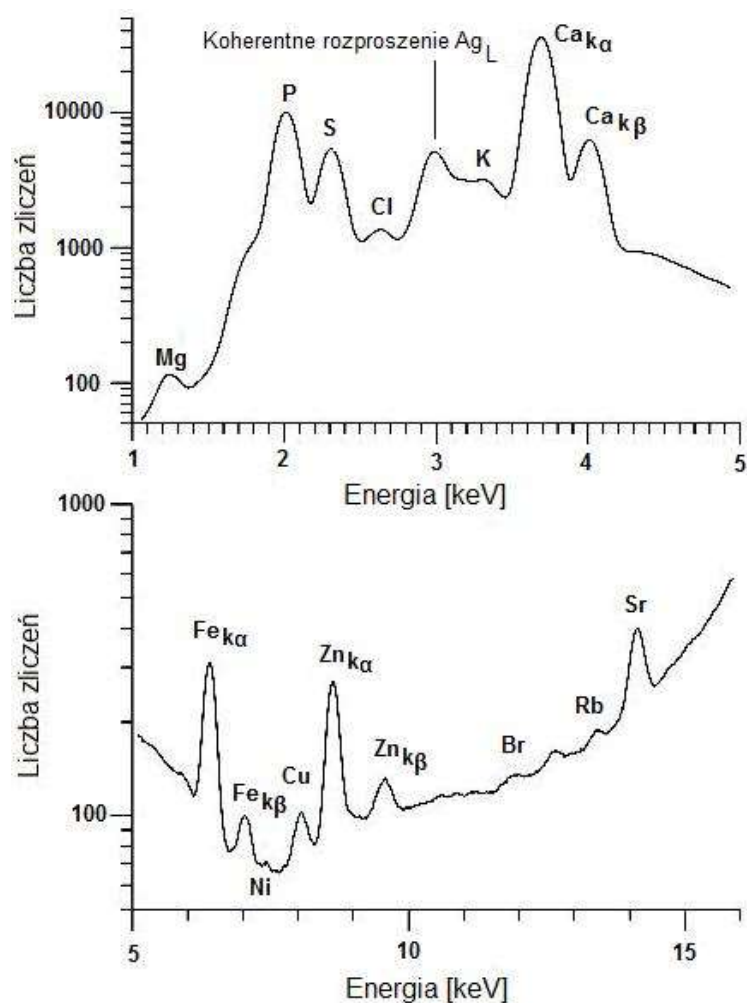


Rys. 3.1. A- Przykładowy trójwymiarowy model kości beleczkowej pacjentów w wieku 24 i 71 lat oraz B- dwuwymiarowy przekrój przez beleczkę kostną wraz z rozkładem gęstości w beleczce.

Pierwiastek	Grupa (24 – 50 lat)	Grupa (70 – 81 lat)	Dane literaturowe
Mg [%]	0.5 ± 0.08	0.45 ± 0.05	0.3 ± 0.1 ^[103]
P [%]	16 ± 3.0	11.5 ± 2.4	11 ± 1 ^[103]
S [%]	0.2 ± 0.02	0.23 ± 0.04	0.24 ^[103]
Cl [%]	0.14 ± 0.03	0.14 ± 0.02	0.13 ± 0.3 ^[104]
K [ppm]	478 ± 39	317 ± 58	570 ± 250 ^[105]
Ca [%]	32 ± 4.0	23.5 ± 4	24 ± 6 ^[105]
Fe [ppm]	77 ± 36	78 ± 24	47 ± 33 ^[105]
Cu [ppm]	0.5 ± 0.2	1.0 ± 0.57	0.6 ± 0.2 ^[105]
Zn [ppm]	140 ± 13	164 ± 50	130 ± 24 ^[103]
Sr [ppm]	231 ± 60	218 ± 97	263 ± 10 ^[105]
Ca/P	1.94 ± 0.2	1.99 ± 0.1	2.07 ± 0.22 ^[106]

Tab. 3.1. Skład pierwiastkowy kości beleczkowej (średnia $\pm$ odchylenie standardowe) pacjentów młodych i w podeszłym wieku wraz z porównaniem z danymi literaturowymi.

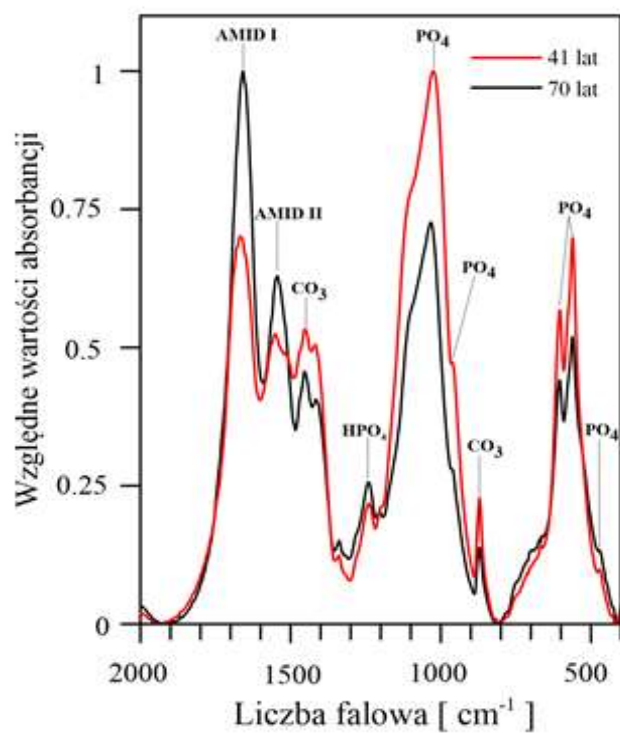
Dodatkowym materiałem porównawczym były zęby, pozyskane od pacjentów w wieku (50 - 70) lat. Przeprowadzono analizę mikrotomograficzną oraz FTIR zębiny i szkliwa zębowego. Wyznaczona gęstość zębiny wyniosła (1.65 ± 0.1) g/cm³, natomiast gęstość szkliwa była równa (2.65 ± 0.2) g/cm³. Na Rys. 3.4 (str. 44) przedstawiono przykładowe widmo FTIR obu struktur zębowych. Parametry, obliczone na podstawie widm FTIR dla zębiny wynosiły: PO₄/Amid I (2.2 ± 0.6), CO₃/PO₄ (0.025 ± 0.008), HPO₄/PO₄ (0.17 ± 0.007), krystaliczność (0.7 ± 0.2), natomiast dla szkliwa były równe: PO₄/Amid I (9.9 ± 1.2), CO₃/PO₄ (0.009 ± 0.002), HPO₄/PO₄ (0.09 ± 0.01), krystaliczność (1.2 ± 0.2). Zestawienie wartości parametrów FTIR dla materiału porównawczego oraz dla depozytów mineralnych zamieszczono w tabeli 3.4 (str.49).



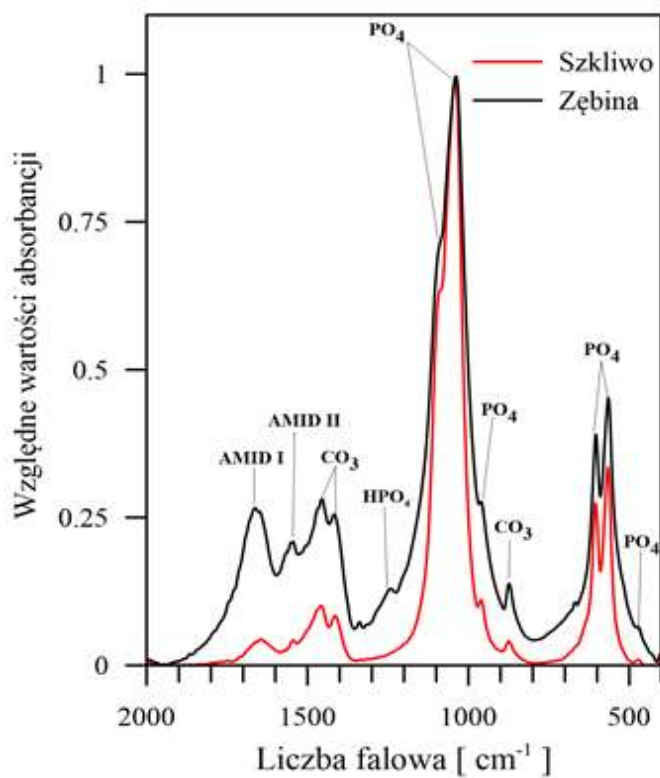
Rys. 3.2. Przykładowe widma charakterystycznego promieniowania rentgenowskiego kości pacjenta w wieku 70 lat.

Parametr	Grupa (24 – 50 lat)	Grupa (70 – 81 lat)
PO ₄ /Amid I	1.6 ± 0.8	0.8 ± 0.5
CO ₃ /PO ₄	0.035 ± 0.005	0.025 ± 0.019
HPO ₄ /PO ₄	0.06 ± 0.05	0.1 ± 0.08
Krystaliczność	0.8 ± 0.4	0.34 ± 0.2

Tab. 3.2. Średnie wartości parametrów wraz z odchyleniem standardowym obliczone na podstawie widm FTIR dla kości beleczkowej pacjentów w dwóch grupach wiekowych.



Rys. 3.3. Widma FTIR kości beleczkowej pacjentów w wieku 41 i 70 lat. Dla obu widm wykonano skalowanie danych względem wartości maksymalnej.



Rys. 3.4. Widmo FTIR zębiny i szkliwa zębowego.

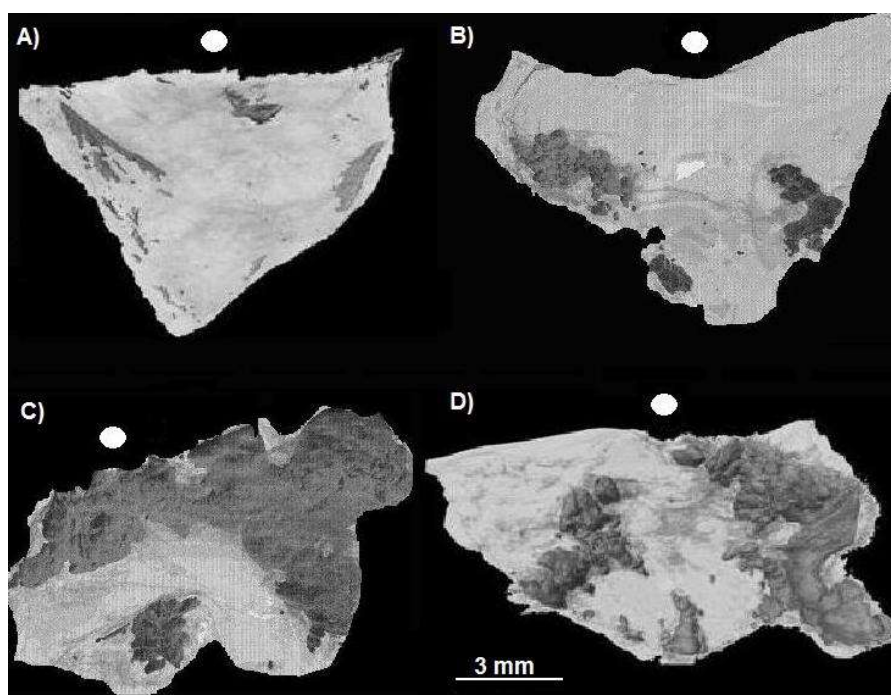
3.2. Płatki zastawek aortalnych

Część zaprezentowanych wyników pomiarów mineralizacji płatków zastawek aortalnych została opublikowana w pracy [107]. W płatkach zidentyfikowano masywne złoże mineralne obejmujące, w niektórych przypadkach, nawet 40% powierzchni płatka. Na rysunku 3.5 przedstawiono rozmieszczenie depozytów mineralnych w płatkach. Część spośród płatków charakteryzowała się skąpą mineralizacją, a depozyty zlokalizowano głównie na brzegach płatków, w kilku przypadkach stwierdzono ich obecność w części centralnej oraz w miejscu przyczepu płatka do pierścienia włóknistego. Pomiary μ -CT pozwoliły na obliczenie gęstości i objętości depozytów. Na przekroju płatka, zmierzonego z rozdzielczością 13.5 μm , można zaobserwować, że faza mineralna złożona jest z ziaren mineralnych wbudowanych we włóknistą matrycę organiczną (Rys. 3.6). Depozyty mineralne w płatkach zastawek aortalnych charakteryzowały się różną gęstością. Rozkład gęstości dla dwóch różnych ziaren mineralnych wraz z porównaniem do gęstości zęba i kości beleczkowej przedstawiono na Rys. 3.7. Rysunek 3.8 przedstawia histogram gęstości dwóch wybranych depozytów w płatku z zaznaczonymi gęstościami charakterystycznymi dla innych zmineralizowanych struktur. Wartości na histogramie wskazują na szeroki zakres gęstości depozytów mineralnych (1.5 - 2.8) g/cm^3 , które nie osiągają gęstości stechiometrycznego hydroksyapatytu. Średnia gęstość wyniosła $(2.20 \pm 0.25) \text{g}/\text{cm}^3$. W celu precyzyjnej analizy struktury depozytów, powtórzono pomiary μ -CT z wyższą zdolnością rozdzielczą (2 μm). Rozkład gęstości depozytów, obliczony przy wykorzystaniu dwóch zdolności rozdzielczych (2 μm i 13.5 μm), był identyczny. Obliczono także gęstość materiału organicznego w płatkach, która dla grupy stenotycznej wynosiła $(1.08 \pm 0.09) \text{g}/\text{cm}^3$ i była niemal identyczna jak w grupie kontrolnej $(1.09 \pm 0.07) \text{g}/\text{cm}^3$.

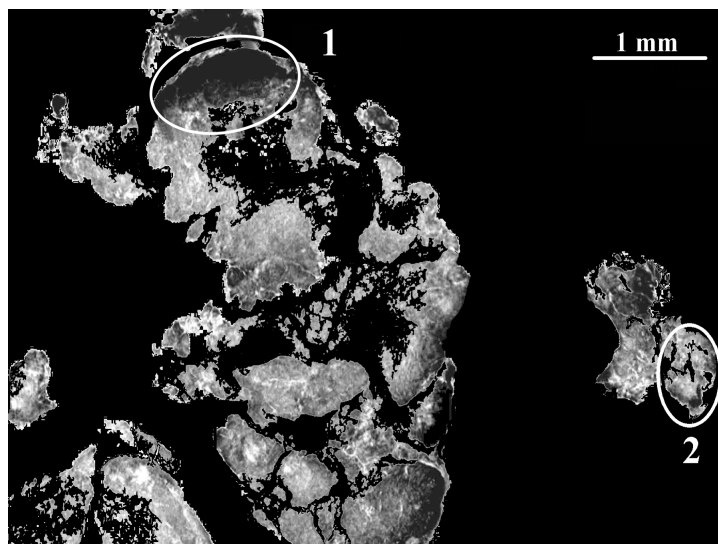
Wyznaczone objętości depozytów znajdowały się w zakresie (0.001 - 0.3) mm^3 , a średnia wartość objętości była równa $(0.09 \pm 0.18) \text{mm}^3$. Podobnie obliczono objętość płatków, która w grupie stenotycznej wynosiła $(257 \pm 140) \text{mm}^3$, a w kontrolnej $(210 \pm 60) \text{mm}^3$. Obliczono, że średni stosunek objętości depozytów do objętości płatków zastawek z masywną mineralizacją wynosił 0.42 ± 0.19 .

Na podstawie pomiarów XRF zidentyfikowano we wszystkich próbkach płatków zastawek następujące pierwiastki: Mg, P, S, Cl, K, Ca, Fe, Cu, Zn i Sr. Średnie stężenia pierwiastków oraz zakres ich wartości przedstawiono w tabeli 3.3 (str. 48). Stwierdzono silną korelację pomiędzy Ca-P ($R = 0.96$) oraz Ca-Sr ($R = 0.71$). Nie stwierdzono natomiast korelacji Mg z zawartością Ca i P.

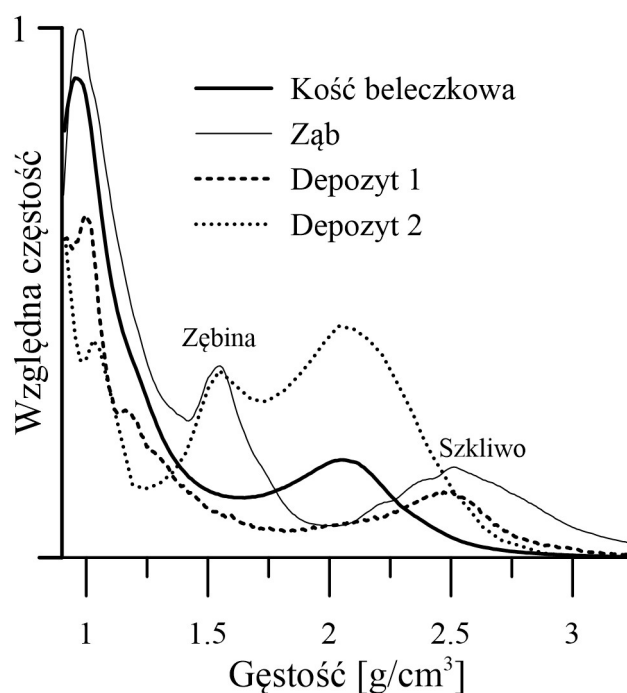
Przykładowe widma FTIR depozytu mineralnego, kości, zębiny i szkliwa zębowego w zakresie $(2000-400) \text{ cm}^{-1}$ zaprezentowano na Rys. 3.9. Otrzymane widma wskazują na występowanie we wszystkich badanych próbkach grupy PO_4^{3-} , CO_3^{2-} a także materii organicznej. Należy przy tym zauważyć wyraźną różnicę w intensywności pasm amidowych, która w przypadku szkliwa zębowego jest znacząco niższa w porównaniu z intensywnością dla depozytów mineralnych, kości i zębiny. Średnie wartości parametrów $\text{PO}_4/\text{Amid I}$, CO_3/PO_4 , HPO_4/PO_4 oraz krystaliczność dla depozytów, kości oraz zębiny i szkliwa zębowego zamieszczono w tabeli 3.4 (str.49). Wartości parametrów FTIR wyraźnie wskazują na odmienność szkliwa zębowego od pozostałych analizowanych struktur. Stosunek $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ potwierdza znaczący udział frakcji nieorganicznej w próbkach szkliwa oraz wysoki udział fazy organicznej w pozostałych strukturach. Istotną statystycznie różnicę w porównaniu z wartościami dla depozytów zanotowano także dla krystaliczności, która w przypadku szkliwa była większa o około 50%. Zgodnie z oczekiwaniami, statystycznie istotne korelacje zanotowano dla P i $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ ($R = 0.63$), P i krystaliczności ($R = 0.56$), Ca i $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ ($R = 0.66$) oraz Ca i krystaliczności ($R = 0.60$). Nie zaobserwowano korelacji składu pierwiastkowego, parametrów FTIR i $\mu\text{-CT}$ z wiekiem pacjentów i/lub płcią.



