

**Univerzita Karlova**

**2. lékařská fakulta**

Autoreferát disertační práce



**Využití biochemických markerů (Lipoproteinová fosfolipáza A2 a kyselina hyaluronová) k laboratorní diagnostice metabolických a degenerativních onemocnění pohybového aparátu**

Use of biochemical markers (Lipoprotein phospholipase A2 and hyaluronic acid) for laboratory diagnosis of metabolic and degenerative diseases of the musculoskeletal system

**Jan Kotaška**

Praha, 2021

Disertační práce byla vypracována v rámci *kombinovaného* studia doktorského studijního programu Experimentální chirurgie na Klinice dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2.lékařské fakulty Univerzity Karlovy a FN v Motole

Školitel:

prof. MUDr. Tomáš Trč, CSc., MBA

Klinika dětské a dospělé ortopedie a traumatologie 2.LF UK a FN Motol, V Úvalu 84, Praha 5, 15006, tel.:224432801, Tomas.Trč@fnmotol.cz

Oponenti:

Obhajoba se bude konat před komisí pro obhajoby oborové rady Experimentální chirurgie dne ..... v..... od ..... hod

Předsedou komise pro obhajobu disertační práce byl jmenován:

Předseda oborové rady a garant doktorského studijního programu:

prof. MUDr. Zdeněk Krška, DrSc.

I. chirurgická klinika - břišní, hrudní a úrazové chirurgie 1.LF UK a VFN, U Nemocnice 2, 12808, Praha 2, tel.: 224962200, zdenek.krska@lf1.cuni.cz

Děkan fakulty: prof.MUDr. Vladimír Komárek, CSc.

S disertační prací je možno se seznámit na Oddělení Ph.D. studia děkanátu 2. lékařské fakulty Univerzity Karlovy, V Úvalu 84, 150 06 Praha 5 (tel. 224 435 836).

## **Abstrakt**

Onemocnění pohybového aparátu patří v dnešní době k nejrozšířenějším chorobám. Předkládaná disertační práce se zabývá možností využití biochemických markerů, konkrétně lipoproteinové fosfolipázy A2 (LpPLA2) a kyseliny hyaluronové (HA) k diagnostice metabolických a degenerativních onemocnění pohybového aparátu.

Koncentrace LP-PLA2 v séru byly zvýšené u pacientů s deficitem kostní hmoty ve srovnání s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Sérové hladiny Lp-PLA2 negativně korelovaly se sníženými hladinami sérového osteokalcinu. Koncentrace HA v synoviální tekutině se nelišily od publikovaných referenční hodnot. Pacienti, kteří podstoupili artroskopii, měli významně zvýšenou koncentraci synoviální HA proti pacientům, kteří podstoupili totální náharu kolenního kloubu. HA pozitivně koreluje s osmotickým tlakem stanoveným prostřednictvím vyšetření osmolality v synoviální tekutině.

Koncentrace Lipoproteinové fosfolipázy A2 jsou zvýšené u pacientů s postižením kostní denzity a korelují s mírou závažnosti postižení kostní denzity vyjádřenou pomocí T skóre.

Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou podstupující artroskopický výkon jsou významně zvýšené oproti skupině pacientů podstupující 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.

**Klíčová slova:** kyselina hyaluronová, lipoproteinová fosfolipáza A2, metabolická onemocnění, degenerativní onemocnění, gonartróza, osteoporóza

## **Abstract**

Musculoskeletal disorders currently belong to the most common diseases. The presented work describes the use of biochemical markers (Lipoprotein phospholipase A2 and hyaluronic acid) for laboratory diagnosis of metabolic and degenerative diseases of the musculoskeletal system. Concentrations of LP-PLA2 were significantly elevated in the patients with bone resorption compared to the control group of healthy individuals. Serum levels of Lp-PLA2 also negatively correlated with decreased levels of serum osteocalcin in patients. HA concentrations in synovial fluid did not differ from published reference values in synovial fluid. Patients who underwent arthroscopy had significantly elevated synovial HA concentration than patients who underwent total knee endoprosthesis. HA positively correlates with osmotic pressure determined by examination of osmolality in synovial fluid. Lipoprotein phospholipase A2 concentrations are elevated in patients with bone density impairment. LpPLA2 concentrations correlate with the severity of bone density impairment expressed by the T score. Hyaluronic acid concentrations in patients with knee osteoarthritis undergoing arthroscopic surgery are significantly increased compared to the group of patients undergoing total knee arthroplasty. Concentrations of hyaluronic acid in synovial fluid do not correlate with the severity of the disease assessed according to radiological criteria (X-ray classification according to Kellgren and Lawrence). Hyaluronic acid concentrations in synovial fluid correlate with increased osmotic pressure and may therefore be an additional indicator of osteoarthritis severity.

**Keywords:** lipoprotein phospholipase A2, hyaluronic acid, metabolic diseases, degenerative diseases, knee osteoarthritis, osteoporosis

## Obsah

<b>1. Úvod</b> .....	<b>6</b>
<b>2. Cíle práce a hypotézy</b> .....	<b>7</b>
<b>3. Pacienti a metody</b> .....	<b>8</b>
<b>4. Výsledky</b> .....	<b>12</b>
<b>5. Diskuse</b> .....	<b>17</b>
<b>6. Závěry</b> .....	<b>20</b>
<b>7. Souhrn</b> .....	<b>21</b>
<b>Literatura</b> .....	<b>23</b>
<b>Seznam publikací autora</b> .....	<b>24</b>

## 1. Úvod

Onemocnění pohybového aparátu patří v dnešní době k nejrozšířenějším chorobám. Ve svém životě se s ním setká asi 30% populace a pro 3% znamená trvalé postižení. Metabolická onemocnění kostí jsou charakterizována abnormalitami v metabolismu vápníku anebo ve fyziologii kostních buněk. Tyto abnormality mají za následek kostní deformace a změnu biomechaniky kloubů vedoucí až k degenerativním onemocněním [1]. Statistiky ukazují, že degenerativní onemocnění kloubů postihuje 80% lidí ve věku nad 60 let a 6% ve věku 30 let [2]. Degenerativní onemocnění kloubů jsou heterogenní, zahrnují řadu patologických a patofyziologických jevů, což významným způsobem ztěžuje konkrétní klasifikaci. Současné postupy diagnostiky onemocnění zahrnují především klinické a radiodiagnostické metody. Nicméně komplexní studium struktury a funkce kloubní chrupavky má velký význam pro pochopení chorobných procesů a léčebných strategií zaměřených na prevenci destrukce kloubů. Současný ortopedický výzkum se zaměřuje na studium využití biochemických markerů. Ukazuje se, že laboratorní analýza biomarkerů může významně přispět nejen k pochopení patofyziologie a molekulární podstaty procesů spojených se vznikem degenerativních onemocnění, ale také k diagnostice onemocnění [3] [4].

