

Łukasz Łapaj

**Wydzielanie wybranych cytokin w hodowlach chondrocytów
i synowocytów stawów kolanowych z chorobą
zwyrodnieniową oraz stawów z uszkodzonym więzadłem
krzyżowym przednim**

Rozprawa doktorska

Promotor : prof. dr hab. med. Małgorzata Wierusz – Kozłowska

Z Kliniki Ortopedii Ogólnej, Onkologicznej i Traumatologii

Katedry Ortopedii i Traumatologii

Uniwersytetu Medycznego im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu

Kierownik Katedry : prof. dr hab. med. Andrzej Joachim Pucher

Kierownik Kliniki : prof. dr hab. med. Małgorzata Wierusz – Kozłowska

Poznań 2011

SPIS TREŚCI

1. WSTĘP	1
1.1 Definicja choroby zwyrodnieniowej i jej epidemiologia	1
1.2 Współczesne poglądy na etiopatogenezę choroby zwyrodnieniowej	2
1.2.1 Udział czynników genetycznych, mechanicznych oraz wpływ starzenia się organizmu	2
1.2.2. Rola mediatorów zapalnych w rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawów	6
1.2.3 Rola mediatorów lipidowych, wolnych rodników i tlenu azotu w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów	10
1.2.4. Adipocytokiny i ich rola w procesie zwyrodnieniowym	14
1.2.5. Reakcja regeneracyjna tkanek stawowych w przebiegu procesu zwyrodnieniowego	16
1.2.6. Stan zapalny błony maziowej i chrząstki stawowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej	18
1.2.7. Rola kości podchrzęstnej i innych tkanek stawowych w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów	21
1.2.8. Podsumowanie	23
2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY	24
3. MATERIAŁ I METODA	26
3.1. Materiał	26
3.2. Metodyka	32
3.2.1. Ocena kliniczna pacjentów	32
3.2.2. Pobieranie materiału do badań, izolacja komórek	33
3.2.3. Prowadzenie hodowli komórkowych	36
3.2.4. Oznaczenia stężeń badanych cytokin z użyciem metody ELISA	37
3.2.5. Analiza statystyczna	39
3.2.6. Etyka badań naukowych	40
4. WYNIKI	41
4.1 Interleukina 1 - beta	41
4.1.1. Charakterystyka produkcji IL – 1 beta w hodowli synowocytów i chondrocytów stawów kolanowych objętych chorobą zwyrodnieniową (grupa I).	41
4.1.2 Charakterystyka produkcji IL – 1 beta w hodowli synowocytów i chondrocytów stawów kolanowych z uszkodzonym więzadłem krzyżowym przednim (grupa II)	43
4.1.3 Porównanie stężenia IL – 1 beta w materiale od obu grup pacjentów	45
4.2 Leptyna	48
4.2.1 Charakterystyka produkcji leptyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa I)	48
4.2.2. Charakterystyka produkcji leptyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (grupy II)	50
4.2.3 Porównanie stężeń leptyny w próbkach pobranych od obu grup pacjentów	52
4.3 Adiponektyna	55
4.3.1 Charakterystyka produkcji adiponektyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa I).	55
4.3.2 Charakterystyka produkcji adiponektyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (grupa II)	57
4.3.3 Porównanie stężeń adiponektyny w próbkach pobranych od pacjentów z obu grup	59

4.4. Korelacje stężeń badanych białek z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi	62
4.4.1. Korelacje stężeń badanych białek z progresją cech radiologicznych choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego wyrażoną w skalach Kellgrena – Lawrenca I Ahlbäcka	62
4.4.2. Korelacje stężeń badanych białek w poszczególnych próbkach, ze wskaźnikiem masy ciała pacjentów z grupy I i II.	64
4.4.3. Wzajemne korelacje między parametrami laboratoryjnymi u pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych (grupa I)	65
4.4.4. Wzajemne korelacje między parametrami laboratoryjnymi u pacjentów uszkodzeniem ACL (grupa II)	66
5. OMÓWIENIE	67
5.1. Omówienie doboru chorych	67
5.2. Omówienie stosowanej metodyki badań	70
5.3. Omówienie wyników badań	75
5.3.1. Omówienie wyników oznaczeń interleukiny – 1 beta	75
5.3.2. Omówienie wyników oznaczeń leptyny	79
5.3.3. Omówienie wyników oznaczeń adiponektyny	80
5.3.4. Omówienie zależności między wynikami laboratoryjnymi	83
5.3.5. Omówienie zależności między parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi	83
6. WNIOSKI	86
7. PIŚMIENICTWO	87
8. STRESZCZENIE	99

1. WSTĘP

1.1 Definicja choroby zwyrodnieniowej i jej epidemiologia

Choroba zwyrodnieniowa to najczęstsza patologia stawów, a także najczęstsza przyczyna bólów i niepełnosprawności wśród ludności krajów rozwiniętych [1]. Jest ona przewlekłym zaburzeniem równowagi między procesami degeneracji i regeneracji w obrębie chrząstki stawowej z towarzyszącymi zmianami w obrębie pozostałych struktur stawu, będących końcowym stadium wielu heterogennych procesów patologicznych. Etiologia jest wieloczynnikowa, a w patogenezie biorą udział zarówno czynniki metaboliczne jak i mechaniczne [2;3].

Populacyjne badania dotyczące częstości występowania choroby zwyrodnieniowej stawów przeprowadzone w Norwegii wykazały, że kliniczne lub radiologiczne jej cechy stwierdza się nawet u 12,8% populacji osób po 25 roku życia, przy czym najczęściej w obrębie stawu kolanowego (7,1%), biodrowego (5,5%) i drobnych stawów ręki (4,3%) [1]. Z kolei badania prowadzone w USA wykazały, że kliniczne i radiologiczne cechy choroby zwyrodnieniowej stawu biodrowego i kolanowego stwierdza się w odpowiednio 5,9% i 7,3% osób w grupie wiekowej 45-54 lata, natomiast w grupie powyżej 75 roku życia jest to już 17,0% i 32,8%, przy czym w obu grupach wiekowych radiologiczne cechy choroby zwyrodnieniowej bez objawów klinicznych stwierdzano jeszcze częściej [4;5]. Badania prowadzone w Grecji wykazały że odsetek pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych, biodrowych i ręki wynosił w grupie osób w wieku 19-44 lata odpowiednio 0,3%, 0,1% i 0,1% [6]. W tym samym badaniu dla pacjentów w wieku 75 – 79 lat udział kształtował się na następującym poziomie: 27,6%, 3,0%, 6,5% [6]. Starzenie się społeczeństw krajów rozwiniętych powoduje, że choroba zwyrodnieniowa stawów stała się jednym z najważniejszych schorzeń cywilizacyjnych [1;6].

Jak dotychczas nie opracowano żadnych leków modyfikujących przebieg choroby zwyrodnieniowej lub skutecznie zatrzymujących jej przebieg [7].

1.2 Współczesne poglądy na etiopatogenezę choroby zwyrodnieniowej

Prowadzone od wielu lat badania pozwoliły na określenie czynników wpływających na rozwój i przebieg choroby zwyrodnieniowej. Zalicza się do nich czynniki genetyczne, mechaniczne, zapalne oraz zmiany wsteczne związane z wiekiem [3;8;9].

1.2.1 Udział czynników genetycznych, mechanicznych oraz wpływ starzenia się organizmu.

Choroba zwyrodnieniowa stawów charakteryzuje się dziedzicznością o charakterze złożonym. Badania nad dziedziczeniem choroby zwyrodnieniowej wskazują, że komponenta genetyczna może być współodpowiedzialna za rozwój choroby zwyrodnieniowej w ok. 35-40% dla stawu kolanowego, natomiast nawet w 60% dla stawu biodrowego [10-14].

Geny, których uszkodzenia lub warianty mają wpływ na rozwój choroby zwyrodnieniowej stawów, można podzielić na grupy związane ze szlakiem patogenetycznym choroby (IL1, COX-2, IL6, IL10), tworzeniem mechanicznej odporności tkanki chrzęstnej (COL2A1, CLIP, COMP), sygnalizacją wewnątrzkomórkową (FRZB, LRP5), przebudową i wzrostem kości (BMP2, BMP5, GDF5), oraz oddziaływaniem i odpornością na działanie proteaz (ADAM12, TNA) [12;13;15;16]. Jak dotychczas najdokładniej przebadano geny FRZB i GDF5 [15;17-19]. Geny te kodują białka biorące udział w szlaku sygnalizacji komórkowej Wnt, który reguluje kataboliczne przemiany w obrębie chondrocytów [19;20]. Nie wszystkie dotychczas opublikowane prace jednoznacznie wskazują na udział określonych alleli tych genów w rozwoju choroby zwyrodnieniowej, część badaczy wskazuje natomiast większą rolę, jaką mają pełnić te geny u kobiet [15;21]. Mimo dużej dynamiki badań genetycznych dotyczących patogenezy choroby

zwyrodnieniowej, nadal nie określono precyzyjnie genów odpowiedzialnych za jej rozwój.

Czynniki mechaniczne początkowo wskazywane były jako podstawowa składowa łańcucha patogenetycznego choroby zwyrodnieniowej. Badania biomechaniczne prowadzone na hodowlach chrząstki wykazały, że przerywane cykliczne obciążanie stawu w zakresie wartości fizjologicznych jest warunkiem utrzymania homeostazy macierzy zewnątrzkomórkowej przez chondrocyty, które produkują wówczas kolagen typu II i agrekan [22-26]. Z kolei obciążanie ciągle statyczne lub przerywane, ale w zakresie przekraczającym wartości fizjologiczne przesuwają równowagę metaboliczną w kierunku katabolizmu. Chondrocyty zmniejszają wówczas produkcję kolagenu i agrekanu, zwiększają natomiast produkcję metaloproteinaz i tlenku azotu (NO), który stymuluje ich apoptozę [25-28]. Wzorzec cyklicznego obciążania tkanki chrzęstnej jest także koniecznym warunkiem właściwej cyrkulacji płynu stawowego zapewniającej dopływ tlenu i składników odżywczych do chondrocytów.

Unikalne właściwości viskoelastyczne chrząstki umożliwiają jej odkształcanie się w czasie obciążania, co pozwala pochłonąć część energii kinetycznej, a także zwiększyć powierzchnię przylegania kości tworzących staw [2;8;29;30]. Do odkształcenia plastycznego chrząstki dochodzi jednak wówczas, gdy siła działa na nią odpowiednio długo. Tak sama siła przyłożona do chrząstki w krótkim czasie uniemożliwia jej plastyczne odkształcenie i gdy udar przekracza granice fizjologiczne, dochodzi do nierównomiernego rozłożenia sił, uszkodzenia chrząstki, prowadząc także do mikrołamań kości podchrzęstnej i dalszej jej przebudowy [8;29;30]. W warunkach fizjologicznych szczytowe siły obciążające chrząstkę stawową rozkładają się w czasie z uwagi na buforujące rozciąganie mięśni oddziaływujących na staw, dzięki czemu część obciążeń zostaje pochłonięta [31;32]. W badaniach doświadczalnych potwierdzono, że u części populacji w trakcie chodzenia występują niewielkie zaburzenia odruchowej koordynacji czynności mięśni działających na staw kolanowy, co skutkuje zwiększeniem przenoszonych sił o 30%. Ponadto część badaczy wskazuje, że osłabienie mięśnia czworogłowego może być jednym z czynników ryzyka rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego, a nie tylko jej następstwem [2;31;33]. Udział zaburzeń równowagi nerwowo – mięśniowej w

rozwoju ChZS nie jest jednak dostatecznie przebadany, a więc trudno jednoznacznie ocenić ich udział w patogenezie tej choroby.

Uzyskano dowody wskazujące, że niestabilność stawu, zarówno wrodzona jak i nabyta, oraz niezborność z powodu deformacji rozwojowej, czy pourazowej, jest istotnym czynnikiem ryzyka rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawu [2;32;34-39]. W tych przypadkach dochodzi do nieprawidłowego działania sił biomechanicznych w obrębie stawu, co skutkuje miejscowym przeciążeniem jego struktur. Obserwację tę potwierdza szereg badań doświadczalnych przeprowadzonych na zwierzętach, a przede wszystkim obserwacja naturalnej historii wtórnych zmian zwyrodnieniowych [39-41]. Wykazano że w przypadku stawu biodrowego istotne znaczenie ma przede wszystkim niezborność stawu – jaką obserwuje się np. w rozwojowej dysplazji stawu biodrowego, czy konflikcie szyjkowo – panewkowym. Z kolei w przypadku stawu kolanowego wydaje się, że główną rolę w patogenezie choroby zwyrodnieniowej odgrywa niestabilność pochodzenia więzadłowego [34;38;39;41-43].

Do prawidłowego funkcjonowania chrząstki stawowej konieczna jest stała synteza składników jej macierzy, za co odpowiedzialne są chondrocyty. Wykazano jednak, że ich aktywność metaboliczna, potencjał regeneracyjny oraz liczba komórek chrząstki zmniejsza się z wiekiem, co skutkuje pogorszeniem właściwości mechanicznych chrząstki i prowadzi do jej przeciążenia [44-46]. Wraz ze starzeniem się organizmu dochodzi także do zmniejszenia wydzielania czynników wzrostu, takich jak IGF-1, TGF-beta, BMP-2. Wraz z wiekiem osłabia się również wrażliwość chondrocytów na te czynniki, co upośledza procesy regeneracji w obrębie chrząstki. Jednym z istotnych dla homeostazy macierzy chrząstki czynników wzrostowych jest IGF-1, który stymuluje syntezę kolagenu i proteoglikanów. Jego oddziaływanie na chrząstkę uzależnione jest od poziomu białek wiążących IGF (IGF-BP), których stężenie wzrasta wraz z wiekiem i rozwojem choroby zwyrodnieniowej stawów [47;48]. W tych warunkach w obrębie chondrocytów nasilają się procesy kataboliczne, w obrębie macierzy narasta stężenie wolnych rodników tlenowych oraz czynników hamujących wydzielanie kolagenu II i agrekanów. Równolegle dochodzi do akumulacji zestarzałych chondrocytów o bardzo ograniczonym potencjale metabolicznym, niezdolnych do utrzymania homeostazy chrząstki stawowej.

Rozległe uszkodzenia chrząstki obserwuje się w chorobach stawów o podłożu zapalnym, takich jak reumatoidalne zapalenie stawów (RZS), zeszywniające zapalenie stawów kręgosłupa (ZZSK) czy łuszczycowe zapalenie stawów [2;3;7;49]. Wykazano, że w tych jednostkach chorobowych dochodzi do stanu zapalnego w obrębie maziówki i wzmożonego wydzielania przez nią prozapalnych cytokin uwalnianych do płynu stawowego. Obecne w nim cytokiny oddziałują na chondrocyty powodując w ich obrębie aktywację szeregu szlaków biochemicznych o charakterze katabolicznym, co z kolei prowadzi do degradacji macierzy chrząstki. Dotychczas choroba zwyrodnieniowa stawów w swojej definicji określana była jako niezapalna, w odróżnieniu od chorób o podłożu reumatycznym. Uznawano, że z uwagi na brak unaczynienia tkanki chrzęstnej nie może dochodzić w jej obrębie do zapalenia według klasycznej definicji. Ponadto w dostępnych wówczas badaniach takich jak OB, CRP, liczba leukocytów we krwi krążącej, nie stwierdzono zmian przemawiających za zapalnym podłożem tego schorzenia. W ostatnich latach dzięki nowym możliwościom w zakresie diagnostyki immunologicznej i histopatologicznej wykazano obecność w płynie i tkankach stawowych osób z chorobą zwyrodnieniową stawów takich samych cytokin, jak w przypadku chorób reumatycznych [2;9;49-51]. Zaobserwowano, że ich stężenie choć jest niższe niż w przypadku zapalnych chorób stawów, przekracza jednak wartości fizjologiczne. Wskazuje to na udział przewlekłego procesu zapalnego o niewielkim nasileniu w rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawów.

Obecne badania wskazują, że w różnych sytuacjach poszczególne czynniki odgrywają wiodącą rolę, jednakże w bardziej zaawansowanych stadiach choroby zwyrodnieniowej łańcuch patogenetyczny jest zbliżony i wiąże się z aktywacją prozapalnych czynników prowadzących do degradacji chrząstki stawowej [3;8;9;49].

1.2.2. Rola mediatorów zapalnych w rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawów

Obecnie zapalenie definiowane jest jako proces, w którym po stymulacji komórek przez bodziec zapalny następuje ich wzmożona aktywacja i wydzielanie mediatorów zapalenia. Wyniki badań ostatnich lat wskazują, że w chorobie zwyrodnieniowej stawów zapalenie ma charakter wtórny do uszkodzeń chrząstki, jednak w istotny sposób przyczynia się do rozwoju choroby. Proces zapalny przebiega z udziałem mediatorów, takich jak interleukiny (IL-1beta, IL-6, IL-17, IL-18), czynnik martwicy guza (TNF alfa), tlenek azotu (NO), prostanoidy (PGE2), peroksynitrat czy reaktywne formy tlenu. Niedawno przeprowadzone badania wskazują na istotną rolę białek z grupy adipocytokin, takich jak leptyna, adiponektyna, rezystyna w patogenezie zmian zwyrodnieniowych stawów. Mediatory te odkryto w obrębie tkanki tłuszczowej, następnie wykazano ich powiązanie z otyłością, oraz rolę w rozwoju stanu zapalnego o niskim nasileniu w przebiegu nadciśnienia tętniczego, miażdżycy, a w ostatnich latach również w chorobie zwyrodnieniowej stawów.

Interleukina 1 – beta (IL – 1 beta)

Interleukina 1-beta jest cytokiną, której udział w rozwoju choroby zwyrodnieniowej został jak dotąd najdokładniej poznany [2;9]. Produkowana jest przez szereg komórek w obrębie stawu, takich jak chondrocyty oraz synowioocyty typu fibroblastów i makrofagów [9;52]. Cytokina ta oddziałuje na komórki docelowe za pośrednictwem błonowego receptora IL1-RI. Jej biologiczne działanie hamowane jest przez naturalne inhibitory : IL1-RII zlokalizowany na błonach komórkowych, oraz antagonistę receptora IL1 (IL1-Ra), który obecny jest w płynie stawowym [2;52;53]. Bardzo wysokie stężenia IL-1beta w płynie stawowym zaobserwowano dotychczas w przebiegu RZS i ChZS, natomiast mniej podwyższone poziomy stwierdzono w próbkach płynu stawowego pobranych ze stawów kolanowych z całkowicie zerwanym więzadłem krzyżowym przednim [9;54-57]. W badaniach immunohistochemicznych

stwierdzono, że największe stężenie w obrębie chrząstki stawowej cytokina ta osiąga w warstwie powierzchniowej [58].

IL1-beta oddziałuje głównie na chondrocyty, w badaniach z użyciem mikromacierzy wykazano, że istotnie wpływa na ekspresję 79 genów w tych komórkach [58;59]. Doprowadza ona do ich aktywacji katabolicznej, co skutkuje zmniejszoną produkcją kolagenu typu II i proteoglikanów i pobudza apoptozę chondrocytów [52]. Oprócz tego wykazano, że IL1-beta stymuluje wydzielanie przez chondrocyty i synowioocyty metaloproteinaz (m. in. MMP-1, -3, -13) i agrekanaz (ADAMTS -4, -5). IL1-beta nasila również wydzielanie innych mediatorów zapalnych (TNF-alfa, IL-6, IL-8, PGE2, NO), czynników wzrostu, takich jak czynnik wzrostu śródbłonna naczyń (VEGF), a także chemokin – np. RANTES (Regulated on Activation, Normal T-cell Expression and Secreted), które z kolei stymulują infiltrację maziówki przez monocyty [2;9;49-51;60-62].

Biologiczne działania IL1-beta potwierdzają badania na modelach zwierzęcych. Na ich podstawie wykazano, że dostawowe podanie tej cytokiny powoduje zmiany typowe dla ChZS, takie jak zmniejszenie zawartości proteoglikanów w chrząstce, jej fibrylację, erozję i pojawienie się nacieku zapalnego w obrębie błony maziowej [50;53].

Z uwagi na wielokierunkowe działanie IL-1beta w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów wysunięto hipotezę, że jej zablokowanie może spowolnić lub nawet zahamować rozwój choroby. Niemal wszystkie stosowane w leczeniu choroby zwyrodnieniowej leki, jak na przykład NLPZ, sterydy, kwas hialuronowy powodują zmniejszenie stężenia IL1-beta w płynie stawowym. Obecnie prowadzonych jest szereg badań nad skutecznością dostawowego podawania inhibitora IL1-beta oraz syntetycznych analogów IL-1, takich jak diacerein czy anakinra [60;63-65]. Uzyskane wyniki wskazują na poprawę kliniczną i zmniejszenie bólu u części chorych, jednak brak jest dostatecznych dowodów klinicznych, aby leki te wprowadzić do standardów leczenia choroby zwyrodnieniowej stawów. Ponadto Richette i współpracownicy zaobserwowali, że w zaawansowanej chorobie zwyrodnieniowej stężenie IL1-Ra wzrasta równoległe ze wzrostem stężenia IL1-beta, osiągając poziom pozwalający na zahamowanie jej działania [53]. Wydaje się więc,

że samo zablokowanie szlaku IL1-beta może nie być wystarczające do zahamowania rozwoju choroby zwyrodnieniowej.

Czynnik martwicy guza alfa (TNF-alfa)

TNF-alfa jest również istotną cytokiną biorącą udział w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Jest on produkowany przez synowocyty typu fibroblastów oraz chondrocyty, między innymi w odpowiedzi na czynniki mechaniczne, takie jak kompresja, czy podwyższone ciśnienie hydrostatyczne [3;9;49;61;62]. W badaniach immunohistochemicznych wykazano, że w chondrocytach ze stawów objętych procesem zwyrodnieniowym występuje zwiększona ilość receptorów tej cytokiny. Z kolei w badaniach doświadczalnych podczas inkubacji próbek zdrowej chrząstki w środowisku płynu stawowego i medium pobranego z hodowli synowocytów ze stawów objętych procesem zwyrodnieniowym zaobserwowano zwiększenie liczby receptorów TNF-alfa na powierzchni chondrocytów [7]. Może to wskazywać na podwyższoną wrażliwość komórek chrząstki na działanie czynnika martwicy guza w przebiegu choroby zwyrodnieniowej. Aktywność biologiczna TNF-alfa jest zbliżona do aktywności IL-1beta, działa bowiem stymulująco na produkcję metaloproteinaz degradujących macierz chrząstki, indukuje syntezę tlenku azotu, wzmacnia wydzielanie innych prozapalnych cytokin, chemokin oraz czynników wzrostu [3;49-51;61;62;66]. TNF-alfa powoduje w chondrocytach zahamowanie syntezy kolagenu, ma zdolność do indukowania ich apoptozy. W badaniach na modelach zwierzęcych wykazano synergistyczne działanie TNF-alfa i IL-1. Dostawowe podanie obu tych cytokin istotnie nasila ich biologiczne działanie prowadzące do uszkodzenia chrząstki stawowej [7].

Interleukina 6 (IL – 6)

Interleukina 6 jest cytokiną, należącą do tzw. rodziny IL-6, do której zalicza się również takie białka jak IL-11, onkostatynę M, czy LIF (czynnik hamujący białaczkę). IL-6 produkowana jest zarówno przez chondrocyty, jak i synowioocyty i oddziałuje na komórki za pośrednictwem specyficznego receptora błonowego IL-6R [67]. Pomimo, iż receptor ten nie występuje w wielu typach komórek wykazano, że IL-6 może na nie oddziaływać w połączeniu z rozpuszczalnym receptorem sIL-6R. W próbkach płynu stawowego pobranych od osób z chorobą zwyrodnieniową stwierdzono podwyższone stężenia zarówno IL-6, jak i sIL-6R. Wykazano także korelację tych stężeń z nasileniem infiltracji błony maziowej przez leukocyty [3;49]. Wyniki badań dotyczących oddziaływania IL-6 na chondrocyty są niejednoznaczne, co spowodowane jest między innymi faktem, że w obrębie chondrocytów stwierdza się niewielką ilość receptorów błonowych IL-6, a nie wszyscy autorzy w badaniach doświadczalnych stosowali jednocześnie IL-6 i sIL-6R [67]. Dotychczas wykazano, że IL-6 oddziałuje na chondrocyty prowadząc do zmniejszenia syntezy proteoglikanów i kolagenu typu II, choć w przypadku tego drugiego molekularne podłoże regulacji wewnątrzkomórkowej nie jest w pełni poznane. W badaniach in vitro wykazano ponadto, że IL-6 działa stymulująco na syntezę MMP -1,-3,-13 oraz ADAMTS -4, -5 [9;67;68].

Inne cytokiny prozapalne

Prowadzone dotychczas badania wskazują, że oprócz wymienionych, w rozwoju choroby zwyrodnieniowej stawów uczestniczą także inne cytokiny prozapalne. Przykładem może być IL-8, która jest silnym chemoatraktantem, działa pobudzająco na neutrofile, powoduje hipertrofię chondrocytów, stymuluje syntezę innych prozapalnych cytokin [9]. Interleukina 17 i 18 są mediatorami, których udział w patogenezie choroby zwyrodnieniowej badany jest od niedawna [3;9;49;54]. IL-17 wydzielana jest przez aktywowane limfocyty T, zwiększa w chondrocytach produkcję metaloproteinaz, pobudza syntezę NO, stymuluje także produkcję innych cytokin prozapalnych, takich jak IL-1beta, TNF-alfa i IL-6. Mediator ten, synergistycznie z IL-

6 i TNF-alfa, zwiększa wydzielanie MMP -1,-3,-13 [2;9;49;54;62]. Z kolei IL-18 produkowana jest przez makrofagi i synowioocyty typu fibroblastów. Cytokina ta oddziałując na chondrocyty powoduje w tych komórkach zmniejszenie produkcji składników macierzy pozakomórkowej, zwiększa produkcję tlenu azotu, indukuje także ich apoptozę [3;9;49;62]. LIF jest cytokiną należącą do rodziny IL-6. Wykazano że mediator ten powoduje zwiększoną produkcję metaloproteinaz, nie wpływając na produkcję tkankowych inhibitorów metaloproteinaz (TIMP) . W obrębie chondrocytów powoduje także zwiększenie produkcji NO, oraz stymuluje wydzielanie cytokin prozapalnych [3;9;49].

1.2.3 Rola mediatorów lipidowych, wolnych rodników i tlenu azotu w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów

Mediatory lipidowe

W ostatnich latach zwrócono uwagę na udział mediatorów lipidowych, takich jak prostanoidy, leukotrieny i czynnik aktywacji płytek (PAF) w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów [3;69;70]. Istotną rolę w tym szlaku metabolicznym odgrywają dwie izoformy enzymu cyklooksyzgenazy (COX1, COX2), katalizujące przemianę kwasu arachidonowego do prostaglandyn [71]. COX-1 jest konstytutywną izoformą, której aktywność utrzymuje się w większości tkanek na stałym, niskim poziomie, natomiast COX-2 jest formą indukowalną, której aktywność istotnie wzrasta między innymi w przypadku uszkodzenia tkanek [72]. Wykazano, że aktywność drugiej izoformy istotnie wzrasta w chondrocytach powierzchniowej warstwy chrząstki oraz w komórkach maziówki [70]. Do wzrostu dochodzi pod wpływem IL-1beta, TNF-alfa, IL-6, NO i czynników mechanicznych, a także na skutek dysfunkcji mitochondriów chondrocytów [69]. Enzym ten odpowiada za produkcję prostaglandyn, wśród których najistotniejszą rolę w rozwoju choroby zwyrodnieniowej wydaje się odgrywać prostaglandyna E2 [3;9;49]. W warunkach fizjologicznych, przy niskich stężeniach wykazuje ona w obrębie chrząstki działanie anaboliczne, wzmacnia syntezę proteoglikanów, kolagenu, pobudza proliferację chondrocytów. Wykazano również, że w tych warunkach PGE2 działa hamująco na

syntezę IL-1beta, TNF-alfa, MMP -1,-3 [3;61;70;72-74]. Jednakże w przebiegu choroby zwyrodnieniowej mediator ten występuje w podwyższonych stężeniach w obrębie chrząstki, płynu stawowego i maziówki, a jego profil działania biologicznego ulega odwróceniu i wówczas moduluje on proces zapalny, nasila działanie cytokin prozapalnych oraz syntezę metaloproteinaz. W obrębie chondrocytów powoduje zmniejszenie produkcji kolagenu typu II, wzmacnia syntezę tlenu azotu, prawdopodobnie uwrażliwia te komórki na czynniki indukujące apoptozę. Jednakże wyniki dotychczasowych badań nie są w ostatniej kwestii jednoznaczne [3;9;49;69;74;75]. Z uwagi na udział COX-2 w patogenezie procesu zwyrodnieniowego stawów podjęto próby zastosowania selektywnych inhibitorów COX-2 w leczeniu tej choroby, jednak dotychczas zebrane doświadczenia kliniczne nie wykazały, by leki te istotnie modyfikowały przebieg choroby [71].

Kolejną grupą mediatorów lipidowych uczestniczących w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów są leukotrieny produkowane przez enzym 5-lipooxygenazę (5-LOX). Stwierdzono, że w rozwoju procesu zwyrodnieniowego stawów istotną rolę odgrywa leukotrien B4. Wykazano, że silnie indukuje on wydzielanie cytokin prozapalnych, takich jak IL1-beta, TNF-alfa [3;9;49;50;69] .

