

Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s gonartrózou

Concentration of Hyaluronic Acid in Synovial Fluid as an Indicator of Severity and Degree of Impairment in Patients Suffering from Gonarthrosis

J. KOTAŠKA¹, L. HANOUSKOVÁ², R. PRŮŠA², T. TRČÍ¹, K. KOTAŠKA²

¹ Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

² Ústav lékařské chemie a klinické biochemie 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy a Fakultní nemocnice v Motole, Praha

ABSTRACT

PURPOSE OF THE STUDY

Hyaluronic acid is a major component of synovial fluid and an indicator of joint viscosity and viscoelasticity. Decreased concentrations of hyaluronic acid in the synovial fluid indicate the severity of osteoarthritis. The aim of the study was to determine the concentrations of hyaluronic acid in the synovial fluid and to evaluate the correlation with the severity of osteoarthritis determined based on the radiological criteria (evaluation according to X-ray classification) and the physicochemical criteria (measurement of synovial fluid osmolality).

MATERIAL AND METHODS

A total of 67 patients with the mean age of 67 years (35 men, mean age = 65 years, and 32 women, mean age = 68 years) with clinically diagnosed osteoarthritis were included in the study. The patients were divided into four groups according to the severity of arthrosis (from Group 1 – the lowest degree of disability to Group 4 – the most severe degree of arthrosis). Samples were taken during knee arthroscopies or total knee replacements. Hyaluronic acid concentrations in synovial fluid were determined using a commercially available kit based on the sandwich ELISA principle (Teco Hyaluronic acid, Switzerland). Osmolality was measured by the cryoscopic method.

RESULTS

The average concentrations of hyaluronic acid in the synovial fluid in the individual groups were as follows: Group 1: HA = 2302 mg/L, Group 2: HA = 2234 mg/L, Group 3: HA = 2300 mg/L, Group 4: HA = 2446 mg/L. HA concentrations in synovial fluid did not differ from the published reference values in synovial fluid (1500 – 3200 mg/L. HA concentrations do not depend on age, sex, and severity of the disease. The patients who underwent arthroscopy have significantly elevated synovial HA concentration compared to the patients who underwent total knee replacements (2581 mg/L vs. 1763 mg/L, $p = 0.01$, Mann-Whitney test). HA positively correlates with the osmotic pressure determined by the examination of osmolality in synovial fluid ($r = 0.29$, $p = 0.015$).

CONCLUSIONS

Hyaluronic acid concentrations in patients with knee osteoarthritis who underwent arthroscopy are significantly increased compared to the group of patients with total knee replacement. Hyaluronic acid concentrations in the synovial fluid correlate with the increased osmotic pressure, and may therefore be an additional indicator of the severity of the disease.

Key words: hyaluronic acid, knee arthrosis, total knee replacement, osmolality.

ÚVOD

Kyselina hyaluronová (KH) je vysokomolekulární polysacharid extracelulární matrix účastnící se řady významných biologických dějů zahrnujících regulační, zá-
nětlivé, imunosupresivní a antiproliferativní účinky (5). Podílí se zejména na udržování viskoelasticity kapalných tkání, na supramolekulárním prostorovém uspořádání proteoglykanů v extracelulární matrix a regulaci osmotického tlaku, čímž významně ovlivňuje homogenitu tkáně a její homeostatickou integritu. Vzhledem ke své jedinečné viskoelastické povaze a neimunogenicitě je možno KH využít i v řadě klinických aplikací včetně suplementace kloubní tekutiny při osteoartróze, pro usnadnění hojení a regenerace chirurgických ran, a také

v oftalmologii, farmakologii a kosmetice (5). Kyselina hyaluronová je běžnou součástí většiny pojivových tkání, hraje významnou úlohu při ochraně kloubní chrupavky a transportu živin do chrupavky, je také hlavní složkou synoviální (kloubní) tekutiny. Kloubní tekutina (synoviální tekutina) je tvořena ultrafiltrátem krevní plazmy, který je obohacen o mukopolysacharidy produkované buňkami kloubní výstelky. Funguje jako biologické mazivo a jako prostředí, přes které procházejí živiny a regulační cytokiny. Hlavní složkou synoviální tekutiny je hyaluronan o vysoké molekulové hmotnosti (~4–6MDa, ~2–4 mg/ml) (7). Součástí synoviální tekutiny jsou také molekuly, které jsou klíčové pro správné fungování chru-

pavek (např. proteoglykan 4 (PRG4) nebo povrchové aktivní fosfolipidy a tkáňové makrofágové buňky (10)). Snížené koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jsou ukazatelem závažnosti artrózy (10). U pacientů s gonartrózou korelují koncentrace kyseliny hyaluronové se stupněm synoviální proliferace a velikostí osteocytů. Pacienti s vyššími výchozími hodnotami vykazují rychlejší progresivní průběh nemoci (6, 9). Cílem studie bylo stanovit koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině a vyhodnotit korelaci se závažností artrózy stanovené dle radiologických kritérií (hodnocení podle rtg klasifikace) a fyzikálně chemických kritérií (měření osmolality synoviální tekutiny).