Předkládaná disertační práce se zabývá možností využití biochemických markerů lipoproteinové fosfolipázy A2 a kyseliny hyaluronové k diagnostice metabolických a degenerativních onemocnění pohybového aparátu. Lipoproteinová fosfolipáza A2 je biomarker kardiovaskulárních onemocnění a jednou z pracovních hypotéz je posoudit vhodnost jejího využití jako dalšího biomarkeru osteoporózy vedle tradičních biomarkerů (CTx a Osteokalcin) [5, 6]. Kyselina hyaluronová je vysokomolekulární polysacharid, který 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 [7]. Druhou pracovní hypotézou bylo posoudit změny koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou z hlediska ukazatele závažnosti gonartrózy.

## **2. Cíle práce a hypotézy**

### **Cíle**

- 1. Stanovit koncentraci lipoproteinové fosfolipázy A2 u pacientů s defektem kostní denzity a posoudit možnost využití LpPLA2 jako doplňkového biochemického markeru osteoporózy**
- 2. Stanovit koncentraci kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině u pacientů s gonartrózou z hlediska ukazatele závažnosti postižení**

### **Hypotézy**

- 1. Lipoproteinová fosfolipáza A2 je biomarkerem kardiovaskulárních onemocnění, může být také markerem osteoporózy?**
- 2. Jsou popsány změny koncentrace kyseliny hyaluronové v séru u pacientů s degenerativními onemocněními. Mění se koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině v závislosti na závažnosti gonartrózy?**

### 3. Pacienti a metody

#### 1. Stanovení koncentrace fosfolipázy A2

##### **Materiál a metody**

Do studie bylo zařazeno 85 pacientů (4 muži, průměrný věk 56 let a 81 postmenopauzálních žen, průměrný věk 70 let) s klinicky diagnostikovaným deficitem kostní hmoty, diagnostikovaným dle kritérií WHO [8]. Pacienti byli rozděleni do tří skupin dle závažnosti deficitu kostní hmoty hodnocenou dle T-skóre. Skupinu I tvořilo 43 pacientů s osteoporózou, ve skupině II bylo 20 pacientů s osteopenií a ve skupině III bylo 22 pacientů s normální kostní denzitou. Padesát sedm pacientů dostávalo kombinovanou antiresorpční terapii a antilipidovou terapii (statiny a bisfosfonáty) a 11 pacientů mělo léčbu snižující hladinu lipidů (statiny). 17 pacientů bylo na terapii vitaminem D3. Srovnávací skupinu tvořilo 46 zdravých jedinců (14 mužů, průměrný věk 55 let a 32 žen, průměrný věk 47 let) bez známek kostní resorpce, a tedy bez jakékoli terapie [6].

##### *Vyšetření kostní denzity*

K vyhodnocení kostní denzity byla použita duální rentgenová absorpciometrie (DXA). Měření u pacientů proběhlo na kyčlích a páteři. Pacienti byli rozděleni do tří skupin podle jejich kostní denzity definované dle T-skóre vyjádřeného ve standardních odchytkách (SD) od průměru referenční populace. T-skóre nad  $-1$  SD je považováno za normální, T-skóre mezi  $-1$  a  $-2,5$  SD je klasifikováno jako osteopenie (nízká kostní hmota) a T-skóre pod  $-2,5$  SD je definováno jako osteoporóza.

##### *Biochemická analýza*

Vzorky pacientů byly odebrány venepunkcí do vakuových zkumavek. Po odběru byly vzorky centrifugovány ( $4^{\circ}\text{C}$  při 1500 G po dobu 10 minut). Následně byly stanovovány hladiny osteokalcinu v séru, celkového cholesterolu, hladiny LDL-cholesterolu a triacylglycerolů.

Před testováním na Lp-PLA2 byly alikvoty séra skladovány přes noc při  $2-8^{\circ}\text{C}$  a testovány následující den po odběru krve (2. den po odběru krve). Sérové hladiny Lp-PLA2 byly měřeny za podmínek uvedených v pokynech výrobce komerčně dostupným turbidimetrickým testem pro kvantitativní stanovení Lp-PLA2 (PLAC Test, Dia DexuS, San Francisco, USA) na automatickém biochemickém analyzátoru Advia 1800 (Siemens). Referenční hodnoty pro Lp-PLA2 poskytnuté výrobcem diagnostické soupravy byly nižší než 200 ng / ml.



Sérové hladiny osteokalcinu byly testovány komerčně dostupným elektrochemiluminiscenčním imunotestem (ECLIA Roche, Mannheim, Německo) na automatickém analyzátoru CO-BAS e411 (Roche). Sérové hladiny cholesterolu, LDL-cholesterolu a triglyceridů byly testovány komerčně dostupnými přímými enzymatickými testy na automatickém biochemickém analyzátoru Advia 1800 (Siemens) [6].

Koncentrace analytů jsou znázorněny v tabulce 1.