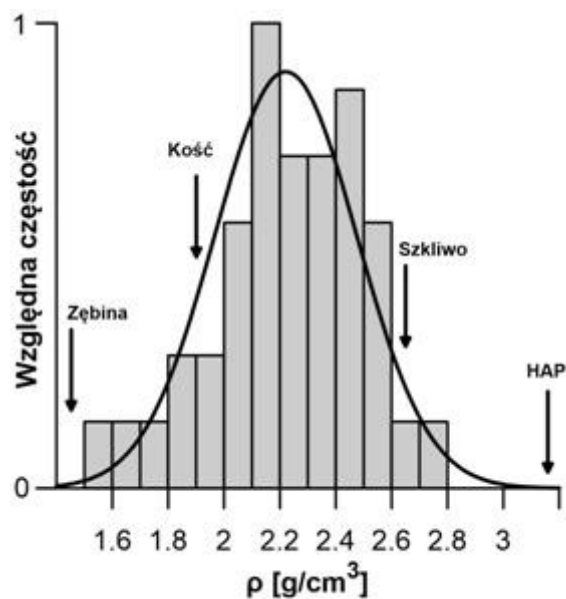
Rys. 3.5. Płatki zastawek aortalnych ze skąpą (A, B) i masywną mineralizacją (C, D). Górna wartość progowania dla tkanki oznaczona kolorem białym oraz dolna wartość dla depozytów mineralnych oznaczona kolorem szarym. Biały punkt wskazuje stronę, z której płatek łączy się z pierścieniem włóknistym zastawki.



Rys. 3.6. Przekrój przez depozyt mineralny (rozdzielczość $13.5\ \mu\text{m}$). Zaznaczono dwa obszary (1 i 2) wyraźnie różniące się gęstością- kolor czarny odpowiada niższej gęstości materiału. Rekonstrukcja została wykonana w płaszczyźnie równoległej do powierzchni płátka.



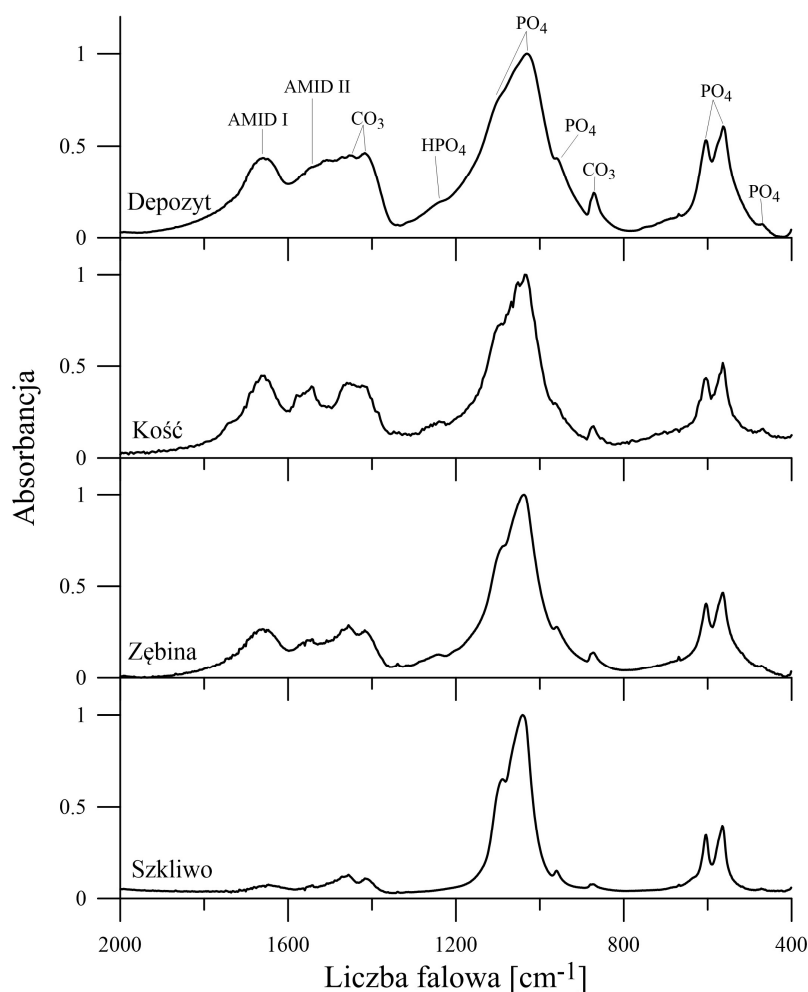
Rys. 3.7. Rozkład gęstości dla dwóch depozytów (oznaczonych 1 i 2 na Rys. 3.6). Dla porównania przedstawiono rozkład gęstości w kości beleczkowej oraz w zębie z zaznaczeniem gęstości charakterystycznej dla zębiny i szkliva zębowego. Maksima dla wartości poniżej $1.5\ \text{g/cm}^3$ odnoszą się do matrycy organicznej.



Rys. 3.8. Histogram rozkładu gęstości (ρ) depozytów mineralnych w płatku zastawki aortalnej. Zaznaczono wartości gęstości charakterystyczne dla szkliwa, zębiny, kości i stechiometrycznej formy hydroksyapatytu (HAP). Linia ciągła - rozkład normalny.

Pierwiastek	Średnia $\pm$ odchylenie standardowe (zakres)
Mg (%)	0.85 ± 0.5 (0.65-1.0)
P (%)	12 ± 2 (10-15)
S (%)	0.46 ± 0.03 (0.43-0.52)
Cl (%)	0.29 ± 0.08 (0.12-0.44)
K (%)	0.035 ± 0.006 (0.013-0.046)
Ca (%)	23 ± 3 (19-28)
Fe (ppm)	30 ± 19 (11-72)
Cu (ppm)	1.8 ± 0.6 (1.2-2.9)
Zn (ppm)	220 ± 120 (130-296)
Sr (ppm)	79 ± 25 (44-95)
Ca/P	1.9 ± 0.1 (1.7-2.06)

Tab. 3.3. Skład pierwiastkowy depozytów mineralnych w płatkach zastawek aortalnych.



Rys. 3.9. Widmo FTIR depozytu mineralnego w zastawce aortalnej. Dla porównania przedstawiono widma kości beleczkowej, zębiny oraz szkliwa zębowego.

Parametr	Depozyt	Kość	Zębina	Szkliwo
PO ₄ /Amid I	2.0 ± 0.3	1.2 ± 0.6	2.2 ± 0.6	9.9 ± 1.2*
CO ₃ /PO ₄	0.035 ± 0.007	0.03 ± 0.01	0.025 ± 0.008	0.009 ± 0.002*
HPO ₄ /PO ₄	0.15 ± 0.08	0.08 ± 0.06	0.17 ± 0.07	0.09 ± 0.01*
Krystaliczność	0.7 ± 0.12	0.57 ± 0.3	0.7 ± 0.2	1.2 ± 0.2*

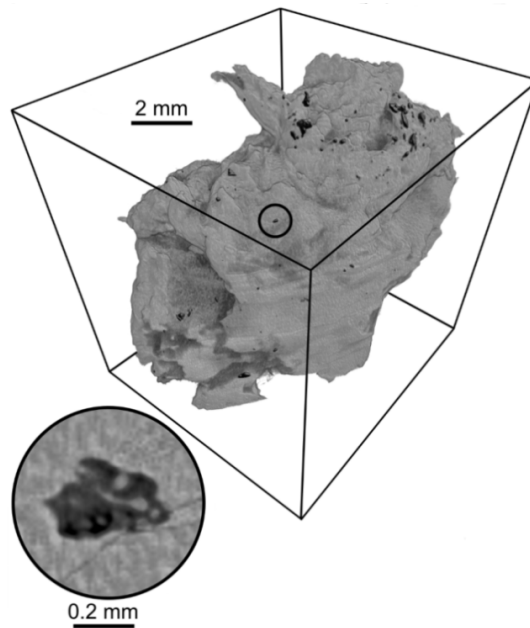
Tab. 3.4. Parametry obliczone na podstawie widm FTIR (średnia ± odchylenie standardowe) dla depozytów w płatkach, kości, zębiny i szkliwa zębowego. * - oznacza różnice istotne statystycznie w porównaniu z wartościami dla depozytów.

3.3. Węzadła żółte

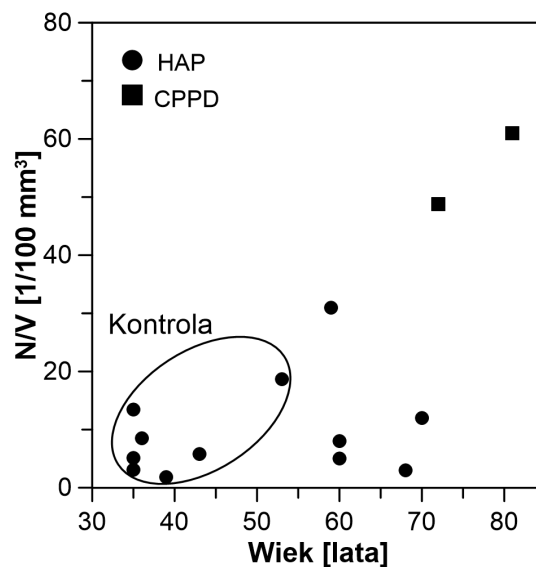
Przedstawione wyniki fizykochemicznej i morfologicznej analizy mineralizacji więzadeł żółtych zostały opublikowane w pracy [108]. Trójwymiarowe obrazy μ -CT wykazały obecność mineralnych depozytów w 14 na 24 próbek więzadeł żółtych, zarówno w grupie stenotycznej (7) jak i w grupie kontrolnej (7). Przykład rozmieszczenia depozytów w więzadle, zmierzonym przy pomocy mikrotomografii z rozdzielczością $13.5\text{ }\mu\text{m}$, został zaprezentowany na Rys. 3.10. Można zauważyć, że depozyty mineralne są rozproszone w próbce i trudno zaobserwować prawidłowość w ich rozmieszczeniu. Objętość minerałów w 100 mm^3 próbki (V_g/V) wyniosła $(0.10 \pm 0.12)\%$, a jej zakres $(0.02 - 0.5)\%$ dla grupy stenotycznej oraz $(0.06 \pm 0.07)\%$ (zakres $0.01 - 0.2\%$) dla grupy kontrolnej. Liczba minerałów przypadająca na 100 mm^3 próbki (N/V) była równa 12 ± 13 (zakres $2 - 60$) dla grupy stenotycznej oraz 8 ± 6 (zakres $2 - 18$) dla grupy kontrolnej. Zanotowano korelację parametru V_g/V z wiekiem pacjentów ($R = 0.62$). Równocześnie nie stwierdzono wyraźnej korelacji N/V z wiekiem ($R = 0.43$). Zależność liczby ziaren w 100 mm^3 próbki od wieku pacjenta przedstawiono na Rys. 3.11.

W celu szczegółowej analizy struktury minerałów, wybrane ziarna zmierzono ponownie z rozdzielczością $2\text{ }\mu\text{m}$. Pomiary dowiodły, że depozyty posiadają heterogeniczną strukturę i w rzeczywistości są mieszaniną materiału organicznego i małych ziaren mineralnych (Rys. 3.10). Zakładając, że ziarno mineralne w LF składa się z hydroksyapatytu (HAP) (gęstość 3.16 g/cm^3) i kolagenu (gęstość 1.34 g/cm^3) możliwe było oszacowanie procentowej zawartości fazy mineralnej w ziarnach zgodnie z równaniem (2.7). Obliczenia wskazują, że zawartość frakcji mineralnej w ziarnie wynosi $(10 - 80)\%$. Ze względu na znacznie wyższy udział tkanki miękkiej w stosunku do zawartości minerałów w próbce (dominujące pasma od matrycy organicznej), zdecydowano o wyekstrahowaniu depozytów mineralnych z próbek w celu przeprowadzenia analizy fizykochemicznej. Do ekstrakcji wybrano ziarna o wielkości $(0.13 - 0.6)\text{ mm}^3$.

Pomiary XRF pozwoliły na określenie zawartości Ca, P, S, Cl, K, Fe i Zn we wszystkich próbkach. Nie zaobserwowano statystycznie znaczących różnic w składzie pierwiastkowym pomiędzy grupami. Średni skład pierwiastkowy dla grupy stenotycznej i grupy kontrolnej przedstawiono w Tab. 3.5 (str. 52). Należy zwrócić uwagę, iż wartość stosunku Ca/P jest zbliżona w obu grupach zawierających depozyty HAP i wynosi ~ 1.7 , przy czym w dwóch przypadkach z grupy stenotycznej wartość ta wyraźnie odbiega od wartości dla HAP i jest równa $\text{Ca/P} = 1.1$. Wskazuje to na chemicznie odmienną strukturę minerałów. Rozpoznano dwa składy chemiczne depozytów mineralnych i rozdzielono je podczas analizy.



Rys. 3.10. Zrekonstruowany obraz wiązadła żółtego (grupa stenotyczna) o dwóch wartościach progowania. Górna wartość progowania (kolor szary) odnosi się do tkanki miękkiej, dolna wartość (czarny) to ziarna mineralne. Pomiar z rozdzielczością $13.5 \mu\text{m}$. Zaznaczono obszar zmierzony ze zdolnością rozdzielczą $2 \mu\text{m}$. Przedstawiono dwuwymiarowy przekrój tego obszaru z opisanym powyżej progowaniem.



Rys. 3.11. Liczba minerałów w 100 mm^3 próbki (N/V) w zależności od wieku pacjenta. Zaznaczono punkty należące do grupy kontrolnej, pozostałe punkty dotyczą grupy stenotycznej.

Pierwiastek	HAP –kontrola	HAP –stenoza	CPPD –stenoza
P [%]	7.1 ± 4.1	7.3 ± 3.1	8.3
S [%]	0.19 ± 0.13	0.2 ± 0.11	0.2
Cl [%]	0.03 ± 0.01	0.05 ± 0.03	0.02
K [ppm]	235 ± 126	289 ± 101	288
Ca [%]	15 ± 7.1	17 ± 11	20
Fe [ppm]	161 ± 43	206 ± 70	122
Zn [ppm]	295 ± 98	356 ± 41	73
Ca/P	1.6 ± 0.61	1.8 ± 0.8	1.1

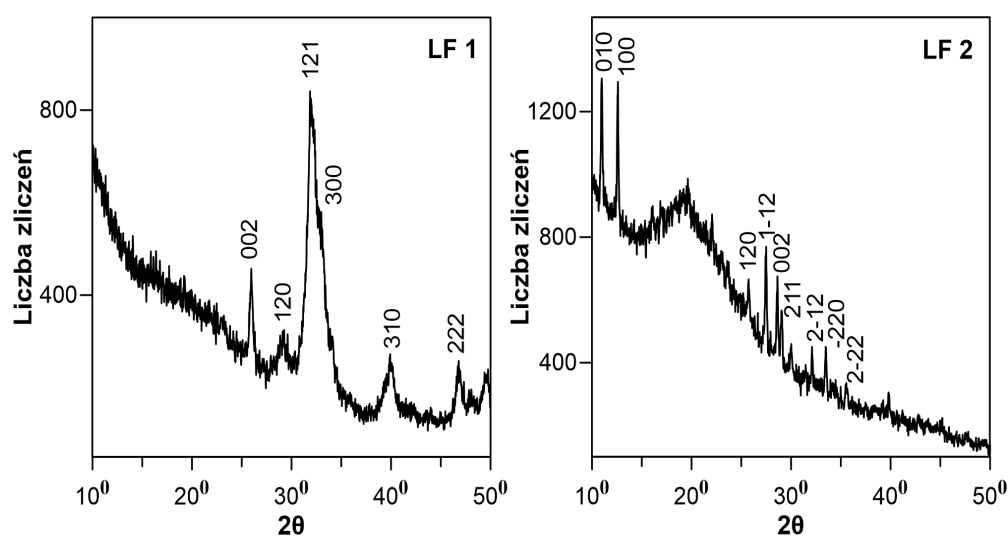
Tab. 3.5. Skład pierwiastkowy depozytów w próbkach więzadeł żółtych. Podano średnie wartości i odchylenie standardowe dla depozytów HAP i średnie wielkości dla depozytów CPPD.

Wysoki współczynnik korelacji dla Ca-P ($R = 0.97$) potwierdza jednoznacznie, że minerały w LF zbudowane są z fosforanów wapnia. Nie stwierdzono obecności innych korelacji pomiędzy pierwiastkami, z wyjątkiem zawartości Zn. Zawartość Zn koreluje z zawartością P ($R = 0.89$) oraz Ca ($R = 0.96$). Należy zaznaczyć brak korelacji składu pierwiastkowego z parametrami morfologicznymi oraz wiekiem pacjentów.

Wyniki XRD wskazują, że główną fazą krystaliczną depozytów jest hydroksyapatyt (HAP). Zaobserwowano obecność wszystkich charakterystycznych refleksów dla HAP [109]. W dwóch próbkach, o stosunku Ca/P ~ 1.1 , zidentyfikowano obecność dwuwodnego pirofosforanu wapnia (CPPD – $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$). Kryształy CPPD zostały jednoznacznie rozpoznane na podstawie dziewięciu refleksów (Rys. 3.12).

Otrzymane widma FTIR potwierdzają wyniki XRD. Widma w zakresie (2000 – 400) cm^{-1} dla dwóch depozytów przedstawiono na Rys. 3.13. Wyniki potwierdziły, że główną fazą mineralną próbek LF stanowi hydroksyapatyt, z wyjątkiem dwóch przypadków, w których stwierdzono obecność kryształów CPPD. Zidentyfikowano pasma $\nu_3\text{PO}_4$ (900–1200) cm^{-1} , $\nu_4\text{PO}_4$ (450–650) cm^{-1} , δCO_3 (860 cm^{-1}) i $\nu_3\text{CO}_3$ (1400–1450) cm^{-1} , a niewielkie rozszczepienie pasma w zakresie (1400–1450) cm^{-1} sugeruje obecność węglano-hydroksyapatytu typu B. Oznacza to, że jony CO_3 podstawiane są w miejsce jonów PO_4 w strukturze HAP. Struktura ta wykazuje charakterystyczny dublet linii absorpcyjnych przy 1456 cm^{-1} i 1422 cm^{-1} , co potwierdza rozkład widma na podpasma [110]. Średnie wartości parametrów $\text{PO}_4/\text{Amid I}$,

CO₃/PO₄, HPO₄/PO₄ oraz krystaliczność depozytów w LF zamieszczono w tabeli 3.6 (str. 54). Nie stwierdzono statystycznie istotnych różnic w wartościach parametrów FTIR pomiędzy grupą badawczą i kontrolną. Zanotowano natomiast statystycznie istotne korelacje w grupie kontrolnej dla P i PO₄/Amid I (R = 0.7), P i krystalicznością (0.65), Ca i PO₄/Amid I (R = 0.57), Ca i krystalicznością (R = 0.62), natomiast w grupie stenotycznej dla P i PO₄/Amid I (R = 0.66), P i krystalicznością (0.78), Ca i PO₄/Amid I (R = 0.6), Ca i krystalicznością (R = 0.68) oraz Zn i PO₄/Amid I (R = 0.96).

