

UNIWERSYTET ŚLĄSKI

Wydział Nauk Ścisłych i Technicznych

Instytut Fizyki im. Augusta Chelkowskiego

ROZPRAWA DOKTORSKA

**MIKROSPEKTROSKOPOWE BADANIA
FLUORESCENCYJNE TKANKI ŁĄCZNEJ
I JEJ PATOLOGII**

mgr Wojciech Ciszek

Promotor: prof. zw. dr hab. Zofia Drzazga

Promotor pomocniczy: dr Jarosław Paluch

CHORZÓW 2021

OŚWIADCZENIE AUTORA PRACY

Ja, niżej podpisany:

imię (imiona) i nazwisko: *Wojciech Ciszek*

autor pracy doktorskiej pt. *Mikrospektroskopowe badania fluorescencyjne tkanki łącznej i jej patologii*

Oświadczam, że ww. praca doktorska:

- została przygotowana przeze mnie samodzielnie,
- nie narusza praw autorskich w rozumieniu ustawy z dnia 4 lutego 1994 r. o prawie autorskim i prawach pokrewnych (tekst jednolity Dz. U. z 2006 r. Nr 90, poz. 631, z późn. zm.) oraz dóbr osobistych chronionych prawem cywilnym,
- nie zawiera danych i informacji, które uzyskałem w sposób niedozwolony, nie była podstawą nadania stopnia doktora nauk, dyplomu wyższej uczelni lub tytułu zawodowego ani mnie, ani innej osobie.

Oświadczam również, że treść pracy doktorskiej zapisanej na przekazanym przeze mnie jednocześnie nośniku elektronicznym jest identyczna z treścią zawartą w wydrukowanej wersji pracy.

Jestem świadomy odpowiedzialności karnej za złożenie fałszywego oświadczenia.

Miejscowość, data

Podpis autora pracy

*Serdecznie dziękuję Pani prof. Zofii Drzazdze za pomoc merytoryczną
oraz cenne wskazówki podczas przygotowania pracy*

Dziękuję również dr. Jarkowi Paluchowi trafne uwagi i współpracę

*Serdecznie dziękuję mojej Żonie za ogromną cierpliwość
i każdy przejaw wsparcia*

*Serdecznie dziękuję moim Rodzicom za wsparcie,
jakiego zawsze mi udzielali*

Pracę tę dedykuję mojej ukochanej Żonie

Spis treści

Wykaz skrótów stosowanych w pracy	9
Streszczenie	10
Abstract	11
Wprowadzenie.....	12
Część literaturowa	13
1. Zjawisko fluorescencji i metody jej pomiaru.....	13
2. Charakterystyka tkanki łącznej.....	15
2.1. Opis tkanki kostnej oraz osteogenezy.....	15
2.2. Zaburzenia prawidłowego rozwoju kości długich	18
2.3. Opis tkanki chrzęstnej.....	19
2.4. Problematyka rekonstrukcji w laryngologii – zarys.....	19
3. Przegląd wybranych badań tkanki łącznej metodą mikroskopii konfokalnej CLSM.....	22
4. Cele pracy	24
5. Materiał badawczy i metodyka badań.....	25
5.1. Materiał badawczy – kości.....	25
5.2. Materiał badawczy – chrząstki.....	26
5.3. Aparatura badawcza i metodyka pomiaru.....	27
Część doświadczalna.....	31
6. Walidacja metody konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego CLSM.....	32
7. Wyniki badania zmian rozwojowych wczesnego osteoidu po prenatalnej aplikacji zidowudyny	36
7.1. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczerzych w wieku 7 dni.....	36
7.2. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczerzych w wieku 14 dni.....	38
7.3. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczerzych w wieku 28 dni.....	41
7.4. Wyniki pomiarów mikrospektrofluorymetrycznych kości szczerzych.....	43
7.4.1. Autofluorescencja kości szczerów w wieku 7 dni.....	46
7.4.2. Autofluorescencja kości szczerów w wieku 14 dni.....	47
7.4.3. Autofluorescencja kości szczerów w wieku 28 dni.....	48
7.4.4. Spektroskopowa ocena szybkości rozwoju tkanki	50
7.5. Dyskusja wyników badań wpływu prenatalnej terapii antyretrowirusowej na rozwój kości	52
8. Wyniki oceny biogodności wybranych chrząstek ludzkich dla potrzeb autotransplantacji otolaryngologicznej.....	57
8.1. Obrazowanie konfokalne chrząstki ludzkiej	57
8.2. Wyniki pomiarów spektrofluorymetrycznych chrząstki ludzkiej	60
8.3. Dyskusja wyników oceny biokompatybilności tkanki chrzęstnej.....	66

9. Podsumowanie pracy i wnioski	71
Bibliografia.....	72
Spis ilustracji.....	78
Spis tabel	81

Wykaz skrótów stosowanych w pracy

CLSM – (ang. *confocal laser-scanning microscope*) konfokalny mikroskop skanujący wiązką laserową z możliwością pomiaru fluorescencji.

UV-VIS – (ang. *Ultraviolet – Visible*) zakres promieniowania elektromagnetycznego od ultrafioletu do światła widzialnego.

NAD(P)H – zredukowana forma fosforanowego dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego.

NADH – zredukowana postać dwunukleotydu nikotynoamidoadeninowego.

FAD – utleniona postać dwunukleotydu flawinoadeninowego.

ECM – (ang. *extracellular matrix*) macierz zewnątrzkomórkowa.

PCM – (ang. *pericellular matrix*) macierz śródkomórkowa (okołokomórkowa).

ART – (ang. *antiretroviral therapy*) terapia antyretrowirusowa.

AZT – (ang. *azidothymidine*) azydotymidyna, inna nazwa zidowudyny.

ZID – zidowudyna.

HIV – (ang. *Human Immunodeficiency Virus*) wirus ludzkiego niedoboru odporności.

AIDS – (ang. *acquired immunodeficiency syndrome*) zespół nabytego niedoboru odporności.

NRTI – (ang. *nucleoside analog reverse-transcriptase inhibitor*) nienukleozydowe inhibitory odwrotnej transkryptazy.

ELWD – (ang. *extra long working distance*) obiektywy firmy NIKON umożliwiające pracę w dalekim zakresie odległości od soczewki.

ROI – (ang. *region of interest*) obszar zainteresowania.

FWHM – (ang. *full width at half maximum*) szerokość połówkowa.

HV – (ang. *high voltage*) oznaczenie jednostek wzmocnienia fotopowielacza w CLSM.

AF – autofluorescencja.

C – oznaczenie kości szczurzych z grupy kontrolnej.

Z – oznaczenie kości szczurzych z grupy leczonej prenatalnie zidowudyną.

I_{max} – natężenie maksymalne widma autofluorescencji.

λ_{max} – długość fali, przy której zmierzono natężenie maksymalne widma autofluorescencji.

Streszczenie

W organizmie człowieka kości i chrząstki pełnią wiele ważnych funkcji, a stany chorobowe tych tkanek mają znaczny wpływ na zdrowie całego ciała. Dzięki obecnemu rozwojowi techniki można badać stany patologiczne tych elementów ciała. Jednym z narzędzi jest konfokalny mikroskop fluorescencyjny. Pozwala obrazować elementy tkanki z dużą dokładnością oraz umożliwia pomiar widmowych autofluorescencji na poziomie mikroskopowym, dzięki którym uzyskujemy więcej informacji na temat badanego obiektu. W niniejszej pracy zastosowano te narzędzie do badań 2 typów ludzkiej tkanki łącznej: kości i chrząstek.

Przeprowadzono badanie rozwoju piszczeli noworodków szczurzych w 7, 14 i 28 dniu życia, których matkom w czasie ciąży podawano lek antyretrowirusowy – zidowudynę. Zarejestrowane obrazy konfokalne ujawniły, że w pierwszych 14 dniach życia kości grupy leczonej są masywniejsze i osiągają wyższy stopień rozwoju macierzy kostnej w porównaniu z kontrolą. Zmierzone widma autofluorescencji wykazały, że największe różnice w ilości i funkcjonowaniu składników osteoidu pojawiają się w 14 dniu życia noworodków. Badania grupy 28-dniowej wykazały stopniowe zanikanie zaburzeń zaobserwowanych dla młodszych osobników. Z przeprowadzonych badań wynika, że terapia zidowudyną w czasie ciąży powoduje нефизjologicznie przyspieszony rozwój macierzy kostnej noworodków szczurzych w pierwszych 2 tygodniach życia, który z czasem wraca do stanu normy.

Ponadto przeprowadzono badania obejmujące oszacowanie biogodności ludzkich chrząstek nosa, ucha, krtani i stawu na potrzeby autotransplantacji. Z wykorzystaniem obrazowania konfokalnego stwierdzono, że największą ilość chondrocytów posiada chrząstka nosa. Nieznacznie mniejszą liczbę tych komórek wykazuje chrząstka małżowiny usznej. Z przeprowadzonych analiz wynika, że chrząstka stawowa posiada dużą ilość macierzy zewnątrzkomórkowej pozbawionej chondrocytów. Pomiary autofluorescencji z rejonu macierzy zewnątrzkomórkowej wykazały występowanie nieznacznych różnic pomiędzy chrząstkami we wstępującej części widma, które najprawdopodobniej wskazują na dysproporcje w stężeniu elastyny. Uzyskane wyniki badań porównawczych chrząstek dowodzą, że chrząstka nosa, ucha, krtani i stawu są wystarczająco biokompatybilne ze sobą, by je wzajemnie zastępować w autotransplantacji.

Słowa kluczowe: konfokalna mikroskopia fluorescencyjna, macierz zewnątrzkomórkowa ECM, osteoid

Abstract

In the human body, bones and cartilage perform many important functions, and disease states of these tissues have a significant impact on the health of the entire body. With current advances in technology, pathological states of these body components can be studied. One tool – the confocal fluorescence microscope. – allows imaging of tissue elements with high accuracy and enables measurement of spectral autofluorescence at the microscopic level, which gives us more information about the studied object. In the present study, this tool was used to study 2 types of human connective tissue: bones and cartilage.

A study of the tibia development of rat newborns at 7, 14, and 28 days of age whose mothers were administered the antiretroviral drug zidovudine during pregnancy was performed. The recorded confocal images revealed that in the first 14 days of life, the bones of the treatment group are more massive and achieve a higher degree of bone matrix development compared to the control. Measured autofluorescence spectra showed that the greatest differences in the amount and function of osteoid components occur at day 14 after animal birth. Studies of the 28-day-old group showed a gradual disappearance of the abnormalities observed for younger individuals. Our study suggests that zidovudine therapy during pregnancy results in unphysiologically accelerated bone matrix development in rat neonates during the first 2 weeks of life, which returns to normal over time.

In addition, a study was conducted involving the estimation of the biocompatibility of human nasal, ear, laryngeal, and joint cartilages for autotransplantation. Using confocal imaging, it was found that nasal cartilage has the highest number of chondrocytes. The auricle cartilage shows a slightly lower number of these cells. The analyses show that articular cartilage has a large amount of extracellular matrix devoid of chondrocytes. Autofluorescence measurements from the extracellular matrix region showed slight differences between the types of cartilage in the ascending part of the spectrum, which most likely indicate a disparity in elastin concentration. Performed comparison results demonstrate the cartilage of the nose, ear, larynx, and joint are sufficiently biocompatible with each other to be mutually substitutable in autotransplantation.

Keywords: confocal fluorescence microscopy, extracellular matrix ECM, osteoid

Wprowadzenie

Obecnie ludzkość stosuje różne metody mikroskopowe w bardzo wielu dziedzinach. Służą one m.in. rutynowym pracom w laboratoriach lub w celach edukacyjnych. Niemniej jednak rozwój technologiczny sprawia, że w ostatnich latach można wnikać jeszcze głębiej w mikroświat i dzięki syntezie innych technik zbierać ogromne ilości informacji o nim. Jedną z takich metod jest konfokalna mikroskopia fluorescencyjna, ponieważ pozwala nie tylko uzyskać bardzo wysoką rozdzielczość obrazu i duże powiększenia, ale z jej zastosowaniem prowadzone są nieniszczące badania *in situ* oraz *in vivo*. Mimo że jest w praktyce od kilku dziesięcioleci, to nadal stanowi wyspecjalizowane narzędzie badawcze stosowane przez wiele zespołów na całym świecie.

W niniejszej rozprawie zbadano rozwój kości noworodków zwierzęcych pod wpływem terapii przeciwwirusowej w okresie prenatalnym oraz dokonano próby oceny podobieństw i różnic wybranych rodzajów chrząstki ludzkiej. W obu tych przypadkach zastosowano konfokalną mikroskopię fluorescencyjną wraz z pomiarem natywnej fluorescencji próbek. Praca ta złożona jest z dwóch części. Pierwsza z nich obejmuje wprowadzenie teoretyczne w rozdziałach 1 – 3. W rozdziale 1 zwięźle przedstawiono niezbędne informacje dotyczące wykorzystanego zjawiska fluorescencji. Kolejny rozdział zawiera krótką charakterystykę tkanki kostnej i chrzęstnej oraz bieżącej problematyki transplantologii chrząstek. Rozdział 3 omawia streszczenie najważniejszych według autora kierunków badań tkanki łącznej z wykorzystaniem mikroskopii konfokalnej.

Rozdział 4 przedstawia założenia i cele niniejszej pracy, natomiast rozdział 5 opisuje badany materiał oraz zastosowaną metodykę.

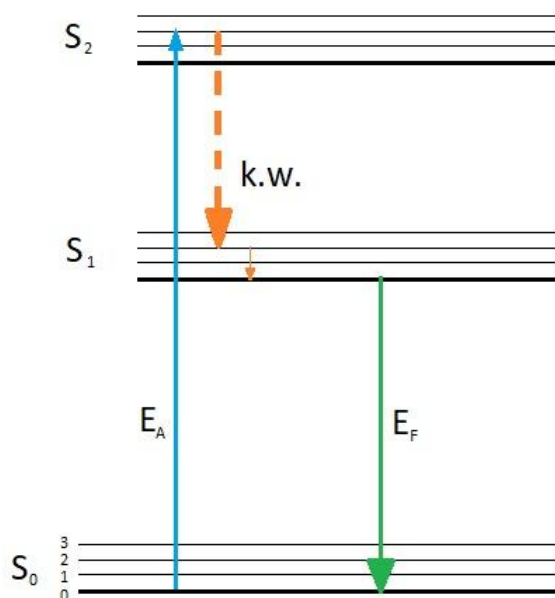
Druga część pracy obejmuje opis wyników przeprowadzonych badań. W rozdziale 6 zawarto opis walidacji metody pomiaru. W rozdziale 7 zaprezentowano wyniki badań konfokalnych oraz pomiarów spektrofluorymetrycznych powierzchni kostnej piszczeli noworodków szczurzych w 7, 14 oraz 28 dniu życia. Oceniany był wpływ terapii przeciwwirusowej matek na ich potomstwo. Rozdział 8 opisuje rezultaty badań konfokalno-spektroskopowych ludzkiej tkanki chrzęstnej w celu oszacowania ich różnic i podobieństw pod kątem ich przydatności w autotransplantacji.

Ostatni rozdział niniejszej dysertacji stanowi podsumowanie całości pracy wraz z wnioskami wynikającymi z przeprowadzonych badań. Na końcu zawarto bibliografię oraz spis ilustracji i tabel.

Część literaturowa

1. Zjawisko fluorescencji i metody jej pomiaru.

Współdziałanie promieniowania elektromagnetycznego z materią dostrzegalne jest za pośrednictwem efektów jakie wywołuje, które z kolei rejestrowane są przez organy (np. receptory zawarte w oku) lub specjalistyczne detektory. W ogólnym ujęciu zjawisko fluorescencji polega na emisji promieniowania elektromagnetycznego o energii niższej po uprzednim zaabsorbowaniu kwantu o energii wyższej. Występuje w związkach chemicznych zwanych fluoroforami. Absorpcja energii fali elektromagnetycznej z zakresu ultrafioletu lub światła widzialnego w takiej molekuale prowadzi do przeniesienia elektronów na wyższy poziom energetyczny, co dobrze obrazuje diagram Jabłońskiego (ilustracja 1):



Ilustracja 1. Schemat Jabłońskiego ilustrujący mechanizm przejść kwantowych w zjawisku fluorescencji. Oznaczenia: S_0 – singletowy stan podstawowy, S_1 , S_2 – singletowe stany wzbudzone, 0, 1, 2, 3 – energetyczne stany oscylacyjne (cieńsze linie), E_A – energia zaabsorbowana, E_F – energia emitowana (fluorescencja), k.w. – konwersja wewnętrzna układu.

Energia cząsteczki jest sumą energii poszczególnych stanów elektronowych, oscylacyjnych i rotacyjnych, dlatego też wzbudzenie stanu elektronowego powoduje wzbudzenia stanów oscylacyjnych i rotacyjnych. Z tego też względu nie można zaobserwować czystego widma elektronowego, zwłaszcza gdy badany jest układ większej ilości molekuł. Wskutek oddziaływań wewnętrznych dochodzi do dyssypacji pewnej ilości energii wewnątrz molekuły pomiędzy stanami oscylacyjnymi i rotacyjnymi, część energii ekscytacyjnej może być też oddawana do otoczenia. To wywołuje zmiany momentu dipolowego, jak również polaryzację, zmiany rzędowości wiązań oraz inne efekty. Nie dochodzi jednak do przesunięcia położenia molekuły ze względu na szybkość wzbudzenia stanu

elektronowego (tzw. przejścia pionowe, wynikające z reguły Francka-Conzona) [1]. Po utracie energii wskutek konwersji wewnętrznej molekula ulega relaksacji do podstawowego stanu singletowego S_0 , emitując promieniowanie o długości fali większej niż długość fali wzbudzającej. Obserwacja tego efektu nazywana jest przesunięciem Stokesa:

$$\Delta E = E_A - E_F, \quad (1)$$

co po przekształceniu daje:

$$\Delta E = hc \left(\frac{1}{\lambda_A} - \frac{1}{\lambda_F} \right), \quad (2)$$

gdzie: ΔE – różnica energii obserwowanej, E_A , E_F – energia odpowiednio: absorbowana (wzbudzenia) i emitowana (fluorescencji), h – stała Plancka, c – szybkość światła, λ_A , λ_F – długość fali odpowiednio: wzbudzającej (absorbowanej) i fluorescencji (emitowanej).

Obserwowane doświadczalnie natężenie widma emisji fluorescencji konkretnego stanu kwantowego związane jest z gęstością prawdopodobieństwa emisji, określane przez moment przejścia:

$$\mu_{mn} = \int \psi_m^* \hat{M} \psi_n dV, \quad (3)$$

gdzie: ψ_m^* , ψ_n – funkcje falowe stanów odpowiednio: wzbudzonego i podstawowego, \hat{M} – operator przejścia [2]. Największe prawdopodobieństwo wystąpienia fluorescencji charakteryzuje przejście z najniższego wzbudzonego stanu singletowego S_1 do podstawowego stanu singletowego S_0 . Ponadto inne przejścia relaksacyjne charakteryzują się niezerowym prawdopodobieństwem. Taki stan rzeczy sprawia, że widmo fluorescencji cząsteczek ma charakter pasmowy o zmiennej intensywności, z założenia będąc lustrzanym odbiciem widma absorpcji. Można jednak przygotować warunki, w których pojawiają się odstępstwa od tej reguły: wpływ środowiska (np. pH roztworu), w jakim badany fluorofor się znajduje, obecność innych substancji (w tym rozpuszczalników) lub tworzenie kompleksów [3]. Emisja fluorescencji po wzbudzeniu molekuly zgodnie z regułą Kasha może zachodzić tylko z najniższego stanu oscylacyjnego pierwszego wzbudzonego stanu elektronowego cząsteczki. Oznacza to, że przejście z wyższych stanów elektronowych odbywa się niemalże natychmiast w sposób bezpromienisty [4]. W efekcie lokalizacja spektralna maksimum fluorescencji cząsteczki konkretnego fluoroforu obserwowana jest zwykle w tym samym miejscu, niezależnie od długości fali wzbudzającej. Dzięki poznaniu powyższych cech widma fluorescencji możliwe jest prawidłowe wykonanie eksperymentów oraz interpretacja uzyskanych wyników.

Od pierwszych obserwacji zjawiska fluorescencji w XIX w. sposób jej pomiaru ulegał modyfikacjom. Przez wiele dekad dostępnym źródłem fal wzbudzających były lampy ksenonowe lub rtęciowe, które wymagały zastosowania monochromatorów oraz filtrów, by uzyskać akceptowalnie wąską szerokość widma wzbudzającego. Jako detektor promieniowania emitowanego z próbki często stanowiły kolorowe klisze światłoczułe lub spektrometry wykorzystujące fotopowielacz do rejestracji sygnału [5, 6].

Obecnie jednak w spektrofлуorymetrii oraz obrazowaniu fluorescencyjnym do wzbudzania próbek wykorzystywane są lasery i diody LED, które cechują się na tyle wąskim pasmem uzyskiwanego światła, że można je uznać za monochromatyczne, eliminując tym samym konieczność stosowania dodatkowych filtrów i monochromatorów. Wybranie konkretnej długości fali wzbudzającej pozwala badać odpowiednie grupy substancji zależnie od kierunku prowadzonych badań. Dodatkową zaletą jest moc znamionowa tych elementów oraz możliwość jej regulacji, a także stabilność emisyjna tego układu, ponieważ dzięki odpowiedniej intensywności możliwe jest uzyskiwanie sygnałów pochodzących z fluoroforów o stosunkowo niskiej wydajności kwantowej. Niewątpliwą zaletą jest także rozmiar fizyczny stosowanych obecnie źródeł promieniowania (w szczególności diody LED), co pozwala zredukować powierzchnię zajmowaną przez całość aparatury spektrofлуorymetrycznej. Natomiast biorąc pod uwagę detekcję fluorescencji w spektroskopii nadal w powszechnym użyciu są fotopowielacze. Opis współczesnych rozwiązań technologicznych oraz modyfikacji tego urządzenia jest bardzo szeroki i znacznie wykracza poza ramy niniejszej pracy. Więcej szczegółów można znaleźć m.in. w opracowaniach [7, 8]. Z kolei na potrzeby mikroskopii fluorescencyjnej dużym powodzeniem cieszą się obecnie detektory CMOS lub kamery CCD, które również znajdują szerokie zastosowanie w laboratoriach spektrofлуorymetrycznych [9, 10]. Dzięki odpowiednio dobranym źródłom wzbudzenia fluoroforów i detektorom emisji spektrofлуorymetria stała się bardzo czołą metodą badawczą.

2. Charakterystyka tkanki łącznej.

Tkanka łączna (z łac. *Textus connectivus*) to jedna z podstawowych tkanek występujących w ciele, której rolą jest spajanie innych tkanek. Ochrania ona wiele ważnych organów w ciele i buduje swoiste podpory dla narządów. Nazwa tej tkanki (*Bindegewebe*) została zaproponowana przez niemieckiego fizjologa J.P. Mullera w 1830 r., który już wtedy zwracał uwagę na ogromną różnorodność funkcji tkanki łącznej [11]. Komórki tkanki łącznej produkują dużą ilość substancji międzykomórkowej, która wypełnia każdą pustą przestrzeń pomiędzy komórkami. W ciele człowieka występuje przynajmniej kilka jej rodzajów, jednakże w niniejszej pracy skoncentrowano się na dwóch jej podtypach: tkance kostnej i tkance chrzęstnej.

2.1. Opis tkanki kostnej oraz osteogenezy.

Kości to wysoko wyspecjalizowane zmineralizowane elementy organizmu. Układ kostny pełni wiele ważnych funkcji: podporową, ochronną, a także magazynową. Pod względem anatomicznym i fizjologicznym kościec to układ bardzo złożony, ponieważ w sposób bezpośredni współpracuje z tkanką nerwową i układem krwionośnym. Wielkość kości, ich kształt oraz struktura wewnętrzna powodują, że przeciwdziałają one sile grawitacji oraz siłom mechanicznym, jakie mają wpływ na ciało w ciągu życia [12, 13]. Przekrój poprzeczny kości ujawnia następujące struktury: okostna, istota zwarta, istota gąbczasta, śródkostna. Okostna to zewnętrzna powłoka tkanki kostnej, ściśle przyczepiona

do powierzchni kości za pomocą włókien Sharpeya [14]. Przebiegające przez nią naczynia krwionośne i nerwy wnikają w głąb kości. Okostna zawiera w swej wewnętrznej powłoce (łac. *cambium* – warstwa rozrodcza) liczne komórki osteogenne, stymulując wzrost kości od zewnątrz. Obecność okostnej ma szczególne znaczenie podczas pęknięć lub złamań kości, ponieważ wspomniane komórki mogą się różnicować na chondro- lub osteoblasty [15]. Z kolei śródkostna wyściela beleczy kości gąbczastej, jamę szpiku kostnego oraz kanały odżywcze wewnątrz istoty zbitiej. Również zawiera komórki osteogenne, które w czasie przebudowy kości lub po urazach są aktywowane. Istota gąbczasta umiejscowiona jest wewnątrz kości i wyróżnia się w przekroju tej tkanki. Jej układ przestrzenny składa się z płytek i beleczek kostnych, które w nasadach kości długich układają się regularnie. W pozostałej części kości istota gąbczasta przybiera układ nieregularny, podlegając ciągłym przekształceniom w czasie życia. Pomędzy beleczkami kostnymi znajduje się szpik kostny. Istota zbita (zwarta) to stosunkowo gruba i sztywna struktura. Te właściwości zapewnia budowa blaszkowata, przypominająca wielokrotnie położone warstwy, okalając istotę gąbczastą w końcach kości oraz jamę szpikową w trzonie kości. Na zewnątrz kości przyjmuje układ blaszek okalających, natomiast w głębszych warstwach występują osteony, ułożone względem siebie równolegle. Osteon (zwany również systemem Haversa) to podstawowa jednostka, z której składa się kość zbita oraz gąbczasta. Każda kość pełni swoistą rolę w organizmie i w ciągu życia może znajdować się w różnym stanie fizjologicznym. To implikuje, że skład biochemiczny kości nie jest stały [16]. W tym miejscu należy podkreślić, że komórki kostne są oddzielone od siebie zmineralizowaną substancją międzykomórkową, zwaną osseiną lub osteoidem, złożoną z kolagenu, białek niekolagenowych, składników odżywczych dla komórek, części mineralnej i wody. Kolagen stanowi ok. 90% całkowitego białka kości, z kolei białka niekolagenowe mogą stanowić ok. 10% całkowitego białka w kościach. Kolagen typu I jest białkiem włóknistym, które wykazuje poprzeczne prążkowanie wynikające z obecności wiązań kowalencyjnych pomiędzy włóknami tropokolagenu. W tkance kostnej za syntezę i sekrecję kolagenu odpowiadają osteoblasty. Struktura macierzy kolagenowej w kości zależy od wielu czynników występujących na poziomie komórkowym, co zostało szerzej wyjaśnione w [17]. Mineralizacja osteoidu jest efektem odpowiedniego działania osteoblastów w sieci kolagenowej, odpowiadających za wbudowywanie w nią kryształów hydroksyapatytu stanowiącego główny składnik mineralny kości [18].

Pełny opis anatomii i fizjologii tkanki kostnej jest bardzo szeroki i wykracza poza ramy niniejszego opracowania. Więcej informacji można znaleźć w odpowiedniej literaturze dotyczącej wyżej wymienionych obszarów medycyny [12, 13, 17, 19].

Prawidłowy proces tworzenia się kości od samego początku życia płodu ma kluczowe znaczenie dla zdrowia i dalszego rozwoju organizmu. Czynniki wewnętrzne i zewnętrzne powodują niekiedy istotne przemiany w kościach, m.in. zaburzając rozwój kości. Z punktu widzenia zaburzeń rozwojowych tkanki kostnej – które badano w niniejszej pracy – istotne jest zrozumienie prawidłowego procesu tworzenia kości, co zostanie zreferowane poniżej.

Osteogeneza, czyli powstawanie kości, obejmuje dwa sposoby rozwoju: łącznotkankowy i chrzęstny.

Kośćotworzenie na podłożu łącznotkankowym

W procesie tym powstają kości czaszki, łopatki i twarzy, który u człowieka rozpoczyna się w okolicach 10 tygodnia życia płodu i kończy się tuż po porodzie. Komórki błony mezenchymatycznej przekształcają się w chondroblasty i wydzielają kolagen typu I oraz proteoglikany. Wydzielają też dwa istotne białka tkanki kostnej:

- Osteonektyna – tworzy z kolagenem kompleks, umożliwiający wytrącanie soli wapnia, a następnie łączenie kryształów hydroksyapatytu.
- Osteokalcyna – jej rolą jest wiązanie kationów wapnia. Białko to jest zależne od odpowiednich stężeń witamin D₃ i K.

Po wytworzeniu się pierwszych kryształów hydroksyapatytu we włóknkach kolagenu tkanka buduje pierwotne beleczki kostne. Gdy ich ilość zaczyna narastać pojawia się kość splotowata (grubowłóknista) – włókna kolagenowe przyjmują wtedy postać coraz grubszych pęczków, lecz ułożonych chaotycznie. Dopiero w okresie okołoporodowym ta postać kości jest przekształcana w kość blaszkowatą (drobnowłóknistą), stopniowo otaczając obecne naczynia krwionośne i wytwarzając w ten sposób osteony pierwotne. W dalszym etapie dochodzi do powielenia ilości blaszek, wytwarzając wtórny system Haversa. Osteony w kościach płaskich układają się wówczas prostopadle do powierzchni kości, osiągając dojrzałość i wystarczającą stabilność [12, 18].

Kośćotworzenie na podłożu chrzęstnym

Ten proces dotyczy rozwoju kości długich. W życiu płodowym pojawia się struktura chrzęstna, nieco rozszerzająca się na końcach, zwana zawiązkiem chrzęstnym kości. Dookoła niej występuje silnie unaczyniona ochrzęstna. W miarę wzrostu tego zawiązka dochodzi do procesu przemiany komórek błony mezenchymatycznej w osteoblasty. Pojawia się pierwotne miejsce osyfikacji, a tym samym wytwarzane zostają pierwsze beleczki kości grubowłóknistej (tzw. mankiety kostny). Naczynia krwionośne oraz mezenchyma z ochręstnej penetrują w głąb mankietu kostnego, powodując zanikanie chrząstki w głębszych warstwach zawiązka i tym samym budowę nowych beleczek kostnych. Po utworzeniu się jamy szpiku proces powstawania kości długiej przechodzi w fazę przyrostu kości na długość. Jednocześnie powiększa się jama szpikowa, zamieniając wygląd zawiązka kostnego na układ zbliżony do kości długiej. W trakcie powiększania się jamy szpikowej nadbudowywana zostaje tkanka kostna na zewnątrz zawiązka, z czasem tworząc istotę zbitą. W obrębie końców uwidaczniają się wtórne punkty kostnienia, zamykając chrząstkę wewnątrz tkanki kostnej, przy czym z chwilą wyczerpania masy chrzęstnej kończy się proces dojrzewania kośćca [12, 13, 17].

W ciągu całego życia człowieka i zwierząt kości ulegają ciągłej przebudowie wynikającej ze zmiany stylu życia, diety, wykonywanej pracy; zmieniają się również siły oddziałujące na kości. Co więcej, niejednokrotnie zmiany funkcjonowania kości wywołane są chorobami, co zostanie szerzej omówione w dalszej części rozdziału.

2.2. Zaburzenia prawidłowego rozwoju kości długich

Prawidłowa praca tkanki kostnej może ulegać zaburzeniom w czasie życia człowieka. Nie inaczej sytuacja wygląda z rozwojem płodowym i okołoporodowym kośćca. Styl życia lub choroby znacząco przyczyniają się do zdrowia kości.

Szeroko przebadano i udokumentowano zaburzenia pracy tkanki kostnej w przebiegu zespołu nabytego niedoboru odporności (AIDS), a także leczonego zakażenia ludzkim wirusem niedoboru odporności (HIV). Większość osób z potwierdzonym zakażeniem poddaje się terapii antyretrowirusowej (ART), która znacząco poprawia jakość życia oraz skutecznie blokuje możliwość transmisji HIV na dalsze osoby [20]. W 2006r. na podstawie meta-analizy wyników uzyskanych na przestrzeni 40 lat Brown i współpracownicy wykazali, że u osób seropozytywnych osteoporoza występowała ponad 3-krotnie częściej niż wśród społeczeństwa z ujemnym wynikiem obecności HIV [21]. Co więcej, wśród pacjentów poddanych początkowej fazie ART ryzyko wystąpienia osteoporozy było również podwyższone, a zastosowane leczenie zauważalnie obniżało poziom gęstości mineralnej kości [21]. Podobne wnioski uzyskał zespół McComsey w 2010r., który odnotował spadek gęstości mineralnej kośćca nawet o 6% w ciągu 2 lat od rozpoczęcia terapii [22].

