

MIKROSTRUKTURNE PROMENE ZGLOBNE HRSKAVICE I SUBHONDRALE KOSTI USLED REUMATOIDNOG ARTRITISA I OSTEOARTRITISA KOD PACIJENATA KOJI SU LEČENI TOTALNOM ARTROPLASTIKOM KOLENA

1. Uvod

Gonartroza je hronično progresivno oboljenje kolena koje predstavlja globalni javno-zdravstveni problem. Jedan je od vodećih razloga smanjenja kvaliteta života i često zahteva operativno lečenje (1). Može biti klasifikovana kao primarna osteoartroza (OA) kolena, odnosno idiopatsko degenerativno stanje koje se javlja tokom starenja, ili sekundarna, kada se oštećenje zglobnih površina povezuje sa prethodnim povredama, infekcijama ili inflamatornim artropatijama kao što je reumatoidni artritis (RA) (2).

Ranije se smatralo da gonartroza dominantno zahvata samo zglobnu hrskavicu, dok novija saznanja ukazuju da se ovo oboljenje odražava na sve strukture zgloba narušavajući njegovo funkcionisanje. Istraživanja ukazuju da subhondralna kost igra značajnu ulogu u etiopatogenezi oboljenja (3). Dva različita kompartmana ulaze u sastav subhondralne kosti: subhondralna kortikalna ploča (koja predstavlja tanku kompaktnu koštanu lamelu pomoću koje se ostvaruje komunikacija između zglobne hrskavice i ostale kosti) i subhondralna trabekularna kost (koja je sačinjena od potpornih trabekula koje igraju značajnu ulogu u prenošenju opterećenja i apsorbovanju mehaničkih sila) (4,5). Hrskavica i subhondralna kost formiraju jedinstvenu strukturu nazvanu osteohondralni spoj, u kome se dešavaju biomehaničke i biohemijske interakcije (6). Promene koje se dešavaju u jednom delu osteohondralnog spoja ne mogu biti posmatrane nezavisno, već utiču na ceo spoj ukazujući na njihove složene odnose koji su izuzetno važni za razumevanje patogeneze gonartroze (4). Uočeno je da odstupanje od fiziološke osovine kolena značajno utiče na distribuciju opterećenja u okrajcima femura i tibije. Angularni deformiteti kolena utiču na ekscentrično pomeranje mehaničke osovine čime dolazi do nejednake raspodele prenosa sila na koštano-zglobne strukture kolena, što se smatra jednim od ključnih faktora u razvoju artroze (7).

Iako savremena literatura sadrži značajan broj istraživanja o mikrostrukturnim karakteristikama proksimalnog okrajka butne kosti, kvantitativna analiza regionalne distribucije mikroarhitekture subhondralne kosti proksimalne tibije i distalnog femura kod osoba sa OA i RA kolena i dalje je nedovoljno istražena (8). Dostupni podaci ukazuju da je gustina ispitivane subhondralne kosti povećana u regionima blizu oštećene hrskavice kod pacijenata sa osteoartrozom i kuka i kolena (1). Eksperimentalne studije ukazuju da degenerativno izmenjena hrskavica ima manji kapacitet za apsorbovanje mehaničkog opterećenja u odnosu na zdravu hrskavicu. Sa progresijom oboljenja razvija se začarani krug između stepena deformiteta i subhondralne skleroze koja nastaje kao odgovor na povećano opterećenje (9,10). Ne postoji uniforman stav o tome da li promene u mikroarhitekturi subhondralne kosti utiču na početak oboljenja ili nastaju kao sekundarni efekat degeneracije hrskavice zgloba kolena (3).

Metod izbora u lečenju uznapredovalih stadijuma gonartroze je totalna artroplastika kolena (*Total Knee Arthroplasty*, TKA) - zamena zglobnih površina veštačkim zglobovom. Iako je TKA uglavnom efikasna procedura, postoje stalni napor i potreba da se poboljša dugovečnost implantata u biološkom okruženju. Jedan od neophodnih uslova za uspešnu hiruršku intervenciju je postizanje adekvatne i trajne fiksacije implantata za kost. Detaljna evaluacija mikrostrukture subhondralne kosti kolena je ključna u razumevanju i održanju ovog koštano-implantacionog spoja kod različitih populacija pacijenata (11).