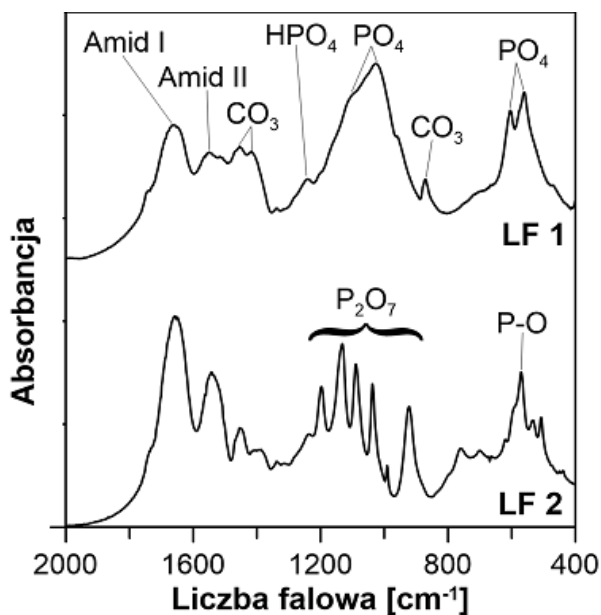


Rys. 3.12. Dyfraktogramy dla dwóch depozytów mineralnych w LF z grupy stenotycznej. Na podstawie bazy identyfikacji materiałów [101] rozpoznano hydroksyapatyt (LF1) oraz dwuwodny pirofosforan wapnia (LF2). Opisano najbardziej charakterystyczne refleksy [hkl].

Obecność pasm pochodzących od drgań rozciągających P₂O₇ (850–1250) cm⁻¹ oraz P-O (480 cm⁻¹) wykazały jednoznacznie strukturę CPPD [111]. Należy podkreślić, że obecność pasm amidowych (Amid I - C=O rozciągające przy 1650 cm⁻¹ i Amid II - δN-H, νC-N przy 1550 cm⁻¹) potwierdza wyniki μ-CT, które wskazywały na występowanie materiału organicznego w strukturze depozytów. Obecność pasm HPO₄ jest charakterystyczna dla struktury HAP z deficytem Ca [8]. Zanotowano statystycznie istotną korelację pomiędzy V_g i PO₄/Amid I, a współczynnik korelacji w grupie kontrolnej i stenotycznej wynosił odpowiednio R = 0.9 i R = 0.96.

Pomimo, że porównanie struktury depozytów HAP i CPPD z użyciem testów statystycznych nie jest możliwe (tylko dwa przypadki CPPD) warto zwrócić uwagę na kilka aspektów. Po pierwsze wartości parametrów N/V oraz V_g/V są wyższe dla CPPD w porównaniu

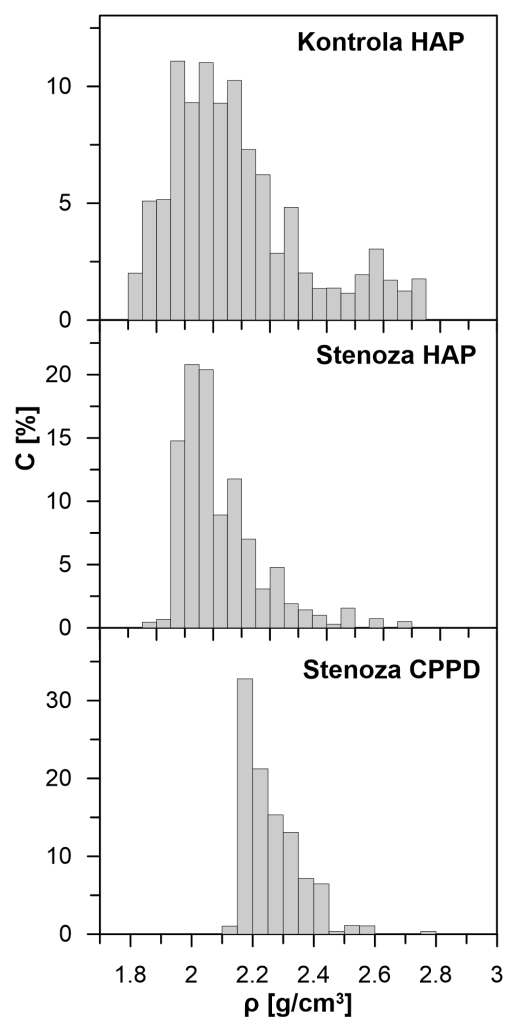
z HAP. Po drugie rozkład gęstości ziaren CPPD jest odmienny niż w przypadku ziaren HAP (Rys. 3.14). Średnia gęstość minerałów wynosi odpowiednio (2.04 ± 0.20) g/cm³ i (2.05 ± 0.18) g/cm³ dla grupy kontrolnej i dla stenotycznej, podczas gdy dla ziaren CPPD wynosi ona 2.3 g/cm³. Po trzecie skład pierwiastkowy minerałów CPPD znajduje się w zakresie wartości koncentracji dla ziaren HAP, z wyjątkiem stężenia Zn. Zawartość Zn w przypadku ziaren CPPD jest mniejsza w porównaniu z kryształami HAP.



Rys. 3.13. Widma absorpcyjne FTIR dwóch depozytów z grupy stenotycznej (LF1, LF2).

Parametr	HAP – kontrola	HAP – stenoza
PO ₄ /Amid I	1.73 ± 0.7	1.8 ± 0.65
CO ₃ /PO ₄	0.031 ± 0.008	0.036 ± 0.01
HPO ₄ /PO ₄	0.2 ± 0.09	0.16 ± 0.09
Krystaliczność	0.62 ± 0.15	0.6 ± 0.2

Tab. 3.6. Parametry obliczone na podstawie widm FTIR (średnia $\pm$ odchylenie standardowe) dla depozytów HAP w więzadłach żółtych.



Rys. 3.14. Histogram rozkładu gęstości (ρ) ziaren w próbkach więzadeł żółtych. C - procentowy udział mineralów o zadanej gęstości w 100 mm^3 próbki.

4. Dyskusja wyników

4.1. Zestawienie wyników z danymi literaturowymi oraz porównanie fizjologicznej i patologicznej mineralizacji

Prace nad mineralizacją kości i kalcyfikacją tkanek miękkich, w tym zastawek aortalnych i więzadeł kręgosłupa, prowadzone są przez wiele grup badawczych. W tym celu najczęściej wykorzystywane są metody obrazowania, jak skaningowa mikroskopia elektronowa i obrazowanie rezonansu magnetycznego, a także badania histologiczne i immunohistochemiczne [54-55]. W przypadku zastawek aortalnych i więzadeł kręgosłupa badania zazwyczaj skoncentrowane są na analizie obszarów otaczających minerały. Ma to na celu wyjaśnienie zmian strukturalnych w macierzy kolagenowej oraz zidentyfikowanie czynników biorących udział w procesie kalcyfikacji [112]. Znacznie mniej uwagi poświęca się natomiast analizie fizykochemicznej depozytów, która może dostarczyć informacji między innymi na temat środowiska wzrostu minerałów. Wyniki, otrzymane dla kości i depozytów mineralnych, zostały skonfrontowane z dostępnymi danymi literaturowymi.

Analiza składu pierwiastkowego kości beleczkowej nie wykazała różnic w stosunku do danych literaturowych [103-105]. Wyraźną różnicę zanotowano dla parametru $\text{PO}_4/\text{Amid I}$, którego wartość literaturowa (4.1 ± 0.2) jest 2.5 razy większa od wartości otrzymanej dla kości beleczkowych młodych pacjentów oraz 5 razy większa od wartości dla starszych pacjentów [113, 114]. Różnica ta wynika prawdopodobnie ze sposobu preparatyki i ekstrakcji szpiku kostnego z kości beleczkowej, które mogły wpłynąć na intensywność pasma amidowego w widmach FTIR. Literaturowa wartość parametru CO_3/PO_4 wynosi 0.012 ± 0.001 [114] i jest niemal trzykrotnie mniejsza w porównaniu z wartością w grupie młodych i dwukrotnie mniejsza w grupie starszych pacjentów. Parametr CO_3/PO_4 odzwierciedla podstawienie węglanów w strukturze HAP, które jest uzależnione od lokalizacji anatomicznej kości, a jego wartość jest niższa w kościach uczestniczących w ruchach rotacyjnych [114-115]. A zatem różnica ta może wynikać z miejsca, z którego pobrano kość oraz cech osobniczych. Nie zanotowano istotnych różnic w wartościach pozostałych parametrów FTIR. Wartość parametru BV/TV jest niemal dwukrotnie mniejsza u starszych niż u młodych pacjentów. Potwierdzają to

dane literaturowe, które dowodzą że wartość ta spada wraz z wiekiem i wynosi $(14.8 \pm 2.3)\%$ dla pacjentów młodszych oraz $(11.6 \pm 1.5)\%$ dla pacjentów w podeszłym wieku [84].

Analiza FTIR wykazała w płatkach zastawek obecność tylko jednej formy mineralnej depozytów, hydroksyapatytu o średniej wartości $\text{Ca/P} = 1.9 \pm 0.1$. Według danych literaturowych HAP jest najczęściej występującą formą mineralną w depozytach zastawek, jednakże obecne są także fosforan ośmiowapniowy (OCP) i bruszyt (DCPD), które występują samodzielnie lub razem z HAP [53, 116]. Sugeruje się, że obie struktury mogą być formami pośrednimi, które ulegają transformacji do HAP w wyniku hydrolizy [116]. Nie wykazano istotnych różnic w składzie pierwiastkowym depozytów w AV w porównaniu z danymi literaturowymi [51, 117] w stosunku do Ca, P, K, P, Mg i Na. Bezwzględne wartości odchylenia standardowego nie przekraczały 20%. Jednakże analiza przeprowadzona w pracy wykazała dodatkowo obecność S, Cl, Fe, Cu, Zn i Sr. Zanotowano ponadto silną korelację Mg – Ca ($R = 0.96$). Pomimo znaczącego udziału magnezu w mineralizacji płatków zastawek, rola jonów magnezowych w procesie kalcyfikacji nie została jeszcze dobrze poznana. Postuluje się udział Mg, jako stabilizatora struktury amorficznej fosforanu wapnia we wczesnej fazie kalcyfikacji, przypisując kationom magnezowym rolę inhibicyjną w nukleacji i wzroście HAP [118-119]. Wykazano obecność masywnych depozytów mineralnych w AV, których objętość znajduje się w zakresie $(0.001 - 0.3) \text{ mm}^3$, jednak dane literaturowe przedstawiają minerały o znacznie mniejszych rozmiarach, będące prawdopodobnie we wczesnej fazie wzrostu. Według danych literaturowych w płatkach zastawek zidentyfikowano minerały zbudowane z bruszytu o długości $>20 \mu\text{m}$, OCP o długości $5 - 20 \mu\text{m}$ oraz HAP najmniejsze o długości $< 5 \mu\text{m}$ [116].

Wyniki analizy depozytów mineralnych w AV zostały porównane z wynikami otrzymanymi dla fizjologicznie zmineralizowanych tkanek (kości i zębów). Po pierwsze, analiza składu pierwiastkowego depozytów w AV nie wykazała statystycznie istotnych różnic w porównaniu ze składem chemicznym kości. Dostępne dane literaturowe wskazują na podobieństwa składu chemicznego depozytów w AV do składu zębiny oraz na różnice w porównaniu ze szkliwem zębowym [111, 120-122]. Szkliwo zębowe zawiera o 40% więcej Ca niż depozyty w AV i 4-krotnie mniejsze stężenie S [120-122]. Podobnie jak w kościach i zębach, główną fazą mineralną depozytów w AV był hydroksyapatyt. Nie wykazano istotnie statystycznych różnic w wartościach parametrów FTIR pomiędzy depozytami w AV i kośćmi. Równocześnie zanotowano wyraźne różnice w wartościach parametrów FTIR pomiędzy depozytami w AV i szkliwem zębowym, wskazujące na wysoki udział materiału nieorganicznego w szkliwie. Świadczy o tym przede wszystkim 4-krotnie większa wartość parametru $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ oraz niemal 2-krotnie większa krystaliczność dla szkliwa. Na widmach

FTIR szkliwa zębowego można zaobserwować pasma amidowe o bardzo słabej intensywności, przy znacznym udziale pasm $\nu_3\text{PO}_4$ i $\nu_4\text{PO}_4$ w porównaniu do widm dla depozytów wapniowych. Fakt ten potwierdza również gęstość szkliwa (2.65 ± 0.2) g/cm^3 , która przewyższa średnią gęstość depozytów w AV (2.2 ± 0.25) g/cm^3 . Średnia gęstość depozytów w AV jest nieznacznie większa od gęstości kości (Rys. 3.8, str. 47).

Mineralizacja więzadeł kręgosłupa jest nieczęsto opisywaną patologią. Dwuwodny pirofosforan wapnia jest uznawany za najczęściej występującą formę mineralizacji więzadeł i zazwyczaj kojarzony z chondrokalcynozą (dna rzekoma) [54-55, 123]. Oprócz minerałów CPPD występuje także hydroksyapatyt (~25% przypadków) oraz obie formy równocześnie (~25% przypadków) [124]. Analiza XRD i FTIR potwierdziły obecność dwuwodnego pirofosforanu wapnia jedynie w 2/14 przypadków, natomiast w pozostałych próbkach zidentyfikowano hydroksyapatyt. Nie zanotowano statystycznie istotnych różnic w wartościach parametrów FTIR depozytów zbudowanych z HAP pomiędzy grupą stenotyczną i kontrolną. Według danych literaturowych skład pierwiastkowy depozytów w więzadłach zawiera Ca, Cl, S, P, Mg, Na [55], a stosunek molowy Ca/P dla depozytów CPPD jest w zakresie 0.96 – 1.46 [124]. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic składu pierwiastkowego w porównaniu z literaturą w stosunku do Ca, P, S i Cl. W przeciwieństwie do danych literaturowych nie zanotowano obecności Mg, natomiast wykazano obecność K, Fe i Zn. Obecność K wynika z udziału komponentu organicznego w strukturze depozytów, natomiast występowanie Fe i Zn może wynikać z obecności tych pierwiastków w centrach aktywnych enzymów proteolitycznych. Silna korelacja Zn z Ca może także sugerować podstawianie cynku w strukturze HAP [125]. Nie stwierdzono istotnej różnicy wartości Ca/P dla depozytów w LF w porównaniu z wartością literaturową dla ścięgien, która znajduje się w zakresie 1.62 - 1.74 [126]. Przedstawione wartości Ca/P dla depozytów HAP nie różnią się znacząco od wartości otrzymanych dla depozytów CPPD, jednak analiza statystyczna jest niemożliwa ze względu na małą liczbę przypadków. Wykazano, że więzadła żółte są przykładem słabo mineralizującej tkanki, przy czym średnia objętość minerałów przypadająca na 100 mm^3 próbki wynosiła (0.10 ± 0.12)%, a zakres objętości minerałów wynosił (0.01 – 0.84) mm^3 . W literaturze jednak zostały opisane przypadki dużych złogów mineralnych o długości 13 mm i szerokości 8 mm [55]. Co więcej, w pracy [123] przedstawione zostały grupy starszych pacjentów, u których nie stwierdzono kalcyfikacji oraz młodych pacjentów z ogniskami mineralizacji. Sugeruje się tym samym, że podeszły wiek pacjentów nie warunkuje pojawienia się mineralizacji, a jedynie sprzyja wzrostowi minerałów. Wniosek przedstawiony w pracy [123] potwierdza otrzymany

wynik, który dowodzi że depozyty wapniowe występują u młodych pacjentów (~20 lat) oraz mogą nie pojawiać się u starszych pacjentów (>50 lat).

Nie wykazano istotnych statystycznie różnic w składzie pierwiastkowym depozytów w LF w porównaniu z kośćmi, z wyjątkiem dwukrotnie mniejszego stężenia Ca i P w depozytach LF, co świadczy o wysokim udziale materiału organicznego w depozytach, a także ponad dwukrotnie większej zawartości Fe w LF niż w kościach. Różnica ta może wynikać z udziału matrycy organicznej w próbkach LF, która została potwierdzona na widmach FTIR w postaci intensywnego pasma amidowego oraz na dyfraktogramach w postaci wyraźnego tła. Postuluje się, że wysoka zawartość Fe może być jednym z czynników sprzyjających powstawaniu złogów wapniowych [119]. Równocześnie zanotowano różnice w składzie pierwiastkowym pomiędzy depozytami w LF a składem zębiny i szkliwa zębowego [127]. Po pierwsze stężenie Ca jest 1.5 razy mniejsze w depozytach LF w grupie kontrolnej i badawczej w porównaniu z zawartością Ca w zębinie oraz ponad dwukrotnie mniejsze niż w szkliwie zębowym. Po drugie stwierdzono prawie 4-krotnie mniejszą zawartość chloru w depozytach w obu grupach pacjentów w porównaniu z zębiną i 10-krotnie mniejszą niż w szkliwie. Wyższa zawartość Cl w zębinie i szkliwie zębowym może wynikać z jego obecności w ślinie, gdzie pełni rolę regulującą środowisko kwasowo-zasadowe i aktywuje enzymy trawienne śliny. Nie stwierdzono istotnych statystycznie różnic w wartościach parametrów FTIR pomiędzy depozytami w LF, kośćmi i zębiną. Znaczące różnice odnotowano natomiast dla parametrów FTIR w porównaniu ze szkliwem zębowym. Wykazano ponad 5-krotnie mniejszą wartość parametru $PO_4/Amid\ I$ oraz 2-krotnie mniejszą wartość HPO_4/PO_4 i krystaliczności dla depozytów w LF. Przedstawione różnice wynikają przede wszystkim z większej zawartości materiału nieorganicznego w szkliwie zębowym w stosunku do LF. Średnia gęstość depozytów w LF jest bliska literaturowej wartości gęstości kości (1.9 g/cm^3) [128] i mniejsza od gęstości szkliwa zębowego.

4.2. Analiza wyników

Próbki kości beleczkowych zostały wykorzystane jako materiał porównawczy dla depozytów mineralnych zlokalizowanych w tkankach. Niewielka liczba przebadanych próbek kości nie pozwoliła na ustalenie statystycznie istotnych różnic pomiędzy grupą młodych i starszych pacjentów. Niemniej jednak na podstawie otrzymanych wyników można wymienić kilka cech różniących obie grupy. Po pierwsze, na obrazach μ -CT obserwuje się destrukcję struktury kostnej w kości gąbczastej w grupie starszych pacjentów, co zostało potwierdzone

przez wartość parametru BV/TV. Analiza rozkładu gęstości poszczególnych beleczek kostnych nie wykazała istotnych różnic pomiędzy młodymi i starszymi pacjentami, natomiast zmiany te zostały zaobserwowane lokalnie na niewielkich obszarach beleczek i są one wynikiem procesu przebudowy kości. Analiza μ -CT wskazała jednoznacznie na mniejszą liczbę beleczek kostnych u starszych pacjentów, co wpływa na mniejsze stężenie wapnia w analizowanych próbkach kości w porównaniu z młodymi pacjentami.

Średnia zawartość P u pacjentów starszych była niższa niż u młodych, co podobnie jak w przypadku Ca, jest związane z mniejszą liczbą beleczek kostnych u starszych pacjentów. Wysoki współczynnik korelacji Ca – P potwierdził, że beleczki zbudowane są z fosforanów wapnia. Niski współczynnik korelacji Sr – Ca może być wynikiem stosowania diety ubogiej w Sr. Doświadczalnie wykazano, że proces mineralizacji zostaje spowolniony w obecności strontu w dawce (20 – 100) $\mu\text{g/ml}$ i charakteryzuje się występowaniem defektów w strukturze hydroksyapatytu. Niska podaż strontu, natomiast, nie wywołuje znaczących zmian w procesie mineralizacji [129]. Podobnie niski współczynnik korelacji Mg – Ca może być następstwem stosowania diety ubogiej w magnez [130].