Terapia przeciwko HIV powoduje również komplikacje w okresie ciąży. Pod koniec XX w. przeprowadzono badania łożyska ludzkiego u osób w trakcie ART z wykorzystaniem zidowudyny ZID. Eksperyment wykazał, że ów lek hamuje transmisję wirusa w stronę płodu. Niemniej jednak substancja ta przechodzi przez łożysko i wykazuje zdolność wbudowywania się w DNA komórek tego organu [23]. Istnieją też doniesienia, że u prawie 30% noworodków, których matki stosowały ART przynajmniej 30 miesięcy przed poczęciem, odnotowano spadek gęstości mineralnej kości. Zasugerowano, że wraz z długością trwania terapii rośnie ryzyko pojawienia się chorób układu kostnego zarówno u ciężarnych, jak i ich potomstwa, które ma kontakt z tymi lekami [24]. Badania porównawcze na modelu zwierzęcym po podaniu matkom w ciąży dwóch różnych leków przeciwko HIV – indynawiru (inhibitor proteazy) oraz zidowudyny (nienukleozydowy inhibitor odwrotnej transkryptazy NRTI) – wykazały, że mają one wpływ na potomstwo leczonych szczurzy. Indynawir zaburza gospodarkę mineralną, obniżając stężenie wapnia oraz gęstości masy kostnej, zmieniając prawidłowe stężenie pierwiastków śladowych w kościach, takich jak stront, żelazo lub cynk. Z kolei ZID wykazuje silne oddziaływanie na macierz organiczną kości – prowadzi do przerostu kości oraz wysokich stężeń wapnia w porównaniu ze zwierzętami nie poddanymi terapii [25]. Wynika z tego, że ART w pewnym stopniu wywiera niekorzystny wpływ na potomstwo nosicielek HIV, mimo że znacznie ogranicza transmisję wirusa. Mechanizm ten jak dotąd nie został w pełni poznany. Interesujące są również doniesienia wskazujące, że obserwowane w tkance kostnej odchylenia od normy zanikają w późniejszym wieku potomstwa [23, 24].

Dotychczasowy przegląd literatury nasuwa pytanie czy opisane przez innych badaczy zaburzenia wywołane ART będą zauważalne w obrazie struktury kości noworodków. Tematyka ta została podjęta w niniejszym opracowaniu.

2.3. Opis tkanki chrzęstnej.

Tkanka chrzęstna zbudowana jest z chondrocytów (często zebranych w grupy izogeniczne, czyli skupiska 2-6 komórek) i substancji międzykomórkowej, zwanej macierzą zewnątrzkomórkową ECM. Chrzęstkę otacza ochrzęstna, czyli warstwa włóknista, w której przebiegają naczynia krwionośne. Pod względem biomechanicznym charakteryzuje się wysoką sprężystością oraz gładkością powierzchni. Występuje w wielu miejscach w ciele, np. końce kości długich, krążki międzykręgowe, ucho, nos, krtań oraz pierścienie tchawicy.

Tkanka ta jest aneuralna (pozbawiona włókien nerwowych) oraz awaskularna (pozbawiona naczyń krwionośnych), co wymusza transport wszystkich substancji przez ECM do komórek poprzez dyfuzję [12]. Istota podstawowa tej tkanki złożona jest z kwasu hialuronowego oraz mnogich proteoglikanów, które połączone tworzą rozległe klastry [12, 26]. Oś hialuronowa poprzez proteoglikany przyłącza do swojej struktury siarczany keratanu i siarczany chondroityny. Reszty cukrowe tych dwóch substancji posiadają w swej strukturze grupy hydroksylowe –OH, przez co wytwarzane są wiązania wodorowe. To powoduje, że chrząstka w głównej mierze składa się z wody związanej cząsteczkowo [12].

Drugi budulec tkanki chrzęstnej stanowią włókna kolagenu, najczęściej typu I oraz II (ok. 40% suchej masy tkanki), zanurzone niejako w istocie podstawowej. Kolagen pojawia się w macierzy na drodze przemiany tropokolagenu II, syntetyzowanego przez chondrocyty. W czasie dojrzewania tego białka tkanki pojawia się duża ilość kowalencyjnych wiązań poprzecznych (ang. cross-links). Takie sieciowanie kolagenu zwiększa mechaniczną wytrzymałość chrząstki, przy czym w czasie życia chrząstki sieć kolagenowa wielokrotnie ulega przebudowie. Wynikiem tego jest nieustanna wzajemna współpraca komórek z macierzą zewnątrzkomórkową – chondrocyty produkują istotne składniki ECM, z kolei macierz bezustannie wpływa na metabolizm komórek [27, 28]. ECM w chrząstce często zajmuje znaczne objętości, wielokrotnie przekraczające objętość samych komórek. Za bezpośredni transport informacji z i do chondrocytu odpowiada macierz śródkomórkowa PCM zbudowana z kolagenu typu VI, lecz pełna jej rola nie została jeszcze poznana [29 – 33].

2.4. Problematyka rekonstrukcji w laryngologii – zarys.

Tkanka chrzęstna może ulegać uszkodzeniom mechanicznym w trakcie urazu. Dochodzi wtedy do pojawienia się stanów patologicznych: naderwania, perforacji lub defragmentacji chrząstki. Inną nieprawidłowością jest odczyn zapalny wywołany chorobą chrząstki. Natomiast awaskularność i aneuralność tejże tkanki sprawia, że jej regeneracja może trwać nawet wiele miesięcy [34 – 36]. W niektórych obszarach ciała czas pełnej regeneracji może nawet zagrażać życiu (np. trudności z oddychaniem). Złotym standardem odbudowy w otolaryngologii jest przeszczep chrząstki tego samego typu z innego obszaru, np. z lewego do prawego ucha. Jednakże często okazuje się to dużym wyzwaniem przede wszystkim z powodu niewystarczającej ilości tkanki chrzęstnej możliwej do pobrania. Również dopasowanie kształtu wszczepu nastęrcza sporo trudności [37]. W dalszej części

podrozdziału zaprezentowano zarys bieżącej problematyki badawczej poświęconej tkance chrzęstnej, jej autotransplantacji oraz implantologii.

Chrząstka nosa

Wady rozwojowe czy uszkodzenia pourazowe chrząstek nosowych (wypadek komunikacyjny, oparzenia okolic nosa, rany u żołnierzy) to najczęstsze problemy medyczne okolicy nosa. Ponadto podejrzewa się, że aż 80% populacji ludzkiej może cierpieć na spadek drożności dróg oddechowych wskutek odchylenia przegrody nosowej [38]. Wielokrotnie podejmowane są zabiegi chirurgiczne w celu naprawy złamań lub poprawy drożności i funkcjonalności organu zmysłu węchu, jak również odbudowy powstałych ubytków. Ponadto resekcja guzów nowotworowych nosa lub jego okolicy wymaga usunięcia sporej części tkanki okalającej, powodując głębokie zniekształcenia w miejscu operacji. Według danych w samych USA aż ok. 36% nowotworów skóry dotyczyło rejonu nosa [39]. Głębokie ubytki chrząstki nosa wymagają uzupełnienia, ponieważ deformacje obniżają przepływ powietrza przez drogi oddechowe, ale stanowią także problem natury estetycznej. Od wielu lat popularna jest autotransplantacja chrząstki z innego rejonu ciała, np. z małżowiny usznej lub żeber [40]. Kolejne wyzwanie chirurgii to konieczność przeszczepu dość dużego fragmentu chrząstki. Wówczas miejsce donorowe mogłoby zostać na tyle osłabione, że spowodowałoby to dysfunkcję innych narządów. Z tego względu wiele nadziei pokłada się w inżynierii tkanek chrzęstnych. Jednakże aby uzyskać implant zastępujący funkcję chrząstki nosowej, należało wpierw poznać jej skład, co zostało wykonane przez kalifornijski zespół badaczy [41]. Dowiedziono także, że wraz z wiekiem spada liczba chondrocytów ulokowanych w chrząstce nosa, co w rezultacie obniża potencjał powielania się komórek w hodowli tkankowej [42, 43]. Niemniej osiągnięcia inżynierii tkankowej w ostatnich latach cieszą się dużym powodzeniem w leczeniu rekonstrukcyjnym chrząstek nosa [44].

Chrząstka małżowiny usznej

Małżowina, w której znajduje się chrząstka sprężysta ucha, może ulegać deformacjom, np. wskutek urazów lub oparzeń. Innym częstym przypadkiem medycznym jest mikrotia, czyli wrodzona deformacja małżowiny. Wykształca się wtedy skarłowaciały fragment małżowiny, wymagający interwencji chirurgicznej [45]. W przypadku mikrotii odbudowa chrząstki obejmuje wiele etapów, wymaga precyzji i uważnego obserwowania postępów terapii. Materiał tkankowy pobierany z chrząstki żeber rzekomych sprawia, że zabiegi takie są czasochłonne, a uzyskiwane efekty nie zawsze spełniają oczekiwania [46]. Z kolei pobieranie chrząstki z żeber rzekomych powoduje deformacje okolicy brzusznej, osłabiając ochronę narządów wewnętrznych i zwiększając ryzyko infekcji. Indyjski duet chirurgów, Chauhan i Guruprasad, zaraportował 27 przypadków osób cierpiących z powodu wrodzonej mikrotii, które zoperowano wykorzystując chrząstkę z żeber 6-8 do odbudowy małżowiny usznej. Odnotowano wiele komplikacji oraz trudności w „rzeźbieniu struktury” małżowiny, która jest indywidualna dla każdego pacjenta [47]. Skłoniło to wielu badaczy do poszukiwań metody o większej wydajności, zapewniając odpowiednią przyswajalność wszczepu. Zastosowano implanty silikonowe oraz techniki inżynierii tkankowej, wykorzystując chondrocyty lub komórki macierzyste [35, 48, 49]. Jedną ze współczesnych

technologii o dużym potencjale w dziedzinie rekonstrukcji są drukarki 3D. Na potrzeby medyczne „bioatrament” stanowi hydrożel macierzy zewnątrzkomórkowej pozbawionej chondrocytów, który zachowuje swoje parametry biologiczne i po zaimplementowaniu w wydrukowanej płytce chondrocytów uzyskiwana jest niemal każda oczekiwana przestrzenna struktura chrząstną [50]. Wyzwaniem w projektowaniu implantów jest odtworzenie właściwości biomechanicznych małżowiny [51]. Niemniej jednak pomimo błyskotliwych odkryć w dziedzinie implantologii sprężysta chrząstka ucha nadal pozostaje złotym standardem w rekonstrukcji małżowiny usznej.

Chrząstka krtani

Krtań jest dużym organem, zbudowanym z 5 chrząstek połączonych błonami, więzadłami oraz mięśniami [19]. Rejon ten jest w ciele ludzkim ważny, ponieważ w krtani umiejscowiony jest narząd fonacji. Jednakże wraz z wiekiem osłabia się głos ludzki w wyniku przemian kształtu strun głosowych. Starzenie się włókien kolagenu prowadzi do przebudowy warstw tkanki łącznej. Zmienia się wówczas mikrostruktura blaszki właściwej oraz nasila się zeszywnienie fałdów głosowych, o czym szeroko pisał zespół Roberta [52]. Doniesiono również o zwapnieniu chrząstki tarczowej krtani lub bliznowaceniu fałdów głosowych po mikrouszkodzeniach lub oparzeniach [53, 54]. Omawiając patologie chrząstki krtani nie można pominąć tematu nowotworów. Pacjenci poddawani są miejscowej resekcji zmiany patologicznej, co może wywołać trwałe uszkodzenie strun głosowych, chrypkę, a także trudności z połykaniem i oddychaniem. Niekiedy krtań jest całkowicie usuwana ze względu na rozległość nowotworu. Zdarza się, że pacjenci, którzy korzystnie przechodzą chemioterapię, trwale tracą funkcje krtani [55]. W takich przypadkach autotransplantacja wydaje się być najlepszym rozwiązaniem dla przywrócenia funkcji organu. Istnieją jednak doniesienia, że po wszczepieniu szkieletu chrząstnego z małżowiny usznej pojawiają się trudno gojące stany zapalne, a niekiedy nawet odrzucenie wszczepu [56]. Problem ten częściowo został rozwiązany dzięki podawaniu czynników wzrostu celem przyspieszenia powielania się komórek w obszarach wymagających szybkiego przyrostu tkanki [57 – 59]. Dużą pomoc przynosi inżynieria tkankowa zastosowana w hodowli chondrocytów pobranych od pacjenta (hodowla odosobnicza). Ponadto można też wykorzystać komórki macierzyste wysortowane z krwi obwodowej pacjenta oraz ukierunkować na fenotyp „chondrocytowy” [55, 56, 60].

Chrząstka stawowa

Z uwagi na ilość chrząstki stawowej w ciele człowieka wydaje się ona być dobrym materiałem do przeszczepu w inny obszar, szczególnie otolaryngologiczny. Niemniej jednak w piśmiennictwie dużo uwagi poświęcone jest samej chrząstce stawowej i jej leczeniu, zarówno przez autotransplantację, jak i z wykorzystaniem inżynierii tkankowej [61, 62]. Z biomechanicznego punktu widzenia chrząstka stawowa kończyn dolnych jak i kręgosłupa wielokrotnie w ciągu życia ulega przeciążeniom, co prowadzi do stanów patologicznych. Jednym z najczęstszych schorzeń chrząstki stawowej jest choroba zwyrodnieniowa stawów, podczas której zaawansowanie degradacji stawu rodzi konieczność wszczepienia endoprotezy stawu (szczególnie kolanowego i udowego). Odpowiednio wczesna diagnostyka dolegliwości

bólowych stawów może uchronić pacjenta przed ingerencją chirurgiczną. Natomiast łagodne stany poddawane są terapiom polegającym na autotransplantacji chrząstki z innego rejonu ciała lub z odpowiedniej hodowli tkankowej [63].

W świetle przedstawionych faktów z zakresu chirurgii rekonstrukcyjnej i wykorzystania inżynierii tkankowej rodzi się pytanie, co sprawia, że przeszczepy chrząstki z innych rejonów ciała wywołują komplikacje lub kończą się niepowodzeniem, pomimo tego, że od lat mają zastosowanie w praktyce klinicznej. Dlatego w niniejszej pracy podjęto próbę porównania ze sobą chrząstek: nosowej, usznej, krtaniowej i stawowej, wykorzystując w tym celu obrazowanie konfokalne oraz pomiary widma autofluorescencji.

3. Przegląd wybranych badań tkanki łącznej metodą mikroskopii konfokalnej CLSM.

Konfokalny mikroskop skanujący laserowo CLSM w badaniach kości i chrząstek poszerza możliwości obserwacji różnych struktur komórkowych, jak również pozwala śledzić procesy metaboliczne w tej grupie tkanek [64 – 66]. Staranny opis jakościowy oraz ilościowy uzyskanych obrazów oraz wiarygodna interpretacja otrzymanych wyników wymaga pewnej miary doświadczenia badawczego. Odpowiednio przygotowane do tego celu oprogramowanie komputerowe dostępne na rynku ułatwia obróbkę graficzną obrazów. Ponadto znacząco przyspiesza odczyt danych ilościowych z obrazu i przetworzenie ich na wartość użyteczną naukowo. Dlatego niektóre zespoły badawcze w swojej pracy skupiają się na zgłębianiu możliwości analizy obrazów z wykorzystaniem metod symulacyjnych, np. Monte Carlo, by jak najwierniej odwzorować procesy zachodzące na poziomie komórkowym np. w czasie wzrostu chrząstki. Odpowiednie dopasowanie modeli statystycznych pozwala na szybki wychwyty zdarzeń losowych w fizjologii tkanek oraz ich prawidłową diagnostykę [67].

Potencjalne nieprawidłowości w tkankach można znaleźć korelując obrazowanie konfokalne z badaniami biomechanicznymi. Zespół Guilaka, badając odpowiedź chondrocytów na ściskanie zauważył, że deformacja kształtu chondrocytu prowadzi do zaburzeń przekazywania sygnałów mechanicznych w chrząstce stawowej [68]. Ponadto stwierdzono, że chondrocyty reagują na zewnątrzkomórkowe fale jonów wapnia, wynikające ze stresu mechanicznego wywieranego na tkankę [69, 70]. Prace jego zespołu pomogły lepiej zrozumieć rolę macierzy śródkomórkowej w funkcjonowaniu całej chrząstki [29]. Metoda CLSM przyczyniła się do rozszerzenia wiedzy na temat białek strukturalnych, w szczególności kolagenu, stanowiąc uzupełnienie innych technik, np. mikroskopii elektronowej. Na przełomie lat 80 i 90 ubiegłego wieku dokładniej zbadano strukturę przestrzenną i rozłożenie tego białka w tkankach [71, 72]. CLSM wraz z innymi technikami pomogła wykryć istotne interakcje pomiędzy kolagenem i bilirubiną w przypadku opracowywania nowych metod leczenia żółtaczki [73]. Interesująca jest również dziedzina badań nad leczeniem ran, wykorzystująca trójwymiarowe obrazowanie sieci kolagenowej w czasie procesu regeneracji błon tkankowych [74].

W badaniach ortopedycznych CLSM stosowana jest w poszukiwaniu przyczyn zapalenia stawów, powiązanego ściśle z chrząstką stawową. Technika ta umożliwia wczesne wykrycie zmian degeneracyjnych chrząstki bez konieczności stosowania barwienia. [75]. Kości w trakcie życia często ulegają mniejszym lub większym urazom, co doprowadza do pojawienia się w ich strukturze mikropęknięć. Badania w tym temacie prowadził zespół Codringtona w 2009 r., wymuszając mikropęknięcia w kości wołu za pomocą specjalnie przygotowanego urządzenia. Następnie zobrazowano uzyskane pęknięcia metodą autofluorescencyjną. Dopiero zastosowanie barwników uwidocznilo obecność głębszych mikropęknięć, propagujących w głąb tkanki wzdłuż osi długiej pęknięcia głównego, a niewidocznych w obrazach autofluorescencyjnych CLSM [76]. Natomiast zespół Ashique wykorzystał CLSM do porównania próbek istoty zwartej kości udowej kobiet w młodym i w podeszłym wieku w celu pogłębienia badań mikrostrukturalnych kości w trakcie osteoporozy. Wykryto, że jednym z czynników nasilających objawy tego zaburzenia metabolicznego jest znaczna redukcja sieci lakularno-kanalikowej w kościach. Poza redukcją objętości jamek kostnych w przeciągu całego życia dochodzi również do zmniejszenia się powierzchni czynnej kanalików, odpowiedzialnych za transport sygnałów i współpracę całej sieci komórek kostnych [77].

Innym zastosowaniem CLSM jest diagnostyka stanów patologicznych poprzez pomiary autofluorescencji na poziomie tkanki lub pojedynczej komórki. Proces taki nazywany jest „biopsją optyczną”, ponieważ umożliwia obserwacje zmian *in situ*, niekiedy z niewielką ingerencją w ciało pacjenta lub zwierzęcia, bez wykorzystania syntetycznych fluoroforów [78]. Spektroskopia porównawcza na poziomie mikroskopowym tkanki zdrowej i patologicznej pozwala znaleźć różnice w zmierzonym widmie autofluorescencji. Określenie rodzaju schorzenia i obszaru, w którym się znajduje polega np. na obliczeniu stosunku intensywności pasm charakterystycznych lub wykryciu sygnału odpowiedzialnego za obecność konkretnego fluoroforu endogennego, czyli tzw. „biomarkerów” (np. NADH/NAD(P)H, FAD, aminokwasy) [65, 79, 80]. Takie profilowanie spektralne może się przyczynić do wczesnego wykrywania stanów nowotworowych lub rzadkich chorób metabolicznych, a tym samym podjęcie odpowiednich działań profilaktycznych [65, 78, 81].

Obrazowanie konfokalne umożliwia wykonanie rekonstrukcji 3D struktur mikroskopowych. Za jej pomocą wykazano, że zasięg funkcjonalny osteocytów w kościach jest znacznie większy niż dotychczas sądzono, za sprawą istnienia wspólnej sieci komunikacyjnej pomiędzy komórkami kości [82]. Rekonstrukcja 3D przy użyciu CLSM zyskuje coraz większe uznanie, ponieważ jest szybsza i mniej wymagająca niż mikroskopia elektronowa. W połączeniu z mikrotomografią komputerową pozwala na uzyskanie szczegółowych danych o mikroarchitekturze układów biologicznych [83 – 85].

Powyższy przegląd doniesień naukowych wskazuje, że zastosowanie CLSM oraz mikrospektroskopii fluorescencyjnej pozwoli uzyskać wystarczającą ilość wyników, aby zrealizować cele niniejszej pracy badawczej.

4. Cele pracy

W oparciu o informacje zawarte w rozdziałach 2 i 3 wytyczono dwa nadrzędne cele niniejszej pracy:

- 1) Ocena wpływu terapii zidowudyną w okresie prenatalnym na rozwój piszczeli noworodków szczurzych z wykorzystaniem konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego CLSM.
- 2) Wykorzystanie metody CLSM do oszacowanie różnic i podobieństw pomiędzy 4 rodzajami chrząstek ludzkich: nosa, małżowiny usznej, krtani i chrząstki stawowej pod względem ich wzajemnej przydatności w autotransplantacji.

5. Materiał badawczy i metodyka badań.

W tym rozdziale opisano materiał wybrany do badań. Scharakteryzowano również dokładną metodykę obrazowania i pomiarów fluorescencyjnych.

5.1. Materiał badawczy – kości.

W badaniach wykorzystano piszczele noworodków szczurzych rasy Wistar, hodowanych w Wydziale Farmaceutycznym Śląskiego Uniwersytetu Medycznego (ŚUM) w Sosnowcu. Kości pobrano od zwierząt w 7, 14 i 28 dniu życia za zgodą Komisji Bioetycznej ŚUM (pozwolenie nr 47/03). Wyekstrahowane kości oczyszczono mechanicznie z fragmentów tkanki miękkiej, a następnie wysuszono. Szczegółowy opis preparatyki pozyskanych kości został zawarty w innych opracowaniach [25, 86].

Materiał do niniejszych badań podzielono na 2 grupy. Pierwsza z nich składała się z kości noworodków szczurzych, których matkom w czasie ciąży podawano zidowudynę (w dawce 200 mg/kg m.c., raz dziennie przez 10 dni trwania ciąży), zwanej w dalszej części pracy grupą zidowudyny i oznaczaną przez „Z”. Druga grupa kości szczurzych obejmowała materiał pobrany od osobników, których matkom w ciąży podano roztwór soli fizjologicznej. W tych badaniach została ona wybrana jako grupa odniesienia i oznaczona przez „C”.

Dla każdej grupy zwierząt 7- i 14-dniowych przygotowano po 6 piszczeli (łącznie 24 preparaty). Dla kości szczurów 28-dniowych uzyskano po 4 próbki dla każdej grupy (łącznie 8 preparatów). Przykładowe zdjęcie fotograficzne próbek kości przedstawiono na ilustracji 2.



Ilustracja 2. Zdjęcie fotograficzne wybranych próbek piszczeli szczurzych przymocowanych do szkiełka podstawowego z użyciem kleju niefluoryzującego (skala 10 mm).

Ze względu na rozmiar fizyczny badanych preparatów kości wymagane było ustabilizowanie ich położenia względem obiektywu, żeby zapewnić maksymalną powtarzalność ustawienia. Dlatego obiekty przyklejono stroną tylną kości za pomocą niefluoryzującego kleju do szkiełek mikroskopowych w projekcji anterior-posterior AP (ilustracja 2). Opisany zabieg ułatwił obserwację mikroskopową preparatów.

Próbki przechowywano w zamkniętym nieprzezroczystym pojemniku, zabezpieczającym je przed zakurzeniem lub czynnikami zewnętrznymi (np. przypadkowe dotknięcie ręką lub uszkodzenie mechaniczne) w klimatyzowanym pomieszczeniu w stałej temperaturze 20°C.

Dla przejrzystości w tabeli 1 zestawiono oznaczenia oraz liczebności próbek w poszczególnych grupach.

Tabela 1. Wykaz zastosowanych oznaczeń oraz liczebności grup szczurów, od których pobrane zostały piszczele do badań zmienności rozwoju kośćca pod wpływem prenatalnego podania zidowudyny.

Grupa	Oznaczenie	Liczebność	Opis
Kontrola	7C	6	Piszczele zdrowych szczurów 7-dniowych, których matek nie poddawano terapii antyretrowirusowej
	14C	6	Piszczele zdrowych szczurów 14-dniowych, których matek nie poddawano terapii antyretrowirusowej
	28C	4	Piszczele zdrowych szczurów 28-dniowych, których matek nie poddawano terapii antyretrowirusowej
Zidowudyna	7Z	6	Piszczele szczurów 7-dniowych, których matki zostały poddane terapii antyretrowirusowej
	14Z	6	Piszczele szczurów 14-dniowych, których matki zostały poddane terapii antyretrowirusowej
	28Z	4	Piszczele szczurów 28-dniowych, których matki zostały poddane terapii antyretrowirusowej

5.2. Materiał badawczy – chrząstki.

Do badań oceny biozgodności chrząstki ludzkiej wykorzystano chrząstkę z różnych rejonów ciała: nosa, krtani, małżowiny usznej i stawu kolanowego, uzyskaną przez pracowników Zakładu Anatomii Prawidłowej ŚUM w Katowicach ze standardowo wykonywanych gotowych preparatów wraz z oceną histologiczną.

Zaakceptowane do badań grupy były równoliczne, po 22 fragmenty tkanki w każdej grupie. Wszystkie zgromadzone preparaty przechowywano w nieprzezroczystym pojemniku w lodówce w temp. 8°C dla zapewnienia stabilności mikrobiologicznej tkanki. Na okres ok. 30 minut przed pomiarami umieszczano je w klimatyzowanym pomieszczeniu pracowni mikroskopowej w celu wyrównania temperatury preparatu z temperaturą pomieszczenia (20°C).

5.3. Aparatura badawcza i metodyka pomiaru.

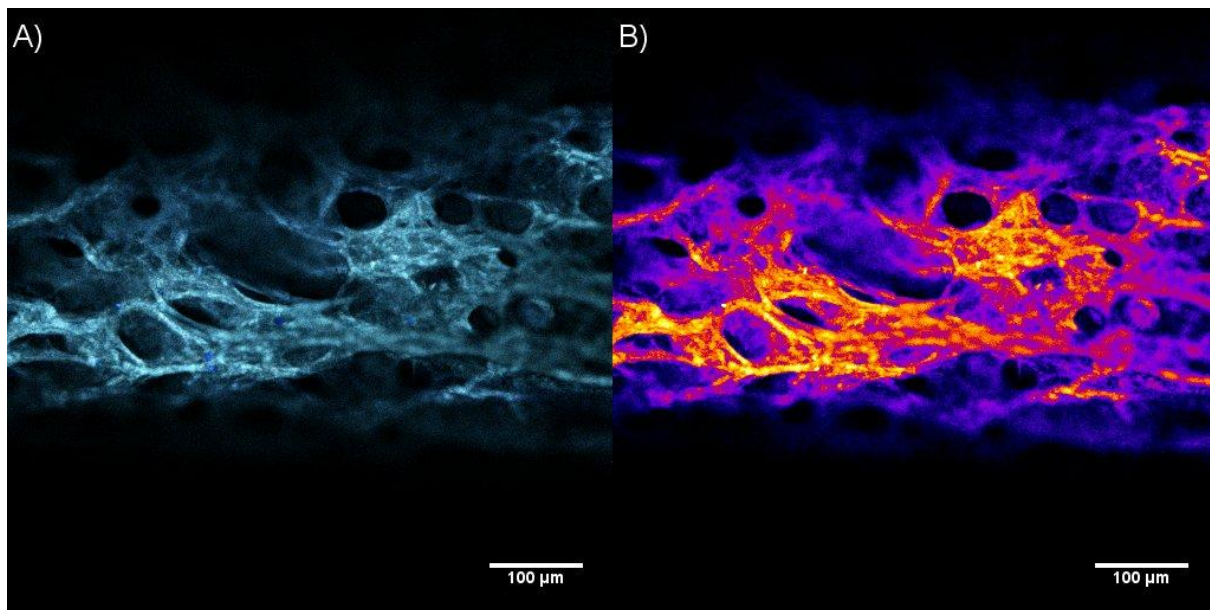
Wszystkie opisane w tej- pracy badania przeprowadzono za pomocą odwróconego konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego (CLSM) Eclipse Ti-E firmy NIKON®. Do obserwacji mikroskopowych wykorzystywano białe oświetlenie transmisyjne, epifluorescencję z lampy PRIOR® w zakresie UV-VIS, jak również oświetlenie laserowe o długościach fali 404, 488 i 544 nm (MellesGriot®) podczas obrazowania konfokalnego. Zastosowane lustro dichroiczne NIKON BS20/80 umożliwiło uzyskanie obrazów fluorescencyjnych w całym zakresie widma światła białego po wzbudzeniu falą o długości 404 nm. Rejestracja sygnału odbywała się poprzez fotopowielacz i przetwornik obrazu. Obrazowanie mikroskopowe wykonywano za pomocą następujących obiektywów:

- 10x (N.A. 0.45) ELWD PlanFluor,
- 20x (N.A. 0.45) ELWD S PlanFluor,
- 40x (N.A. 0.60) ELWD S PlanFluor.

Okular mikroskopu miał moc 10x, podobnie jak podstawowa optyczna apertura konfokalna, co umożliwiało obserwowanie i porównywanie obrazów z jednakowym powiększeniem. Podstawowe powiększenie mikroskopu 100x wraz z oświetleniem transmisyjnym wykorzystywano w celu wstępnego pozycjonowania próbki w polu widzenia. Używając tego powiększenia na obrazach konfokalnych wstępnie oceniano wygląd próbek i ich podstawowe parametry. Ze względu na brak zmotoryzowanego stolika na wyposażeniu mikroskopu przesuwany był ręcznie za pomocą śrub kierunkowych pozycji X i Y celem ustalenia dogodnego położenia obrazu.

Metoda obrazowania

Dla powiększenia 200x i 400x obrazowano konfokalnie powierzchnię próbek kości i chrząstki w różnych rejonach w taki sposób, aby jak największą powierzchnię obrazu zajmowało odwzorowanie płaszczyzny konfokalnej (zwaną dalej płaszczyzną obrazu) [75]. Dla każdego rejonu obserwowanej próbki kości i chrząstek przeprowadzono konfokalne obrazowanie wstępne z użyciem krótkiego czasu skanowania, żeby znaleźć optymalną ostrość obrazu oraz ustalić przydatność obrazu do dalszej analizy. Po akceptacji obrazu wstępnego przeprowadzano właściwe obrazowanie, wykorzystując dłuższy czas akwizycji oraz uśrednianie 8-krotne. Obrazy do analizy rejestrowano w rozdzielczości 1024x1024 pikseli. Szczegóły obrazu mikroskopowego uwydatniano regulując poziom wzmocnienia fotopowielacza w poszczególnych kanałach (niebieski, zielony i czerwony). Wykorzystywano funkcję look-up table (LUT) w celu oznaczenia rzeczywistego położenia płaszczyzny konfokalnej, wzmacniając kontrast obrazu. Ponadto wykorzystywano funkcję graficznego oznaczania nadmiernej saturacji pikseli w celu wyeliminowania lokalnego przejawienia obrazu (ilustracja 3).