Dosadašnje studije o mikrostrukturnim promenama kolena kod osoba sa OA i RA (11-15) imaju brojne limitacije: različiti dijagnostički kriterijumi za dijagnozu OA i RA, varijabilan broj

ispitanika uključenih u studiju, analiziranje samo jedne grupe ispitanika ili uključivanje samo individua sa OA ili samo RA u poređenju sa kontrolama, zanemarivanje značaja kovarijantnih faktora (pol, uzrast, fizička aktivnost, indeks telesne mase i drugo), analiziranje samo jednog skeletnog mesta (samo femur ili samo tibija) i korišćenje različitih metodoloških pristupa (ograničena prostorna rezolucija skenera, dvodimenzionalnost analize, ograničena zapremina analizirane kosti i drugo). Svi navedeni nedostaci dostupnih istraživanja ukazuju na neophodnost dodatnog detaljnog ispitivanja mikrostrukturnih promena subhondralne kosti i hrskavice kolena kod osoba sa OA i RA.

2. Radna hipoteza

Postoji značajna razlika u mikroarhitekturnim parametrima kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti i u debljini zglobove hrskavice kolena među bolesnicima sa RA kolena, OA kolena i ispitanika bez oboljenja kolena.

Postoje regionalne razlike u mikrostrukturnim karakteristikama subhondralne kosti i debljini hrskavice kolena bolesnika sa RA i OA.

Angularni deformiteti kolena (varus/valgus koleno) utiču na distribuciju debljine zglobove hrskavice i mikroarhitekturnih parametara kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti kolena kod bolesnika sa RA i OA.

3. Ciljevi istraživanja

Specifični ciljevi našeg istraživanja će biti:

1. da se ispita značajnost razlika u mikrostrukturnim promenama subhondralne kosti i zglobove hrskavice kolena u grupi bolesnika sa RA i OA kolena koji su hirurški lečeni, kao i zdravih individua istog pola koju nisu imali oboljenje kolena.
2. da se ispita značajnost razlika u mikroarhitekturnim parametrima kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti i značajnost razlika u debljini zglobove hrskavice kolena kod bolesnika sa različitim stadijumima RA i OA kolena.
3. da se utvrdi postojanje regionalnih specifičnosti mikrostrukturnih karakteristika kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti i hrskavice kolena bolesnika sa RA i OA koje mogu uticati na dugotrajnost fiksacije hirurških implantata.
4. da se ispita značajnost regionalno-specifičnih razlika u debljini zglobove hrskavice i mikroarhitekturnim parametrima kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti kod bolesnika sa RA i OA koji imaju različite angularne deformitete (varus/valgus koleno).

4. Materijal i metode

4.1. Dizajn studije i izbor ispitanika

Istraživanje će biti sprovedeno u formi retrospektivne studije koja će analizirati 360 koštanih uzoraka (240 uzoraka proksimalne tibije i 120 uzoraka sa distalnog femura) sakupljenih od 60 odraslih osoba oba pola koje će biti podeljene u tri grupe: kontrolna grupa, OA grupa i RA grupa.

OA grupa će se sastojati od pacijenata koji će biti lečeni na Institutu za ortopediju Banjica ugradnjom totalne endoproteze kolena zbog primarne artroze u periodu od 2023. do 2025. godine (n=20). RA grupu će činiti pacijenti koji su takođe lečeni na Institutu za ortopediju Banjica ugradnjom totalne endoproteze u istom periodu, ali zbog sekundarne artroze kolena posredovane RA (n=20). Dijagnoza kod OA i RA pacijenata biće postavljena na osnovu istorije bolesti, kliničkog i radiografskog nalaza. Uzorci kontrolne grupe istog pola biće sakupljeni od kadaveričnih donora bez makroskopskih znakova i/ili heteroanamnestičkih/medicinskih podataka o degenerativnom oboljenju kolena (n=20).