Obecność pasm amidowych i pasm pochodzących od grupy fosforanowej w widmach FTIR potwierdziły jednoznacznie udział materiału organicznego i fazy mineralnej w badanych próbkach kości beleczkowych. Fazę mineralną kości beleczkowej stanowił hydroksyapatyt. Pasma absorpcyjne przy 1422 cm^{-1} i 1456 cm^{-1} wskazują na obecność węglanów, podstawionych w miejsce grup fosforanowych. Wyniki nie wskazują na istotną różnicę wartości parametru CO_3/PO_4 pomiędzy grupą młodych i starszych pacjentów. Wyższa wartość parametru $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ u młodych osobników wskazuje na tendencję do większego udziału fazy mineralnej w tkance kostnej, natomiast wyższa krystaliczność próbek kości młodych osobników świadczy o większym udziale minerałów o uporządkowanej strukturze krystalicznej i mniejszym udziale fazy amorficznej. Zgodnie z oczekiwaniami, wykazano korelacje pomiędzy P - $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ oraz P – krystaliczność, a także Ca - $\text{PO}_4/\text{Amid I}$ i Ca – krystaliczność.

W celu porównania fizykochemicznych i morfologicznych cech ziaren mineralnych zestawiono wyniki otrzymane dla płatków zastawek aortalnych i więzadeł żółtych. Zastawki aortalne należą do tkanek mineralizujących w wysokim stopniu, a objętość mineralizacji, w kilku przypadkach, stanowiła prawie 40% objętości płatka. W przeciwieństwie do płatków zastawek, więzadła żółte wykazują obecność niewielkich złogów (objętość ziaren w 100 mm^3 próbki 0.01 – 0.5%). Nie zaobserwowano żadnej prawidłowości w rozmieszczeniu minerałów w więzadłach, przy czym występowały one pojedynczo lub w skupiskach wewnątrz tkanki.

Potwierdzono heterogeniczną strukturę ziaren, które w obu typach tkanek występowały w postaci mineralno-włóknistych zgrubień. Zgodnie z równaniem 2.7 (str. 33), obliczono procentowy udział hydroksyapatytu w ziarnach. W przypadku płatków zastawek, udział materiału nieorganicznego w ziarnie wynosił (30 – 72)%, natomiast dla więzadeł żółtych był równy (10 – 80)%. Wartości te w obu przypadkach nie odbiegają znacząco od siebie. Odmienny stosunek ilościowy substancji organicznej i mineralnej wskazuje, że ziarna mogą być na różnym etapie wzrostu. Różnica średniej gęstości ziaren w AV i LF była nieznaczna i wynosiła ~10%. Natomiast średnia objętość ziaren w LF jest prawie 30 razy mniejsza niż ziaren w AV.

Depozyty we wszystkich próbkach AV posiadały bardzo podobny skład chemiczny. Co istotne, zanotowano obecność Mg na poziomie (0.85 ± 0.5)%. Z punktu widzenia struktury chemicznej krystalitów, znaczna zawartość Mg może oznaczać podstawienie w miejsce Ca w sieci krystalicznej HAP. Wynikiem tego jest zmiana wymiarów sieciowych ze względu na różne promienie jonowe Ca i Mg. W związku z tym podstawienie Ca-Mg wpływa na krystaliczność minerału. Zastąpienie Ca przez Mg powinno mieć swoje odzwierciedlenie w korelacji Ca - Mg, jednak analiza statystyczna nie wykazała takich zależności. Można, zatem przypuszczać, że Mg odkłada się w postaci odrębnego związku (np. węglanu magnezu). Równocześnie nie zaobserwowano pasm związanych z obecnością związków magnezowych, co może być wynikiem limitu detekcji metody FTIR. Skład pierwiastkowy depozytów w LF był odmienny niż w AV. Po pierwsze, nie wykazano obecności Mg, a także Cu, Sr w depozytach LF. Obecność Mg i Sr jest charakterystyczna w tkankach wysoce zmineralizowanych, a ich rolą jest, między innymi, działanie ograniczające wzrost mineralizacji [129]. Po drugie, stężenie Ca i P w depozytach LF było mniejsze niż w AV odpowiednio o 35% i 41%, co wynika z mniejszego udziału materiału nieorganicznego.

Analiza chemiczna wykazała, że główną fazą mineralną depozytów w AV i LF stanowi węglano-hydroksyapatyt typu B. Zanotowano dublet pasm absorpcyjnych dla CO_3 przy 1422 cm^{-1} i 1456 cm^{-1} . Jedynie w dwóch przypadkach więzadeł stwierdzono obecność depozytów CPPD. Nie rozpoznano obecności struktury HAP typu A, która charakteryzuje się przesunięciem pasm w stronę większych wartości liczby falowej (1435 cm^{-1} i 1463 cm^{-1}). Obecność pasm amidowych w widmach FTIR potwierdziła udział matrycy organicznej w depozytach AV i LF. Należy zauważyć, że kryształy hydroksyapatytowe w więzadłach były obecne zarówno w grupie kontrolnej jak i w grupie stenotycznej, podczas gdy minerały CPPD wystąpiły wyłącznie w grupie stenotycznej. Obie formy krystaliczne nie wystąpiły równocześnie w żadnej próbce. Co więcej, kryształy CPPD zidentyfikowano tylko u starszych pacjentów. Nie stwierdzono obecności depozytów w 8 na 15 próbek LF ze stenozą. Można

sądzić na tej podstawie, że stenoza kanału kręgowego nie jest czynnikiem warunkującym wystąpienie mineralizacji więzadeł żółtych.

Pacjenci cierpiący na stenozę kanału kręgowego skarżyli się na typowe objawy przedoperacyjne o podobnym nasileniu, jak bóle w lędźwiowym odcinku kręgosłupa, osłabienie siły mięśniowej, zaburzenia czucia. Nie stwierdzono korelacji pomiędzy symptomami klinicznymi a liczbą i objętością ziaren. Wspomniane symptomy były prawdopodobnie związane ze stenozą kanału kręgowego, a nie z obecnością minerałów. Równocześnie należy zaznaczyć, że pacjenci z grupy kontrolnej nie skarżyli się na dolegliwości ze strony kręgosłupa zanim wystąpił uraz mechaniczny, pomimo że stwierdzono u nich obecność drobnych złogów mineralnych w LF. Fakt ten sugeruje, że drobna mineralizacja w więzadłach może mieć przebieg bezobjawowy. 50% spośród pacjentów chorowało na cukrzycę. W wielu pracach postulowano wpływ cukrzycy na wapnienie tkanek miękkich. Wiadome jest, że podwyższony poziom insuliny w krwi skutkuje wzrostem wewnątrzkomórkowej absorpcji wapnia i rozpoczęciem procesu osteogenezy [21]. Jednakże bezpośredni wpływ cukrzycy na mineralizację więzadeł nie został wystarczająco dobrze poznany.

Postulowanych jest wiele mechanizmów mineralizacji więzadeł żółtych [131-133]. Wyniki zebrane w pracy nie pozwalają na jednoznaczny opis tego procesu. Równocześnie wartości parametrów morfologicznych i rozkład gęstości świadczą o dwóch prawdopodobnych mechanizmach odpowiedzialnych za odkładanie się złogów HAP i CPPD. Hydroksyapatyt, jako minerał charakterystyczny dla struktury kostnej, jest również głównym składnikiem depozytów mineralnych w tkankach miękkich [117,131]. Jedną z koncepcji zakłada, że formowanie kryształów HAP odbywa się na powierzchni błony komórkowej. Błona komórkowa jest bogata w fosfatydyloserynę, mającą duże powinowactwo do jonów wapniowych. Fosfor, natomiast, jest dostarczany przez transportery Na/P_i (P_i fosfor nieorganiczny) zlokalizowane na błonie komórkowej. Dodatkowym źródłem fosforu może być hydroliza fosfolipidów membranowych [35]. Hydroksyapatyt typu B jest charakterystyczny dla układów biologicznych [8]. W środowisku o zredukowanej ilości jonów CO_3 faworyzowane jest tworzenie HAP typu A, natomiast wzrost zawartości węglanów ($>3\%$) promuje tworzenie się HAP typu B. Wyniki sugerują, że w układzie występowała wystarczająco duża zawartość CO_3^{2-} do preferencyjnego podstawiania w pozycji B w sieci krystalicznej HAP.

Mechanizm formowania złogów CPPD jest dyskusyjny. Badania ostatnich kilku lat są skoncentrowane na związku pomiędzy odkładaniem CPPD w więzadłach i ścięgnach a chondrokalcynozą (*dna rzekoma*). Choroba ta zaliczana jest do schorzeń reumatycznych w

wyniku, której odkładające się złogi CPPD prowadzą do wystąpienia lokalnego stanu zapalnego. W patomechanizm odkładania się CPPD mogą być zaangażowane zarówno choroby metaboliczne, jak i czynniki reumatyczne i genetyczne. Generalnie wiadome jest, że odkładanie się złogów CPPD skorelowane jest z nadprodukcją nieorganicznego pirofosforanu za pośrednictwem chondrocytów [55, 105]. Wewnątrzkomórkowy nieorganiczny pirofosforan jest transportowany przez błonę komórkową za pośrednictwem białek ANK. Mutacja genu ANK może indukować wzrost poziomu zewnątrzkomórkowego nieorganicznego pirofosforanu, który wiążąc się z Ca^{2+} prowadzi do produkcji minerałów CPPD [131].

Porównanie wyników dla grup stenotycznej i kontrolnej więzadeł żółtych wskazuje na pewne podobieństwa i różnice. Główna różnica wynika z obecności kalcyfikacji CPPD wyłącznie w grupie stenotycznej. Może to oznaczać, że formowanie CPPD jest skorelowane ze stenozą kanału kręgowego. Mineralizacja CPPD jest scharakteryzowana przez wyższe wartości parametrów N/V (Rys. 3.11, str. 51) i V_g/V oraz gęstości w porównaniu z mineralizacją HAP (Rys. 3.14, str. 55). Skład pierwiastkowy CPPD i HAP był podobny, z wyjątkiem zawartości Zn. Wyższa zawartość Zn w przypadku minerałów HAP może wynikać z preferencyjnego wbudowywania się Zn w strukturę HAP [132] i/lub z wyższej zawartości enzymów Zn w matrycy organicznej [133]. Można sądzić, że formowanie minerałów HAP należy do procesu degeneracyjnego w tkance miękkiej, rozpoczynającego się, w niektórych przypadkach, w młodym wieku. Jednak jednoznaczny mechanizm odpowiedzialny za mineralizację HAP wymaga dalszych badań. Dodatkowo, otwartym pytaniem pozostaje, dlaczego obie struktury krystaliczne (HAP i CPPD) nie zostały zaobserwowane równocześnie w tej samej tkance?

Podsumowując, przedstawione wyniki wskazują na wysoce heterogeniczną, pod względem objętości i gęstości, strukturę depozytów mineralnych. Niewiadomym pozostaje czy różnorodność morfologiczna depozytów wynika z odmiennych szlaków wzrostu minerałów czy z różnej szybkości wzrostu, nawet w tym samym obszarze tkanki. Odmienna gęstość i objętość ziaren może także świadczyć o tym, że wzrost nie przebiega w stałych warunkach chemicznych. Fluktuacje warunków środowiska lokalnego, wynikające z przebytych chorób (np. metabolicznych) w wyniku których mogą ulec zmianie stężenia jonów wapnia i fosforu, będą skutkowały wzrostem ziaren w otoczeniu odmiennych warunków chemicznych. Można sądzić, że mineralizacja tkanek miękkich rozpoczyna się od wystąpienia defektu w matrycy kolagenowej, w którym odkładają się sole wapnia, a dodatkowo w proces angażują się liczne komórki, jak chondrocyty, BMP i inne.

Sprawą wielokrotnie poruszaną jest obecność matrycy organicznej w minerałach. Kolagen jest powszechnie uważany za białko stanowiące rusztowanie i „szablon” dla

formowania minerałów. Zebranie danych eksperymentalnych dotyczących funkcji kolagenu w mineralizacji wymaga monitorowania procesu wzrostu na poziomie molekularnym. Rola matrycy kolagenowej nie została jednak do tej pory dobrze poznana. Zasadniczo, na włóknie kolagenowym w określonych obszarach kości z fazy amorficznej zarodkują i rosną kryształy hydroksyapatytu, przy czym proces ten jest kontrolowany przez białka niekolagenowe [50]. Przyjmując założenie, że tworzenie HAP w tkankach miękkich odbywa się w podobny sposób można przypuszczać, że defekty we włóknach kolagenowych tkanki powstające na skutek mikro-urazów, incydentów chorobowych, czynników autogennych lub działania toksyn stanowią centra krystalizacji.

W przypadku mineralizacji homogennej istotną kwestią jest źródło jonów niezbędnych do zainicjowania nukleacji i wzrostu kryształu. Obecność jonów jest uzależniona od składu chemicznego płynów zewnątrzkomórkowych, który z kolei jest odzwierciedleniem stanu organizmu. Defekty w strukturze włókien kolagenowych, jako efekt działania czynników uszkodzających, mogą wystąpić u każdego. Świadczy o tym obecność kalcyfikacji niezależnie od wieku i płci pacjenta. Równocześnie pojawienie się mineralizacji u młodych pacjentów, u których nie rozpoznano innych jednostek chorobowych pozwala sądzić, że wzrost minerałów odbywa się nawet przy zachowaniu prawidłowych parametrów płynów zewnątrzkomórkowych. Jednak obecność defektu matrycy kolagenowej inicjuje proces „uszkodzenie – naprawa”. Można przypuszczać, że w zmienionym chorobowo obszarze tkanki na drodze procesów biochemicznych i przy udziale licznych mediatorów komórkowych, może dochodzić do lokalnego przesycenia jonami uczestniczącymi w mineralizacji. W takiej sytuacji, kiedy skład płynów ustrojowych nie ulega zmianie na skutek przebytych chorób, a zmiane ulega jedynie lokalne środowisko w otoczeniu defektu matrycy, można mówić o mineralizacji heterogenicznej.

Incydentalne fluktuacje warunków środowiska mogą prowadzić do powstania tzw. mineralizacji ukrytej, polegającej na wbudowaniu pewnej ilości atomów pierwiastków, odbiegającej od normy, w strukturę tkanki. Mineralizacja ukryta wywołuje zmiany własności fizycznych i chemicznych tkanek. Rezultatem wzrostu mineralizacji ukrytej, możliwej do wykrycia za pomocą mikroskopii elektronowej, jest czasem mineralizacja jawna.

Na przykładzie zastawki aortalnej przedstawiono dwa modele mechanizmu mineralizacji. Pierwszy model koncentruje się na siłach działających na płatki zastawki podczas skurczu i rozkurczu komory serca. Model zakłada, że włókna kolagenowe ulegają w ten sposób uszkodzeniu, stając się tym samym ogniskami mineralizacji. W drugim modelu kluczowa rola w zainicjowaniu procesu wapnienia tkanki została przypisana czynnikom biochemicznym i

reakcji zapalnej w tkance. Oba modele jednak nie wykluczają się, a opisane czynniki mogą mieć wpływ synergiczny na proces kalcyfikacji. Pomiar mikrotomograficzne płatków zastawek aortalnych wykazały, że depozyty zlokalizowane były na krawędziach płatków, w części centralnej lub brzegowej w miejscu przyczepu do pierścienia włóknistego. Przedstawiona lokalizacja depozytów znajduje swoje potwierdzenie w modelu biomechanicznym, ponieważ miejsca wystąpienia mineralizacji są obszarami poddawanych ścisaniu podczas otwierania zastawki (Rys. 1.2, str. 12), a także są narażone na naprężenia ścinające związane z przepływem krwi (część brzegowa i centralna płątka).

Płatki zastawek stenotycznych cechuje zredukowana elastyczność i pogrubienie. Utrudniony odpływ krwi z lewej komory serca powoduje koncentryczny przerost zastawki, powodując wzrost wartości siły ściskającej, naprężeń ścinających oraz turbulencji podczas otwarcia zastawki. Następstwa hemodynamiczne mogą prowadzić do uszkodzenia warstwy komórek śródbłonkowych (Rys. 1.4, str. 15) oraz powstania defektów we włóknach kolagenowych płatków, co w dalszej kolejności prowadzi do wapnienia. Na tej podstawie można sądzić, mineralizacja płatków zastawki nie jest bezpośrednią przyczyną stenozy zastawki lecz jest dodatkowym powikłaniem w przebiegu stenozy.

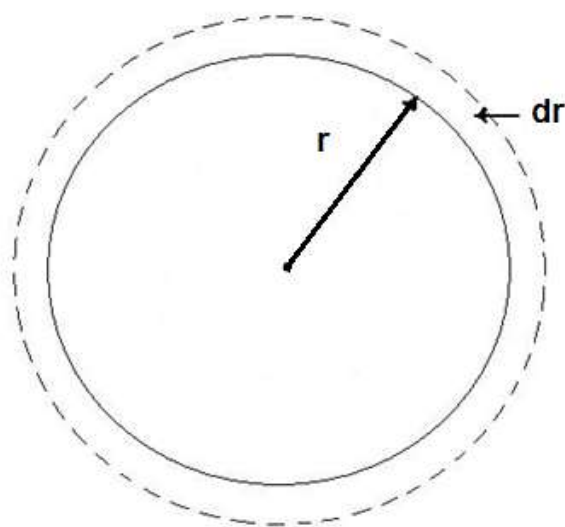
W badaniach opisanych w pracach [134-135] wykazano obecność markerów odczynu zapalnego w miejscach poddawanych naprężeniu ścinającemu. Analiza mineralizacji płatków zastawek nie pozwala stwierdzić, czy w proces ten były zaangażowane komórki odczynu zapalnego. Analiza składu pierwiastkowego wykazała, jednak, podniesiony poziom Fe, który może wystąpić w przypadku obecności sieci dodatkowych mikro-naczyń krwionośnych, tworzonych w obszarach niedokrwienych tkanki, do jakich należą obszary patologicznie zmineralizowane. Formowanie dodatkowych naczyń krwionośnych jest zjawiskiem towarzyszącym stanowi zapalnemu i pełni funkcję drogi transportu dla makrofagów do miejsca zapalnego tkanki [23]. Równocześnie, analiza spektrometryczna nie wykazała różnic w intensywności i położeniu pasm pochodzących od matrycy organicznej w porównaniu z pasmami, otrzymanymi dla kości, które mogłyby świadczyć o destrukcji matrycy kolagenowej na skutek procesów zapalnych. Dane literaturowe [136] wskazują, że tkanka zastawki aortalnej pod wpływem zmian hemodynamicznych posiada zdolność do stymulowania syntezy kolagenu. Trudność w oszacowaniu stanu matrycy organicznej może wynikać z wystąpienia pewnej równowagi pomiędzy nowo syntetyzowanymi włóknami a ilością włókien zdegradowanych na skutek działania czynników prozapalnych [136]. Uzyskane wyniki nie potwierdzają jednoznacznie obecności procesów prozapalnych opisywanych przez drugi model, ale równocześnie nie mogą one być wykluczone.