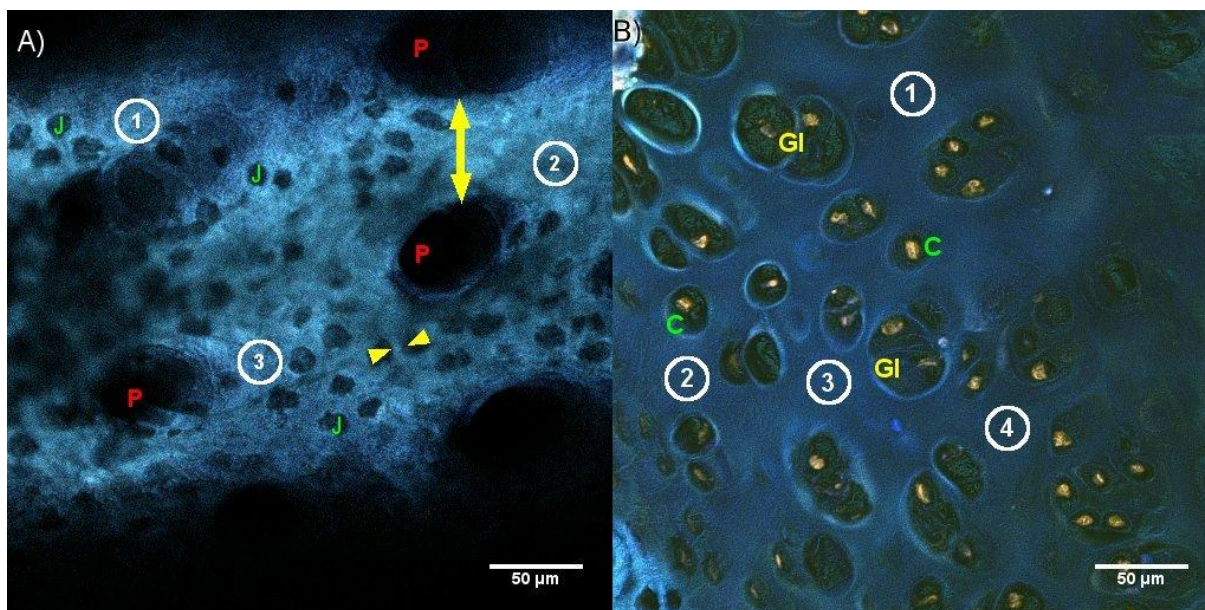


Ilustracja 3. Przykład wykorzystania narzędzi graficznych do oznaczenia położenia płaszczyzny konfokalnej w przypadku preparatów kości. A) obraz standardowego obrazowania konfokalnego; B) zastosowanie funkcji look-up table w celu określenia płaszczyzny konfokalnej. Powiększenie 200x.

Rejestrację i wstępną obróbkę obrazów wykonano z użyciem oprogramowania producenta NIS-Elements® (NIKON). Porównania oraz analizy obrazów wykonano przy pomocy rekomendowanego darmowego programu komputerowego ImageJ (USA). Następnie na odpowiednio przygotowanych obrazach zliczano ilość obiektów charakterystycznych dla danej tkanki:

- Tkanka kostna: przestrzenie międzybeleczkowe oraz jamki komórek kostnych na powierzchni preparatu,
- Tkanka chrzęstna: chondrocyty oraz grupy izogeniczne.

Co więcej, w przypadku tkanki kostnej wykonano pomiary grubości beleczek w obrębie płaszczyzny konfokalnej oraz pomiary grubości osteoidu pomiędzy obserwowanymi jamkami powierzchniowymi, co przykładowo przedstawiono na ilustracji 4(str23).

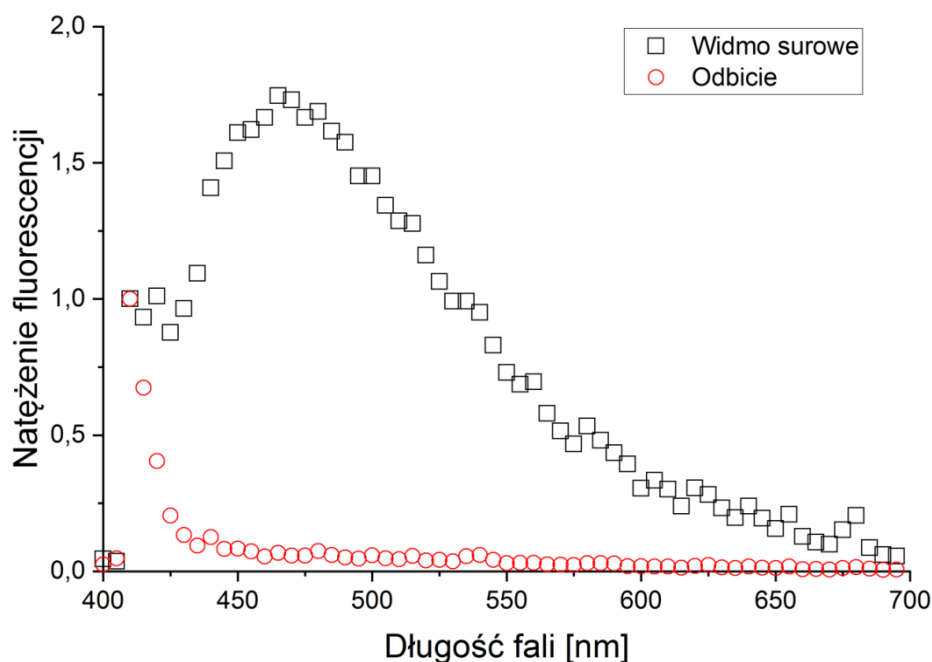


Ilustracja 4. Przykładowe zdjęcia próbek (pow. 400x) ukazujące obiekty zliczane oraz wielkości mierzone. A) tkanka kostna; oznaczenia: żółta strzałka dwustronna – grubość beleczki, podwójna strzałka – grubość macierzy pomiędzy jamkami (J), P – przestrzeń międzyjamkowe, białe okręgi 1-3 – regiony zainteresowania ROI dla pomiaru fluorescencji. B) tkanka chrzęstna; oznaczenia: C – chondrocyt, GI – grupa izogeniczna, białe okręgi 1-4 – regiony zainteresowania ROI dla pomiaru fluorescencji.

Metoda pomiaru autofluorescencji

Akwizycja sygnału autofluorescencji (zarówno dla kości jak i chrząstek) przeprowadzana była na podstawie obrazu emisji światła w zakresie długości fali 400-700 nm po wzbudzeniu falą 404 nm. Rozdzielczość spektralna pomiaru wynosiła 5 nm. W obrębie płaszczyzny konfokalnej zaznaczano koliste regiony zainteresowania ROI (ilustracja 4) o średnicy $20 \pm 5 \mu\text{m}$ rozlokowanych w miejscach najbardziej jednorodnej widocznej emisji, redukując w ten sposób wpływ szumu tła lub widma odbiciowego lasera. Dla każdego obrazu z zaznaczonymi ROI pomiar powtarzano 5-krotnie.

W widmach uzyskanych z bezpośrednich pomiarów autofluorescencji zaznaczają się dwa główne regiony: 1) widmo odbicia lasera od powierzchni próbki oraz 2) widmo emisji wzbudzonych cząsteczek osteoidu, częściowo na siebie nałożone, jak to zaprezentowano na ilustracji 5.



Ilustracja 5. Przykład normalizacji widma odbicia i widma surowego próbki kości do wartości w 410 nm mającej na celu subtrakcję nakładających się pasm i uzyskania właściwego widma autofluorescencji.

Rejestrację, przegląd i analizę widm przeprowadzono za pomocą oprogramowania Origin2019® (OriginLab, USA).

Rozdzielono zmierzone sygnały od siebie (ilustracja 5) poprzez normalizację wszystkich widm do wartości w punkcie widma 410 nm (maksimum widma odbitego), zarówno dla widm surowych, jak i widm odbitych od szkiełka mikroskopowego zarejestrowanych dla tych samych ustawień akwizycji pomiaru. Następnie widmo odbicia zostało odjęte od surowego widma emisji próbki, uzyskując sygnał autofluorescencji bez pasma wzbudzeniowego.

Wszystkie analizy statystyczne przeprowadzono z przyjętym poziomem ufności $p=0.05$, wykorzystując pakiet STATISTICA® (StatSoft, USA). Dla oceny istotności między dwoma grupami wykorzystano test t-Studenta, dla statystyk parametrycznych w testach jednorodności wariancji (ANOVA) testem post-hoc był test Scheffe’ego. W przypadku uzyskania statystyk nieparametrycznych wykorzystywano ANOVA rang z testem Kruskala-Wallisa ($p=0.05$).

Część doświadczalna

W tej części pracy zaprezentowano i omówiono następujące wyniki:

1. przeprowadzonej walidacji metody konfokalnego mikroskopu fluorescencyjnego skanującego wiązką laserową (CLSM),
2. badań piszczeli noworodków szczurzych w wieku 7, 14, i 28 dni od momentu urodzenia, których matki czasie ciąży leczono zidowudyną w porównaniu z grupą kontrolną,
3. badań biogodności chrząstek ludzkich z rejonu nosa, ucha, krtani i stawu kolanowego na potrzeby rekonstrukcji w laryngologii.

6. Walidacja metody konfokalnego fluorescencyjnego CLSM.

Każda metoda badawcza przed wdrożeniem do rutynowej praktyki laboratoryjnej powinna być sprawdzona pod względem tego, czy mierzony zakres wielkości fizycznych i niepewność jej pomiaru znajdują się w akceptowalnym przez badaczy zakresie. Szacowana jest także powtarzalność i odtwarzalność pomiaru. Prawidłowa walidacja metody badawczej obejmuje gruntowne poznanie zasady działania aparatury. W jej zakres wchodzi też prawidłowa identyfikacja sygnału mierzonego bezpośrednio, jego przetwarzanie przez urządzenia stosowane w metodzie oraz wykrycie źródeł błędów i niepewności, jakie w tej metodzie występują. Dużej precyzji w trakcie walidacji wymaga czułość metody, ponieważ pozwala poprawnie oznaczać ilościowo jakiś parametr, np. stężenie danej substancji. Wykorzystuje się do tego wzorce i metody kalibracyjne, a to pociąga za sobą nanoszenie odpowiednich korekcyj odczytu. W rzadkich przypadkach pojawia się konieczność porzucenia danej metody, gdyż jej stosowanie nie pozwoli sprawdzić hipotez badawczych. Stosowanie CLSM wymaga pewnego doświadczenia w doborze odpowiednich parametrów obrazowania i pomiaru autofluorescencji. W przypadku obrazowania struktur mikroskopowych głównym celem jest ich czytelność i ostrość, jak również kontrastowanie obszarów szczególnego zainteresowania czy eliminacja szumów i nadmiarowego tła obrazu. Istotny jest fakt, że parametry obrazowania wpływają na czytelność pomiaru widma autofluorescencji i wymaga to odpowiedniego dopasowania ustawień dla rodzaju badanych próbek. Dlatego metoda CLSM również jest obciążona charakterystycznymi źródłami niepewności oraz błędów, na które w pracy zwrócono uwagę i zostały poniżej opisane wraz z wprowadzonymi rozwiązaniami.

Dopasowanie mocy lasera

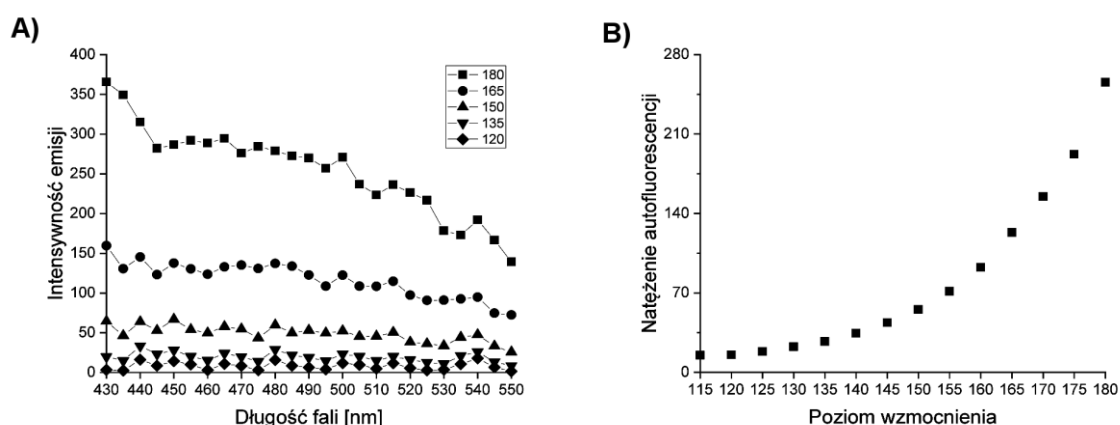
W CLSM podstawą obrazowania jest wiązka światła laserowego. Jednakże lasery wykorzystywane w tego typu aparatach badawczych cechuje stosunkowo duża moc wiązki. Jedną z przyczyn takiego rozwiązania technologicznego jest niska wydajność kwantowa mierzonej autofluorescencji próbek biologicznych, dlatego w celu uzyskania wystarczającej czytelności sygnałów emisji należy wzmocnić natężenie fali wzbudzającej. Dobrą metodą w obrazowaniu konfokalnym jest aplikacja fluoroforów syntetycznych w trakcie preparacji materiału badawczego lub na próbkę już w trakcie obserwacji, ponieważ pozwala obrazować konkretne struktury lub ich reakcję na wybrane warunki prowadzenia eksperymentu. Odpowiednie projektowanie takich substancji umożliwia podanie niewielkich ilości takiego barwnika fluorescencyjnego [87]. Natomiast w badaniach przyżyciowych dobiera się fluorofory o minimalnej cytotoksyczności w celu zachowania prawidłowych funkcji życiowych organelli, chyba że taka zmiana jest zamierzona w eksperymencie [88].

W niniejszej rozprawie rejestrowano sygnał natywnej autofluorescencji, żeby jak najwierniej odwzorować funkcje tkanki łącznej w ciele. Nadmienić należy, że dla większości próbek mikroskopowych zbyt duża moc irradycji lasera jest zjawiskiem niekorzystnym, zwłaszcza w zakresie UV i dalekiego fioletu, ponieważ energia fotonów w tym paśmie może

powodować chemiczną dekompozycję układów biologicznych [89]. Co więcej, obrazowanie przy użyciu dużej mocy lasera skutkuje wypaleniem danego obszaru obrazowania (z ang. photobleaching) [90]. Jest to zauważalne praktycznie już po pierwszej ekspozycji wiązki lasera na badany obiekt, zwłaszcza dla preparatów o grubości kilku mikronów. To niekorzystne zjawisko zauważono w badaniach wstępnych niniejszej pracy. Dlatego optymalny poziom mocy wyjściowej lasera dobrano eksperymentalnie w taki sposób, żeby 5-krotne skanowanie próbki chrząstek nie spowodowało spadku natężenia emisji mniejszą niż 1.5 odchylenia standardowego, co zostało uzyskane dla 50% mocy wyjściowej lasera 404 nm. W przypadku kości taki poziom mocy lasera nie powodował znaczącej redukcji emisji nawet po kilkunastokrotnej ekspozycji.

Optymalizacja wzmocnienia fotopowielacza

Regulacja poziomu mocy wyjściowej lasera wzbudzającego fluorescencję zmienia proporcjonalnie samą intensywność emisji sygnału mierzonego. Z kolei redukcja emisji jest ściśle związana z obniżeniem jasności obrazu konfokalnego, a tym samym jego czytelności i rozróżnialności elementów obrazu. Swoiste zmiany stężenia poszczególnych biomarkerów w tkankach wynikają ze stanu zdrowia lub choroby organizmu [78]. Dlatego optymalne wzmocnienie sygnału emisji pochodzącego od fluoroforów natywnych zawartych w próbce ma istotne znaczenie w prawidłowej analizie spektrofluorymetrycznej. Zbyt duże wzmocnienie fotopowielacza może spowodować przesycenie sygnału i zatkanie detektora. W ten sposób może dojść do zakrycia sygnałów świadczących o obecności fluoroforów występujących w mniejszym stężeniu. Z drugiej strony, zbyt małe wzmocnienie może całkowicie wyeliminować obecność niektórych biomarkerów i zostać błędnie odczytane jako tło lub sygnał podlegający eliminacji. W celu dobrania optymalnego poziomu wzmocnienia zbadano zależność sygnału autofluorescencji w funkcji wzmocnienia fotopowielacza (ilustracja 6).



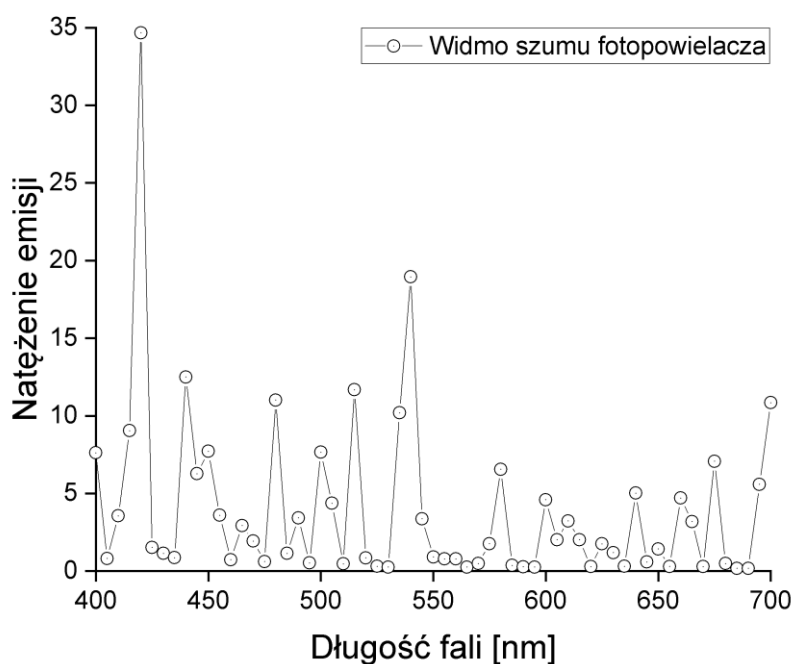
Ilustracja 6. Wyniki walidacji wpływu fotopowielacza na sygnał emisji. A) Przykład zmienności kształtu widma autofluorescencji na obrazie próbki kości szczurzej w funkcji wzmocnienia fotopowielacza. Widoczne jest pojawianie się pasm charakterystycznych wraz z wzrostem wzmocnienia fotopowielacza. B) Zależność natężenia widma autofluorescencji od zmiany poziomu wzmocnienia jest nieliniowa.

Wyniki przedstawione na ilustracji 4A wskazują, że dopiero od poziomu 160 jednostek wzmocnienia fotopowielacza na widmie pojawiają się jednoznaczne sygnały

charakterystyczne, obserwowane we wszystkich badanych próbkach z różnym natężeniem względnym. Dlatego odpowiedni dobór wzmocnienia pozwoli na najlepsze zróżnicowanie sygnałów pochodzących z biomarkerów. Jak natomiast widać z ilustracji 4B, odpowiedź natężenia autofluorescencji nieliniowo zależy od poziomu wzmocnienia fotopowielacza, co nasunęło wniosek, żeby ustalić jeden poziom wzmocnienia fotopowielacza dla wszystkich pomiarów autofluorescencji równy 170 HV, przekładając się tym samym na stałą czułość metody niezależnie od próbki badanej.

Uwzględnienie szumu fotopowielacza

Zauważono, że dla niskiego poziomu wzmocnienia fotopowielacza w widmie autofluorescencji pojawiają się punkty widmowe o stałym natężeniu nieco większym niż linia samego widma. W tym celu zamknięto przesłonę dopuszczającą falę wzbudzenia do próbki i zmierzono widmo, jakie powstało. W wyniku tego eksperymentu ustalono, że fotopowielacz ma swój stały szum aparaturowy, który może zaburzać wynik pomiaru emisji. Na ilustracji 7 przedstawiono widmo szumu fotopowielacza odejmowane od widma fluorescencji.



Ilustracja 7. Widmo szumu zastosowanego fotopowielacza. Rozdzielczość: 5 nm. Wyniki pomiarów autofluorescencji zostały odpowiednio skorygowane o sygnał szumu.

Dopasowanie szybkości skanowania i pomiaru sygnału

Szybkość skanowania jest kolejnym parametrem istotnie wpływającym na jakość obrazowania i prawidłowy pomiar autofluorescencji. Często określona jest za pomocą ilości rejestrowanych klatek na sekundę, jednakże znacznie bardziej miarodajnym parametrem jest czas pobytu wiązki w pikselu (ang. pixel dwell time), tzn. czas, jaki może przebywać wiązka skanująca w jednostce przestrzeni, czyli pojedynczym pikselu, oświetlając go. W oparciu o dane eksperymentalne ustalono optymalny czas skanowania piksela na potrzeby pomiaru autofluorescencji wynoszący 11 μ s. Czas skanowania wiązką dla obrazowania mieścił się w zakresie 1 – 16.8 μ s.

Dopasowanie szerokości przesłony

Przesłona konfokalna (ang. pinhole) ma za zadanie odciąć nadmiarowy sygnał światła docierający do detektora, pochodzący spoza obszaru płaszczyzny konfokalnej, który może zaburzyć prawidłowy obraz próbki. Logiczne jest, że zbyt duże otwarcie takiej przesłony spowoduje nadmierne nasycenie obrazu, dlatego też producent aparatury wykorzystywanej w niniejszej pracy skorelował optymalną średnicę przesłony z konkretnym obiektywem wykorzystywanym do obserwacji. Z tego powodu wybierano proponowaną z automatu średnicę przesłony dla każdego obiektywu, mieszczącą się w zakresie 30 – 40 μ m.

Podsumowanie walidacji

Dzięki procesowi walidacji fluorescencyjnego mikroskopu konfokalnego sprawdzono zakres stosowalności tego narzędzia badawczego w badaniach próbek kości oraz tkanki chrzęstnej. Na podstawie wstępnych wyników pomiarów układ badawczy został dostosowany do optymalnej pracy z wykorzystaniem próbek biologicznych, by móc prawidłowo obrazować tkanki oraz odpowiednio rejestrować widmo autofluorescencji preparatów. Poniżej przedstawiono kartę walidacji mikroskopu (Tabela 2).

Tabela 2. Karta walidacji mikroskopu fluorescencyjnego na potrzeby badań tkanki chrzęstnej i kostnej.

Parametr	Wartość ustalona	Uwagi
Moc lasera wzbudzającego 404 nm	50%	--
Wzmocnienie fotopowielacza	170 HV (pomiar autofluorescencji); W obrazowaniu zmienna wartość bez przesylenia obrazu	Nieliniowa odpowiedź sygnału
Szum fotopowielacza	Określony dla 170 HV, odejmowany	Stała wartość dla stałego poziomu HV
Szybkość skanowania wiązki (dwell time)	Autofluorescencja: 11 μ s Obrazowanie: 1 – 16.8 μ s (jak najlepszy obraz)	--
Przesłona	30 – 40 μ m (zależnie od obiektywu)	Zoptymalizowane podczas instalacji przez producenta

7. Wyniki badania zmian rozwojowych wczesnego osteoidu po prenatalnej aplikacji zidowudyny

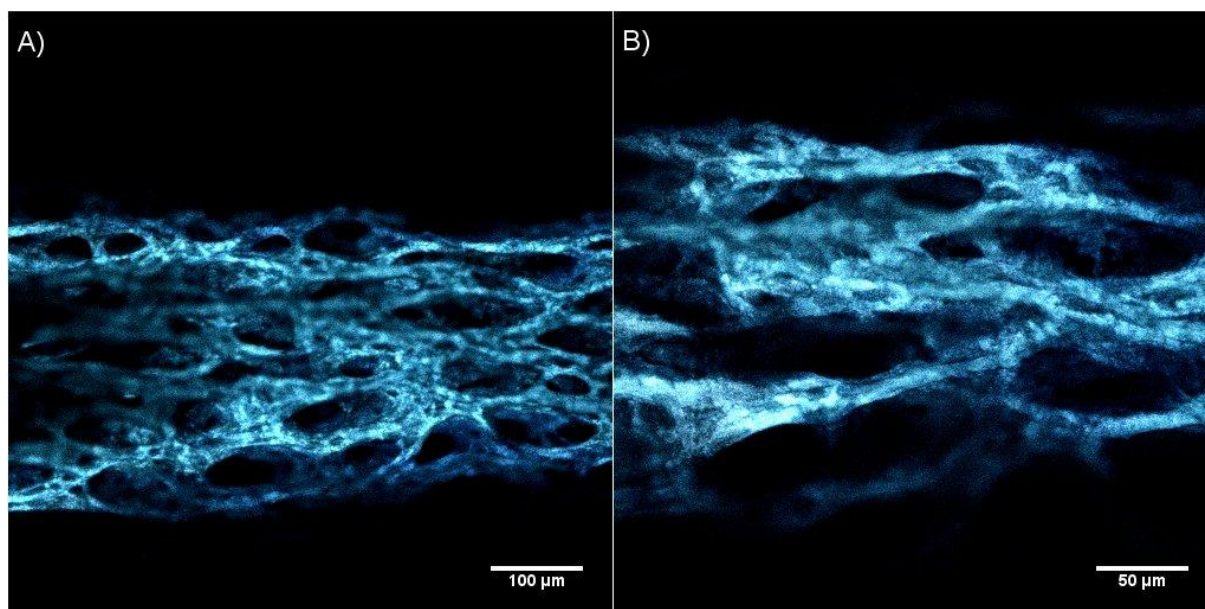
Pierwsza część niniejszego rozdziału obejmuje opis wyników obrazowania konfokalnego kości szczurzych. W drugiej części rozdziału zaprezentowano wyniki badań autofluorescencji osteoidu.

Wstępne obserwacje tkanki kostnej w rejonie końców kości wykazały znaczne niejednorodności struktury, pęknięcia i zanieczyszczenia, dlatego przedstawione wyniki dotyczą tylko trzonów kości.

7.1. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczurzych w wieku 7 dni

Grupa kontrolna 7C.

Niewielki rozmiar fizyczny piszczeli szczurów nie poddanych terapii w wieku 7 dni sprawił, że dopiero przy powiększeniu 200x można rozróżnić poszczególne obiekty strukturalne tkanki. Obrazowanie konfokalne wykazało, że trzon piszczeli 7-dniowych szczurów jest niewielką podłużną gąbczastą strukturą o nieregularnym ułożeniu beleczek i przestrzeni międzybeleczkowych (ilustracja 8).



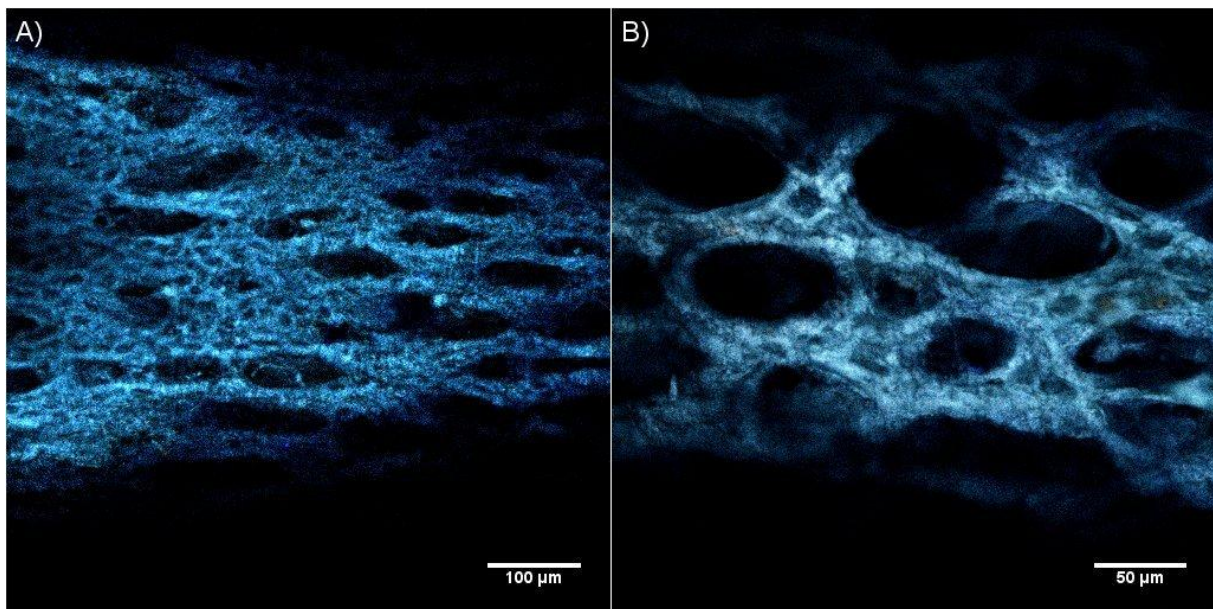
Ilustracja 8. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 7-dniowych szczurów nie poddanych terapii: A) pow. 200x; widoczna gąbczasta struktura o nieregularnym ułożeniu przestrzeni międzybeleczkowych i beleczek kostnych. B) pow. 400x uwidacznia szczegóły struktury macierzy kostnej; w rejonach złączeń beleczek pojawiają się większe skupiska jamek kostnych.

Jak widać z ilustracji 8 obrys przestrzeni międzybeleczkowych przyjmuje nieregularny kształt: od podłużnego o dużej powierzchni do mniejszego o kształcie zbliżonym

do owalnego. Na powierzchni macierzy kostnej znajdują się mnogie niewielkie przestrzenie, które mogą być jamkami kostnymi osteocytów lub miejscami przyczepu osteoklastów w procesie przebudowy macierzy. Obrazowanie przy powiększeniu 400x (ilustracja 8B) umożliwia dostrzec więcej szczegółów strukturalnych. Jamki kostne występują w skupiskach na złączeniach beleczek kostnych oraz w większych powierzchniach macierzy kostnej, natomiast w obrębie samych beleczek układają się w jednorzędowe szeregi.

Grupa leczona zidowudyną 7Z.

Obrazy kości 7-dniowych szczurów leczonych w okresie prenatalnym zidowudyną wykazały, że struktura trzonu piszczeli jest masywniejsza, bardziej zwarta i zawiera więcej macierzy kostnej w porównaniu z grupą kontrolną 7C. Przykładowe zdjęcia mikroskopowe przedstawiono na ilustracji 9.



Ilustracja 9. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli szczurów 7-dniowych leczonych prenatalnie zidowudyną: A) pow. 200x; widoczna masywniejsza struktura kości niż w przypadku grupy 7C. Osteoid grupy 7Z jest bardziej zwarty, posiada bardziej regularnie rozlokowanie przestrzeni międzybeleczkowych. B) pow. 400x; w obrębie beleczek kostnych znajdują się przynajmniej 2 rzędy jamek, natomiast przestrzenie międzybeleczkowe posiadają kształt zbliżony do owalnego.

Obserwacją makroskopową potwierdza, że kości szczurów w grupie 7Z są fizycznie większe niż kości szczurów 7C. Obrazy konfokalne trzonu kości ukazują, że osteoid grupy 7Z posiada większe pole powierzchni w porównaniu z 7C (por. ilustracje 8A i 9A). Przestrzenie międzybeleczkowe oraz jamki kostne wydają się leżeć w jednej płaszczyźnie i osiągać swoiste usieciowanie, jednakże bez regularnego charakteru. Powiększenie 400x ukazuje, że rejonny złączenia beleczek kostnych są grubsze i zajmują większą powierzchnię w porównaniu z tymi samymi rejonami w grupie 7C. Wielokrotnie w beleczkach dostrzegaliśmy więcej niż jeden rząd jamek kostnych. Wskazuje to na pogrubianie się warstwy istoty zbitiej, zapewniającej twardość kości.

W porównaniu z obrazami struktury tkanki kostnej 7C, grupa 7Z charakteryzuje się większą liczbą obiektów tkankowych w polu widzenia. Dla obrazów w powiększeniu 400x policzono

więc przestrzenie międzybeleczkowe oraz jamki kostne dla grup 7C i 7Z. Zmierzono także grubość beleczek kostnych i grubość macierzy kostnej pomiędzy jamkami na powierzchni osteoidu. Wyniki tej analizy zawarto w tabeli 3.