Kriterijumi za isključivanje iz studije obuhvataju pozitivnu anamnezu bolesti koja direktno ili indirektno utiču na koštano-zglobni sistem (bolesti jetre i bubrega, poremećaj paratiroidne, nadbubrežne žlezde, gonada, prisustvo malignog oboljenja, osteomijelitisa, podaci o potpunoj invalidnosti i prethodnim osteoporotskim prelomima) i upotrebu lekova za osteoporozu, antiepileptika, hemioterapije ili hormonske terapije. Takođe, pacijenti sa povredama kolena, ligamentarnom nestabilnošću, kao i oni koji ne budu u stanju da daju potpisan pristanak informisanog pacijenta ili imaju kognitivni deficit će biti isključeni iz studije. Pacijenti kod kojih je prethodno primenjena intraartikularna terapija (viskosuplementacija i/ili kortikosteroidna injekcija), kao i oni kod kojih postoji hronična zloupotreba alkohola ili psihoaktivnih supstanci neće biti uključeni u studiju. Za sprovođenje ovog istraživanja biće zatražena saglasnost Etičkog odbora Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu, po odobrenju etičkog odbora Instituta za ortopediju Banjica pod brojem I-113/3 od 23.03.2023. godine.

4.2. Procena trabekularne i kortikalne mikroarhitekture kosti pomoću mikrokompjuterizovane tomografije

Pribavljeni uzorci kosti biće čuvani u standardnom rastvoru formaldehida na konstantnoj temperaturi, manuelno očišćeni od mekih tkiva i isečeni radi izdvajanja po šest cilindričnih uzoraka (prečnika 1cm) od svakog ispitanika: dva uzorka distalnog femura (jedan iz medijalnog i jedan iz lateralnog kondila) i četiri uzorka proksimalne tibije (jedan iz prednjeg i jedan iz zadnjeg dela medijalnog kondila, kao i jedan iz prednjeg i jedan iz zadnjeg dela lateralnog kondila). Svaki koštani uzorak biće postavljen i fiksiran za nosač kako bi se izbegli artefakti usled pomeranja, umotan u parafinski film kako bi se sprečilo isušivanje tkiva i biće skeniran primenom mikrokompjuterizovane tomografije izotropne rezolucije od 10 μm (mikro-CT sistem *SkyScan 1172, Bruker*, Belgija) u Centru za biologiju kosti, Medicinskog fakulteta Univerziteta u Beogradu. Koristićemo kombinovani aluminijumski i bakarni filter, 2K kameru, izotropnu rezoluciju od 10 μm , odgovarajući stepen rotacije i trostruko skeniranje po frejmu. Dobijene projekcijske slike ćemo rekonstruisati korišćenjem *NRecon* softvera (*Bruker microCT*, Belgija) na *InstaRecon* platformi (*InstaRecon*, SAD) sa adekvatnim Gausovim izgladivanjem (*Gaussian smoothing*), korekcijom termičkog drifta (*thermal drift correction*), kompenzacijom lošeg poravnanja (*misalignment compensation*), kao i korekcijama prstenastih artefakata (*ring artifact correction*) i očvršćavanja zraka (*beam hardening corrections*). Proces segmentacije podrazumevaće manuelno konturisanje regiona od interesa (ROI) na različitim presecima, sa interpolacijom kako bi se dobili trodimenzionalni volumeni od interesa (VOI). VOI subhondralne kortikalne kosti će obuhvatati 300 ručno obeleženih ROI-a (približno 0,3cm³ kortikalne kosti po uzorku), dok će VOI distalnijeg trabekularnog dela subhondralne kosti obuhvatati 701 presek (centralni presek ± 350 preseka, približno 0,7cm³ trabekularne kosti po uzorku). Pomoću softvera za 3D histomorfometriju (*CT.An 2020; 1.20.30.0 ver; Skyscan*, Belgija) biće analizirani sledeći kortikalni mikroarhitekturni parametri: totalna kortikalna poroznost (*Ct.Po.tot*, %), separacija kortikalnih pora (*Ct.Po.Sp*, mm), dijametar kortikalnih pora (*Ct.Po.Dm*, μm) i debljina korteksa (*Ct.Th*, mm). Takođe, biće analizirani i sledeći parametri mikrostrukture trabekularne kosti: zapreminska frakcija trabekularne kosti (*BV/TV*, %), broj trabekula (*Tb.N*, 1/mm), debljina trabekula (*Tb.Th*, μm), trabekularna separacija (*Tb.Sp*, mm), gustina trabekularnih spojeva (*Conn.Dn*, 1/mm³), fraktalna dimenzija (*FD*, bez jedinice), stepen anizotropije (*DA*, bez jedinice) i indeks strukturnog modela (*SMI*, bez jedinice).