Wieżadła żółte są strukturami będącymi pod wpływem działania sił, prowadzących do rozciągania. Jak wykazały badania eksperymentalne, wykonane na kręgosłupach szczurów, poddawanie ich rozciąganiu i ruchom skrętnym skutkuje proliferacją tkanki chrzęstnej, przekształcającej się w tkankę kostną w więzadłach kręgosłupa [27-28]. Podobnie, badania wykonane na pacjentach, narażonych na rozciąganie, wykazały wzrost poziomu cytokin związanych z procesem kościotworzenia (m.in. BMP) [27-28]. Nietypowa struktura więzadeł żółtych, polegająca na wyższej zawartości elastyny niż kolagenu, powoduje znaczne przystosowanie do obciążeń mechanicznych, zwłaszcza do rozciągania. Może to tłumaczyć niewielkie zmineralizowanie LF, w których zwapnienia występują incydentalnie. Mineralizacje więzadeł żółtych mogą być wynikiem działania siły, przekraczającej wartości wytrzymałościowe włókien elastynowych. Aby jednoznacznie rozstrzygnąć mechanizm powstawania mineralizacji w zastawkach aortalnych i więzadłach żółtych kręgosłupa niezbędna jest szczegółowa analiza stanu macierzy włóknistej, na której wzrastały depozyty mineralne. Niemniej jednak materiał porównawczy uwidoczniał wiele cech wspólnych fizjologicznej i patologicznej mineralizacji, do których zaliczyć można nie tylko skład i strukturę chemiczną, ale również podstawę wzrostu minerałów, dla których rusztowaniem jest matryca organiczna.

5. Model mineralizacji struktur kolagenowych

Mikrouszkodzenie struktury włókna kolagenowego stanowi centrum krystalizacji ziarna mineralnego. Wzrost zarodka mineralnego, znajdującego się w środowisku płynu zewnątrzkomórkowego, zachodzi w wyniku odkładania się jonów wapnia na powierzchni zarodka. Rozważając jony wapnia, będące głównym składnikiem hydroksyapatytu, możliwe jest opisanie procesu wzrostu ziarna za pomocą modelu dyfuzyjnego. Zaproponowany model pozwoli na oszacowanie czasu wzrostu ziarna mineralnego. Przyjęto następujące założenia:

1. układ posiada symetrię sferyczną,
2. czynnikiem limitującym wzrost ziarna jest transport jonów wapnia,
3. nie występują reakcje chemiczne w otoczeniu.



Rys. 5.1. Schematyczne przedstawienie wzrostu ziarna o promieniu r .

Ze względu na symetrię sferyczną strumień jonów J zależy tylko od odległości r pomiędzy środkiem układu (kuli) a wybranym punktem w przestrzeni. Zgodnie z prawem zachowania masy liczba jonów wchodzących do sferycznej przestrzeni o promieniu r jest równa liczbie jonów adsorbowanych na powierzchni zarodka, a zatem można zapisać:

$$-4\pi r^2 J(r) + 4\pi(r + dr)^2 * J(r + dr) = 0 \quad (5.1)$$

W wyrażeniu (5.1) strumień $J(r + dr)$ rozwinięto w szereg Taylora:

$$-4\pi r^2 J(r) + 4\pi(r^2 + 2rdr + (dr)^2) * \left(J(r) + \frac{dJ}{dr} dr \right) = 0 \quad (5.2)$$

Dzieląc obie strony przez $4\pi dr$ i zanedbując $(dr)^2$ otrzymano następujące równanie:

$$2rJ(r) + r^2 \frac{dJ}{dr} = 0 \quad (5.3)$$

Ostatecznie równanie różniczkowe przyjmuje postać:

$$\frac{d}{dr}(r^2 J) = 0 \quad (5.4)$$

Scałkowanie równania 5.4 prowadzi do zależności strumienia jonowego od odległości r od środka układu:

$$r^2 J = C_1 \quad (5.5)$$

A zatem:

$$J = \frac{C_1}{r^2}, \quad (5.6)$$

gdzie C_1 to stała całkowania. Zgodnie z pierwszym prawem Fick'a strumień jonów można zapisać, jako:

$$J = -D \frac{dc}{dr}, \quad (5.7)$$

gdzie D to współczynnik dyfuzji, c stężenie jonów wapnia. Porównując równania 5.6 i 5.7 otrzymano:

$$\frac{dc}{dr} = -\frac{C_1}{Dr^2} \quad (5.8)$$

Scałkowanie równania 5.8 prowadzi do następującego rozwiązania:

$$c(r) = \frac{C_1}{Dr} + C_2 \quad (5.9)$$

Obliczenie stałych całkowania C_1 i C_2 wymaga przyjęcia warunków brzegowych. Przyjęto, że dla $r \rightarrow \infty$ stężenie jonów równe jest c_0 , natomiast na powierzchni ziarna o promieniu r stężenie jest zerowe.

$$c(\infty) = c_0$$

$$c(r) = 0$$

Zastosowanie powyższych warunków brzegowych pozwala na wyznaczenie stałych całkowania C_1 i C_2 .

$$C_1 = -c_0 D * r \quad (5.10)$$

$$C_2 = c_0 \quad (5.11)$$

A zatem strumień jonów na powierzchni zarodka o promieniu a , można wyrazić za pomocą równania:

$$J = \left| -D \frac{dc}{dr} \right|_{r=a} = \frac{D * c_0}{a} \quad (5.12)$$

Całkowity strumień jonów na powierzchni zarodka o promieniu a można zapisać jako:

$$I = 4\pi a^2 * J(a) \quad (5.13)$$

A zatem całkowity strumień jonów na powierzchni zarodka wynosi:

$$I = 4\pi a D c_0 \quad (5.14)$$

Przyjmując, że gęstość ziarna jest równa ρ , można skorzystać z wyrażenia opisującego przyrost masy ziarna w czasie, która jest równa całkowitemu strumieniowi jonów I na powierzchni zarodka, zgodnie z równaniem 5.14. Wobec tego przyrost masy ziarna w czasie wyrażono, jako:

$$\frac{d}{dt} \left(\frac{4}{3} \pi a^3 \rho \right) = 4 \pi a^2 \rho \frac{da}{dt} = 4 \pi D a * c_0 \quad (5.15)$$

Powyższy związek sprowadza się do równania różniczkowego, opisującego zależną od czasu zmianę promienia ziarna:

$$a \frac{da}{dt} = \frac{D * c_0}{\rho} \quad (5.16)$$

Zakładając, że w chwili początkowej $t = 0$ promień ziarna równy jest 0, rozwiązanie równania przybiera postać:

$$a = \sqrt{\frac{2 D * c_0 t}{\rho}} \quad (5.17)$$

Na podstawie równania 5.17 obliczono, że czas wzrostu ziarna wynosi:

$$t = \frac{a^2 * \rho}{2 D * c_0} \quad (5.18)$$

Na podstawie obliczeń przeprowadzono analizę zmiany promienia ziarna w czasie. W obliczeniach wykorzystano następujące dane literaturowe:

- Stała dyfuzji dla jonów wapnia w tkance mięśniowej, $D = 1.65 * 10^{-6} \text{ (cm}^2/\text{s)}$ [137].
- Stężenie nieskompleksowanego wapnia $c_0 = 42 \text{ mg/l} = 4.2 * 10^{-5} \text{ (g/cm}^3\text{)}$, co stanowi 50% całkowitego stężenia wapnia w płynach zewnątrzkomórkowych [138].

Wartości promienia (a) i gęstości (ρ) ziaren są danymi eksperymentalnymi. Wyniki obliczeń modelowych przedstawiono na przykładzie próbek więzadeł żółtych. Dla minerałów CPPD w zakresie wartości $a = (0.02-0.1) \text{ cm}$ zakres wartości ρ wynosił: $\rho = (2.15-2.25) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 72 lat oraz $\rho = (2.16-2.4) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 81 lat, natomiast dla minerałów HAP, w tym samym zakresie a , był równy: $\rho = (1.78-1.95) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 35 lat,

$\rho = (1.85-2.0) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 36 lat, $\rho = (1.85-2.0) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 59 lat oraz $\rho = (1.87-2.2) \text{ g/cm}^3$ dla pacjenta w wieku 60 lat.

Na Rys. 5.2 przedstawiono przykładowe wyniki, uzyskane na podstawie obliczeń modelowych, zależności promienia ziarna od czasu wzrostu dla minerałów zbudowanych z CPPD, na Rys. 5.3 zaprezentowano zależność $a(t)$ dla minerałów HAP w więzadłach z grupy kontrolnej (35 i 36 lat), natomiast na Rys. 5.4 zależność $a(t)$ dla grupy stenotycznej (59 i 60 lat). Różnice pomiędzy poszczególnymi przypadkami były nieznaczne, dlatego wybrano najbardziej różniące się przykłady. Maksymalny błąd pomiarowy, naniesiony na Rys. 5.2, 5.3 i 5.4 wynosił połowę wielkości voxela. Dla pozostałych przypadków błędy pomiarowe nie odbiegały znacząco. W obliczeniach założono, że wartość D i c_0 są stałe dla wszystkich przypadków.

Przedstawiony model mineralizacji struktur kolagenowych miał na celu oszacowanie czasu wzrostu ziaren mineralnych. Duża złożoność układu, z jakim mamy do czynienia, wymagała przyjęcia kilku uproszczeń. Do najistotniejszych należało założenie o sferycznym kształcie ziaren oraz przyjęcie, że środowisko wzrostu zbudowane jest tylko z jonów wapnia. Niemniej jednak istnieje możliwość rozbudowania modelu o dodatkowe czynniki, jakimi mogą być wieloskładnikowe środowisko wzrostu, konkurencyjność o jony pomiędzy ziarnami, częściowe rozpuszczanie ziaren, fluktuacje warunków środowiska wewnętrznego, przyjęcie kształtu płytkowego lub walcowego ziaren, agregacja zarodków, starzenie Ostwalda itp.

Na Rys. 5.2 można zauważyć, że czas wzrostu ziaren CPPD wynosił od ~miesiąca do 6 lat, natomiast w przypadku ziaren HAP (Rys. 5.3, Rys. 5.4) wynosił do 4 lat u młodych oraz do 5.5 roku u starszych pacjentów.

Znając czas wzrostu można także określić szybkość wzrostu ziaren. Szybkość wzrostu została wyrażona jako pochodna promienia po czasie:

$$\frac{da}{dt} = \frac{1}{\sqrt{\frac{2Dc_0}{\rho}t}} * \frac{Dc_0}{\rho} \quad (5.19)$$

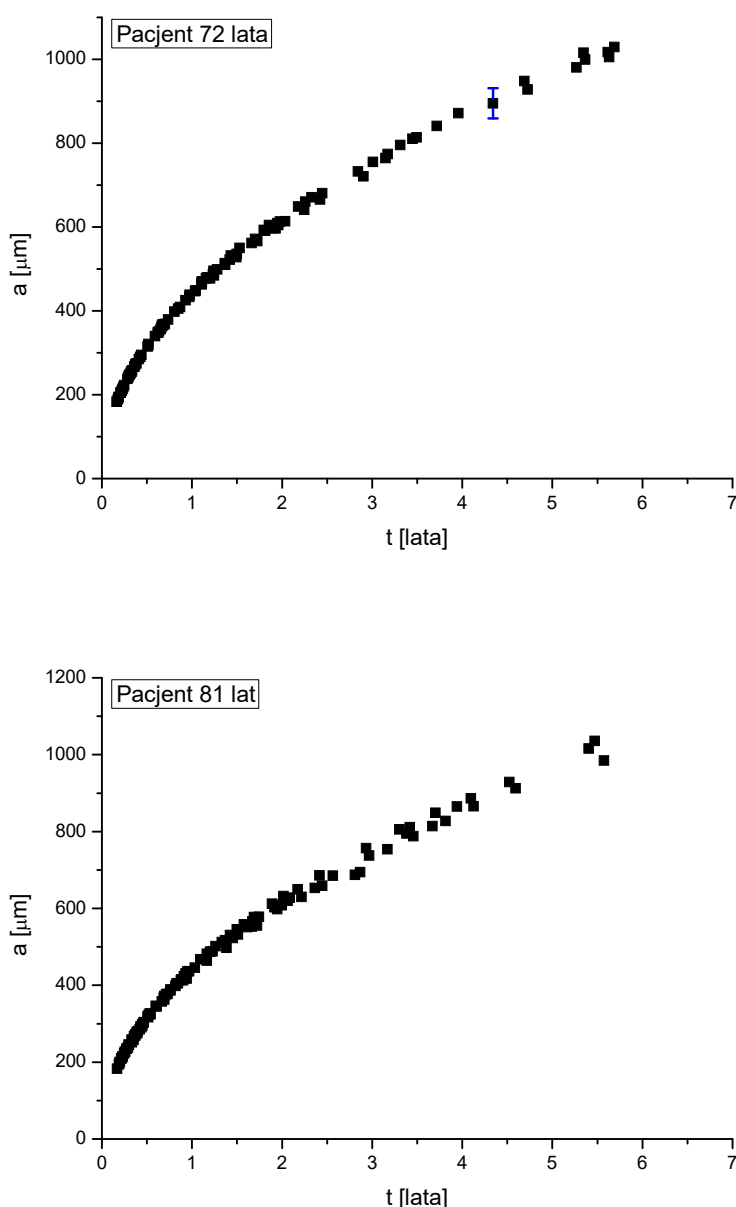
Podstawiając wyrażenie (5.18) do powyższego równania i przyjmując, że wartości D , c_0 i ρ są stałe otrzymamy zależność:

$$\frac{da}{dt} \sim \frac{1}{\sqrt{t}} \sim \frac{1}{a} \quad (5.20)$$

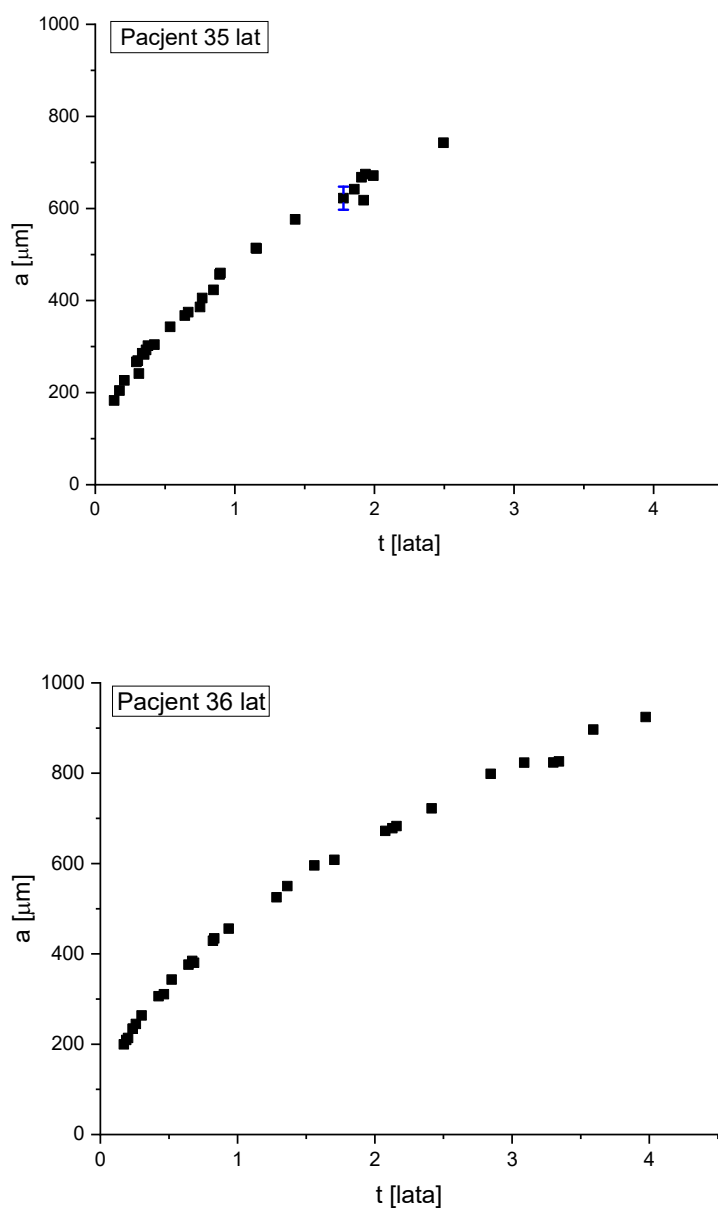
Na podstawie równania (5.19) obliczono, że da/dt ziarna CPPD (pacjent 72 lata) o promieniu $a = 0.02$ cm wynosi $1.75 \cdot 10^{-9}$ cm/s, natomiast dla $a = 0.1$ cm wynosi $2.9 \cdot 10^{-10}$ cm/s. W drugim przypadku dla ziaren CPPD (pacjent 81 lat) o promieniu $a = 0.02$ cm da/dt wynosi $1.54 \cdot 10^{-9}$ cm/s, a dla $a = 0.1$ cm wynosi $3.0 \cdot 10^{-10}$ cm/s. W przypadku ziaren HAP (pacjent 35 lat) o promieniu $a = 0.02$ cm da/dt wynosi $1.89 \cdot 10^{-9}$ cm/s, a dla $a = 0.1$ cm jest równy $4.78 \cdot 10^{-10}$ cm/s, dla pacjenta w wieku 36 lat dla $a = 0.02$ cm da/dt wynosi $1.78 \cdot 10^{-9}$ cm/s, a dla $a = 0.1$ cm jest równy $3.7 \cdot 10^{-10}$ cm/s, natomiast dla pacjenta w wieku 59 lat da/dt wynosi $1.76 \cdot 10^{-9}$ cm/s dla $a = 0.02$ i $3.56 \cdot 10^{-10}$ cm/s dla $a = 0.1$ cm oraz $1.0 \cdot 10^{-9}$ cm/s dla $a = 0.02$ cm i $3.2 \cdot 10^{-10}$ cm/s przy $a = 0.1$ cm dla pacjenta w wieku 60 lat. Zgodnie z wyrażeniem (5.20) da/dt w przedstawionych przypadkach maleje wraz ze wzrostem promienia ziarna. Równocześnie należy zauważyć, że największą zmianę da/dt zanotowano w przypadku depozytów zbudowanych z CPPD co sugeruje, że w procesie wzrostu biorą udział czynniki promujące odkładanie soli wapnia i sprzyjające wzrostowi ziaren. Wśród czynników mających wpływ na proces mineralizacji wymienić można schorzenia reumatyczne i metaboliczne, skorelowane z nadprodukcją nieorganicznego pirofosforanu [55]. Do czynników, mających wpływ na szybkość wzrostu ziaren, zaliczyć można także dietę, choroby ogólnoustrojowe (cukrzyca, otyłość) i stosowane leki, które mają bezpośredni wpływ na skład płynów fizjologicznych i gospodarkę wapniową. W przypadku minerałów HAP można zaobserwować mniejszą zmianę da/dt wraz ze wzrostem promienia niż w przypadku CPPD, co może świadczyć o różnych typach wzrostu obu krystalitów. Nie zanotowano wyraźnych różnic da/dt pomiędzy młodymi i starszymi pacjentami co sugeruje, że mineralizacja HAP w obu grupach badawczych przebiega według podobnych mechanizmów.