Tabela 3. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 7 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

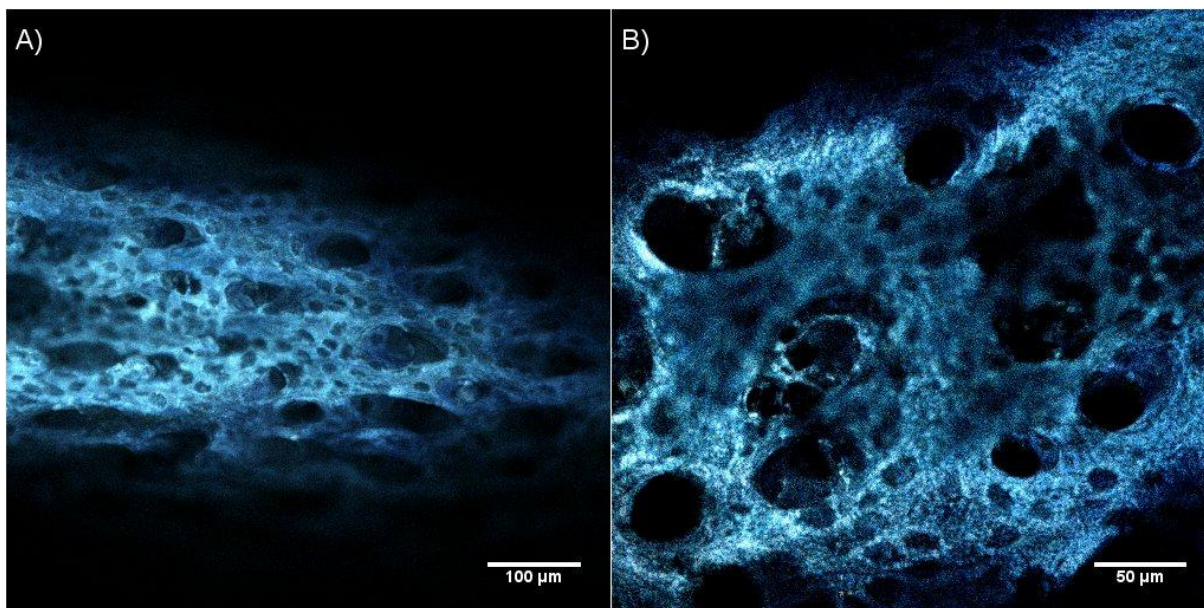
	Kontrola 7C	Zidowudyna 7Z	Wartość p
Liczba przestrzeni międzybeleczkowych	30 ± 7	46 ± 6	0.0484
Liczba jamek kostnych	88 ± 5	199 ± 10	0.0001
Grubość beleczek kostnych [µm]	20.0 ± 7.7	20.2 ± 8.5	0.8524
Grubość macierzy międzyjamkowej [µm]	4.4 ± 1.1	5.3 ± 1.4	0.0063

Na podstawie analizy wyników z tabeli 3 można stwierdzić, że w grupie 7Z liczba przestrzeni międzybeleczkowych ok. 1,5-krotnie wyższa w porównaniu z kontrolą. Ponadto zarejestrowane obrazy kości wskazują, że w trakcie życia zwierzęta 7Z wytworzyły ponad dwukrotnie więcej komórek kostnych niż grupa kontrolna. Grubość beleczek kostnych pomiędzy grupami 7C i 7Z nie różni się w sposób istotny statystycznie. Natomiast grupa 7Z cechuje się istotnie grubszą (ok. 120%) macierzą pomiędzy jamkami kostnymi niż grupa 7C.

7.2. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczurzych w wieku 14 dni

Grupa kontrolna 14C.

Obserwacje mikroskopowe powierzchni kości szczurów zdrowych w wieku 14 dni ukazały (ilustracja 10), że struktura tkanki kostnej jest bardziej rozwinięta w porównaniu z obrazami kości zwierząt 7-dniowych (por. ilustracje 8 i 9). W odróżnieniu od grupy szczurów 7-dniowych, obrys przestrzeni międzybeleczkowych ma kształt zbliżony do okręgu. W badanych trzonach kości znajduje się większa liczba tych przestrzeni, które układają się w bardziej uporządkowaną sieć niż zostało to zaobserwowane w grupie młodszych osobników. Wskazuje to na nadbudowę osteoidu w tym rejonie, świadcząc o pojawianiu się coraz grubszej warstwy blaszek istoty zbitej kości, wypełniającej obszar pomiędzy przestrzeniami, prowadząc jednocześnie do zaniku beleczek kostnych w rejonie powierzchni zewnętrznej kości. Na wszystkich przeanalizowanych obrazach grupy 14C odnotowano występowanie łącznie tylko kilku beleczek kostnych.

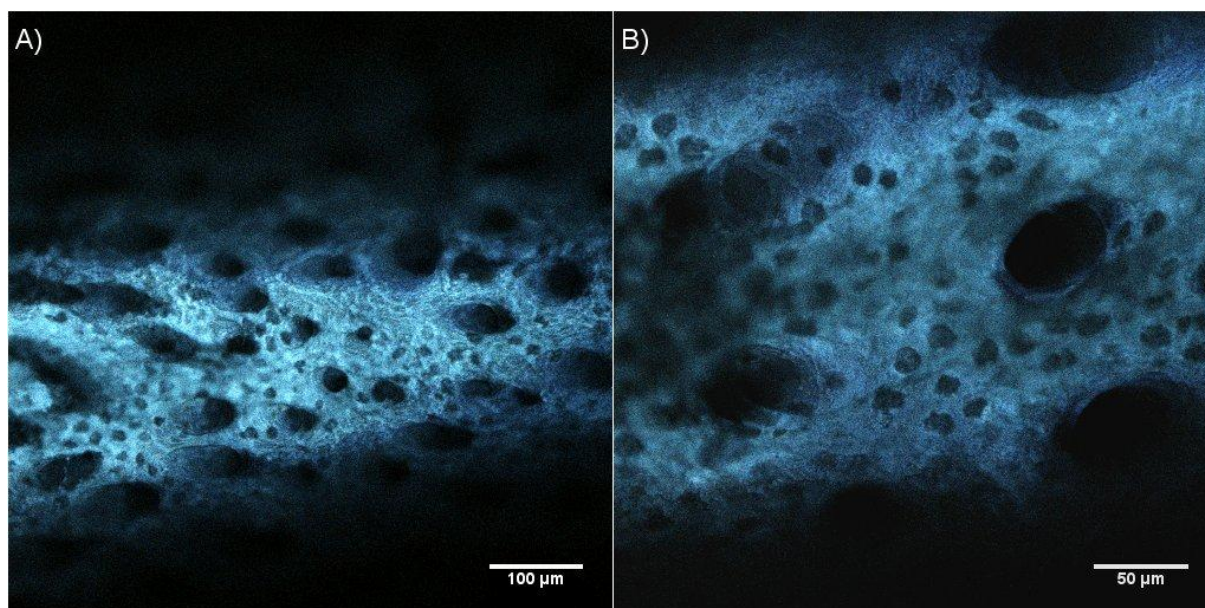


Ilustracja 10. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 14-dniowych szczurów nie poddanych terapii. Tkanka jest bardziej rozwinięta i masywniejsza niż w przypadku grupy młodszych osobników. A) pow. 200x; widoczna duża liczba przestrzeni międzybeleckowych oraz jamek kostnych. B) pow. 400x; jamki kostne okalają przestrzenie międzybeleckowe. Widoczne lokalne rozmycie obrazu świadczy o nierówności powierzchni osteoidu.

Obrazy konfokalne kości grupy 14C potwierdziły występowanie większej liczby jamek kostnych niż w grupie zwierząt 7-dniowych. W nielicznych przypadkach dostrzeżono, że jamki te okalają przestrzenie międzybeleckowe. Niemniej jednak na obrazach pojawiają się fragmenty osteoidu, w których jamki nie są widoczne lub ich obraz jest nieco rozmyty. Oznacza to, że znajdują się one poza płaszczyznę konfokalną, co dowodzi, że powierzchnia kości szczurów 14C rozrastając się zaokrągla się. Nadal jest pofałdowana, jednak mniej niż w grupie młodszych osobników, przy czym obrazy 200x dla grupy 7Z wykazują pewne podobieństwa z obrazami grupy 14C.

Grupa leczona zidowudyną 14Z.

Obserwacje konfokalne kości szczurów 14Z wykazały, że struktura tkanki kostnej tej grupy jest masywniejsza i bardziej zwarta niż kości zwierząt 7-dniowych (por. ilustracje 8 i 9, ilustracja 11). Podobnie jak w przypadku 14C na obrazach kości szczurów z grupy 14Z dostrzegalne są większe przestrzenie macierzy kostnej pomiędzy przestrzeniami międzybeleckowymi lub ich pozostałościami. Powierzchnia osteoidu jest pokryta dużą ilością jamek kostnych. Uwagę zwraca uzyskiwana ostrość większości obrazowanych fragmentów trzonu, co oznacza, że prawie wszystkie elementy jego powierzchni widoczne na obrazie znajdują się w płaszczyźnie konfokalnej (ilustracja 11B). Wynika z tego, że kości zwierząt w grupie 14Z rozrastając się uzyskują większą płaskość powierzchni niż w grupie 14C.



Ilustracja 11. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 14-dniowych szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną. A) pow. 200x; struktura tkanki jest masywniejsza i bardziej zwarta niż w grupie młodszych zwierząt. B) pow. 400x; większa część obrazu powierzchni kości znajduje się w płaszczyźnie konfokalnej, wskazując na większą płaskość powierzchni niż przypadku grupy 14C.

Dla kości szczurów grup 14C i 14Z policzono ilość przestrzeni międzybeleczkowych i jamek kostnych. Zmierzono również grubość beleczek oraz grubość macierzy pomiędzy jamkami. Wyniki zestawiono w tabeli 4.

Tabela 4. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 14 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

	Kontrola 14C	Zidowudyna 14Z	Wartość p
Liczba przestrzeni międzybeleczkowych	52 ± 3	39 ± 8	0.0115
Liczba jamek kostnych	168 ± 19	228 ± 49	0.0351
Grubość beleczek kostnych [µm]	29.3 ± 9.2	44.7 ± 18.0	<0.0000
Grubość macierzy międzyjaskmkowej [µm]	6.8 ± 1.7	8.0 ± 1.5	0.0001

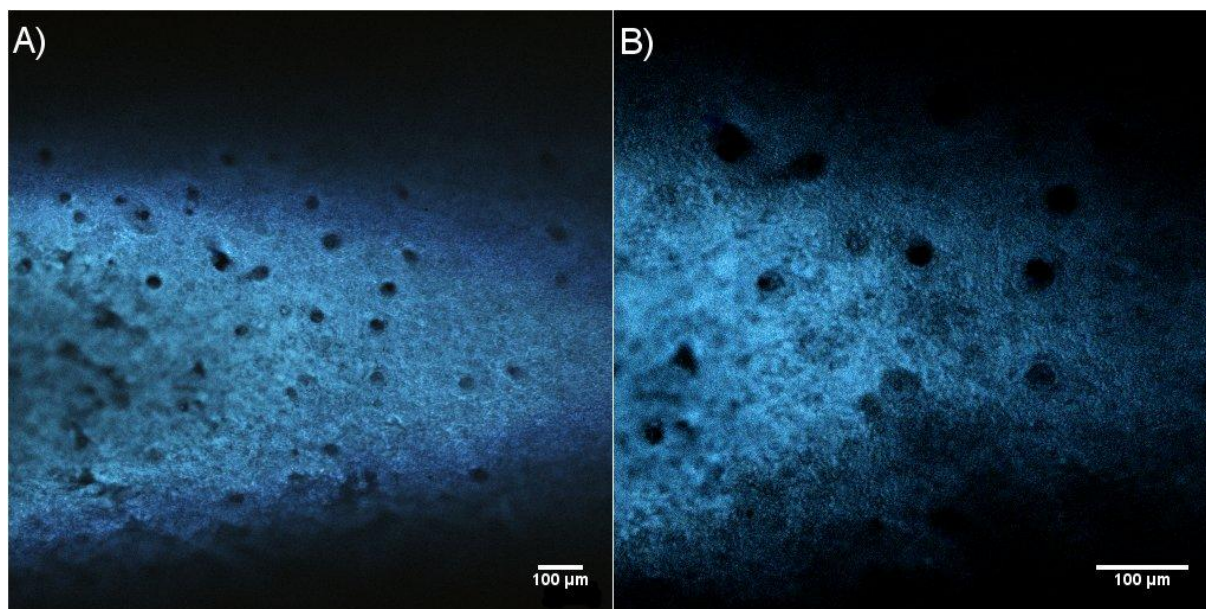
Analiza wyników obrazów kości szczurów 14C i 14Z przedstawiona w tabeli 4 wykazała, że liczba przestrzeni międzybeleczkowych w grupie 14Z jest o 25% mniejsza niż w grupie kontroli, stanowiąc różnicę istotną statystycznie. Zauważono również, że liczba tych obiektów w grupie szczurów 14Z zmalała o ok. 18% w porównaniu z grupą 7Z. Z kolei liczba jamek kostnych widoczna na powierzchni kości jest znacząco większa w grupie 14Z niż w grupie 14C. Wraz z wiekiem w grupie kontrolnej liczba jamek wzrosła dwukrotnie (14C/7C), przy czym pomiędzy grupami 14Z a 7Z przyrost liczby jamek wyniósł zaledwie 15%. W grupie 14Z zaobserwowano statystycznie istotny wzrost grubości beleczek w porównaniu

do 14C. Zauważono również istotny przyrost grubości macierzy międzyjamkowej dla grupy 14Z.

7.3. Obrazowanie konfokalne trzonów piszczeli noworodków szczurzych w wieku 28 dni

Grupa kontrolna 28C.

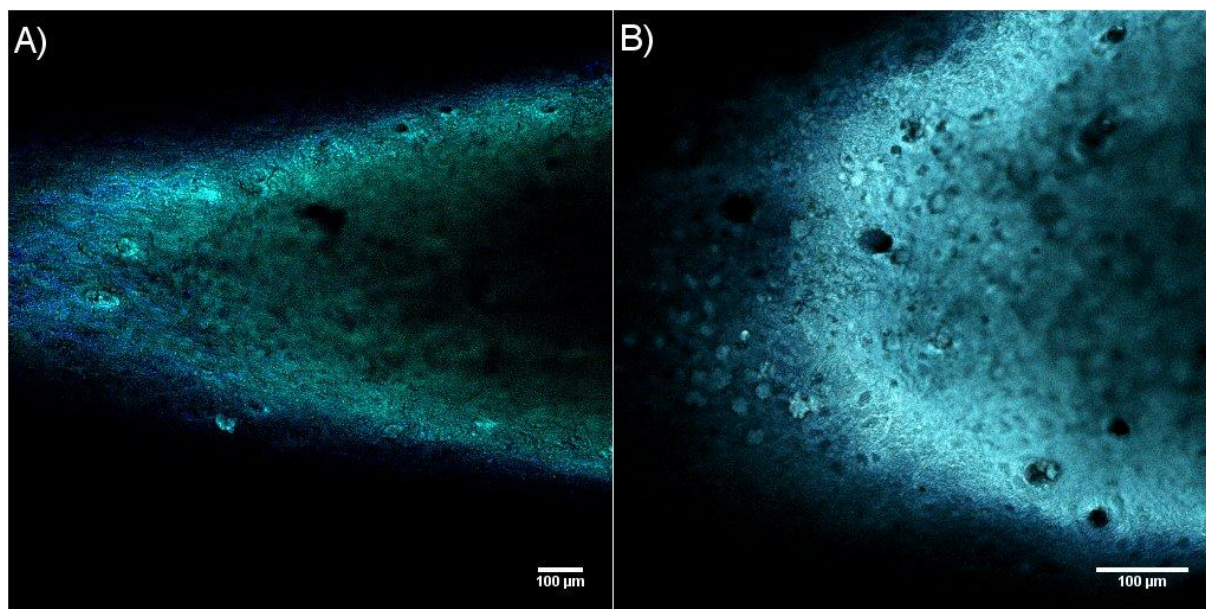
Obrazowana powierzchnia kości szczurów 28C jest bardziej jednorodna w porównaniu z obrazami trzonów kości szczurów młodszych, z nieznacznymi lokalnie występującymi obszarami pofałdowania kości. Powiększenie 200x wykazało, że jest to struktura masywniejsza i bardziej zwarta niż kości szczurów 14-dniowych, a jej obszar zajmował w wielu przypadkach całe pole widzenia obiektywu, dlatego zwiększono liczbę obserwacji z użyciem powiększenia 100x. Na obrazach konfokalnych widoczne są nieliczne przestrzenie międzybeleczkowe, które są prawie okrągłe dla większości wykonanych ujęć (ilustracja 12). Pomędzy tymi przestrzeniami występuje wysoka liczebność jamek kostnych na powierzchni tkanki, a odległości pomiędzy nimi są zdecydowanie większe niż w przypadku kości młodszych osobników. Zauważono, że płaszczyzna konfokalna obejmuje tylko pewien fragment obrazu, tworząc w większości przypadków „linię ostrości” obrazu o różnym rozmiarze, przypominającą parabolę, zależnie od obserwowanego rejonu piszczeli. Dodatkowe skanowanie w osi Oz wykazało, że to zjawisko zanika tylko w rejonie fizycznego środka kości, sugerując, że powierzchnia kości w tym miejscu przyjmuje charakter walcowaty, szybko rozszerzający się w kierunku końców kości. Obserwacja makroskopowa trzonu kości potwierdza, że środek fizyczny trzonu przyjmuje kształt zbliżony do walca.



Ilustracja 12. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 28-dniowych szczurów nie poddanych terapii. A) pow. 100x ujawnia bardziej jednorodną strukturę w porównaniu z grupami młodszych osobników. Macierz kostna jest masywna i zwarta. B) pow. 200x; widoczne duże ilości jamek kostnych oraz duże odległości pomiędzy przestrzeniami międzybeleczkowymi.

Grupa leczona zidowudyną 28Z.

Obrazowanie konfokalne powierzchni kości szczurów 28Z wykazało występowanie pewnych podobieństw względem grupy 28C. Poza dostrzegalnie większą jednorodnością powierzchni oraz rozmiarem tkanki w porównaniu z grupami młodszymi na obrazach również występują pojedyncze przestrzenie międzybeleczkowe (ilustracja 13).



Ilustracja 13. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 28-dniowych szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną. A) pow. 100x; widoczny zarys „linii ostrości” płaszczyzny konfokalnej, wynikający z walcowatego kształtu trzonu. B) pow. 200x; niewielka liczba przestrzeni międzybeleczkowych, widoczne duża ilość jamek kostnych oraz duże odległości między przestrzeniami międzybeleczkowymi.

Kształt tych przestrzeni jest również zbliżony do okręgu jak w przypadku grupy 28C, jednakże odległości pomiędzy tymi przestrzeniami są największe spośród wszystkich badanych grup. Kolejną cechą wspólną z grupą 28C jest walcowaty kształt trzonu kości. Widoczne są także mnogie jamki kostne na powierzchni kości. Również w tym przypadku powiększenie 400x ujawniło nieznaczne pofałdowania struktury powierzchni kostnej.

Tabela 5. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 28 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

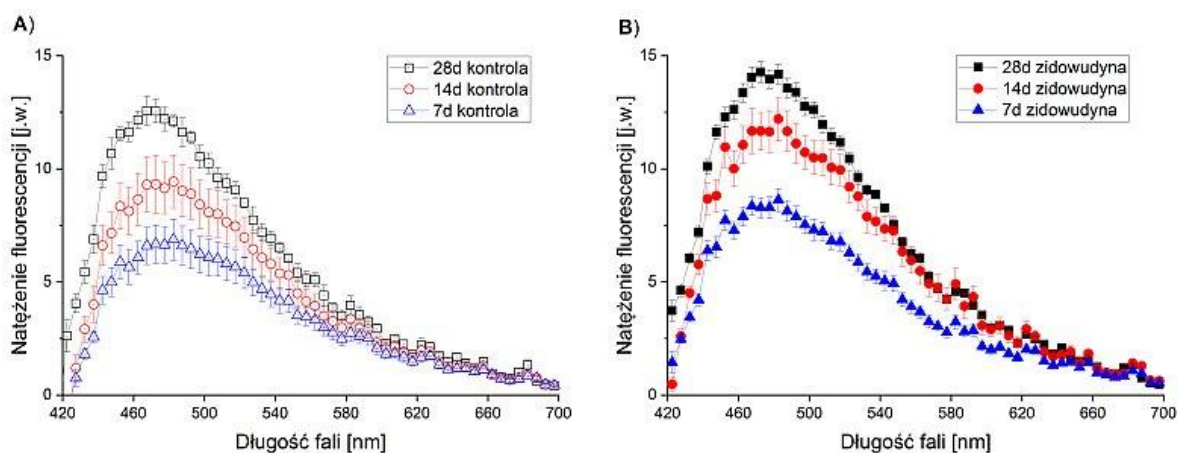
	Kontrola 28C	Zidowudyna 28Z	Wartość p
Liczba przestrzeni międzybeleczkowych	12 ± 3	8 ± 2	0.0319
Liczba jamek kostnych	304 ± 18	452 ± 71	0.0069
Grubość beleczek kostnych [µm]	107.4 ± 50.0	132.9 ± 73.2	0.2001
Grubość macierzy międzyjakmkowej [µm]	10.4 ± 2.0	11.3 ± 3.6	0.2974

Dla kości szczurów grup 28C i 28Z policzono ilość przestrzeni międzybeleczkowych oraz jamek kostnych. Zmierzono również grubość macierzy beleczek oraz grubość macierzy pomiędzy jamkami. Wyniki zestawiono w tabeli 5.

Wyniki analizy obiektów struktury kości (tabela 5) wskazują, że wraz z wiekiem ilość otworów kanałów drastycznie maleje. Ilość przestrzeni międzybeleczkowych w grupy 28Z względem 28C jest mniejsza o 33%. Porównanie ilości tych przestrzeni między grupami wiekowymi tj. dla grup 14C/28C oraz 14Z/28Z wskazało, że wraz z wiekiem liczba tych przestrzeni spada ponad 4-krotnie. Liczba jamek kostnych w grupie 28Z jest prawie o 150% wyższa niż w grupie kontrolnej 28C. Dla porównań 14C/28C oraz 14Z/28Z znaleziono, że wraz z wiekiem liczba jamek kostnych w obu przypadkach rośnie prawie dwukrotnie. Pomiedzy grupami 28Z i 28C nie znaleziono różnic istotnych w wartościach grubości beleczek kostnych ani w grubości macierzy międzyjamkowej. Zaobserwowano natomiast ponad 3-krotny wzrost wartości grubości beleczek kostnych wraz z wiekiem zarówno dla porównań 14C/28C, jak i 14Z/28Z.

7.4. Wyniki pomiarów mikrospektrofluorymetrycznych kości szczurzych.

Pogłębione badania zmian rozwojowych kośćca noworodków szczurzych są możliwe z zastosowaniem pomiarów autofluorescencji pochodzącej z rejonów macierzy kostnej (ilustracja 4A), Zarejestrowane widma emisji wzbudzonej laserem 404 nm zaprezentowano na ilustracji 14.



Ilustracja 14. Uśrednione widma autofluorescencji wzbudzonej laserem 404 nm macierzy kostnej piszczeli szczurów w funkcji wieku dla grupy: A) kontrolnej „C” i B) leczonej prenatalnie zidowudyną „Z”. Ogólny przebieg krzywych jest podobny dla wszystkich badanych grup; maksimum emisji przypada w okolicy 480 nm. Widma nakładają się w czerwonej części zakresu pomiaru. W grupie zidowudyny dostrzegalne są charakterystyczne pasma, kształtem których odróżniają się od grupy kontrolnej. Słupki błędów – odchylenie standardowe.

W przeprowadzonych pomiarach uzyskano ok. 50 widm autofluorescencji dla każdej badanej grupy po oczyszczeniu z wartości odstających. Porównanie zarejestrowanych widm (ilustracja 14) dla poszczególnych grup ujawniło, że kształt widm jest do siebie zbliżony.

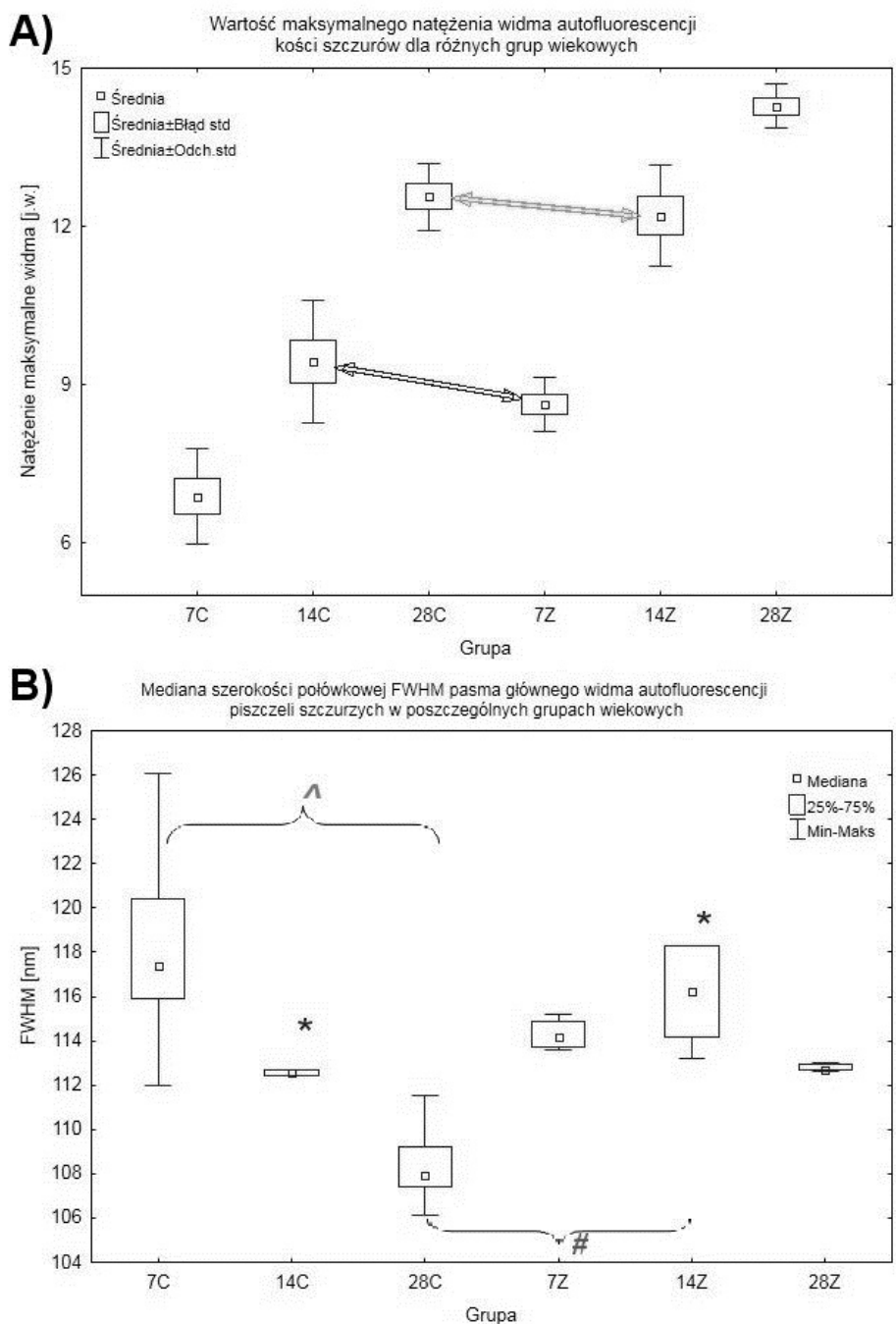
Główny rejon widma (zakres 420 – 580 nm) charakteryzuje się dużą szerokością połówkową. W części wstępującej widma pojawia się szybki wzrost intensywności aż do osiągnięcia maksimum w okolicy 480 nm, natomiast pasmo zstępujące widma rozciąga się od ok. 490 nm i opada aż do 700 nm. Zaobserwowano również niewielkie perturbacje intensywności zaczynające się w okolicy 575 nm i rozciągające do końca zakresu pomiaru widma. Zauważalne są pasma charakterystyczne: 585 – 600 nm, 620 – 635 nm oraz w okolicy 680 nm, w których występuje lokalny wzrost intensywności. Obserwacja ta dotyczy wszystkich analizowanych widm. Ponadto pewne niewielkie perturbacje natężenia emisji występują w paśmie 450 – 460 nm dla grup w wieku 7 i 14 dni, zarówno w grupie zidowudyny, jak i w grupie kontrolnej, lecz nie są one widoczne w grupach 28-dniowych. Wraz z wiekiem zwierzęcia rośnie intensywność widma autofluorescencji kości zarówno w grupie zidowudyny, jak i w grupie kontrolnej. Wzrost wartości maksimum emisji obserwowany w grupie kontrolnej w funkcji wieku ma charakter zbliżony do liniowego (ilustracja 14A), czego nie zaobserwowano w grupie zidowudyny, w której maksimum emisji kości szczurów 14-dniowych wydaje się przyspieszać i szybciej osiągać wartość maksimum dla szczurów 28Z (ilustracja 14B). W tabeli 6 zaprezentowano położenie maksimum natężenia emisji λ_{em} , średnie natężenie maksymalne I_{max} oraz szerokość połówkową FWHM.

Tabela 6. Charakterystyka uzyskanych widm dla badanych grup: położenie maksimum λ_{em} wraz niepewnością odczytu [nm], średnia wartość maksymalnego natężenia I_{max} wraz z odchyleniem standardowym, mediana szerokości połówkowej pasma głównego FWHM wraz z kwartylem dolnym i górnym [nm]. Oznaczenia: C – grupa kontrolna, Z – grupa zidowudyny.

<i>Grupa</i>	<i>Położenie maksimum</i> λ_{em} [nm]	<i>Maksymalne natężenie</i> I_{max}	<i>Szerokość połówkowa</i> FWHM [nm]
7C	482.5 ± 2.5	6.87 ± 0.91	117.4 (115.9; 120.4)
14C	482.5 ± 2.5	9.43 ± 1.17	112.6 (112.5; 112.7)
28C	467.5 ± 2.5	12.56 ± 0.63	107.9 (107.4; 109.2)
7Z	482.5 ± 2.5	8.63 ± 0.51	114.2 (113.7; 114.9)
14Z	482.5 ± 2.5	12.20 ± 0.96	116.2 (114.2; 118.3)
28Z	472.5 ± 2.5	14.28 ± 0.46	112.7 (112.7; 112.9)

Położenie maksimum λ_{em} dla każdej z grup 7- i 14-dniowej jest identyczne i wynosi 482.5 nm w odróżnieniu od grup najstarszych, w których zauważono pewne przesunięcie maksimum w kierunku krótszych długości fali widma o 15 i 10 nm odpowiednio dla grup 28C i 28Z.

Przeprowadzona analiza wariancji maksymalnego natężenia emisji pomiędzy poszczególnymi grupami wykazała występowanie par różniących się między sobą w sposób istotny ($p < 0.001$). Za pomocą testu post-hoc znaleziono 2 grupy homogenne nie różniące się od siebie w sposób istotny statystycznie (tabela 6). Dotyczy to grup 14C i 7Z (ok. 8,5% różnicy względem 14C) oraz 14Z i 28C (niecałe 3% różnicy względem 28C). Dla pozostałych grup test post-hoc wykazał występowanie różnic istotnych statystycznie pomiędzy każdą porównywaną parą (ilustracja 15A).



Ilustracja 15. A) Średnia wartość maksymalnego natężenia autofluorescencji I_{max} macierzy kostnej szczurów dla wszystkich badanych grup wiekowych. Dwustronnymi strzałkami zaznaczono pary nie wykazujące różnic istotnych statystycznie (test post-hoc, $p=0.05$). B) Mediana szerokości połówkowej FWHM pasma głównego widma autofluorescencji macierzy kostnej szczurów. Nieparametryczny test istotności Kruskala-Wallis ($p=0.05$) wykazał obecność różnic istotnych pomiędzy: parą 14C i 14Z (oznaczonych *), grupami 7C, 14C, 28C (oznaczone ^) oraz grupami 28C, 7Z, 14Z (oznaczone #).