MATERIÁL A METODIKA

Do studie bylo zařazeno celkem 67 pacientů průměrného věku 67 let (35 mužů, průměrný věk 65 let a 32 žen, průměrný věk 68 let) s diagnostikovanou artrózou kolenního kloubu definovanou dle rtg klasifikace podle Kellgrena a Lawrence. Pacienti byli rozděleni do čtyř skupin dle závažnosti postižení (1. skupina – gonartróza 1. stupně až 4. skupina – gonartróza IV. stupně, nejtěžší stupeň postižení). Charakteristika studovaného souboru je shrnuta v tabulce 1.

Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině, odebrané pacientům během operačních výkonů (artroskopie a implantace totální endoprotézy (TEP) kolene) byly stanoveny pomocí komerčně dostupného kitu založeného na principu sendvičové enzymoimunoanalýzy ELISA (Teco Hyaluronic acid, Švýcarsko, pracovní rozsah metody 2,7–1000 mg/l, variační koeficient CV = 2,8–5,2 %). Po odběru byly vzorky ihned dopraveny do laboratoře, kde byly centrifugovány při 4 °C 10 minut při 3000 otáčkách, následně alikvotovány do 1 ml zkumavek a zamrazeny na –80 °C do doby, než byla provedena analýza. Bezprostředně před analýzou byly alikvotované vzorky ředěny PBS pufrům o pH 7,4 v poměru 1:5000. Jako doplňkový parametr použitý pro hodnocení fyzikálně chemických kritérií artrózy na základě posouzení viskozity a viskoelasticity byla v odebraných primárních vzorcích měřena osmolalita pomocí kryoskopické metody na analyzátoru Advanced 2020.

Statistická analýza a vyhodnocení naměřených dat

Analýza rozptylu (ANOVA) byla použita k porovnání koncentrací kyseliny hyaluronové v jednotlivých skupinách pacientů. Normalita rozložení dat byla testována pomocí D'Agostinova Pearsonova testu. Multivariátní analýza byla použita k posouzení závislosti koncentrací kyseliny hyaluronové na věku, pohlaví, stupni artrózy. Neparametrický Mannův-Whitneyův U test byl použit k porovnání koncentrací kyseliny hyaluronové v jednotlivých skupinách. Regresní analýza byla využita k hodnocení korelace hodnot kyseliny hyaluronové a osmolality. Hladina pravděpodobnosti $p < 0,05$ byla zvolena jako statisticky významná. Data byla vyhodnocena pomocí statistického programu GraphPad Prism, verze 8.02 (San Diego, USA).

VÝSLEDKY

Průměrné koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině v jednotlivých skupinách byly následující Skupina 1: KH = 2302 mg/l, Skupina 2: KH = 2234 mg/l, Skupina 3: KH = 2300 mg/l, Skupina 4: KH = 2446 mg/l (viz tabulka 1). Distribuce hodnot kyseliny hyaluronové v jednotlivých skupinách s vyznačením referenčního intervalu je znázorněna na obrázku 1. Rozdíly koncentrací KH mezi jednotlivými skupinami nebyly statisticky významné. Koncentrace KH v synoviální tekutině se nelišily od publikovaných referenčních hodnot 1500–3200 mg/l (8). Koncentrace KH nezávisí na věku, pohlaví, stupni artrózy, ani na závažnosti onemocnění charakterizovaném nutností provedení totální endoprotézy.

Korelační analýza ukazuje signifikantní závislost mezi hodnotami KH v synoviální tekutině pouze ve skupinách 1 a 2 ($p = 0,013$, Spearmanův korelační koeficient $r = 0,84$), korelace v ostatních skupinách je nevýznamná.