Z zaburzeniem gospodarki wapniowej mamy do czynienia najczęściej w przypadku chorób przytarczyc i nerek, a także w zaburzeniach metabolizmu witaminy D [139]. Obecność przewlekłych schorzeń i konieczność stosowania leków mających wpływ na wchłanianie wapnia, jak również różnice osobnicze i zmienne nawyki żywieniowe, mogą powodować zakłócenie bilansu wapniowego. Zmiany stężenia jonów w płynach fizjologicznych mogą mieć wpływ na wielkość ziaren i czas ich wzrostu, mając działanie promujące lub inhibicyjne (Mg^{2+} , Sr^{2+}) na proces mineralizacji [8, 118]. Analizując spadek wartości da/dt ziaren wraz z wiekiem, można wymienić kilka czynników hamujących wzrost. Po pierwsze, najszybszy wzrost może nastąpić aż do wysycenia jonami wszystkich wolnych wiązań chemicznych w defekcie matrycy kolagenowej. Następnie ziarno wzrasta na zewnątrz defektu. Jeżeli stężenie jonów, uczestniczących w mineralizacji, pozostaje na stałym poziomie, to na rosnącej powierzchni kulistego ziarna adsorbowana jest niezmienna liczba jonów, a zatem przyrost promienia ziarna

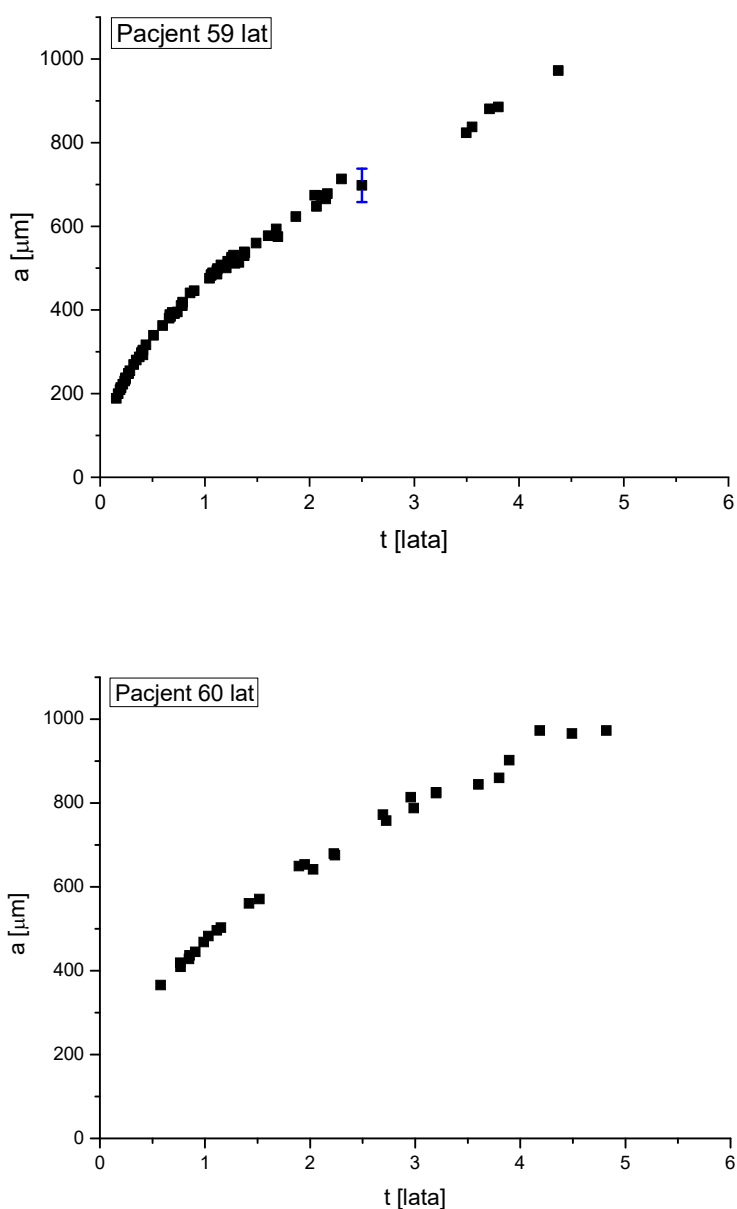
odbywa się w coraz dłuższym czasie. Wzrost ziarna może zostać również spowolniony lub zahamowany poprzez zmianę nawyków żywieniowych lub wyeliminowanie leków zakłócających bilans wapniowy. Drugą kwestią może być częściowe rozpuszczanie ziaren na rzecz wzrostu innych, które z czasem także mogą ulec rozpuszczaniu.



Rys. 5.2. Zależność wartości promienia ziaren mineralnych, zbudowanych z CPPD, od czasu wzrostu, wyznaczona na podstawie obliczeń modelowych, dla dwóch przypadków więzadeł żółtych. Maksymalny błąd pomiarowy zaznaczono na pierwszym wykresie.



Rys. 5.3. Zależność wartości promienia ziaren mineralnych, zbudowanych z HAP, od czasu wzrostu, wyznaczona na podstawie obliczeń modelowych, dla dwóch przypadków więzadeł żółtych młodych pacjentów. Maksymalny błąd pomiarowy zaznaczono na pierwszym wykresie.



Rys. 5.4. Zależność wartości promienia ziaren mineralnych, zbudowanych z HAP, od czasu wzrostu, wyznaczona na podstawie obliczeń modelowych, dla dwóch przypadków więzadeł żółtych starszych pacjentów. Maksymalny błąd pomiarowy zaznaczono na pierwszym wykresie.

Różnica czasu wzrostu ziaren CPPD i HAP sugeruje, że mechanizm mineralizacji nie przebiega według identycznych szlaków. Odzwierciedleniem tego zjawiska jest także ponad pięciokrotnie większa liczba ziaren CPPD przypadających na 100 mm³ tkanki niż w przypadku ziaren HAP. Różnice liczby i wielkości ziaren sugerują, że były one w odmiennej fazie wzrostu,

a nukleacja zarodków nastąpiła prawdopodobnie w różnym czasie. Jednoznaczne ustalenie przyczyn zróżnicowanego wzrostu minerałów wymaga jednak dalszych badań.

W obliczeniach modelowych wykorzystano stężenie wolnych jonów wapniowych. Należy zauważyć, że w płynie zewnątrzkomórkowym około 40% wapnia jest związana z białkami, głównie albuminą, natomiast ~10% Ca występuje w postaci kompleksów z anionami organicznymi, jak cytrynianowy i mleczanowy. Pozostałe 50% stanowi wapń zjonizowany, o dużym znaczeniu fizjologicznym. Założenia przyjęte w pracy nie uwzględniają fluktuacji w stężeniu wapnia, a wyniki przedstawiają czas wzrostu ziaren przy niezaburzonej gospodarce wapniowej.

Określenie czasu wzrostu mineralizacji odgrywa istotną rolę w działaniu prewencyjnym, zapobiegającym utracie elastyczności tkanek na skutek ich mineralizacji, a także możliwość leczenia bez konieczności ekstrakcji chirurgicznej. Obliczenia modelowe wskazują, że czas wzrostu ziaren mineralnych o promieniu do 400 μm jest stosunkowo krótki i trudny do zidentyfikowania technikami obrazowania medycznego, a omawiana patologia jest diagnozowana dopiero w wysokim stadium zaawansowania jako współtowarzysząca, zazwyczaj przy okazji diagnostyki innych chorób.

6. Podsumowanie

Prezentowane wyniki nie wyczerpują zagadnień dotyczących procesu patologicznej mineralizacji tkanek miękkich. W pracy zebrano opublikowane do tej pory dane, dotyczące kalcyfikacji wybranych tkanek miękkich i uzupełniono wiedzę poprzez kompleksową analizę minerałów. Analiza patologicznej mineralizacji wniosła wiele interesujących informacji dotyczących struktury chemicznej, budowy morfologicznej oraz relacji ze zmianami stenotycznymi w tkankach. Do najważniejszych wniosków, płynących z analizy wyników, należą:

1. W płatkach zastawek aortalnych i więzadłach żółtych kręgosłupa stwierdzono obecność depozytów mineralnych o heterogenicznej strukturze, zbudowanych z ziaren mineralnych i materiału organicznego,
2. Fazę mineralną stanowił hydroksyapatyt, podobny do apatyty kostnego, przy czym w dwóch przypadkach więzadeł żółtych stwierdzono obecność dwuwodnego pirofosforanu wapnia,
3. Hydroksyapatyt występował we wszystkich grupach badawczych, u młodych i starszych pacjentów. Pirofosforan wapnia wystąpił tylko u starszych pacjentów ze stenozą kanału kręgowego,
4. Proces tworzenia hydroksyapatytu i pirofosforanu wapnia przebiega prawdopodobnie według odmiennych mechanizmów. Odkładanie hydroksyapatytu jest związane z procesem degeneracyjnym tkanki, w wyniku starzenia i/lub mikro-urazów. Tworzenie pirofosforanu wapnia może być następstwem działalności dodatkowego czynnika, np. choroby reumatoidalnej,
5. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy składem pierwiastkowym depozytów w AV i składem kości. Zanotowano jednak różnice w zawartości Ca i P (2 razy mniej) oraz Fe (2 razy więcej) w depozytach LF w porównaniu ze składem kości,
6. Średnia gęstość depozytów nieznacznie przewyższała gęstość kości, a w skrajnych przypadkach osiągała nawet gęstość szkliwa zębowego,
7. Różna gęstość i objętość depozytów wskazuje, że wzrost kryształów odbywa się w zmiennych warunkach środowiska i/lub przebiega z różną szybkością,
8. Stenoza kanału kręgowego nie jest warunkiem koniecznym do wystąpienia mineralizacji więzadeł żółtych,

9. Patologiczna mineralizacja tkanek została rozpoznana u młodych (~30 lat) i starszych pacjentów, a w niektórych przypadkach więzadeł żółtych nie wystąpiła wcale,
10. Obliczenia modelowe wykazały, że wzrost ziaren CPPD trwał od ~miesiąca do 6 lat, natomiast w przypadku ziaren HAP u młodych pacjentów do 4 lat, a u starszych do 5.5 roku,
11. Korekcja *efektu częściowego wypełnienia voxela* w mikrotomografii komputerowej z użyciem programu BmpBinarizer, wykorzystującego progowanie lokalne, prowadzi do dwóch wniosków: Po pierwsze, korekcja PVE pozwala zredukować różnice pomiędzy wartościami parametrów struktury zobrazonej z dwoma rozdzielczościami z 14% do 6.5%. Po drugie, korekcja PVE wprowadza wyraźną różnicę w wartościach parametrów struktury zobrazonej z wyższą zdolnością rozdzielczą.

Dodatek – Program BmpBinarizer

Program BmpBinarizer został stworzony w obiektowym języku programowania Java, z zastosowaniem klasy BufferedImage. Binaryzację przeprowadzono przy użyciu gotowych metod klasy Binaryze.java. Jako parametry przyjęto trzy obrazy GrayScaleImage (skala szarości w zakresie 0 - 255) oraz parametry μ (średnia wartość zaczernienia) i σ (odchylenie standardowe). Aby odczytać wartość piksela o współrzędnych $P(x, y)$ zastosowano metodę BinarizePixel(x,y). Następnie sprawdzono czy wartość piksela znajduje się w zakresie progowania ($\mu - \sigma$; $\mu + \sigma$). Jeśli tak, to przypisano analizowanemu punktowi obrazu wartość 255. Jeśli wartość ta nie spełniała I kryterium, wówczas sprawdzano czy wartość piksela znajduje się w zakresie progowania ($\mu - 2\sigma$; $\mu + 2\sigma$) oraz czy wartość zaczernienia pikseli z nim sąsiadujących znajduje się w tym zakresie. Jeśli tak, to analizowanemu pikselowi przypisano wartość 255, w przeciwnym razie wartość 0. Algorytm klasyfikacji wartości zaczernienia piksela o współrzędnych $P(x, y)$ i sąsiadujących z nim pikseli o współrzędnych $P_i(x_i, y_i)$, gdzie $i \in (1; 4)$, przedstawiono poniżej:

$$P(x, y) \begin{cases} \text{jeżeli } P(x, y) \in (\mu \pm \sigma) \Rightarrow P(x, y) = 255 \\ \text{jeżeli } P(x, y) \notin (\mu \pm \sigma) \end{cases} \longrightarrow \begin{cases} \text{jeżeli } P(x, y) \notin (\mu \pm 2\sigma) \Rightarrow P(x, y) = 0 \\ \text{jeżeli } P(x, y) \in (\mu \pm 2\sigma) \wedge P_i(x_i, y_i) \in (\mu \pm 2\sigma) \\ \Rightarrow P(x, y) = 255. \end{cases}$$

Przedstawiony algorytm został oparty o analizę sąsiedztwa von Neumana (Rys. D.1), w której rozważa się cztery piksele przylegające ścianami do wybranego piksela [138, 140-141]. W analizie sąsiedztwa istotne jest zawężenie przeszukiwanej przestrzeni do takiej, w której prawdopodobieństwo znalezienia pikseli o jednakowej/zbliżonej wartości jest największe. Dlatego do analizy wybrano najbliższe sąsiedztwo piksela centralnego z możliwością rozbudowy algorytmu dla większej liczby pikseli. Ponieważ analiza prowadzona jest w trzech wymiarach, podczas binaryzacji uwzględniany jest obraz zawierający analizowany piksel i dwa obrazy z nim sąsiadujące, każdy o wymiarach 3x3 piksele. A zatem każdy obraz składa się z 9 pikseli, a po nałożeniu trzech obrazów otrzymujemy układ o wymiarach 3x3x3 voxeli, czyli 27

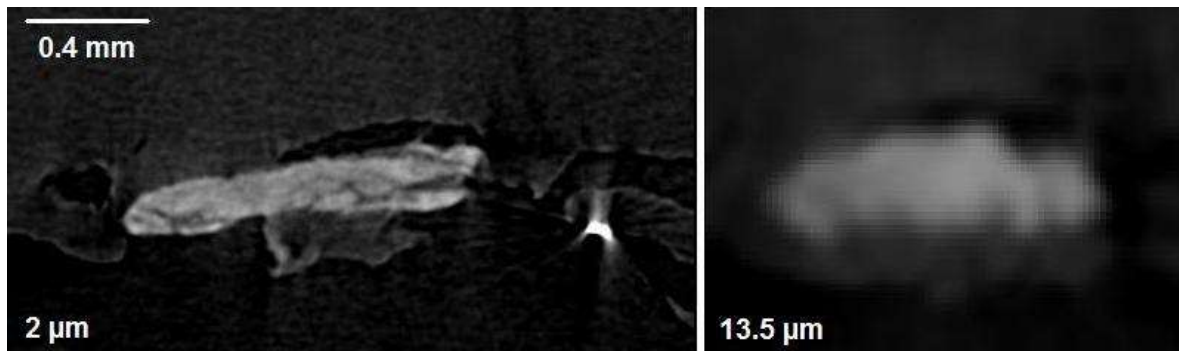
voxeli. W związku z tym rozważa się voxel centralny oraz jego sześć sąsiadów: od góry, od dołu, z lewej i prawej strony oraz z przodu i z tyłu.



Rys. D.1. Sąsiedztwo von Neumanna obiektu.

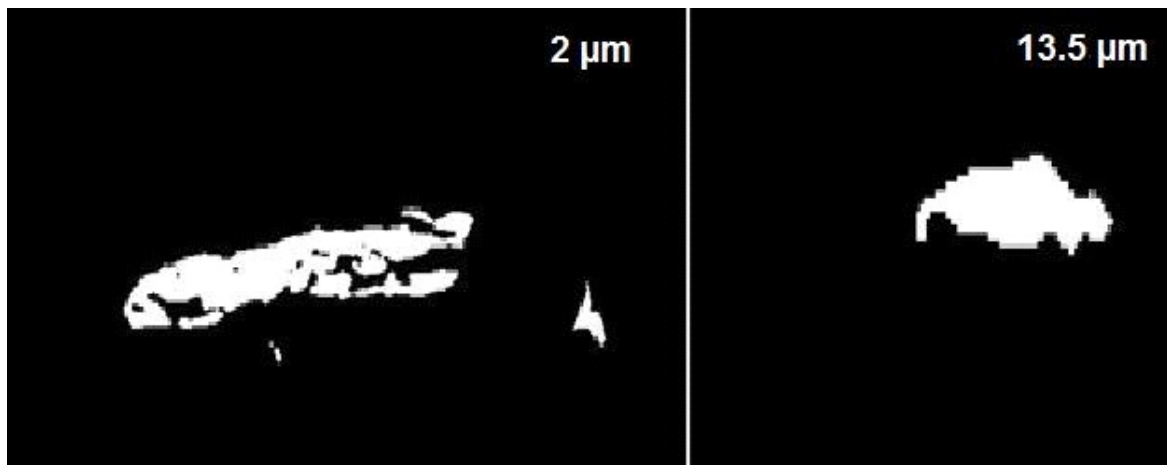
Przeanalizowano znaczenie korekcji PVE w pomiarach mikrotomograficznych dla próbki zmierzonej przy dwóch zdolnościach rozdzielczych – 13.5 μm i 2 μm . Pomiarzy przeprowadzono dla wybranego depozytu mineralnego o długości 0.87 mm. Wykonano progowanie dla obu przypadków metodą dopasowania funkcji Gaussa do maksimum na histogramie, pochodzącego od fazy nieorganicznej. W celu przeprowadzenia analizy, przy zachowaniu jednakowych warunków pomiaru, konieczne było ustalenie wartości progowania osobno dla każdego przypadku. Należy wziąć pod uwagę, że przy zastosowaniu dwóch różnych rozdzielczości pomiar wykonywany jest z różną odległością próbki od źródła, co skutkuje odmiennym czasem naświetlania próbki. Dla rozdzielczości 13.5 μm ustalono zakres progowania równy 118 ± 15 , a dla 2 μm zakres wynosił 129 ± 20 .

Następnie wykonano binaryzację obrazów z użyciem progowania globalnego za pomocą programu dedykowanego dla mikrotomografu SkyScan i progowania za pomocą stworzonego programu BmpBinarizer opartego na progowaniu lokalnym. Na rysunku D.2 przedstawiono zrekonstruowane obrazy próbki zmierzonej przy dwóch zdolnościach rozdzielczych.

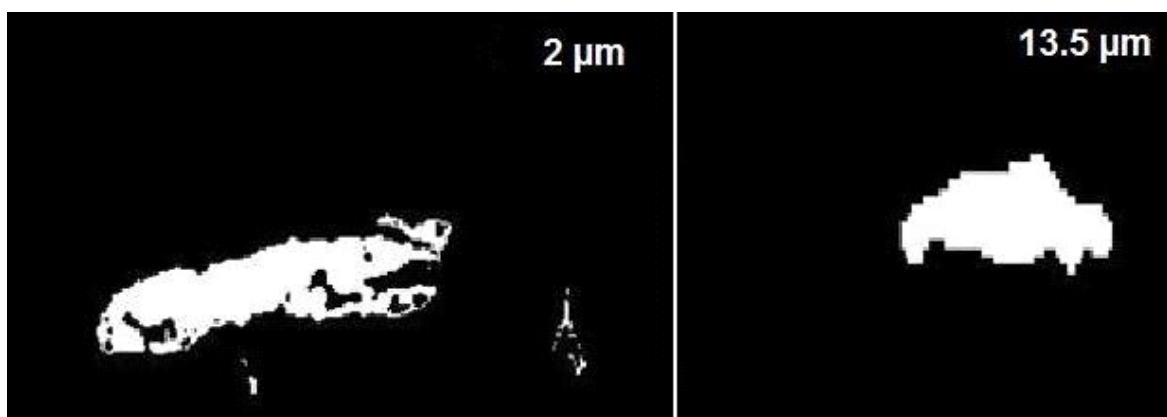


Rys. D.2. Rekonstrukcja obrazu z dwoma różnymi rozdzielczościami- program SkyScan

Obrazy zbinaryzowanych struktur przedstawiono na rysunkach. D.3 i D.4.



