

# Podsumowanie pracy doktorskiej w języku polskim

## Wstęp

W badaniu Global Burden of Disease z 2010 roku ból szyi znalazł się na 4-tym miejscu pod względem lat przeżytych w niepełnosprawności (spośród 291 ocenionych problemów zdrowotnych) oraz na 21-szym miejscu pod względem całościowego obciążenia osoby chorej. Całkowita częstość występowania bólu szyi w populacji światowej waha się od 0,4% do 86,8%, przy średniej wartości 23,1%.

Ból szyi jest silnie związany z chorobą degeneracyjną dysków międzykręgowych (intervertebral disc – IVD). Dyski międzykręgowe ulegają degeneracji znacznie wcześniej niż inne tkanki mięśniowo-szkieletowe. Pierwsze oznaki zwyrodnienia w lędźwiowych IVD są widoczne już między 11, a 16 rokiem życia. Krzywa postępowania degeneracji, szczególnie u mężczyzn, silnie zwiększa nachylenie z wiekiem – około 10% 50-latków i 60% 70-latków ma IVD ze znacznego stopnia zmianami zwyrodnieniowymi.

Dyski międzykręgowe są strukturami o cylindrycznym kształcie, składającymi się głównie z chrząstki włóknistej i stanowiącymi centralny element stawów międzykręgowych, które umożliwiają wykonywanie ruchów w sztywnej, przedniej kolumnie kręgosłupa. Dyski międzykręgowe mają około 7 do 10 mm grubości i 2,5 cm średnicy w szyjnej części kręgosłupa i stanowią około 1/3 wysokości kolumny kręgosłupa. Umożliwiają one równe rozkładanie się obciążeń na trzonach kręgów niezależnie od pozycji w jakiej znajduje się kręgosłup. Makroskopowo IVD można podzielić na znajdujący się na zewnątrz pierścień włóknisty (annulus fibrosus – AF), który otacza leżące w środku jądro miażdżyste (nucleus pulposus – NP). Płytki graniczne mają mniej niż 1 mm grubości, składają się zarówno z chrząstki szklistej jak i komponenty kostnej oraz otaczają IVD zarówno od strony głowowej jak i ogonowej, oddzielając je w ten sposób od trzonów kręgów i zapobiegając by bogato uwodnione NP nie

przebiło się do trzonu sąsiadującego kręgu. Płytki graniczne pochłaniają również znacznego stopnia ciśnienie hydrostatyczne, które generowane jest w wyniku przenoszonych przez kolumnę kręgosłupa obciążeń.

Płytki graniczne, w trakcie rozwoju rosnącego kręgosłupa, przenikane są przez sieć mikroskopijnych naczyń krwionośnych, których zadaniem jest zapewnić dowóz substancji odżywczych do IVD. Zanikają one w okresie gdy proces kostnienia w organizmie dobiega końca. Od tego momentu kostną część płytki granicznej przenikają już tylko szpikowe otwory odżywcze (marrow contact channels – MCC), przez które przechodzą naczynia kapilarne transportujące substancje odżywcze do IVD. Naczynia te łączą przestrzenie międzybeleczkowe z chrzęstną częścią płytki granicznej, ale nie wnikają w nią. Poza rzadkim unaczynieniem w zewnętrznych warstwach AF, dojrzałe IVD prawie w całości otrzymują niezbędne substancje odżywcze i pozbywają się produktów przemiany materii na zasadzie dyfuzji poprzez płytkę graniczną. Upřednie badania wykazały, że to centralna część płytki granicznej odpowiada za dyfuzję większości substancji odżywczych.

Pomimo że złożone i dynamiczne zależności pomiędzy degeneracją IVD i kostnieniem/wapnieniem płytki granicznej są dobrze poznane, to jednak jesteśmy dalecy od ich pełnego zrozumienia. Do powstania i rozwoju choroby degeneracyjnej IVD może prowadzić szereg czynników takich jak starzenie się organizmu, zmiany biochemiczne (utrata zawartości proteoglikanów i włókien kolagenowych, zwiększona aktywność enzymatyczna metaloproteinaz macierzowych), genetyczne, przeciążenia mechaniczne i urazy, jak również upośledzenie dowozu substancji odżywczych.