Tlenek azotu (NO)

Tlenek azotu jest krótko działającą gazową cząsteczką uczestniczącą w regulacji szeregu procesów zarówno fizjologicznych, jak i patologicznych. Powstaje on podczas przekształcenia argininy do cytruliny przy udziale syntetazy NO (NOS). Jak dotąd opisano trzy izoformy tego enzymu : NOS1, NOS2, NOS3. Druga izoforma podlega regulacji z udziałem czynników prozapalnych, stąd określana jest jako indukowalna syntetaza NO (iNOS) [72;76]. Szereg badań potwierdziło jej wysoką aktywność w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów. Ponadto w badaniach doświadczalnych na modelach zwierzęcych wykazano, że zablokowanie tego enzymu specyficznymi inhibitorami hamuje progresję choroby zwyrodnieniowej. Zaobserwowano wzrost aktywności iNOS w odpowiedzi na działanie takich cytokin, jak IL-1beta czy TNF-alfa [9;74;77;78]. Aktywność biologiczna tlenu azotu przejawia się między innymi poprzez wewnątrzkomórkowe modulowanie działania cytokin

prozapalnych, hamowanie syntezy składników macierzy, takich jak agrekan, oraz hamowanie syntezy IL-1Ra. Wykazano także, że tlenek azotu nasila toksyczne działanie wolnych rodników tlenowych, doprowadzając do apoptozy chondrocytów [3;9;75;76;79-84]. W ostatnich latach zaobserwowano, że NO wzmacnia produkcję PGE2, która wydaje się odgrywać rolę modulującą w procesie indukcji apoptozy przez tlenek azotu [73;82;85;86].

Aktywne formy tlenu

Z uwagi na fakt, iż chrząstka stawowa nie jest tkanką unaczynioną, chondrocyty są metabolicznie zaadaptowane do niskiego ciśnienia parcjalnego tlenu. Cząsteczka tlenu w warunkach fizjologicznych, jak również w przebiegu procesów patologicznych, może zostać przekształcona w tzw. reaktywne formy tlenu. Zalicza się do nich wolny rodnik tlenowy i jego pochodne, takie jak peroksynikrat powstający w reakcji z tlenkiem azotu, czy wolny rodnik hydroksylowy [61;82;86;87]. Badania doświadczalne wykazały, że cząsteczki te w warunkach fizjologicznych występują w niewielkich stężeniach i odgrywają rolę regulacyjną w metabolizmie komórkowych. Źródłem wolnych rodników tlenowych jest wiele procesów metabolicznych, takich jak oddychanie komórkowe, przemiany enzymatyczne z udziałem cytochromu P-450, oksydazy NADPH, mieloperoksydazy, syntetazy NO [61;82;86;87]. Za utrzymanie równowagi oksydacyjnej odpowiadają enzymy eliminujące wolne rodniki, do których zalicza się między innymi dysmutazę ponadtlenkową, katalazę, peroksydazę glutationową, a także szereg antyoksydantów, takich jak kwas askorbinowy, glutation, witamina E, karotenoidy [3;49]. W przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów obserwuje się w obrębie chrząstki stawowej, jak i w błonie maziowej zaburzenie tej równowagi, oraz wzmożoną produkcję wolnych rodników tlenowych i ich pochodnych. Cząsteczki te wykazują dużą reaktywność, która przejawia się między innymi uszkodzeniem kwasów nukleinowych, czynników transkrypcyjnych, fosfolipidów błony komórkowej, składników macierzy zewnątrz i wewnątrzkomórkowej [3;9;51]. Aktywność biologiczna wolnych rodników polega między innymi na indukowaniu apoptozy w chondrocytach. Wydaje się, że ważną rolę w tym procesie odgrywają cząsteczki tlenu azotu, między innymi poprzez tworzenie

peroksynitratu [82;86-88]. Oprócz tego aktywne formy tlenu doprowadzają w chondrocytach do zahamowania produkcji składników macierzy zewnątrzkomórkowej i reagując z czynnikami transkrypcyjnymi, takimi jak białka kompleksu NF-kappaB, nasilają produkcję enzymów niszczących ją [46;86;87].

Jak dotychczas ustalono, produkcja wolnych rodników tlenowych i ich pochodnych w obrębie tkanek stawowych zwiększana jest przez szereg czynników. Zalicza się do nich prozapalne cytokiny, które mogą działać bezpośrednio, jak TNF-alfa, który nasila aktywność oksydazy NADPH [82;86;87]. Cytokiny działające pośrednio, jak IL-1, IL-6 zmniejszają produkcję wymiataczy wolnych rodników, takich jak dysmutaza ponadtlenkowa i peryksydaza glutationowa. Wykazano również, że czynniki mechaniczne, w tym unieruchomienie stawu nasilają stres oksydacyjny w jego obrębie [82;86;87]. Wydaje się również, że w przebiegu starzenia się organizmu rola stresu oksydacyjnego w procesach destrukcyjnych chrząstki odgrywa istotną rolę. Świadczy o tym fakt, że wraz z wiekiem i progresją choroby zwyrodnieniowej stawów wzrasta w chrząstce stawowej stężenie nitrotyrozyny, będącej miernikiem stresu oksydacyjnego [46].

Udział metaloproteinaz w chorobie zwyrodnieniowej stawów

Do czynników katabolicznych w przebiegu choroby zwyrodnieniowej zalicza się także metaloproteinazy, które są jednymi z najważniejszych enzymów uczestniczących w patogenezie tej choroby. Są to endopeptydazy zdolne do degradacji składników macierzy pozakomórkowej chrząstki, które w zdrowym stawie są produkowane przez chondrocyty w niewielkich ilościach i odpowiadają za utrzymanie homeostazy macierzy chrząstki [3;9;49;62]. Domena katalityczna metaloproteinaz jest bardzo konserwatywna i zawiera jony cynku i wapnia. Większość metaloproteinaz wydzielana jest w formie nieaktywnej, z dołączonym do N-końca peptydem, którego usunięcie czyni enzym. W zależności od specyficzności względem substratu można podzielić je na: kolagenazy (MMP-1,-8-13), gelatynazy (MMP-2. -9) rozkładające zdenaturowany kolagen macierzy zewnątrzkomórkowej i kolagen typu IV w błonach komórkowych oraz stromielinazy (MMP -3,-10,-11) [3;9;49;51;61;62;89]. Wykazano, że MMP-1,-8 są aktywne głównie

w powierzchniowych warstwach chrząstki, natomiast MMP-13 występuje w największych ilościach w pośrednich i głębokich warstwach chrząstki. Wszystkie te enzymy wykazują największe powinowactwo względem kolagenu [3;9;61;89]. MMP-3 posiada szerokie spektrum substratów, do których zalicza się między innymi kolagen, proteoglikany, elastynę. MMP-3 w zdrowej chrząstce wydaje się być głównym enzymem odpowiedzialnym za przebudowę macierzy, jej stężenie wzrasta we wczesnych stadiach choroby zwyrodnieniowej i obniża się w miarę postępu choroby. Kolejną klasą enzymów zaangażowanych w patogenezę ChZS stanowią agrekanazy – ADAMTS-4, ADAMTS-5, przy czym ta druga wydaje się być jednym z najważniejszych enzymów degradujących chrząstkę [3;49;61;90]. Oprócz powyższych enzymów w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów opisano metaloproteinazy związane z błoną komórkową chondrocytów, jednak ich rola w degradacji macierzy nie jest w pełni poznana. Wydzielanie metaloproteinaz przez chondrocyty istotnie rośnie pod wpływem czynników mechanicznych oraz cytokin prozapalnych takich jak IL-1beta, IL-6, TNF-alfa, IL-8, -17, -18. Z kolei cytokiny przeciwzapalne, takie jak IL-4, IL-10, IL-13, oraz inhibitor receptora IL-1beta zmniejszają wydzielanie metaloproteinaz w sposób bezpośredni lub pośredni, hamując produkcję i aktywność cytokin prozapalnych [3;9;49;61;62].

1.2.4. Adipocytokiny i ich rola w procesie zwyrodnieniowym

W aktualnych publikacjach zwrócono uwagę na udział adipocytokin w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Białka te produkowane są w dużych ilościach w tkance tłuszczowej, szczególnie białej. Najnowsze badania wykazały również ich obecność w płynie i tkankach stawowych [91-93]. Otyłość jest czynnikiem ryzyka choroby zwyrodnieniowej, co związane jest głównie z przeciążeniem mechanicznym stawów kończyny dolnej i kręgosłupa. Jednak stwierdzono również korelację BMI z rozwojem zmian zwyrodnieniowych dystalnych stawów międzypaliczkowych ręki, których obciążenie mechaniczne nie jest zależne od masy ciała [94]. Obecnie prowadzi się szereg badań mających określić, czy adipocytokiny stanowią ogniwo łączące otyłość z chorobą zwyrodnieniową stawów.

Leptyna

Leptyna jest hormonem białkowym odkrytym w 1994 roku i produkowanym głównie w obrębie tkanki tłuszczowej. Początkowo określano ją jako hormon sytości, z uwagi na jej udział w regulacji homeostazy energetycznej. Jednakże w toku dalszych badań zaobserwowano udział leptyny w innych osiach hormonalnych [95] oraz w szeregu chorób o charakterze autoimmunologicznych, takich jak cukrzyca typu I, reumatoidalne zapalenie stawów [91;92;94;96], a także w chorobach nowotworowych [97]. Zwiększone stężenia leptyny w osoczu stwierdza się też w chorobach związanych z otyłością, takich jak cukrzyca typu II, nadciśnienie tętnicze, choroby sercowo – naczyniowe. Obecność leptyny stwierdzono również w próbkach płynu stawowego, przy czym podwyższone stężenia zaobserwowano w przypadku choroby zwyrodnieniowej i RZS [92;96;98;99]. Określono, że hormon ten produkowany jest przez synowioocyty, chondrocyty chrząstki stawowej i osteofitów, a także komórki tłuszczowe ciała Hoffy [92;93;100;101]. W patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów leptyna wykazuje działanie kataboliczne i prozapalne. W obrębie chondrocytów nasila produkcję metaloproteinaz, zwiększa syntezę tlenu azotu w odpowiedzi na IL1-beta. Zaobserwowano także, że leptyna zwiększa wydzielanie interleukiny 6, a także enzymów z grupy metaloproteinaz. Z drugiej strony w chondrocytach poddanych stymulacji leptyną wzrasta transkrypcja mRNA dla kolagenu typu II, jednakże w badaniach doświadczalnych wykazano, że podanie leptyny do hodowli chrząstki skutkuje uszkodzeniem macierzy pozakomórkowej [98;99;102].

Adiponektyna

Adiponektyna jest hormonem białkowym odkrytym w 1995 roku, produkowanym głównie przez adipocyty [91;92;92]. Wczesne badania wskazywały na istotną rolę tego białka w utrzymaniu homeostazy energetycznej, ponieważ jego stężenie osoczowe ujemnie koreluje z BMI. W kolejnych latach zaobserwowano, że obniżone poziomy adiponektyny stwierdza się u pacjentów z insulinoopornością, zespołem metabolicznym, a także miażdżycą i nadciśnieniem tętniczym. Z uwagi na

powyższe spektrum aktywności biologicznej wysunięto hipotezę, że adiponektyna wykazuje działanie przeciwzapalne. Zwrócono także uwagę na fakt, że jej niskie stężenie w osoczu obserwuje się w przebiegu przewlekłego procesu zapalnego o niskim nasileniu (low-grade chronic inflammation), którego rola w patogenezie chorób, takich jak nadciśnienie tętnicze, otyłość i cukrzyca jest obecnie przedmiotem intensywnych badań [92;94;103-105]. Pierwsze doniesienia dotyczące roli tego hormonu w patogenezie choroby zwyrodnieniowej wykazały że produkowana jest ona przez komórki chrząstki, maziówki i ciała Hoffy [91;93]. Badania te zdawały się potwierdzać tezę o przeciwzapalnym charakterze adiponektyny. Powoduje ona nasilenie wydzielania TIMP-2, ponadto zmniejsza produkcję MMP-13 w odpowiedzi na IL-1beta [106;107]. Obserwowany w chorobie zwyrodnieniowej wzrost stężenia adiponektyny w obrębie płynu stawowego i tkanek stawowych początkowo tłumaczono jako reakcję obronną. Jednakże dalsze badania wykazały, że adiponektyna stymuluje w chondrocytach niekorzystną w skutkach produkcję IL-6, MMP-3, MMP-9 [106].

Rola obu przedstawionych adipocytokin w patogenezie choroby zwyrodnieniowej nie jest dostatecznie poznana. Z uwagi na ich udział w rozwoju chorób będących elementami tzw. zespołu metabolicznego z otyłością na czele, są one potencjalnymi ogniwami łączącymi szlaki patogenetyczne otyłości i choroby zwyrodnieniowej stawów.

1.2.5. Reakcja regeneracyjna tkanek stawowych w przebiegu procesu zwyrodnieniowego

W odpowiedzi na wydzielanie prozapalnych cytokin dochodzi w obrębie stawu do szeregu reakcji o charakterze kompensacyjnym [3;9]. W początkowym okresie choroby zwyrodnieniowej równoległe do utraty proteoglikanów macierzy chrząstki dochodzi do niezbyt nasilonej reakcji regeneracyjnej objawiającej się wzmożoną proliferacją chondrocytów i wzrostem syntezy składników macierzy zewnątrzkomórkowej. W przebiegu tej reakcji zmienia się wzorzec produkcji kolagenu, w macierzy pojawiają się inne jego rodzaje, takie jak kolagen t. III, VI, X

[61;62]. Jednocześnie komórki maziówki i chrząstki wydzielają cytokiny o działaniu przeciwzapalnym i czynniki wzrostu.

Jedną z najlepiej przebadanych cytokin o charakterze przeciwzapalnym jest interleukina 4 [3;9;49]. Białko to produkowane jest między innymi przez chondrocyty oraz synowioocyty i ma szerokie spektrum aktywności biologicznej. Redukuje ekspresję genów IL-1beta oraz TNF-alfa, a także obniża produkcję innych cytokin prozapalnych. IL-4 oddziałując na chondrocyty poddane stymulacji IL-1beta ogranicza produkcję PGE2 i MMP-3, zwiększa jednak produkcję IL-1RA. Cytokina ta zmniejsza aktywność resorpcyjną osteoklastów, hamuje również proces apoptozy w obrębie maziówki, co może być jednym z czynników doprowadzających do jej przerostu obserwowanego w przebiegu choroby zwyrodnieniowej [9;61;62]. Podobne działania wykazują inne cytokiny z grupy interleukin, do których zalicza się między innymi IL-10 oraz IL-14 [3;9;61;62].

W przebiegu choroby zwyrodnieniowej w obrębie stawu dochodzi do produkcji szeregu czynników wzrostu, wśród których najważniejszą rolę odgrywają transformujący czynnik wzrostu beta (TGF-beta) i insulinopodobny czynnik wzrostu 1 (IGF-1) [9;108;109]. TGF-beta wykazuje szereg działań ochronnych, do których zalicza się między innymi zwiększenie produkcji proteoglikanów przez chondrocyty, zmniejszenie wywołanej przez IL1-beta produkcji MMP-3 i kolagenazy, a także obniżenie syntezy receptora dla IL-1beta. Białko to wykazuje jednak szereg działań o charakterze prozapalnym, między innymi indukuje syntezę MMP-13 i ADAMTS-4 [3;9;50;51;61]. Zaobserwowano również, że przyspiesza wzrost osteofitów, działa stymulująco na proces zapalny w obrębie maziówki, a także hiperplazję kości podchrzęstnej [109-111].

IGF-1 jest cytokiną, która w warunkach fizjologicznych odpowiada za utrzymanie homeostazy chrząstki stawowej. Wykazuje działanie anaboliczne w obrębie chondrocytów, pobudzając zarówno w przypadku komórek pobranych ze stawów zdrowych, jak i objętych procesem zwyrodnieniowym produkcję składników macierzy pozakomórkowej, takich jak proteoglikany i kolagen typu II. Wykazano także działanie proliferacyjne IGF-1 na chondrocyty, jak również hamujący wpływ tej cytokiny na produkcję MMP-13 indukowaną przez IL1-beta. Równocześnie IGF-1 nasila produkcję inhibitorów metaloproteinaz [3;7;9;49;62]. W badaniach

doświadczalnych wykazano, że w przebiegu choroby zwyrodnieniowej spada wrażliwość chondrocytów na działanie IGF-1, co spowodowane jest prawdopodobnie wzmożoną produkcją białek wiążących IGF obecnych w błonie komórkowej chondrocytów (IGFBP). Białka te wychwytyją część IGF-1, zmniejszając w ten sposób jego dostępność biologiczną [61].

1.2.6. Stan zapalny błony maziowej i chrząstki stawowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej

Zapalenie błony maziowej

W świetle opublikowanych w ostatnich latach danych uzyskanych dzięki badaniom histologicznym i radiologicznym udowodniono, że już we wczesnym okresie choroby zwyrodnieniowej stawów dochodzi do zajęcia przez proces zapalny błony maziowej. W badaniach MRI pogrubienie maziówki w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego stwierdza się nawet w 73% przypadków, a badania histologiczne wykazały korelację obrazu radiologicznego z obecnością histopatologicznych cech procesu zapalnego [112-115].

Badania histologiczne i immunohistochemiczne prowadzone między innymi przez Pelletiera wykazały, że stan zapalny maziówki w przebiegu choroby zwyrodnieniowej charakteryzują trzy cechy: neoangiogeneza, naciek zapalny i wzmożony metabolizm komórkowy [3;9;68;72].

Cechy neoangiogenezy w obrębie maziówki stwierdzane są już w przypadkach niewielkiego zaawansowania choroby. Dochodzi wówczas do redystrybucji naczyń w obrębie maziówki z wytworzeniem kapilar o mniej dojrzałym fenotypie, które cechuje zwiększona przepuszczalność i ekspresja białek adhezyjnych ułatwiających formowanie nacieku zapalnego, takich jak selektyna-E [116;117]. Proces angiogenezy w sposób pośredni stymulują cytokiny, takie jak IL-1beta, IL-8, TNF-alfa. W obrębie płynu stawowego i maziówki stwierdzono również obecność czynników stymulujących tworzenie naczyń w sposób bezpośredni, przy czym większość badań wskazuje na dominującą rolę naczyniowego endotelialnego czynnika

wzrostu (VEGF), produkowanego przez makrofagi i fibroblasty [116;118;119]. Badania immunohistochemiczne wykazały ponadto, że równolegle do powiększania sieci naczyń w obrębie maziówki, zwiększa się również liczba czuciowych zakończeń nerwowych, które mogą uczestniczyć w percepcji bólu związanego z chorobą.

W obrębie fibroblastów maziówkowych stwierdza się cechy hiperplazji, a także wzmożonej aktywności metabolicznej. Wykazano, że produkują one szereg cytokin prozapalnych, między innymi TNF-alfa, IL1-beta, IL-6, IL-8, a także metaloproteinaz MMP-1,-3,-9,-13. Cytokiny te przedostają się do płynu stawowego i dodatkowo stymulują chondrocyty oraz parakrynowo synowioocyty, pobudzają angiogenezę i tworzenie nacieku zapalnego [9;120]. Stwierdzenie w obrębie maziówki stawu objętego procesem zwyrodnieniowym molekularnych wykładników stanu zapalnego nie daje odpowiedzi na pytanie, czy proces ten pojawił się pierwotnie, czy stanowi on reakcję tkanek stawowych na degradację chrząstki. We wcześniejszych doniesieniach sugerowano, że proces zapalny maziówki ma charakter wtórny do uszkodzenia chrząstki i powodują go obecne w płynie stawowym produkty degradacji macierzy chrzęstnej. Wyniki badań przeprowadzonych w ostatnich latach na hodowlach komórek maziówki wskazują jednak, że proces ten może mieć charakter pierwotny.

W obrębie maziówki obserwuje się także naciek zapalny, złożony z głównie z makrofagów i w mniejszej ilości z limfocytów B, T oraz neutrofilii [121]. Jego nasilenie w większości przypadków jest mniejsze niż obserwowane w RZS, jednakże uzyskane w ostatnich latach dane wskazują, że w stawach objętych chorobą zwyrodnieniową makrofagi są istotnym źródłem cytokin prozapalnych [122;123]. Wykazano, że produkują one między innymi TNF-alfa, IL-1beta, IL-10, MMP-1, MMP-3 oraz ich inhibitory (TIMP). Mimo, że podobne spektrum cytokin produkowane jest przez makrofagi w RZS, wykazano że regulacja tego procesu w przebiegu choroby zwyrodnieniowej podlega innym mechanizmom. W przypadku RZS produkcja cytokin prozapalnych w dużej mierze zależy od stymulacji TNF-alfa i udziału szlaku sygnalizacji wewnątrzkomórkowej czynnika jądrowego kappa B (NF kappa B). W przypadku ChZS powyższe szlaki odgrywają mniejszą rolę i ich zablokowanie jedynie częściowo obniża produkcję prozapalnych cytokin w obrębie monocytów [124].

Reakcja zapalna chrząstki stawowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów

W przebiegu choroby zwyrodnieniowej w obrębie chrząstki stawowej stwierdza się również cechy stanu zapalnego, jednak z uwagi na różnice w budowie histologicznej proces ten przebiega inaczej niż w maziówce [61;108;120;125;126].

Zdrowa chrząstka stawowa jest tkanką pozbawioną naczyń krwionośnych, natomiast w przebiegu choroby zwyrodnieniowej w głębiej położonych warstwach chrząstki dochodzi do wytworzenia w macierzy chrzęstnej kanałów włóknisto – naczyniowych i inwazji w ich obrębie naczyń ze strony kości podchrzęstnej. Stwierdzono, że w przebiegu choroby zwyrodnieniowej uszkodzona macierz chrzęstna wykazuje mniejszą oporność względem inwazji naczyń, ponadto chondrocyty głębokich warstw chrząstki produkują małe ilości czynników hamujących angiogenezę [80;127]. Wykazano natomiast, że zarówno chondrocyty warstwy powierzchniowej chrząstki, jak i hipertroficzne chondrocyty warstw głębokich wydzielają czynniki wzrostu, takie jak VEGF, które mogą stymulować rozrost naczyń kości podchrzęstnej [128]. Dokładne podłoże patogenetyczne neoangiogenezy w obrębie chrząstki stawowej i jej rola w patogenezie choroby zwyrodnieniowej nie są obecnie dostatecznie poznane [54].

Równolegle z nowymi naczyniami tworzącymi się w obrębie chrząstki stawowej od strony kości podchrzęstnej podążają czuciowe zakończenia nerwowe. Unerwienie to może odpowiadać za powstawanie części dolegliwości bólowych towarzyszących chorobie [129-132]. Ponadto tworzenie nowych naczyń w chrząstce może stymulować jej kostnienie, co obserwuje się między innymi w procesie tworzenia osteofitów. Natomiast z uwagi na budowę macierzy chrząstki, w przebiegu CHzS nie obserwuje się w jej obrębie nacieku komórek zapalnych, takich jak makrofagi i monocyty.

Wydzielanie cytokin prozapalnych jest wspólnym mianownikiem aktywności zapalnej chrząstki stawowej i błony maziowej w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów. Produkcję mediatorów prozapalnych obserwuje się zarówno w warstwach powierzchniowej i głębokich chrząstki.

1.2.7. Rola kości podchrzęstnej i innych tkanek stawowych w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów

Rola kości podchrzęstnej w rozwoju procesu zwyrodnieniowego

Kość podchrzęstna odgrywa istotną rolę w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Podczas rozwoju zmian zwyrodnieniowych dochodzi do pobudzenia metabolizmu osteoblastów kości podchrzęstnej, co wiąże się z wydzielaniem przez nie szeregu cytokin odpowiedzialnych za kataboliczną aktywację chondrocytów, takich jak TGF-beta, IGF, IGF-BP, IL-6 [9;54;89]. Radiologiczne zmiany w obrębie kości podchrzęstnej w postaci jej sklerotyzacji stwierdza się już we wczesnych etapach choroby zwyrodnieniowej. Ta obserwacja doprowadziła do powstania dwóch przeciwstawnych hipotez dotyczących etiologii przebudowy kostnej. Część badaczy twierdzi, że przebudowa ma charakter wtórny i jest ona wynikiem utraty chrząstki i zwiększonego mechanicznego obciążania kości podchrzęstnej. Inni postulują, że sklerotyzacja kości podchrzęstnej ma charakter pierwotny i poprzez jej przeszywnienie, ekspozuje chrząstkę stawową na nadmierne obciążenia [133;134]. Badania biomechaniczne wykazały, że zarówno zdrowa chrząstka stawowa, jak i kość podchrzęstna posiadają unikalne właściwości wiskoelastyczne, które umożliwiają im odkształcanie się podczas obciążania stawu, co pozwala na pochłonięcie części energii kinetycznej. Sklerotyzacja kości podchrzęstnej pozbawia ją tych właściwości, zwiększając siły działające na chrząstkę i czyniąc ją bardziej podatną uszkodzenie [135]. Jednocześnie badania przeprowadzone na dużej grupie pacjentów wykazały, że pojawienie się w obrazie MRI sklerotyzacji kości podchrzęstnej poprzedza wystąpienie uszkodzeń chrząstki stawowej pokrywającej obszar sklerotyzacji, co potwierdza drugą z omawianych teorii [36;136-138].

Oprócz roli kości podchrzęstnej w uszkodzeniu chrząstki stawowej wykazano, że jej przebudowa doprowadza do przekrwienia czynnego nasady i wzrostu ciśnienia krwi w jej obrębie, co jest jedną z głównych przyczyn dolegliwości bólowych w chorobie zwyrodnieniowej stawów.

Udział innych tkanek stawowych w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów

Odkrycie roli cytokin produkowanych przez tkankę tłuszczową w szeregu procesów chorobowych o charakterze zapalnym spowodowało zainteresowanie badaczy rolą tłuszczowych struktur obecnych w stawach w patogenezie choroby zwyrodnieniowej. Jak dotychczas najdokładniej przebadaną pod tym kątem strukturą jest ciało Hoffy [93;129;130;139]. Zarówno badania kliniczne, jak również doświadczenia na modelach zwierzęcych, wykazały powiększenie ciała Hoffy i jego włóknienie w przebiegu ChZS. W próbkach ciała tłuszczowego pobranych od pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stwierdzono nasiloną ekspresję oraz wydzielanie szeregu cytokin o charakterze prozapalnym, takich jak TNF-alfa, IL-6, leptyna, adiponektyna, a także czynników wzrostu, między innymi VEGF, czynnik wzrostu fibroblastów (bFGF) [101;102;140]. Wydaje się, że ciało Hoffy może odgrywać ważną rolę w procesie zwyrodnieniowym, niestety na chwilę obecną brak jest badań porównujących produkcję powyższych czynników na dużym materiale pochodzącym ze stawów zdrowych i objętych chorobą zwyrodnieniową. Brak jest również danych dotyczących roli tkanki tłuszczowej dna panewki stawu biodrowego w patogenezie choroby zwyrodnieniowej tego stawu.

Biologiczna rola osteofitów

Tworzenie osteofitów jest jedną z typowych cech choroby zwyrodnieniowej stawów [141]. Ich obecność może powodować dolegliwości bólowe, ograniczać funkcję stawu, doprowadzać do ucisku naczyń i nerwów [110;141]. Nie jest jasne, czy tworzenie osteofitów jest fizjologiczną adaptacją stawu związaną z uszkodzeniem chrząstki, czy wynika ze zmian patologicznych w objętym procesem zwyrodnieniowym stawie.

Dotychczas przeprowadzone badania wykazały, że do formowania się osteofitów dochodzi w obrębie okostnej, na jej granicy z chrząstką stawową [109;111]. W czasie ich tworzenia mezenchymalne komórki pnia obecne w okostnej różnicują się w chondrocyty, proces ten stymulowany jest w głównej mierze przez

TGF beta. Z kolei chondrocyty w obrębie osteofitu podlegają hiperplazji, na podłożu której dochodzi do kostnienia, stymulowanego przez białka BMP2 i BMP9. Badania doświadczalne na modelach zwierzęcych wykazały, że IGF-1 oraz FGF-2 w istotny sposób nasilają chondrogenne działanie TGF-beta [108;109]. W badaniach immunohistochemicznych i genetycznych stwierdzono, że wszystkie powyższe czynniki produkowane są miejscowo w obrębie samego osteofitu, jednakże badania przeprowadzone na myszach wskazują, że istotnym źródłem powyższych cytokin są makrofagi obecne w maziówce [111;141]. Jak dotąd nie wyjaśniono jednoznacznie roli osteofitów w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Z jednej strony osteoblasty obecne w osteofitach wydzielają uczestniczące w patogenezie ChZS cytokiny, takie jak IL-6, IL-8, MMP-13. Z kolei badania innych autorów wykazały, że obecność osteofitów w obrębie stawu biodrowego zajętego przez proces zwyrodnieniowy wiąże się z wolniejszą progresją choroby [129;142].

1.2.8. Podsumowanie

W ostatnich latach dokonał się znaczny postęp w badaniach dotyczących patogenezy choroby zwyrodnieniowej stawów. Poznano nowe mediatory uczestniczące w szlakach patogenetycznych, szereg badań klinicznych i radiologicznych pozwolił na nową interpretację roli poszczególnych tkanek stawowych w rozwoju tej choroby. Mimo to nie określono jednego zasadniczego szlaku patogenetycznego prowadzącego do uszkodzenia struktur tworzących staw, a wiedza na temat etiopatogenezy ChZS jest nadal fragmentaryczna. Poszerzenie wiedzy na temat patogenezy choroby zwyrodnieniowej stawów nie umożliwiło wdrożenia skutecznego przyczynowego leczenia choroby, ani leczenia modyfikującego jej przebieg.

2. ZAŁOŻENIA I CELE PRACY

Założenia pracy

W przebiegu choroby zwyrodnieniowej w obrębie zajętego stawu występuje przewlekły stan zapalny. Procesem zapalnym objęte są błona maziowa i chrząstka stawowa, a w jego przebiegu dochodzi do wydzielania mediatorów prozapalnych przez chondrocyty oraz synowioocyty typu fibroblastów do płynu stawowego. Do mediatorów procesu zapalnego uczestniczących w patogenezie choroby zwyrodnieniowej należy przede wszystkim interleukina 1-beta, a także leptyna i adiponektyna, które produkowane są przez synowioocyty typu fibroblastów i chondrocyty. Stężenia powyższych białek w płynie stawowym, oraz ich produkcja w obrębie maziówki i chrząstki różnią się pomiędzy stawami objętymi zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym, a stawami bez cech choroby zwyrodnieniowej.

Zakładam, że hodowla laboratoryjna chondrocytów i synowiocytów typu fibroblastów umożliwi ocenę produkcji cytokin prozapalnych, jaka ma miejsce w obrębie chrząstki i maziówki stawu. Zakładam, że w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawów stopień aktywności zapalnej komórek maziówki i chrząstki jest wyższy w porównaniu ze stawami bez cech tej choroby.