Rys. D.3. Obrazy zbinaryzowane z użyciem progowania globalnego- program SkyScan



Rys. D.4. Obrazy zbinaryzowane przy pomocy programu BmpBinarizer

Obliczono objętość struktury zbinaryzowanej z użyciem dwóch wymienionych metod progowania. Wyniki przedstawiono w tabeli D.1:

Rozdzielczość	Progowanie globalne	Progowanie -BmpBinarizer
13.5 μm	0.030 mm^3	0.029 mm^3
2 μm	0.035 mm^3	0.031 mm^3

Tab. D.1. Objętość struktury zobrazowanej przy dwóch zdolnościach rozdzielczych oraz przy dwóch metodach progowania

Wyniki zamieszczone w tabeli D.1 zostały porównane pod kątem różnicy wartości parametrów dla danej rozdzielczości pomiarów przy zastosowaniu progowania globalnego i z użyciem programu BmpBinarizer wykorzystującego progowanie lokalne oraz pod kątem wpływu PVE na wartości parametrów przy pomiarach z dwoma różnymi rozdzielczościami. Na podstawie wyników oszacowano, że binaryzacja struktury zobrazowanej z niską i wysoką zdolnością rozdzielczą (13.5 μm i 2 μm) przy zastosowaniu progowania globalnego prowadzi do różnicy objętości struktury na poziomie 14.3%. Przeprowadzenie korekcji PVE z użyciem programu BmpBinarizer pozwala na zmniejszenie różnicy objętości struktury do 6.5%. Wynik ten jest zgodny z oczekiwaniami, bowiem korekcja PVE pozwala uwzględnić w obliczeniach piksele na brzegach struktury, która uległa rozmyciu przy obrazowaniu z niższą zdolnością rozdzielczą. Znając zmianę objętości obiektu na skutek efektu PVE możliwe jest oszacowanie jego wpływu na gęstość struktury. Przy wykorzystaniu progowania globalnego różnica gęstości obiektu zmierzonego przy dwóch zdolnościach rozdzielczych, proporcjonalnie do objętości, wynosiła ~14%, a po zastosowaniu korekcji PVE różnica ta była na poziomie 6.5%. Taka różnica gęstości może mieć znaczący wpływ zwłaszcza podczas analiz medycznych. Za przykład może posłużyć diagnostyka guzów nowotworowych, których gęstość często jest wskaźnikiem ich złośliwości [142]. Różnica objętości struktury obliczonej z zastosowaniem progowania lokalnego i globalnego, dla pomiarów ze zdolnością rozdzielczą 13.5 μm , wyniosła 3.4%, natomiast dla pomiarów z rozdzielczością 2 μm jest równa 11.4%. Przedstawiony wynik wskazuje, że progowanie lokalne ma szczególne znaczenie dla pomiarów z wyższą zdolnością rozdzielczą.

Program komputerowy BmpBinarizer wraz z kodem źródłowym i instrukcją obsługi został zamieszczony na nośniku danych załączonym na końcu pracy. W celu uruchomienia programu demonstracyjnego wymagane jest zainstalowanie oprogramowania Java w wersji od 1.7.

7. Bibliografia

1. Sawicki W. Histologia. PZWL. Warszawa. 2012.
2. Ignasiak Z, Janusz A, Jarosińska A. Anatomia człowieka. AWF. Wrocław. 2002.
3. Clark B. Normal bone anatomy and physiology. Clin J Am Soc Nephrol. 2008; 3:131-139.
4. Bonucci E. The mineralization of bone and its analogies with other hard tissues. Intech. 2013; 6:145-184.
5. Nyman J, Reyes M, Wang X. Effect of ultrastructural changes on the toughness of bone. Micron. 2005; 36:566-582.
6. Kini U, Nandeesh B. Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. Springer. 2012; 2:29-55.
7. LeGeros R, Taheri M, Quirolgico G i wsp. Formation and stability of apatites: effects of some cationic substitutes. 2nd International congress on phosphorus compounds proceedings. Boston. 1980; 89-102.
8. Sobczak-Kupiec A, Wzorek N. Właściwości fizykochemiczne ortofosforanów wapnia istotnych dla medycyny –TCP i HAP. Czas Tech. 2010; 107:309-322.
9. Pawlikowski M. Mineralogia kości. PAN. Kraków 2002.
10. Karuga E, Żywicka B, Pielka S. Uszkodzenia chrząstki stawowej- problem do rozwiązania. Procesni technika, Praga. 2010; 207-219.
11. Ciszek B. Morfologia i funkcja chrząstki stawowej. Acta Clinica. 2001; 1:10-14.
12. Mackie E, Ahmed Y, Tatarczuch L i wsp. Endochondral ossification: How cartilage is converted into bone in the developing skeleton. Internat J Biochem & Cell Biol. 2008; 40:46-62.
13. Włodarski K. Budowa i czynność tkanki kostnej. Czas Stomatol. 2009; 62:282-292.
14. www.histologia.cm-uj.krakow.pl/Stomatologia/Materialy/zab1.pdf
15. Sierpińska T, Stocka A, Gołębowska M. Struktura szkliwa, właściwości śliny oraz bruksizm jako czynniki etiologiczne odpowiedzialne za starcie patologiczne. Przegląd piśmiennictwa. Protet Stomatol. 2008; 2:100-104.
16. Karwowski W, Naumnik B. Kalcyfikacja naczyń— problem interdyscyplinarny. Forum Nefrologiczne. 2011; 2:91–99.

17. Rutsch F, Nitschke Y, Terkeltaub R i wsp. Genetics in arterial calcification: pieces of a puzzle and cogs in a wheel. *Circ Res.* 2011; 109:578-592.
18. Tanaka T, Ikari K, Furushima K i wsp. Genomewide linkage and linkage disequilibrium analyses identify COL6A1, on chromosome 21, as the locus for ossification of the posterior longitudinal ligament of the spine. *Am J Hum Genet.* 2003; 73:812-822.
19. Shiigi E, Sugiyama T, Tanaka H i wsp. Possible involvement of vitamin D receptor gene polymorphism in male patients with ossification of spinal ligaments. *J Bone Miner Metab.* 2001; 19:308-311.
20. Shirakura Y, Sugiyama T, Tanaka H i wsp. Hyperleptinemia in female patients with ossification of spinal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 2000; 267:752-755.
21. Yoshihiro S, Akinobu N, Masakuni N. Ligamentous ossification of the cervical spine in the late middle-aged Japanese men. Its relation to body mass index and glucose metabolism. *Spine.* 1996; 21:2474–2478.
22. Mohler E, Gannon F, Reynolds C i wsp. Bone formation and inflammation in cardiac valves. *Circulation.* 2001; 103:1522–1528.
23. Mohler E. Mechanism of aortic valve calcification. *Am J Cardiol.* 2004; 94:1396-1402.
24. London G, Marchais S, Gueri A i wsp. Arteriosclerosis, vascular calcifications and cardiovascular disease in uremia. *Curr Opin Nephrol Hypertens.* 2005; 14:525–531.
25. Li P, Huang L, Zhao Z i wsp. Spinal-cord compression related to pseudohypoparathyroidism. *J Clin Neurosci.* 2011; 18:143-145.
26. Razzaque MS. The dualistic role of vitamin D in vascular calcification. *Kidney Int.* 2011; 70:8–14.
27. Kłosiński M, Skrzat J, Walocha J i wsp. Contemporary views on the ossification of the ligamenta flava. *Ortop Traum Reh.* 2012; 14:495-503.
28. Tsukamoto N, Maeda T, Miura H i wsp. Repetitive tensile stress to rat caudal vertebrae inducing cartilage formation in the spinal ligaments: a possible role of mechanical stress in the development of ossification of the spinal ligaments. *J Neurosurg Spine.* 2006; 5:234-242.
29. Furukawa KI. Current topics in pharmacological research on bone metabolism: molecular basis of ectopic bone formation induced by mechanical stress. *J Pharmacol Sci.* 2006; 100:201–204.
30. Xu P, Wang C, He H i wsp. Spinal balance failure: a potential cause of spinal ligament ossification. *Med Hypotheses.* 2011; 76:908-910.

31. Barba I, Villacorta E, Bratoz-Perez MA i wsp. Aortic Valve-derived Calcifying Nanoparticles: No evidence of life. *Rev Esp Cardiol.* 2012; 65:813–818.
32. Hu YR, Zhao Y, Sun YW i wsp. Detection of nanobacteria-like material from calcified cardiac valves with rheumatic heart disease. *Cardiovasc Pathol.* 2010; 19:286–292.
33. Janiszewska M, Kulik T, Dziedzic M i wsp. Osteoporoza jako problem społeczny-patogeneza, objawy i czynniki ryzyka osteoporozy pomenopauzalnej. *Probl Hig Epidemiol.* 2015; 96:106-114.
34. Browler M, Merryman D. In vitro models of aortic valve calcification: solidifying a system. *Cardiovasc Pathol.* 2015; 24:1-10.
35. Orimo H. The mechanism of mineralization and the role of Alkaline Phosphatase in health and disease. *J Nippon Med Sch.* 2010; 77:4-12.
36. Ho P. The pulsewave reflections model: Exploring for a fundamental mechanism of cardiovascular calcification. *Med Hypoth.* 2007; 69:792-799.
37. Yochelis A, Tintut Y, Demer L i wsp. The formation of labyrinths, spots and stripe patterns in a biochemical approach to cardiovascular calcification. *New J Phys.* 2008; 10:2-15.
38. Mebarek S, Aboulsalham A, Magne D i wsp. Phospholipases of mineralization competent cells and matrix vesicles: Roles in physiological and pathological mineralizations. *Int J Mol Sci.* 2013; 14:5036-5129.
39. Proudfoot D, Skepper J, Hegyi L i wsp. The role of apoptosis in the initiation of vascular calcification. *Z Kardiol.* 2001; 3:43-46.
40. Dwight A. Oxidation, inflammation, and aortic valve calcification. *J Am Coll Cardiol.* 2008; 52:851-854.
41. Back M, Gasser T, Michel JB i wsp. Biomechanical factors in the biology of aortic wall and aortic valve diseases. *Cardiovasc Res.* 2013; 99:232-241.
42. Balachandran K, Sucosky P, Yoganathan A. Hemodynamics and mechanobiology of aortic valve inflammation and calcification. *Inter J Inflam.* 2011; 2011:1-15.
43. Leopold J. Cellular mechanism of aortic valve calcification. *Circ Cardiovasc Interv.* 2012; 5:605-614.
44. Wright M, Aikawa M, Szeto W i wsp. Identification of a Wnt-responsive signal transduction pathway in primary endothelial cells. *Biochem Biophys Res Communications.* 1999; 263:384-388.
45. Songyi X, Gotlieb AI. Wnt3a/ β -catenin increases proliferation in heart valve interstitial cells. *Cardiovasc Pathol.* 2013; 22:156-166.

46. Kim J, Kim J, Kim DW i wsp. Wnt5a induces endothelial inflammation via β -catenin-independent signaling. *J Immunol.* 2010; 2:1274-1282.
47. Pytlik M. Bone remodeling disorders in diabetes type 2 and during its treatment. *Farm Przegl Nauk.* 2010; 11:45-50.
48. Głowińska-Olszewska B, Luczyński W, Bossowski A. Endothelial progenitor cells as a new marker of endothelial function with respect to risk of cardiovascular disorders. *Postępy Hig Med Dośw.* 2011; 65:8-15.
49. Gautieri A, Vesentini S, Redaelli A i wsp. Hierarchical structure and nanomechanics of collagen microfibrils from the atomistic scale up. *Nano Lett.* 2011; 11:757–766.
50. Nudelman F, Pieterse K, George A i wsp. The role of collagen in bone apatite formation in the presence of hydroxyapatite nucleation inhibitors. *Nat Mater.* 2010; 9:1004–1009.
51. Prieto R, Gomila I, Sohnle O i wsp. Study on the structure and composition of aortic valve calcific deposits: Etiological aspects. *J Bioph Chem.* 2011; 2:19-25.
52. Gilinskaya G, Okuneva G, Vlasov Y. Investigation of pathogenic mineralization human heart valves. *J Str Chem.* 2003; 4:622-631.
53. Holmgren A, Rumsby G, Gustafsson S. The nature of cardiac calcification in aortic stenosis. *Internat J Cardiol.* 2012; 2:319-321.
54. Yayama T, Kobayashi S, Sato R i wsp. Calcium pyrophosphate crystal deposition in the ligamentum flavum of degenerated lumbar spine: histopathological and immunohistological findings. *Clin Rheumatol.* 2008; 27:597–604.
55. Seki S, Kawauchi Y, Ishihara H i wsp. Lumbar spinal stenosis due to a large calcified mass in the ligamentum flavum. *Asian Spine J.* 2013; 3:236-241.
56. Manoharan R, Baraga J, Rava R i wsp. Biochemical analysis and mapping of atherosclerotic human artery using FT-IR microspectroscopy. *Atherosclerosis.* 1993; 103:181–193.
57. Pritzker K. Articular pathology of gout, calcium pyrophosphate dihydrate and basic calcium phosphate crystal deposition arthropathies. *Gout & Other Crystal Arthrop.* 2012; 1:2-19.
58. Oliva F, Via AG, Maffulli N. Physiopathology of intratendinous calcific deposition. *BMC Med.* 2012; 10:95-95.
59. Cox R, Morgan M. Microcalcifications in breast cancer: Lessons from physiological mineralization. *Bone.* 2013; 53:437–450.
60. Channa NA, Ghangro A, Soomro A i wsp. Analysis of kidney stones by FTIR spectroscopy. *JLUMHS.* 2007; 6:66-73.

61. Nguyen Ch, Hang-Korng E, Bazin D i wsp. Osteoarthritis, a basic calcium phosphate crystal-associated arthropathy. *Arthritis Rheum.* 2010; 62:2829-2830.
62. Ledingham J, Regan M, Jones A i wsp. Radiographic patterns and associations of osteoarthritis of the knee in patients referred to hospital. *Rheum Dis.* 1993; 52:520-526.
63. Lagier R, Baud CA. Magnesium whitlockite, a calcium phosphate crystal of special interest in pathology. *Pathol Res Pract.* 2003; 5:329-335.
64. Nguyen C, Lioté F, Hannouche D i wsp. Revisiting chemical and morphological diversity of calcium-containing crystals in human osteoarthritic menisci *Annals of the Rheum Dis.* 2013; 71:698-700.
65. Ropion-Michaux H, Mathias J, Bruot O i wsp. Liver calcifications in adults: the KUB stars are too frequently neglected in the CT era. *J Radiol.* 2010; 91:759-768.
66. Den Bakker MA, Bakker A, Beenen R i wsp. Subtotal liver calcification due to epithelioid hemangioendothelioma. *Pathol Res Pract.* 1998; 3:189-194.
67. Haddow RA, Kemp-Harper RA. Calcification in the liver and portal system. *Clin Radiol.* 1967; 3:225-236.
68. Dessombz A, Meria P, Bazin D i wsp. Revisiting the chemical diversity in prostatic calculi: a SEM and FT-IR investigation. *Prog Urol.* 2011; 13:940-945.
69. Hanna S, Neves-Junior W, Marta G i wsp. Role of intra- and periprosthetic calcifications in image-guided radiotherapy for prostate cancer. *Oncol Biol Phys.* 2012; 3:1208-1216.
70. Zeng G, McGowan T, Tessa L i wsp. Calcifications are potential surrogates for prostate localization image-guided radiotherapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys.* 2008; 4:963-966.
71. Dudley A, Khan Z, Shin SC i wsp. Calcification of multipotent prostate tumor endothelium. *Cancer Cell.* 2008; 3:201-211.
72. Lin SY, Lin MJ, Cheng WT. FT-IR and Raman vibrational microspectroscopies used for spectral biodiagnosis of human tissues. *Spectroscopy.* 2007; 21:1–30.
73. <http://www.kardiolo.pl/zastawki.htm>
74. https://pl.wikipedia.org/wiki/Zw%C4%99%C5%BCenie_zastawki_aortalnej
75. Holmgren A, Rumsby G, Gustafsson S i wsp. The nature of cardiac calcification in aortic stenosis. *Int J Cardiol.* 2012; 2:319-321.
76. http://www.ortopeda.net.pl/informacje_03.html
77. https://pl.wikipedia.org/wiki/Zw%C4%99%C5%BCenie_kana%C5%82u_kr%C4%99gowego
78. Ahmed T, Goel P, Babu R. A study of lumbar canal by MRI in clinically symptomatic and asymptomatic subjects. *J Anat Soc.* 2011; 602:184–187.

79. Sobański D, Strohm W, Kolasa P. Ocena leczenia operacyjnego pacjentów ze stenozą zwyrodnieniową w odcinku lędźwiowym metodą hemilaminektomii. Aktualn Neurol. 2014; 1:70–74.
80. Shiguematsu FY, de Souza E, Zimmermann i wsp. Thoracic myelopathy due to calcification of the *ligamentum flavum* with hyperproteinorachia and responsive to steroid therapy: case report. Rev Bras Reumatol. 2012; 3:438-446.
81. Hyuk H, Lee JK, Lee JH i wsp. Thoracic myelopathy caused by ossification of the ligamentum flavum. J Korean Neurosurg Soc. 2009; 46:189-94.
82. Troyer K. Comprehensive viscoelastic characterization of human lower cervical spine ligaments. PhD Thesis. Kolorado. 2010.
83. <http://limbicus.pl/przerost-wiezadel-zoltych/>
84. Chen H, Zhou X, Fujita H i wsp. Age related changes in trabecular and cortical bone microstructure. Int J Endocrin. 2013; 2013:1-9.
85. Wróbel A, Rokita E, Korbas M i wsp. Application of EDXRF to the assessment of aortic valve mineralization. X-Ray Spectrom. 2001; 30:393-396.
86. Pleshko N, Boskey A, Mendelshon R. Novel infrared spectroscopic method for the determination of crystallinity of hydroxyapatite mineral. Biophys J. 1991; 4:786–793.
87. Stock S. Microcomputed tomography: methodology and applications. CRC Press Taylor and Francis Group. Floryda. 2009.
88. Buzug T. Computed Tomography: from photon statistics to modern cone-beam CT. Springer. Berlin. 2008.
89. Hryniewicz A. Fizyczne metody diagnostyki medycznej i terapii. PWN. Warszawa. 2000.
90. Feldkamp LA, Davis L, Kress J. Practical cone-beam algorithm. J Opt Soc Am A. 1984; 1:612-619.
91. Clack R, Defrise M. Cone-beam reconstruction by the use of radon transform intermediate functions. J Opt Soc Am A. 1994; 11:580-585.
92. Cierniak R. Tomografia komputerowa. Budowa urządzeń CT, algorytmy rekonstrukcyjne. EXIT. Warszawa. 2005.
93. Bolte S, Cordelieres F. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. J Microscopy. 2009; 3:213-232.
94. Tadeusiewicz R, Korohoda P. Komputerowa analiza i przetwarzanie obrazów. Postęp Rozwoju Telekom. Kraków. 1997.