4.3. Procena debljine hrskavice pomoću mikrokompjuterizovane tomografije

Zglobna hrskavica biće segmentirana na istim rekonstruisanim snimcima uzoraka, koristeći prag nivoa sive u vrednostima između 20 i 90 (kako bi se iz analize isključio vazduh, koštana srž

i koštano tkivo) i semiautomatski način određivanja granica ROI-a hrskavice. Za analizu debljine hrskavice (*Cg.Th*, μm) koristiće se 64-bit softver za 3D histomorfometriju (*CT.An 2020; 1.20.30.0 version, Skyscan, Belgija*).

4.7. Statistička analiza

Veličina uzorka: Veličina uzorka je određena primenom statističkog softvera *G*Power* (verzija 3.1., za *Windows* operativni sistem) koristeći preliminarne rezultate o srednim vrednostima i standardnoj devijaciji za primarni parametar od interesa (zapremiska frakcija rabekularne kosti, *BV/TV*) u tri ispitivane grupe (parametarski test), sa ciljem postizanja jačine studije od 80% pri nivou značajnosti od 5% ($\beta=0.2$ i $\alpha=0.05$).

Statistička analiza podataka: Kolmogorov-Smirnov test će biti primenjen za procenu normalnosti raspodele, dok će Levenov test biti korišćen za procenu homogenosti varijansi podataka. U slučaju normalno raspoređenih podataka, biće korišćeni parametarski testovi za procenu značajnosti razlike među grupama (RA, OA i kontrolna grupa), među ispitivanim skeletnim mestima (butna kosti i tibija), kao i značanst njihove interakcije (jednofaktorska analiza varijanse za ponovljena merenja (*engl. one-way repeated measures ANOVA*) sa Bonferoni *post hoc* korekcijom. Da bi se ispitao potencijalni kovarijantni efekat starosti i indeksa telesne mase u ispitivanju značajnosti razlike parametara kortikalne i trabekularne mikrostrukture biće korišćena analiza kovarijanse (*engl. ANCOVA*) sa Bonferoni *post hoc* korekcijom za procenu značajnosti razlike među pacijentima sa RA i OA koji imaju angluarni deformitet (varus/valgus koleno), među ispitivanim skeletnim mestima (butna kosti i tibija), kao i značanst njihove interakcije. Metode Pirsonove korelacije i linearne regresije će biti korišćene za procenu postojanja i jačine povezanosti koštanih mikroarhitekturnih parametara koji prate normalnu raspodelu. Ukoliko podaci ne prate normalnu raspodelu primenjivaće se adekvatni neparametarski testovi za procenu značajnosti razlike među ispitivanim grupama bolesnika, među stadijumima gonartroze, među različitim angularnim deformitetima kolena i/ili među ispitivanim skeletnim mestima (Kruskal-Wallis test i Mann-Whitney U test). Sve analize će biti obavljene u SPSS statističkom softveru (verzija 27, za *Windows* operativni sistem) na nivou značajnosti od 5 % (0,05).

Procena kandidata o potencijalnom naučnom doprinosu

S obzirom da dosadašnje studije o mikrostrukturnim promenama kod OA i RA kolena imaju brojne limitacije, bazična ispitivanja trabekularnog i kortikalnog dela subhondralne kosti i zglobove hrskavice koja će biti sprovedena u okviru ove teze neophodna su u cilju potpunog razumevanja ove teme. Dodatno, u savremenoj literaturi ne postoji ni analiza regionalnih razlika u parametrima mikroarhitekture subhondralne kosti i u debljini hrskavice kolena koji su uzrokovani angularnim deformitetima kolena kod osoba sa OA i RA. Naše istraživanje će ukazivati na značaj promena kortikalnog i trabekularnog dela subhondralne kosti u patogenezi oboljenja i pružiti osnov za dalja klinička istraživanja usmerena na razvoj novih terapijskih pristupa lečenju ovih oboljenja. Takođe, na osnovu ovog ispitivanja steći će se bolji uvid u građu subhondralne kosti kolena koja je ključni element u fiksaciji i stabilnosti implantata tokom TKA.