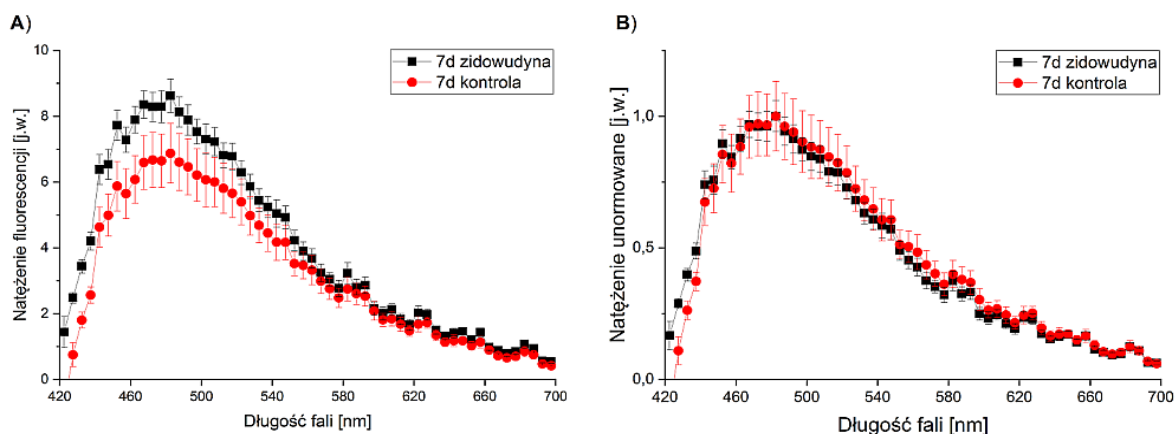
Wyniki pomiaru szerokości połówkowej widm FWHM dla większości badanych grup nie miały rozkładu zbliżonego do rozkładu normalnego. Dlatego też wyznaczona mediana FWHM wykazała, że dla grupy kontrolnej wraz z wiekiem zwierząt dochodzi do stopniowego zwężania się pasma głównego autofluorescencji. Test istotności wykazał, że szerokość połówkowa grupy 7C różni się istotnie zarówno od grupy 14C ($p=0.0193$), jak i od grupy 28C ($p=0.0003$). Nie zaobserwowano różnic istotnych w FWHM pomiędzy grupami 14C i 28C.

Natomiast w grupie zidowudyny zaobserwowano odmienne zachowanie się tego parametru zależnie od wieku – dla grupy zwierząt 14-dniowych dochodzi do wzrostu wartości FWHM względem pozostałych grup wiekowych. Pomiędzy grupami 7Z, 14Z oraz 28Z nie wykryto różnic istotnych statystycznie (ilustracja 15B). Ponadto dla FWHM różnice istotne statystycznie znaleziono pomiędzy parami: 14C i 14Z ($p=0,0164$), 28C i 7Z ($p=0,0087$), 28C i 14Z ($p=0,0002$).

W dalszej części pracy porównano różnice kształtu sygnału autofluorescencji grupy zidowudyny z grupą kontrolną osobno dla wszystkich grup wiekowych uzyskane dla widm unormowanych do maksimum natężenia emisji.

7.4.1. Autofluorescencja kości szczurów w wieku 7 dni

W grupie szczurów 7-dniowych zestawiono ze sobą widma charakterystyczne autofluorescencji oraz w celu uwydatnienia szczegółowych różnic wykonano normalizację tychże sygnałów do ich maksimum. Wyniki porównania widm przedstawiono na ilustracji 16.



Ilustracja 16. Porównanie widm autofluorescencji powierzchni kości szczurów 7-dniowych pomiędzy grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczny wzrost intensywności pasma głównego w grupie zidowudyny oraz nakładanie się pasm w zakresie 570 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji. Widoczne pewne różnice kształtu w części wstępującej widma oraz w kilku wąskich pasmach w części zstępującej.

Jak wynika z ilustracji 16 emisja powierzchni piszczeli szczurów 7-dniowych przede wszystkim różni się intensywnością w zakresie 420 – 580 nm (ilustracja 16A). Maksimum natężenia autofluorescencji kości szczurów 7Z w stosunku do 7C jest większe o prawie 26%, dając różnicę istotną statystycznie. Porównanie tych samych widm po wykonaniu normalizacji do maksimum (ilustracja 16B) wskazuje na obecność kilku wąskich pasm, w których uzyskane sygnały się różnią. Wyniki analiz podsumowano w tabeli 7.

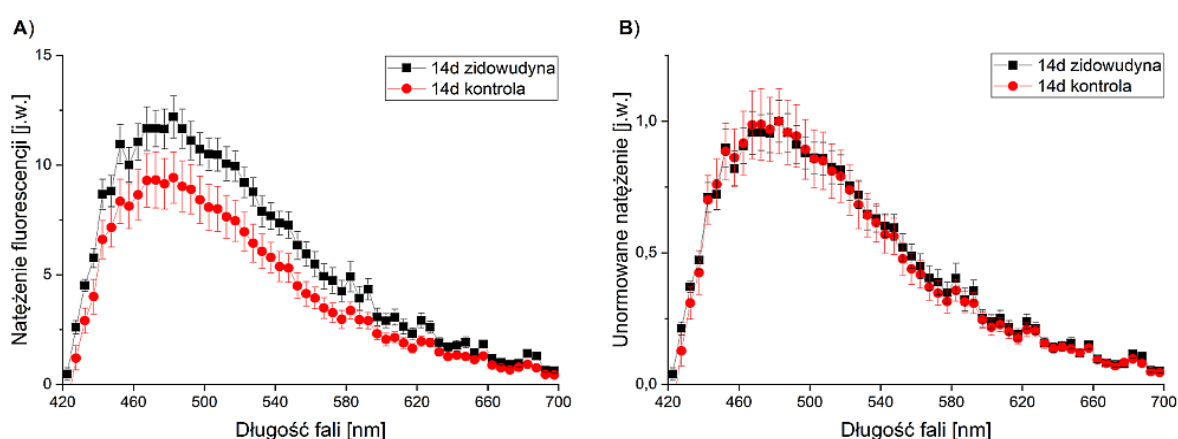
Tabela 7. Średnia wartość całki pod krzywą dla wyznaczonych zakresów widma unormowanego do maksimum dla badanych grup kości szczurów w wieku 7 dni. Niepewność wyniku stanowi odchylenie standardowe. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Rejon widma	Pole powierzchni pod krzywą		Wartość p
	7C	7Z	
420 - 450	2.28 ± 0.14	2.84 ± 0.16	<0.0000
500 - 540	7.78 ± 0.09	7.37 ± 0.13	<0.0000
555 - 580	2.19 ± 0.10	1.93 ± 0.09	0.0002
585 - 605	1.72 ± 0.07	1.51 ± 0.08	0.0002

Uzyskane wyniki obliczeń pola powierzchni pod wskazaną krzywą (tabela 7) wykazały, że w wytyczonych zakresach widma grupa 7Z różni się od 7C w sposób istotny. Pierwszą charakterystyczną różnicą jest pasmo 420 – 450 nm, w którym całka intensywności w grupie zidowudyny uzyskuje prawie 25% przyrostu, dając różnicę istotną statystycznie ($p < 0.0000$). Kolejnym pasmem, dla którego zauważono różnice to zakres 500 – 540 nm, w którym intensywność widma 7Z spada względem kontroli w sposób istotny statystycznie ($p < 0.0000$), pomimo tego, że różnica średniej wartości powierzchni między grupami wynosi nieco ponad 5%. W paśmie 555 – 580 nm sumaryczna intensywność 7Z jest mniejsza o ok. 12% niż w 7C, stanowiąc różnicę istotną statystycznie ($p = 0.0002$). Podobna sytuacja dotyczy pasma 585 – 605 nm, dla którego różnica intensywności 7Z względem 7C sięga prawie 12% (istotne statystycznie, $p = 0.0002$).

7.4.2. Autofluorescencja kości szczurów w wieku 14 dni

Porównania widm kości szczurów 14-dniowych przedstawiono na ilustracji 17.



Ilustracja 17. Porównanie widm autofluorescencji powierzchni kości szczurów 14-dniowych pomiędzy grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczna większa różnica intensywności pomiędzy grupami oraz nieznaczne nakładanie się pasm w zakresie 630 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji. Widoczne niewielkie różnice w kształcie widma.

Porównanie widm kości szczurów w wieku 14 dni wykazało, że grupa 14Z charakteryzuje się 1,3-krotnie większą intensywnością emisji niż grupa 14C (ilustracja 15A). Widma zaczynają się nakładać dopiero w okolicy 630 nm.

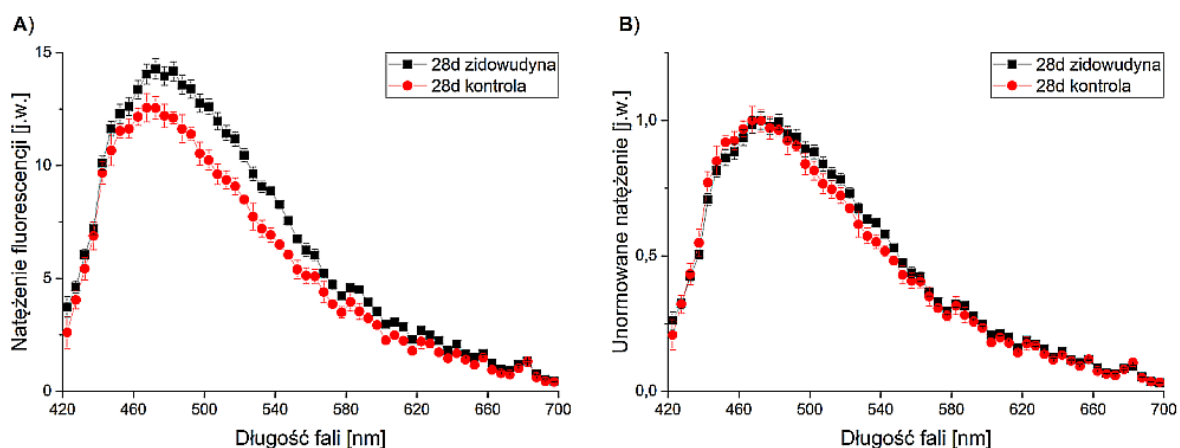
Tabela 8. Porównanie średnich wartości całek pod krzywą oraz intensywności pojedynczych punktów dla wyznaczonych zakresów widma unormowanego do maksimum dla badanych grup kości szczurów w wieku 14 dni. Niepewność wyniku stanowi odchylenie standardowe. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Rejon widma	Pole powierzchni pod krzywą / Intensywność		Wartość p
	14C	14Z	
420 - 435	0.99 ± 0.01	1.09 ± 0.04	<0.0000
455	0,86 ± 0.01	0.82 ± 0.01	<0.0000
540 - 560	2.47 ± 0.01	2.66 ± 0.15	0.0030
590	0.31 ± 0.01	0.36 ± 0.04	0.0050

Analiza wykresów z ilustracji 17B wykazała istnienie dwóch zakresów widma różniących się kształtem, jak również trzech punktów wykazujących widoczne różnice intensywności. Wyniki tej analizy zawarto w tabeli 8 (strona 43). Obliczenia całki pod krzywymi fluorescencji dla grup szczurów 14-dniowych wykazały, że w zakresie 420 – 435 nm grupa 14Z wzrost intensywności o ponad 10% względem 14C i jest to różnica istotna statystycznie ($p < 0.0000$). Podobnie jest w przypadku zakresu 540 – 560 nm, dla którego intensywność grupy zidowudyny względem kontroli jest większa o prawie 8% ($p = 0,003$). Na ilustracji 17B widoczny jest spadek natężenia emisji dla punktu o długości fali równej 455 nm. W tym przypadku różnica pomiędzy grupami kontrolną a zidowudyny wynosi 5% i jest istotna statystycznie ($p < 0,0000$). Dla położenia 590 nm grupa zidowudyny wykazuje wzrost intensywności o 15,5% ($p = 0,005$).

7.4.3. Autofluorescencja kości szczurów w wieku 28 dni

Przebieg analizy sygnału autofluorescencji rejestrowanej z powierzchni piszczeli szczurów w wieku 28 dni był identyczny jak w przypadku grup młodszych. Wyniki porównania grupy zidowudyny z grupą kontrolną prezentuje ilustracja 18.



Ilustracja 18. Porównanie widm emisji z powierzchni kości szczurów 28-dniowych między grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczne przesunięcie maksimum pomiędzy grupami; różnica intensywności nie obejmuje całego pasma głównego; nakładanie się widm występuje w początkowej części wstępującej oraz w zakresie czerwieni, 630 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji.

Widma autofluorescencji charakterystyczne (wykres 18A) dla grupy szczurów w wieku 28 dni wskazują, że grupę 28Z cechuje wyższa o ok. 14% intensywność maksimum emisji niż grupę 28C. Unormowanie widm do maksimum wskazuje na dwa zakresy widma, w których znaleziono różnice. Pierwszym zakresem jest pasmo 440 – 460 nm, dla którego cała intensywność dla grupy 28Z jest o prawie 5% mniejsza niż w przypadku kontroli, stanowiąc różnicę istotną statystycznie ($p < 0,0000$). Drugi zakres, 490 – 560 nm, ukazuje istotny statystycznie, 10% wzrost intensywności w grupie 28Z względem 28C ($p < 0,0000$). Podsumowanie wyników analizy pola powierzchni pod krzywą dla grupy 28-dniowych szczurów zawarto w tabeli 9.

Tabela 9. Zestawienie średnich wartości całki pod krzywą wskazanych zakresów widma unormowanego dla badanych grup kości szczurów w wieku 28 dni. Odchylenie standardowe stanowi podaną niepewność wyniku. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Rejon widma	Pole powierzchni pod krzywą		Wartość <i>p</i>
	28C	28Z	
440 - 460	3.97 ± 0.04	3.77 ± 0.01	<0.0000
490 - 560	8.95 ± 0.12	9.82 ± 0.05	<0.0000

Przeprowadzona dotychczas analiza wykazała występowanie różnic w przebiegu widma autofluorescencji tkanki kostnej pomiędzy szczurami, których matkom podano w ciąży lek antyretrowirusowy a szczurami zdrowymi dla identycznych grup wiekowych. W dalszej części rozdziału przedstawiono uzyskane wyniki oceny szybkości rozwoju kośćca zależnego od wieku zwierząt.

7.4.4. Spektroskopowa ocena szybkości rozwoju tkanki

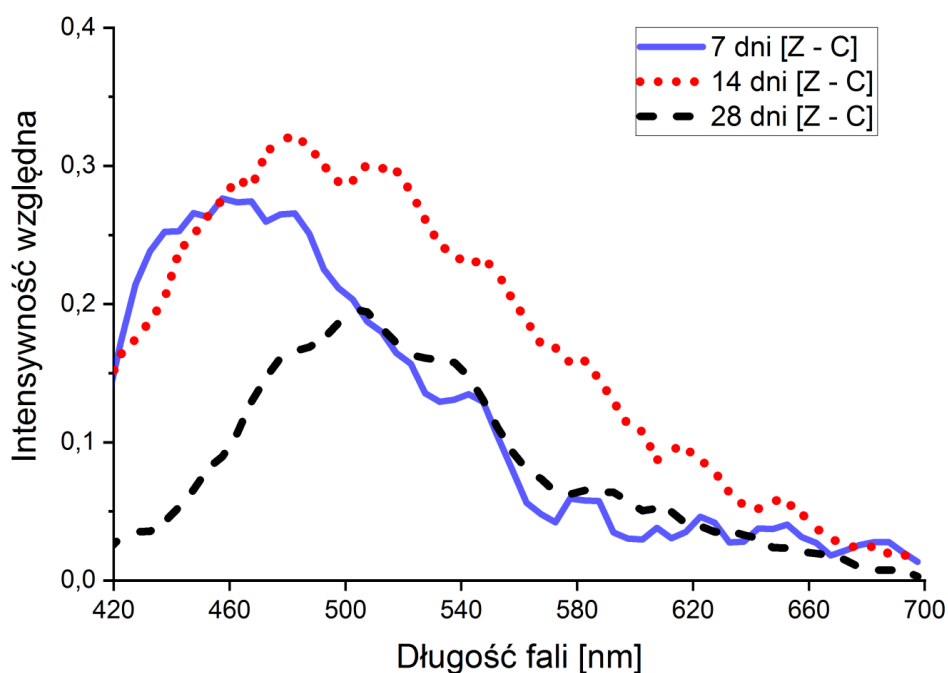
Szybkość rozwoju kości u badanych szczurów można również ocenić za pomocą algebraicznej różnicy intensywności sygnału pomiędzy następującymi po sobie grupami wiekowymi. Wyniki tych obliczeń zawarto w tabeli 10.

Tabela 10. Algebraiczne różnice maksymalnego natężenia autofluorescencji Δ_{int} pomiędzy badanymi grupami wiekowymi (d – dni życia).

Grupa	Różnica natężenia autofluorescencji pomiędzy poszczególnymi grupami wiekowymi Δ_{int}		
	14d – 7d	28d – 14d	28d – 7d
Kontrola	2.56	3.13	5.69
Zidowudyna	3.57	2.08	5.65

Obliczenie takiego współczynnika Δ_{int} ujawniło, że prenatalne podanie leku antyretrowirusowego spowodowało większy o ok. 40% przyrost natężenia fluorescencji w pierwszych dwóch tygodniach życia noworodków szczurzych w porównaniu z przyrostem natężenia emisji obserwowanym w grupie kontrolnej w identycznym okresie życia (14d – 7d). Natomiast wynik obliczeń współczynnika tempa rozwoju kośćca od drugiego do czwartego tygodnia życia zwierząt wskazał występowanie innego efektu. Różnica natężenia fluorescencji osteoidu w grupie zidowudyny między 28 a 14 dniem życia jest o ok. 35% mniejsza od zaobserwowanej różnicy intensywności fluorescencji w grupie kontrolnej w tym samym okresie życia szczurów. Rozstęp intensywności zależny od wieku pomiędzy najstarszymi a najmłodszymi osobnikami (28 dni – 7 dni) jest zbliżony w obu grupach.

Potraktowanie grupy kontrolnej jako referencji do oceny szybkości wzrostu umożliwia uzyskanie dodatkowego narzędzia analitycznego, pozwalającego dokładniej określić nadmiarowy sygnał fluorescencji obserwowany w widmach grupy zwierząt leczonych zidowudyną. Unormowanie widm z danej grupy wiekowej do widma grupy kontrolnej, a następnie odjęcie go od widma grupy zidowudyny wykazało, że grupa kości szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną w wieku 14 dni wyróżnia się na tle innych, co przedstawia ilustracja 19.



Ilustracja 19. Unormowane do kontroli widmo różnicowe autofluorescencji dla poszczególnych grup wiekowych (Z – grupa zidowudyny, C – grupa kontrolna). Widmo emisji kości grupy 14-dniowych wykazuje nadmiarową intensywność. Maksima pozostałych widm są przesunięte względem niego: 7-dniowe w stronę fal krótszych, 28-dniowe w stronę fal dłuższych.

Z wykresu na ilustracji 19 wynika, że widmo różnicowe grupy szczurów w wieku 14 dni charakteryzuje się największą intensywnością w porównaniu z innymi grupami wiekowymi (natężenie względne dla grupy 14-dniowej wynosi 0.32 ± 0.07 ; maksimum w 482.5 nm) oraz szerokim sygnałem (FWHM = 154 ± 14 nm). Kształt tej linii jest nieregularny z lokalnymi maksimumami w okolicy 460, 510, 550, 580, 610 i 650 nm. W grupie szczurów 7-dniowych uzyskana intensywność względna wykazuje przesunięcie swojego maksimum o 25 nm w stronę fal krótszych względem grupy 14-dniowej. Sygnał emisji jest węższy od grupy 14-dniowej (FWHM = 108 ± 9 nm), z maksimum w okolicach 460 nm (intensywność wynosi 0.28 ± 0.11). Sąsiadują z nim dwa inne maksimuma lokalne, nieznacznie słabsze, w okolicy 440 i 480 nm. Ponadto w widmie różnicowym tej grupy można dostrzec kolejne, charakterystyczne maksimum lokalne w okolicy 545 nm oraz rejon wzmocnienia sygnału w okolicy 580 nm. Najmniejszym sygnałem nadmiarowym cechuje się grupa kości szczurów w wieku 28 dni (FWHM = 96 ± 8 nm). Maksimum natężenia względnego jest nieznacznie przesunięte w stronę czerwieni (502 nm, intensywność względna 0.20 ± 0.09) względem grupy szczurów 14-dniowych, a natężenie jest najmniejsze spośród wszystkich badanych grup. Symetrycznie po obu stronach tego maksimum pojawiają się obszary wzmocnienia sygnału w okolicy 480 oraz 540 nm, o zbliżonej do siebie intensywności i stromych zboczach. Brak jednoznacznych sygnałów wskazujących na obecność innych maksimumów lokalnych.

Opisane w tej części wyniki spektrofluorymetrii kości szczurzych zostały częściowo opublikowane w czasopiśmie *Journal of Fluorescence* [91].

7.5. Dyskusja wyników badań wpływu prenatalnej terapii antyretrowirusowej na rozwój kości

W niniejszym rozdziale przedstawione zostały wyniki badań z zastosowaniem metody CLSM nad przebiegiem rozwoju macierzy kostnej (osteoidu) noworodków szczurzych pod wpływem terapii lekiem antyretrowirusowym w okresie prenatalnym. Metoda ta umożliwiła obserwowanie zachodzących przemian w dojrzewającej tkance na poziomie mikroskopowym. Wykazano, że piszczele – jako kość długa – ulegają intensywnym przemianom: od delikatnej gąbczastej sieci włókien kolagenowych u szczurów w wieku 7 dni (ilustracja 8 i 9), poprzez stadium przejściowe w wieku 14 dni (ilustracja 10 i 11), aż do zwartej, masywnej i stabilnej struktury kostnej w grupie szczurów 28-dniowych (ilustracja 12 i 13). W obu grupach widoczny jest wyraźny podział na te 3 etapy rozwojowe, dowodząc faktu, że kość stale się rozwija aż do momentu osiągnięcia dojrzałości, niezależnie od zastosowania prenatalnej terapii antyretrowirusowej.

Uzyskane obrazy trzonów piszczeli szczurów w wieku 7 dni jednoznacznie wskazują na intensywne dojrzewanie kości długich z rozwiniętą siecią beleczek kostnych, zapewniającą stabilność i możliwość dalszej rozbudowy tkanki kostnej. Gąbczasta struktura trzonu dowodzi wcześniejszego penetrowania tego rejonu kości przez dużą liczbę naczyń krwionośnych jeszcze w okresie płodowym [12]. Można podejrzewać, że tuż przed urodzeniem dochodzi do nasilenia procesu osteoresorpcji od wewnątrz kości, mającej na celu powiększenie jamy szpikowej w późniejszym okresie życia. Zarejestrowane obrazy konfokalne (ilustracja 8 i 9) uwidaczniają różnej grubości beleczki kostne, na których powierzchni odkładają się coraz to nowe warstwy tkanki kostnej pierwotnej, powoli otaczając obecne w przestrzeniach międzybeleczkowych naczynia krwionośne oraz osteoblasty. Następnie dochodzi do odkładania coraz to nowych warstw tzw. blaszek podstawowych, które zapewniają masywność oraz zwartość struktury kości, obserwowane u zwierząt w wieku 14 dni (ilustracja 10 i 11). Dochodzi wówczas do intensyfikacji procesu wymiany masy kostnej (tj. modelowania kości), ponieważ proces ten ma za zadanie tak przystosować strukturę kości, żeby stała się odporna na działanie siły grawitacji oraz obciążenia działające na kość wynikające z poruszania się ciała zwierzęcia – ok. 14 dnia życia młode szczury otwierają oczy i zaczynają coraz intensywniej się poruszać [92]. Obserwowany rozwój macierzy kostnej do 28 dnia życia zwierząt potwierdza, że od momentu rozpoczęcia proces ten trwa już całe życie, ponieważ reguluje odpowiedź tkanki kostnej na występujące w życiu bodźce zewnętrzne. Oddziaływania biomechaniczne na kości szczura powodują intensywniejszy rozrost kości tam, gdzie pojawiają się większe siły nacisku na kość [13, 17].

Obudowanie trzonu coraz grubszą warstwą złożoną z osteonów i blaszek zewnętrznych sprawia, że powierzchnia kości staje się coraz bardziej jednorodna, co widać na obrazach kości szczurów 28-dniowych. Zwierzęta te uzyskują dojrzałość płciową dopiero w wieku 3-4 miesięcy [92], co wskazuje, że wzrost oraz dojrzewanie kości szczurów w wieku 28 dni nadal jest intensywne, zwłaszcza w rejonie pomiędzy trzonem a końcami kości. Analiza zdjęć wykazała, że wzrost kości w grupie szczurów zdrowych jest zgodny z ogólnie znanym mechanizmem rozwoju kości długich. W odróżnieniu od prawidłowego procesu

dojrzewania, w grupie zwierząt leczonych prenatalnie wzrost kości piszczelowej jest znacząco przyspieszony (Tabele 3 – 5). Dowiodły tego również wyniki analizy strukturalnej obrazów kości: grupa leczona prenatalnie charakteryzuje się znacznie większą w porównaniu do kontroli ilością jamek kostnych, większą grubością macierzy oraz większymi odległościami pomiędzy jamkami. Obecność większej liczby jamek, w których zlokalizowane były komórki kostne, świadczy o przyspieszonym procesie kościotworzenia. Na podstawie przeprowadzonych obserwacji mikroskopowych kości stwierdzono, że podawanie zidowudyny matkom w ciąży nienaturalnie przyspiesza osyfikację u ich potomstwa.

Liczba przestrzeni międzybeleczkowych obserwowanych w rejonie macierzy kostnej jest zmienna na przestrzeni pierwszych tygodni życia szczurów. Dla grupy kontrolnej w pierwszych dwóch tygodniach (7C ÷ 14C) życia następuje ponad 1,5-krotny wzrost ich liczebności, a następnie w wieku 28 dni liczba ta spada ponad 2-krotnie względem osobników najmłodszych 7C (tabela 3). Jest to wynik procesu modelowania strukturalnego, podczas którego naczynia krwionośne głęboko penetrujące trzon zostają obudowywane przez macierz kostną, tworząc osteony. Kość przyrasta na grubość, jednocześnie usuwając głębsze warstwy kości (gąbczastej). Powstaje wówczas większa liczba osteonów, w środku których umiejscowione są naczynia krwionośne. Powierzchnia kości wyrównuje się, ponieważ odkładają się coraz to nowe warstwy blaszek zewnętrznych. Aby lepiej poznać szczegóły tego procesu na wczesnym etapie życia należałoby zastosować dodatkowe metody badawcze, np. badanie przekrojów poprzecznych kości, uzyskanych za pomocą mikrotomu [15, 93]. Z kolei w grupie zidowudyny liczebność przestrzeni międzybeleczkowych maleje wraz z wiekiem. Największa liczba tych przestrzeni została zaobserwowana w grupie najmłodszej 7Z, co implikuje, że modelowanie strukturalne tkanki kostnej nasila się w tej grupie wcześniej, czyli w pierwszym tygodniu życia zwierząt, a intensywność tego procesu maleje wraz z wiekiem. Wymagałoby to przeprowadzenia podobnych badań dla noworodków zaraz po urodzeniu. Ponadto wydaje się interesujące monitorowanie stanu kości długich w krótszych niż tygodniowe odstępach długości życia zwierząt, jak również na przestrzeni całego życia szczurów. Wykorzystanie innych metod badawczych, np. obrazowanie mikrotomografem komputerowym pomogłoby ukazać procesy dojrzewania kości od strony jamy szpikowej oraz wykazać, czy efekty terapii prenatalnej z czasem zanikają lub pozostają trwałe [85].

Przeprowadzona analiza zarejestrowanych widm autofluorescencji (ilustracja 14) dowodzi, że wraz z wiekiem zwierzęcia rośnie natężenie autofluorescencji I_{\max} tkanki w obu badanych grupach, lecz w grupie zidowudyny omawiany wzrost natężenia jest szybszy niż w grupie kontrolnej. Biorąc pod uwagę fakt, że intensywność fluorescencji jest miarą stężenia danego fluoroforu [94, 95] oraz że głównym składnikiem organicznym tkanki kostnej jest kolagen typu I (ok. 85% macierzy kostnej) [18] nasuwa się wniosek, że właśnie ten rodzaj białka w głównej mierze przyczynia się do obserwowanej intensywności widma. Stanowi to dowód, że macierz kostna rozrasta się wraz z wiekiem, a zarazem rośnie ilość masy kolagenu [5]. Fakt ten został potwierdzony obrazowaniem konfokalnym.

Co więcej, badania prowadzone w ostatnich dziesięcioleciach dowiodły, że poza kolagenem w tkankach obecne są inne fluorofory endogenne, również dające silny wkład w mierzony sygnał autofluorescencji [78]. Jedną z takich substancji jest NAD(P)H, który pełni ważną rolę w oddychaniu komórkowym [96]. Wyniki obrazowania przedstawione w niniejszym rozdziale wykazały, że wraz z wiekiem rośnie liczba osteocytów umiejscowionych w rejonie osteoidu. Jednocześnie obserwuje się wzrost intensywności autofluorescencji z rejonu macierzy kostnej. Jednakże w oparciu o uzyskane dane trudno jest jednoznacznie wskazać w zarejestrowanych widmach wkład osobnych sygnałów pochodzących od kolagenu oraz NAD(P)H, ponieważ ich emisje się nakładają. Co więcej, trudność tego rodzaju zależy też od stanu chemicznego NAD(P)H, jak również stosunku $\text{NAD(P)H}_{\text{związany}}/\text{NAD(P)H}_{\text{wolny}}$, który obserwuje się jako zmiany w kształcie linii spektralnej [78]. Ponadto, za kościotworzenie odpowiadają osteoblasty. Ich obecność w tkance w młodym wieku również daje pewien wkład w obserwowany kształt widma ze względu na mnogość procesów biochemicznych, za jakie odpowiadają [12, 15]. Z czysto spektroskopowego punktu widzenia nie bez znaczenia pozostają również skomplikowane wzajemne interakcje tych fluoroforów z otoczeniem, co może powodować, że wkłady emisji nie mają charakteru addytywnego. Oprócz wspomnianego wcześniej kolagenu i NAD(P)H, macierz kostna zawiera również białka niekolagenowe (10-15% całej masy białkowej kości), które znacząco wpływają na procesy metaboliczne w kościach oraz samą aktywność komórek kostnych [13]. Jednym z najważniejszych białek niekolagenowych w kości jest osteonektyna, odpowiedzialna za rozbudowę osteoidu [15, 18, 97]. Z kolei inne białka niekolagenowe biorące udział w procesie mineralizacji macierzy kostnej, wpływają na rozmiar oraz ilość tworzonego na włóknach kolagenowych hydroksyapatytu. Do tej grupy białek należą m.in.: osteokalcyna, osteopontyna, fosfataza alkaliczna oraz sjaloproteina kostna. Wynika z tego, że w badaniach spektroskopowych rozwoju kości należy uwzględnić wiele procesów tkankowych.

Jak dowiedziono w niniejszej pracy, terapie lekowe ciężarnych wpływają na rozwój kości u płodów, w szczególności na aktywność białek niekolagenowych oraz koenzymów, takich jak wspomniany NAD(P)H. Zastosowana w niniejszych badaniach zidowudyna jest analogiem koenzymowym, co powoduje jej konkurowanie z naturalnymi metabolitami o miejsce aktywne w istotnych enzymach tkankowych, co z kolei może zaburzać lub nawet całkowicie blokować ich działanie [98]. Niniejsze badania wpływu prenatalnej aplikacji zidowudyny ujawniły, że emisja sygnału fluorescencji osteoidu rośnie szybciej niż w przypadku braku takiej terapii. Ponadto, kształty krzywych emisji pomiędzy grupą poddaną ART a kontrolną są do siebie zbliżone, co utrudnia analizę wyników. Unormowanie widm do ich indywidualnego maksimum wykazało różnice istotne dla nielicznych wąskich pasm pomiędzy badanymi grupami (tabele 8 – 9), co najwyraźniej świadczy o wahaniach ilości poszczególnych fluoroforów zależnie od wieku oraz ich wzajemnej interakcji, których mechanizmy wciąż nie są w pełni poznane. Porównanie wzrostu maksymalnej emisji sugeruje, że w drugim tygodniu życia szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną dochodzi do wzmocnienia syntezy białek, wzrostu aktywności koenzymów i może prowadzić do przedwczesnego procesu modelowania przestrzennego. Pogłębiona analiza w oparciu o unormowane widma różnicowe (ilustracja 19) ukazała zależny od wieku nadmiarowy

przyrost emisji z wyraźnymi przesunięciami maksimum widma w stronę fal krótkich dla najmłodszych szczurów oraz z przesunięciem w stronę fal długich dla grupy najstarszych badanych zwierząt. Takie zachowanie spektralne spowodowane jest różnym stopniem dojrzałości włókien kolagenowych, wynikającym z zaburzeń białkowych czynników wzrostu, wspomnianą wcześniej konkurencją o miejsce aktywne w enzymach, współoddziaływaniem koenzymów między sobą oraz z otoczeniem, w którym się znajdują [78]. Dyskusja ta została podjęta w opublikowanej pracy [91].