Jak napisano powyżej, jednym z głównych powodów prowadzących do rozwinięcia się choroby degeneracyjnej IVD może być zaburzenie w transporcie substancji odżywczych do komórek IVD. *In vitro* aktywność komórek IVD jest bardzo wrażliwa na zmiany w pozakomórkowym stężeniu tlenu oraz na wahania pH. Komórki IVD szybko obumierają kiedy zostaną wystawione

na działanie niskiego pH lub niskiego stężenia glukozy. W konsekwencji spadek w dowozie substancji odżywczych, który prowadzi od obniżenia prężności tlenu lub wartości pH (w wyniku wzrostu stężenia mleczanów) może wpływać na zdolność komórek IVD do syntezy i utrzymywania macierzy zewnątrzkomórkowej, co w konsekwencji może doprowadzić do degeneracji IVD. Nawet jeśli przepływ krwi nie zostanie zaburzony, to substancje odżywcze mogą nie dotrzeć do IVD w wyniku zwapnienia płytki granicznej.

Gen ANKH jest ludzkim homologiem genu odpowiedzialnego za postępującą ankylozę w naturalnie żyjących myszach. Odpowiada on za produkcję przez błonowego białka ANK, które reguluje transport wewnątrzkomórkowy nieorganicznego pirofosforanu (PPi) z cytoplazmy do przestrzeni pozakomórkowej. W ten sposób ANK utrzymuje stężenie PPi na jednorodnym poziomie, prawdopodobnie zapobiegając nadmiernemu wapnieniu tkanek.

Transformujący czynnik wzrostu  $\beta 1$  (TGF- $\beta 1$ ) odgrywa znaczącą rolę w regulacji odkładania się kryształów wapnia w chrzęstnej części płytki granicznej. Posiada on możliwość indukcji przetwarzania PPi poprzez zwiększanie ekspresji genu ANKH, przez co staje się istotnym elementem w regulacji procesów wapnienia. Fosfataza alkaliczna (alkaline phosphatase – ALP) odgrywa aktywną rolę w inicjowaniu odkładania kryształów fosforanu wapnia – bardzo istotnego elementu w procesie wapnienia. Fosfataza alkaliczna hydrolizuje organiczne fosforany i PPi, prowadząc do powstania jonów monofosforanowych (Pi), które w obecności jonów wapnia tworzą kryształy hydroksyapatytu. Jednakże proces ten jest dużo bardziej skomplikowany niż jesteśmy w stanie obecnie stwierdzić. Wiemy, że zaburzenia w ekspresji ANKH (wspólnie z ektoenzymem PC-1 – ENPP1) powodują istotne spadki w poziomach PPi i osteopontyny (OPN).

Cytując badania odnośnie choroby degeneracyjnej IVD można być więcej niż pewnym, że dotyczą one eksperymentów przeprowadzonych na ludzkich lędźwiowych IVD lub zwierzęcych IVD. Ilość informacji dostępnych na temat degeneracji szyjnych IVD jest bardzo

ograniczona lub praktycznie nie istnieje w przypadku procesów zwyrodnieniowych przebiegających w płytce granicznej szyjnych IVD.

### **Zakres artykułów wchodzących w skład rozprawy doktorskiej**

W skład niniejszej pracy doktorskiej wchodzi cztery artykuły opublikowane w uznanych, międzynarodowych czasopismach naukowych z dziedziny anatomii i patologii.

*Artykuł numer 1* opublikowany w *Folia Morphologica* jest opisowym przeglądem piśmiennictwa i podsumowuje oraz uaktualnia obecny stan wiedzy na temat embriologii, struktury i biomechaniki IVD oraz płytek granicznych. Aby zaprezentować całość przedstawionej wiedzy w bardziej kliniczny świetle, artykuł opisuje wpływ starzenia się i degeneracji na wymienione wyżej właściwości IVD i płytek granicznych. Artykuł ten ma za zadanie wprowadzić Czytelnika w problematykę niniejszej rozprawy doktorskiej.