Cele pracy

1. Ocena stężenia interleukiny 1- beta, leptyny i adiponektyny w płynie stawowym pobranym od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych i pacjentów bez cech tej choroby oraz określenie różnic stężeń badanych cytokin pomiędzy grupami.
2. Ocena stężenia IL – 1 beta, leptyny i adiponektyny w mediach pobranych z hodowli komórkowej synowiocytów i chondrocytów pacjentów z chorobą zwyrodnieniową i osób z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego oraz określenie różnic w produkcji tych mediatorów pomiędzy grupami.
3. Określenie różnic w produkcji badanych białek między chondrocytami i synowiocytami z tej samej grupy pacjentów.

4. Ustalenie, czy istnieje zależność nasilenia procesu zapalnego w obrębie badanych tkanek od parametrów klinicznych, takich jak stopień zaawansowania zmian radiologicznych w przebiegu choroby zwyrodnieniowej, a także od wskaźnika masy ciała (BMI).

3. MATERIAŁ I METODA

3.1. Materiał

Badania zostały przeprowadzone na próbkach płynu stawowego oraz próbkach supernatantu hodowli komórek maziówki (synowocytów typu fibroblastów) i chondrocytów, które pobrałem od pacjentów leczonych w Klinice Ortopedii Ogólnej, Onkologicznej i Traumatologii. Do badań włączyłem dwie grupy chorych:

GRUPA I - pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych, zakwalifikowanymi do zabiegu endoprotezoplastyki tych stawów.

GRUPA II - porównawcza, obejmująca pacjentów z całkowicie zerwanym więzadłem krzyżowym przednim, zakwalifikowanych do artroskopowej rekonstrukcji tego więzadła.

3.2.1. Charakterystyka badanych grup pacjentów

Grupa I

Do grupy pacjentów z chorobą zwyrodnieniową włączyłem 17 chorych z zaawansowanymi jedno lub obustronnymi idiopatycznymi zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych, zakwalifikowanych do zabiegu endoprotezoplastyki całkowitej stawu kolanowego w Klinice Ortopedii Ogólnej, Onkologicznej i Traumatologii. Żaden z chorych w tej grupie nie posiadał wcześniej wszczepionej endoprotezy jakiegokolwiek stawu.

Kryterium włączającym do tej grupy było rozpoznanie u pacjentów choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego na podstawie kryteriów klinicznych wg American College of Rheumatology (tabela 2.1) oraz oceny radiologicznej na podstawie zdjęć w projekcji przednio – tylnej oraz bocznej. Po potwierdzeniu spełnienia powyższych kryteriów wśród pacjentów przyjmowanych do kliniki w latach 2009 – 2010 metodą

randomizacji wytypowałem 17 osób, które uczestniczyły w badaniu.

Tabela 2.1. Kryteria rozpoznania choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego wg American College of Rheumatology

Chorobę zwyrodnieniową stawu kolanowego można rozpoznać u pacjenta, który spełnia następujące kryteria :
<ol style="list-style-type: none">1. Ból stawu kolanowego2. Spełnienie trzech z sześciu poniższych kryteriów :<ol style="list-style-type: none">a) Wiek 50 lat lub więcejb) Sztywność poranna trwająca mniej niż 30 minutc) Krepitacje w obrębie stawud) Tkliwość struktur kostnych stawue) Powiększenie struktur kostnych stawuf) Brak wyczuwalnego zwiększonego ucieplenia stawu

W omawianej grupie u wszystkich chorych zabieg całkowitej endoprotezoplastyki cementowej stawu kolanowego został przeprowadzony z użyciem endoprotez Stryker Triathlon, Zimmer NexGegn, Smith&Nephew Genesis II. Stosowano mieszany próżniowo polimetylometakrylanowy cement kostny z dodatkiem gentamycyny Cemex System firmy Tecres.

U wszystkich pacjentów przed zabiegiem operacyjnym, a także w okresie pooperacyjnym stosowano profilaktykę antybiotykową w postaci dożylnie podawanych cefalosporyn II generacji oraz profilaktykę przeciwzakrzepową przy użyciu heparyn drobnocząsteczkowych przez okres 6 tygodni. W okresie pooperacyjnym, przez 14 dni u wszystkich chorych z tej grupy stosowano profilaktykę przeciw skostnieniom okołostawowym, podając począwszy od 2 doby piroksykam w dawce 15 mg na dobę.

U wszystkich chorych z tej grupy okres pooperacyjny przebiegał bez powikłań, nie stwierdziłem przedłużającego się okresu podwyższonej temperatury, u wszystkich chorych liczba leukocytów we krwi krążącej w 10 dobie mieściła się w zakresie normy.

Grupa II

Do grupy porównawczej włączyłem 18 pacjentów zakwalifikowanych do artroskopowej rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego w Klinice Ortopedii Ogólnej, Onkologicznej i Traumatologii. Celem unifikacji omawianej grupy przyjąłem następujące kryteria włączające :

1. Uszkodzenie więzadła krzyżowego przedniego na skutek urazu, którego pacjent doznał w okresie 2 - 12 miesięcy przed zabiegiem artroskopowej rekonstrukcji ACL.
2. Objawy kliniczne niestabilności przedniej stawu kolanowego, potwierdzono objawami: szufladowym przednim, Lachmana i pivot – shift przy prawidłowej zwartości tego stawu w płaszczyźnie czołowej.
3. Potwierdzenie całkowitego zerwania więzadła krzyżowego przedniego w czasie artroskopii przeprowadzonej w Klinice co najmniej na dwa miesiące przed zabiegiem rekonstrukcji. W trakcie tej artroskopii usuwano także kikut zerwanego ACL.
4. Brak choroby zwyrodnieniowej operowanego stawu (stwierdzony na podstawie oceny radiologicznej i artroskopowej). Brak uszkodzeń chrząstki stawowej, uszkodzenia łąkotek, ciał wolnych, przerostu maziówki, przerostu ciała Hoffy lub innych patologii wewnątrzstawowych, potwierdzony w trakcie artroskopowej rekonstrukcji ACL.

Po potwierdzeniu spełnienia powyższych kryteriów wśród pacjentów przyjmowanych do kliniki w latach 2009 – 2010 metodą randomizacji do omawianej grupy włączyłem 23 osoby. Z powodu trudności z uzyskaniem próbek płynu stawowego u wielu pacjentów, do badania wykorzystałem próbki płynu od pacjentów u których z uwagi na brak wskazań do procedury notch – plasty nie można było założyć hodowli komórkowych. W omawianej grupie ostatecznie znalazło się 13 osób,

u których uzyskałem komplet próbek (płyn stawowy, fragment błony maziowej i chrząstki stawowej), 5 osób od których uzyskałem fragmenty błony maziowej i chrząstki stawowej, a także 5 osób od których pobrałem jedynie próbki płynu stawowego.

U wszystkich chorych z tej grupy zabieg wykonano z użyciem ścięgien mięśni smukłego oraz półścięgnistego, stabilizowanych w obrębie kości udowej przy użyciu pętli polietylenowej i płytki metalowej, natomiast w obrębie piszczeli za pomocą biowchłanianalnej śruby interferencyjnej.

U wszystkich pacjentów w okresie okołoperacyjnym stosowano profilaktykę antybiotykową w postaci dożylnie podawanych cefalosporyn II generacji oraz profilaktykę przeciwzakrzepową przy użyciu heparyn drobnocząsteczkowych przez okres 6 tygodni.

U chorych z tej grupy okres pooperacyjny przebiegał bez powikłań, nie stwierdziłem przedłużającego się okresu podwyższonej temperatury, ani występowania wysięku w obrębie stawu.

Podstawową charakterystykę grup badanych przedstawia tabela 2.2.

Tabela 2.2. Podstawowa charakterystyka grup badanych.

Parametr	Grupa I	Grupa II
Liczba chorych	17	23
Kobiet	11	5
Mężczyzn	6	18
Średni wiek	69,3	27,3
Wiek min	54	18
Wiek max	82	41
Średnie BMI	29,9	23,7
BMI min	24,3	19,6
BMI max	34,6	29,3

Kryteria wyłączone

Celem ujednoczenia obu grup pacjentów i wykluczenia osób, u których inne schorzenia mogłyby mieć wpływ na poziomy badanych cytokin ustaliłem następujące kryteria wyłączone :

- Reumatoidalne zapalenie stawów
- Zesztywniające zapalenie stawów kręgosłupa
- Łuszczycowe zapalenie stawów
- Wtórna choroba zwyrodnieniowa, po bakteryjnym zapaleniu stawu
- Infekcja bakteryjna lub wirusowa w okresie do 6 tygodni przed zabiegiem
- Laboratoryjne wykładniki świeżego stanu zapalnego (OB, CRP, liczba leukocytów we krwi krążącej)
- Przyjmowanie preparatów sterydowych, również dostawowo
- Przyjmowanie dostawowo preparatów kwasu hialuronowego lub innych leków
- Gruźlica
- Choroby wątroby
- Immunosupresja
- Świeży (do 2 miesięcy) uraz w obrębie stawu kolanowego
- Kontaminacja materiału w czasie jego pobierania

W tym celu u każdego pacjenta przed zabiegiem zbierałem dokładny wywiad, przeprowadzałem dokładne badanie kliniczne i mierzyłem temperaturę ciała. U wszystkich pacjentów przed zabiegiem rutynowo wykonywano następujące badania laboratoryjne : morfologię krwi, badanie laboratoryjne moczu, oznaczono OB, CRP, INR, APTT, poziom glukozy, białka całkowitego, kreatyniny, mocznika. U każdego chorego wykonano zdjęcie przeglądowe klatki piersiowej, jak również zdjęcie operowanego stawu w projekcji przednio – tylnej oraz bocznej. Ponadto przy przyjęciu do Kliniki chorzy dostarczali aktualne zaświadczenie od stomatologa o braku ognisk zapalnych w jamie ustnej, jak również aktualne zaświadczenia od prowadzących pacjentów ambulatoryjnie lekarzy specjalistów o braku przeciwwskazań do zabiegu endoprotezoplastyki stawu kolanowego lub rekonstrukcji

artroskopowej więzadła krzyżowego przedniego. Jedną dobę przed zabiegiem pacjenci byli badani przez specjalistę chorób wewnętrznych celem wykluczenia internistycznych przeciwwskazań do przeprowadzenia operacji.

3.2. Metodyka

3.2.1. Ocena kliniczna pacjentów

Po przyjęciu do Kliniki pacjenci byli badani podmiotowo i przedmiotowo przez autora pracy, następnie ważeni i mierzeni celem uzyskania ich BMI. U każdego chorego wykonano zdjęcie radiologiczne obu stawów kolanowych na stojąco, w projekcjach przednio - tylnej i bocznej (na długiej kliszy), celem potwierdzenia rozpoznania. Następnie u pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi określano radiologiczne zaawansowanie choroby na podstawie klasyfikacji Ahlbäcka (tabela 2.3) oraz Kellgrena – Lawrence’a (tabela 2.4). Oceny radiologicznej dokonywało niezależnie od siebie dwóch lekarzy specjalistów w dziedzinie ortopedii, przy czym każdy pacjent był anonimowo oceniany dwukrotnie przez każdego ze specjalistów. Uzyskane z każdego pomiaru wyniki uśredniłem i zaokrągliłem do liczb całkowitych.

W przypadku pacjentów zakwalifikowanych do rekonstrukcji ACL rozpoznanie stawiano na podstawie wywiadu i badania klinicznego, potwierdzano je podczas artroskopii przeprowadzanej co najmniej dwa miesiące przed zabiegiem rekonstrukcji ACL.

Tabela 2.3 : Klasyfikacja Ahlbäcka radiologicznego zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych

Stopień 0	Brak radiologicznych cech choroby zwyrodnieniowej
Stopień I	Zwężenie szpary stawowej (ze sklerotyzacją podchrzęstną lub bez), definiowany jako szpara stawowa niższa niż 3 mm, lub niższa niż 50% wysokości szpary stawowej drugiego przedziału, lub tego samego przedziału w obrębie drugiego stawu
Stopień II	Brak szpary stawowej
Stopień III	Ubytek kostny < 5 mm
Stopień IV	Ubytek kostny 5 – 10 mm
Stopień V	Ubytek kostny > 10 mm

Tabela 2.4 – Klasyfikacja radiologicznego zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawów wg Kellegrena – Lawrence’a

Stopień 0	Brak radiologicznych cech choroby zwyrodnieniowej
Stopień I	Minimalne osteofity o wątpliwym znaczeniu klinicznym
Stopień II	Wyraźne osteofity, bez zwężenia szpary stawowej
Stopień III	Wyraźne osteofity, zwężenie szpary stawowej
Stopień IV	Wyraźne osteofity, zwężenie szpary stawowej, sklerotyzacja podchrzęstna

3.2.2. Pobieranie materiału do badań, izolacja komórek

Pobieranie materiału od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa I)

U pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych materiał pobierałem podczas zabiegu endoprotezoplastyki całkowitej stawu kolanowego. Bezpośrednio przed zabiegiem pacjentowi zakładano opaskę Esmarcha na operowaną kończynę, celem zapewnienia bezkrwawego pola operacyjnego. Zabieg wykonywano z typowego cięcia, po odreparowaniu torebki stawowej pobierałem strzykawką próbkę płynu stawowego z zachyłka nadržepkowego. W przypadku, gdy podczas pobierania płyn stawowy został zanieczyszczony krwią, pacjent był wyłączany z badania. Następnie po dojściu do jamy stawowej odsłaniano zachyłek nadržepkowy, skąd pobierałem próbkę maziówki z okolicy górnego bieguna powierzchni rżepkowej kości udowej i pobraną tkankę umieszczałem w naczyniu z roztworem fizjologicznym. Fragmenty chrząstki uzyskiwałem z kłykcia przyśrodkowego lub bocznego kości udowej i umieszczałem w naczyniu z solą fizjologiczną. Zawsze pobierałem powierzchniową warstwę chrząstki, z miejsca leżącego od strony wcięcia międzykłykciowego i w bezpośrednim sąsiedztwie obszaru o największym zniszczeniu chrząstki. We wszystkich przypadkach pobrane próbki tkanek stanowiły odpad operacyjny, bowiem fragmenty maziówki i bloczki chrząstko – kostne, z których pochodziły są rutynowo usuwane podczas zabiegu endoprotezoplastyki stawu kolanowego. W każdym przypadku materiał był pobierany w warunkach jałowych,

następnie przewoziłem go w ciągu 45 minut od pobrania do Zakładu Histologii UM w Poznaniu celem przygotowania hodowli komórkowych, które prowadziła dr med. Agnieszka Ziółkowska.

Pobieranie materiału od pacjentów poddanych rekonstrukcji ACL (grupa II)

U pacjentów poddanych zabiegowi artroskopowej rekonstrukcji więzadła krzyżowego przedniego, analogicznie jak w przypadku grupy I, przed zabiegiem zakładano opaskę Esmarcha celem zapewnienia bezkrwawego pola operacyjnego. Po jałowym umyciu i obłożeniu operowanej kończyny staw kolanowy zginano do 90 stopni i przez portal przednio – boczny (bocznie od więzadła rzepki), wprowadzano optykę artroskopu. Pod kontrolą wzrokową wprowadzano w rzucie portalu przednio – przyśrodkowego (przyśrodkowo od więzadła rzepki) igłę strzykawką, przez którą aspirowano płyn stawowy. Zdecydowałem o takim postępowaniu z uwagi na małą ilość płynu stawowego obecną w stawach osób bez cech choroby zwyrodnieniowej. Ponadto próba aspiracji „na ślepo” grozi jatrogennym uszkodzeniem chrząstki stawowej oraz zanieczyszczeniem próbki krwią. W przypadku zanieczyszczenia próbki płynu stawowego krwią pacjenta wyłączałem z badania.

Po pobraniu płynu staw wypełniano płynem fizjologicznym, a przez portal przednio – przyśrodkowy wprowadzano narzędzia artroskopowe. Próbkę maziówki pobierano z zachyłka nadrzepkowego. Pobrane fragmenty maziówki umieszczałem w naczyniu wypełnionym płynem fizjologicznym. Po przewierceniu w kości piszczelowej i udowej kanałów przeprowadzano przez nie przeszczep wytworzony ze ścięgien mięśni półścięgnistego i smukłego, który następnie mocowano do kości. Po jego ustabilizowaniu wykonywano śródoperacyjną ocenę konfliktu przeszczepu z kłykiem bocznym kości udowej. W przypadku zaistnienia takiego konfliktu wykonywano rutynową procedurę notch - plasty, która polega na usunięciu leżącego w sąsiedztwie dołu międzykłykciowego chrząstno – kostnego fragmentu kłykcia przyśrodkowego kości udowej, który konfliktuje się z przeszczepem więzadła. Usuwany fragment pochodzi z nieobciążonej powierzchni chrząstki i nie wpływa ujemnie na biomechanikę stawu kolanowego. Z uzyskanego bloczka kostno – chrząstnego

pobierałem powierzchniowy fragment chrząstki i umieszczałem go w naczyniu z płynem fizjologicznym. We wszystkich przypadkach materiał, który pobierałem stanowił odpad operacyjny. W każdym przypadku materiał był pobierany w warunkach jałowych, następnie przewoziłem go w ciągu 45 minut od pobrania do Zakładu Histologii UM w Poznaniu celem prowadzenia hodowli komórkowych.

Izolacja komórek i przygotowanie hodowli pierwotnej

W dniu poprzedzającym pobranie materiału i założenie hodowli przygotowywano medium hodowlane na bazie Dulbecco's MEM nutrient mix (GIBCO 42400-0028) wg proporcji 1,557 g sproszkowanej mieszanki i 0,11 g NaHCO_3 /100 ml wody destylowanej. Po dokładnym wymieszaniu przy użyciu mieszadła magnetycznego roztwór filtrowano (Minisart NML SM 16555K, 0,45 μm , Sartorius) i dodawano do niego płodowej surowicy bydlęcej (GIBCO 10106-169) oraz mieszaninę penicyliny, streptomycyny i amfoterycyny B (Antibiotic Antimycotic Solution, Sigma - Aldrich A-5955) w ilości odpowiednio 6 i 1,5 ml / 100 ml roztworu. Przygotowany roztwór umieszczano w inkubatorze, w temperaturze 37 °C, atmosferze 95% powietrza i 5% CO_2 , wilgotności 100% na ok. 20 h. Następnie sprawdzano i wyrównywano jego pH przy użyciu 1 M NaOH lub 1 M HCl. Odczyn medium był kontrolowany także przed każdą jego zmianą.

Po przywiezieniu materiału do Zakładu Histologii próbki płynu maziowego były odwirowywane, zamrażane i przechowywane w temperaturze -80 °C do czasu wykonania oznaczeń ELISA. Materiał tkankowy posłużył do założenia hodowli pierwotnej, a wszystkie etapy tego procesu, jak również czynności związane z prowadzeniem hodowli odbywały się w warunkach sterylnych. Fragmenty błony maziowej i chrząstki stawowej o objętości około 20 – 35 mm^3 były oczyszczane, rozdrabniane mechanicznie przy użyciu skalpela, następnie trawione w zawiesinie kolagenazy I. Roztwór kolagenazy przygotowywano na bazie otrzymanego wcześniej medium hodowlanego. W tym celu dodawano do niego albuminę bydlęcą (BSA, Sigma – Aldrich A-7030), bufor HEPES (Sigma – Aldrich, H3375) kolagenazę I (Sigma – Aldrich C-0130) i inhibitor trypsyny (Sigma – Aldrich C-0130) w ilościach 0,03 g, 0,475 g, 0,1 g i 0,01 g/100 ml medium). Następnie wyrównywano pH roztworu do 7,4. Proces enzymatycznego oddzielania komórek od macierzy odbywał się w łaźni

wodnej z wytrząsaniem, w temperaturze 37 °C i trwał w wypadku synowocytów 20 minut, w wypadku chondrocytów 40 minut. Po trawieniu zawiesinę przepuszczano przez filtr nylonowy do próbówki, a następnie wirowano. W celu wypłukania pozostałości roztworu kolagenazy I, po odwirowaniu usuwano supernatant z warstwy komórek, wprowadzano świeże medium, mieszano do uzyskania zawiesiny i powtórnie wirowano. Tak uzyskaną warstwę komórek umieszczano w świeżym medium hodowlanym, następnie dla każdej próbki obliczano stężenie komórek. Na potrzeby prowadzenia hodowli przyjęto stałe początkowe stężenie komórek w medium służącym do założenia hodowli, które wynosiło 5000 komórek w 3 ml medium. Każdą próbkę rozcieńczano do powyższego stężenia poprzez dodawanie odpowiedniej ilości płynu hodowlanego. Otrzymaną w ten sposób zawiesinę o wystandaryzowanej ilości komórek i objętości medium umieszczano w dołkach płytki hodowlanej (NUNC Brand Products 143982).

3.2.3. Prowadzenie hodowli komórkowych

Naczynia hodowlane z umieszczonymi w nich komórkami przechowywano w inkubatorze, w temperaturze 37 °C, atmosferze 95% powietrza i 5% CO₂, wilgotności 100%. Równoległe z właściwymi hodowlami prowadzono hodowle kontrolne, uzyskane z tych samych komórek w identycznych warunkach. Umożliwiło to przeprowadzenie co 24 godziny kontroli dynamiki rozwoju i czystości badanych komórek, ocenę ich morfologii bez konieczności narażania właściwych hodowli na dodatkowe manipulacje, a także pozwoliło na ograniczenie ryzyka kontaminacji.

Dynamika wzrostu komórek w prowadzonych hodowlach eliminowała konieczność ich pasażowania. Przez cały okres hodowli komórki rozrastały się swobodnie w obrębie dna naczynia. Zdecydowano o prowadzeniu hodowli przez 6 dni, celem określenia metabolicznej aktywności komórek maziówki i chrząstki w warunkach, gdy nie znajdują się pod wpływem czynników metabolicznych oraz mediatorów produkowanych przez inne tkanki stawowe. Medium hodowlane zbierano z warstwy komórek co 48 h, i wymieniano je na świeże. Zebrany płyn zamrażano

i przechowywano w temperaturze $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ do momentu oznaczeń. Łącznie z każdej hodowli uzyskano 3 próbki płynu inkubacyjnego pobrane w 2,4 i 6 dobie.

3.2.4. Oznaczenia stężeń badanych cytokin z użyciem metody ELISA

Do oznaczenia stężeń wybranych chemokin: leptyny, adiponektyny i interleukiny 1-beta użyto komercyjnych zestawów, odpowiednio: Human Leptin Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, DLP00; Human Total Adiponectin/Acrp30 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, DRP 300 oraz Human IL-1 beta/IL-1F2 Quantikine ELISA Kit, R&D Systems, DLB 50. Zebrane wcześniej płyny (medium hodowlane znad komórek hodowli pierwotnej synowocytów i chondrocytów oraz płyn stawowy) rozmrożono bezpośrednio przed wykonaniem analizy. Płyn stawowy ze względu na swoje właściwości fizyko-chemiczne został 10-krotnie rozcieńczony w roztworze soli fizjologicznej. Oznaczenia dokonano według procedury opisanej przez producenta. Po uprzednim przygotowaniu płytek w kolejnych celkach umieszczono znane stężenia badanych chemokin w dwóch powtórzeniach, rozpuszczalnik peptydu oraz próbki medium hodowlanego i płynu stawowego. Wypełnione płytki inkubowano przez 2 godziny w temperaturze pokojowej. Po trzykrotnym przepłukaniu płytek do każdej studzienki dodano sprzężone z enzymem przeciwciała przeciw badanym peptydom. Po kolejnym cyklu płukania (Labsystem, Wellwash 4) do celek płytki dodano bezbarwny substrat. Uzyskano barwny produkt reakcji i po 30 minutach reakcja została zahamowana roztworem HCl. Absorbancję odczytano przy długości fali 540 nm w ciągu 10 min od zakończenia reakcji. Stężenie cytokin w badanych próbkach obliczono na podstawie uzyskanych wartości absorbancji w odniesieniu do wyznaczonej krzywej standardowej.

Reasumując, u każdego pacjenta, za wyjątkiem osób z grupy II u których nie udało się pobrać kompletu próbek, wykonano następujące oznaczenia dla każdego z powyższych peptydów:

1. Stężenie w płynie stawowym
2. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej synowocytów – w 2 dobie
3. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej synowocytów – w 4 dobie
4. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej synowocytów – w 6 dobie
5. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej chondrocytów – w 2 dobie
6. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej chondrocytów – w 4 dobie
7. Stężenie w medium z hodowli pierwotnej chondrocytów – w 6 dobie

Sumarycznie daje to 21 oznaczeń u jednego pacjenta (odpowiednio 7 dla IL1-beta, leptyny, adiponektyny). Przy liczbie 40 pacjentów w obu grupach, po uwzględnieniu niekompletnych zestawów próbek u niektórych chorych z grupy II jest to łącznie 735 próbek do oznaczeń metodą ELISA. Z uwagi na fakt, że po wyznaczeniu krzywych standardowych do dyspozycji pozostało 720 dołeków, zdecydowano o wyłączeniu z badania próbek medium z szóstej doby hodowli chondrocytów od pacjentów z grupy II, u których nie pobrano płynu stawowego.

3.2.5. Analiza statystyczna

Po uzyskaniu wyników oznaczeń stężeń badanych cytokin metodą ELISA dokonałem, we współpracy z mgr Agnieszką Seraszek z Zakładu Bioinformatyki i Biologii Obliczeniowej UM w Poznaniu, analizy statystycznej uzyskanych wyników.

Dla wszystkich ocenianych parametrów wyliczyłem przy pomocy programu Statistica 9 firmy Statsoft następujące parametry: odchylenie standardowe, wariancję, średnią, medianę, minimum i maksimum. W obrębie każdej próby dokonałem analizy normalności rozkładu z zastosowaniem testu W Shapiro – Wilka (uzyskana wartość $p > 0,05$ oznacza występowanie rozkładu normalnego w próbie).

Podczas analizy różnic statystycznych w obrębie jednej grupy stosowałem testy dla zmiennych powiązanych. W wypadku, gdy w obrębie obu prób stwierdziłem rozkład normalny stosowałem test t-Studenta, natomiast w sytuacji, gdy w danej parze jedna lub dwie próby nie wykazywały rozkładu normalnego, stosowałem test Wilcoxon.

Podczas oceny różnic występujących pomiędzy obiema grupami pacjentów stosowałem testy dla zmiennych niepowiązanych. W sytuacji, gdy w danej parze przynajmniej jedna próba nie wykazywała rozkładu normalnego stosowałem test Manna – Whitney. Natomiast jeśli w obrębie analizowanej pary obie próby wykazywały rozkład normalny, z uwagi na ich licznosc mniejszą niż 50, przed rozpoczęciem właściwej analizy, oceniałem jednorodność wariancji z zastosowaniem testu Levena. Jeśli wariancje były jednorodne, do porównania grup wybierałem test t, natomiast przy braku jednorodności stosowano test Cochran – Coxa.

Analizę korelacji przeprowadziłem w oparciu o testy Spearmana i Pearsona. Pierwszy test stosowałem w przypadku braku rozkładu normalnego w obrębie przynajmniej jednej z analizowanych prób, a także dla korelacji z parametrami radiologicznymi, ponieważ klasyfikacje Ahlbäcka i Kellgrena – Lawrenca są skalami porządkowymi. Drugi z testów stosowałem, gdy obie oceniane próby wykazywały rozkład normalny.

Ze względu na niewielką liczbę kobiet w grupie II, oraz mężczyzn w grupie I analiza statystyczna zależności uzyskanych wyników od płci byłaby obarczona dużym błędem. Z tego powodu odstąpiłem od przeprowadzania takiej oceny.

3.2.6. Etyka badań naukowych

Na prowadzenie powyższych badań uzyskałem zgodę Komisji Bioetycznej przy Uniwersytecie Medycznym im. Karola Marcinkowskiego w Poznaniu nr 2048 / 2008 z 4 grudnia 2008 roku. Każdy pacjent uczestniczył w badaniu dobrowolnie. Wszyscy chorzy przed przystąpieniem do badań uzyskiwali dokładną informację na temat ich celu oraz przebiegu, następnie, jeśli wyrazili zgodę na udział w badaniu podpisywali stosowny formularz świadomej zgody. Na każdym etapie badań pacjenci mieli zapewnioną możliwość rezygnacji z udziału w badaniu bez ponoszenia żadnych konsekwencji.

4. WYNIKI

4.1 Interleukina 1 - beta

4.1.1. Charakterystyka produkcji IL – 1 beta w hodowli synowocytów i chondrocytów stawów kolanowych objętych chorobą zwyrodnieniową (grupa I).

W badanej grupie pacjentów we wszystkich próbkach pobranych z hodowli zarówno synowocytów, jak i chondrocytów stężenie IL - 1 beta było o rząd wielkości wyższe w próbkach płynu stawowego (tabela 4.1.1).

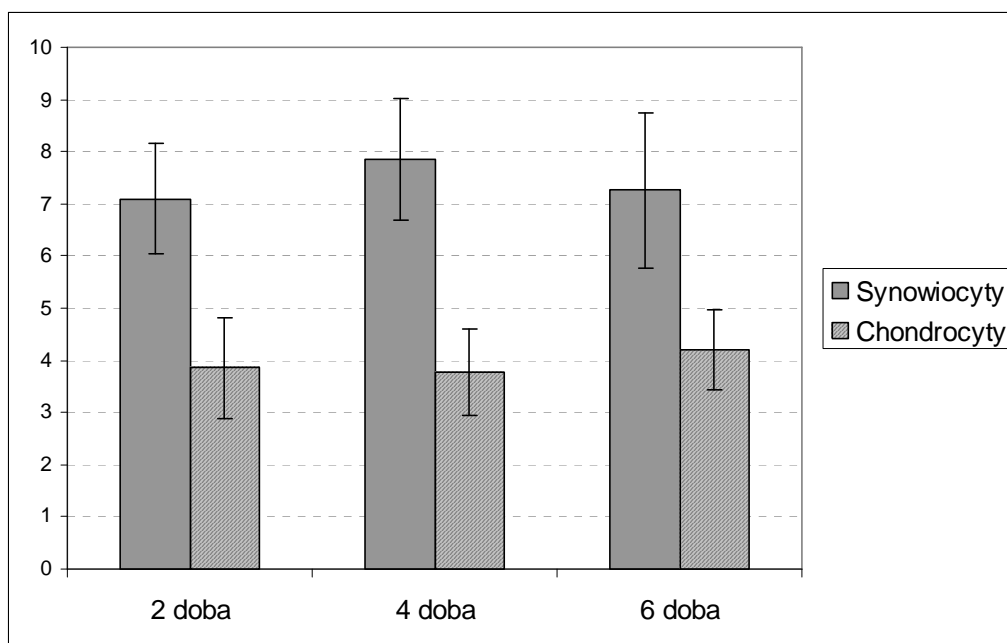
Tabela 4.1.1 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe [pg/ml] oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń IL – 1 beta w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy I.

Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład normalny
Płyn stawowy	-	16	104,75	81	130,0	16,13	0,0807
Synowocyty	2 doba	17	7,09	5,8	9,9	1,06	0,0307
Synowocyty	4 doba	17	7,85	4,9	9,8	1,17	0,3841
Synowocyty	6 doba	17	7,26	4,8	10,2	1,48	0,7348
Chondrocyty	2 doba	17	3,85	2,2	6,3	0,97	0,5450
Chondrocyty	4 doba	17	3,78	2,2	6,0	0,82	0,0513
Chondrocyty	6 doba	17	4,21	3,2	6,5	0,76	0,0053

W hodowli synowocytów stężenie interleukiny - 1 beta było w drugiej dobie najniższe, znamienne statystycznie wzrastało w czwartej dobie (test Wilcoxon, $p=0,0261$), następnie nieistotnie statystycznie obniżało się w szóstej dobie, przyjmując jednak wartość większą niż w drugiej dobie (brak istotności statystycznej) (rycina 4.1.1, tabela 4.1.1). Stwierdziłem wysoką korelację pomiędzy stężeniami interleukiny - 1 beta w płynach z hodowlanych synowocytów z drugiej i czwartej (test Spearmana, $r=0,6937$, $p=0,002$), a także z drugiej i szóstej doby (test Spearmana, $r=0,7703$, $p=0,002$).

W próbkach medium pobranego z hodowli chondrocytów stężenie interleukiny – 1 beta w drugiej dobie było nieznacznie wyższe niż w czwartej (brak istotności statystycznej) , następnie istotnie wzrastało (test Wilcoxona, $p=0,0186$), tak że w ostatniej dobie hodowli było wyższe (choć nieistotnie statystycznie) niż na początku jej prowadzenia (rycina 4.1.1, tabela 4.1.1). Stwierdziłem wysoką korelację między stężeniami tego mediatora w próbkach pobranych w drugiej i czwartej dobie trwania hodowli (test Pearsona, $r=0,7339$, $r=0,001$)

W omawianej grupie pacjentów stężenie IL1 - beta w próbkach pobranych z hodowli synowioctów było znamienne wyższe niż w medium z hodowli chondrocytów, zarówno w drugiej (test Wilcoxona, $p=0,0003$), czwartej (test t-Studenta, $p=0,0001$), jak i szóstej (test Wilcoxona, $p=0,0004$) dobie prowadzenia hodowli(rycina 4.1.1, tabela 4.1.1). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami IL - 1 beta w mediach z hodowli synowioctów i chondrocytów pobranych w tych samych dobach.



Rycina 4.1.1 Stężenia IL – 1 beta [pg/ml] w próbkach płynu z hodowli synowioctów i chondrocytów od pacjentów z grupy I, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

4.1.2 Charakterystyka produkcji IL – 1 beta w hodowli synowocytów i chondrocytów stawów kolanowych z uszkodzonym więzadłem krzyżowym przednim (grupa II)

W badanej grupie pacjentów, podobnie jak w grupie pierwszej, stężenie IL-1 beta we wszystkich próbkach medium z hodowli, zarówno chondrocytów, jak i synowocytów, było o rząd wielkości niższe niż w próbkach płynu stawowego (Tabela. 4.1.2).

Tabla 4.1.2 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe [pg/ml], oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń IL – 1 beta w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy II.

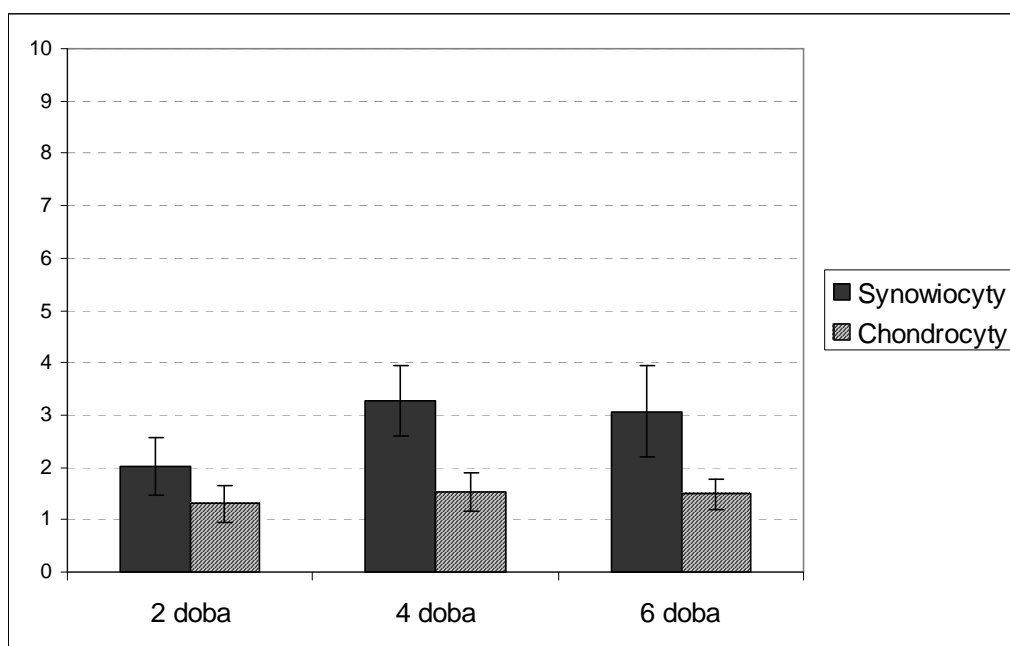
Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład normalny
Płyn stawowy	-	18	20,50	12,0	32,0	5,36	0,6825
Synowocyty	2 doba	18	2,03	1,1	2,9	0,55	0,5194
Synowocyty	4 doba	18	3,28	1,9	4,3	0,68	0,3398
Synowocyty	6 doba	18	3,07	1,8	4,6	0,86	0,3409
Chondrocyty	2 doba	18	1,30	0,8	2,1	0,34	0,5118
Chondrocyty	4 doba	18	1,54	0,9	2,3	0,37	0,9084
Chondrocyty	6 doba	18	1,49	0,9	1,9	0,29	0,5818

W trakcie prowadzenia hodowli synowocytów stężenie IL – 1 beta w medium hodowlanym początkowo istotnie wzrastało między drugą, a czwartą dobą (test t-Studenta, $p=0,0001$). Następnie zmniejszało się w szóstej dobie (nieistotnie statystycznie), jednakże było ono istotnie wyższe niż w drugiej dobie (test t-Studenta, $p=0,0001$) (rycina 4.1.2, tabela 4.1.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami IL – 1 beta w mediach z poszczególnych dni hodowli.

W próbkach medium hodowli chondrocytów stężenie interleukiny – 1 beta, analogicznie, jak w przypadku hodowli synowocytów, wzrastało w czwartej dobie (test t-Studenta, $p=0,019$), by nieistotnie zmniejszyć się w ostatniej dobie trwania hodowli, przy czym stężenie było ono nieznacznie wyższe niż na początku hodowli (brak istotności statystycznej)(rycina 4.1.2, tabela 4.1.2). Stwierdziłem występowanie

korelacji między stężeniem IL – 1 beta w medium hodowli chondrocytów z czwartej i szóstej doby hodowli (test Pearsona, $r=0,4981$, $p=0,035$)

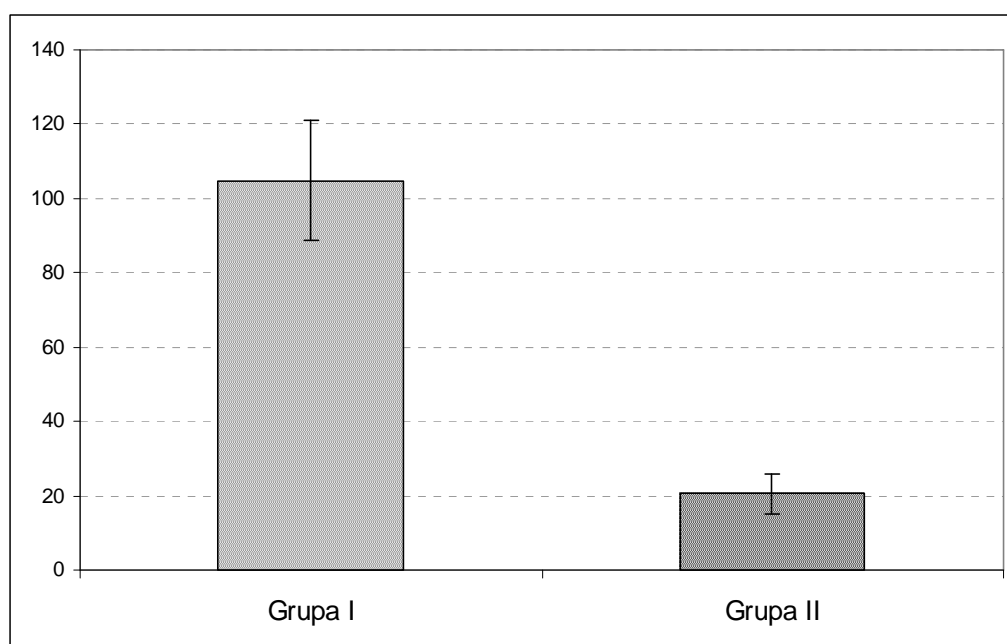
Przez cały okres prowadzenia hodowli stężenie IL - 1 beta w próbkach pobranych z hodowli synowioctów było znamienne wyższe niż w medium z hodowli chondrocytów (w każdym przypadku test t-Studenta $p<0,0003$) (rycina 4.1.2, tabela 4.1.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami IL - 1 beta w mediach z hodowli synowioctów i chondrocytów pobranych w tych samych dobach.



Rycina 4.1.2 Stężenia IL – 1 beta [pg/ml] w próbkach płynu z hodowli synowioctów i chondrocytów od pacjentów z grupy II, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

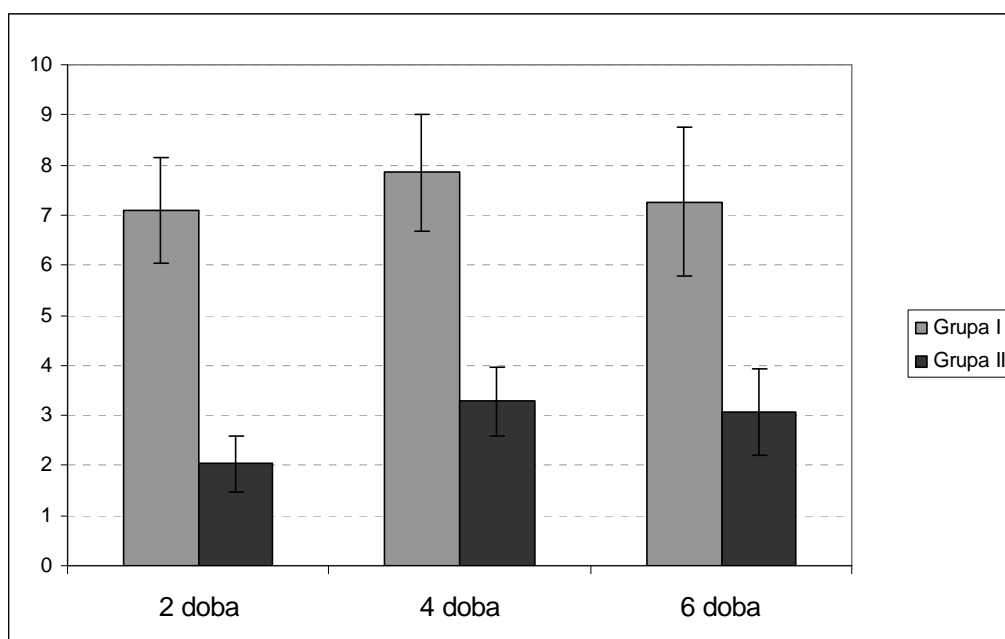
4.1.3 Porównanie stężenia IL – 1 beta w materiale od obu grup pacjentów

Stężenie IL – 1 beta w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów kolanowych było znacznie wyższe (test t, $p=0,0001$) niż w próbkach uzyskanych od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (rycina 4.1.3)



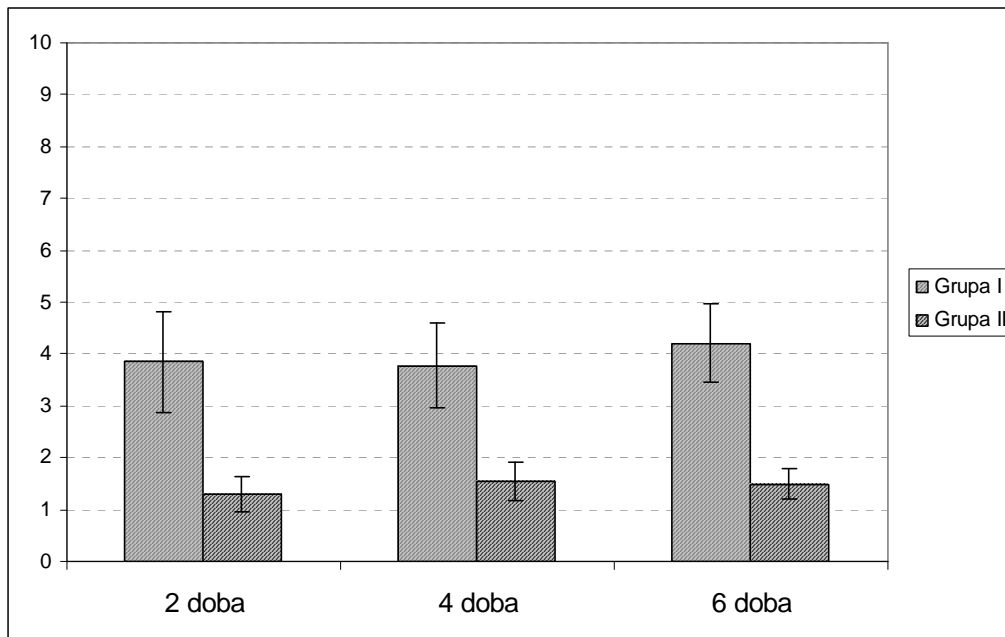
Rycina 4.1.3 Stężenie interleukiny – 1 beta [pg/ml] w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z grupy I i II.

Również stężenie interleukiny - 1 beta w próbkach medium hodowlanego uzyskanego z hodowli synowocytów było zarówno w drugiej (test Manna-Whitneya, $p=0,0001$), jak również w czwartej i szóstej dobie, istotnie wyższe (test Cochran – Coxa, w obu dobach $p=0,0001$) w materiale od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową (rycina 4.1.4) w porównaniu do analogicznych próbek od pacjentów z uszkodzeniem ACL.



Rycina 4.1.4 Stężenie IL – 1 beta [pg/ml] w próbkach medium z hodowli synowocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

Stężenie interleukiny - 1 beta w próbkach medium hodowlanego uzyskanego z hodowli chondrocytów było w zarówno w drugiej (test t, $p=0,0001$), czwartej (test Cochrańa – Coxa, $p=0,0001$) i szóstej dobie (test Manna-Whitneya, $p=0,0001$) istotnie wyższe w materiale od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową (rycina 4.1.5) w porównaniu z analogicznymi próbkami od pacjentów z grupy II.



Rycina 4.1.5 Stężenie IL – 1 beta [pg/ml] w próbkach medium z hodowli chondrocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

4.2 Leptyna

4.2.1 Charakterystyka produkcji leptyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa I).

W badanej grupie pacjentów najwyższe stężenie leptyny występowało w płynie stawowym. Stężenie to, analogicznie jak w przypadku IL 1 - beta, było o rząd wielkości wyższe niż w próbkach mediów hodowlanych.

Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład Normalny
Płyn stawowy	-	16	11,40	6,60	17,50	4,05	0,0380
Synowioocyty	2 doba	17	0,80	0,59	0,95	0,11	0,0380
Synowioocyty	4 doba	17	0,87	0,68	1,10	0,11	0,9388
Synowioocyty	6 doba	17	0,76	0,49	0,99	0,14	0,8127
Chondrocyty	2 doba	17	0,69	0,51	0,98	0,14	0,2940
Chondrocyty	4 doba	17	0,69	0,58	0,88	0,08	0,0304
Chondrocyty	6 doba	17	0,73	0,59	0,98	0,09	0,2069

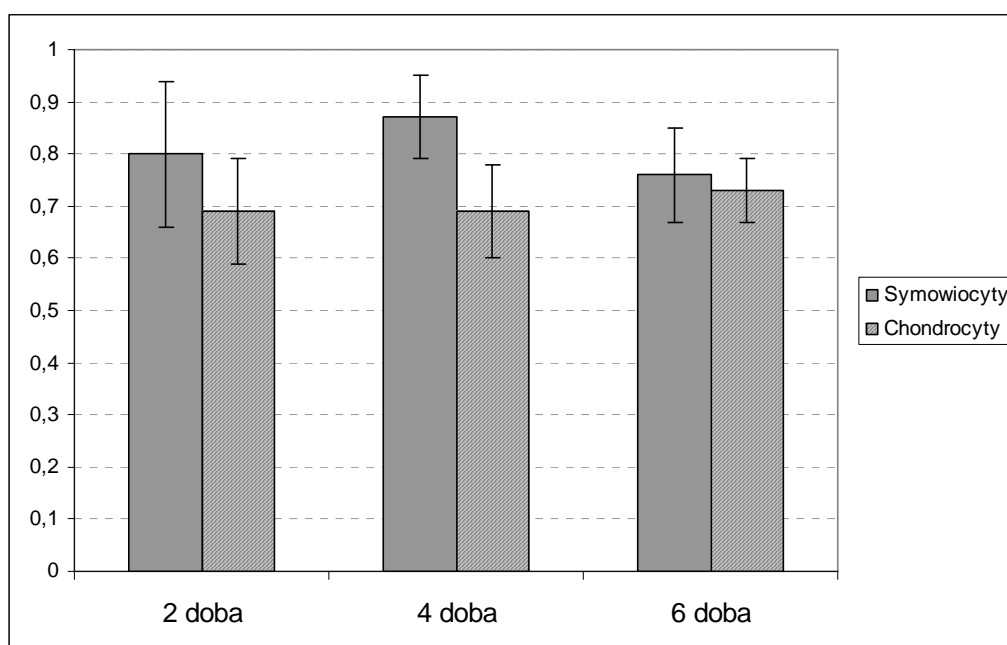
tabela 4.2.1 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe [ng/ml], oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń leptyny w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy I.

W hodowli synowocytów stężenie leptyny w pierwszym etapie prowadzenia hodowli istotnie statystycznie wzrastało (test Wilcozona, $p=0,0157$), osiągając w czwartej dobie najwyższą wartość, następnie istotnie zmniejszało się (test t-Studenta, $p=0,0139$), osiągając w szóstej dobie stężenie nieistotnie niższe niż na początku hodowli (rycina 4.2.1 , tabela 4.2.1). Stwierdziłem występowanie korelacji między stężeniem leptyny w materiale z hodowli synowocytów z drugiej i czwartej doby prowadzenia hodowli (test Spearmana, $r=0,5$, $p=0,04$);

W próbkach medium pobranego z hodowli chondrocytów stężenie leptyny utrzymywało się w trakcie trwania hodowli stałym poziomie między drugą i czwartą dobą, następnie nieznacznie wzrastało (brak znamienności statystycznej) i w końcowym etapie prowadzenia hodowli było nieistotnie statystycznie wyższe niż na

jej początku (rycina 4.2.1, tabela 4.2.1). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami leptyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

W drugiej oraz czwartej dobie prowadzenia hodowli stężenie leptyny w próbkach pobranych z hodowli synowioctów było znamienne wyższe niż w medium z hodowli chondrocytów (test Wilcoxon, $p=0,0262$ oraz $p=0,0003$). Z kolei w ostatniej dobie było ono również wyższe, jednakże różnica była nieistotna statystycznie (rycina 4.2.1, tabela 4.2.1). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami leptyny w mediach z hodowli synowioctów i chondrocytów pobranych w tych samych dobach.



Rycina 4.2.1 Stężenia leptyny [ng/ml] w próbkach płynu z hodowli synowioctów i chondrocytów od pacjentów z grupy I, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

4.2.2. Charakterystyka produkcji leptyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (grupy II).

W badanej grupie pacjentów najwyższe stężenie leptyny występowało w płynie stawowym. Stężenie to było o rząd wielkości wyższe, niż w próbkach mediów hodowlanych na każdym etapie trwania hodowli (tabela 4.2.2),

Tabela 4.2.2 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe [ng/ml], oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń leptyny w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy II.

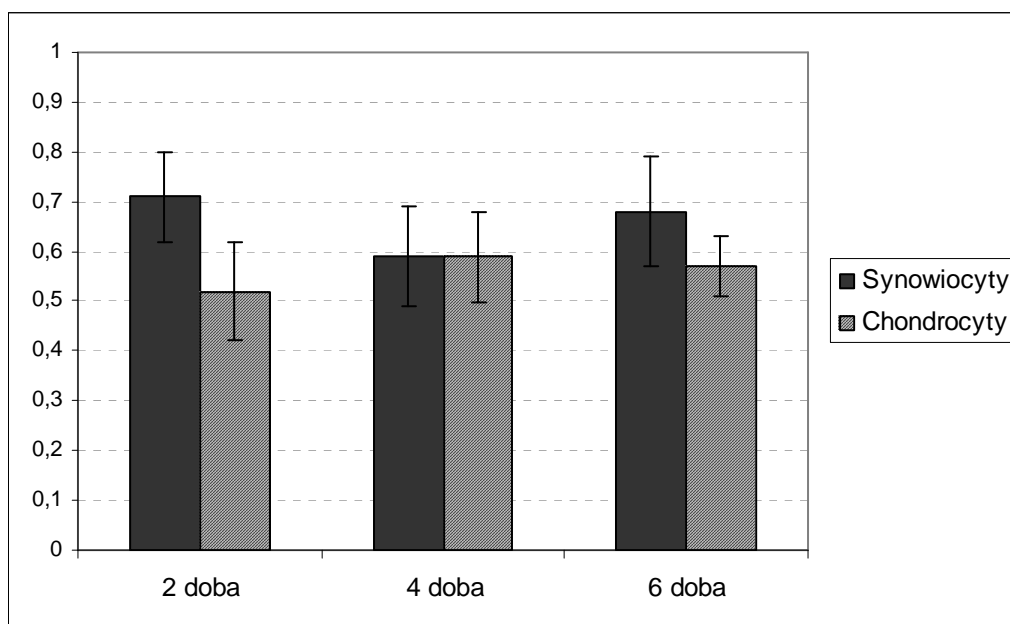
Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład Normalny
Płyn stawowy	-	18	6,64	4,80	9,30	1,33	0,2828
Synowocyty	2 doba	18	0,71	0,54	0,85	0,09	0,8446
Synowocyty	4 doba	18	0,59	0,39	0,79	0,10	0,9981
Synowocyty	6 doba	18	0,68	0,48	0,83	0,11	0,1301
Chondrocyty	2 doba	18	0,52	0,29	0,65	0,10	0,0273
Chondrocyty	4 doba	18	0,59	0,49	0,87	0,09	0,0098
Chondrocyty	6 doba	18	0,57	0,48	0,65	0,06	0,0983

W trakcie prowadzenia hodowli synowocytów stężenie leptyny w medium hodowlanym początkowo istotnie zmniejszało się między drugą a czwartą dobą (test t-Studenta, $p=0,0002$). Następnie znamienne wzrastało w szóstej dobie (test t-Studenta, $p=0,0084$), przy czym stężenie w szóstej dobie było nieco niższe (różnica statystycznie nieistotna) niż na początku hodowli (rycina 4.2.2, tabela 4.2.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami leptyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

W próbkach medium pobranego z hodowli chondrocytów pacjentów grupy II stężenie leptyny wzrastało w czwartej dobie (test Wilcoxon, $p=0,0365$), by nieznacznie zmniejszyć się ostatniej dobie (test Wilcoxon, $p=0,03719$) trwania hodowli, przy czym stężenie to było wyższe (różnica statystycznie nieistotna) niż w

drugiej dobie (rycina 4.2.2, tabela 4.2.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami leptyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

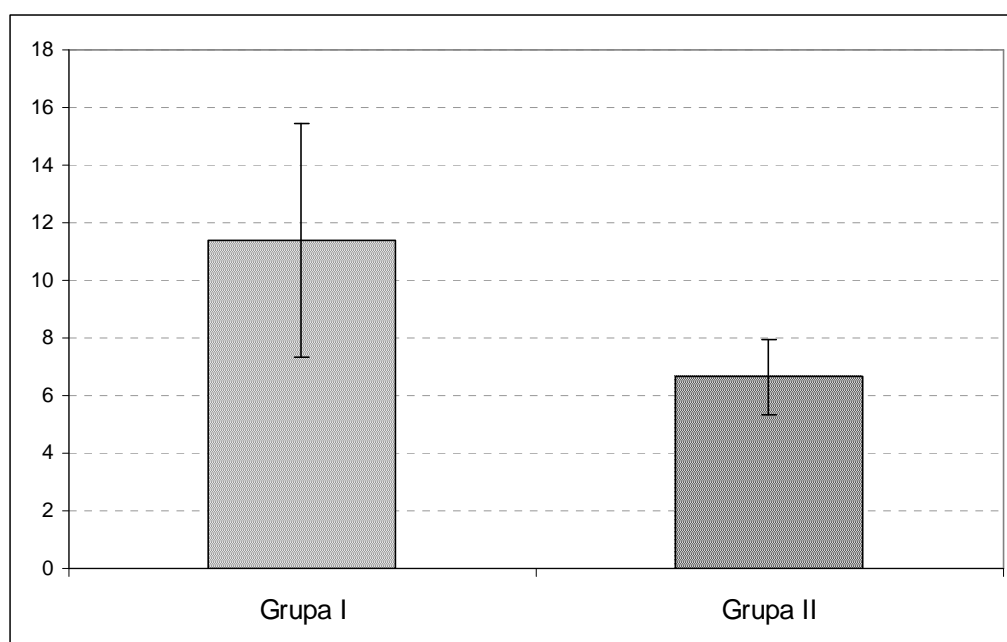
W trakcie prowadzenia hodowli komórek od omawianej grupy pacjentów stężenie leptyny początkowo było istotnie wyższe (test Wilcoxon, $p=0,0005$) w hodowli synowocytów, następnie średnie stężenia z obu hodowli osiągnęły taką samą wartość (brak statystycznie istotnej różnicy między próbkami), a w ostatnim etapie ponownie istotnie wyższe (test t-Studenta, $p=0,0014$) było stężenie w hodowli synowocytów (rycina 4.2.2, tabela 4.2.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami leptyny w mediach z hodowli synowocytów i chondrocytów pobranych w tych samych dobach.



Rycina 4.2.2 Stężenia leptyny [ng/ml] w próbkach płynu z hodowli synowocytów i chondrocytów od pacjentów z grupy II, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

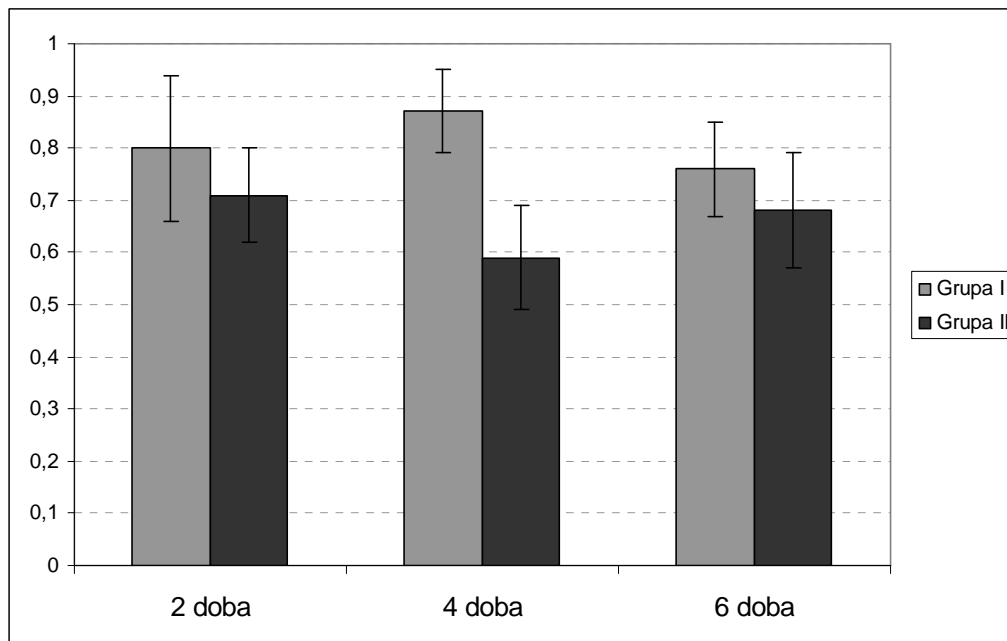
4.2.3 Porównanie stężeń leptyny w próbkach pobranych od obu grup pacjentów

Stężenie leptyny w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową było istotnie wyższe (test Manna - Whitney, $p=0,0007$) niż w próbkach od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (rycina 4.2.3)



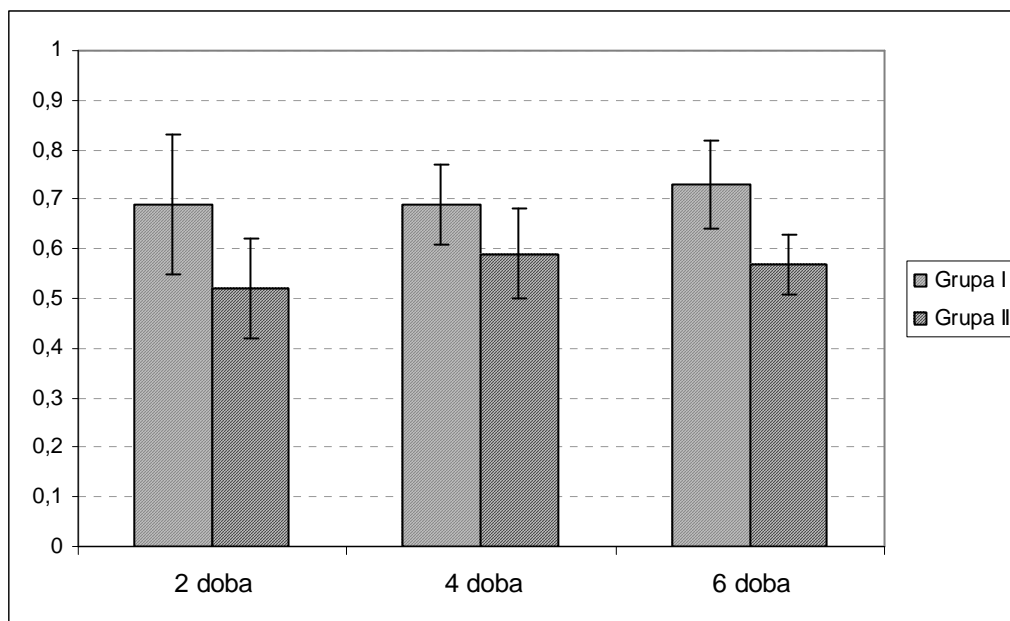
Rycina 4.2.3 Stężenie leptyny [ng/ml] w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z grupy I i II.