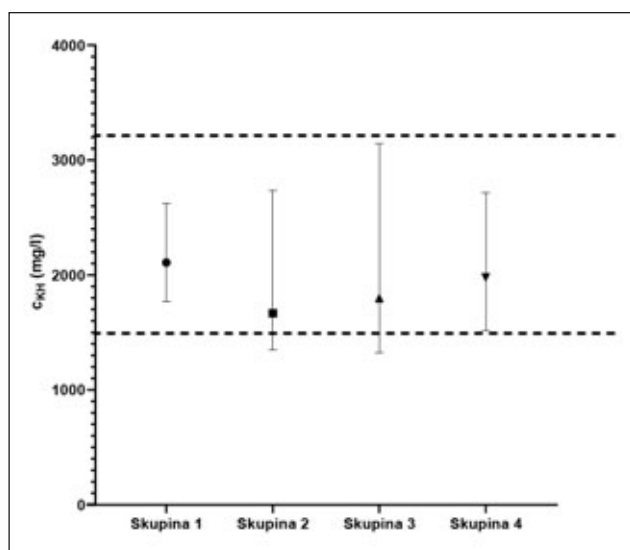
Nelze tedy jednoznačně prokázat korelaci koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině se závažností onemocnění hodnocenou dle radiologických kritérií.

Pacienti, kteří podstoupili artroskopii, ale mají signifikantně zvýšené koncentrace v synoviální KH oproti pacientům, kteří podstoupili totální endoprotézu (2581 mg/l vs. 1763 mg/l, $p = 0,01$, Mannův-Whitneyův test) (obr. 2).

Tab. 1. Charakteristika sledovaného souboru
Table 1. Characteristics of the studied group

	Celkový soubor N = 67	Muži N = 35	Ženy N = 32	
Věk, roky (rozpětí)	67 (29–89)	65 (29–86)	68 (49–89)	
cKH ,mg/l, průměr (rozpětí)	2238 (13,5–5000)	2436 (931–5000)	2006 (13,5–4743)	
Osmolalita, mOsm/kg, průměr (rozpětí)	311 (279–382)	311 (287–382)	310 (279–354)	
	Skupina 1 N = 18	Skupina 2 N = 17	Skupina 3 N = 16	Skupina 4 N = 16
cKH, mg/l, průměr (rozpětí)	2302 (1347–4095)	2234 (1056–5000)	2300 (13,5–5000)	2446 (760,3–5000)
Osmolalita, mOsm/kg, průměr (rozpětí)	324 (300–357)	314 (287–382)	306 (285–354)	306 (279–328)

cKH – koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině



Obr. 1. Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou (Skupina 1 – nejmenší závažná forma onemocnění – Skupina 4, nejzávažnější forma onemocnění).

Data v grafu jsou vyjádřena jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil). Přerušované čáry znázorňují hodnoty referenčního intervalu 1500–3200 mg/l publikované ve studii Palmieriho et al. (8). Rozdíly mezi koncentracemi KH v jednotlivých skupinách nebyly statisticky významné.

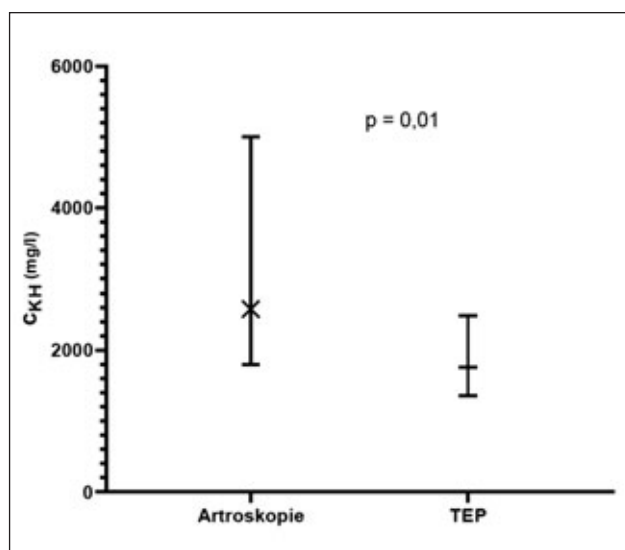
Fig. 1. Distribution of values of hyaluronic acid concentrations in the synovial fluid of patients with gonarthrosis (Group 1 – the lowest degree of disability – Group 4, the most severe form of disability).

Data in the chart are expressed as the median and the interquartile range (difference between the 25th and 75th percentile). The dashed lines indicate the reference interval values of 1500–3200 mg/l published in the study by Palmieri et al. (8). The differences between the hyaluronic acid concentrations in individual groups were statistically insignificant.

Závažnost onemocnění posouzená dle fyzikálně chemických kritérií vyšetřením osmolality v synoviální tekutině u pacientů s gonartrózou ukazuje významnou korelaci koncentrací kyseliny hyaluronové s hodnotami osmolality (Spearmanův $r = 0,29$, $p = 0,015$) viz obrázek 3.