*Artykuł numer 2* opublikowany w *Polish Journal of Pathology* skupia się na kwantyfikacji gęstości komórkowej i zawartości glikozaminoglikanów w całej objętości szyjnego IVD i jego płytek granicznych. Wyniki tejże analizy zostały następnie odniesione do wieku, jak również do histologicznego stopnia zwyrodnienia tkanki IVD i płytki granicznej.

*Artykuł numer 3* opublikowany w *Polish Journal of Pathology* bada i wyjaśnia zależności występujące między ekspresją białek odpowiedzialnych za przetwarzanie i transport nieorganicznego pirofosforanu w szyjnych IVD, a wapnieniem i degeneracją szyjnych płytek granicznych.

*Artykuł numer 4* opublikowany w *Folia Morphologica* opisuje i bada problematykę degeneracji szyjnych IVD oraz wapnienie szyjnych płytek granicznych w aspekcie drożności szpikowych otworów odżywczych.

## **Cele**

Niniejsza praca miała na celu:

1. Podsumowanie i uaktualnienie obecnego stanu wiedzy na temat embriologii, struktury i biomechaniki IVD i płytek granicznych.
2. Przedstawienie wpływu starzenia się i degeneracji na powyższe właściwości (*cel I*) zarówno IVD jak i płytek granicznych.
3. Kwantyfikację gęstości komórkowej w szyjnych IVD i płytkach granicznych o różnym wieku i stopniu zaawansowania zmian zwyrodnieniowych, tak aby możliwym stało się przygotowanie trójwymiarowych map gęstości komórkowej, które mogłyby stanowić podstawę teoretyczną do przyszłego stosowania komórek macierzystych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej szyjnych dysków międzykręgowych.
4. Analizę zawartości glikozaminoglikanów w szyjnych IVD i płytkach granicznych, tak aby dostarczyć danych niezbędnych komputerowego modelowania zachowania tkanki ludzkich IVD.
5. Wyjaśnienie zależności występujących pomiędzy ekspresją białek odpowiedzialnych za przetwarzanie nieorganicznego pirofosforanu w IVD, a wapnieniem i degeneracją szyjnych płytek granicznych.
6. Ustalenie podstawowych zależności pomiędzy degeneracją szyjnych IVD, wapnieniem płytki granicznej oraz drożnością szpikowych otworów odżywczych.