Stężenie leptyny w próbkach płynu z hodowli synowocytów pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów w drugiej (test Manna – Whitneya $p=0,0043$) oraz czwartej (test Cochrańa – Coxa, $p=0,0001$) dobie było istotnie wyższe niż w próbkach od pacjentów z uszkodzeniem ACL. W szóstej dobie hodowli stężenie to było również wyższe w materiale grupy I, jednakże różnica nie była istotna statystycznie (rycina 4.2.4)



Rycina 4.2.4 Stężenie leptyny [ng/ml] w próbkach medium z hodowli synowocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli

W próbkach medium hodowlanego pobranego z hodowli chondrocytów od pacjentów z grupy I stężenia leptyny były istotnie wyższe niż w materiale od pacjentów z II grupy zarówno w początkowym (test Manna – Whitney, $p=0,0001$), środkowym (test Manna - Whitney, $p=0,0002$) , jak i końcowym (test Cochran – Coxa, $p=0,0001$) etapie hodowli (rycina 4.2.5).



Rycina 4.2.5 Stężenie leptyny [ng/ml] w próbkach medium z hodowli chondrocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli

4.3 Adiponektyna

4.3.1 Charakterystyka produkcji adiponektyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów (grupa I).

W badanej grupie pacjentów najwyższe stężenie adiponektyny występowało w płynie stawowym. Stężenie to było o dwa rzędy wielkości wyższe niż w próbkach mediów hodowlanych na każdym etapie trwania hodowli (tabela 4.3.1). W omawianej grupie pacjentów stwierdziłem wysoką korelację między stężeniem adiponektyny w próbkach płynu stawowego, a jej stężeniem w medium pobranym w drugiej dobie hodowli chondrocytów (test Pearsona, $r=0,6494$, $p=0,005$). Należy jednak zaznaczyć, że nie przeliczałem stężeń badanych cytokin względem całkowitego stężenia białka w danej próbce.

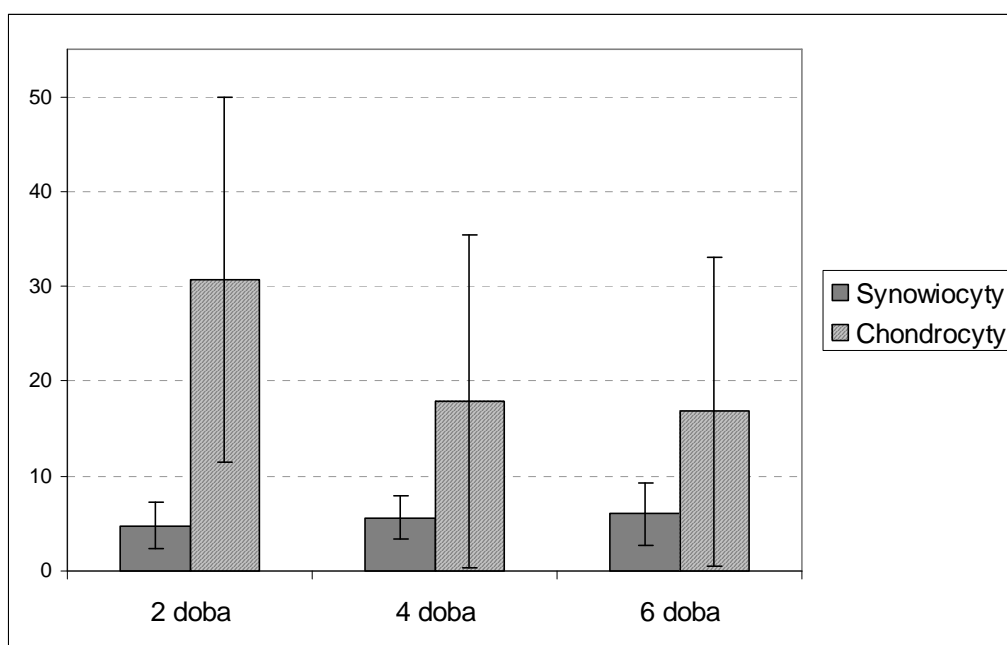
Tabela 4.3.1 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe, [ng/ml] oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń adiponektyny w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy I.

Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład normalny
Płyn stawowy	-	16	1143,75	100	2500	737,36	0,1658
Synowioocyty	2 doba	17	4,76	2	11	2,44	0,0900
Synowioocyty	4 doba	17	5,65	3	11	2,26	0,0380
Synowioocyty	6 doba	17	6,06	3	15	3,29	0,0100
Chondrocyty	2 doba	17	30,65	7	65	19,23	0,1324
Chondrocyty	4 doba	17	17,88	6	63	17,50	0,0001
Chondrocyty	6 doba	17	16,82	5	55	16,32	0,0003

W hodowli synowocytów stężenie adiponektyny stopniowo wzrastało, zarówno w czwartej, jak i szóstej dobie (rycina 4.3.1, tabela 4.3.1). Różnice między stężeniami tej cytokiny w próbkach z poszczególnych etapów hodowli nie były jednak istotne statystycznie. Nie stwierdziłem również korelacji między stężeniami adiponektyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

W próbkach medium pobranego z hodowli chondrocytów stężenie adiponektyny gwałtownie, istotnie statystycznie obniżało się między drugą i czwartą dobą (test Wilcoxona, $p=0,0217$), następnie zaobserwowano nieznaczny dalszy jego spadek w szóstej dobie (różnica nieistotna statystycznie) i w końcowym etapie prowadzenia hodowli stężenie adiponektyny było istotnie niższe (test Wilcoxona, $p=0,0174$) niż na jej początku (rycina 4.3.1, tabela 4.3.1). Stwierdziłem wysokie korelacje między stężeniami adiponektyny w próbkach z drugiej oraz czwartej (test Spearmana, $r=0,5043$, $p=0,0389$), a także czwartej oraz szóstej doby (test Spearmana, $r=0,593$, $p=0,0126$)

W drugiej oraz czwartej dobie prowadzenia hodowli stężenie adiponektyny w próbkach pobranych z hodowli chondrocytów było znamienne wyższe niż w medium z hodowli synowioctów (test t-Studenta, $p=0,0001$, test Wilcoxona, $p=0,0001$). Z kolei w ostatniej dobie było ono również wyższe, jednakże różnica ta była nieistotna statystycznie (rycina 4.3.1, tabela 4.3.1) Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami adiponektyny w mediach z hodowli synowioctów i chondrocytów pobranych w tych samych dobach.



Rycina 4.3.1 Stężenia adiponektyny [ng/ml] w próbkach płynu z hodowli synowioctów i chondrocytów od pacjentów z grupy I, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

4.3.2 Charakterystyka produkcji adiponektyny w hodowli synowocytów i chondrocytów pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (grupa II).

W badanej grupie pacjentów najwyższe stężenie adiponektyny występowało w płynie stawowym. Stężenie to było znamienne o dwa rzędy wielkości wyższe, niż w próbkach mediów hodowlanych (tabela 4.3.2).

Tabela 4.3.2 Stężenia średnie, minimalne, maksymalne, odchylenie standardowe [ng/ml], oraz wynik oceny normalności rozkładu stężeń adiponektyny w próbkach pochodzących od pacjentów z grupy II

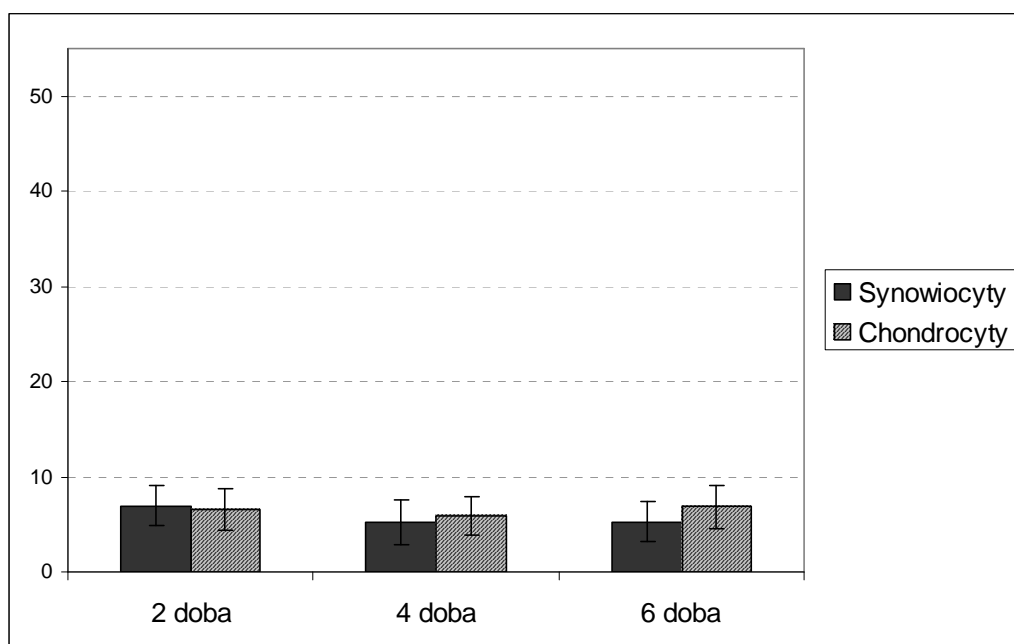
Pochodzenie próbki	Czas hodowli	Liczba próbek	Średnie stężenie	Minimalne stężenie	Maksymalne stężenie	Odchyl. stand.	Rozkład normalny
Płyn stawowy	-	18	623,89	480	820	81,61	0,0839
Synowocyty	2 doba	18	6,94	3	12	2,07	0,4933
Synowocyty	4 doba	18	5,17	2	12	2,36	0,0311
Synowocyty	6 doba	18	5,22	2	9	2,10	0,2676
Chondrocyty	2 doba	18	6,56	3	10	2,23	0,2770
Chondrocyty	4 doba	18	5,83	3	11	2,01	0,2605
Chondrocyty	6 doba	18	6,83	3	12	2,26	0,7561

W trakcie prowadzenia hodowli synowocytów stężenie adiponektyny w medium hodowlanym początkowo istotnie zmniejszało się między drugą a czwartą dobą (test Wilcoxon, $p=0,0162$), a następnie minimalnie wzrastało w 6 dobie (różnica nieistotna statystycznie), przy czym stężenie w szóstej dobie było istotnie niższe (test Wilcoxon, $p=0,0247$) niż w drugiej (rycina 4.3.2, tabela 4.3.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami adiponektyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

W próbkach medium pobranego z hodowli chondrocytów pacjentów grupy II stężenie adiponektyny nieznacznie obniżało się między drugą a czwartą dobą, by następnie zwiększyć się ostatniej dobie trwania hodowli do poziomu niższego niż na jej początku. Różnice między stężeniami adiponektyny w próbkach pobranych na każdym etapie hodowli były nieistotne statystycznie (rycina 4.3.2, tabela 4.3.2). Nie

stwierdziłem korelacji między stężeniami adiponektyny w mediach z poszczególnych dni hodowli.

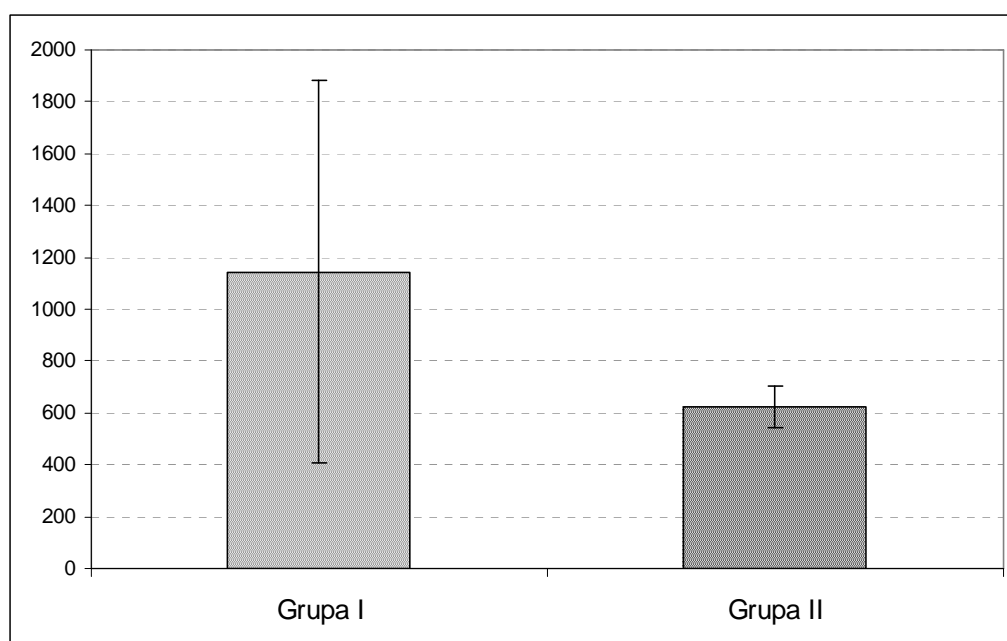
W trakcie prowadzenia hodowli komórek od omawianej grupy pacjentów stężenie adiponektyny było nieznacznie wyższe w hodowli synowocytów w drugiej (brak istotnej statystycznie różnicy) oraz czwartej (różnica statystycznie nieistotna) dobie w porównaniu ze stężeniami w hodowli chondrocytów. W ostatnim etapie stężenie adiponektyny było istotnie wyższe (test t-Studenta, $p=0,0376$) w hodowli chondrocytów (rycina 4.3.2, tabela 4.3.2). Nie stwierdziłem korelacji między stężeniami adiponektyny w pobranych na tych samych etapach prowadzenia hodowli synowocytów i chondrocytów.



Rycina 4.3.2 Stężenia adiponektyny [ng/ml] w próbkach płynu z hodowli synowocytów i chondrocytów od pacjentów z grupy II, pobranych w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli

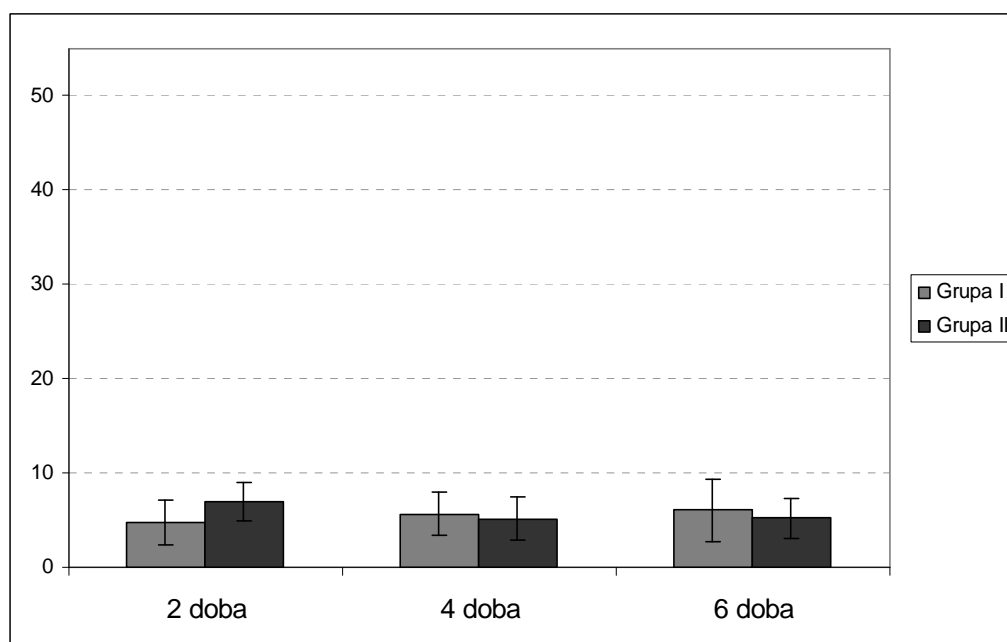
4.3.3 Porównanie stężeń adiponektyny w próbkach pobranych od pacjentów z obu grup.

Stężenie adiponektyny w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową było istotnie wyższe (test t, $p=0,0178$) niż w próbkach od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego (rycina 4.3.3). Zwraca jednak uwagę duży rozrzut wyników w grupie pacjentów z chorobą zwyrodnieniową.



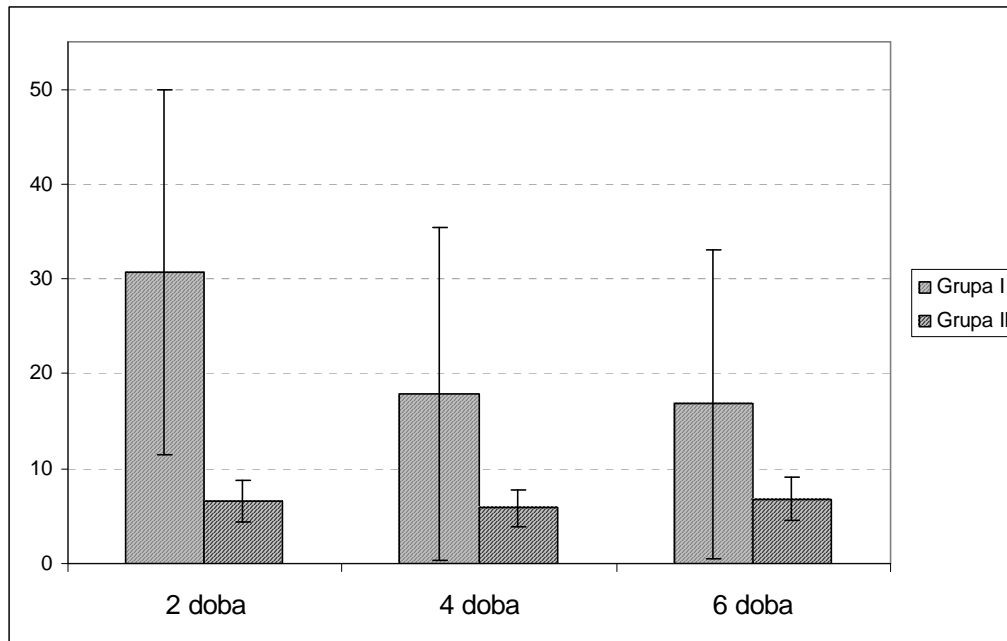
Rycina 4.3.3 Stężenie adiponektyny [ng/ml] w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z grupy I i II.

Stężenie adiponektyny w próbkach płynu z hodowli synowocytów pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów w drugiej dobie było istotnie niższe (test Cochran – Coxa $p=0,0073$) niż na tym etapie w II grupie pacjentów. Natomiast w czwartej i szóstej dobie stężenie to było wyższe (różnica statystycznie nieistotna) w porównaniu do próbek od pacjentów z uszkodzeniem ACL (rycina 4.3.4).



Rycina 4.3.4 Stężenie adiponektyny [ng/ml] w próbkach medium z hodowli synowocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli.

W próbkach medium hodowlanego pobranego z hodowli chondrocytów od pacjentów z grupy I stężenia adiponektyny były istotnie wyższe niż w materiale od pacjentów z II grupy zarówno w początkowym (test Manna – Whitney, $p=0,0001$), środkowym (test Manna - Whitney, $p=0,0101$) , jak i końcowym (test Manna – Whitney, $p=0,0007$) etapie hodowli, mimo znacznego rozrzutu wyników w materiale od pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów (rycina 4.3.5).



Rycina 4.3.5 Stężenie adiponektyny [ng/ml] w próbkach medium z hodowli chondrocytów pochodzących od pacjentów z grupy I i II. Płyny pobierano w drugiej, czwartej i szóstej dobie trwania hodowli

4.4. Korelacje stężeń badanych białek z parametrami klinicznymi i laboratoryjnymi

4.4.1. Korelacje stężeń badanych białek z progresją cech radiologicznych choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego wyrażoną w skalach Kellgrena – Lawrenca I Ahlbäcka.

Stwierdziłem występowanie wysokiej korelacji między radiologicznym zaawansowaniem zmian zwyrodnieniowych ocenianym w skali Kellgrena – Lawrenca, a stężeniem interleukiny – 1 beta w płynie stawowym pobranym od osób z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego (tabela 4.4.1). Zaobserwowałem także występowanie korelacji między zaawansowaniem radiologicznym choroby zwyrodnieniowej ocenianym w powyższej skali, a produkcją IL – 1 beta w hodowli synowocytów w szóstej dobie. Nie stwierdziłem takich korelacji dla próbek z wcześniejszych etapów hodowli synowocytów, oraz próbek medium z hodowli chondrocytów (tabela 4.4.1).

Tabela 4.4.1. Korelacje między progresją cech radiologicznych choroby zwyrodnieniowej stawów w skali Kellgrena – Lawrenca, a stężeniem IL – 1 beta w poszczególnych próbkach.

Skala RTG	Materiał	Test	współczynnik r	wartość p
Kellgrena - Lawrenca	IL – 1 beta płyn stawowy	Spearmana	0,5307	0,0344
Kellgrena - Lawrenca	IL- 1 beta synowocyty 2 doba	Spearmana	-0,1817	0,4851
Kellgrena - Lawrenca	IL- 1 beta synowocyty 4 doba	Spearmana	-0,2954	0,2496
Kellgrena - Lawrenca	IL- 1 beta synowocyty 6 doba	Spearmana	0,5263	0,0300

Stwierdziłem wysoką korelację między radiologicznym zaawansowaniem choroby zwyrodnieniowej ocenianym w skali Ahlbäcka a produkcją adiponektyny przez chondrocyty w drugiej dobie hodowli, przy czym słabła ona w kolejnych jej etapach (tabela 4.4.2)

Tabela 4.4.2. Korelacje między progresją cech radiologicznych choroby zwyrodnieniowej stawów w skali Ahlbäcka, a stężeniem adiponektyny w poszczególnych próbkach z hodowli chondrocytów.

Skala RTG	Materiał	Test	współczynnik r	wartość p
Ahlbäcka	adiponektyna chondrocyty 2 doba	Spearmana	0,5829	0,0141
Ahlbäcka	adiponektyna chondrocyty 4 doba	Spearmana	0,4221	0,0915
Ahlbäcka	adiponektyna chondrocyty 6 doba	Spearmana	0,2303	0,3738

Stężenia adiponektyny w próbkach medium z hodowli synowiocytów pobranych w ostatnim jej etapie ujemnie korelowały z punktacją radiologicznej skali Ahlbäcka, nie stwierdziłem jednak takich zależności dla wcześniejszych etapów hodowli (tabela 4.4.3).

Tabela 4.4.3. Korelacje między progresją cech radiologicznych choroby zwyrodnieniowej stawów w skali Ahlbäcka, a stężeniem adiponektyny w poszczególnych próbkach z hodowli synowiocytów.

Skala RTG	Materiał	Test	współczynnik r	wartość p
Ahlbäcka	adiponektyna synowiocyty 2 doba	Spearmana	0,3834	0,1287
Ahlbäcka	adiponektyna synowiocyty 4 doba	Spearmana	-0,1543	0,5544
Ahlbäcka	adiponektyna synowiocyty 6 doba	Spearmana	-0,6107	0,0092

4.4.2. Korelacje stężeń badanych białek w poszczególnych próbkach. ze wskaźnikiem masy ciała pacjentów z grupy I i II.

Analiza statystyczna wykazała, że w grupie pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi występowała dodatnia korelacja między wskaźnikiem masy tych pacjentów (BMI), a stężeniem interleukiny – 1 beta w próbkach medium hodowlanego z czwartej doby hodowli synowocytów (test Pearsona, $r=0,5939$, $p=0,012$). Wskaźnik masy ciała nie korelował ani ze stężeniami IL – 1 beta w pozostałych próbkach, ani ze stężeniami leptyny i adiponektyny.

W grupie pacjentów z uszkodzeniem ACL stwierdziłem występowanie ujemnej korelacji między BMI a oznaczonymi w próbkach medium z czwartej doby hodowli synowocytów stężeniami IL1-beta (test Spearmana, $r=-0,5178$, $p=0,027$) oraz leptyny a BMI (test Pearsona, $r= -0,485$, $p=0,041$). Korelacji z BMI nie stwierdziłem dla stężeń badanych cytokin we wszystkich pozostałych próbkach.

4.4.3. Wzajemne korelacje między parametrami laboratoryjnymi u pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych (grupa I)

W przypadku pacjentów z grupy I stwierdziłem występowanie zależności między stężeniem adiponektyny w obrębie płynu stawowego, a produkcją adiponektyny w hodowli chrząstki w drugiej dobie, w kolejnych dobach współczynnik korelacji tych zmiennych był jednak bardzo niski i nieistotny statystycznie (tabela 4.4.4). Należy jednak zaznaczyć, że nie przeliczałem stężenia adiponektyny względem całkowitego stężenia białka w badanych próbkach.

Tabela 4.4.4. Korelacje między stężeniem adiponektyny w płynie stawowym, a stężeniem IL – 1 beta w mediach z poszczególnych dniach hodowli chondrocytów w grupie pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów .

Materiał	Materiał	Test	współczynnik r	wartość p
adiponektyna płyn stawowy	adiponektyna chondrocyty 2 doba	Pearson	0,6494	0,0050
adiponektyna płyn stawowy	adiponektyna chondrocyty 4 doba	Spearmana	0,1284	0,6231
adiponektyna płyn stawowy	adiponektyna chondrocyty 6 doba	Spearmana	0,2666	0,3008

Analiza statystyczna wykazała występowanie silnej ujemnej korelacji między produkcją IL – 1 beta w szóstej dobie hodowli synowocytów a produkcją adiponektyny w szóstej dobie hodowli chondrocytów (test Spearmana, $r=-0,6720$, $p=0,0031$). W poprzednich etapach hodowli nie stwierdziłem jednak występowania podobnych zależności.

4.4.4. Wzajemne korelacje między parametrami laboratoryjnymi u pacjentów uszkodzeniem ACL (grupa II)

W II grupie pacjentów analiza statystyczna uzyskanych wyników nie wykazała występowania korelacji między stężeniami badanych cytokin w obrębie mediów hodowlanych w poszczególnych dobach trwania hodowli. Stwierdziłem wprawdzie występowanie ujemnej korelacji między stężeniem leptyny w płynie stawowym a jej produkcją w 4 dobie hodowli synowocytów (test Pearsona, $r=-0,7372$, $p=0,0040$), jednakże w pozostałych etapach hodowli nie stwierdziłem analogicznych zależności, ponadto nie przeliczałem stężenia uzyskanych cytokin względem całkowitego stężenia białka w próbkach materiału.

5. OMÓWIENIE

5.1. Omówienie doboru chorych

Poznanie mechanizmów leżących u podłoża choroby zwyrodnieniowej stawów jest poważnym wyzwaniem dla współczesnej nauki. Postępujące starzenie się społeczeństwa i wraz z nim zwiększenie liczby pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów są istotnymi problemami w ortopedii.

Badania prowadzone w ostatnich latach wykazały istotną rolę mediatorów zapalnych w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów, jednak ich rola jest jak dotąd poznana jedynie w sposób fragmentaryczny [3;9;89]. W szczególnym stopniu dotyczy to odkrytych stosunkowo niedawno cytokin, jakimi są adiponektyna i leptyna. Wyniki prowadzonych obecnie badań coraz wyraźniej wskazują na ich istotną rolę w szeregu procesów chorobowych mieszczących się w obrębie tzw. zespołu metabolicznego, natomiast ich udział w chorobie zwyrodnieniowej stawów jest bardzo słabo udokumentowany [92;140]. Z powyższego względu interesujące z poznawczego punktu widzenia wydawało się przeprowadzenie badań dotyczących produkcji tych właśnie białek w obrębie stawów dotkniętych procesem zwyrodnieniowym.

Spośród mediatorów uczestniczących w rozwoju choroby zwyrodnieniowej, jak dotychczas najdokładniej poznano rolę interleukiny – 1 beta [9;58]. Wykazuje ona wielokierunkowe działania kataboliczne, prowadzące między innymi do uszkodzenia chrząstki stawowej [3;49;52;62]. Z uwagi na udokumentowanie przez szereg autorów roli tej cytokiny w patogenezie choroby zwyrodnieniowej, w wielu publikacjach jest ona traktowana jako swoisty punkt odniesienia i „cytokina modelowa”, z którą porównywane są inne mediatory uczestniczące w tej chorobie [9;52]. Z tego właśnie powodu zdecydowałem o uwzględnieniu jej w badaniu dla obiektywizacji uzyskanych wyników i łatwiejszego odniesienia wyników pracy do danych przedstawianych przez innych autorów.