Koncentrace jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka a jako medián a interkvartilové rozpětí

**Tabulka 1: Koncentrace daných analytů ve sledovaném souboru**

	<b>Kontrolní skupina (n=46)</b>	<b>Pacienti (N=85)</b>	<b>p</b>
Průměrný věk (roky)	55	67	
Muži/Ženy	14/32	4/81	
S-Lp-PLA <sub>2</sub> (ng/mL)	192 (159–227)	225 (193–253)	<0.001
S-Osteokalcin (mg/L)	30.3 (17.6–37)	18.4 (14.2–20.6)	<0.05
S-LDL cholesterol (mmol/L)	3.1 (1.0)	2.9 (0.7)	
S-Cholesterol (mmol/L)	5.2 (1.0)	5.1 (0.7)	
S-Triacylglyceroly (mmol/L)	1.34 (1.02–1.88)	1.13 (0.86–1.5)	0.03

*Koncentrace jsou vyjádřeny jako průměr a směrodatná odchylka a jako medián a interkvartilové rozpětí*

### *Statistická analýza*

Shapiro-Wilkův test normality byl využit k vyhodnocení normality rozložení dat. Jednosměrná analýza rozptylu s Newmannovým-Keulsovým vícenásobným testem a nepárový T-test v případě normálního rozložení dat byly použity k vyhodnocení hladin Lp-PLA<sub>2</sub> ve vybraných skupinách. V případě neparametrické distribuce dat byly využity Kruskalův-Wallisův test nebo Mannův-Whitneyův U-test. Fisherův přesný test a poměr šancí byly použity k vyhodnocení závislosti mezi Lp-PLA<sub>2</sub> a lipidovými parametry (celkový cholesterol, LDL-cholesterol) věkem, pohlaví a terapií. Hodnota  $p < 0,05$  byla považována za statisticky významnou. K provedení statistické analýzy byl použit statistický software GraphPad Prism, verze 6.0 (San Diego, Kalifornie).

## 2. Stanovení kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou

### **Materiál a metody**

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) [9]. Charakteristika studovaného souboru je shrnuta v tabulce 2.

**Tabulka 2: Charakteristika sledovaného souboru**

	<b>Celkový soubor</b> N = 67	<b>Muži</b> N = 35	<b>Ženy</b> 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)	
	<b>Skupina 1</b> N = 18	<b>Skupina 2</b> N = 17	<b>Skupina 3</b> N = 16	<b>Skupina 4</b> 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

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

aliquotovány do 1ml zkumavek a zamraženy na -80°C do doby, než byla provedena analýza. Bezprostředně před analýzou byly aliquotované 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 viskoelastivity byla v odebraných primárních vzorcích měřena osmolalita pomocí kryoskopické metody na analyzátoru Advanced 2020[9].

#### *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. Multivariantní 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).

## 4. Výsledky

### 1. Stanovení koncentrace fosfolipázy A2

Sérové hladiny Lp-PLA2 byly měřeny v kontrolní skupině zdravých jedinců a u pacientů. Sérové hladiny Lp-PLA2 byly u pacientů významně zvýšeny ve srovnání se zdravými jedinci (225 ng / ml vs. 192 ng / ml,  $p < 0,001$  - Mannův-Whitneyův U-test).

Pacienti byli rozděleni do tří skupin (osteoporóza, osteopenie a normální kostní denzita) podle T-skóre odhadovaného z denzitometrie. T-skóre se vyjadřuje jako standardní odchylka kostní hustoty od referenční populace, jak bylo popsáno výše.

Mediány koncentrací Lp-PLA2 u pacientů s osteoporózou, osteopenií a normální kostní denzitou podle DXA byly významně zvýšené oproti kontrolní skupině s největším rozdílem u pacientů s osteoporózou a osteopenií (227 ng / ml a 222 ng / ml vs. 192 ng / ml,  $p = 0,004$  a  $p = 0,005$  - Mannův-Whitneyův U-test). Koncentrace Lp-PLA2 u pacientů s normální hustota kostí byla také zvýšena (221 ng / ml) ve srovnání s kontrolní skupinou (221 ng/mL vs 192 ng/m,  $p = 0,024$  - Mannův-Whitneyův U-test). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 3.

**Tabulka 3: Koncentrace LpPLA2 u pacientů s různým stupněm kostní denzity.**

Skupina	n	Lp-PLA2 (ng/mL)	p
Zdraví jedinci	46	192 (159–227)	
Pacienti	85	225 (193–253)	<0.001*
T > -1 (Normální kostní denzita)	20	221 (192–251)	0.024*
T = -1 až -2.5 (Osteopenie)	22	222 (198–250)	0.005*
T < -2.5 (Osteoporóza)	43	227 (187–263)	0.004*

*Výsledky jsou vyjádřeny jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil)*

*\* Hodnota  $p < 0.05$  je statisticky významná. Rozdíly v koncentracích u pacientů s různými stupni postižení kostní denzity dle DXA nejsou statisticky významné. ( $p = 0.76$  Newmann-Keulsův srovnávací test).*

U všech pacientů byl také měřen sérový osteokalcin jako marker osteosyntézy a remodelace kostí. Referenční intervaly pro sérový osteokalcin byly následující: muži od 50 do 70 let: 14–46 mg / l, ženy mladší než 55: 11–43 mg / l, ženy starší než 56: 15–46 mg / l.

Sérové hladiny Lp-PLA2 u pacientů se sníženými koncentracemi osteokalcinu v séru (koncentrace menší než referenční interval) byly porovnány s kontrolní skupinou zdravých jedinců. Dvacet čtyři pacientů z celé skupiny ( $n = 85$ ) mělo sérovou hladinu

osteokalcinu nižší, než je dolní hranice referenčního intervalu. Koncentrace Lp-PLA2 u všech pacientů s nízkou koncentrací osteokalcinu v séru byly významně zvýšené ve srovnání se zdravými jedinci (224 ng / ml vs. 192 ng / ml,  $p = 0,005$  - Mannův-Whitneyův U-test).

V podskupině pacientů s osteoporózou a sníženými sérovými hladinami osteokalcinu byla hladina Lp-PLA2 významně zvýšena, na rozdíl od kontrolní skupiny (260 pg / ml vs. 192 pg / ml  $p = 0,002$  - Mannův-Whitneyův U -test). Koncentrace LpPLA2 v ostatních skupinách (pacienti s osteopenie a normální kostní denzita) se sníženými sérovými hladinami osteokalcinu nedosáhly statistické významnosti ( $p = 0,49$  a  $p = 0,24$ ). Výsledky jsou shrnuty v tabulce 4.