DISKUSE

Recentní studie ukazují zásadní význam kyseliny hyaluronové v posouzení závažnosti postižení. Koncentrace kyseliny hyaluronové korelují s mírou postižení (2, 4, 11). Je prokázána také významná negativní závislost kyseliny hyaluronové na věku (11). Naše výsledky jsou od těchto výsledků odlišné, neboť jsme neprokázali závislost na věku ani významnou korelaci s radiologickým stupněm prokázané gonartrózy. Tuto odlišnost lze vysvětlit jednak značnou věkovou heterogenitou sledovaného souboru (ve velké většině se jednalo o pacienty starší 50 let – 63 z celkových 67 pacientů). Druhým vysvětlením týkajícím se nevýznamného rozdílu v synoviálních koncentracích kyseliny hyaluronové může být

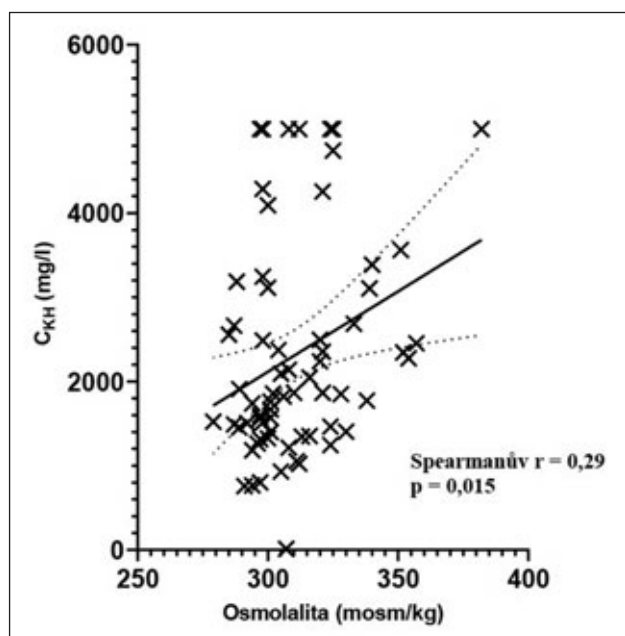


Obr. 2. Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů po artroskopii a po totální endoprotéze.

Data v grafu jsou vyjádřena jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil).

Fig. 2. Distribution of values of hyaluronic acid concentrations in the synovial fluid in patients after arthroscopy and total knee replacement.

Data in the chart are expressed as the median and the interquartile range (difference between the 25th and 75th percentile).



Obr. 3. Vzájemná korelace koncentrací kyseliny hyaluronové a osmolality v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou. Tečkované čáry vymezují oblast 95% intervalu spolehlivosti regresní přímky.

Fig. 3. Correlation between the hyaluronic acid concentration and the osmolality in the synovial fluid of patients with gonarthrosis.

Dotted lines indicate the 95% confidence interval for the regression line.

skutečnost, že diagnostický kit použitý pro stanovení kyseliny hyaluronové neposkytuje přesnou informaci o velikosti a molární hmotnosti stanovovaného fragmentu. Výše uvedené studie popisují významné korelace různě velikých fragmentů kyseliny hyaluronové (molekulová hmotnost 0,8–20 kDa (1, 2, 11)) s klinicky prokázanými formami onemocnění. Vysokomolekulární formy mají protektivní účinky, zatímco nízkomolekulární formy vykazují významnou prozánětlivou, angiogenní a imunostimulační aktivitu. I přes značné rozpětí hodnot (14–5000 mg/l) se synoviální koncentrace kyseliny hyaluronové v naší studii se významně neodlišovaly od hodnot publikovaného referenčního rozmezí 1500–3200 mg/l (8). Pacienti, kteří podstoupili artroskopii, mají významně vyšší koncentrace synoviální KH oproti pacientům s implantací kolenní endoprotézy (2581 vs 1763 mg/l, $p = 0,01$), nicméně korelace hodnot KH v obou skupinách s rtg nálezy není významná. Vyšší koncentrace synoviální KH u pacientů po artroskopii oproti pacientům s implantací totální endoprotézy lze vysvětlit tím, že pacienti, kterým byla provedena artroskopie, byli významně mladší, než pacienti, kteří podstoupili totální endoprotézu (průměrný věk 62 let oproti 69 let, $p = 0,03$, Mannův-Whitneyův U test). Pacienti s TEP ve větší míře vykazovali omezení hybnosti a trvalé klidové a noční bolesti klasifikované dle kritérií VAS (12). Pacienti podstupující artroskopii vykazovali předoperačně nižší skóre bolesti – rozmezí VAS 2–5/10, oproti pacientům k TEP, kteří vykazovali zvýšené skóre v rozmezí VAS 4–7/10.