## **Materialy i metody**

### *Pobieranie materiału do badań*

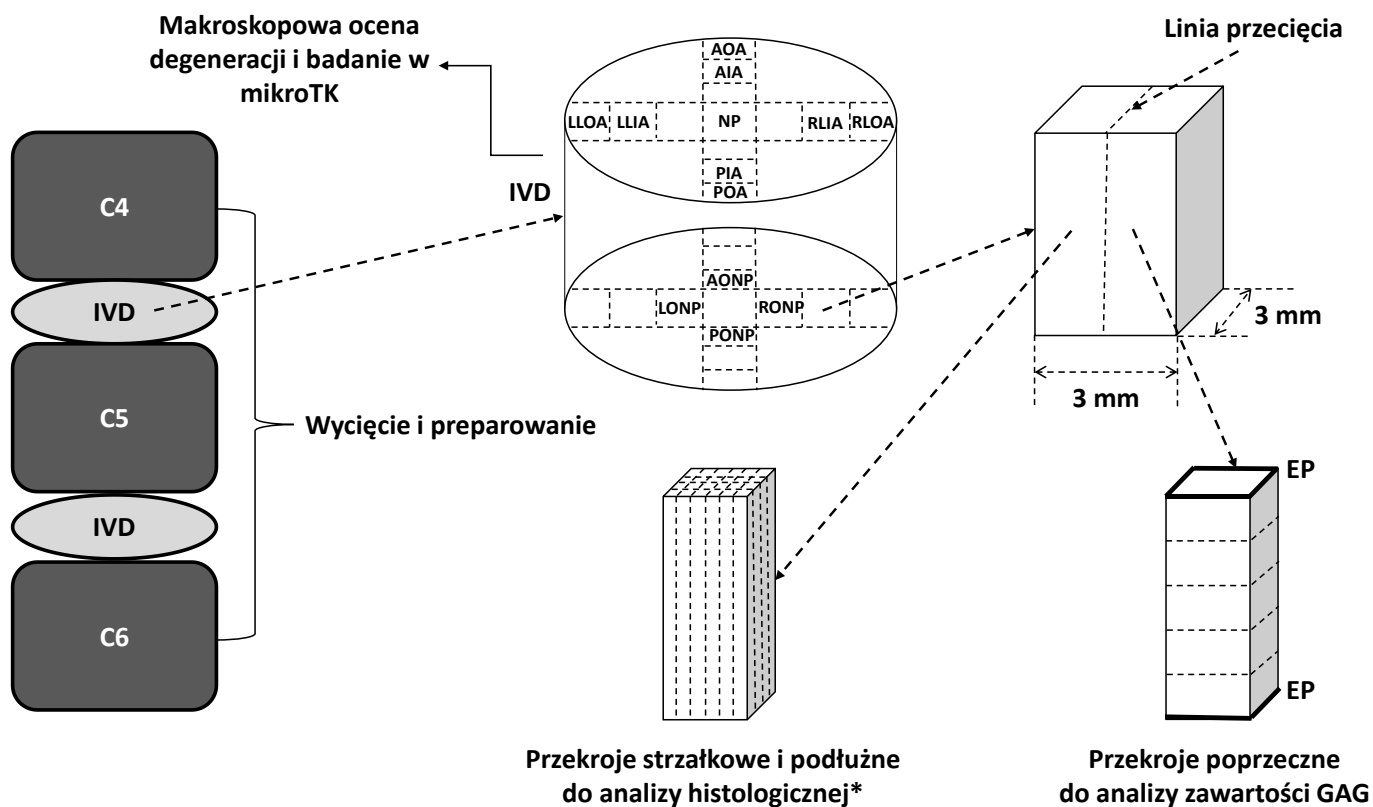
Do badania pobrano 60 szyjnych IVD ze zwłok ludzkich (Katedra Medycyny Sądowej Uniwersytetu Jagiellońskiego Collegium Medicum). Materiał wypreparowano używając dostępu przedniego, a samo pobranie wykonano nie później niż 24 godziny od zgonu.

Materiał wycięto w jednym bloku składającym się z trzonów kręgów, IVD, płytek granicznych i naczyń zaopatrujących te struktury. Po wypreparowaniu materiał zawinięto w nasączoną solą fizjologiczną gazę, zapakowano próżniowo w celu zapobiegnięcia odwodnieniu tkanki i przechowywano w temperaturze 4° Celsjusza przez okres transportu oraz do czasu dalszych badań. Materiał preparowano od poziomu dolnej połowy kręgu C4 do górnej połowy kręgu C6. Kryterium włączenia do badania była możliwość wypreparowania wskazanego powyżej odcinka przedniej kolumny kręgosłupa wraz z przednim i tylnym więzadłem podłużnym oraz naczyniami krwionośnymi zaopatrującymi kręgi.

Kryteria wyłączenia z badania uwzględniały (1) przebyty uraz szyjnego odcinka kręgosłupa, który uniemożliwiłby wykonanie zaplanowanych czynności preparacyjnych; (2) przebyte zabiegi operacyjne w zakresie szyjnego odcinka kręgosłupa; (3) przebyta chemioterapia w okresie ostatnich 12 miesięcy; (4) przebyta radioterapia w zakresie kręgosłupa; (5) całkowity paraliż o okresie trwania dłuższym niż 6 miesięcy; (6) zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa.

#### *Przetwarzanie materiału do badań*

Rycina zamieszczona na kolejnej stronie w sposób schematyczny przedstawia jak przetwarzany był materiał do badań. W celu zapoznania się ze szczegółową metodyką poszczególnych badań autor odsyła Czytelnika do poszczególnych artykułów.



Zarówno IVD jak i płytki graniczne przeszły pełną analizę histologiczną. Uwzględniała ona barwienie preparatów hematoksyliną i eozyną oraz trichromem Masona, histologiczną ocenę stopnia zaawansowania zmian zwyrodnieniowych, ocenę stopnia zwapnienia płytki granicznej, kwantyfikację gęstości komórkowej w IVD i w płytce granicznej oraz immunohistochemię (w kierunku ANK, OPN, ALP, ENPP1 i TGF- $\beta$ 1).