**Tabulka 4: Koncentrace sérového Lp-PLA2 (ng/mL) u zdravých jedinců a u pacientů se sníženými hodnotami sérového osteokalcinu**

Skupina	n	Lp-PLA2 (ng/mL)	p
Zdraví jedinci	46	192 (159–227)	
Pacienti	24	224 (194–264)	0.005*
T < -2.5 (osteoporóza)	13	260 (214–295)	0.002*
T = -1 až -2.5 (Osteopenie)	6	198 (189–218)	0.49
T > -1 (normální kostní denzita)	5	213 (194–236)	0.24

*Výsledky jsou vyjádřeny jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil)*

*\* Hodnota  $p < 0.05$  je statisticky významná. Rozdíly u pacientů s osteoporózou osteopenií a normální kostní hustotou nebyly statisticky významné. ( $p = 0.11$ , Newmann-Keulsův srovnávací test).*

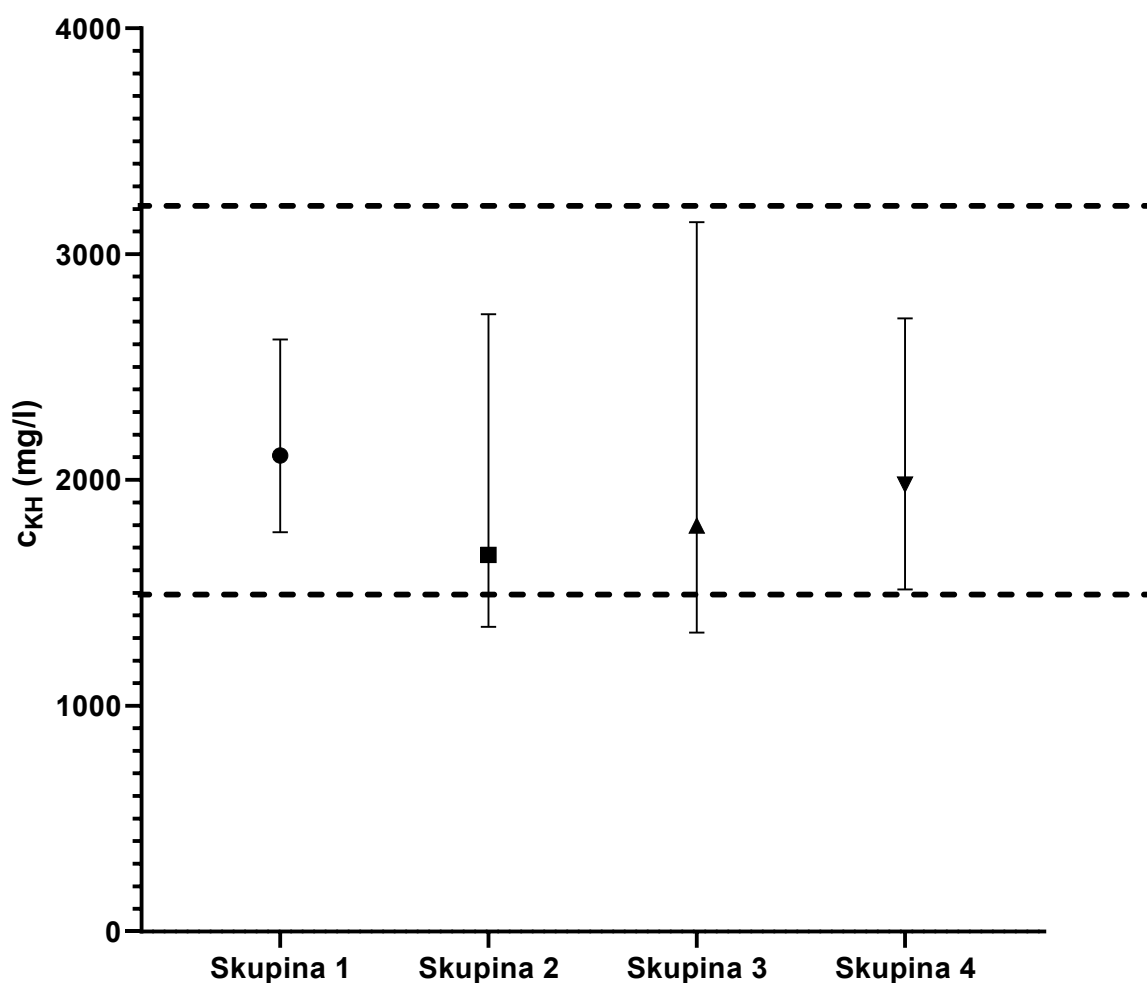
Koncentrace Lp-PLA2 nepřímě korelovala se sníženými hladinami sérového osteokalcinu (průměrná koncentrace Lp-PLA2 u pacientů se sníženým osteokalcinem = 237,2 ng / ml vs. průměrná koncentrace Lp-PLA2 u pacientů s normálním osteokalcinem = 220,8 ng / ml , Pearsonův korelační koeficient  $r = -0,28$ ,  $p = 0.02$ ).

Sledovali jsme souvislost elevace Lp-PLA2 s terapeutickými postupy (antiresorpční terapie a antiresorpční terapie kombinovaná s terapií snižující lipidy) a obě souvislosti byly signifikantní ( $p = 0,014$ , poměr šancí - OR = 3,36 a  $p = 0,007$ , OR = 2,97).

## 2. Stanovení kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou

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 2). 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 [10]. Koncentrace KH nezávisí na věku, pohlaví, stupni artrózy, ani na závažnosti onemocnění charakterizovaném nutností provedení totální endoprotézy.