Závažnost onemocnění lze často posoudit podle fyzikálně chemických kritérií (viskozita a viskoelasticita). Kyselina hyaluronová je významným ukazatelem viskozity a viskoelasticity. Nízké koncentrace kyseliny hyaluronové jsou spojeny s nízkou viskoelasticitou a viskozitou, a tedy se závažností onemocnění (1, 2, 11). Recentní studie ukazují, že alterace osmotických podmínek, konkrétně hypoosmotický stres v synoviální tekutině i chondrocytech, významně snižuje viskoelastické vlastnosti prostředí (3, 4, 10). Tamer et al. (10) popisují exponenciální vztah mezi koncentrací hyaluronanu a osmotickým tlakem a zmiňují také fakt, že významné změny v koncentracích KH vedou ke změnám osmotického tlaku. Osmotický tlak v buňkách lze charakterizovat prostřednictvím vyšetření osmolality. V naší studii jsme prokázali významnou pozitivní korelaci koncentrací KH a osmolality v synoviální tekutině (Spearmanův $r = 0,29$, $p = 0,015$, obr. 3). Tato korelace ukazuje možnost využití kyseliny hyaluronové jako ukazatele viskozity a viskoelasticity k posouzení klinického stavu pacientů s artrózou.

ZÁVĚR

Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou podstupujících artroskopický výkon jsou významně zvýšené oproti skupině pacientů podstupujících operaci totální endoprotézy kolene. Koncentrace kyseliny

hyaluronové v synoviální tekutině nekorelují se závažností onemocnění posuzovanou dle radiologických kritérií (rtg klasifikace dle Kellgrena a Lawrence). Koncentrace hyaluronové kyseliny v synoviální tekutině korelují se zvýšeným osmotickým tlakem a mohou být tedy doplňkovým ukazatelem závažnosti artrózy. Vzhledem k tomu, že studie byla prováděna na malém počtu pacientů, jedná se o studii pilotní a výsledky bude nutno ověřit na souboru s větším počtem pacientů.

Literatura

1. Blewis ME, Nugent-Derfus GE., Schmidt TA, Schumacher BL., Sah RL. A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater.* 2007;13:26–39.
2. Buhren BA, Schruppf H, Hoff NP, Bolke E, Hilton S, Gerber PA. Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *Eur J Med Res.* 2016;21:5:1–6.
3. Guilak F, Erickson GR, Ting-Beall HP. The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophys J.* 2002;82:720–727.
4. Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci.* 2019;6:192:1–24.
5. Kotaška J, Trě T. Kyselina hyaluronová – charakteristika, její význam a klinické aplikace / Hyaluronic acid – characteristics, its importance and clinical applications. *Ortopedie.* 2018;5:221–225.
6. Mazieres B, Garnero P, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, Nguyen M, Salles JP, Vignon E, Dougados M. Molecular markers of cartilage breakdown and synovitis at baseline as predictors of structural progression of hip osteoarthritis. The ECHODIAH Cohort. *Ann Rheum Dis.* 2006;65:354–359.
7. McCarty WJ, Cheng JC, Hansen BC, Yamaguchi T, Firestein GS, Masuda K, Sah RL. The biophysical mechanisms of altered hyaluronan concentration in synovial fluid after anterior cruciate ligament transection. *Arthritis Rheum.* 2012;64:3993–4003.
8. Palmieri B, Conrozier T, Vadala M, Laurino C. Synoviology: a new chapter entitled to joints care. *Asian Journal of Medical Sciences* 2017;8:1–10.
9. Pavelka K, Forejtova S, Olejarova M, Gatterova J, Senolt L, Spacek P, Braun M, Hulejova M, Stovickova J, Pavelkova A. Hyaluronic acid levels may have predictive value for the progression of knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2004;12:277–283.
10. Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol.* 2013;6:111–125.
11. Temple-Wong MM, Ren S, Quach P, Hansen BC, Chen AC, Hasegawa A, D'Lima D D, Koziol J, Masuda K, Lotz MK, Sah RL. Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Res Ther.* 2016;18:1–8.
12. Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs.* 2005;14:798–804.

Korespondující autor:

MUDr. Jan Kotaška

Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie

2. LF UK a FN v Motole

V Úvalu 84/1

150 06 Praha 5-Motol

E-mail: jan.kotaska@email.cz