W większości dotychczas opublikowanych prac dotyczących roli poszczególnych cytokin w chorobie zwyrodnieniowej stawów dokonano porównania wyników z chorymi z reumatoidalnym zapaleniem stawów. Wynika to z łatwości

uzyskania próbek materiału badawczego ze stawów osób z schorzeniami, na przykład podczas zabiegów endoprotezoplastyki. Zdecydowanie mniej badań dotyczy materiału od osób zdrowych stanowiących grupę kontrolną. Ogranicza to wiedzę dotyczącą podłoża procesu zwyrodnieniowego stawów, a wynika z zastrzeżeń natury bioetycznej dotyczących pozyskiwania tkanek stawowych od zdrowych ochotników. Część badaczy uniknęła tych wątpliwości pobierając tkanki np. z kończyn poddanych amputacji, czy podczas operacyjnego leczenia złamań [101]. Zastrzeżenie budzi zakres, w jakim schorzenie podstawowe wpłynęło na metabolizm badanych tkanek. Inni autorzy [92;100;143] pobierali próbki tkanek od dawców narządów, co stanowi jednak dużą trudność natury organizacyjnej w uzyskaniu odpowiedniej wielkości grupy badanej. Niektórzy autorzy zdecydowali się na pobieranie materiału od osób zmarłych, w trakcie sekcji zwłok, jednakże wielogodzinny okres między zgonem a pobraniem może spowodować istotne zmiany w metabolizmie badanych komórek, co jest bardzo poważną wadą takiego postępowania [90;144;145].

Wobec powyższych trudności, postanowiłem włączyć do badania jako grupę porównawczą pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego, poddanych zabiegowi artroskopowej rekonstrukcji tego więzadła. W tej grupie chorych możliwe jest uzyskanie próbek płynu stawowego, chrząstki i maziówki ze stawów nie objętych procesem zwyrodnieniowym w sposób nie budzący wątpliwości bioetycznych, gdyż stanowią one odpad operacyjny.

Pewną wadą zastosowanego w tej pracy sposobu losowego doboru pacjentów jest dysproporcja między liczbą kobiet i mężczyzn w obrębie obu grup. Wynika z charakterystyki epidemiologicznej choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego i uszkodzeń więzadła krzyżowego przedniego. Należy zaznaczyć, że dysproporcje dotyczące płci badanych pacjentów występują w zdecydowanej większości prac doświadczalnych dotyczących patogenezy choroby zwyrodnieniowej stawów kolanowych, czy procesów patologicznych w stawach kolanowych z uszkodzeniem ACL [146;147]. Z uwagi na powyższą dysproporcję w moim materiale nie przeprowadzałem analizy zależności poszczególnych stężeń od płci, ponieważ przy niewielkiej liczbie mężczyzn w grupie I oraz kobiet w grupie II analiza statystyczna byłaby obciążona dużym błędem.

Dla przeprowadzenia rzetelnej analizy uzyskanych danych istotne jest określenie, czy wyniki uzyskane w grupie pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego są równorzędne z wynikami, które można uzyskać prowadząc badania na materiale od zdrowych ochotników. W dostępnym piśmiennictwie nie znaleziono informacji o różnicach metabolicznych między chondrocytami i synowiocytami od osób zdrowych i pacjentów z uszkodzeniem ACL. Dotychczas badacze skupiali się na tylko porównywaniu stężeń określonych cytokin w próbkach płynu stawowego od obu omawianych grup [148-150].

Większość dotychczas przeprowadzonych badań wykazała, że w krótkim okresie po uszkodzeniu ACL dochodzi do wzrostu stężenia prozapalnych cytokin : IL-1beta, IL-6 czy TNF-alfa w płynie stawowym, zarówno w przypadku modeli zwierzęcych, jak i u ludzi [149;151;152]. Zaobserwowano, że największe stężenia mediatorów te osiągają 24 godziny po uszkodzeniu [146], następnie ich poziom obniża się. Zauważono również, że w stawach kolanowych z przewlekłą przednią niestabilnością stężenia cytokin prozapalnych w płynie stawowym są wyższe niż u osób zdrowych i wzrastają dodatkowo w przypadku współistnienia uszkodzeń chrząstki stawowej [147]. Z powyższych względów do badania włączałem pacjentów, którzy przebyli uszkodzenie ACL w okresie od dwóch do dwunastu miesięcy przed jego artroskopową rekonstrukcją. Ponadto wykluczałem chorych, u których w trakcie samego zabiegu stwierdzano cechy uszkodzenia chrząstki, lub inne współistniejące patologie wewnątrzstawowe, jak na przykład uszkodzenia łąkotek, obecność ciał wolnych. Należy jednak zaznaczyć, że zakresy stężeń poszczególnych cytokin w płynie stawowym, a zwłaszcza interleukiny – 1 beta podawane przez niektórych autorów dla osób zdrowych i z uszkodzeniem ACL nie różnią się znacząco [56;57;146;147;150].

Na podstawie badań dotyczących patogenezy choroby zwyrodnieniowej można przyjąć, że podwyższone stężenia cytokin prozapalnych w płynie stawowym pacjentów z uszkodzeniem ACL świadczą, iż nie są to stawy kolanowe „w pełni zdrowe”, a znajdują się w stadium poprzedzającym rozwój zmian zwyrodnieniowych.

5.2. Omówienie stosowanej metodyki badań

Istotnym problemem, który pojawił się w trakcie zbierania materiału do tego badania, były trudności z uzyskaniem płynu stawowego od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego. W większości wypadków jego ilość była bardzo mała, co znacznie utrudniało pobranie próbek, między innymi ze względu na łatwość ich kontaminacji krwią podczas prób aspiracji. Xie i współpracownicy napotkali podobne problemy podczas aspiracji płynu ze stawów biodrowych objętych procesem zwyrodnieniowym w celu oceny stężenia IL-1beta [153]. W związku z tym badacze ci podawali do jamy stawowej określoną objętość roztworu fizjologicznego, co ułatwiało aspirację i umożliwiło wyliczenie ilości płynu stawowego będącego różnicą objętości aspiratu i podanej do stawu soli fizjologicznej. Z kolei znajomość objętości płynu stawowego i stężenia badanych białek w aspiracie umożliwiła im wyliczenie stężeń IL-1beta w płynie stawowym. Z identycznej procedury w odniesieniu do stawu skroniowo – żuchwowego korzystał Kaneyama, a w zmodyfikowanej wersji w swoich badaniach nad stężeniami cytokin w płynie ze stawów kolanowych zastosowali Marks i Cuellar [147;148;154]. W przypadku stawu kolanowego, z uwagi na liczne zachyłki i przestrzenie w obrębie jamy stawowej, precyzyjne pobranie rozcieńczonego płynu jest technicznie bardzo trudne i nie daje gwarancji uzyskania dokładnych wyników. Z tego względu w moich badaniach płyn był pobierany bez jego rozcieńczania. Z powodu dużych trudności z pobraniem go u niektórych pacjentów, do badania włączyłem próbki płynu od chorych, u których z uwagi na brak wskazań do procedury notch – plasty nie uzyskałem materiału odpowiedniego do hodowli komórkowych.

Dotychczas opublikowane prace różnią się pod względem metodyki prowadzenia hodowli chondrocytów i synowocytów. Należy zaznaczyć, że w celu oceny aktywności biologicznej chondrocytów, stosowana w mojej pracy metodyka hodowli jest inna, niż w przypadku hodowli służących autologicznym przeszczepom chondrocytów [155;156]. Pomimo, iż w moich badaniach etap przygotowania komórek do hodowli, skład mediów i warunki fizyczne hodowli były zbliżone do podawanych przez większość autorów, występują jednak pewne różnice

[92;93;157;157;158]. Widoczne są one już na etapie pobierania komórek do zakładania hodowli, szczególnie w przypadku chrząstki stawowej.

Autorzy większości prac związanych z hodowlą synowocytów i chondrocytów podają tylko, że badane tkanki pochodziły ze stawów objętych procesem zwyrodnieniowym. Jedynie niektórzy z nich podają anatomiczną lokalizację miejsca pobrania próbek [144;145;159].

Stwierdzono, że chondrocyty wykazują zróżnicowaną reaktywność na czynniki prozapalne, w zależności nie tylko od lokalizacji anatomicznej, lecz także od warstwy chrząstki, której się znajdują [58]. U pacjentów z chorobą zwyrodnieniową nierównomierna destrukcja chrząstki w poszczególnych obszarach stawu wiąże się z odmiennym profilem wydzielania cytokin przez chondrocyty z różnych lokalizacji [101;144;145;147;151;152;159]. Wydaje się więc, że miejsce pobrania próbek chrząstki może mieć istotny wpływ na ostateczne wyniki badania. Z tego względu zdecydowałem o pobieraniu od pacjentów z grupy I próbek powierzchniowej warstwy chrząstki z jej ściśle określonej lokalizacji. Materiał uzyskiwałem jedynie z obrzeży obszarów największej destrukcji chrząstki w obrębie kłykci udowych. Nie pobierałem materiału ze środka zmiany, bowiem w większości przypadków obszar ten był pozbawiony chrząstki. W przypadku pacjentów grupy II miejsce pobrania chrząstki było identyczne u wszystkich badanych, co wynikało z techniki wykonywania procedury notch – plasty. Z uwagi na omówione wcześniej różnice metaboliczne chondrocytów z różnych okolic stawu kolanowego, wydaje się, że sposób pobierania materiału stosowany w mojej pracy zapewnia możliwie największą powtarzalność uzyskanych wyników.

Kolejną różnicą dotyczącą prowadzenia hodowli chondrocytów i synowocytów w poszczególnych badaniach jest długość okresu inkubacji. Autorzy większości prac stosowali 3 – 4 dniowy okres prowadzenia hodowli [92;93;157], niektórzy jednak prowadzili je przez dłuższy czas [144;145;159]. Podobne różnice występują dla okresu inkubacji hodowli z medium użytym do oznaczenia badanych białek [100;101;157]. Z uwagi na różnice między poszczególnymi publikacjami zdecydowałem o oznaczaniu stężeń badanych cytokin w trzech interwałach 48 godzinnych. W podobny sposób postępowali także inni autorzy [101;144;145;160]. W celu oceny zmian aktywności biologicznej badanych komórek w czasie,

zaniechałem ich pasażowania pomiędzy poszczególnymi etapami hodowli. Takie postępowanie wdrożyli również inni badacze [93;144;145;157;159].

Istotnymi czynnikami wpływającym na wyniki badania są parametry fizyczne hodowli. Do najważniejszych należy stosunek objętości medium do ilości komórek w hodowli, który wpływa na rozcieńczenie wydzielanych substancji. Pewnym problemem jest także odniesienie wyników uzyskanych w ramach hodowli komórkowej do warunków panujących *in vivo*. Stosowane przez niektórych przeliczanie uzyskanych wyników na liczbę komórek w hodowli ma tę wadę, że taka sama liczba chondrocytów i synowiocytów *in vitro* odpowiada różnym powierzchniom chrząstki i maziówki *in vivo* z uwagi na różnice wielkości komórek i ich zagęszczenie w macierzy zewnątrzkomórkowej. W związku z tym część autorów przelicza uzyskane stężenia na masę tkanki, z której zakładano hodowlę, przy czym w niektórych pracach różnice między masami poszczególnych próbek były nawet trzykrotne [92;157]. Warto zaznaczyć, że zespół Presle w seriach publikacji dotyczących hodowli synowiocytów i chondrocytów stosował oba powyższe sposoby przeliczania uzyskanych wyników. Ja zdecydowałem się na prowadzenie hodowli zakładanych z identycznej liczby komórek uzyskanych ze zbliżonych objętościowo fragmentów tkanek, podobnie jak zespół Huang, bez pasażowania komórek w trakcie trwania hodowli [113;161;162].

Podczas zakładania hodowli synowiocytów miejsce pobrania próbek maziówki wydaje się mieć mniejsze znaczenie niż w przypadku chrząstki z uwagi na fakt, że wykazuje ona jednorodne zmiany histologiczne w całym stawie [112;113;117;163]. Nie udało mi się ponadto znaleźć publikacji dotyczących różnic metabolicznych między synowiocytami pobranymi z różnych okolic stawu kolanowego. Analiza dostępnego piśmiennictwa wykazała występowanie istotnych różnic w sposobie prowadzenia hodowli synowiocytów w poszczególnych publikacjach. Okres hodowli wynosił od 2-3 dni [92;93;164], nawet do 2 tygodni [161;162]. W celu zapewnienia możliwości porównania produkcji badanych przeze mnie białek w hodowlach chondrocytów i synowiocytów zdecydowałem o prowadzeniu obu hodowli komórkowych w identycznych przedziałach czasowych oraz warunkach fizycznych.

W mojej pracy nie oznaczałem stężeń badanych cytokin w osoczu u pacjentów z obu grup. Wprawdzie badania prowadzone przez Presle i Senolt u chorych ze

zwyrodnieniem stawów wykazały, że w tej grupie stężenia leptyny a także adiponektyny w płynie stawowym i osoczu wykazują dodatnią korelację [93;165;166]. Zaobserwowano także, że stężenia leptyny są istotnie wyższe w płynie stawowym, natomiast adiponektyny w osoczu [92;100;157;165]. Uzyskane przez Senolt wyniki wskazują na brak istotnych statystycznie różnic między osoczym stężeniem adiponektyny u pacjentów zdrowych i osób ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów. Stwierdzono jednak istotne różnice w stężeniach adiponektyny w płynie stawowym pomiędzy tymi grupami pacjentów [165;166]. Persle i współpracownicy w badaniach dotyczących stężenia adiponektyny i leptyny w płynie stawowym i osoczu wyrazili szereg zastrzeżeń dotyczących ich wzajemnych korelacji. Sugerują oni, że wydzielanie tych białek do osocza i płynu stawowego zachodzi niezależnie [92;93]. Z kolei populacyjne badania Stannusa (w obrębie populacji Tasmanii) dotyczące zależności stężeń osoczowych leptyny i radiologicznych cech choroby zwyrodnieniowej stawów biodrowych wykazały występowanie takiej zależności. Była ona szczególnie wyraźnie widoczna w modelu statystycznym obejmującym takie dane jak płeć, wiek, BMI czy wywiad dotyczący palenia. Jednakże w tym samym modelu rozszerzonym o stężenie IL-6 w osoczu, zależności znalazły się na granicy istotności statystycznej [167]. Wyniki powyższej pracy oraz innych publikacji z ostatnich lat wskazują na istotny wpływ wskaźników antropometrycznych (BMI, wzrost, płeć), a także parametrów biochemicznych (poziom triglicerydów, cholesterolu, glukozy), jak również współwystępowania określonych schorzeń na osoczowe stężenia adipocytokin. W związku z wpływem czynników ogólnoustrojowych na osoczowe stężenia badanych białek, postanowiłem ograniczyć zakres badań do płynu stawowego.

Kolejnym aspektem metodyki tej pracy mogącym wpływać na uzyskane wyniki jest ocena radiologiczna pacjentów. W przypadku stawów kolanowych większość badaczy posługuje się radiologicznymi skalami Ahlbäcka i Kellgrena – Lawrenca, niektórzy również skalą Brandta [168-170]. Ponieważ większość publikacji ortopedycznych opiera się na dwóch pierwszych klasyfikacjach, a dotychczas prowadzone badania wykazały dużą zgodność między punktacją uzyskaną w obydwu skalach u tych samych pacjentów, zdecydowałem o wykorzystaniu ich w tej pracy [168;169]. Należy zaznaczyć, że skale te mimo przydatności w ocenie

zaawansowania procesu zwyrodnieniowego w ograniczonym zakresie odzwierciedlają rzeczywisty obszar uszkodzenia chrząstki stawowej [168]. Celem obiektywizacji badań radiologicznych, ocenę przeprowadziło niezależnie od siebie i w sposób anonimowy dwóch specjalistów ortopedów. Dla zmniejszenia wpływu na ostateczny wynik badania różnic między ocenami dwóch specjalistów, a także różnic między wynikami uzyskanymi przez jednego badacza w różnych seriach zdecydowałem, że każdy lekarz przeprowadzi ocenę radiologiczną dwukrotnie, a uzyskane przez nich wyniki zostały uśrednione i zaokrąglone do wartości całkowitych.

5.3. Omówienie wyników badań

5.3.1. Omówienie wyników oznaczeń interleukiny – 1 beta

Wyniki uzyskane w tym badaniu wskazują na występowanie w próbkach płynu stawowego pobranych od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów istotnie wyższych, w porównaniu z pacjentami z uszkodzeniem ACL, stężeń interleukiny - 1 beta, leptyny, adiponektyny. Przemawia to za obecnością wyraźnej reakcji zapalnej utrzymującej się w środowisku płynu stawowego w przebiegu zaawansowanego procesu zwyrodnieniowego.

W moich badaniach stężenie interleukiny 1- beta w płynie od pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi wynosiło średnio 104,75 pg/ml (81 – 130 pg/ml) i było istotnie wyższe, niż w materiale od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego, u których wynosiło średnio 20,5 pg/ml (12-32 pg/ml). Wartości te są wyższe, niż podawane w wielu publikacjach, zarówno w materiale od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową, jak również w materiale od pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego. Należy jednak zauważyć, że wyniki badań nad stężeniem IL – 1 beta w płynie ze stawów ze zmianami zwyrodnieniowymi, a także z uszkodzeniem ACL różnią się w poszczególnych publikacjach.

Richette i wsp. w swoim materiale obejmującym próbki płynu stawowego od pacjentów z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową kolana (radiologicznie Kellgren – Lawrence III i IV) stwierdzili występowanie oznaczalnych (powyżej 0,1 pg/ml) stężeń IL - 1 beta jedynie u 70 % pacjentów [53]. Ponadto badacze ci określili, że w próbkach w których wykryto obecność IL - 1beta, jej średnie stężenie wynosiło około 1 pg/ml. Z kolei Karan i wsp. podali, że średnie stężenie 10,52 pg/ml stwierdzono w grupie pacjentów z mniejszym radiologicznym zaawansowaniem choroby (Kellgren – Lawrence II – III) [171]. W moim materiale stężenia te były znacznie wyższe, przy czym u większości pacjentów stwierdziłem znaczne zaawansowanie procesu zwyrodnieniowego (Kellgren – Lawrence III – IV). Inni autorzy, którzy nie dokonywali w swoim materiale oceny radiologicznej, podają wartości stężeń IL – 1 beta w płynie stawowym nie przekraczające 10 pg/ml, co pokrywa się z zakresem podawanym przez innych autorów dla stawów z uszkodzeniem ACL [93;147-149;172;173].

Natomiast Xie i wsp., oceniając płyn ze stawów biodrowych objętych zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym wtórnym do rozwojowej dysplazji tego stawu podają, że średnie stężenie IL-1beta w płynie stawowym w ich materiale wynosiło 55 pg/ml [153].

Podobne rozbieżności wyników można zaobserwować analizując publikacje dotyczące stężenia IL- 1 beta w płynie ze stawów kolanowych z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego. Na modelach doświadczalnych [106;174], oraz w badaniach u ludzi [146;148] wykazano gwałtowny wzrost stężenia tego mediatora w płynie stawowym w pierwszych dobach po urazie. Natomiast Cameron i współpracownicy stwierdzili w swojej pracy, że u około 50% pacjentów bezpośrednio po urazie, jak również u około 50% osób z przewlekłą niestabilnością przednią kolana, stężenia IL-1 beta były bardzo niskie (około 0,26 pg/ml) [55]. Takiego rozkładu wyników nie potwierdzają jednak badania innych autorów. Celem eliminacji wpływu pourazowego podrażnienia stawu na uzyskane wyniki. do badania włączyłem pacjentów, u których okres od urazu lub ostatniej artroskopii do badania wynosił co najmniej dwa miesiące.

Wartości stężeń IL – 1 beta w płynie pobranym ze stawów kolanowych z zastarzałym uszkodzeniem ACL podawane w poszczególnych publikacjach różnią się istotnie. Część badaczy podaje zakres 0-2 pg/ml [56;146;149], z kolei Elsaid, a także Zysk podają zakres 2-8 pg/ml [150-152]. Z kolei Marks i wsp. zaobserwowali, że stężenie to wynosi 10-20 pg/ml i bardzo istotnie wzrasta w przypadku uszkodzenia chrząstki stawowej [147]. Natomiast w zdrowych stawach określili średnie stężenie na 5 pg/ml. Z moich badań wykluczałem chorych u których w trakcie artroskopowej rekonstrukcji ACL stwierdziłem uszkodzenie chrząstki, lub inne patologie wewnątrzstawowe, jak na przykład uszkodzenie łąkotek. Należy również zauważyć, że stężenia uzyskane przez niektórych z powyższych autorów mieszczą się w zakresie podawanym przez innych badaczy dla stawów objętych zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym [171-173]. Co ciekawe, stężenia podawane dla płynu stawowego od zdrowych ochotników mieszczą się w większości publikacji w bardzo podobnym zakresie 0 – 5 pg / ml [57;147-149]. Wprawdzie w moich badaniach stężenie interleukiny 1 – beta w płynie stawowym od osób z uszkodzeniem ACL były wyższe, niż podawane w piśmiennictwie, jednakże w porównaniu z pacjentami z chorobą

zwyrodnieniową wartości te były znacznie niższe. Wskazuje to na dużo mniejsze nasilenie procesu zapalnego w obrębie stawów z uszkodzeniem ACL.

Ocena stężeń interleukiny – 1 beta w próbkach medium z hodowli synowocytów od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi wykazała, że są one istotnie wyższe, niż w przypadku chorych z uszkodzeniem ACL. Stwierdziłem również, że w trakcie prowadzenia hodowli utrzymują się one na względnie stałym poziomie.

Wyniki zbliżone do uzyskanych w moich badaniach w trakcie hodowli synowocytów od pacjentów z uszkodzeniem ACL przedstawił Huang i współpracownicy [161;162]. Badacze ci korzystali jednak z próbek maziówki pobranych ze stawów kolanowych, w obrębie których wykonano kontrolną artroskopię około rok po złamaniu przezstawowym bliższego końca kości piszczelowej. W badaniach tych autorów hodowla synowocytów prowadzona była dłużej niż w mojej pracy. Z kolei Benito i współpracownicy badali nasilenie procesu zapalnego w obrębie błony maziowej w stawach objętych wczesnym i zaawansowanym procesem zwyrodnieniowym [164]. Uzyskali oni próbki maziówki podczas artroskopii i endoprotezoplastyki stawu kolanowego, następnie oznaczali IL-1 beta z zastosowaniem ilościowych technik immunohistochemicznych. Autorzy ci wykazali, że liczba komórek maziówki produkujących IL-1 beta zmniejsza się wraz z progresją choroby, nie znaleźli jednak wyjaśnienia dla tej obserwacji [164].

Inni autorzy prowadząc badania dotyczące produkcji interleukiny – 1 beta w komórkach błony maziowej stosowali techniki genetyczne, głównie Real Time – PCR, umożliwiające ocenę produkcji mRNA dla badanego białka w hodowli komórkowej. Scanzello i współpracownicy, stosując technikę RT-PCR porównali produkcję IL-1 beta w synowocytach od pacjentów z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową oraz pacjentów z uszkodzeniem łąkotki [175;176]. Stwierdzili, że o ile stężenie tego białka w płynie od osób z zaawansowaną chorobą zwyrodnieniową jest wyższe, to jednak poziom ekspresji tej cytokiny w synowocytach od obu grup pacjentów jest zbliżony. Podobnie, Wassillew i współpracownicy stwierdzili, że w synowocytach od pacjentów z chorobą zwyrodnieniową ekspresja mRNA IL – 1 beta jest nieistotnie większa, niż u pacjentów z wewnętrznymi uszkodzeniami w obrębie stawu kolanowego [177]. Należy zaznaczyć, że w materiale tych badaczy grupa pacjentów z wewnętrznym uszkodzeniem kolana obejmowała w większości osoby z uszkodzeniem zarówno ACL,

jak również łąkotek. Ponadto u około 2/3 osób z tej grupy stwierdzono cechy uszkodzenia chrząstki stawowej. Wydaje się, że te współistniejące uszkodzenia mogły mieć istotny wpływ na zwiększoną maziówkową produkcję IL – 1 beta.

W moich badaniach, analogicznie jak w przypadku synowocytów, podczas prowadzenia hodowli chondrocytów stwierdziłem, że stężenie IL 1 – beta w próbkach od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi było istotnie wyższe, niż w próbkach od osób z uszkodzeniem ACL. Poziom produkcji tego białka utrzymywał się na względnie stałym poziomie w trakcie trwania hodowli komórek w obu grupach pacjentów. Badania na modelu zwierzęcym przeprowadzone przez Marksa i wsp. wykazały, że wraz z rozwojem zmian zwyrodnieniowych zwiększa się produkcja IL – 1 beta przez chondrocyty [147]. Wyniki uzyskane przez tego autora są trudne do porównania z uzyskanymi w tej pracy z uwagi na fakt, że wykrywał on interleukinę 1 – beta metodą hybrydyzacji in situ, a intensywność reakcji wyrażał półilościowo.

Wyniki zbliżone do uzyskanych w mojej pracy przedstawił Wang i współpracownicy, którzy badali chondrocyty pobrane z obszarów uszkodzonej i nieuszkodzonej chrząstki stawów objętych procesem zwyrodnieniowym [144;145]. Autorzy ci stosowali jednak inną metodykę hodowli. Wykorzystując cytometrię przepływową zespół ten wykazał, że produkcja IL – 1 beta jest istotnie wyższa w chondrocytach z obszarów chrząstki objętych znaczną destrukcją, w porównaniu z produkcją przez komórki z fragmentów nieuszkodzonych. Inne badanie tego zespołu, oparte o powyższą metodykę wykazało, że produkcja IL-1beta w chondrocytach pobranych ze stawów nie objętych procesem zwyrodnieniowym jest istotnie niższa niż w materiale ze stawu objętego chorobą zwyrodnieniową. Są to wyniki podobne do uzyskanych w moich badaniach. W omawianej publikacji zdecydowano także o prowadzeniu hodowli chondrocytów przez 14 dni, natomiast w celu charakterystyki produkcji cytokin w trakcie jej trwania pobrano próbki medium w 3,7 i 14 dobie. W przeciwieństwie do wyników uzyskanych w mojej pracy, Wang zaobserwował istotny spadek stężenia IL-1beta, zarówno między 3 i 7, jak również 7 i 14 dobą [144]. Różnica ta może wynikać ze sposobu prowadzenia hodowli, istotny wpływ może mieć również fakt, że komórki pochodziły od dawców zmarłych i były narażone na długi okres niedotlenienia przed założeniem hodowli.

Dane z moich badań wskazują, że produkcja IL – 1 beta istotnie wzrasta w obrębie chondrocytów i synowioctów w stawach objętych chorobą zwyrodnieniową. Ponadto można przypuszczać, że w obu grupach pacjentów głównym źródłem IL-1beta są komórki maziówki. Wprawdzie analogiczne wnioski wysuwają autorzy innych prac, jednakże brak jest dotychczas badań, w których porównano by produkcję IL-1beta w hodowlach synowioctów i chondrocytów pobranych z tego samego stawu.

5.3.2 Omówienie wyników oznaczeń leptyny

Przed rozpoczęciem analizy uzyskanych wyników dotyczących stężeń leptyny należy zaznaczyć, że sama jego wartość nie odzwierciedla w pełni metabolicznej aktywności tej cytokiny. Badania ostatnich lat wykazały, że obecność w danym środowisku rozpuszczalnego receptora leptyny – s Ob-R, jak na przykład w osoczu krwi, istotnie ogranicza biologiczną aktywność tego białka [101]. W związku z tym, w celu wyrażenia biodostępności leptyny podaje się tzw. indeks wolnej leptyny (Free Leptin Index), będący ilorazem stężenia leptyny i jej rozpuszczalnego receptora. W mojej pracy nie oznaczałem stężenia tego receptora w badanych próbkach, jednakże badania Presle wykazały, że indeks wolnej leptyny w płynie stawowym jest trzykrotnie większy niż w osoczu [100;101;178]. Można więc przyjąć, że leptyna w środowisku płynu stawowego ma dużą biologiczną dostępność i jej rozpuszczalny receptor nie odgrywa tak istotnej roli regulacyjnej, jak w innych płynach ustrojowych.

W mojej pracy stężenie leptyny oznaczane w płynie stawowym od pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi było istotnie wyższe, w porównaniu z pacjentami z uszkodzeniem ACL. Podobnych obserwacji dokonał KU i współpracownicy, przy czym zespół ten podał nieco niższe wartości stężeń [99]. Zespoły Gandhi oraz Presle wykazały w swych pracach, że stężenia leptyny w płynie stawowym z kolan objętych procesem zwyrodnieniowym są istotnie niższe u mężczyzn [93;105;179]. W mojej pracy średnie stężenie leptyny w płynie stawowym chorych z grupy I (przewaga kobiet) przyjęło wartość niższą, niż podana przez tych autorów dla grupy kobiet i nieco wyższą niż dla grupy mężczyzn.

Analiza stężeń badanych białek w próbkach mediów wykazała, że w warunkach hodowli synowioocyty i chondrocyty od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi produkują więcej leptyny niż analogiczne komórki od osób z uszkodzeniem ACL. Stwierdziłem także, że produkcja leptyny jest w obu grupach pacjentów wyższa w hodowli synowioocytów, wykazuje jednak dość duże fluktuacje w czasie jej trwania. Z kolei produkcja w obrębie chondrocytów jest niższa i przez cały okres hodowli utrzymuje się na względnie stałym poziomie. Badania prowadzone przez Presle i współpracowników wykazały, że komórki błony maziowej produkują duże ilości leptyny, natomiast chondrocyty wykazują niską aktywność wydzielniczą [92;93]. Zespół ten prowadził hodowle komórkowe w sposób zbliżony do stosowanego w tej pracy, jednak uzyskane wyniki były przeliczane na masę tkanki użytej do założenia hodowli, co utrudnia obiektywne porównanie wyników obu prac. Mimo to można stwierdzić, że w badaniach Presle produkcja leptyny w obrębie chondrocytów była wyraźnie niższa niż w mojej pracy. Z kolei Simopoulou i współpracownicy badali z zastosowaniem RT-PCR ekspresję leptyny w hodowli chondrocytów ze stawów zdrowych oraz objętych procesem zwyrodnieniowym, zarówno z obszarów bez makroskopowych uszkodzeń, jak i objętych znaczną destrukcją [101]. Badacze ci wykazali, że w chondrocytach z grupy kontrolnej ekspresja leptyny jest najniższa, natomiast w przypadku materiału ze stawów z chorobą zwyrodnieniową komórki pobrane z obszarów uszkodzeń chrząstki produkują dwukrotnie więcej mRNA leptyny niż komórki pobrane z nieuszkodzonych miejsc. Mimo zastosowania przez tych autorów innej techniki wydaje się, że wyniki te są zbieżne z danymi zebranymi w moim badaniu. Niewielka liczba publikacji dotyczących produkcji leptyny przez tkanki stawowe pozwala jedynie na ograniczone porównanie wyników uzyskanych w tej pracy z danymi z literatury.