**Obrázek 1: Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou (Skupina 1 – nejméně závažná forma onemocnění – Skupina 4, nejzávažnější forma onemocnění)**



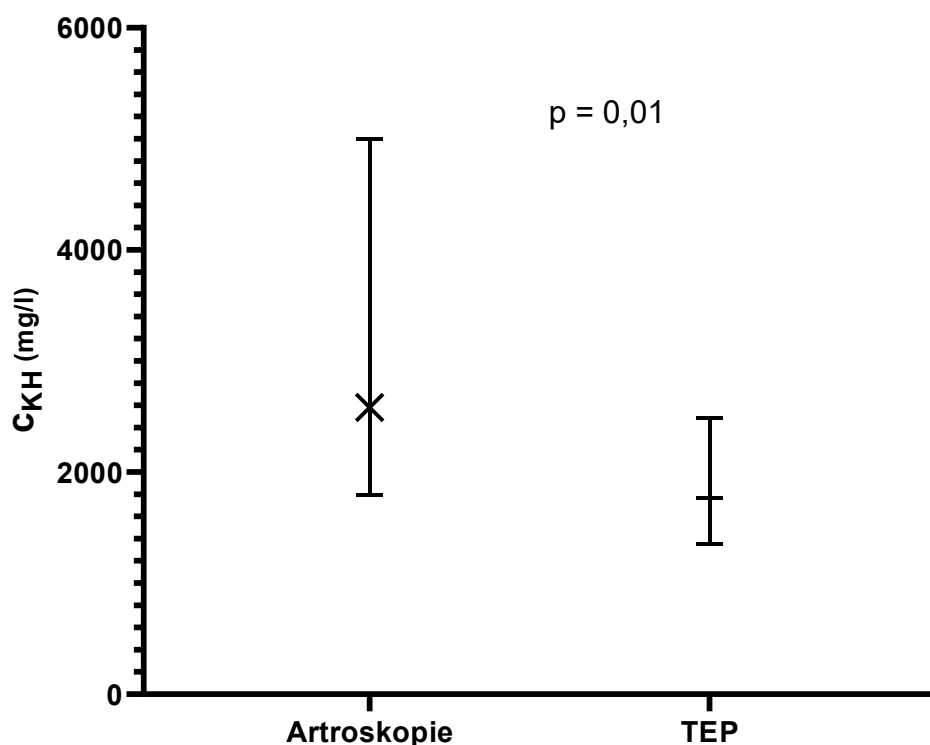
Data v grafu jsou vyjádřena jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil). Přerušované čáry znázorňují hodnoty referenčního intervalu 1500 - 3200 mg/l publikované ve studii Palmieriho a kol [10]. Rozdíly mezi koncentracemi KH v jednotlivých skupinách nebyly statisticky významné.

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) (viz obrázek 2).

**Obrázek 2: Distribuce hodnot koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů po artroskopii a po totální endoprotéze**

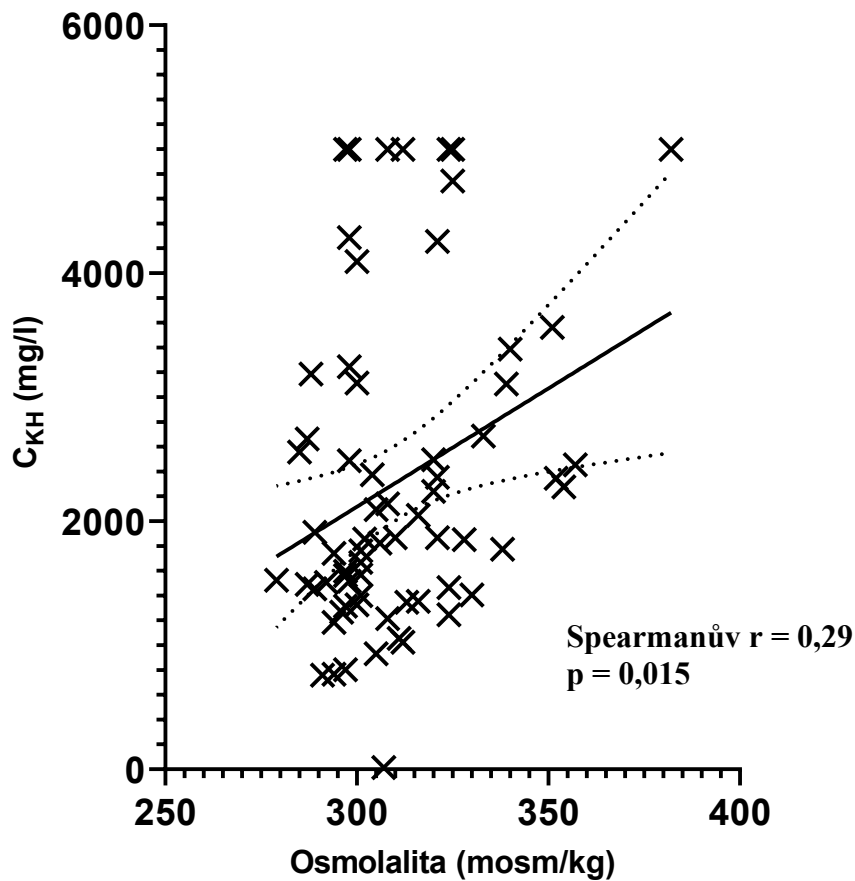


Data v grafu jsou vyjádřena jako medián a mezikvartilové rozpětí (25. a 75. percentil).

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.

**Obrázek 3: Vzájemná korelace koncentrací kyseliny hyaluronové a osmolality v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou**