### Etyka

Badanie uzyskało pozytywną opinię Komisji Bioetycznej UJ CM (numer KBET/319/B/2012) i zostało przeprowadzone zgodnie z wytycznymi Deklaracji Helsińskiej (1964) i jej późniejszymi poprawkami. Pobrania materiału dokonano w taki sposób by nie zdestabilizować kolumny kręgosłupa zwłok.

## **Główne wyniki, wnioski i implikacje praktyczne badania**

*Artykuł numer 1 opublikowany w Folia Morphologica*

Opisywana praca pogładowa podsumowuje i uaktualnia obecny stan wiedzy na temat embriologii, struktury i biomechaniki IVD i płytek granicznych. Aby zaprezentować przedstawione dane w bardziej klinicznym kontekście, artykuł opisuje wpływ starzenia się i degeneracji na wymienione wyżej właściwości IVD i płytek granicznych.

Dysk międzykręgowy razem z płytkami granicznymi jest z pozoru strukturą prostą, która przy bliższej analizie okazuje w pełni swój poziom skomplikowania, uświadamiając badaczowi, że do tej pory nie poznaliśmy jej w pełni. Dyski międzykręgowe powstają z mezodermalnej notochordy i otrzymują substancje odżywcze w wyniku dyfuzji zachodzącej poprzez płytki graniczne. W warunkach fizjologicznych IVD unerwione są wyłącznie w zakresie zewnętrznego AF poprzez czuciowe i sympatyczne włókna nerwowe okołonaczyniowe. Są to gałęzie od nerwu zatokowo-kręgowego, brzusznych gałęzi nerwów rdzeniowych oraz od gałęzi łączących szarych. Wraz z wiekiem i degeneracją w IVD zachodzą znaczące zmiany. Te powstałe na tle zwyrodnieniowym możemy podzielić na dwa typy tj. „zależne od płytki granicznej” w skład których wchodzi defekty samej płytki granicznej i zapadanie się do wewnątrz AF oraz „zależne od pierścienia włóknistego” w skład których wchodzi powstawanie promienistych pęknięć IVD lub powstawanie przepuklin IVD.

*Artykuł numer 2 opublikowany w Polish Journal of Pathology*

Badanie to miało na celu kwantyfikację gęstości komórkowej w szyjnych IVD oraz płytkach granicznych o zróżnicowanym wieku i stopniu zaawansowania zmian zwyrodnieniowych. Autor badania chciał aby możliwym stało się stworzenie trójwymiarowych map gęstości komórkowej, które mogłyby stanowić podstawę teoretyczną do przyszłego stosowania komórek macierzystych w leczeniu choroby zwyrodnieniowej szyjnych dysków



międzykręgowych. Aby przystąpić do stosowania takiego leczenia niezbędna jest znajomość podstawowej liczby komórek znajdujących się w IVD.

Jako że komórki IVD są bezpośrednio odpowiedzialne za produkcję proteoglikanów, drugim celem opisywanego badania była analiza zawartości glikozaminoglikanów (GAG) w szyjnych IVD i płytkach granicznych. Ta część badania miała dostarczyć danych na temat zmian w zawartości GAG w IVD i płytkach granicznych w warunkach fizjologicznych i patologicznych. Dane w ten sposób uzyskane miałyby posłużyć do komputerowego modelowania zachowania tkanki ludzkiego IVD w różnych warunkach.