5.3.3. Omówienie wyników oznaczeń adiponektyny

Analiza stężeń adiponektyny w badanym materiale wykazała, że w płynie stawowym od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych jej stężenie jest istotnie wyższe niż w materiale od osób z uszkodzeniem ACL.

Stężenie adiponektyny w próbkach płynu stawowego od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi w moim materiale były niemal identyczne jak podane przez Schäfflera i współpracowników, którzy podobnie jak ja stwierdzili również duży rozrzut uzyskanych wyników [91]. Bardzo zbliżone wartości, przy mniejszym odchyleniu standardowym podał w swej pracy Hao i współpracownicy [180]. Z kolei stężenia w płynie stawowym od osób z chorobą zwyrodnieniową stawów podane przez Tana i wsp. odpowiadają stężeniom stwierdzanym w mojej pracy w grupie pacjentów z uszkodzeniem ACL [181]. Zespół Tana nie podał jednak w swojej pracy stopnia zaawansowania choroby zwyrodnieniowej w badanej grupie pacjentów [181]. Z kolei Senolt i współpracownicy stwierdzili u osób ze zmianami zwyrodnieniowymi wartości pięciokrotnie wyższe niż w mojej pracy [165;166]. W chwili obecnej brak jest w piśmiennictwie danych dotyczących stężenia adiponektyny w próbkach płynu stawowego od osób zdrowych .

W moich badaniach produkcja adiponektyny w obrębie chondrocytów od osób z chorobą zwyrodnieniową była istotnie wyższa, niż od osób z uszkodzeniem ACL. Okazało się ponadto, że w trakcie hodowli produkcja adiponektyny przez te komórki gwałtownie spadała w kolejnych dobach. Jest to zaskakujące, bowiem w hodowlach synowiocytów osób z chorobą zwyrodnieniową, a także chondrocytów i synowiocytów od osób z uszkodzeniem ACL produkcja tego białka utrzymywała się na podobnym poziomie przez cały okres hodowli. Należy również zauważyć, że w materiale ze stawów objętych procesem zwyrodnieniowym, o ile produkcja IL – 1 beta oraz leptyny była wyższa w hodowli synowiocytów, o tyle produkcja adiponektyny była istotnie statystycznie wyższa w hodowli chondrocytów.

Bardzo ciekawych informacji dostarczyła analiza statystyczna dotycząca produkcji adiponektyny w początkowym etapie hodowli chondrocytów od osób z chorobą zwyrodnieniową stawów. Stwierdziłem wysoką korelację między jej produkcją, a stężeniami w płynie stawowym, należy jednak zaznaczyć, że nie przeliczałem uzyskanych wyników względem stężenia białka w próbkach. Wydaje się jednak, że chrząstka stawowa odgrywa istotną rolę w produkcji tej cytokiny.

Okazało się, że produkcja adiponektyny w pierwszym etapie hodowli chondrocytów od pacjentów ze zmianami zwyrodnieniowymi koreluje z radiologicznym zaawansowaniem choroby ocenianym według skali Ahlbäcka,

odzwierciedlającej w głównej mierze zniszczenie chrząstki i kości. Zależność ta słabła jednak w kolejnych dobach trwania hodowli. Mimo braku danych na ten temat w dostępnych publikacjach, istnieją dowody pośrednie pozwalające uwiarygodnić występowanie takich zależności w przebiegu choroby zwyrodnieniowej. Hao i współpracownicy stwierdzili, że poziom adiponektyny w płynie stawowym koreluje ze stężeniem produktów degradacji chrząstki [180]. Z kolei moje obserwacje wykazały, że komórki chrząstki z uszkodzonych obszarów wydzielają duże ilości adiponektyny, korelujące z jej stężeniem w płynie stawowym. Jest więc prawdopodobne, że wydzielanie przez chondrocyty adiponektyny narasta wraz z postępującym uszkodzeniem chrząstki, będącym jednocześnie przyczyną radiologicznej progresji zmian zwyrodnieniowych. Również gwałtowny spadek produkcji tego białka w kolejnych etapach hodowli wskazuje, że adiponektyna jest wydzielana w odpowiedzi na czynniki zewnętrzne obecne w płynie stawowym, takie jak produkty degradacji chrząstki, choć nie można wykluczyć istotnej roli innych mediatorów.

Informacje dotyczące produkcji adiponektyny w poszczególnych tkankach stawowych są obecnie znane jedynie fragmentaryczne. Zespół Presle ocenił stężenia adiponektyny w hodowlach komórkowych synowocytów i chondrocytów od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi stawów kolanowych. Hodowle prowadzono w sposób podobny do stosowanego w mojej pracy. Wyniki uzyskane przez tych badaczy wskazują, że adiponektyna produkowana jest głównie przez synowocyty, natomiast chondrocyty produkują jedynie niewielkie jej ilości [92;93;100;157]. Obserwacje tego zespołu są rozbieżne z wynikami mojego badania.

W dostępnym piśmiennictwie brak jest innych prac dotyczących produkcji adiponektyny w obrębie tkanek stawów objętych procesem zwyrodnieniowym. Wprawdzie Tan i współpracownicy porównywali produkcję tej cytokiny w maziówkach stawów objętych RZS i procesem zwyrodnieniowym, jednakże do oceny ekspresji stosowali techniki immunohistochemiczne oraz RT – PCR [181]. Z uwagi na odmienną metodykę i dobór materiału trudno porównać wynik tej pracy z moimi badaniami.

Rozbieżności wyników uzyskanych w mojej pracy oraz badaniach Presle, a także niewielka liczba danych literaturowych dotyczących produkcji i roli

adiponektyny w obrębie stawów objętych procesem zwyrodnieniowym skłaniają do przeprowadzenia dalszych badań w tym kierunku.

5.3.4. Omówienie zależności między wynikami laboratoryjnymi

Nie stwierdziłem występowania korelacji między stężeniami poszczególnych cytokin w płynie stawowym a wielkością ich produkcji w warunkach hodowli komórkowych. Wyjątkiem jest adiponektyna, w przypadku której zaobserwowałem wysoką korelację między stężeniem tego białka w płynie stawowym a jego produkcją w hodowli chondrocytów w drugiej dobie. Jednakże w trakcie obliczeń nie przeliczałem uzyskanych wyników względem całkowitego stężenia białka w próbkach. Tym niemniej może to wskazywać, że chrząstka stawowa jest istotnym źródłem tego białka w obrębie stawu objętego procesem zwyrodnieniowym. Badania Presle i wsp. wskazują, że w przebiegu tego schorzenia adiponektyna wydzielana jest głównie w obrębie ciała Hoffy oraz osteofitów [92;93].

W moim materiale nie stwierdziłem występowania wzajemnych korelacji między produkcją badanych białek, które w sposób ciągły utrzymywałyby się w trakcie prowadzenia hodowli zarówno synowiocytów, jak i chondrocytów. Można przyjąć, że występowanie pojedynczych korelacji między stężeniami badanych cytokin w płynie stawowym i mediach hodowlanych ma charakter przypadkowy.

5.3.5. Omówienie zależności między parametrami laboratoryjnymi i klinicznymi

Zależność badanych białek od danych radiologicznych

Analiza statystyczna uzyskanych danych wykazała silną korelację między stężeniem interleukiny – 1 beta w płynie stawowym, a radiologicznym zaawansowaniem choroby ocenianym w skali Kellgren – Lawrenca. Wraz z progresją zmian radiologicznych wzrastało stężenie tego mediatora w płynie stawowym. W dostępnym piśmiennictwie nie znalazłem prac, których autorzy oceniali by tego rodzaju zależności. Zaobserwowana w moich badaniach korelacja z parametrami

radiologicznymi nie dziwi w świetle szeregu publikacji, wskazujących na prozapalną rolę interleukiny 1 – beta w chorobie zwyrodnieniowej, oraz występowanie podwyższonych jej poziomów w płynie stawowym u osób z zaawansowanymi zmianami zwyrodnieniowymi stawów [3;49].

W moich badaniach nie zaobserwowałem zależności między stężeniem leptyny i adiponektyny w płynie stawowym a zaawansowaniem zmian radiologicznych w przebiegu choroby zwyrodnieniowej. Ku i wsp. stwierdzili w swej pracy, że stężenie leptyny w płynie stawowym pacjentów z zaawansowanymi zmianami (Kellgren - Lawrence III, IV) było istotnie wyższe niż u chorych z wcześniejszymi stadiami choroby, jednak autorzy ci nie znaleźli korelacji liniowej między tymi parametrami [99].

Nie stwierdziłem zależności między produkcją badanych mediatorów w hodowli synowocytów, a stopniem radiologicznego zaawansowania choroby zwyrodnieniowej. Wyjątkiem była dodatnia korelacja stwierdzona między produkcją IL – 1 beta w szóstej dobie a punktacją w skali Kellgrena - Lawrenca.

Stwierdziłem jednak występowanie wysokiej korelacji między stężeniem adiponektyny w medium z drugiej doby hodowli chondrocytów, a zaawansowaniem procesu zwyrodnieniowego ocenianym w skali Ahlbäcka, przy czym zależność ta była słabsza w kolejnych etapach hodowli. Szczegółowe omówienie tych zależności przedstawiłem w rozdziale „Omówienie wyników oznaczeń adiponektyny”.

Zależność badanych białek od BMI

Analiza publikacji dotyczących udziału adipocytokin w procesie zwyrodnieniowym doprowadziła do wysunięcia przez niektórych badaczy hipotezy, że mediatory te są ogniwem łączącym nadwagę z procesem zwyrodnieniowym stawów. Jednak moje badania nie potwierdziły występowania zależności między stężeniami IL-1 beta, leptyny i adiponektyny w płynie stawowym a wskaźnikiem masy ciała (BMI), zarówno u pacjentów z grupy I jak i II. Gandhi wykazał wprawdzie występowanie korelacji między BMI a stężeniem leptyny w płynie stawowym [105;179]. Natomiast Senolot i wsp. stwierdzili brak zależności między stężeniem adiponektyny w płynie

stawowym, a wskaźnikiem masy ciała [165;166]. W pracach innych badaczy dotyczących stężeń adipocytokin w płynie stawowym, brak jest danych dotyczących ewentualnych korelacji tych parametrów [92;93;180].

Nie stwierdziłem zależności między produkcją badanych mediatorów w hodowli synowocytów i chondrocytów od obu grup pacjentów a wskaźnikiem masy ciała. Wyjątkiem była zaobserwowana przeze mnie korelacja między BMI a stężeniem IL-1beta z medium z czwartej doby hodowli synowocytów od pacjentów z grupy I, także ujemna korelacja między BMI a leptyny i IL – 1 beta przez chondrocyty w czwartej dobie hodowli. Być może niewielka liczba włączonych do tego badania pacjentów z chorobą zwyrodnieniową może mieć wpływ na wykazanie tych zależności.

Aspekty kliniczne uzyskanych wyników

Wyniki moich badań, a także dane z piśmiennictwa wskazują na udział leptyny i adiponektyny w patogenezie choroby zwyrodnieniowej stawów. Wydaje się, że dokładne poznanie ich roli tych białek może ułatwić zrozumienie zależności między otyłością a rozwojem choroby zwyrodnieniowej stawów. Ponadto cytokiny te mogą stanowić punkt uchwytu dla leków hamujących, lub modyfikujących przebieg choroby zwyrodnieniowej stawów.

6. WNIOSKI

1. W płynie stawowym z kolan objętych procesem zwyrodnieniowym stwierdza się, w porównaniu z płynem ze stawów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego, wyższe stężenia interleukiny 1 – beta, leptyny, adiponektyny.
2. W hodowlach synowocytów i chondrocytów od osób ze zmianami zwyrodnieniowymi stawu kolanowego stwierdza się większe wydzielanie interleukiny 1 – 1 beta i leptyny niż w hodowlach komórek od osób z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego.
3. Produkcja adiponektyny jest znacząco wyższa tylko w hodowli chondrocytów od osób z chorobą zwyrodnieniową, natomiast w obu grupach pacjentów synowocyty wydzielają zbliżone ilości tego białka.
4. W obrębie obu grup pacjentów interleukina 1 – beta oraz leptyna były produkowane głównie w obrębie synowocytów, natomiast adiponektyna była wydzielana w większej ilości przez chondrocyty.
5. Stwierdzono występowanie zależności między radiologicznym zaawansowaniem choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego a stężeniem interleukiny – 1 beta w płynie stawowym, a także wydzielaniem adiponektyny przez chondrocyty w drugiej dobie hodowli.
6. Nie stwierdzono związku między wskaźnikiem masy ciała (BMI) a stężeniami adipocytokin w płynie stawowym oraz ich wydzielaniem przez chondrocyty i synowocyty w przebiegu choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego.

PIŚMIENICTWO

1. Grotle M, Hagen KB, Natvig B, Dahl FA, Kvien TK: Prevalence and burden of osteoarthritis: results from a population survey in Norway. *J Rheumatol* 35(4):677, 2008
2. Brandt KD, Dieppe P, Radin EL: Commentary: is it useful to subset "primary" osteoarthritis? A critique based on evidence regarding the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 39(2):81, 2009
3. Goldring MB, Goldring SR: Osteoarthritis. *J Cell Physiol* 213(3):626, 2007
4. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, Fang F, Schwartz TA, Abbate LM, Callahan LF, Kalsbeek WD, Hochberg MC: Prevalence of knee symptoms and radiographic and symptomatic knee osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 34(1):172, 2007
5. Jordan JM, Helmick CG, Renner JB, Luta G, Dragomir AD, Woodard J, Fang F, Schwartz TA, Nelson AE, Abbate LM, Callahan LF, Kalsbeek WD, Hochberg MC: Prevalence of hip symptoms and radiographic and symptomatic hip osteoarthritis in African Americans and Caucasians: the Johnston County Osteoarthritis Project. *J Rheumatol* 36(4):809, 2009
6. Andrianakos AA, Kontelis LK, Karamitsos DG, Aslanidis SI, Georgountzos AI, Kaziolas GO, Pantelidou KV, Vafiadou EV, Dantis PC: Prevalence of symptomatic knee, hand, and hip osteoarthritis in Greece. The ESORDIG study. *J Rheumatol* 33(12):2507, 2006
7. Malemud CJ: Cytokines as therapeutic targets for osteoarthritis. *BioDrugs* 18(1):23, 2004
8. Herrero-Beaumont G, Roman-Blas JA, Castaneda S, Jimenez SA: Primary osteoarthritis no longer primary: three subsets with distinct etiological, clinical, and therapeutic characteristics. *Semin Arthritis Rheum* 39(2):71, 2009
9. Sutton S, Clutterbuck A, Harris P, Gent T, Freeman S, Foster N, Barrett-Jolley R, Mobasheri A: The contribution of the synovium, synovial derived inflammatory cytokines and neuropeptides to the pathogenesis of osteoarthritis. *Vet J* 179(1):10, 2009
10. Doherty M, Spector TD, Serni U: Epidemiology and genetics of hand osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 8 Suppl A:S14-S15, 2000
11. Spector TD, MacGregor AJ: Risk factors for osteoarthritis: genetics. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S39-S44, 2004
12. Valdes AM, Spector TD: The contribution of genes to osteoarthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 34(3):581, 2008
13. Valdes AM, Spector TD: The genetic epidemiology of osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 22(2):139, 2010
14. Williams FM, Spector TD: Recent advances in the genetics of osteoporosis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 6(1):27, 2006
15. Valdes AM, Loughlin J, Oene MV, Chapman K, Surdulescu GL, Doherty M, Spector TD: Sex and ethnic differences in the association of ASPN, CALM1, COL2A1, COMP, and FRZB with genetic susceptibility to osteoarthritis of the knee. *Arthritis Rheum* 56(1):137, 2007
16. Smith AJ, Keen LJ, Billingham MJ, Perry MJ, Elson CJ, Kirwan JR, Sims JE, Doherty M, Spector TD, Bidwell JL: Extended haplotypes and linkage disequilibrium in the IL1R1-IL1A-IL1B-IL1RN gene cluster: association with knee osteoarthritis. *Genes Immun* 5(6):451, 2004

17. Evangelou E, Chapman K, Meulenbelt I, Karassa FB, Loughlin J, Carr A, Doherty M, Doherty S, Gomez-Reino JJ, Gonzalez A, Halldorsson BV, Hauksson VB, Hofman A, Hart DJ, Ikegawa S, Ingvarsson T, Jiang Q, Jonsdottir I, Jonsson H, Kerkhof HJ, Kloppenburg M, Lane NE, Li J, Lories RJ, van Meurs JB, Nakki A, Nevitt MC, Rodriguez-Lopez J, Shi D, Slagboom PE, Stefansson K, Tsezou A, Wallis GA, Watson CM, Spector TD, Uitterlinden AG, Valdes AM, Ioannidis JP: Large-scale analysis of association between GDF5 and FRZB variants and osteoarthritis of the hip, knee, and hand. *Arthritis Rheum* 60(6):1710, 2009
18. Kerkhof JM, Uitterlinden AG, Valdes AM, Hart DJ, Rivadeneira F, Jhamai M, Hofman A, Pols HA, Bierma-Zeinstra SM, Spector TD, van Meurs JB: Radiographic osteoarthritis at three joint sites and FRZB, LRP5, and LRP6 polymorphisms in two population-based cohorts. *Osteoarthritis Cartilage* 16(10):1141, 2008
19. Velasco J, Zarrabeitia MT, Prieto JR, Perez-Castrillon JL, Perez-Aguilar MD, Perez-Nunez MI, Sanudo C, Hernandez-Elena J, Calvo I, Ortiz F, Gonzalez-Macias J, Riancho JA: Wnt pathway genes in osteoporosis and osteoarthritis: differential expression and genetic association study. *Osteoporos Int* 21(1):109, 2010
20. Lodewyckx L, Lories RJ: WNT Signaling in osteoarthritis and osteoporosis: what is the biological significance for the clinician? *Curr Rheumatol Rep* 11(1):23, 2009
21. Riyazi N, Rosendaal FR, Slagboom E, Kroon HM, Breedveld FC, Kloppenburg M: Risk factors in familial osteoarthritis: the GARP sibling study. *Osteoarthritis Cartilage* 16(6):654, 2008
22. Sharma G, Saxena RK, Mishra P: Synergistic effect of chondroitin sulfate and cyclic pressure on biochemical and morphological properties of chondrocytes from articular cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 16(11):1387, 2008
23. Tanimoto K, Kitamura R, Tanne Y, Kamiya T, Kunimatsu R, Yoshioka M, Tanaka N, Tanaka E, Tanne K: Modulation of hyaluronan catabolism in chondrocytes by mechanical stimuli. *J Biomed Mater Res A* 93(1):373, 2010
24. Sauerland K, Steinmeyer J: Intermittent mechanical loading of articular cartilage explants modulates chondroitin sulfate fine structure. *Osteoarthritis Cartilage* 15(12):1403, 2007
25. Wolf A, Ackermann B, Steinmeyer J: Collagen synthesis of articular cartilage explants in response to frequency of cyclic mechanical loading. *Cell Tissue Res* 327(1):155, 2007
26. Ackermann B, Steinmeyer J: Collagen biosynthesis of mechanically loaded articular cartilage explants. *Osteoarthritis Cartilage* 13(10):906, 2005
27. Thibault M, Poole AR, Buschmann MD: Cyclic compression of cartilage/bone explants in vitro leads to physical weakening, mechanical breakdown of collagen and release of matrix fragments. *J Orthop Res* 20(6):1265, 2002
28. Islam N, Haqqi TM, Jepsen KJ, Kraay M, Welter JF, Goldberg VM, Malemud CJ: Hydrostatic pressure induces apoptosis in human chondrocytes from osteoarthritic cartilage through up-regulation of tumor necrosis factor-alpha, inducible nitric oxide synthase, p53, c-myc, and bax-alpha, and suppression of bcl-2. *J Cell Biochem* 87(3):266, 2002
29. Natoli RM, Scott CC, Athanasiou KA: Temporal effects of impact on articular cartilage cell death, gene expression, matrix biochemistry, and biomechanics. *Ann Biomed Eng* 36(5):780, 2008
30. Natoli RM, Athanasiou KA: Traumatic loading of articular cartilage: Mechanical and biological responses and post-injury treatment. *Biorheology* 46(6):451, 2009

31. Liikavainio T, Isolehto J, Helminen HJ, Perttunen J, Lepola V, Kiviranta I, Arokoski JP, Komi PV: Loading and gait symmetry during level and stair walking in asymptomatic subjects with knee osteoarthritis: importance of quadriceps femoris in reducing impact force during heel strike? *Knee* 14(3):231, 2007
32. Sharma L: The role of proprioceptive deficits, ligamentous laxity, and malalignment in development and progression of knee osteoarthritis. *J Rheumatol Suppl* 70:87, 2004
33. Slemenda C, Heilman DK, Brandt KD, Katz BP, Mazzuca SA, Braunstein EM, Byrd D: Reduced quadriceps strength relative to body weight: a risk factor for knee osteoarthritis in women? *Arthritis Rheum* 41(11):1951, 1998
34. Hunter DJ, Sharma L, Skaife T: Alignment and osteoarthritis of the knee. *J Bone Joint Surg Am* 91 Suppl 1:85, 2009
35. Sharma L, Eckstein F, Song J, Guermazi A, Prasad P, Kapoor D, Cahue S, Marshall M, Hudelmaier M, Dunlop D: Relationship of meniscal damage, meniscal extrusion, malalignment, and joint laxity to subsequent cartilage loss in osteoarthritic knees. *Arthritis Rheum* 58(6):1716, 2008
36. Kothari A, Guermazi A, Chmiel JS, Dunlop D, Song J, Almagor O, Marshall M, Cahue S, Prasad P, Sharma L: Within-subregion relationship between bone marrow lesions and subsequent cartilage loss in knee osteoarthritis. *Arthritis Care Res (Hoboken)* 62(2):198, 2010
37. Barros HJ, Camanho GL, Bernabe AC, Rodrigues MB, Leme LE: Femoral Head-neck Junction Deformity is Related to Osteoarthritis of the Hip. *Clin Orthop Relat Res* 2010
38. Gosvig KK, Jacobsen S, Sonne-Holm S, Palm H, Troelsen A: Prevalence of malformations of the hip joint and their relationship to sex, groin pain, and risk of osteoarthritis: a population-based survey. *J Bone Joint Surg Am* 92(5):1162, 2010
39. Jessel RH, Zilkens C, Tiderius C, Dudda M, Mamisch TC, Kim YJ: Assessment of osteoarthritis in hips with femoroacetabular impingement using delayed gadolinium enhanced MRI of cartilage. *J Magn Reson Imaging* 30(5):1110, 2009
40. van der EM, Steultjens M, Wieringa H, Dinant H, Dekker J: Structural joint changes, malalignment, and laxity in osteoarthritis of the knee. *Scand J Rheumatol* 34(4):298, 2005
41. it Si ST, Fithian D, Neyret P: The evolution of osteoarthritis in 103 patients with ACL reconstruction at 17 years follow-up. *Knee* 13(5):353, 2006
42. Takeyama A, Naito M, Shiramizu K, Kiyama T: Prevalence of femoroacetabular impingement in Asian patients with osteoarthritis of the hip. *Int Orthop* 33(5):1229, 2009
43. Louboutin H, Debarge R, Richou J, Selmi TA, Donell ST, Neyret P, Dubrana F: Osteoarthritis in patients with anterior cruciate ligament rupture: a review of risk factors. *Knee* 16(4):239, 2009
44. Plumb MS, Aspden RM: The response of elderly human articular cartilage to mechanical stimuli in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 13(12):1084, 2005
45. Acosta CA, Izal I, Ripalda P, Douglas-Price AL, Forriol F: Gene expression and proliferation analysis in young, aged, and osteoarthritic sheep chondrocytes effect of growth factor treatment. *J Orthop Res* 24(11):2087, 2006
46. Carlo MD, Jr., Loeser RF: Increased oxidative stress with aging reduces chondrocyte survival: correlation with intracellular glutathione levels. *Arthritis Rheum* 48(12):3419, 2003

47. Loeser RF, Shanker G, Carlson CS, Gardin JF, Shelton BJ, Sonntag WE: Reduction in the chondrocyte response to insulin-like growth factor 1 in aging and osteoarthritis: studies in a non-human primate model of naturally occurring disease. *Arthritis Rheum* 43(9):2110, 2000
48. Trippel SB: Growth factor inhibition: potential role in the etiopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl):S47-S52, 2004
49. Goldring MB: Osteoarthritis and cartilage: the role of cytokines. *Curr Rheumatol Rep* 2(6):459, 2000
50. Goldring MB: The role of cytokines as inflammatory mediators in osteoarthritis: lessons from animal models. *Connect Tissue Res* 40(1):1, 1999
51. Goldring SR, Goldring MB: The role of cytokines in cartilage matrix degeneration in osteoarthritis. *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl):S27-S36, 2004
52. Daheshia M, Yao JQ: The interleukin 1beta pathway in the pathogenesis of osteoarthritis. *J Rheumatol* 35(12):2306, 2008
53. Richette P, Francois M, Vicaut E, Fitting C, Bardin T, Corvol M, Savouret JF, Rannou F: A high interleukin 1 receptor antagonist/IL-1beta ratio occurs naturally in knee osteoarthritis. *J Rheumatol* 35(8):1650, 2008
54. Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB: Osteoarthritis: a tale of three tissues. *Bull NYU Hosp Jt Dis* 66(3):244, 2008
55. Cameron ML, Fu FH, Paessler HH, Schneider M, Evans CH: Synovial fluid cytokine concentrations as possible prognostic indicators in the ACL-deficient knee. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 2(1):38, 1994
56. Catterall JB, Stabler TV, Flannery CR, Kraus VB: Changes in serum and synovial fluid biomarkers after acute injury (NCT00332254). *Arthritis Res Ther* 12(6):R229, 2010
57. Darabos N, Hundric-Haspl Z, Haspl M, Markotic A, Darabos A, Moser C: Correlation between synovial fluid and serum IL-1beta levels after ACL surgery-preliminary report. *Int Orthop* 33(2):413, 2009
58. Towle CA, Hung HH, Bonassar LJ, Treadwell BV, Mangham DC: Detection of interleukin-1 in the cartilage of patients with osteoarthritis: a possible autocrine/paracrine role in pathogenesis. *Osteoarthritis Cartilage* 5(5):293, 1997
59. Aigner T, McKenna L, Zien A, Fan Z, Gebhard PM, Zimmer R: Gene expression profiling of serum- and interleukin-1 beta-stimulated primary human adult articular chondrocytes--a molecular analysis based on chondrocytes isolated from one donor. *Cytokine* 31(3):227, 2005
60. Goupille P, Mulleman D, Chevalier X: Is interleukin-1 a good target for therapeutic intervention in intervertebral disc degeneration: lessons from the osteoarthritic experience. *Arthritis Res Ther* 9(6):110, 2007
61. Martel-Pelletier J, Boileau C, Pelletier JP, Roughley PJ: Cartilage in normal and osteoarthritis conditions. *Best Pract Res Clin Rheumatol* 22(2):351, 2008
62. Fernandes JC, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: The role of cytokines in osteoarthritis pathophysiology. *Biorheology* 39(1-2):237, 2002
63. Bartels EM, Bliddal H, Schondorff PK, Altman RD, Zhang W, Christensen R: Symptomatic efficacy and safety of diacerein in the treatment of osteoarthritis: a meta-analysis of randomized placebo-controlled trials. *Osteoarthritis Cartilage* 18(3):289, 2010

64. Boileau C, Tat SK, Pelletier JP, Cheng S, Martel-Pelletier J: Diacerein inhibits the synthesis of resorptive enzymes and reduces osteoclastic differentiation/survival in osteoarthritic subchondral bone: a possible mechanism for a protective effect against subchondral bone remodelling. *Arthritis Res Ther* 10(3):R71, 2008
65. Chevalier X, Goupille P, Beaulieu AD, Burch FX, Bensen WG, Conrozier T, Loeuille D, Kivitz AJ, Silver D, Appleton BE: Intraarticular injection of anakinra in osteoarthritis of the knee: a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Arthritis Rheum* 61(3):344, 2009
66. He W, Pelletier JP, Martel-Pelletier J, Laufer S, Di Battista JA: Synthesis of interleukin 1beta, tumor necrosis factor-alpha, and interstitial collagenase (MMP-1) is eicosanoid dependent in human osteoarthritis synovial membrane explants: interactions with antiinflammatory cytokines. *J Rheumatol* 29(3):546, 2002
67. Poree B, Kyriiotou M, Chadjichristos C, Beauchef G, Renard E, Legendre F, Melin M, Gueret S, Hartmann DJ, Mallein-Gerin F, Pujol JP, Boumediene K, Galera P: Interleukin-6 (IL-6) and/or soluble IL-6 receptor down-regulation of human type II collagen gene expression in articular chondrocytes requires a decrease of Sp1.Sp3 ratio and of the binding activity of both factors to the COL2A1 promoter. *J Biol Chem* 283(8):4850, 2008
68. Pelletier JP, Martel-Pelletier J: [Role of synovial inflammation, cytokines and IGF-1 in the physiopathology of osteoarthritis]. *Rev Rhum Ed Fr* 61(9 Pt 2):103S, 1994
69. Laufer S: Role of eicosanoids in structural degradation in osteoarthritis. *Curr Opin Rheumatol* 15(5):623, 2003
70. Martel-Pelletier J, Pelletier JP, Fahmi H: Cyclooxygenase-2 and prostaglandins in articular tissues. *Semin Arthritis Rheum* 33(3):155, 2003
71. Laine L, White WB, Rostom A, Hochberg M: COX-2 selective inhibitors in the treatment of osteoarthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(3):165, 2008
72. Amin AR, Attur M, Abramson SB: Nitric oxide synthase and cyclooxygenases: distribution, regulation, and intervention in arthritis. *Curr Opin Rheumatol* 11(3):202, 1999
73. Notoya K, Jovanovic DV, Reboul P, Martel-Pelletier J, Mineau F, Pelletier JP: The induction of cell death in human osteoarthritis chondrocytes by nitric oxide is related to the production of prostaglandin E2 via the induction of cyclooxygenase-2. *J Immunol* 165(6):3402, 2000
74. Guilak F, Fermor B, Keefe FJ, Kraus VB, Olson SA, Pisetsky DS, Setton LA, Weinberg JB: The role of biomechanics and inflammation in cartilage injury and repair. *Clin Orthop Relat Res*(423):17, 2004
75. Jeffrey JE, Aspden RM: Cyclooxygenase inhibition lowers prostaglandin E2 release from articular cartilage and reduces apoptosis but not proteoglycan degradation following an impact load in vitro. *Arthritis Res Ther* 9(6):R129, 2007
76. Abramson SB: Nitric oxide in inflammation and pain associated with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 10 Suppl 2:S2, 2008
77. Jovanovic DV, Mineau F, Notoya K, Reboul P, Martel-Pelletier J, Pelletier JP: Nitric oxide induced cell death in human osteoarthritic synoviocytes is mediated by tyrosine kinase activation and hydrogen peroxide and/or superoxide formation. *J Rheumatol* 29(10):2165, 2002
78. Loeser RF: Molecular mechanisms of cartilage destruction in osteoarthritis. *J Musculoskelet Neuronal Interact* 8(4):303, 2008