Tečkované čáry vymezují oblast 95% intervalu spolehlivosti regresní přímky



## 5. Diskuse

První experiment se zabýval posouzení možností využití LpPLA2 jako doplňkového biomarkeru osteoporózy. Naše výsledky podporují důkazy o významné roli fosfolipázy A2 v metabolických procesech kostního metabolismu. Je dobře známo, že fosfolipáza A2 se účastní metabolismu prostaglandinů (zejména prostaglandinu E2) a působí jako stimulátor resorpce kostí. Lipoproteinová fosfolipáza A2 patří do podskupiny rodiny PLA2 nezávislé na Ca<sup>2+</sup> + s jedinečnou preferencí substrátu pro lysofosfolipidy, a proto se účastní procesů spojených se vznikem aterosklerózy. Lp-PLA2 se podílí na tvorbě dvou prozánětlivých mediátorů po oxidaci LDL - lysofosfatidylcholinu a oxidovaných mastných kyselin, a je tedy významným predikátorem vzniku s kardiovaskulárních onemocnění (5). Diagnostický rozhodovací limit (cut off) LpPLA2 definovaný pro využití LpPLA2 k diagnostice kardiovaskulárních onemocnění je stanovena na 200 ng/ml (6). Naše výsledky ukazují, že koncentrace sérové Lp-PLA2 u pacientů s poruchou remodelace kostí (podle DXA) se pohybovaly od 221 do 227 ng / ml, a byly tedy zvýšeny nad cut off hodnotu definovanou pro kardiovaskulární onemocnění. Toto zjištění by mohlo vést k otázce, zda je u pacientů se zhoršeným kostním metabolizmem také zvýšené riziko vzniku kardiovaskulárních příhod. Pacienti však byli v současné době klinicky vyšetřováni a léčeni standardní terapií (vitamin D3, bisfosfonáty, statiny). Bisfosfonáty jsou známy jako silné inhibitory kostní resorpce (7). Studie ukazují, že bisfosfonáty mohou také poskytovat ochranné účinky proti kardiovaskulárním příhodám včetně akutního infarktu myokardu (8). Je dobře známo, že snížené hladiny sérového osteokalcinu korelují s dlouhodobou léčbou bisfosfonáty. Tento pokles byl potvrzen ve skupině pacientů se zhoršenou kostní resorpcí, jak ukazuje tabulka 1. Zjistili jsme negativní korelaci hladin Lp-PLA2 se sníženými hladinami sérového osteokalcinu (Pearsonův korelační koeficient  $r = -0,28$ ). Toto naznačuje, že Lp-PLA2 může být dalším, slibným biochemickým markerem kostního metabolismu, je však třeba to ověřit na větším počtu vzorků. Aktivita Lp-PLA2 koreluje s parametry lipidů. V mnoha epidemiologických studiích (9–15) byla jasně prokázána pozitivní korelace LpPLA2 s LDL a celkovým cholesterolem. Tuto korelaci jsme potvrdili v naší studii (Pearsonův korelační koeficient  $r = 0,93$ ). Analyzovali jsme vzájemný vztah lipidových parametrů s hladinami Lp-PLA2 a zjistili jsme, že tento vztah není významný ( $p = 0,64$ , Fischerův přesný test, poměr šancí - OR = 0,76). To naznačuje, že zvýšená koncentrace Lp-PLA2 v naší skupině pacientů se sníženou kostní denzitou byla nezávislá na hladinách LDL-cholesterolu a celkového cholesterolu. Přestože je kontrolní

skupina mladší než skupina pacientů (55 vs. 67 let), nebyla zjištěna významná souvislost hladin Lp-PLA2 s věkem (OR = 1,48, p = 0,49). Koncentrace Lp-PLA2 nezávisí na pohlaví (OR = 1, p = 0,67). Sérové hladiny Lp-PLA2 významně souvisely s terapeutickými postupy. Zjistili jsme významnou souvislost hladin Lp-PLA2 s kombinovanou antiresorpcí a s terapií snižující lipidy pomocí bisfosfonátů (OR = 2,97, p = 0,007). Vztah koncentrací Lp-PLA2 s antiresorpční terapií pomocí bisfosfonátů byl také významný (OR = 3,36, p = 0,014). Naopak souvislost s terapií statiny a suplementací vitamínem D3 nebyla významná (p = 0,09 a p = 0,15). Je nutné zmínit, že využití Lp-PLA2 jako markeru kostní resorpce v rutinní laboratorní praxi zahrnuje některé analytické specifikace včetně manipulace se vzorky, skladování vzorků a doby analýzy. Přestože je Lp-PLA2 transportován ve vazbě buď s LDL, nebo HDL a lipoproteinem (a), je nutné provést vlastní stanovení až po stabilizaci vzorku během 16 hodin při 2–8 °C a nejlépe mezi 16–72 hodinami po odběru krve, po vyloučení Lp-PLA2 z vazby na lipoproteiny. Alternativně lze stanovení provést druhý den po zmrazení přes noc na méně než –20 °C.

Ve druhém experimentu byla stanovena koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině u pacientů s gonartrózou a byla posuzována možnost využití kyseliny hyaluronové pro sledování závažnosti postižení. Recentní studie ukazují zásadní význam kyseliny hyaluronové v posouzení závažnosti postižení. Koncentrace kyseliny hyaluronové korelují s mírou postižení [11-13]. Je prokázána také významná negativní závislost kyseliny hyaluronové na věku [13]. 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 68 pacientů). Druhým vysvětlením týkajícím se nevýznamného rozdílu v synoviálních koncentracích kyseliny hyaluronové může být 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 [11, 13, 14]) 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 [10]. 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 [15]. 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 [11, 13, 14]. Recentní studie ukazují, že alterace osmotických podmínek, konkrétně hypoosmotický stres v synoviální tekutině i chondrocytech, významně snižuje viskoelastické vlastnosti prostředí [12, 16, 17]. Tamer a kol [17] popisují exponenciální vztah mezi koncentrací hyaluronanu a osmotickým tlakem a zmiňují také fakt, že významné změny v koncentracích KH vedou k 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  $r = 0,29$ ,  $p = 0,015$ , obrázek 4). Tato korelace ukazuje možnost využití kyseliny hyaluronové jako ukazatele viskozity a viskoelasticity k posouzení klinického stavu pacientů s artrózou.

## **6. Závěry**

**1. Koncentrace Lipoproteinové fosfolipázy A2 jsou zvýšené u pacientů s postižením kostní denzity.**

**Koncentrace LpPLA2 korelují s mírou závažnosti postižení kostní denzity vyjádřenou pomocí T skóre. (Nejvyšší hodnoty jsou u pacientů s osteoporózou vyjádřenou hodnotou T-skóre < 2,5).**

**Fosfolipáza asociovaná s lipoproteiny (LpPLA2) má významnou úlohu v metabolických procesech kostního metabolismu a může být doplňkovým biochemickým markerem u pacientů s postižením kostní denzity diagnostikované pomocí DXA. (Koncentrace LpPLA2 korelují s ukazateli kostní resorpce, konkrétně byla prokázána nepřímá korelace se sérovými hladinami osteokalcinu)**

**2. Koncentrace kyseliny hyaluronové u pacientů s gonartrózou podstupující artroskopický výkon jsou významně zvýšené oproti skupině pacientů podstupující 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**