Literatura:

1. Holzer LA, Kraiger M, Talakic E, Fritz GA, Avian A, Hofmeister A, et al. Microstructural analysis of subchondral bone in knee osteoarthritis. *Osteoporos Int.* 2020;31:2037–45. doi:10.1007/s00198-020-05461-6.
2. Giorgino R, Albano D, Fusco S, Peretti GM, Mangiavini L, Messina C. Knee Osteoarthritis: Epidemiology, Pathogenesis, and Mesenchymal Stem Cells: What Else Is New? An Update. *Int J Mol Sci.* 2023 Mar 29;24(7):6405. doi: 10.3390/ijms24076405.
3. Li X, Chen W, Liu D, Chen P, Wang S, Li F, et al. Pathological progression of osteoarthritis: a perspective on subchondral bone. *Front Med.* 2024;18:237–57. doi:10.1007/s11684-024-1061-y.
4. Evans LAE, Pitsillides AA. Structural clues to articular calcified cartilage function: a descriptive review of this crucial interface tissue. *J Anat.* 2022;241:875–95.
5. Luo P, Yuan QL, Yang M, Wan X, Xu P. The role of cells and signal pathways in subchondral bone in osteoarthritis. *Bone Joint Res.* 2023;12:536–45. doi:10.1302/2046-3758.129.BJR-2023-0081.R1.
6. Li Q, Miramini S, Smith DW, Gardiner BS, Zhang L. Osteochondral junction leakage and cartilage joint lubrication. *Comput Methods Programs Biomed.* 2023;230:107353. doi:10.1016/j.cmpb.2023.107353.
7. Han X, Cui J, Xie K, Jiang X, He Z, Du J, et al. Association between knee alignment, osteoarthritis disease severity, and subchondral trabecular bone microarchitecture in patients with knee osteoarthritis: a cross-sectional study. *Arthritis Res Ther.* 2020;22:274. doi:10.1186/s13075-020-02274-0.
8. Schadow JE, Maxey D, Smith TO, Finnilä MAJ, Manske SL, Segal NA, et al. Systematic review of computed tomography parameters used for the assessment of subchondral bone in osteoarthritis. *Bone.* 2024 Jan; 178:116948. doi: 10.1016/j.bone.2023.116948.
9. Kasaeian A, Roemer FW, Ghotbi E, Ibad HA, He J, Wan M, et al. Subchondral bone in knee osteoarthritis: bystander or treatment target? *Skeletal Radiol.* 2023;52:2069–83. doi:10.1007/s00256-023-04225-y.
10. Rapagna S, Roberts BC, Solomon LB, Reynolds KJ, Thewlis D, Perilli E. Relationships between tibial articular cartilage, in vivo external joint moments and static alignment in end-stage knee osteoarthritis: a micro-CT study. *J Orthop Res.* 2022;40:1125–34. doi:10.1002/jor.25140.
11. Roberts BC, Solomon LB, Mercer G, Reynolds KJ, Thewlis D, Perilli E. Relationships between in vivo dynamic knee joint loading, static alignment and tibial subchondral bone microarchitecture in end-stage knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage.* 2018;26:547–56. doi:10.1016/j.joca.2018.01.014.
12. Renault JB, Carmona M, Tzioupis C, Ollivier M, Argenson JN, Parratte S, et al. Tibial subchondral trabecular bone micromechanical and microarchitectural properties are affected by alignment and osteoarthritis stage. *Sci Rep.* 2020 Mar 4;10(1):3975. doi: 10.1038/s41598-020-60464-x.
13. Rapagna S, Roberts BC, Solomon LB, Reynolds KJ, Thewlis D, Perilli E. Tibial cartilage, subchondral bone plate and trabecular bone microarchitecture in varus- and valgus-osteoarthritis versus controls. *J Orthop Res.* 2021;39:1988–99. doi:10.1002/jor.24914.
14. Roberts BC, Thewlis D, Solomon LB, Mercer G, Reynolds KJ, Perilli E. Systematic mapping of the subchondral bone 3D microarchitecture in the human tibial plateau: variations with joint alignment. *J Orthop Res.* 2017;35:1927–41. doi:10.1002/jor.23474.
15. Meng XH, Wang Z, Zhang XN, Xu J, Hu YC. Rheumatoid arthritis of knee joints: MRI–pathological correlation. *Orthop Surg.* 2018;10:247–54. doi:10.1111/os.12389.