Zbyt intensywny, nieadekwatny do wieku, wzrost masy kolagenowej jest wynikiem tworzenia zwiększonej ilości kolagenowych wiązań poprzecznych podczas rozwoju kości. Wytwarzanie w tkance wiązań poprzecznych kolagenu obejmuje dwa różne procesy: enzymatyczne sieciowanie kolagenu podczas normalnego wzrostu i dojrzewania organizmu oraz nieenzymatyczne, uboczne dojrzewanie tkanki, co zaprezentował zespół Baileya [99]. Podejrzewa się, że głównym czynnikiem odpowiedzialnym za zaburzenia rozwoju kolagenu są zaawansowane produkty końcowe glikacji (ang. AGE – advanced glycation end products), które pojawiają się między innymi w chorobach wieńcowych [100] oraz chorobach metabolicznych, jak np. cukrzyca [101]. Na podstawie analizy wyników opisanych w tej pracy badań można podejrzewać, że to właśnie obecność AGE odpowiada za przesunięcie w stronę fal krótkich widma autofluorescencji kości szczurów w wieku 7 dni (ilustracja 19). Biorąc pod uwagę maksimum emisji AGE przypadające na zakres 440-450 nm można wnioskować, że dają one znaczący wkład w unormowane widmo różnicowe najmłodszych szczurów. Dodatkowo ten stan rzeczy potwierdza obserwacja występujących różnic we wszystkich grupach w zakresie widma 420 – 460 nm.

Innym aktywnym fluoroforem mającym wpływ na uzyskane widmo jest lipofuscyna lub lipopigmenty lipofuscynopodobne [78]. Emisja tych substancji przypada na dość szeroki zakres (480 – 700 nm), pokrywający się również z sygnałami innych składników biochemicznych. W uzyskanych w tej pracy wynikach obecność lipofuscyn może dawać wkład w widmo różnicowe grupy szczurów 14-dniowych, pokrywając pasmo żółto-czerwone. Porównania kształtów widm wskazują, że w tym zakresie istnieją pewne różnice statystyczne pomiędzy grupą zidowudyny a kontrolną. Na uwagę zasługuje fakt, że akumulacja lipofuscyny cechuje starzejący się nabłonek pigmentowy siatkówki [102]. Substancje te mogą zostać wykorzystane jako wskaźniki stresu oksydacyjnego, np. podczas silnych zatruc metalami ciężkimi [103].

We wspomnianym zakresie widma emitują również lipidy. Nawet niewielka ilość lipidów może dawać duży wkład do widm autofluorescencji, osiągając swoje maksimum w okolicach 470-480 nm [78]. Ponadto, wbrew powszechnej opinii, że lipidy to składnik tylko szpiku kostnego, zmineralizowana kość także zawiera związki lipidowe, które odgrywają istotną rolę w fizjologii kośćca, zwłaszcza u młodych osobników [15]. Substancje te wpływają na przeżywalność komórek kostnych, jak również są istotnymi składnikami szlaków sygnałowych, których zaburzenia mogą prowadzić do chorób metabolicznych, m.in. osteoporozy [104]. W niniejszych badaniach niemożliwe jest jednoznaczne stwierdzenie charakteru zmian dla związków lipidowych, ponieważ ich sygnał

emisji pokrywa się z fluorescencją innych składników, tym bardziej, że w okolicach 480 nm występuje maksimum emisji sygnału z macierzy kostnej zwierząt 7- i 14-dniowych. Przesunięcie maksimum w stronę barwy niebieskiej widma dla najstarszych osobników może wynikać ze stopniowego zanikania różnic, co potwierdza znalezienie tylko dwóch zakresów widma różniących się między sobą w sposób istotny (tabela 10). Taki wynik porównań wskazuje, że zanikają różnice w stężeniu lipidów pomiędzy badanymi grupami.

W uzyskanym widmie różnicowym (ilustracja 19) zaobserwowano więcej dodatkowych sygnałów, które mogą pochodzić od innych fluoroforów obecnych w kości lub być wynikiem omawianego już współdziałania substancji ze środowiskiem, w jakim się znajdują. Aby to określić, wymagane jest poszerzenie badań o inne metody analityczne, co przekracza ramy niniejszej pracy. W tym miejscu podkreślić należy, że wszystkie zaburzenia obserwowane w pierwszych dwóch tygodniach życia szczurów po około miesiącu życia stopniowo osiągają stan równowagi i najprawdopodobniej dominuje już tylko enzymatyczne tworzenie wiązań poprzecznych kolagenu, a metabolizm kości przechodzi ze stanu patologicznego do stanu fizjologicznego, przy czym wymagałoby to dalszych pogłębionych badań.

8. Wyniki oceny biozgodności wybranych chrząstek ludzkich dla potrzeb autotransplantacji otolaryngologicznej.

W pierwszej części rozdziału scharakteryzowano tkanki pod względem morfologicznym. Dalszą część zajmuje charakterystyka spektrofluorymetryczna tychże obiektów. W ostatniej części rozdziału zostały przedyskutowane uzyskane wyniki.

8.1. Obrazowanie konfokalne chrząstki ludzkiej

Zarejestrowane obrazy konfokalne (200x i 400x) chrząstek przedstawiają prawidłową morfologię tej tkanki. Przykładowe obrazy badanych typów chrząstek zaprezentowano na ilustracji 20.

W niektórych próbkach chrząstki widoczna była pozostałość ochrzęstnej, której obecność nie wpływała na jakość obrazów ani pomiarów spektroskopowych. Pojedyncze preparaty wykazywały nieznaczne zawinięcia się fragmentów tkanki na siebie oraz szczeliny powstałe wskutek uszkodzeń mechanicznych lub wysychania. W obrębie chondrocytów zauważono pojedyncze lub podwójne jądra komórkowe. Ze względu na to, że próbki miały kilka mikrometrów grubości, znaleziono nieliczne komórki, które dobrze zachowały swoją strukturę wewnętrzną, gdzie oprócz jądra komórkowego można dostrzec fragmenty retikulum endoplazmatycznego. Na obrazach uwidacznia się także rejon macierzy śródkomórkowej PCM, otaczającej chondrocyty.

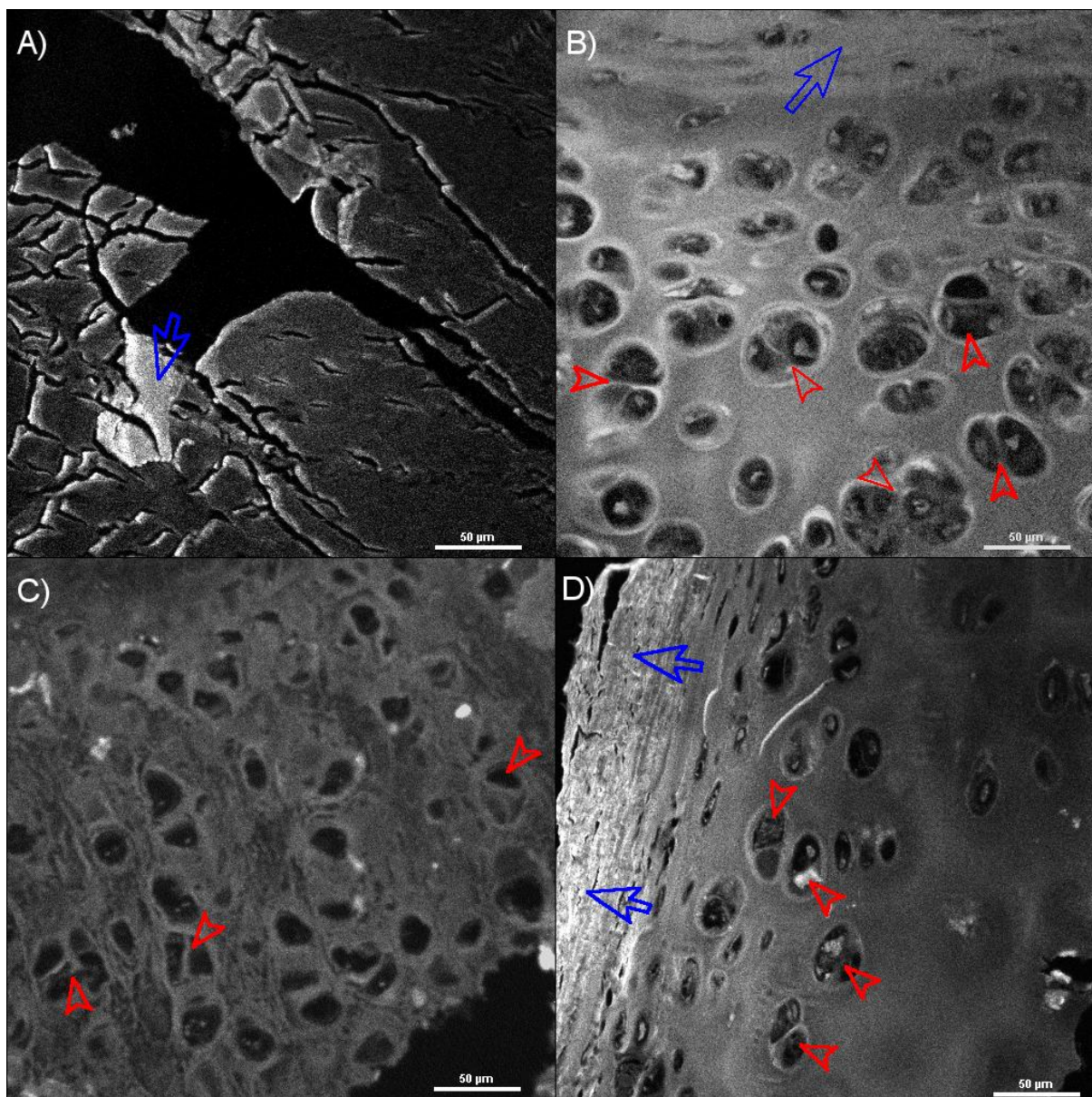
W dalszej części rozdziału dokonano bardziej szczegółowego opisu zarejestrowanych obrazów dla poszczególnych typów chrząstek.

Chrząstka stawu

Obserwowane fragmenty tej chrząstki cechowały się dużą powierzchnią ECM, jednakże nie znaleziono w niej żadnych chondrocytów (ilustracja 20A). Cechą charakterystyczną ECM chrząstki stawowej była jej duża jednorodność, choć niektóre fragmenty były popękane. Nie wpłynęło to jednak na dalsze wyniki badań. Zaobserwowano nieliczne zawinięcia się fragmentów chrząstki.

Chrząstka nosa

Obrazowanie konfokalne próbek chrząstki nosa (ilustracja 20B) ukazało, że ten rodzaj chrząstki posiada największą liczbę chondrocytów oraz grup izogenicznych względem pozostałych rodzajów chrząstek. Komórki chrzęstne łącznie zajmują stosunkowo dużą powierzchnię chrząstki. Na niektórych obrazach chondrocyty lokalnie układają się w jednej linii. W obrębie komórek tego typu tkanki najczęściej znajdowano siateczkę śródplazmatyczną.



Ilustracja 20. Przykładowe obrazy badanych rodzajów chrząstki ludzkiej (pow. 400x). A) chrząstka stawowa z rejonu stawu kolanowego. Dla tego typu chrząstki nie zarejestrowano obecności żadnych chondrocytów. Strzałką oznaczono zawinięty i nałożony fragment ECM. B) chrząstka nosa. Ten rodzaj tkanki charakteryzuje się dużą liczbą komórek, skupionych w licznych grupach izogenicznych (strzałki czerwone). Niebieską strzałką zaznaczono fragment ochrzęstnej. C) chrząstka ucha. Widoczna stosunkowo duża liczba chondrocytów; rzadko agregują się w grupach izogenicznych (strzałki czerwone). D) chrząstka krtani. Widoczna spora liczba chondrocytów, jednakże ich skupianie się w grupy izogeniczne (strzałki czerwone) nie jest tak częste jak w przypadku chrząstki nosa. Strzałką niebieską zaznaczono fragment ochrzęstnej.

Chrząstka małżowiny usznej

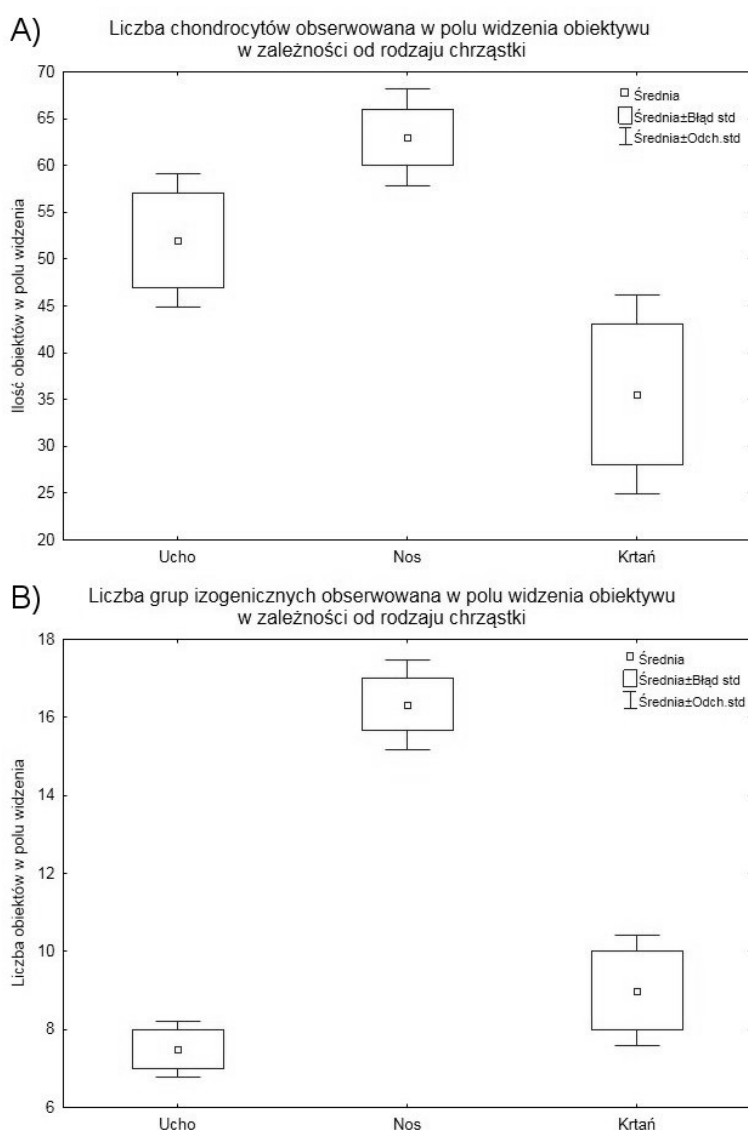
Konfokalne obrazy morfologii próbek chrząstki usznej (ilustracja 20C) ukazują gęstą sieć przeplatających się włókien sprężystych w obszarze macierzy zewnątrzkomórkowej [12]. Próbki chrząstki pobranej z małżowiny usznej wykazują stosunkowo dużą ilość chondrocytów w polu widzenia obiektywu, które w większości badanych próbek układały się

w rzędach równoległych względem siebie. Komórki tej chrząstki sporadycznie występują w postaci grup izogenicznych.

Chrząstka krtani

Wiele preparatów tej chrząstki zawiera fragmenty ochrzęstnej (ilustracja 20D). Zauważono, że wokół komórek i grup izogenicznych występuje swoista otoczka ciemniejszej ECM; prawdopodobnie są to rejony aktywne PCM. Chrząstka ta cechuje się najmniejszą liczebnością chondrocytów w polu widzenia. Ilość grup izogenicznych w tkance krtaniowej jest nieznacznie większa od liczby tych obiektów w tkance usznej.

Z uwagi na dostrzeżone różnice liczebności komórek oraz grup izogenicznych, policzono te obiekty dla wszystkich zarejestrowanych obrazów. Wyniki przedstawiono na ilustracji 21.



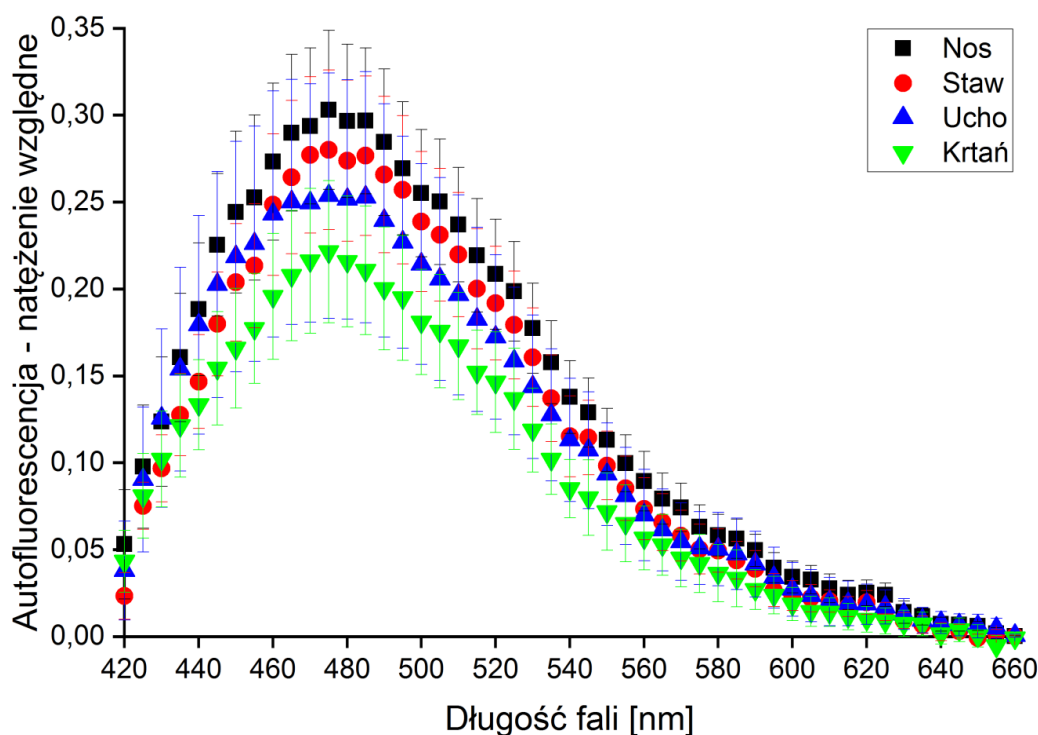
Ilustracja 21. Liczba obiektów tkankowych obserwowanych w polu widzenia obiektywu w zależności od rodzaju chrząstki. A) chondrocyty, B) grupy izogeniczne. Nie uwzględniono tkanki stawowej, ponieważ nie zarejestrowano w jej objętości żadnych chondrocytów.

Wyniki przedstawione na ilustracji 21 wskazują, że pomiędzy badanymi rodzajami chrząstki występują różnice w liczebności komórek w polu widzenia. Chrząstka nosa posiada niemalże 1,8-krotnie większą liczbę chondrocytów niż w przypadku chrząstki krtani. Dla chrząstki małżowiny usznej różnica liczby chondrocytów wyniosła ok. 20% względem chrząstki nosa. Natomiast chrząstka krtani charakteryzuje się ok. 2-krotnie większym rozrzutem ilości zliczanych chondrocytów pomiędzy różnymi rejonami preparatów. Wyniki liczebności grup izogenicznych wykazały, że największą ich liczbę posiada chrząstka nosa (ok. 2 razy więcej) w porównaniu z chrząstkami ucha i krtani, dla których liczba grup izogenicznych była zbliżona.

Liczebność chondrocytów pozwala tylko na półilościową ocenę zdolności adaptacyjnej tkanki chrzęstnej podczas przeszczepów. Dodatkowych informacji dostarcza analiza pomiarów autofluorescencji przedstawiono w dalszej części rozdziału.

8.2. Wyniki pomiarów spektrofluorymetrycznych chrząstki ludzkiej

Uśrednione widma autofluorescencji ECM uzyskane dla badanych rodzajów chrząstki zaprezentowano na ilustracji 22.



Ilustracja 22. Średnie widma autofluorescencji ECM badanych rodzajów chrząstek. Widma różnią się intensywnością maksimum oraz szerokościami półkwadrami. Dostrzegalne lokalne różnice w przebiegu krzywych. Dla chrząstki ucha maksimum emisji znajduje się w obszarze plateau (465-485 nm), w odróżnieniu od pozostałych widm, które mają wyraźnie ułożone maksimum. W zakresie 575-585 nm dostrzegalne wzmocnienie sygnału dla chrząstek: nosa, stawu i ucha. Słupki błędów jako odchylenie standardowe.

Ocena kształtu widm emisji chrząstek z ilustracji 22 wskazuje, że sygnał szybko narasta we wstępującej części widma, osiągając maksimum w 475 nm. W zakresie barwy niebieskiej widma autofluorescencji dostrzegalne jest stopniowe pogłębianie się różnicy w intensywności pomiędzy analizowanymi rodzajami chrząstki. Najmniejsza wartość intensywności zaobserwowana została w chrząstce krtani, przy czym najwyższą intensywność cechuje chrząstka nosa. W przypadku chrząstki małżowiny usznej maksimum występuje w postaci swoistego plateau w zakresie 465-485 nm. W części zstępującej widma uwidaczniają się różnice w kształcie sygnału, podkreślając lokalne wzmocnienia lub osłabienia sygnału, uzależnione od rodzaju badanej chrząstki. Różnice między intensywnością widoczne są aż do zakresu fal długich badanego widma, przy czym zanikają od 630 nm. Wyniki parametrów widmowych, tj. położenie maksimum, natężenie maksymalne oraz FWHM zostały zebrane w tabeli 11.

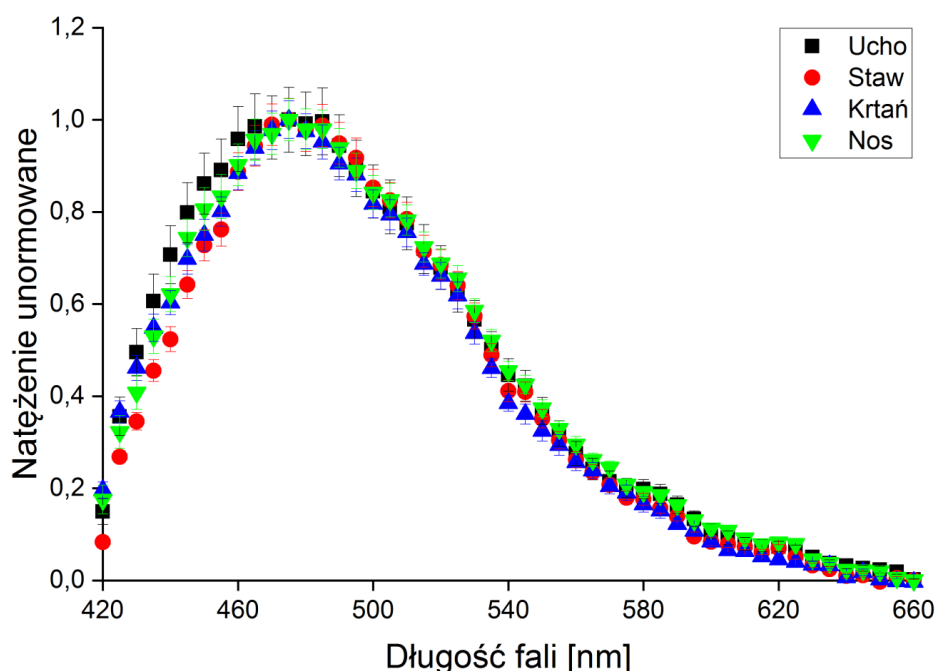
Tabela 11. Charakterystyka uzyskanych widm autofluorescencji badanych chrząstek: położenie maksimum λ_{em} wraz niepewnością odczytu [nm], średnia wartość maksymalnego natężenia I_{max} wraz z odchyleniem standardowym, mediana szerokości połówkowej pasma głównego FWHM wraz z kwartylem dolnym i górnym [nm].

Tkanka	Położenie maksimum λ_{max} [nm]	Natężenie maksymalne I_{max}	Szerokość połówkowa FWHM [nm]
Nos	475.0 ± 2.5	0.304 ± 0.045	103.4 (100.7; 104.6)
Staw	475.0 ± 2.5	0.282 ± 0.046	95.2 (93.4; 96.0)
Ucho	475.0 ± 2.5	0.257 ± 0.074	100.4 (99.4; 103.2)
Krtań	475.0 ± 2.5	0.223 ± 0.041	102.2 (99.1; 102.6)

Z tabeli 11 wynika, że maksimum emisji sygnału dla wszystkich typów chrząstki ludzkiej jest położone w 475 nm. Przeprowadzone testy ANOVA i post-hoc pomiędzy wartościami I_{max} wykazały, że różnice istotne występują pomiędzy parami nos-ucho ($p=0.0006$), nos-krtań ($p<0.0000$), staw-krtań ($p=0.0002$) oraz staw-ucho ($p=0.0439$). Dla zmierzonych średnich intensywności widma chrząstek nosa, stawu i krtani odchylenie standardowe jest zbliżone do siebie. Z kolei w przypadku natężenia emisji chrząstki usznej rozrzut wyników jest ok. 1.7-krotnie większy od pozostałych.

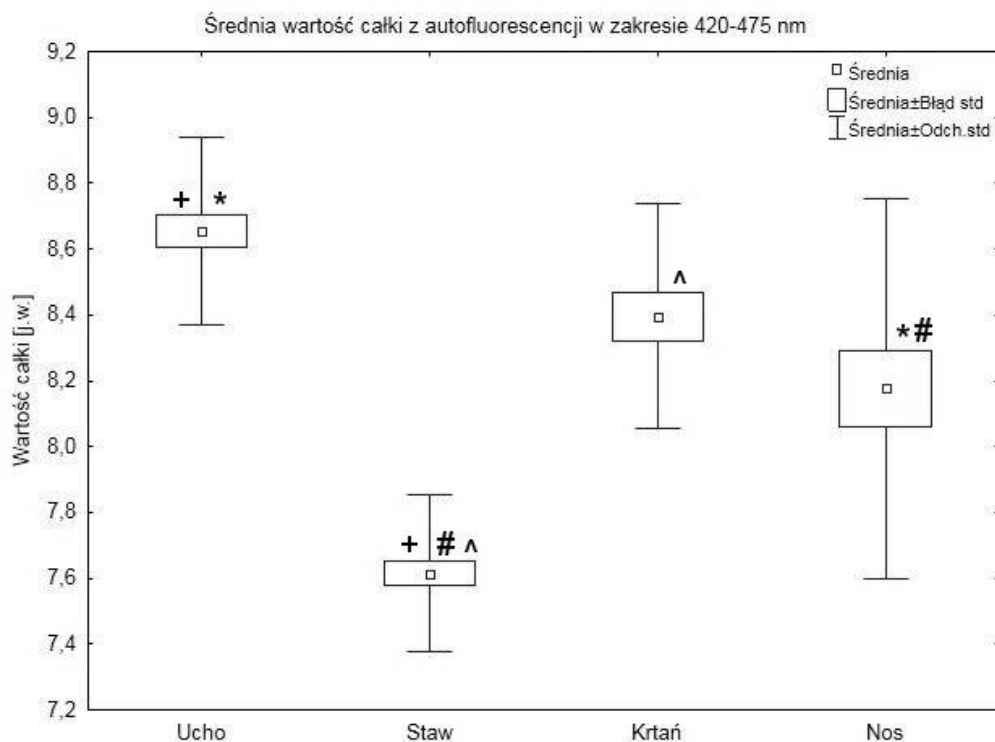
Mediana szerokości połówkowej FWHM (statystyka nieparametryczna) wskazuje, że widmo tkanki stawowej jest największe spośród pozostałych. ANOVA Kruskala-Wallisa wykazała, że jest to wynik istotny statystycznie ($p<0.0000$). Pomiedzy pozostałymi rodzajami chrząstki nie odnotowano różnic istotnych w wartości FWHM.

Unormowanie do maksimum widm autofluorescencji ECM chrząstek dostarcza dodatkowych informacji na temat ich biogodności (ilustracja 22).



Ilustracja 23. Unormowane widmo autofluorescencji badanych typów chrząstek ludzkich. Punkt maksimum w 475 nm jest wspólny dla wszystkich widm. Dostrzegalne są pewne różnice w tempie narastania wstępującej części widma. Przebieg części zstępującej wskazuje na wzajemne nakładanie się sygnałów.

Unormowanie widm autofluorescencji do wartości maksymalnej uwydatniło lokalnie występujące różnice pomiędzy badanymi sygnałami z ECM. Na ilustracji 23 widoczna jest różnica w paśmie wstępującym aż do osiągnięcia maksimum emisji, tj. 420 – 475 nm. W części zstępującej widma unormowanego (480 – 660 nm) różnice mieszczą się w zakresie wyznaczonej niepewności pomiaru. Dla oszacowania ilościowego zauważonych różnic w części wstępującej widma obliczono całkę w zakresie 420 – 475 nm dla każdego typu chrzątki. Wyniki obliczeń graficznie zaprezentowano na ilustracji 24.



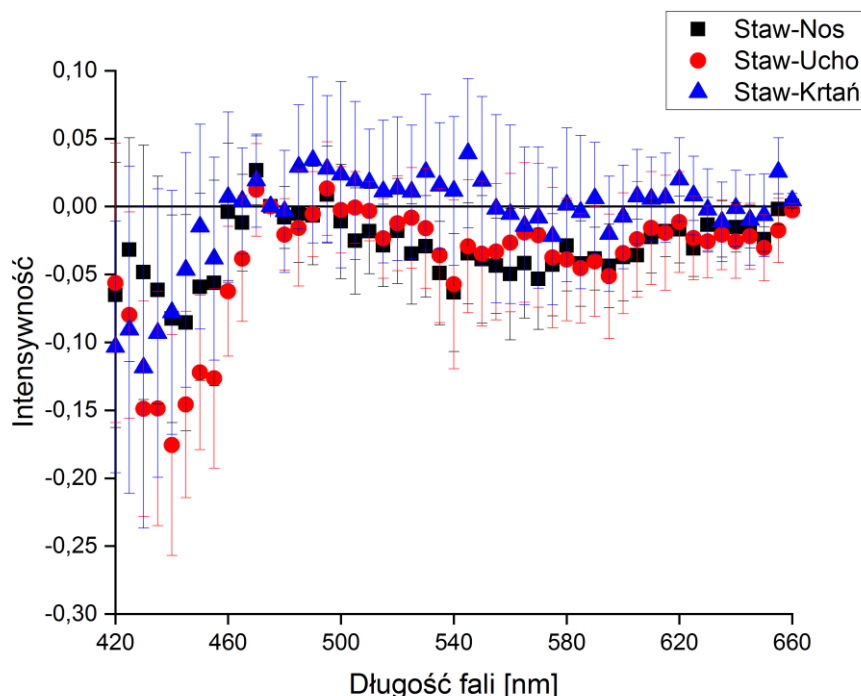
Ilustracja 24. Porównanie średniej wartości całki widma autofluorescencji z zakresu 420 – 475 nm dla badanych typów chrząstki. Oznaczenia +, *, ^ i # wskazują pary różniące się od siebie w sposób istotny statystycznie ($p=0.05$).

Przeprowadzona analiza statystyczna wykazała, że w zakresie widma 420-475 nm chrząstka stawowa odróżnia się od wszystkich pozostałych chrząstek w sposób istotny ($p<0.0005$). Ponadto różnice istotne statystycznie odnotowano tylko pomiędzy parą ucho-nos ($p=0.0011$). Pomiędzy pozostałymi porównywanymi parami nie występują różnice istotne.