79. az-Gallego L, Prieto JG, Coronel P, Gamazo LE, Gimeno M, Alvarez AI: Apoptosis and nitric oxide in an experimental model of osteoarthritis in rabbit after hyaluronic acid treatment. *J Orthop Res* 23(6):1370, 2005
80. Kawaguchi H: Endochondral ossification signals in cartilage degradation during osteoarthritis progression in experimental mouse models. *Mol Cells* 25(1):1, 2008
81. Abramson SB: Osteoarthritis and nitric oxide. *Osteoarthritis Cartilage* 16 Suppl 2:S15-S20, 2008
82. Henrotin YE, Bruckner P, Pujol JP: The role of reactive oxygen species in homeostasis and degradation of cartilage. *Osteoarthritis Cartilage* 11(10):747, 2003
83. Davies CM, Guilak F, Weinberg JB, Fermor B: Reactive nitrogen and oxygen species in interleukin-1-mediated DNA damage associated with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 16(5):624, 2008
84. Del CM, Jr., Loeser RF: Cell death in osteoarthritis. *Curr Rheumatol Rep* 10(1):37, 2008
85. Goldring MB, Berenbaum F: The regulation of chondrocyte function by proinflammatory mediators: prostaglandins and nitric oxide. *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl):S37-S46, 2004
86. Henrotin Y, Kurz B, Aigner T: Oxygen and reactive oxygen species in cartilage degradation: friends or foes? *Osteoarthritis Cartilage* 13(8):643, 2005
87. Afonso V, Champy R, Mitrovic D, Collin P, Lomri A: Reactive oxygen species and superoxide dismutases: role in joint diseases. *Joint Bone Spine* 74(4):324, 2007
88. Kuhn K, Shikhman AR, Lotz M: Role of nitric oxide, reactive oxygen species, and p38 MAP kinase in the regulation of human chondrocyte apoptosis. *J Cell Physiol* 197(3):379, 2003
89. Goldring MB, Goldring SR: Articular cartilage and subchondral bone in the pathogenesis of osteoarthritis. *Ann N Y Acad Sci* 1192(1):230, 2010
90. Varoga D, Paulsen FP, Kohrs S, Grohmann S, Lippross S, Mentlein R, Tillmann BN, Goldring MB, Besch L, Pufe T: Expression and regulation of human beta-defensin-2 in osteoarthritic cartilage. *J Pathol* 209(2):166, 2006
91. Schaffler A, Ehling A, Neumann E, Herfarth H, Tarner I, Scholmerich J, Muller-Ladner U, Gay S: Adipocytokines in synovial fluid. *JAMA* 290(13):1709, 2003
92. Gegout PP, Francin PJ, Mainard D, Presle N: Adipokines in osteoarthritis: friends or foes of cartilage homeostasis? *Joint Bone Spine* 75(6):669, 2008
93. Presle N, Pottier P, Dumond H, Guillaume C, Lapique F, Pallu S, Mainard D, Netter P, Terlain B: Differential distribution of adipokines between serum and synovial fluid in patients with osteoarthritis. Contribution of joint tissues to their articular production. *Osteoarthritis Cartilage* 14(7):690, 2006
94. Gabay O, Hall DJ, Berenbaum F, Henrotin Y, Sanchez C: Osteoarthritis and obesity: experimental models. *Joint Bone Spine* 75(6):675, 2008
95. Malendowicz LK, Rucinski M, Belloni AS, Ziolkowska A, Nussdorfer GG: Leptin and the regulation of the hypothalamic-pituitary-adrenal axis. *Int Rev Cytol* 263:63-102.:63, 2007
96. Sandell LJ: Obesity and osteoarthritis: is leptin the link? *Arthritis Rheum* 60(10):2858, 2009

97. Markowska A, Malendowicz K, Drews K: The role of leptin in breast cancer. *Eur J Gynaecol Oncol* 25(2):192, 2004
98. Bao JP, Chen WP, Feng J, Hu PF, Shi ZL, Wu LD: Leptin plays a catabolic role on articular cartilage. *Mol Biol Rep* 2009
99. Ku JH, Lee CK, Joo BS, An BM, Choi SH, Wang TH, Cho HL: Correlation of synovial fluid leptin concentrations with the severity of osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 28(12):1431, 2009
100. Dumond H, Presle N, Terlain B, Mainard D, Loeuille D, Netter P, Pottie P: Evidence for a key role of leptin in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(11):3118, 2003
101. Simopoulou T, Malizos KN, Iliopoulos D, Stefanou N, Papatheodorou L, Ioannou M, Tsezou A: Differential expression of leptin and leptin's receptor isoform (Ob-Rb) mRNA between advanced and minimally affected osteoarthritic cartilage; effect on cartilage metabolism. *Osteoarthritis Cartilage* 15(8):872, 2007
102. Distel E, Cadoudal T, Durant S, Poignard A, Chevalier X, Benelli C: The infrapatellar fat pad in knee osteoarthritis: an important source of interleukin-6 and its soluble receptor. *Arthritis Rheum* 60(11):3374, 2009
103. Chen TH, Chen L, Hsieh MS, Chang CP, Chou DT, Tsai SH: Evidence for a protective role for adiponectin in osteoarthritis. *Biochim Biophys Acta* 1762(8):711, 2006
104. Stofkova A: Leptin and adiponectin: from energy and metabolic dysbalance to inflammation and autoimmunity. *Endocr Regul* 43(4):157, 2009
105. Gandhi R, Takahashi M, Syed K, Davey JR, Mahomed NN: Relationship between body habitus and joint leptin levels in a knee osteoarthritis population. *J Orthop Res* 28(3):329, 2010
106. Tang CH, Chiu YC, Tan TW, Yang RS, Fu WM: Adiponectin enhances IL-6 production in human synovial fibroblast via an AdipoR1 receptor, AMPK, p38, and NF-kappa B pathway. *J Immunol* 179(8):5483, 2007
107. Simpson F, Whitehead JP: Adiponectin--it's all about the modifications. *Int J Biochem Cell Biol* 42(6):785, 2010
108. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van der Kraan PM, van den Berg WB: Expression of transforming growth factor-beta (TGFbeta) and the TGFbeta signalling molecule SMAD-2P in spontaneous and instability-induced osteoarthritis: role in cartilage degradation, chondrogenesis and osteophyte formation. *Ann Rheum Dis* 65(11):1414, 2006
109. Blaney Davidson EN, van der Kraan PM, van den Berg WB: TGF-beta and osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15(6):597, 2007
110. van der Kraan PM, van den Berg WB: Osteophytes: relevance and biology. *Osteoarthritis Cartilage* 15(3):237, 2007
111. Blaney Davidson EN, Vitters EL, van Beuningen HM, van de Loo FA, van den Berg WB, van der Kraan PM: Resemblance of osteophytes in experimental osteoarthritis to transforming growth factor beta-induced osteophytes: limited role of bone morphogenetic protein in early osteoarthritic osteophyte formation. *Arthritis Rheum* 56(12):4065, 2007
112. Fernandez-Madrid F, Karvonen RL, Teitge RA, Miller PR, An T, Negendank WG: Synovial thickening detected by MR imaging in osteoarthritis of the knee confirmed by biopsy as synovitis. *Magn Reson Imaging* 13(2):177, 1995

113. Loeuille D, Chary-Valckenaere I, Champigneulle J, Rat AC, Toussaint F, Pinzano-Watrin A, Goebel JC, Mainard D, Blum A, Pourel J, Netter P, Gillet P: Macroscopic and microscopic features of synovial membrane inflammation in the osteoarthritic knee: correlating magnetic resonance imaging findings with disease severity. *Arthritis Rheum* 52(11):3492, 2005
114. Loeuille D, Rat AC, Goebel JC, Champigneulle J, Blum A, Netter P, Gillet P, Chary-Valckenaere I: Magnetic resonance imaging in osteoarthritis: which method best reflects synovial membrane inflammation? Correlations with clinical, macroscopic and microscopic features. *Osteoarthritis Cartilage* 17(9):1186, 2009
115. Ostergaard M, Stoltenberg M, Lovgreen-Nielsen P, Volck B, Sonne-Holm S, Lorenzen I: Quantification of synovitis by MRI: correlation between dynamic and static gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging and microscopic and macroscopic signs of synovial inflammation. *Magn Reson Imaging* 16(7):743, 1998
116. Walsh DA, Bonnet CS, Turner EL, Wilson D, Situ M, McWilliams DF: Angiogenesis in the synovium and at the osteochondral junction in osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15(7):743, 2007
117. Hashimoto A, Tarner IH, Bohle RM, Gaumann A, Manetti M, Distler O, Steinmeyer J, Ulfgren AK, Schulz A, Gay S, Muller-Ladner U, Neumann E: Analysis of vascular gene expression in arthritic synovium by laser-mediated microdissection. *Arthritis Rheum* 56(4):1094, 2007
118. Giatromanolaki A, Sivridis E, Athanassou N, Zois E, Thorpe PE, Brekken RA, Gatter KC, Harris AL, Koukourakis IM, Koukourakis MI: The angiogenic pathway "vascular endothelial growth factor/flk-1(KDR)-receptor" in rheumatoid arthritis and osteoarthritis. *J Pathol* 194(1):101, 2001
119. Tanaka E, Aoyama J, Miyauchi M, Takata T, Hanaoka K, Iwabe T, Tanne K: Vascular endothelial growth factor plays an important autocrine/paracrine role in the progression of osteoarthritis. *Histochem Cell Biol* 123(3):275, 2005
120. Haywood L, McWilliams DF, Pearson CI, Gill SE, Ganesan A, Wilson D, Walsh DA: Inflammation and angiogenesis in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 48(8):2173, 2003
121. Shiokawa S, Matsumoto N, Nishimura J: Clonal analysis of B cells in the osteoarthritis synovium. *Ann Rheum Dis* 60(8):802, 2001
122. Bondeson J, Wainwright SD, Lauder S, Amos N, Hughes CE: The role of synovial macrophages and macrophage-produced cytokines in driving aggrecanases, matrix metalloproteinases, and other destructive and inflammatory responses in osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 8(6):R187, 2006
123. Bondeson J, Blom AB, Wainwright S, Hughes C, Caterson B, van den Berg WB: The role of synovial macrophages and macrophage-produced mediators in driving inflammatory and destructive responses in osteoarthritis. *Arthritis Rheum* 62(3):647, 2010
124. Roman-Blas JA, Jimenez SA: NF-kappaB as a potential therapeutic target in osteoarthritis and rheumatoid arthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 14(9):839, 2006
125. Borzi RM, Mazzetti I, Marcu KB, Facchini A: Chemokines in cartilage degradation. *Clin Orthop Relat Res*(427 Suppl):S53-S61, 2004
126. Hayami T, Funaki H, Yaoeda K, Mitui K, Yamagiwa H, Tokunaga K, Hatano H, Kondo J, Hiraki Y, Yamamoto T, Duong IT, Endo N: Expression of the cartilage derived anti-angiogenic factor chondromodulin-I decreases in the early stage of experimental osteoarthritis. *J Rheumatol* 30(10):2207, 2003

127. Smith JO, Oreffo RO, Clarke NM, Roach HI: Changes in the antiangiogenic properties of articular cartilage in osteoarthritis. *J Orthop Sci* 8(6):849, 2003
128. Murata M, Yudoh K, Masuko K: The potential role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in cartilage: how the angiogenic factor could be involved in the pathogenesis of osteoarthritis? *Osteoarthritis Cartilage* 16(3):279, 2008
129. Dougados M, Gueguen A, Nguyen M, Berdah L, Lequesne M, Mazieres B, Vignon E: [Natural history of coxarthrosis: epidemiological data from the ECHODIAH study]. *Rev Prat* 47(17 Suppl):S6, 1997
130. Ushiyama T, Chano T, Inoue K, Matsusue Y: Cytokine production in the infrapatellar fat pad: another source of cytokines in knee synovial fluids. *Ann Rheum Dis* 62(2):108, 2003
131. Suri S, Gill SE, Massena de CS, Wilson D, McWilliams DF, Walsh DA: Neurovascular invasion at the osteochondral junction and in osteophytes in osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 66(11):1423, 2007
132. Saklatvala J: Inflammatory signaling in cartilage: MAPK and NF-kappaB pathways in chondrocytes and the use of inhibitors for research into pathogenesis and therapy of osteoarthritis. *Curr Drug Targets* 8(2):305, 2007
133. Lajeunesse D: The role of bone in the treatment of osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S34-S38, 2004
134. Burr DB: The importance of subchondral bone in osteoarthrosis. *Curr Opin Rheumatol* 10(3):256, 1998
135. Arokoski JP, Jurvelin JS, Vaatainen U, Helminen HJ: Normal and pathological adaptations of articular cartilage to joint loading. *Scand J Med Sci Sports* 10(4):186, 2000
136. Neogi T, Felson D, Niu J, Lynch J, Nevitt M, Guermazi A, Roemer F, Lewis CE, Wallace B, Zhang Y: Cartilage loss occurs in the same subregions as subchondral bone attrition: a within-knee subregion-matched approach from the Multicenter Osteoarthritis Study. *Arthritis Rheum* 61(11):1539, 2009
137. Roemer FW, Guermazi A, Javaid MK, Lynch JA, Niu J, Zhang Y, Felson DT, Lewis CE, Torner J, Nevitt MC: Change in MRI-detected subchondral bone marrow lesions is associated with cartilage loss: the MOST Study. A longitudinal multicentre study of knee osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 68(9):1461, 2009
138. Roemer FW, Neogi T, Nevitt MC, Felson DT, Zhu Y, Zhang Y, Lynch JA, Javaid MK, Crema MD, Torner J, Lewis CE, Guermazi A: Subchondral bone marrow lesions are highly associated with, and predict subchondral bone attrition longitudinally: the MOST study. *Osteoarthritis Cartilage* 18(1):47, 2010
139. Clockaerts S, Bastiaansen-Jenniskens YM, Runhaar J, Van Osch GJ, Van Offel JF, Verhaar JA, De Clerck LS, Somville J: The infrapatellar fat pad should be considered as an active osteoarthritic joint tissue: a narrative review. *Osteoarthritis Cartilage* 2010
140. Toussirot E, Streit G, Wendling D: The contribution of adipose tissue and adipokines to inflammation in joint diseases. *Curr Med Chem* 14(10):1095, 2007
141. Menkes CJ, Lane NE: Are osteophytes good or bad? *Osteoarthritis Cartilage* 12 Suppl A:S53-S54, 2004
142. Garnero P, Mazieres B, Gueguen A, Abbal M, Berdah L, Lequesne M, Nguyen M, Salles JP, Vignon E, Dougados M: Cross-sectional association of 10 molecular markers of bone,

- cartilage, and synovium with disease activity and radiological joint damage in patients with hip osteoarthritis: the ECHODIAH cohort. *J Rheumatol* 32(4):697, 2005
143. Hermida-Gomez T, Fuentes-Boquete I, Gimeno-Longas MJ, Muinos-Lopez E, az-Prado S, de Toro FJ, Blanco FJ: Quantification of cells expressing mesenchymal stem cell markers in healthy and osteoarthritic synovial membranes. *J Rheumatol* 38(2):339, 2011
 144. Wang J, Verdonk P, Elewaut D, Veys EM, Verbruggen G: Homeostasis of the extracellular matrix of normal and osteoarthritic human articular cartilage chondrocytes in vitro. *Osteoarthritis Cartilage* 11(11):801, 2003
 145. Wang J, Elewaut D, Veys EM, Verbruggen G: Insulin-like growth factor 1-induced interleukin-1 receptor II overrides the activity of interleukin-1 and controls the homeostasis of the extracellular matrix of cartilage. *Arthritis Rheum* 48(5):1281, 2003
 146. Irie K, Uchiyama E, Iwaso H: Intraarticular inflammatory cytokines in acute anterior cruciate ligament injured knee. *Knee* 10(1):93, 2003
 147. Marks PH, Donaldson ML: Inflammatory cytokine profiles associated with chondral damage in the anterior cruciate ligament-deficient knee. *Arthroscopy* 21(11):1342, 2005
 148. Cuellar VG, Cuellar JM, Golish SR, Yeomans DC, Scuderi GJ: Cytokine profiling in acute anterior cruciate ligament injury. *Arthroscopy* 26(10):1296, 2010
 149. Higuchi H, Shirakura K, Kimura M, Terauchi M, Shinozaki T, Watanabe H, Takagishi K: Changes in biochemical parameters after anterior cruciate ligament injury. *Int Orthop* 30(1):43, 2006
 150. Zysk SP, Fraunberger P, Veihelmann A, Dorger M, Kalteis T, Maier M, Pellengahr C, Refior HJ: Tunnel enlargement and changes in synovial fluid cytokine profile following anterior cruciate ligament reconstruction with patellar tendon and hamstring tendon autografts. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* 12(2):98, 2004
 151. Elsaid KA, Fleming BC, Oksendahl HL, Machan JT, Fadale PD, Hulstyn MJ, Shalvoy R, Jay GD: Decreased lubricin concentrations and markers of joint inflammation in the synovial fluid of patients with anterior cruciate ligament injury. *Arthritis Rheum* 58(6):1707, 2008
 152. Elsaid KA, Machan JT, Waller K, Fleming BC, Jay GD: The impact of anterior cruciate ligament injury on lubricin metabolism and the effect of inhibiting tumor necrosis factor alpha on chondroprotection in an animal model. *Arthritis Rheum* 60(10):2997, 2009
 153. Xie J, Naito M, Maeyama A: Intracapsular pressure and interleukin-1beta cytokine in hips with acetabular dysplasia. *Acta Orthop* 81(2):189, 2010
 154. Kaneyama K, Segami N, Sun W, Sato J, Fujimura K: Analysis of tumor necrosis factor-alpha, interleukin-6, interleukin-1beta, soluble tumor necrosis factor receptors I and II, interleukin-6 soluble receptor, interleukin-1 soluble receptor type II, interleukin-1 receptor antagonist, and protein in the synovial fluid of patients with temporomandibular joint disorders. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 99(3):276, 2005
 155. Trzeciak T, Kruczynski J, Jaroszewski J, Lubiowski P: Evaluation of cartilage reconstruction by means of autologous chondrocyte versus periosteal graft transplantation: an animal study. *Transplant Proc* 38(1):305, 2006
 156. Trzeciak T, Kruczynski J, Lubiowski P, Piontek T, Jaroszewski J: Rekonstrukcja ubytków chrząstki stawowej za pomocą autologicznych chondrocytów. *Ortop Traumatol Rehabil* 3(2):200, 2001

157. Francin PJ, Guillaume C, Humbert AC, Pottie P, Netter P, Mainard D, Presle N: Association between the chondrocyte phenotype and the expression of adipokines and their receptors: evidence for a role of leptin but not adiponectin in the expression of cartilage-specific markers. *J Cell Physiol* 2010
158. Chenevier-Gobeaux C, Morin-Robinet S, Lemarechal H, Poiraudeau S, Ekindjian JC, Borderie D: Effects of pro- and anti-inflammatory cytokines and nitric oxide donors on hyaluronic acid synthesis by synovial cells from patients with rheumatoid arthritis. *Clin Sci (Lond)* 107(3):291, 2004
159. Wang J, Elewaut D, Hoffman I, Veys EM, Verbruggen G: Physiological levels of hydrocortisone maintain an optimal chondrocyte extracellular matrix metabolism. *Ann Rheum Dis* 63(1):61, 2004
160. Tong KM, Shieh DC, Chen CP, Tzeng CY, Wang SP, Huang KC, Chiu YC, Fong YC, Tang CH: Leptin induces IL-8 expression via leptin receptor, IRS-1, PI3K, Akt cascade and promotion of NF-kappaB/p300 binding in human synovial fibroblasts. *Cell Signal* 20(8):1478, 2008
161. Huang TL, Hsu HC, Yang KC, Yao CH, Lin FH: Effect of different molecular weight hyaluronans on osteoarthritis-related protein production in fibroblast-like synoviocytes from patients with tibia plateau fracture. *J Trauma* 68(1):146, 2010
162. Huang TL, Hsu HC, Yang KC, Lin FH: Hyaluronan Up-Regulates IL-10 Expression in Fibroblast-Like Synoviocytes from Patients with Tibia Plateau Fracture. *J Orthop Res* 2010
163. Attur M, Samuels J, Krasnokutsky S, Abramson SB: Targeting the synovial tissue for treating osteoarthritis (OA): where is the evidence? *Best Pract Res Clin Rheumatol* 24(1):71, 2010
164. Benito MJ, Veale DJ, FitzGerald O, van den Berg WB, Bresnihan B: Synovial tissue inflammation in early and late osteoarthritis. *Ann Rheum Dis* 64(9):1263, 2005
165. Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M: Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 35(5-6):247, 2006
166. Senolt L, Pavelka K, Housa D, Haluzik M: Increased adiponectin is negatively linked to the local inflammatory process in patients with rheumatoid arthritis. *Cytokine* 35(5-6):247, 2006
167. Stannus OP, Jones G, Quinn SJ, Cicuttini FM, Dore D, Ding C: The association between leptin, interleukin-6, and hip radiographic osteoarthritis in older people: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther* 12(3):R95, 2010
168. Kijowski R, Blankenbaker D, Stanton P, Fine J, De SA: Arthroscopic validation of radiographic grading scales of osteoarthritis of the tibiofemoral joint. *AJR Am J Roentgenol* 187(3):794, 2006
169. Petersson IF, Boegard T, Saxne T, Silman AJ, Svensson B: Radiographic osteoarthritis of the knee classified by the Ahlback and Kellgren & Lawrence systems for the tibiofemoral joint in people aged 35-54 years with chronic knee pain. *Ann Rheum Dis* 56(8):493, 1997
170. Isbagio H: Factors affecting radiographic progression of knee osteoarthritis. *Acta Med Indones* 36(2):87, 2004
171. Karan A, Karan MA, Vural P, Erten N, Tascioglu C, Aksoy C, Canbaz M, Oncel A: Synovial fluid nitric oxide levels in patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 22(6):397, 2003
172. Singh AK, Misra R, Aggarwal A: Th-17 associated cytokines in patients with reactive arthritis/undifferentiated spondyloarthropathy. *Clin Rheumatol* 2010

173. Westacott CI, Whicher JT, Barnes IC, Thompson D, Swan AJ, Dieppe PA: Synovial fluid concentration of five different cytokines in rheumatic diseases. *Ann Rheum Dis* 49(9):676, 1990
174. Tang Z, Yang L, Wang Y, Xue R, Zhang J, Huang W, Chen PC, Sung KL: Contributions of different intraarticular tissues to the acute phase elevation of synovial fluid MMP-2 following rat ACL rupture. *J Orthop Res* 27(2):243, 2009
175. Pearle AD, Scanzello CR, George S, Mandl LA, DiCarlo EF, Peterson M, Sculco TP, Crow MK: Elevated high-sensitivity C-reactive protein levels are associated with local inflammatory findings in patients with osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage* 15(5):516, 2007
176. Scanzello CR, Umoh E, Pessler F, az-Torne C, Miles T, Dicarlo E, Potter HG, Mandl L, Marx R, Rodeo S, Goldring SR, Crow MK: Local cytokine profiles in knee osteoarthritis: elevated synovial fluid interleukin-15 differentiates early from end-stage disease. *Osteoarthritis Cartilage* 17(8):1040, 2009
177. Wassilew GI, Lehnigk U, Duda GN, Taylor WR, Matziolis G, Dynybil C: The expression of proinflammatory cytokines and matrix metalloproteinases in the synovial membranes of patients with osteoarthritis compared with traumatic knee disorders. *Arthroscopy* 26(8):1096, 2010
178. Pallu S, Francin PJ, Guillaume C, Gegout-Pottie P, Netter P, Mainard D, Terlain B, Presle N: Obesity affects the chondrocyte responsiveness to leptin in patients with osteoarthritis. *Arthritis Res Ther* 12(3):R112, 2010
179. Gandhi R, Takahashi M, Smith H, Rizek R, Mahomed NN: The synovial fluid adiponectin-leptin ratio predicts pain with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol* 29(11):1223, 2010
180. Hao D, Li M, Wu Z, Duan Y, Li D, Qiu G: Synovial fluid level of adiponectin correlated with levels of aggrecan degradation markers in osteoarthritis. *Rheumatol Int* 2010
181. Tan W, Wang F, Zhang M, Guo D, Zhang Q, He S: High adiponectin and adiponectin receptor 1 expression in synovial fluids and synovial tissues of patients with rheumatoid arthritis. *Semin Arthritis Rheum* 38(6):420, 2009

8. STRESZCZENIE

Patogenezę choroby zwyrodnieniowej stawów dotychczas poznano jedynie fragmentarycznie. W ostatnich latach coraz większą rolę w rozwoju procesu zwyrodnieniowego przypisuje się mediatorom prozapalnym.

Celem pracy jest ocena u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawów i osób bez cech tej choroby stężenia w płynie stawowym, oraz produkcji przez komórki maziówki i chrząstki interleukiny 1 – beta, leptyny oraz adiponektyny.

Do badania włączono 17 pacjentów z chorobą zwyrodnieniową stawu kolanowego, zakwalifikowanych do endoprotezoplastyki tego stawu, oraz 23 pacjentów z uszkodzeniem więzadła krzyżowego przedniego, zakwalifikowanych do jego artroskopowej rekonstrukcji, u których nie stwierdzono cech choroby zwyrodnieniowej stawów.

Od pacjentów pobrano próbki płynu stawowego, a także fragmenty chrząstki stawowej i błony maziowej. Próbki tkankowe posłużyły do założenia pierwotnych hodowli komórkowych synowocytów typu fibroblastów oraz chondrocytów, z których w 2,4 i 6 dobie trwania hodowli pobierano próbki medium hodowlanego. Przy użyciu metody ELISA oznaczono stężenia badanych białek w płynie stawowym i mediach hodowlanych. Przeprowadzono analizę zależności uzyskanych wyników od BMI, a u pacjentów z chorobą zwyrodnieniową również od stopnia radiologicznego zaawansowania choroby.

W grupie chorych ze zmianami zwyrodnieniowymi, w porównaniu z pacjentami z uszkodzeniem ACL stwierdzono wyższe stężenia wszystkich badanych białek w obrębie płynu stawowego oraz w mediach hodowlanych. W obrębie obu grup więcej IL – 1 beta raz leptyny produkowały synowocyty, natomiast adiponektyna była produkowana głównie przez chondrocyty. Zaobserwowano znaczny spadek produkcji adiponektyny w hodowli chrząstki od osób z chorobą zwyrodnieniową stawów między 2 a 4 dobą hodowli. Stwierdzono występowanie dodatnich korelacji między stopniem radiologicznego zaawansowania choroby zwyrodnieniowej stawu kolanowego a stężeniem IL – 1 beta w płynie stawowym oraz wydzielaniem adiponektyny w drugiej dobie hodowli chondrocytów.

Uzyskane wyniki wskazują na wzmożoną produkcję IL – 1 beta, leptyny i adiponektyny w stawach objętych procesem zwyrodnieniowym, przy czym dwa pierwsze białka produkują głównie synowioocyty, natomiast adiponektynę głównie chondrocyty.

ABSTRACT

The pathogenesis of osteoarthritis (OA) is not fully understood, and in recent years the role of inflammatory mediators in this process has been emphasized.

The aim of this study is to measure in patients with knee OA and non – arthritic knees synovial fluid concentrations of interleukin – 1 beta, leptin, adiponectin, and to assess the secretion of these cytokines by synovial fibroblasts and chondrocytes.

17 patients with knee osteoarthritis requiring total knee arthroplasty, and 23 patients with ACL ruptures, with no OA of the knee joint, qualified for arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction were included in this study.

Joint fluid samples, fragments of synovial membrane and articular cartilage were obtained from both groups. The tissue fragments were used to create primary cultures of synovial fibroblasts and chondrocytes. Concentrations of IL – 1 beta, leptin and adiponectin in synovial fluid, and media samples from days 2,4,6 of cultures were measured using ELISA assay. Correlations with BMI, and radiographic advancement of osteoarthritis were also analyzed.

Concentrations of examined proteins were higher in synovial fluids and culture media from patients with osteoarthritis. In both groups IL – 1 beta, and leptin were produced mainly by synoviocytes, whereas more adiponectin was produced by chondrocytes. The production of adiponectin in chondrocytes from patients with OA dropped between the 2nd and 4th day of culture. Significant positive correlations between radiographic advancement of osteoarthritis and concentration of IL – 1 beta in synovial fluid, and secretion of adiponectin in the 2nd day of chondrocyte culture were found.

The results indicate increased production of IL – 1 beta, leptin and adiponectin in joints with osteoarthritis. The first cytokines are produced mainly by synovial fibroblast, while adiponectin is produced mostly by chondrocytes.