## 7. Souhrn

Prvním cílem práce bylo stanovit koncentraci lipoproteinové fosfolipázy A2 v séru u pacientů s osteoporózou a potvrdit hypotézu, zdali může lipoproteinová fosfolipáza A2, která je nejčastěji využívána jako ukazatel kardiovaskulárních onemocnění, být doplňkovým ukazatelem u pacientů s defektem kostní denzity. Výsledky ukázaly vysoké koncentrace LpPLA2 v séru pacientů s deficitem kostní hmoty a potvrdily korelaci se stupněm závažnosti postižení kostní denzity vyjádřeným pomocí T-skóre (Nejvyšší hodnoty jsou u pacientů s osteoporózou vyjádřenou hodnotou T-skóre  $< 2,5$ ). Zároveň byla potvrzena negativní korelace sérové LpPLA2 se sníženými hladinami osteokalcinu, což potvrzuje hypotézu využití LpPLA2 jako dalšího z možných biochemických ukazatelů vhodných ke sledování změn kostní denzity.

Druhý cíl práce se týkal posouzení koncentrací kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině pacientů s gonartrózou z hlediska posouzení závažnosti postižení a ověření hypotézy o změně koncentrací kyseliny hyaluronové v závislosti na závažnosti gonartrózy posuzované dle radiologických kritérií (RTG klasifikace dle Kellgrena a Lawrence). Hypotéza byla částečně potvrzena. Ačkoliv se koncentrace kyseliny hyaluronové nelišila ve skupinách charakterizovaných dle závažnosti postižení, je zřejmé, že pacienti, kteří podstoupili artroskopii, měli významně zvýšenou synoviální koncentraci kyseliny hyaluronové než pacienti, kteří podstoupili totální endoprotézu. Pro potvrzení hypotézy svědčí i nalezená korelace synoviálních koncentrací kyseliny hyaluronové s osmotickým tlakem, což charakterizuje přímý vztah kyseliny hyaluronové k viskozitě a viskoelasticitě významným způsobem přispívá k posouzení klinického stavu pacientů s artrózou. Prezentované výsledky potvrzují možnost využití lipoproteinové fosfolipázy A2 jako doplňkového diagnostického biomarkeru pro sledování změn kostní denzity u pacientů s osteoporózou. I přesto, že se synoviální koncentrace kyseliny hyaluronové nekorelují se závažností gonartrózy, lze je na základě jejich zvýšených koncentrací u pacientů po artroskopii a jejich korelaci se synoviální osmolalitou považovat za doplňkové ukazatele závažnosti artrózy.

## Summary

The first aim of the study was to determine the concentration of lipoprotein phospholipase A2 in the serum of patients with osteoporosis and to confirm the hypothesis whether lipoprotein phospholipase A2, which is most often used as an indicator of cardiovascular disease, can be an additional indicator in patients with bone density impairment. The results showed high serum concentrations of LpPLA2 in patients with bone deficiency and confirmed the correlation with the degree of severity of bone density impairment expressed by T-score (highest values are in patients with osteoporosis expressed by T-score  $<2.5$ ). At the same time, a negative correlation of serum LpPLA2 with reduced osteocalcin levels was found, and this finding confirms the hypothesis of the use of LpPLA2 as an additional biochemical indicator for monitoring changes in bone density.

The second goal was to assess the concentrations of hyaluronic acid in the synovial fluid of patients with gonarthrosis with respect to the severity of the disease and verify the hypothesis of changes in hyaluronic acid concentrations depending on the severity of knee osteoarthritis assessed by radiological criteria (X-ray classification according to Kellgren and Lawrence). The hypothesis was partially confirmed. Although hyaluronic acid levels did not differ in the groups characterized by severity of the knee osteoarthritis, it was confirmed that patients who underwent arthroscopy had significantly increased synovial hyaluronic acid levels than patients who underwent total knee replacement. The hypothesis found is also supported by the correlation of synovial concentrations of hyaluronic acid with osmotic pressure, which characterizes the direct relationship of hyaluronic acid to viscosity and viscoelasticity contributes to the assessment of the clinical condition of patients with osteoarthritis. The presented results confirm the possibility of using lipoprotein phospholipase A2 as an additional diagnostic biomarker for monitoring changes in bone density in patients with osteoporosis. Although synovial concentrations of hyaluronic acid do not correlate with the severity of knee osteoarthritis, they can be considered as additional indicators of osteoarthritis severity due to their increased concentrations in arthroscopic patients and their correlation with synovial osmolality.

## Literatura

- [1] Moya-Angeler J, Lane JM, Rodriguez JA. Metabolic Bone Diseases and Total Hip Arthroplasty: Preventing Complications. *J Am Acad Orthop Surg* 2017; 25:725-735.
- [2] Anandacoomarasamy A, Bagga H, Ding C *et al.* Predictors of clinical response to intraarticular Hylan injections -- a prospective study using synovial fluid measures, clinical outcomes, and magnetic resonance imaging. *J Rheumatol* 2008; 35:685-90.
- [3] Cuellar V, Strauss E. Molecular Biomarkers of Knee Pathology. *Bull Hosp Jt Dis* (2013) 2013; 75:30-36.
- [4] Convill JG, Tawy GF, Freemont AJ, Biant LC. Clinically Relevant Molecular Biomarkers for Use in Human Knee Osteoarthritis: A Systematic Review. *Cartilage* 2020:1947603520941239.
- [5] Davidson MH, Corson MA, Alberts MJ *et al.* Consensus panel recommendation for incorporating lipoprotein-associated phospholipase A2 testing into cardiovascular disease risk assessment guidelines. *Am J Cardiol* 2008; 101:51F-57F.
- [6] Kotaška K, Kolářová J, Jedličková B *et al.* Lipoprotein-associated phospholipase A2 is increased in patients with impaired bone density. *Journal of Medical Biochemistry* 2014; 33:317-322.
- [7] Kotaška J, Trč T. Kyselina hyaluronová – charakteristika, její význam a klinické aplikace / Hyaluronic acid – characteristics, its importance and clinical applications. *Ortopedie* 2018; 5:221-225.
- [8] Assessment of fracture risk and its application to screening for postmenopausal osteoporosis. Report of a WHO Study Group. *World Health Organ Tech Rep Ser* 1994; 843:1-129.
- [9] Kotaška J, Hanousková L, Průša R *et al.* Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s gonartrózou. *Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Čechoslovaca* 2021; 88:85-88.
- [10] 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.
- [11] Buhren BA, Schrumpf H, Hoff NP *et al.* Hyaluronidase: from clinical applications to molecular and cellular mechanisms. *Eur J Med Res* 2016; 21:5.
- [12] Gupta RC, Lall R, Srivastava A, Sinha A. Hyaluronic Acid: Molecular Mechanisms and Therapeutic Trajectory. *Front Vet Sci* 2019; 6:192.
- [13] Temple-Wong MM, Ren S, Quach P *et al.* Hyaluronan concentration and size distribution in human knee synovial fluid: variations with age and cartilage degeneration. *Arthritis Res Ther* 2016; 18:18.
- [14] Blewis ME, Nugent-Derfus GE, Schmidt TA *et al.* A model of synovial fluid lubricant composition in normal and injured joints. *Eur Cell Mater* 2007; 13:26-39.
- [15] Williamson A, Hoggart B. Pain: a review of three commonly used pain rating scales. *J Clin Nurs* 2005; 14:798-804.
- [16] Guilak F, Erickson GR, Ting-Beall HP. The effects of osmotic stress on the viscoelastic and physical properties of articular chondrocytes. *Biophys J* 2002; 82:720-7.
- [17] Tamer TM. Hyaluronan and synovial joint: function, distribution and healing. *Interdiscip Toxicol* 2013; 6:111-25.