Po przeprowadzeniu dokładnej analizy histologicznej i biochemicznej autorowi badania udało się stworzyć trójwymiarowe mapy gęstości komórkowej oraz zawartości GAG w całej objętości szyjnego IVD oraz jego płytek granicznych. Analizując cały IVD gęstość komórkowa była najwyższa w rejonie NP ( $4218 \pm 417$  komórek/mm<sup>3</sup>) i stopniowo obniżała się w kierunku do przodu i na zewnątrz (przednia część AF:  $3283 \pm 438$  komórek/mm<sup>3</sup>), a wzrastała w kierunku do tyłu i na zewnątrz (tylna część AF:  $4464 \pm 551$  komórek/mm<sup>3</sup>). Wraz ze wzrostem stopnia degeneracji IVD gęstość komórkowa zmniejszała się. Co ciekawe podobny efekt nie występował wraz ze starzeniem się – w różnych grupach wiekowych próbek gęstość komórkowa pozostawała na zbliżonym poziomie. Gęstość komórkowa i zawartość GAG była bardzo zbliżona w głowowych i ogonowych płytkach granicznych. Płytką graniczną wykazywała podobną gęstość komórkową w całej swojej objętości, w niektórych przypadkach „uzupełniając” rejony IVD o niskiej gęstości komórkowej, „własnymi” rejonami o wysokiej gęstości komórkowej. Jednak w przeciwieństwie do IVD, w przypadku płytek granicznych wiek istotnie negatywnie korelował z ich gęstością komórkową. Fakt ten może wynikać z samego wapnienia płytki granicznej (które wyraźnie postępowało z wiekiem) i prostego obumierania komórek lub może sugerować, że komórki IVD są bardziej odporne ze względu na „trudniejsze” warunki w jakich przyszło im funkcjonować.

Analizując zawartość GAG, zarówno w IVD jak i płytkach granicznych, widocznym staje się, że wartości gęstości komórkowej blisko korelują z zawartością GAG. Interesujący jest fakt, że zmienność zawartości GAG w strzałkowych i czołowych przekrojach była znacząco wyższa niż w badaniach dotychczas opublikowanych. Tak było jednak tylko w przypadku IVD, gdyż w przypadku płytki granicznej zawartość GAG była homogenna w całej jej objętość – niezależnie od wieku preparatu lub stopnia degeneracji IVD/płytki granicznej. Zmienności w osiowej zawartości GAG w IVD były niewielkie i podobne do tych znalezionych w lędźwiowych IVD.

Podsumowując, wyniki badania pozwoliły na przygotowanie serii trójwymiarowych map gęstości komórkowej i zawartości GAG w szyjnych IVD i ich płytkach granicznych. Jednym z najważniejszych elementów przygotowujących do przeprowadzenia poprawnej technicznie i skutecznej klinicznie implantacji komórek macierzystych w IVD jest znajomość liczby i rozłożenia komórek w danym rejonie IVD, niezależnie od stopnia jego zwyrodnienia. Wiedza zdobyta poprzez to badanie stworzyła teoretyczne podstawy do przygotowywania zawiesin/żelów zawierających odpowiednią biologicznie liczbę komórek macierzystych.

Dodatkowo, badanie to wykazało, że szyjne IVD i ich płytki graniczne różnią się tylko nieznacznie, pod względem gęstości komórkowej i zawartości GAG, od ich odpowiedników w lędźwiowym odcinku kręgosłupa. Co więcej, badanie to dostarczyło nowych informacji na temat rozkładu zawartości GAG we wszystkich trzech płaszczyznach IVD. Wiedza ta może okazać się przydatna w komputerowym modelowaniu zachowania ludzkiego IVD. Przedstawione dane wskazują również na występowanie związanego z wiekiem trendu, sugerującego, że spadek aktywności metabolicznej komórek IVD może być wyrażony przez zmniejszone stężenie GAG.

*Artykuł numer 3 opublikowany w Polish Journal of Pathology*

Według najlepszej wiedzy autora, opisywane badanie jest pierwszą próbą we współczesnej literaturze mającą na celu analizę zależności pomiędzy ekspresją ANK, ALP, ENPP-1, OPN oraz TGF- $\beta$ 1, a wapnieniem i degeneracją szyjnych płytek granicznych.

Badanie to wykazało, że stopień zwapnienia płytki granicznej silnie koreluje ze stopniem zaawansowania zwyrodnienia samej płytki granicznej jak i IVD (w obu przypadkach  $r=0.91$ ;  $p<0.0001$ ). Zarówno liczba jak i intensywność wybarwionych komórek przypadających na analizowane pole widzenia znacząco zmniejszała się w przypadku ANK, ENPP-1 oraz TGF- $\beta$ 1 w odniesieniu do stopnia degeneracji IVD, niezależnie od analizowanego rejonu IVD. Jedynie liczba komórek wybarwiona pod kątem ekspresji ALP wzrastała wraz z narastaniem zwyrodnienia IVD.