Oszacowanie różnic, jakie mogą występować pomiędzy ECM chrząstek ludzkich wymaga pogłębienia dotychczasowej analizy i wyznaczeniu swoistych widm odniesienia. W oparciu o dane literaturowe [44, 105] można przyjąć, że jako jedną z chrząstek odniesienia można wybrać chrząstkę nosa. Uznawana jest ona za jeden z najlepszych natywnych przeszczepów do bezpośredniej rekonstrukcji chrząstki, dlatego też powinna wykazywać najlepiej „dopasowany” skład biochemiczny. Drugą chrząstką odniesienia może być chrząstka stawowa, ponieważ nie należy do grupy chrząstek „okołolaryngologicznych”. Sugeruje to, że będzie jedną z najbardziej różniących się biochemicznie typów chrząstek. Z tych dwóch powodów przeprowadzono analizy opisane w dalszej części tego rozdziału.

Chrzątka stawowa jako próbka odniesienia

Uwzględniając chrząstkę stawową jako referencję wyznaczono widma różnicowe, odejmując od widma chrząstki nosa widma pozostałych typów chrząstek (ilustracja 25).



Ilustracja 25. Średnie widma różnicowe pomiędzy badanymi typami chrząstek w odniesieniu do chrząstki stawowej. Słupki błędów stanowią odchylenie standardowe.

Widma różnicowe względem widma chrząstki stawowej w ogólności mają zbliżony przebieg. Niepewność oszacowania widm różnicowych wskazuje, że w znacznej większości badanego zakresu krzywe pokrywają się ze sobą, chociaż potwierdzono obecność różnic w kilku zakresach badanego spektrum. Przede wszystkim zaobserwowano fluktuację znaku wartości widma widoczną w przypadku pary staw-krtań. Pomędzy parami staw-nos oraz staw-ucho największa rozbieżność pojawia się tylko w początkowym zakresie widma, natomiast w dalszej części zdają się pokrywać ze sobą. Zauważone odchylenia kształtu oraz intensywności dla wszystkich wyznaczonych krzywych dotyczą zakresów 420 – 475, 495 – 570 oraz 575 – 635 nm. Wyniki całkowania w wyznaczonych pasmach pomiędzy badanymi parami widm różnicowych przedstawiono w tabeli 12.

Tabela 12. Wyniki całkowania dla wyznaczonych pasm widma różnicowego dla chrząstki stawowej jako próbki odniesienia. W tabeli zawarto wartości średnie całki wraz z odchyleniem standardowym.

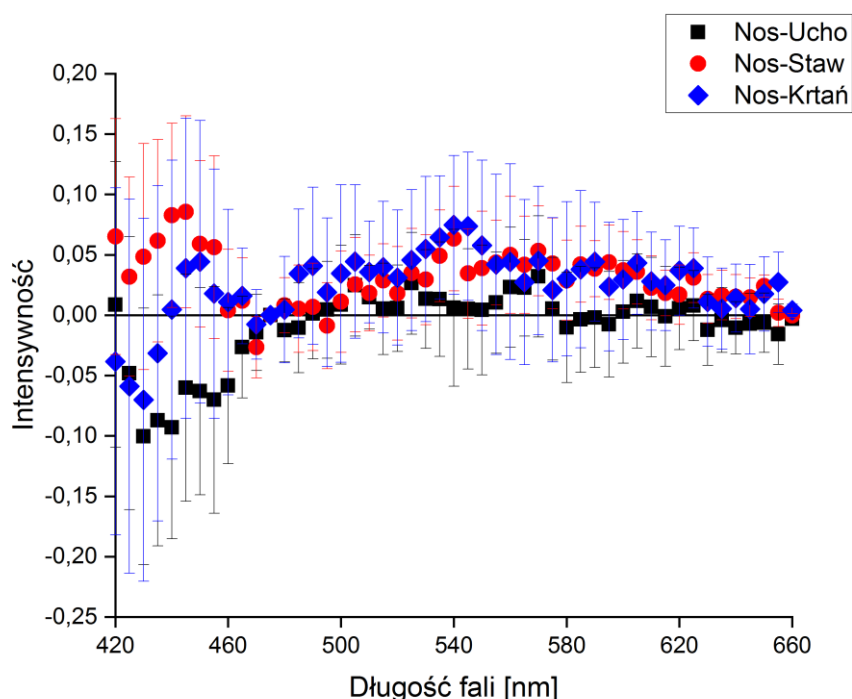
Zakres widma [nm]	Staw-Nos	Staw-Ucho	Staw-Krtań
420 - 475	-1.81 ± 2.46	-4.81 ± 1.65	-2.96 ± 1.54
495 - 570	-2.12 ± 1.44	-1.54 ± 2.48	0.97 ± 3.29
575 - 635	-1.79 ± 0.70	-1.80 ± 2.23	0.02 ± 2.11

Analiza statystyczna (ANOVA, post-hoc) całkowania widma różnicowego w paśmie 420 – 475 nm wykazała istnienie różnic istotnych statystycznie pomiędzy parami staw-nos i staw-ucho ($p < 0.0000$) oraz staw-ucho i staw-krtień ($p = 0.0091$). Natomiast porównanie staw-nos i staw-krtień nie wykazało obecności różnic istotnych.

Dla zakresów widma: 495-570 nm oraz 575-635 nm nie przeprowadzono analizy istotności statystycznej z powodu zbyt dużego rozrzutu uzyskanych wyników.

Chrzątka nosa jako próbka odniesienia

Przeprowadzona subtrakcja widm chrząstek względem widma chrząstki nosa wykazała obecność pewnych różnic pomiędzy chrząstkami. Wyznaczone widma różnicowe zostały zaprezentowane na ilustracji 26.



Ilustracja 26. Średnie widma różnicowe pomiędzy badanymi typami chrząstek w odniesieniu do chrząstki nosowej. Słupki błędów stanowią odchylenie standardowe.

Widma różnicowe widoczne na ilustracji 26 wskazują, że emisja z ECM chrząstek różni się w kilku zakresach widma fluorescencji; dla niektórych pasm różnice są wyraźniejsze niż w pozostałych. W paśmie 420-475 nm dostrzec można zmiany znaku wartości pomiędzy porównywanymi parami. Ponadto widma par nos-staw oraz nos-krtień w części od 475 nm praktycznie się pokrywają, natomiast widmo nos-ucho od tego punktu cechuje się nieco innym przebiegiem. W oparciu o ilustrację 26 największe różnice widmowe znaleziono w zakresach 420-475, 480-495, 525-565 i 570-635 nm, dla których również obliczono całość. Wyniki przedstawiono w tabeli 13.

Tabela 13. Wyniki całkowania dla wyznaczonych pasm widma różnicowego dla chrząstki nosa jako próbki odniesienia. W tabeli zawarto wartości średnie całki wraz z odchyleniem standardowym.

Zakres widma [nm]	Nos-Ucho	Nos-Staw	Nos-Krtani
420 - 475	-3.08 ± 3.75	2.24 ± 3.23	-0.28 ± 5.16
480 - 495	-0.07 ± 0.45	0.09 ± 0.52	0.44 ± 0.81
525 - 565	0.50 ± 1.74	$1.48 \pm 0,87$	2.24 ± 2.32
570 - 635	0.11 ± 1.51	2.03 ± 0.76	1.72 ± 1.49

Przegląd wyników z tabeli 13 wskazuje, że w wyznaczonych zakresach występują pewne różnice w wartości całki, niemniej jednak rozrzut tych wyników jest na tyle duży, że nie można poprawnie przeprowadzić analizy statystycznej. W związku z powyższym obserwowane odchylenia pomiędzy badanymi widmami różnicowymi można uznać za zanedbywalne.

Przeprowadzona w tej części rozdziału analiza wyników widm autofluorescencyjnych chrząstek ludzkich wskazuje, że pomiędzy chrząstkami nosa, ucha, krtani oraz stawu kolanowego występują pewne różnice w kształcie oraz intensywności. Największe różnice dotyczą części wstępującej widma autofluorescencji (ilustracja 22 i 23). Z kolei wyznaczenie widm różnicowych w odniesieniu do dwóch odrębnych typów chrząstek (ilustracje 25 oraz 26) potwierdziło, że głównej przyczyny różnic pomiędzy chrząstkami należy doszukiwać się w zakresie 420 – 475 nm. W pozostałej części widma praktycznie się pokrywają. Uzyskane w tym rozdziale wyniki zostaną wkrótce opublikowane w czasopiśmie naukowym.

8.3. Dyskusja wyników oceny biokompatybilności tkanki chrzęstnej

W badaniach opisanych w tym rozdziale oszacowano poziom wzajemnej biokompatybilności zdrowej ludzkiej chrząstki pochodzącej z obszaru nosa, krtani, ucha i stawu kolanowego. Od wielu lat doniesienia innych badaczy [26, 106, 107] wskazują, że przeszczep chrząstki z innego rejonu ciała jest dobrze tolerowany przez organizm i szybko przyswajany. Niemniej jednak istnieją doniesienia, że po jakimś czasie pojawia się pewien odsetek przypadków, dla którego wyniki autoprzeszczepu nie są zadowalające [61]. Przegląd literatury przedmiotu pozwala stwierdzić, że stabilność i przyswajalność przeszczepu przez organizm zależy od rodzaju tkanki, metody operacyjnej oraz indywidualnego stanu zdrowia organizmu biorcy. Wyniki przedstawione w niniejszej pracy rzucają więcej światła na temat możliwości wzajemnego przeszczepiania tkanki chrzęstnej pomiędzy różnymi obszarami ciała pacjenta. Ocena biozgodności pomiędzy wymienionymi wyżej typami chrząstek przeprowadzona została na dwa sposoby: mikroskopii konfokalnej oraz spektrofotometrii, co szerzej omówiono w dalszej części podrozdziału.

Obrazowanie konfokalne

Obserwacja mikroskopowa przebadanych typów chrząstek: nosa, ucha, krtani i stawu kolanowego wykazała występowanie pewnych różnic strukturalnych pomiędzy nimi. Zaobserwowana liczebność chondrocytów odpowiedzialnych za metabolizm tkanki wskazuje, że największą aktywność tkankową wykazuje chrząstka nosa. Z punktu widzenia autotransplantacji ma to istotne znaczenie, ponieważ komórki te syntetyzują kolagen, chondronektynę oraz inne białka niezbędne w procesie regeneracji tkanki, dlatego uznawana jest za najlepszy natywny wszczep stosowany praktyce klinicznej [105]. Jednakże w przypadku konieczności rekonstrukcji dużych ubytków tej chrząstki coraz więcej badaczy kieruje się w stronę wykorzystania inżynierii tkankowej [42, 44, 108]. Z punktu widzenia autotransplantacji zaletą chrząstki nosa jest fakt, że jej hydratacja oraz ilość kolagenu w niej zawartego nie zmieniają się istotnie z wiekiem [41]. Z drugiej strony brak chondrocytów (stwierdzony w badanych preparatach chrząstki stawowej) lub ich niewystarczająca ilość zwiększa ryzyko odrzucenia wszczepu, ponieważ procesy naprawcze tkanki są w takiej sytuacji spowolnione. Dodatkowym czynnikiem utrudniającym transport składników w obrębie ECM chrząstki jest jej awaskularność [35]. Analiza liczby obiektów tkankowych chrząstki sugeruje, że fragment pobrany do przeszczepu powinien być poddany wstępnej ocenie mikroskopowej pod kątem obecności wystarczającej liczby chondrocytów. Wydaje się również zasadne wzięcie pod uwagę fizycznej odległości chondrocytów od granicy fragmentu przeszczepianego. Zwiększenie tego fizycznego dystansu może wydłużać czas potrzebny do dostarczenia budulca na granicę dwóch różnych fragmentów tkanki, ponieważ transport w ECM odbywa się na drodze dyfuzji [12]. Z tego powodu można przypuszczać, że odpowiednie spreparowanie wszczepu tak, aby chondrocyty były stosunkowo blisko krawędzi, przyspieszy proces gojenia się na granicy tkanek, niemniej jednak wymaga to przeprowadzenia osobnych badań.

Zarejestrowana nieobecność chondrocytów w przypadku chrząstki stawowej nie świadczy o jej nieprzydatności w chirurgii rekonstrukcyjnej. Wyniki obserwacji mikroskopowej wskazują, że badane fragmenty chrząstki stawowej mogły zostać pobrane z powierzchniowej części kłykcia kości. Występuje tam obszar pozbawiony komórek, tzw. „*lamina splendens*” [109, 110]. W obszarze kontaktu dwóch kości, w którym lokalnie występują duże siły nacisku, dochodzi do „przepychania” komórek chrzęstnych w głębsze partie chrząstki, gdzie siły nacisku ją już mniejsze [111]. Z punktu widzenia transplantologii brak chondrocytów w pobranej objętości ECM można wykorzystać na korzyść hodowli tkankowych. Taka pozbawiona komórek macierz mogłaby stanowić odpowiedni materiał nośny dla komórek innego typu chrząstki w hodowli tkankowej, dzięki czemu przygotowanie podłoża nie wymagałoby uprzedniej decelularyzacji [55].

Trzy spośród badanych tkanek: chrząstka nosa, krtani i stawu należą do grupy chrząstek szklitych, natomiast chrząstka małżowiny usznej należy do grupy chrząstek sprężystych [12]. Zarówno chrząstka szklista jak i sprężysta są uznawane za podobne do siebie ze względu na występowanie zbliżonego stężenia kolagenu typu II oraz glikozoaminoglikanów (GAG) [112]. W niniejszej pracy obrazowanie konfokalne bez

konieczności wybarwienia preparatu uwidocznilo w chrząstce małżowiny ucha rozbudowaną sieć włókien sprężystych, przeplatających się w przestrzeniach międzykomórkowych. Wykorzystanie chrząstki sprężystej jako wszczepu może utrudniać adaptację z powodu obecności największego stężenia elastyny w porównaniu z innymi typami badanej chrząstki [113]. Obecność takiej sieci włókien prawdopodobnie spowolni migrację dzielących się chondrocytów w stronę miejsc naprawy tkanki po przeszczepie. Jednakże ilość chondrocytów obecnych w małżowinie usznej sugeruje wysoki potencjał adaptacyjny po przeszczepie. Wyznaczona liczebność chondrocytów w polu widzenia (ilustracja 21) wskazuje na podobieństwo pomiędzy chrząstką ucha i nosa. Uzyskany rezultat idzie w parze z wynikami badań immunohistochemicznych identyfikujących obecność elastyny w chrząstce oraz zbliżone wartości wybranych parametrów biomechanicznych obu tych chrząstek [113]. Z kolei dokładne scharakteryzowanie biomechaniczne chrząstki usznej wspomaga prace inżynierii tkankowej nad wytwarzaniem implantów małżowiny usznej [51, 114].

Podczas obserwacji konfokalnych chrząstki krtani zauważono obecność fragmentów ochrzęstnej w większości przebadanych preparatów, co wskazuje, że pobrano ją z rejonów ciała o dużej aktywności tkankowej, np. w sąsiedztwie gruczołu dokrewnego tarczycy. W tej pracy chrząstka krtani posiadała najmniejszą liczbę chondrocytów, co dowodzi jej niewystarczającego potencjału regeneracyjnego dla innych typów chrząstek. Niemniej jednak na potrzeby odbudowy chrząstki krtani inne typy chrząstek są wystarczająco dobrym materiałem, co zostało już przedyskutowane. Ze względu na to, że krtani stanowi element drogi oddechowej, wszczepy tkankowe powinny być restrykcyjnie dobierane, żeby utrzymać jej funkcje. Prace innych badaczy przeprowadzone na modelu zwierzęcym wykazały, że odbudowa chrzęstnych elementów krtani jest możliwa przy zastosowaniu wszczepów odpowiednio wcześniej przygotowanych, np. z wykorzystaniem komórek macierzystych na podłożu zdecelularyzowanej ECM chrząstki krtaniowej [55]. Zespoły zajmujące się odbudową głośni i fałdów głosowych zalecają zachowanie szczególnej ostrożności podczas przygotowań materiału i samej operacji ze względu na to, że prawidłowy kształt i funkcjonowanie tych narządów mają silny wpływ na jakość życia pacjentów po przebytych operacjach w obszarze krtani [54, 56, 60].

Mikrospektroskopia

Opisane w tym rozdziale wyniki pomiarów spektrofluorymetrycznych ECM chrząstek pozwoliły ocenić stopień biogodności tych tkanek. Zarejestrowane widma autofluorescencji (ilustracja 22) są podobne pod względem kształtu. Obserwowane różnice w głównej mierze dotyczą maksymalnego natężenia mierzonego sygnału. Cechą wspólną widm wszystkich chrząstek jest położenie maksimum autofluorescencji ECM przypadające na 475 nm. Analiza statystyczna wyników natężenia maksymalnego widm wykazała istnienie różnic istotnych pomiędzy niektórymi badanymi typami chrząstki. Obserwowany dla tego parametru rozrzut wyników (tabela 11) wskazuje na częściowe pokrywanie się uzyskanych rezultatów. Chrząstka małżowiny usznej cechuje się największym rozrzutem wyników ze wszystkich badanych typów chrząstki oraz pod względem natężenia emisji odróżnia się tylko od chrząstki nosa. Biorąc pod uwagę fakt, że natężenie fluorescencji można traktować jako miarę stężenia

emitującej substancji [95], można wnioskować, że obserwowane różnice w intensywności sygnału z ECM dotyczą głównie niejednakowych stężeń fluoroforów endogennych, występujących w tkankach biologicznych i dających swój wkład w widmo autofluorescencji [78]. Oznacza to, że chrząstka małżowiny usznej może wykazywać wysoką zmienność stężeń oraz rodzajów fluoroforów endogennych w porównaniu z innymi typami chrząstek. Zmierzona szerokość połówkowa FWHM widm autofluorescencji chrząstek nosa, ucha, krtani nie wykazała różnicy statystycznej. Natomiast w przypadku FWHM chrząstki stawowej zaobserwowano najmniejszą wartość wśród badanych typów chrząstki, co sugeruje, że w składzie ECM chrząstki stawowej niektóre metabolity lub białka nie występują wcale lub występują w znacząco niższym stężeniu niż w pozostałych typach chrząstki. Potwierdzenie tego wymagałoby jednak przeprowadzenia dodatkowych badań składu chemicznego.

Pogłębiona analiza wyników pomiaru autofluorescencji ECM chrząstek ludzkich uwidoczniała początkowo niewidoczne różnice między rejestrowanymi sygnałami. Zastosowanie normalizacji oraz wyznaczenie widm różnicowych względem wybranych próbek odniesienia wykazało, że badane typy chrząstek różnią się między sobą przede wszystkim w paśmie wstępującym widma AF, tj. 420 - 475 nm (ilustracje 22 – 24). W świetle wyników badań spektrofluorymetrycznych uzyskanych przez innych autorów można w przybliżeniu wyznaczyć położenie oraz wkład w sygnał emisji najważniejszych fluoroforów endogennych obecnych w chrząstce ludzkiej [78, 115, 116]. Croce i Bottioli [78] zasugerowali, że elastyna po wzbudzeniu promieniowaniem o długości fali z zakresu 350 – 420 nm emituje w dość szerokim zakresie 420 – 510 nm. Ponadto, zespół Naumanna, odnotował największe stężenie elastyny w ECM w chrząstce ucha [113]. Porównując z tymi doniesieniami wyniki niniejszej pracy dla chrząstki usznej (ilustracja 22 i 24, tabele 11 – 13) można przyjąć, że główną przyczyną rozbieżności między widmami chrząstek w zakresie 420 – 475 nm są dysproporcje stężenia elastyny. Interesujący jest wynik uzyskany w tym paśmie dla chrząstki stawowej, która odróżnia się znacząco od pozostałych badanych typów tkanki chrząstnej. Pokrywa się to z wynikami badań immunohistochemicznych [103], dowodzącymi, że elastyna w chrząstce stawowej jest obecna w chondrocytach, których nie zarejestrowano w próbkach chrząstki stawu obrazowanych w tej pracy. Implikuje to zaniechany wkład tego białka w zarejestrowane widmo AF chrząstki stawu. Z drugiej jednak strony nie można jednoznacznie udowodnić, że w omawianym zakresie jedyną różnicą jest stężenie elastyny ze względu na nakrywanie się emisji innych fluoroforów endogennych, m.in. NAD(P)H [78] czy kolagenu typu 2 [115], występujących w ECM praktycznie wszystkich chrząstek [113]. Widmo AF substancji organicznych jest czułe na interakcje między nimi, co wprowadza dodatkową niewiadomą w procesie identyfikacji poszczególnych fluoroforów. Przepuszczalnie podobne efekty mogły spowodować pojawianie się niewielkich różnic spektralnych w zakresie 480 – 635 nm, przy czym określenie, jaki fluorofor obecny w chrząstkach dominuje, jest trudne. We wskazanym paśmie emituje wiele ważnych substancji występujących w tkankach, np. flawiny, kwasy tłuszczowe, lipofuscyny [78]. Dodatkowo ocenę komplikuje fakt nakładania się na siebie tych szerokich pasm emisyjnych. Dlatego oszacowanie takich efektów wymaga dalszych badań ukierunkowanych

na identyfikację spektrofluorymetryczną poszczególnych fluoroforów oraz ich wzajemną interakcję.

Na podstawie omówionych w tym rozdziale porównań chrząstek nosa, małżowiny usznej, krtani i chrząstki stawowej stwierdzić należy, że pomiędzy nimi występują pewne różnice zarówno strukturalne, jak i spektroskopowe. Niemniej jednak wyniki te w żaden sposób nie przesądzają o tym, że pomiędzy porównywanymi parami chrząstek nie występuje biozgodność. Przeprowadzone analizy sugerują jedynie większe lub mniejsze powinowactwo chrząstek względem siebie. Z uwagi na wyzwania przed jakimi staje współczesna transplantologia można uznać, że różne typy chrząstek są wystarczająco biokompatybilne, aby je wzajemnie zastępować.

9. Podsumowanie pracy i wnioski

Wyniki opisane w niniejszej pracy ukazały możliwości badawcze metody CLSM w dziedzinie obrazowania, jak również w zastosowaniu spektrofluorymetrii na poziomie mikroskopowym. Wykazano również, że walidacja metody badawczej powinna być nieodłącznym elementem każdego badania, ponieważ wpływa na poprawność uzyskanych wyników i ich późniejszą interpretację.

Wykorzystując obrazowanie konfokalne i mikrospektrofluorymetrię oceniono, jaki wpływ ma terapia antyretrowirusowa w okresie prenatalnym na rozwój kości noworodków szczurzych w pierwszych tygodniach ich życia. Ponadto zastosowanie tej metody umożliwiło oszacowanie biogodności chrząstek ludzkich pochodzących z różnych rejonów ciała: ucha, nosa, krtani i stawu kolanowego. Poniżej przedstawiono wnioski wynikające z tej pracy:

Badania kości:

- CLSM dzięki epiluminescencji umożliwia obserwacje preparatów kości bez konieczności wcześniejszej fragmentacji, wykonania przekrojów próbki z użyciem mikrotomu lub barwienia.
- Aplikacja zidowudyny u samic szczurzych będących w ciąży wywołuje нефизjologiczne przyspieszenie wzrostu macierzy kostnej w pierwszych tygodniach życia potomstwa.
- Leczenie zidowudyną matek w ciąży może prowadzić do zaburzeń ilości oraz funkcjonowania białek niekolagenowych ich potomstwa w pierwszych 14 dniach życia.
- Zaburzenia obserwowane w pierwszych 2 tygodniach życia szczurów zdają się zanikać w 4 tygodniu życia noworodków.

Badania chrząstek:

- Wykorzystanie CLSM do badań chrząstki ludzkiej bez barwienia preparatów pozwala ocenić różnice strukturalne pomiędzy typami chrząstki.
- Badania mikrospektrofluorymetryczne umożliwiają wykrywać niewielkie różnice pomiędzy preparatami tkanki chrzęstnej.
- Chrząstka nosowa wykazuje największą gęstość komórkową ze wszystkich badanych chrząstek i wydaje się być najlepszym materiałem transplantacyjnym.
- Przebadane typy chrząstek nosa, ucha, krtani i stawu kolanowego są wystarczająco biokompatybilne ze sobą, by je wzajemnie zastępować w autotransplantacji.

Bibliografia

- [1] Twardowski, J. (1990). *Biospektroskopia*, t. 3. PWN S.A., Warszawa.
- [2] Simons, J., & Nichols, J. (1997). *Quantum mechanics in chemistry* (pp. 412-417). New York: Oxford University Press.
- [3] Lakowicz, J. R. (Ed.). (2013). *Principles of fluorescence spectroscopy*. Springer science & business media.
- [4] Kasha, M. (1950). Characterization of electronic transitions in complex molecules. *Discussions of the Faraday society*, 9, 14-19.
- [5] Prentice, A. I. D. (1967). Autofluorescence of bone tissues. *Journal of clinical pathology*, 20(5), 717-719.
- [6] Dekanić, D., Weber, K., & Kostial, K. (1977). Determination of oxytetracycline induced fluorescence and autofluorescence as an indicator of age and sex differences in rat femur. *Pflügers Archiv*, 370(1), 77-80.
- [7] Tyndall, D., Rae, B. R., Li, D. D. U., Arlt, J., Johnston, A., Richardson, J. A., & Henderson, R. K. (2012). A High-Throughput Time-Resolved Mini-Silicon Photomultiplier With Embedded Fluorescence Lifetime Estimation in 0.13 μ m CMOS. *IEEE transactions on biomedical circuits and systems*, 6(6), 562-570.
- [8] Zhou, X., Bec, J., Yankelevich, D., & Marcu, L. (2021). Multispectral fluorescence lifetime imaging device with a silicon avalanche photodetector. *Optics Express*, 29(13), 20105-20120.
- [9] Grigalavicius, M., Berg, K., & Theodossiou, T. A. (2021, June). Detection of chemiluminescence-induced photosensitizer activation through fluorescence and concomitant singlet oxygen generation. In *Optical Methods for Inspection, Characterization, and Imaging of Biomaterials V* (Vol. 11786, p. 117860B). International Society for Optics and Photonics.
- [10] Bian, Y., Jiang, Y., Huang, Y., Yang, X., Deng, W., Shen, H., Shen, R. & Kuang, C. (2021). Deep learning virtual colorization overcoming chromatic aberrations in singlet lens microscopy. *APL Photonics*, 6(3), 031301.
- [11] Aterman, K. (1981). Connective tissue: an eclectic historical review with particular reference to the liver. *The Histochemical Journal*, 13(3), 341-396.
- [12] Sawicki, W., Malejczyk, J., (2012) *Histologia*, wyd. 6, PZWL Warszawa.
- [13] Niedźwiedzki, T., Kuryszko, J. J. (2007) *Biologia kości*, PWN S.A. Warszawa.
- [14] Aaron, J. E. (2012). Periosteal Sharpey's fibers: a novel bone matrix regulatory system?. *Frontiers in endocrinology*, 3, 98.
- [15] Burr, D. B., & Allen, M. R. (Eds.). (2019). *Basic and applied bone biology*. Academic Press.
- [16] Clarke, B. (2008). Normal bone anatomy and physiology. *Clinical journal of the American Society of Nephrology*, 3(Supplement 3), S131-S139.
- [17] Cowin, S. C., & Telega, J. J. (2003). Bone mechanics handbook. *Appl. Mech. Rev.*, 56(4), B61-B63.
- [18] Kini, U., & Nandeesh, B. N. (2012). Physiology of bone formation, remodeling, and metabolism. In *Radionuclide and hybrid bone imaging* (pp. 29-57). Springer, Berlin, Heidelberg.
- [19] Bochenek, A., Reicher, M. (2021). *Anatomia człowieka*. PZWL Warszawa.
- [20] <https://www.hiv.gov/hiv-basics/overview/data-and-trends/global-statistics> (Dostęp 05.07.2019)
- [21] Brown, T. T., & Qaqish, R. B. (2006). Antiretroviral therapy and the prevalence of osteopenia and osteoporosis: a meta-analytic review. *Aids*, 20(17), 2165-2174.
- [22] McComsey, G. A., Tebas, P., Shane, E., Yin, M. T., Overton, E. T., Huang, J. S., Aldrovandi, G. M., Cardoso, S. W., Santana, J. L. & Brown, T. T. (2010). Bone disease in HIV infection: a practical review and recommendations for HIV care providers. *Clinical infectious diseases*, 51(8), 937-946.
- [23] Olivero, O. A., Parikka, R., Poirier, M. C., & Vähäkangas, K. (1999). 3'-azido-3'-deoxythymidine (AZT) transplacental perfusion kinetics and DNA incorporation in normal human placentas perfused with AZT. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis*, 428(1-2), 41-47.

- [24] Maccabruni, A., Pedrotti, L., Lazzaroni, C., Mora, R., & Quaglini, S. (2006). Study on changes in bone metabolism in a cohort of HIV-infected pregnant women and their uninfected children. *Clinical cases in mineral and bone metabolism*, 3(1), 88-91.
- [25] Maciejewska, K., Drzazga, Z., & Kaszuba, M. (2015). The changes in bone organic and inorganic matrix in newborn rats after maternal application of antiretroviral agents: Indinavir and zidovudine. *BioFactors*, 41(3), 198-208.
- [26] Thyberg, J., Lohmander, S., & Heinegård, D. (1975). Proteoglycans of hyaline cartilage: Electron-microscopic studies on isolated molecules. *Biochemical Journal*, 151(1), 157-166.
- [27] Eyre D. (200). Collagen of articular cartilage. *Arthritis Res*, 4(1), 30-35.
- [28] Werkmeister, E., De Isla, N., Netter, P., Stoltz, J. F., & Dumas, D. (2010). Collagenous extracellular matrix of cartilage submitted to mechanical forces studied by second harmonic generation microscopy. *Photochemistry and photobiology*, 86(2), 302-310.
- [29] Guilak, F., Alexopoulos, L. G., Upton, M. L., Youn, I., Choi, J. B., Cao, L., Setton, L. A. & Haider, M. A. (2006). The pericellular matrix as a transducer of biomechanical and biochemical signals in articular cartilage. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1068(1), 498-512.
- [30] Wilusz, R. E., Sanchez-Adams, J., & Guilak, F. (2014). The structure and function of the pericellular matrix of articular cartilage. *Matrix biology*, 39, 25-32.
- [31] Hulmes, D. J. S. (2008). Collagen diversity, synthesis and assembly. In *Collagen* (pp. 15-47). Springer, Boston, MA.
- [32] Ricard-Blum, S. (2011). The collagen family. *Cold Spring Harbor perspectives in biology*, 3(1), a004978.
- [33] Gordon, M. K., & Hahn, R. A. (2010). Collagens. *Cell and tissue research*, 339(1), 247-257.
- [34] Bücheler, M., & Haisch, A. (2003). Tissue engineering in otorhinolaryngology. *DNA and cell biology*, 22(9), 549-564.
- [35] Sterodimas, A., de Faria, J., Correa, W. E., & Pitanguy, I. (2009). Tissue engineering and auricular reconstruction: a review. *Journal of plastic, reconstructive & aesthetic surgery*, 62(4), 447-452.
- [36] Kamaraj, A., Kyriacou, H., Seah, K. M., & Khan, W. S. (2021). Use of human induced pluripotent stem cells for cartilage regeneration in vitro and within chondral defect models of knee joint cartilage in vivo: a Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses systematic literature review. *Cytotherapy*.
- [37] Haisch, A., Kläring, S., Gröger, A., Gebert, C., & Sittinger, M. (2002). A tissue-engineering model for the manufacture of auricular-shaped cartilage implants. *European archives of oto-rhino-laryngology*, 259(6), 316-321.
- [38] Roblin, D. G., Eccles, R. (2002). What, if any, is the value of septal surgery? *Clinical Otolaryngological Allied Science*. 27(2):, 77-80.
- [39] Drisco, B. P., & Baker, S. R. (2001). Reconstruction of nasal alar defects. *Archives of facial plastic surgery*, 3(2), 91-99.
- [40] Tardy Jr, M. E., Denny III, J., & Fritsch, M. H. (1985). The versatile cartilage autograft in reconstruction of the nose and face. *The Laryngoscope*, 95(5), 523-533.
- [41] Homicz, M. R., McGowan, K. B., Lottman, L. M., Beh, G., Sah, R. L., & Watson, D. (2003). A compositional analysis of human nasal septal cartilage. *Archives of facial plastic surgery*, 5(1), 53-58.
- [42] Britt, J. C., & Park, S. S. (1998). Autogenous tissue-engineered cartilage: evaluation as an implant material. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 124(6), 671-677.
- [43] Andrews, S. H., Kunze, M., Mulet-Sierra, A., Williams, L., Ansari, K., Osswald, M., & Adesida, A. B. (2017). Strategies to mitigate variability in engineering human nasal cartilage. *Scientific reports*, 7(1), 1-11.
- [44] Lavernia, L., Brown, W. E., Wong, B. J., Hu, J. C., & Athanasiou, K. A. (2019). Toward tissue-engineering of nasal cartilages. *Acta biomaterialia*, 88, 42-56.
- [45] Liu, Y., & Cao, Y. (2020). Generation of Ear Cartilage for Auricular Reconstruction. *Organ Tissue Engineering*, 1-25.