95. Leszczyński B. Mikrotomografia komputerowa i jej zastosowania medyczne. Praca magisterska. Kraków. 2011.
96. Bielecki J, Bożek S, Lekki J i wsp. Metoda mikrotomografii komputerowej dla układu mikrowiązki promieniowania X w zastosowaniu do wyznaczania porowatości i powierzchni właściwej skał. PAN. Kraków. 2009.
97. Dohnalik M. Zwiększenie możliwości wyznaczania parametrów zbiornikowych skał z wykorzystaniem rentgenowskiej mikrotomografii komputerowej. Praca doktorska. Kraków. 2013.
98. Wróbel A, Goncerz G, Kunz J i wsp. Determination of the elemental composition of aortic valve cusps by EDXRF. *X-Ray Spectrom.* 2004; 33:50-54.
99. Manual for Nicolet 6700. GPL Ghostscript 8.61. Oxford. 2009.
100. Savitzky A, Golay M. Smoothing and differentiation of data by simplified least squares procedures. *Anal Chem.* 1964; 36:1627-1639.
101. Fawcett T. PDF-4+ The material identification database. *Microstr Anal Mater Sci.* Freiburg. 2005.
102. Bewick V, Cheek L, Ball J. Further nonparametric methods. *Crit Care.* 2004; 8:196-199.
103. Helliwell TR, Kelly S, Walsh H i wsp. Elemental analysis of femoral bone from patients with fractured neck of femour or osteoarthritis. *Bone.* 1996; 2:151-157.
104. Janos I, Szathmary L, Nadas E i wsp. Evaluation of elemental status of ancient human bone samples from Northeastern Hungary dated to the 10th century AD by XRF. *Nucl Instr Meth B.* 2011; 269:2593–2599.
105. Jurkiewicz A, Wiechuła D, Nowak R i wsp. Metal content in femoral head spongius bone of people living in regions of different degrees of environmental pollution in Southern and Middle Poland. *Ecotox Environm Saf.* 2004; 59:95–101.
106. Zaichick V, Tzaphlidou M. Calcium and phosphorus concentrations and the calcium/phosphorus ratio in trabecular bone from the femoral neck of healthy humans as determined by neutron activation analysis. *Appl Radiat Isot.* 2003; 6:623-627.
107. Orzechowska S, Wróbel A, Goncerz G i wsp. Physicochemical and micro-tomographic characterization of inorganic deposits associated with aortic stenosis. *J Heart Valve Dis.* 2014; 23:40-47.
108. Orzechowska S, Wróbel A, Koziel M i wsp. Physicochemical characterization of mineral deposits in human ligamenta flava. *J Bone Miner Metab.* 2017; 7:1-9.

109. Grigorjeva L, Millers D, Smits K i wsp. Characterization of hydroxyapatite by time-resolved luminescence and FTIR spectroscopy. *Mater Sci Eng.* 2013; 49:1-4.
110. Rey C, Collins B, Goehl T i wsp. The carbonate environment in bone mineral: A resolution-enhanced Fourier transform infrared spectroscopy study. *Calc Tissue Int.* 1989; 45:157-164.
111. Kaygili O. Synthesis and characterization of paramagnetic Mn doped $\text{Ca}_2\text{P}_2\text{O}_7$ ceramics by sol-gel method. *J Ceram Proces Res.* 2015; 16:54-58.
112. Hayashi K, Ishidou Y, Yonemori K i wsp. Expression and localization of bone morphogenetic proteins (BMPs) and BMP receptors in ossification of the ligamentum flavum. *Bone.* 1997; 21:23-30.
113. Faibisha D, Gomes A, Bovin G i wsp. Infrared imaging of calcified tissue in bone biopsies from adults with osteomalacia. *Bone.* 2005; 36:6 –12.
114. Turunen M, Prantner V, Jukka S i wsp. Composition and microarchitecture of human trabecular bone change with age and differ between anatomical location. *Bone.* 2013; 54:118-125.
115. Isaksson H, Turunen M, Rieppo L i wsp. Infrared spectroscopy indicates altered bone turnover and remodeling activity in renal osteodystrophy. *J Bone Miner Res.* 2010; 25:1360–1366.
116. Mikroulis D, Mavrilas D, Kapolos J i wsp. Physicochemical microscopical study of calcific deposits from natural and bioprosthetic heart valves. Comparison and implications for mineralization mechanism. *J Mat Sc: Mat Med.* 2002; 13:885-889.
117. Tomazic BB. Physicochemical principles of cardiovascular calcification. *Cardiology.* 2001; 90:68-80.
118. Delogne Ch, Lawford P, Habesch S i wsp. Characterization of the calcification of the cardiac valve bioprotheses by environmental scanning electron microscopy and vibrational spectroscopy. *J Microscopy.* 2007; 288:62-77.
119. Louvet L, Bazin D, Buchel J i wsp. Characterization of calcium phosphate crystals on calcified human aortic vascular smooth muscle cells and potential role of magnesium. *PLoS ONE.* 2015; 10:11534-115342.
120. Oprea C, Szalanski P, Gustova M i wsp. Multivariate comparison of elemental concentration in human teeth. *Appl Radiat Isot.* 2009; 12:2142-2145.
121. Riyat M, Sharma D. Analysis of 35 inorganic elements in teeth in relation to caries formation. *Biol Trace Elem Res.* 2009; 129:126-129.

122. Gutierrez-Salazar M, Reyes-Gasga J. Microhardness and chemical composition of human tooth. *Mater Res*. 2003; 3:367-373.
123. Avrahami E, Vigler I, Stern D i wsp. Computed tomographic demonstration of calcification of the ligamenta flava of the lumbosacral spine in ankylosing spondylitis. *Annals Rheum Dis*. 1988; 47:62-64.
124. Cabre P, Pascal-Mousellard H, Kaidomar S i wsp. Six cases of cervical ligamentum flavum calcification in Blacks in the French West Indies. *Joint Bone Spine*. 2001; 68:158-165.
125. Bazin D, Carpentier X, Brocheriou I i wsp. Revisiting the localization of Zn^{2+} cations sorbed on pathological calcifications made of apatites through X-ray absorption spectroscopy. *Biochimie*. 2009; 91:1294-1300.
126. Qu J, Thoreson A, Chen Q i wsp. Tendon gradient mineralization for tendon to bone interface integration. *J Orthop Res*. 2013; 31:1713-1719.
127. Saiki M, Adachi LK, Adachi EM. Elemental comparison in sound and carious human teeth by instrumental neutron activation analysis. *J Radioanal Nucl Chem*. 2009; 282:29–32.
128. Cameron JR, Skofronick J, Grant R. *Physics of the Body*. Med Phys Pub. Nowy Jork. 2014.
129. Verberckmoes S, Behets G, Oste L I wsp. Effects of strontium on the physicochemical characteristics of hydroxyapatite. *Calc Tissue Int*. 2004; 75:405–415.
130. Faralay D, Duclos M, Gineyts E i wsp. The ratio $1660/1690\text{ cm}^{-1}$ measured by infrared microspectroscopy is not specific of enzymatic collagen cross-links in bone tissue. *PlosOne*. 2011; 12:28736-28736.
131. Pascolo L, Gianocelli A, Rizzardi C i wsp. Calcium micro-depositions in jugular truncular venous malformations revealed by Synchrotron-based XRF imaging. *Sci Rep*. 2014; 4:6540-6540.
132. Finsy R. On the critical radius in Ostwald ripening. *Langmuir*. 2004; 20:2975-2976.
133. Azari F, Vali H, Guerguin-Kern J i wsp. Intracellular precipitation of hydroxyapatite mineral and implications for pathologic calcification. *J Str Biol*. 2008; 162:468-479.
134. Butcher J, Simmons C, Warnock J. Mechanobiology of the aortic heart valve. *J Heart Valve Disease*. 2008; 1:62-73.
135. Butcher J, Markwald R. Valvulogenesis: the moving target. *Philosoph Transact Royal Soc B*. 2007; 1484:1489-1503.

136. Sukhova G, Shi G, Simon D i wsp. Expression of the elastolytic cathepsins S and K in human atheroma and regulation of their production in smooth muscle cells. *J Clin Invest.* 1998; 3:576-583.
137. Safford R, Bassingthwaite J. Calcium diffusion in transient and steady states in muscle. *Biophys J.* 1977; 20:113-136.
138. Markiewicz-Żukowska R. Stężenie wapnia w surowicy krwi osób starszych. *Bromat Chem Toksykol.* 2012; 3:771–774.
139. Kołtąj W, Szewczyk L. Calcium balance. Regulatory mechanisms of calcium homeostasis. *Pediatr Endocrinol.* 2006; 1:49-55.
140. Wasilewicz-Porębska A. Wybrane aspekty zastosowania 2D automatów komórkowych do przetwarzania informacji. *Z Nauk Wydz Elektrotech i Automat PG.* Gdańsk. 2009.
141. Neumann J. *The Theory of Self-reproducing Automata.* Univ of Illinois Press. Illinois. 1966.
142. Papierska L, Kasperlik-Załuska A. Incidentally discovered adrenal masses. Who should be operated? *Postępy Nauk Med.* 2008; 2:126-131.

8. Streszczenie

Sylvia Orzechowska

Zakład Fizyki Medycznej, Wydział Fizyki, Astronomii i Informatyki Stosowanej

Uniwersytet Jagielloński

Mineralizacja tkanek miękkich jest patologią opisywaną od wielu lat. Badania z użyciem metod obrazowania takich jak skaningowa mikroskopia elektronowa, obrazowanie rezonansu magnetycznego, a także histologicznych i immunohistochemicznych, były skoncentrowane głównie na analizie czynników zaangażowanych w osteogenezę. Z tego powodu badaniom poddawane były przede wszystkim obszary wokół zmineralizowanej tkanki. Jednakże fizykochemiczna struktura depozytów mineralnych nie była przedmiotem szczegółowych badań.

Celem pracy była fizykochemiczna i morfologiczna analiza mineralizacji w płatkach zastawek aortalnych (AV) i więzadłach żółtych kręgosłupa (LF), a także określenie związku patologicznej mineralizacji ze stenozą aortalną i stenożą kanału kręgowego. Badania zostały przeprowadzone na, chirurgicznie pobranych, 30 próbkach AV (25/5- stenoza zastawki/kontrola) i 24 próbkach LF (15/9- stenoza kanału kręgowego/kontrola). Dodatkowo w celach porównawczych analizie poddano próbki kości beleczkowych i zębów. Analiza morfologiczna depozytów została wykonana z użyciem mikrotomografii komputerowej. Do analizy chemicznej depozytów wykorzystano techniki fluorescencji rentgenowskiej, dyfraktometrii rentgenowskiej oraz spektroskopii w podczerwieni z transformatą Fouriera. W celu korekcji efektu częściowego wypełnienia voxela (PVE) w mikrotomografii, sporządzono program komputerowy, oparty o analizę sąsiedztwa pikseli i binaryzację lokalną. W pracy zaproponowano także model wzrostu minerałów, oparty o zjawisko dyfuzji jonów wapnia. Celem modelu było oszacowanie czasu wzrostu depozytów mineralnych.

Płatki zastawek aortalnych charakteryzowały się obecnością masywnej mineralizacji, zajmującej w niektórych przypadkach 40% objętości płatka, podczas gdy więzadła żółte są przykładem tkanki mineralizującej w niewielkim stopniu. Depozyty były mieszaniną materiału organicznego i ziaren mineralnych. Główną fazą mineralną ziaren był hydroksyapatyt typu B

(HAP), przy czym w dwóch przypadkach LF zidentyfikowano dwuwodny pirofosforan wapnia (CPPD). Ziarna charakteryzowały się różną gęstością, a jej średnia wartość była zbliżona do gęstości kości. Objętość ziaren wynosiła (0.001 - 0.6) mm³. Analiza kości beleczkowych nie wykazała różnic w gęstości beleczek kostnych pomiędzy grupami pacjentów, ale stwierdzono tendencję do spadku procentowej objętości kości beleczkowej u starszych pacjentów. Analiza strukturalna zębów wykazała, że wartość gęstości szkliwa jest znacząco wyższa od średniej gęstości depozytów w LF i AV.

Na podstawie wyników oszacowano, że binaryzacja struktury zobrazonej z niską i wysoką zdolnością rozdzielczą (13.5 µm i 2 µm) przy zastosowaniu progowania globalnego prowadzi do różnicy objętości struktury na poziomie 14.3%. Przeprowadzenie korekcji PVE za pomocą programu BmpBinarizer wykorzystującego procedurę progowania lokalnego, pozwala na zmniejszenie różnicy objętości struktury do 6.5%. Korekcja PVE wprowadza wyraźną różnicę w wartościach parametrów struktury zobrazonej z wyższą zdolnością rozdzielczą

Na podstawie obliczeń modelowych wykazano, że czas wzrostu ziaren CPPD wynosił od ~miesiąca do 6 lat, natomiast w przypadku ziaren HAP wynosił do 4 lat u młodych pacjentów i do 5.5 roku u starszych pacjentów. Wyniki analizy wskazują, że największą różnicę zmiany szybkości wzrostu ziaren zanotowano dla pacjentów z CPPD.

Dwie odmienne struktury chemiczne depozytów sugerują dwa niezależne procesy mineralizacji. Tworzenie HAP jest efektem procesu degeneracji tkanki. Odkładanie CPPD jest bardziej intensywnym procesem, w który mogą być zaangażowane dodatkowe czynniki promujące mineralizację. O większej dynamice mineralizacji CPPD mogą świadczyć wyższe wartości parametrów morfologicznych niż dla ziaren HAP. Nie wykazano statystycznie istotnych różnic pomiędzy składem pierwiastkowym depozytów w AV i składem kości. Zanotowano jednak różnice w zawartości Ca i P (2 razy mniej) oraz Fe (2 razy więcej) w depozytach LF w porównaniu ze składem kości. Analiza wyników wskazuje, że mineralizacja może występować jako patologia towarzysząca stenozie aortalnej, będąca efektem zmian hemodynamicznych w zastawce. Podobnie w przypadku stenozы kanału kręgowego kalcyfikacja może towarzyszyć stenozie lub pojawiać się w tkankach, które uległy urazom mechanicznym.

ABSTRACT

Sylvia Orzechowska

Department of Medical Physics, Faculty of Physics, Astronomy and Applied Computer
Science of the Jagiellonian University

The pathological calcification of soft tissues has been the subject of research for many years. Calcification has been studied mostly by imaging methods such as scanning electron microscopy, magnetic resonance imaging as well as histological and immunohistochemical techniques. The studies focused on specific markers for osteogenesis that are observed around the calcific zone. However, the physicochemical structure of deposits has not been thoroughly described.

The aim of the study was the physicochemical and morphological analysis of the calcium deposits in aortic valve cusps (AV) and ligamenta flava (LF) as well as finding a possible connection between mineralization and aortic stenosis and spinal stenosis. The studies were carried out on surgically removed 30 AV (25/5- aortic stenosis/control) and 24 LF (15/9 spinal stenosis/control) samples. Additionally, the trabecular bone and teeth were analyzed. For morphological analysis, the samples were examined using the micro-computed tomography. X-ray fluorescence, X-ray diffraction and Fourier transform infrared spectroscopy methods have been applied for physicochemical characterization of the inorganic material. A computer program based on an analysis of pixels neighborhood and local binarization procedure was developed in order to correct the partial volume effect (PVE) in microtomography. The mineral growth model based on the phenomenon of calcium ion diffusion was proposed. The purpose of the model was to estimate the time of mineral deposits growth.

Aortic valve cusps were characterized by the presence of massive mineralization, occupying in some cases 40% of the cusp volume, while the ligamenta flava are an example of a weakly mineralizing tissue. The deposits are a mixture of organic material and small mineral grains. The predominant crystalline phase was B-type hydroxyapatite (HAP), however in two LF cases from stenotic group the calcium pyrophosphate dehydrate (CPPD) was identified. The minerals were characterized by a different density, while the average value was similar to the density of compact bone. The volume of the deposits was spread over a broad range (0.001-0.6) mm³. The trabecular bone analysis did not show differences in bone density between groups of patients, but there was a tendency to decrease the trabecular bone volume in elderly patients.

The structural analysis of the teeth showed that the enamel density is significantly higher than the average density of deposits in LF and AV.

It was estimated that the binarization of the structure measured with a two different spatial resolutions (13.5 μm and 2 μm) using global thresholding leads to a difference in structure volume of 14.3%. PVE correction performed by BmpBinarizer program using the local thresholding procedure allows to reduce the difference in structure volume to 6.5%.

It was shown that CPPD mineral growth rate was ~month to 6 years, while for HAP minerals it was up to 4 years in young patients and up to 5.5 years in elderly patients. The results of the analysis indicate that the rate of grain growth is the biggest in patient cases with CPPD grains.

Two different crystal structures suggest two independent processes of mineralization. The HAP mineral formation is the result of the tissue degeneration process. The CPPD mineralization is a more intensive process where additional factors promoting mineralization may be involved. It has been confirmed by higher values of CPPD morphological parameters than in HAP mineral cases. The statistically significant differences in the chemical composition between deposits in AV and bone have not been observed. However, the difference in Ca and P (2 times less) and Fe (2 times higher) concentrations in LF deposits compared to bone were found. Analysis of the results indicates that mineralization can occur as a pathology accompanying aortic stenosis and can be connected with hemodynamic changes in the valve. Similarly, in the spinal canal stenosis case, calcification may be accompanied by canal stenosis or may occur as a result of mechanical trauma of a tissue.

9. Wykaz skrótów

μ -CT- mikrotomografia komputerowa
ABCC6- gen kodujący białko o wysokiej oporności na wiele receptorów
ALP- fosfataza alkaliczna
ANK- białko genu *ankylosis ank*
AV- zastawka aortalna
BMP- białko morfogenetyczne kości
BV/TV- objętość kości/całkowita objętość
CHAP- węglanohydroksyapatyt
COL- rodzina genów związanych z tworzeniem kolagenu
CPPD- dwuwodny pirofosforan wapnia
DCPD- uwodniony wodorofosforan wapnia (bruszyt)
ENPP1- gen pirofosfataza ektonukleotydowa /fosfodiesteraza
FTIR- transformacja Fouriera w podczerwieni
GACI- dziecięca mineralizacja tętnic
Gly- Glicyna
HAP- hydroksyapatyt
LF- więzadło żółte
LSD- test najmniejszych istotnych różnic
N/V- liczba ziaren w 100 mm³ próbki
OCP- fosforan ośmiowapniowy
PVE- efekt częściowego wypełnienia voxela
R- współczynnik korelacji
ROI- obszar zainteresowania
TCP- fosforan trójwapniowy
TGF- β - transformujący czynnik wzrostu β
V_g/V- objętość ziaren na 100 mm³ próbki
VDR- receptor witaminy D3
XRD- dyfraktometria rentgenowska
XRF- fluorescencja rentgenowska