Najważniejszym wynikiem badania jest fakt, że po raz pierwszy udało potwierdzić się, na dużej grupie szyjnych IVD, że spadek ekspresji ANK, ENPP-1 i TGF- $\beta$ 1 w IVD połączony jest z nasilającą się degeneracją IVD jak i degeneracją i wapnieniem płytki granicznej. Zależność ta była najbardziej widoczna w przypadku ANK i TGF- $\beta$ 1, jako że obydwa białka są ze sobą ściśle połączone w procesach powodujących wapnienie. Tak jak oczekiwano, ekspresja ALP wzrastała wraz z postępującym wapnieniem płytki granicznej – wiadomo, że ALP jest markerem zachodzącej mineralizacji.

Badanie to potwierdziło również, że wapnienie płytki granicznej może zostać wykryte w materiale histologicznym już w trzeciej dekadzie życia.

Modulowanie ekspresji wymienionych powyżej białek, szczególnie ANK i TGF- $\beta$ 1, może okazać się nowym sposobem zapobiegania degeneracji i wapnienia IVD.

*Artykuł numer 4 opublikowany w Folia Morphologica*

Celem opisywanego badania było ustalenie podstawowych zależności pomiędzy degeneracją szczyjnych IVD, wapnieniem płytki granicznej oraz drożnością szpikowych otworów odżywczych (MCC).

Badania przeprowadzone na lędźwiowych IVD sugerowały, że wapnienie płytki granicznej może zaburzać transport substancji odżywczych do IVD. Jednakże odkrycia te nie zostały nigdy bezpośrednio odniesione do degeneracji płytki granicznej, ani zbadane szerzej w kontekście IVD pochodzących z innych poziomów niż lędźwiowy.

W badaniu tym, dzięki zastosowaniu mikrotomografii komputerowej (mikroTK) stwierdzono, że liczba otworów w płytce granicznej o średnicy 300  $\mu\text{m}$  koreluje negatywnie z liczbami otworów o mniejszej średnicy ( $r=-0.62$ - $(-0.82)$ ;  $p<0.0001$ ). Korelacja ta była najsilniejsza w przypadku MCC o średnicy 10 – 50  $\mu\text{m}$ . Podobna zależność została zaobserwowana pomiędzy liczbą MCC, a degeneracją IVD i degeneracją oraz wapnieniem płytki granicznej, gdzie liczba otworów o średnicy 300  $\mu\text{m}$  korelowała pozytywnie, a liczba MCC o mniejszych rozmiarach korelowała negatywnie z nasileniem zmian degeneracyjnych oraz rozległością wapnienia.

Opierając się na uzyskanych wynikach, jak również na danych pochodzących z badań przeprowadzonych z użyciem skaningowej mikroskopii elektronowej stwierdzono, że pozytywna zależność pomiędzy otworami w płytce granicznej o średnicy 300  $\mu\text{m}$ , a degeneracją IVD i płytki granicznej sugeruje, że otwory te nie mogą zostać uznane jako MCC, a wyłącznie jako pęknięcia płytki granicznej wynikające z jej degeneracji. Otwory te nie zawierają zakończeń naczyń kapilarnych i są pochodną ścięczenia płytki granicznej i jej zmian powstających z wiekiem.

Dodatkowo stopień degeneracji IVD, oceniany za pomocą makroskopowej klasyfikacji Thompsona korelował pozytywnie ze stopniem degeneracji wyznaczonym przy użyciu histologicznej klasyfikacji Boos'a ( $r=0.77$ ;  $p<0.0001$ ).

Jest to pierwsze badanie, które wykorzystało mikroTK w połączeniu z analizą histologiczną w celu lokalizacji, kwantyfikacji i scharakteryzowania MCC w szyjnych płytkach granicznych. Do tej pory tylko jedno podobne badanie zostało przeprowadzone, jednak autorzy wykorzystali w nim skaningową mikroskopię elektronową i oceniali występowanie MCC w lędźwiowych płytkach granicznych. Inne badania oceniające współwystępowania zmian zwyrodnieniowych i zmian w charakterystyce MCC bazowały wyłącznie na analizie histologicznej, która umożliwia zobrazowanie wyłącznie części płytki granicznej, nie zaś jej całej struktury.