## Seznam publikací autora

### 1. Seznam publikací týkajících se tématu disertační práce

#### Publikace v časopisech s definovaným impakt faktorem

**KOTAŠKA J., HANOUSKOVÁ L., PRUSA R., TRČ T., KOTAŠKA K.** Koncentrace kyseliny hyaluronové v synoviální tekutině jako ukazatel závažnosti a stupně postižení u pacientů s enartrózou. Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca, 2021, vol.88, s. 85-88, **IF = 0,531.**

**KOTAŠKA K., KOLAROVA J., JEDLIČKOVÁ B., ČEPOVÁ J., KOTAŠKA J., PRŮŠA R.** Lipoprotein associated phospholipase A2 is increased in patients with impaired bone density. Journal of Medical Biochemistry, 2014, vol. 33, s. 317-322. ISSN 1452-8258, **IF = 1,065.**

#### Publikace v recenzovaných časopisech

**KOTAŠKA J., TRČ T.** Kyselina hyaluronová - charakteristika, její význam a klinické aplikace. Ortopedie, 2018, vol. 12, s. 221-225. ISSN 1802-1727. 2018/2019

### 2. Seznam ostatních publikací autora

#### Publikace v časopisech s definovaným impakt faktorem

**HAVLAS V., KOTAŠKA J., KONÍČEK P., TRČ T., KONRADOVA S., KOČÍ Z., SYKOVÁ E.** Použití kultivovaných lidských autologních kmenových buněk kostní dřeni při rekonstrukci ruptury rotátorové manžety - studie bezpečnosti metody, předběžné výsledky. Acta Chirurgiae Orthopaedicae et Traumatologiae Českoslovaca, 2015, vol. 82, s. 229-234. ISSN 0001-5415, **IF = 0,552**

#### Publikace v recenzovaných časopisech

**KOTAŠKA J., TRČ T.** Zkrácení kosti jako operační řešení difference délek končetin. Časopis lékařů českých, 2016, vol. 155, s. 417-422. ISSN 0008-7335

**KOTAŠKA J., TRČ T.** Transplantace autologních chondrocytů a metody jejich kultivace. Ortopedie, 2011, vol. 5, s. 216-219. ISSN 1802-1727.

**KOTAŠKA J., PAŠA L., TRČ T., HAVLAS V.** Fixace zlomenin proximálního humeru za použití PHILOS dlahy: dvouleté výsledky ze 3 center. Ortopedie, 2014, vol. 8, s. 8-12. ISSN 1802-1727.



HANUS M., KOTAŠKA J., TRČ T., HAVLAS V. Hodnocení stabilizace zlomenin Prevotovými pruty. Ortopedie Supplementum, 2010, vol. 4, s. 46-46. ISSN 1802-1727.

SCHOVANEK J., TRČ T., KOTAŠKA J., PADĚRA R. Diagnostika a terapie benigních kostních nádorů. Postgraduální medicína, 2008, vol. 10, s. 897-905. ISSN 1212-4184.

TRČ T., KOTAŠKA J., SEVASTYANOVA O., HAVLAS V. Klinické využití růstových faktorů získaných z krevní plazmy v ortopedii. Ortopedie, 2013, vol. 7, s. 114-116. ISSN 1802-1727.

TRČ T., HANUS M., KOTAŠKA J. Peroperační periprotetické zlomeniny. Ortopedie, 2014, vol. 8, s. 74-79. ISSN 1802-1727.

SCHOVANEK J., TRČ T., KOTAŠKA J., PADĚRA R. Sekundární osteosarkom v terénu primární chronické osteomyelitidy. Ortopedie, 2009, vol. 3, s. 140-144. ISSN 1802-1727.

SCHOVANEK J., TRČ T., KOTAŠKA J., PADĚRA R., DERFLEROVÁ K., KVÁŠOVÁ S. Infekční komplikace způsobené multirezistentními kmeny MRSA, příčina, prevence a možnosti terapie. Ortopedie, 2010, vol. 4, s. 29-33. ISSN 1802-1727.

HAVLAS V., KOTAŠKA J., PADĚRA R., SCHEJBALOVÁ A. Vrozené poruchy a anatomické variace pately u dětí a dospívajících. Pediatrie pro praxi, 2012, vol. 13, s. 29-32. ISSN 1213-0494.

HAVLAS V., KOTAŠKA J., LESNÝ P., SEVASTYANOVA O., TRČ T. Vliv PRP na hojení rotátorové manžety - první zkušenosti. Ortopedie, 2013, vol. 7, s. 96-99. ISSN 1802-1727.