- [46] Olshinka, A., Louis, M., & Truong, T. A. (2017, August). Autologous ear reconstruction. In *Seminars in plastic surgery* (Vol. 31, No. 03, pp. 146-151). Thieme Medical Publishers.
- [47] Chauhan, D. S., & Guruprasad, Y. (2012). Auricular reconstruction of congenital microtia using autogenous costal cartilage: report of 27 cases. *Journal of maxillofacial and oral surgery*, 11(1), 47-52.
- [48] Nayyer, L., Patel, K. H., Esmaeili, A., Rippel, R. A., Birchall, M., O'Toole, G., Butler, P. E., & Seifalian, A. M. (2012). Tissue engineering: revolution and challenge in auricular cartilage reconstruction. *Plastic and reconstructive surgery*, 129(5), 1123-1137.
- [49] Jessop, Z. M., Javed, M., Otto, I. A., Combelleck, E. J., Morgan, S., Breugem, C. C., Archer, C. W., Khan, I. M., Lineaweaver, W. C., Kon, M., Malda, J., & Whitaker, I. S. (2016). Combining regenerative medicine strategies to provide durable reconstructive options: auricular cartilage tissue engineering. *Stem cell research & therapy*, 7(1), 1-12.
- [50] Visscher, D. O., Lee, H., van Zuijlen, P. P., Helder, M. N., Atala, A., Yoo, J. J., & Lee, S. J. (2021). A photo-crosslinkable cartilage-derived extracellular matrix bioink for auricular cartilage tissue engineering. *Acta biomaterialia*, 121, 193-203.
- [51] Griffin, M. F., Premakumar, Y., Seifalian, A. M., Szarko, M., & Butler, P. E. M. (2016). Biomechanical characterisation of the human auricular cartilages; implications for tissue engineering. *Annals of Biomedical Engineering*, 44(12), 3460-3467.
- [52] Roberts, T., Morton, R., & Al-Ali, S. (2011). Microstructure of the vocal fold in elderly humans. *Clinical Anatomy*, 24(5), 544-551.
- [53] Sabnis, A., & Mane, P. (2020). A case report on ossified thyroid cartilage. *J Media Res*, 6(1), 7-8.
- [54] Tse, J. R., & Long, J. L. (2014). Microstructure characterization of a decellularized vocal fold scaffold for laryngeal tissue engineering. *The Laryngoscope*, 124(8), E326-E331.
- [55] Ansari, T., Lange, P., Southgate, A., Greco, K., Carvalho, C., Partington, L., Bullock, A., MecNeil, S., Lowdell, M. W., Sibbons, P. D., & Birchall, M. A. (2017). Stem cell-based tissue-engineered laryngeal replacement. *Stem cells translational medicine*, 6(2), 677-687.
- [56] Gugatschka, M., Ohno, S., Saxena, A., & Hirano, S. (2012). Regenerative medicine of the larynx. Where are we today? A review. *Journal of Voice*, 26(5), 670-e7.
- [57] Ohno, T., Yoo, M. J., Swanson, E. R., Hirano, S., Ossoff, R. H., & Rousseau, B. (2009). Regeneration of aged rat vocal folds using hepatocyte growth factor therapy. *The Laryngoscope*, 119(7), 1424-1430.
- [58] Kishimoto, Y., Hirano, S., Kitani, Y., Suehiro, A., Umeda, H., Tateya, I., Kanemaru, S., Tabata, Y., & Ito, J. (2010). Chronic vocal fold scar restoration with hepatocyte growth factor hydrogel. *The Laryngoscope*, 120(1), 108-113.
- [59] Suehiro, A., Hirano, S., Kishimoto, Y., Tateya, I., Rousseau, B., & Ito, J. (2010). Effects of basic fibroblast growth factor on rat vocal fold fibroblasts. *Annals of Otolaryngology, Rhinology & Laryngology*, 119(10), 690-696.
- [60] Delaere, P. R., Vranckx, J. J., Doods, C., Meulemans, J., & Hermans, R. (2011). Tracheal autotransplantation: guidelines for optimal functional outcome. *The Laryngoscope*, 121(8), 1708-1714.
- [61] Solheim, E., Hegna, J., Øyen, J., Harlem, T., & Strand, T. (2013). Results at 10 to 14 years after osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects in the knee. *The Knee*, 20(4), 287-290.
- [62] Emre, T. Y., Ege, T., Kose, O., Demircioglu, D. T., Seyhan, B., & Uzun, M. (2013). Factors affecting the outcome of osteochondral autografting (mosaicplasty) in articular cartilage defects of the knee joint: retrospective analysis of 152 cases. *Archives of orthopaedic and trauma surgery*, 133(4), 531-536.
- [63] Carson, J. R. (2018). Articular Cartilage Repair. *Science Insights*, 2018(11), 1-4.
- [64] Rodrigues, R. M., Macko, P., Palosaari, T., & Whelan, M. P. (2011). Autofluorescence microscopy: a non-destructive tool to monitor mitochondrial toxicity. *Toxicology letters*, 206(3), 281-288.
- [65] Blacker, T. S., Mann, Z. F., Gale, J. E., Ziegler, M., Bain, A. J., Szabadkai, G., & Duchon, M. R. (2014). Separating NADH and NADPH fluorescence in live cells and tissues using FLIM. *Nature communications*, 5(1), 1-9.

- [66] Bensaci, J., Chen, Z. Y., Mack, M. C., Guillaud, M., & Stamatas, G. N. (2015). Geometrical and topological analysis of in vivo confocal microscopy images reveals dynamic maturation of epidermal structures during the first years of life. *Journal of biomedical optics*, 20(9), 095004.
- [67] Al-Awadhi, F., Jennison, C., & Hurn, M. (2004). Statistical image analysis for a confocal microscopy two-dimensional section of cartilage growth. *Journal of the Royal Statistical Society: Series C (Applied Statistics)*, 53(1), 31-49.
- [68] Guilak, F., Ratcliffe, A., & Mow, V. C. (1995). Chondrocyte deformation and local tissue strain in articular cartilage: a confocal microscopy study. *Journal of Orthopaedic Research*, 13(3), 410-421.
- [69] Guilak, F., Jones, W. R., Ting-Beall, H. P., & Lee, G. M. (1999). The deformation behavior and mechanical properties of chondrocytes in articular cartilage. *Osteoarthritis and cartilage*, 7(1), 59-70.
- [70] Guilak, F., Zell, R. A., Erickson, G. R., Grande, D. A., Rubin, C. T., McLeod, K. J., & Donahue, H. J. (1999). Mechanically induced calcium waves in articular chondrocytes are inhibited by gadolinium and amiloride. *Journal of orthopaedic research*, 17(3), 421-429.
- [71] Malak, T. M., Ockleford, C. D., Bell, S. C., Dalglish, R., Bright, N., & Macvicar, J. (1993). Confocal immunofluorescence localization of collagen types I, III, IV, V and VI and their ultrastructural organization in term human fetal membranes. *Placenta*, 14(4), 385-406.
- [72] Fukuta, M., Kobayashi, Y., Uchimura, K., Kimata, K., & Habuchi, O. (1998). Molecular cloning and expression of human chondroitin 6-sulfotransferase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Structure and Expression*, 1399(1), 57-61.
- [73] Usharani, N., Jayakumar, G. C., Rao, J. R., Chandrasekaran, B., & Nair, B. U. (2014). A microscopic evaluation of collagen–bilirubin interactions: in vitro surface phenomenon. *Journal of microscopy*, 253(2), 109-118.
- [74] Abraham, T., Carthy, J., & McManus, B. (2010). Collagen matrix remodeling in 3-dimensional cellular space resolved using second harmonic generation and multiphoton excitation fluorescence. *Journal of structural biology*, 169(1), 36-44.
- [75] Jones, C. W., Smolinski, D., Keogh, A., Kirk, T. B., & Zheng, M. H. (2005). Confocal laser scanning microscopy in orthopaedic research. *Progress in Histochemistry and Cytochemistry*, 40(1), 1-71.
- [76] Codrington, J., Kuliwaba, J., Zarrinkalam, K., & Fazzalari, N. (2009). A study of cortical bone microdamage and crack morphology utilising confocal microscopy and sequential labelling.
- [77] Ashique, A. M., Hart, L. S., Thomas, C. D. L., Clement, J. G., Pivonka, P., Carter, Y., Mousseau, D. D. & Cooper, D. M. L. (2017). Lacunar-canalicular network in femoral cortical bone is reduced in aged women and is predominantly due to a loss of canalicular porosity. *Bone reports*, 7, 9-16.
- [78] Croce, A. C., & Bottiroli, G. (2014). Autofluorescence spectroscopy and imaging: a tool for biomedical research and diagnosis. *European journal of histochemistry: EJH*, 58(4).
- [79] Francis-Sedlak, M. E., Uriel, S., Larson, J. C., Greisler, H. P., Venerus, D. C., & Brey, E. M. (2009). Characterization of type I collagen gels modified by glycation. *Biomaterials*, 30(9), 1851-1856.
- [80] Werahera, P. N., Jasion, E. A., Crawford, E. D., La Rosa, F. G., Lucia, M. S., van Bokhoven, A., Sullivan, H. T., Port, J. D., Maroni, P. D. & Daily, J. W. (2014, August). Systematic diagnosis of prostate cancer using an optical biopsy needle adjunct with fluorescence spectroscopy. In *2014 36th Annual International Conference of the IEEE Engineering in Medicine and Biology Society* (pp. 2165-2168). IEEE.
- [81] Chen, W. L., Hu, P. S., Ghazaryan, A., Chen, S. J., Tsai, T. H., & Dong, C. Y. (2012). Quantitative analysis of multiphoton excitation autofluorescence and second harmonic generation imaging for medical diagnosis. *Computerized Medical Imaging and Graphics*, 36(7), 519-526.
- [82] Sugawara, Y., Kamioka, H., Honjo, T., Tezuka, K. I., & Takano-Yamamoto, T. (2005). Three-dimensional reconstruction of chick calvarial osteocytes and their cell processes using confocal microscopy. *Bone*, 36(5), 877-883.
- [83] Carter, Y., Thomas, C. D. L., Clement, J. G., Peele, A. G., Hannah, K., & Cooper, D. M. (2013). Variation in osteocyte lacunar morphology and density in the human femur—a synchrotron radiation micro-CT study. *Bone*, 52(1), 126-132.

- [84] Dong, P., Hauptert, S., Hesse, B., Langer, M., Gouttenoire, P. J., Bousson, V., & Peyrin, F. (2014). 3D osteocyte lacunar morphometric properties and distributions in human femoral cortical bone using synchrotron radiation micro-CT images. *Bone*, *60*, 172-185.
- [85] Filipek, J., Binkowski, M., Maciejewska, K., Drzazga, Z., & Wróbel, Z. (2015). Investigation of microstructure of bone tissue in mandibles of newborn rats after maternal treatment with antiretroviral drugs. *Biocybernetics and Biomedical Engineering*, *35*(1), 54-63.
- [86] Maciejewska K. (2012). Wpływ leków antyretrowirusowych (indinawir i zidowudyna) na rozwój kości noworodków szczurzych. Praca doktorska. Uniwersytet Śląski w Katowicach.
- [87] Tao, S., Song, Y., Zhu, S., Shao, J., & Yang, B. (2017). A new type of polymer carbon dots with high quantum yield: from synthesis to investigation on fluorescence mechanism. *Polymer*, *116*, 472-478.
- [88] Ansari, A. M., Ahmed, A. K., Matsangos, A. E., Lay, F., Born, L. J., Marti, G., Harmon, J. W., & Sun, Z. (2016). Cellular GFP toxicity and immunogenicity: potential confounders in in vivo cell tracking experiments. *Stem cell reviews and reports*, *12*(5), 553-559.
- [89] Avila, F., Friguet, B., & Silva, E. (2010). Simultaneous chemical and photochemical protein crosslinking induced by irradiation of eye lens proteins in the presence of ascorbate: the photosensitizing role of an UVA-visible-absorbing decomposition product of vitamin C. *Photochemical & Photobiological Sciences*, *9*(10), 1351-1358.
- [90] Diaspro, A., Chirico, G., Usai, C., Ramoino, P., & Dobrucki, J. (2006). Photobleaching. In *Handbook of biological confocal microscopy* (pp. 690-702). Springer, Boston, MA.
- [91] Drzazga, Z., Ciszek, W., & Binek, M. (2019). Prenatal Zidovudine Treatment Modifies Early Development of Rat Osteoid—Confocal Microspectroscopy Analysis. *Journal of fluorescence*, *29*(5), 1257-1263.
- [92] Armitage, D. (2004). *Rattus norvegicus*. *Animal Diversity Web*. University of Michigan (Dostęp 11.03.2020).
- [93] Arsenault, A. L. (1990). Vascular canals in bovine cortical bone studied by corrosion casting. *Calcified tissue international*, *47*(5), 320-325.
- [94] Zhang, J., Mi, Q., & Shen, M. (2012). Resveratrol binding to collagen and its biological implication. *Food chemistry*, *131*(3), 879-884.
- [95] Zehentbauer, F. M., Moretto, C., Stephen, R., Thevar, T., Gilchrist, J. R., Pokrajac, D., Richard, K. L., & Kiefer, J. (2014). Fluorescence spectroscopy of Rhodamine 6G: Concentration and solvent effects. *Spectrochimica Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy*, *121*, 147-151.
- [96] Spaans, S. K., Weusthuis, R. A., Van Der Oost, J., & Kengen, S. W. (2015). NADPH-generating systems in bacteria and archaea. *Frontiers in microbiology*, *6*, 742.
- [97] Bianco, P., Silvestrini, G., Termine, J. D., & Bonucci, E. (1988). Immunohistochemical localization of osteonectin in developing human and calf bone using monoclonal antibodies. *Calcified tissue international*, *43*(3), 155-161.
- [98] Hoffman, R. M., & Landovitz, R. J. (2004). Complications of antiretroviral therapy for HIV: mechanisms of action, NRTIs, and NNRTIs. *J Infect Dis*, *9*(2), 2-11.
- [99] Bailey, A. J., Paul, R. G., & Knott, L. (1998). Mechanisms of maturation and ageing of collagen. *Mechanisms of ageing and development*, *106*(1-2), 1-56.
- [100] Raposeiras-Roubín, S., Rodiño-Janeiro, B. K., Paradelo-Dobarro, B., Grigorian-Shamagian, L., García-Acuña, J. M., Aguiar-Souto, P., Jacquet-Hervet, M., Reino-Maceiras, M. V., Gonzales-Juanatey, J. R., & Álvarez, E. (2013). Fluorescent advanced glycation end products and their soluble receptor: the birth of new plasmatic biomarkers for risk stratification of acute coronary syndrome. *PLoS One*, *8*(9), e74302.
- [101] Yamamoto, M., & Sugimoto, T. (2016). Advanced glycation end products, diabetes, and bone strength. *Current osteoporosis reports*, *14*(6), 320-326.
- [102] Nandakumar, N., Buzney, S., & Weiter, J. J. (2012, November). Lipofuscin and the principles of fundus autofluorescence: a review. In *Seminars in ophthalmology* (Vol. 27, No. 5-6, pp. 197-201). Taylor & Francis.

- [103] Patková, J., Vojtíšek, M., Tůma, J., Vožeh, F., Knotková, J., Šantorová, P., & Wilhelm, J. (2012). Evaluation of lipofuscin-like pigments as an index of lead-induced oxidative damage in the brain. *Experimental and toxicologic pathology*, 64(1-2), 51-56.
- [104] During, A., Penel, G., & Hardouin, P. (2015). Understanding the local actions of lipids in bone physiology. *Progress in lipid research*, 59, 126-146.
- [105] Murrell, G. L. (2004). Auricular cartilage grafts and nasal surgery. *The Laryngoscope*, 114(12), 2092-2102.
- [106] Loeb, L. (1926). Autotransplantation and homoiotransplantation of cartilage in the guinea-pig. *The American journal of pathology*, 2(2), 111.
- [107] Craigmyle, M. B. L. (1955). Studies of cartilage autografts and homografts in the rabbit. *British journal of plastic surgery*, 8, 93-100.
- [108] Vinatier, C., Gauthier, O., Fatimi, A., Merceron, C., Masson, M., Moreau, A., Moreau, F., Fellah, B., Weiss, J., & Guicheux, J. (2009). An injectable cellulose-based hydrogel for the transfer of autologous nasal chondrocytes in articular cartilage defects. *Biotechnology and bioengineering*, 102(4), 1259-1267.
- [109] Weiss, C., Rosenberg, L., & Helfet, A. J. (1968). An ultrastructural study of normal young adult human articular cartilage. *JBJS*, 50(4), 663-674.
- [110] Wan, H., Ren, K., Kaper, H. J., & Sharma, P. K. (2021). Cartilage lamina splendens inspired nanostructured coating for biomaterial lubrication. *Journal of Colloid and Interface Science*, 594, 435-445.
- [111] Fox, S. A. J., Bedi, A., & Rodeo, S. A. (2009). The basic science of articular cartilage: structure, composition, and function. *Sports health*, 1(6), 461-468.
- [112] Ciszek, B. (2001). Morfologia i funkcja chrząstki stawowej. *Acta Clinica*, 1, 10-14.
- [113] Naumann, A., Dennis, J. E., Awadallah, A., Carrino, D. A., Mansour, J. M., Kastenbauer, E., & Caplan, A. I. (2002). Immunochemical and mechanical characterization of cartilage subtypes in rabbit. *Journal of Histochemistry & Cytochemistry*, 50(8), 1049-1058.
- [114] Zopf, D. A., Flanagan, C. L., Nasser, H. B., Mitsak, A. G., Huq, F. S., Rajendran, V., Green, G. E., & Hollister, S. J. (2015). Biomechanical evaluation of human and porcine auricular cartilage. *The Laryngoscope*, 125(8), E262-E268.
- [115] Schweitzer, D., Schenke, S., Hammer, M., Schweitzer, F., Jentsch, S., Birckner, E., Becker, W., & Bergmann, A. (2007). Towards metabolic mapping of the human retina. *Microscopy research and technique*, 70(5), 410-419.
- [116] Chorvat Jr, D., & Chorvatova, A. (2009). Multi-wavelength fluorescence lifetime spectroscopy: a new approach to the study of endogenous fluorescence in living cells and tissues. *Laser Physics Letters*, 6(3), 175-193.

Spis ilustracji

Ilustracja 1. Schemat Jabłońskiego ilustrujący mechanizm przejść kwantowych w zjawisku fluorescencji. Oznaczenia: S0 – singletowy stan podstawowy, S1, S2 – singletowe stany wzbudzone, 0, 1, 2, 3 – energetyczne stany oscylacyjne (cieńsze linie), EA – energia zaabsorbowana, EF – energia emitowana (fluorescencja), k.w. – konwersja wewnętrzna układu.

Ilustracja 2. Zdjęcie fotograficzne wybranych próbek piszczeli szczurzych przymocowanych do szkiełka podstawowego z użyciem kleju niefluoryzującego (skala 10 mm).

Ilustracja 3. Przykład wykorzystania narzędzi graficznych do oznaczenia położenia płaszczyzny konfokalnej w przypadku preparatów kości. A) obraz standardowego obrazowania konfokalnego; B) zastosowanie funkcji look-up table w celu określenia płaszczyzny konfokalnej. Powiększenie 200x.

Ilustracja 4. Przykładowe zdjęcia próbek (pow. 400x) ukazujące obiekty zliczane oraz wielkości mierzone. A) tkanka kostna; oznaczenia: żółta strzałka dwustronna – grubość beleczki, podwójna strzałka – grubość macierzy pomiędzy jamkami (J), P – przestrzenie międzyjamkowe, białe okręgi 1-3 – regiony zainteresowania ROI dla pomiaru fluorescencji. B) tkanka chrzęstna; oznaczenia: C – chondrocyt, GI – grupa izogeniczna, białe okręgi 1-4 – regiony zainteresowania ROI dla pomiaru fluorescencji.

Ilustracja 5. Przykład normalizacji widma odbicia i widma surowego próbki kości do wartości w 410 nm mającej na celu subtrakcję nakładających się pasm i uzyskania właściwego widma autofluorescencji.

Ilustracja 6. Wyniki walidacji wpływu fotopowielacza na sygnał emisji. A) Przykład zmienności kształtu widma autofluorescencji na obrazie próbki kości szczurzej w funkcji wzmocnienia fotopowielacza. Widoczne jest pojawianie się pasm charakterystycznych wraz z wzrostem wzmocnienia fotopowielacza. B) Zależność natężenia widma autofluorescencji od zmiany poziomu wzmocnienia jest nieliniowa.

Ilustracja 7. Widmo szumu zastosowanego fotopowielacza. Rozdzielczość: 5 nm. Wyniki pomiarów autofluorescencji zostały odpowiednio skorygowane o sygnał szumu.

Ilustracja 8. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 7-dniowych szczurów nie poddanych terapii: A) pow. 200x; widoczna gąbczasta struktura o nieregularnym ułożeniu przestrzeni międzybeleczkowych i beleczek kostnych. B) pow. 400x uwydatnia szczegóły struktury macierzy kostnej; w rejonach złączeń beleczek pojawiają się większe skupiska jamek kostnych.

Ilustracja 9. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli szczurów 7-dniowych leczonych prenatalnie zidowudyną: A) pow. 200x; widoczna masywniejsza struktura kości niż w przypadku grupy 7C. Osteoid grupy 7Z jest bardziej zwarty, posiada bardziej regularnie rozlokowanie przestrzeni międzybeleczkowych. B) pow. 400x; w obrębie beleczek kostnych znajdują się przynajmniej 2 rzędy jamek, natomiast przestrzenie międzybeleczkowe posiadają kształt zbliżony do owalnego.

Ilustracja 10. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 14-dniowych szczurów nie poddanych terapii. Tkanka jest bardziej rozwinięta i masywniejsza niż w przypadku grupy młodszych osobników. A) pow. 200x; widoczna duża liczba przestrzeni międzybeleczkowych oraz jamek kostnych. B) pow. 400x; jamki kostne okalają przestrzenie międzybeleczkowe. Widoczne lokalne rozmycie obrazu świadczy o nierówności powierzchni osteoidu.

Ilustracja 11. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 14-dniowych szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną. A) pow. 200x; struktura tkanki jest masywniejsza i bardziej zwarta niż w grupie młodszych zwierząt. B) pow. 400x; większa część obrazu powierzchni kości znajduje się w płaszczyźnie konfokalnej, wskazując na większą płaskość powierzchni niż przypadku grupy 14C.

Ilustracja 12. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 28-dniowych szczurów nie poddanych terapii. A) pow. 100x ujawnia bardziej jednorodną strukturę w porównaniu z grupami młodszych osobników. Macierz kostna jest masywna i zwarta. B) pow. 200x; widoczne duże ilości jamek kostnych oraz duże odległości pomiędzy przestrzeniami międzybeleczkowymi.

Ilustracja 13. Przykładowe obrazy trzonów piszczeli 28-dniowych szczurów leczonych prenatalnie zidowudyną. A) pow. 100x; widoczny zarys „linii ostrości” płaszczyzny konfokalnej, wynikający z walcowatego kształtu trzonu. B) pow. 200x; niewielka liczba przestrzeni międzybeleczkowych, widoczne duża ilość jamek kostnych oraz duże odległości między przestrzeniami międzybeleczkowymi.

Ilustracja 14. Uśrednione widma autofluorescencji wzbudzonej laserem 404 nm macierzy kostnej piszczeli szczurów w funkcji wieku dla grupy: A) kontrolnej „C” i B) leczonej prenatalnie zidowudyną „Z”. Ogólny przebieg krzywych jest podobny dla wszystkich badanych grup; maksimum emisji przypada w okolicy 480 nm. Widma nakładają się w czerwonej części zakresu pomiaru. W grupie zidowudyny dostrzegalne są charakterystyczne pasma, kształtem których odróżniają się od grupy kontrolnej. Słupki błędów – odchylenie standardowe.

Ilustracja 15. A) Średnia wartość maksymalnego natężenia autofluorescencji I_{max} macierzy kostnej szczurów dla wszystkich badanych grup wiekowych. Dwustronnymi strzałkami zaznaczono pary nie wykazujące różnic istotnych statystycznie (test post-hoc, $p=0.05$). B) Mediana szerokości połówkowej FWHM pasma głównego widma autofluorescencji macierzy kostnej szczurów. Nieparametryczny test istotności Kruskala-Wallisa ($p=0.05$) wykazał obecność różnic istotnych pomiędzy: parą 14C i 14Z (oznaczonych *), grupami 7C, 14C, 28C (oznaczone ^) oraz grupami 28C, 7Z, 14Z (oznaczone #).

Ilustracja 16. Porównanie widm autofluorescencji powierzchni kości szczurów 7-dniowych pomiędzy grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczny wzrost intensywności pasma głównego w grupie zidowudyny oraz nakładanie się pasm w zakresie 570 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji. Widoczne pewne różnice kształtu w części wstępującej widma oraz w kilku wąskich pasmach w części zstępującej.

Ilustracja 17. Porównanie widm autofluorescencji powierzchni kości szczurów 14-dniowych pomiędzy grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczna większa różnica intensywności pomiędzy grupami oraz nieznaczne nakładanie się pasm w zakresie 630 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji. Widoczne niewielkie różnice w kształcie widma.

Ilustracja 18. Porównanie widm emisji z powierzchni kości szczurów 28-dniowych między grupami zidowudyny oraz kontrolną. A) widma charakterystyczne. Widoczne przesunięcie maksimum pomiędzy grupami; różnica intensywności nie obejmuje całego pasma głównego; nakładanie się widm występuje w początkowej części wstępującej oraz w zakresie czerwieni, 630 – 700 nm. B) Normalizacja do maksimum widm emisji.

Ilustracja 19. Unormowane do kontroli widmo różnicowe autofluorescencji dla poszczególnych grup wiekowych (Z – grupa zidowudyny, C – grupa kontrolna). Widmo emisji kości grupy 14-dniowych wykazuje nadmiarową intensywność. Maksima pozostałych widm są przesunięte względem niego: 7-dniowe w stronę fal krótszych, 28-dniowe w stronę fal dłuższych.

Ilustracja 20. Przykładowe obrazy badanych rodzajów chrząstki ludzkiej (pow. 400x). A) chrząstka stawowa z rejonu stawu kolanowego. Dla tego typu chrząstki nie zarejestrowano obecności żadnych chondrocytów. Strzałką oznaczono zawinięty i nałożony fragment ECM. B) chrząstka nosa. Ten rodzaj tkanki charakteryzuje się dużą liczbą komórek, skupionych w licznych grupach izogenicznych (strzałki czerwone). Niebieską strzałką zaznaczono fragment ochrzęstnej. C) chrząstka ucha. Widoczna stosunkowo duża liczba chondrocytów; rzadko agregują się w grupach izogenicznych (strzałki czerwone). D) chrząstka krtani.

Widoczna spora liczba chondrocytów, jednakże ich skupianie się w grupy izogeniczne (strzałki czerwone) nie jest tak częste jak w przypadku chrząstki nosa. Strzałką niebieską zaznaczono fragment ochrzęstnej.

Ilustracja 21. Liczba obiektów tkankowych obserwowanych w polu widzenia obiektywu w zależności od rodzaju chrząstki. A) chondrocyty, B) grupy izogeniczne. Nie uwzględniono tkanki stawowej, ponieważ nie zarejestrowano w jej objętości żadnych chondrocytów.

Ilustracja 22. Średnie widma autofluorescencji ECM badanych rodzajów chrząstek. Widma różnią się intensywnością maksimum oraz szerokościami połówkowymi. Dostrzegalne lokalne różnice w przebiegu krzywych. Dla chrząstki ucha maksimum emisji znajduje się w obszarze plateau (465-485 nm), w odróżnieniu od pozostałych widm, które mają wyraźnie ulokowane maksimum. W zakresie 575-585 nm dostrzegalne wzmocnienie sygnału dla chrząstek: nosa, stawu i ucha. Słupki błędów jako odchylenie standardowe.

Ilustracja 23. Unormowane widmo autofluorescencji badanych typów chrząstek ludzkich. Punkt maksimum w 475 nm jest wspólny dla wszystkich widm. Dostrzegalne są pewne różnice w tempie narastania wstępującej części widma. Przebieg części zstępującej wskazuje na wzajemne nakładanie się sygnałów.

Ilustracja 24. Porównanie średniej wartości całki widma autofluorescencji z zakresu 420 – 475 nm dla badanych typów chrząstki. Oznaczenia +, *, ^ i # wskazują pary różniące się od siebie w sposób istotny statystycznie ($p=0.05$).

Ilustracja 25. Średnie widma różnicowe pomiędzy badanymi typami chrząstek w odniesieniu do chrząstki stawowej. Słupki błędów stanowią odchylenie standardowe.

Ilustracja 26. Średnie widma różnicowe pomiędzy badanymi typami chrząstek w odniesieniu do chrząstki nosowej. Słupki błędów stanowią odchylenie standardowe.

Spis tabel

Tabela 1. Wykaz zastosowanych oznaczeń oraz liczebności grup szczurów, od których pobrane zostały piszczele do badań zmienności rozwoju kośćca pod wpływem prenatalnego podania zidowudyny.

Tabela 2. Karta walidacji mikroskopu fluorescencyjnego na potrzeby badań tkanki chrzęstnej i kostnej.

Tabela 3. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 7 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

Tabela 4. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 14 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

Tabela 5. Wyniki analizy obiektów tkankowych na obrazach (400x) trzonów piszczeli szczurów w wieku 28 dni. W tabeli podano wartości średnie wraz z odchyleniem standardowym. Wartość obliczonego p dla różnic istotnych statystycznie (t-Student, założone $p = 0.05$) oznaczono kolorem czerwonym.

Tabela 6. Charakterystyka uzyskanych widm dla badanych grup: położenie maksimum λ_{em} wraz niepewnością odczytu [nm], średnia wartość maksymalnego natężenia I_{max} wraz z odchyleniem standardowym, mediana szerokości połówkowej pasma głównego FWHM wraz z kwartylem dolnym i górnym [nm]. Oznaczenia: C – grupa kontrolna, Z – grupa zidowudyny.

Tabela 7. Średnia wartość całki pod krzywą dla wyznaczonych zakresów widma unormowanego do maksimum dla badanych grup kości szczurów w wieku 7 dni. Niepewność wyniku stanowi odchylenie standardowe. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Tabela 8. Porównanie średnich wartości całek pod krzywą oraz intensywności pojedynczych punktów dla wyznaczonych zakresów widma unormowanego do maksimum dla badanych grup kości szczurów w wieku 14 dni. Niepewność wyniku stanowi odchylenie standardowe. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Tabela 9. Zestawienie średnich wartości całki pod krzywą wskazanych zakresów widma unormowanego dla badanych grup kości szczurów w wieku 28 dni. Odchylenie standardowe stanowi podaną niepewność wyniku. Wszystkie różnice względem kontroli są istotne statystycznie, t-Student ($p = 0.05$).

Tabela 10. Algebraiczne różnice maksymalnego natężenia autofluorescencji Δ_{int} pomiędzy badanymi grupami wiekowymi (d – dni życia).

Tabela 11. Charakterystyka uzyskanych widm autofluorescencji badanych chrząstek: położenie maksimum λ_{em} wraz niepewnością odczytu [nm], średnia wartość maksymalnego natężenia I_{max} wraz z odchyleniem standardowym, mediana szerokości połówkowej pasma głównego FWHM wraz z kwartylem dolnym i górnym [nm].

Tabela 12. Wyniki całkowania dla wyznaczonych pasm widma różnicowego dla chrząstki stawowej jako próbki odniesienia. W tabeli zawarto wartości średnie całki wraz z odchyleniem standardowym.

Tabela 13. Wyniki całkowania dla wyznaczonych pasm widma różnicowego dla chrząstki nosa jako próbki odniesienia. W tabeli zawarto wartości średnie całki wraz z odchyleniem standardowym.