Nadal nie jest jasnym czy wapnienie płytki granicznej jest przyczyną czy efektem degeneracji zachodzącej w IVD lub płytce granicznej. Niektórzy autorzy odpowiadają w sposób wymijający, że oba procesy zachodzą równocześnie i są mocno ze sobą związane. Jednak wyniki niniejszego badania zasygnalizowały, że wapnienie płytki granicznej jest raczej przyczyną, niż efektem spadku w dowozie substancji odżywczych, jako, że rozpoczyna się w dobrze unaczynionym centrum płytki granicznej, a nie na jej brzegach gdzie liczba MCC jest znacząco niższa. Niestety autorzy muszą się wstrzymać ze stawianiem definitywnych stwierdzeń dopóki nie zostaną przeprowadzone badania wyraźnie wskazujące na istnienie ciągu przyczynowo-skutkowego.

Podsumowując, jest to pierwsze tego typu badanie, które zostało przeprowadzone na szyjnych IVD. Wykazało ono, że podobnie do lędźwiowych IVD, występuje silna negatywna korelacja pomiędzy liczbą MCC w płytce granicznej, a makroskopowo i mikroskopowo ocenianą degeneracją IVD i płytki granicznej. Stanowi to dodatkowy argument przemawiający za tym, że wapnienie płytki granicznej, przez okluzję MCC, prowadzi do spadku transportu substancji odżywczych do IVD, co powoduje jego degenerację. Dodatkowo, wykorzystana w tym artykule metoda badania płytki granicznej (mikroTK) pozwała na wykonywanie dokładnych i powtarzalnych pomiarów liczby, wielkości i kształtu MCC płytki granicznej. Co więcej, wykazano, że makroskopowa klasyfikacja Thompsona dobrze koreluje z histologiczną

klasyfikacją Boos'a w przypadku oceny degeneracji IVD i płytki granicznej. Czyni to klasyfikację Thompsona dobrym surogatem mikroskopowej degeneracji, do czasu kiedy dostępne są wyniki analizy histologicznej.

#### *Aspekty praktyczne pracy*

Obok walorów czysto naukowych, praca ta niesie ze sobą również istotne aspekty praktyczne, zarówno dla obecnej jak i przyszłej działalności naukowo-lekarskiej. Wartym wspomnienia jest również fakt, że według najlepszej wiedzy autora, jest to pierwsze tego typu badanie przeprowadzone na szyjnych IVD.

Badanie to przedstawia szereg trójwymiarowych map gęstości komórkowej i zawartości GAG w szyjnych IVD i ich płytkach granicznych. Wiedza zdobyta poprzez to badanie stworzyła teoretyczne podstawy do przygotowywania zawiesin/żelów zawierających dostosowaną biologicznie liczbę komórek macierzystych. Przedstawiony rozkład GAG w całej objętości IVD (we wszystkich trzech płaszczyznach) i płytkach granicznych może być pomocny w modelowaniu tkanki ludzkiego IVD za pomocą metody elementów skończonych.

Przedstawione wyniki sugerują, że modulowanie ekspresji wybranych białek, szczególnie ANK i TGF- $\beta$ 1, może okazać się nowym sposobem zapobiegania degeneracji i wapnienia IVD.

Dodatkowo, wykorzystana metoda badania płytki granicznej (mikroTK) pozwala na wykonywanie dokładnych i powtarzalnych pomiarów liczby, wielkości i kształtu MCC płytki granicznej. Co więcej, wykazano, że makroskopowa klasyfikacja Thompsona dobrze koreluje z histologiczną klasyfikacją Boos'a w przypadku oceny degeneracji IVD i płytki granicznej. Czyni to klasyfikację Thompsona dobrym surogatem mikroskopowej degeneracji, do czasu kiedy dostępne są wyniki analizy histologicznej.