

# **Az ízületi gyulladás pathomechanizmusának feltárása és terápiás lehetőségei**

Butt Edina

PhD értekezés tézisei

**Szegedi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar  
Klinikai Orvostudományi Doktori Iskola**

**PhD program:**

**Klinikai és kísérletes kutatás a helyreállító és szervkímélő sebészetben**

**Igazgató: Prof. Dr. Lázár György, PhD**



**Témavezető:**

**Prof. Dr. Varga Endre**

**Dr. Hartmann Petra**

**Szeged**

**2021**

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények listája:**

Hartmann P\*, **Butt E\***, Feher A, Szilagyi AL, Jasz KD, Balazs B, Bakonyi M, Berko S, Eros G, Boros M, Horvath G, Varga E, Csanyi E, Electroporation-enhanced transdermal diclofenac sodium delivery into the knee joint in a rat model of acute arthritis.

DRUG DESIGN, DEVELOPMENT AND THERAPY 12:1917-1930. doi: 10.2147/DDDT.S161703. (2018) **IF: 3.208**

\*Megosztott első szerzős közlemény

Horvath T, Hanak L, Hegyi P, **Butt E**, Solymar M, Szucs A, Varga O, Thien B., Szakacs Zs, Csonka E, Hartmann P, Hydroxyapatite-coated implants provide better fixation in total knee arthroplasty. A meta-analysis of randomized controlled trials.

PLOS ONE 12;15:e0232378. doi: 10.1371/journal.pone.0232378. (2020) **IF: 2.740**

Jávor P, Mácsai A, **Butt E**, Baráth Bá, Jász DK, Horváth T, Baráth Be, Csonka Á, Torok L, Varga E, Hartmann P, Mitochondrial dysfunction affects the synovium of patients with rheumatoid arthritis and osteoarthritis differently (under review in PLOS ONE)

**Egyéb, az értekezéshez nem kapcsolódó teljes terjedelmű közlemények listája:**

Greksa F, **Butt E**, Csonka E, Jávor P, Tuboly E, Török L, Szabo A, Varga E, Hartmann P, Periosteal and endosteal microcirculatory injury following excessive osteosynthesis.

INJURY 52 Suppl 1:S3-S6. doi: 10.1016/j.injury.2020.11.053. (2021) **IF: 2.106**

Jávor P, Csonka E, **Butt E**, Rárosi F, Babik B, Török L, Varga E, Hartmann P, Comparison of the previous and current trauma-related shock classifications – A retrospective cohort study from a level I trauma centre. European Surgical Research (accepted for publication) (2021)

**IF: 2.351**

**Összesített IF: 10.405**

## I. BEVEZETÉS

Az arthritis olyan gyűjtőfogalom, amely számos, különféle etiológiájú, de hasonló tünettel, ízületi fájdalommal és gyulladással járó betegséget tartalmaz. Az osteoarthritis (OA) és a reumatoid arthritis (RA) a leggyakoribb előfordulási formája az arthritisnek, annak ellenére, hogy etiológiájukban és patomechanizmusukban jelentős különbségek vannak. Bár epidemiológiai vizsgálatok szerint az OA-nak mind endogén, mind exogén kockázati tényezői vannak, alapvetően egy degeneratív ízületi betegségről van szó, amelyet sérülés vagy ismétlődő ízületi stressz vált ki. A mechanikus károsodás aktiválja a mechanoszenzitív intracelluláris jelátvitelt a porcban, amely magában foglalja a gyulladással járó folyamatok aktiválódását, amelyek kialakíthatják a betegség strukturális és tüneti lefolyását. Ezzel szemben, az etiológiáját tekintve az RA egy multifaktoriális, multigén autoimmun betegség. Bár a pontos patomechanizmus nem minden részletében ismert, a genetikai hajlamot a HLA-DR4 és DR1 gének alléljaival való szoros kapcsolat RA-ben megerősíti. Ennek következménye a T- és B-limfociták és a makrofágok rendellenes aktivációja, kitapadása és migrációja, amely fokozott proinflammatorikus citokintermeléssel jár (TNF- $\alpha$ , IL-1). A krónikus autoimmun gyulladás következtében porckárosodás és intenzív angiogenezis és pannus képződés alakulhat ki a szinoviumban.

Az ízületi gyulladás patogenezisében ezen jól ismert tényezők mellett egyre több bizonyíték sugallja a mitokondriális diszfunkció szerepét az OA és RA betegek szinoviális sejtjeiben és porcsejtjeiben. Egyrészt a mitokondriális diszfunkció szerepet játszik a primer és poszt-traumás OA patogenezisében. Másrészt a mitokondriális légzési komplexeket kódoló gének egyes haplotípusai szorosan összefüggnek az OA és RA magasabb prevalenciájával, ami fokozott genetikai hajlamot jelent az ízületi gyulladás kialakulására. A megváltozott mitokondriális gének következtében az ízületi gyulladásban a mitokondriális légzési aktivitás romlik.

Az ízületi gyulladással összefüggő fájdalom enyhítésére „arany standard” terápiaként diklofenakot, a fenilecetsav osztályba tartozó nem szteroid gyulladáscsökkentő gyógyszert (NSAID) alkalmazzuk. Hatékony fájdalomcsillapító tulajdonsága mellett azonban sajnos a mellékhatásai is jelentősek. A diklofenak alkalmazása ugyanis dózis függő módon összefügg a gyomor-bélrendszeri, szív-érrendszeri és vesekárosodással. A szisztémás kezelések potenciálisan súlyos szövődményeinek mérséklésé céljából ezért helyileg alkalmazható készítményeket fejlesztettek ki. A helyileg alkalmazott diklofenak felszívódása az orális készítmény dózisének mindössze 3-5%-a, ráadásul tízszer lassabban jut a hatás helyére.

Emiatt van létjogosultsága az új gyógyszerbeviteli módszerek fejlesztésének, melyek magasabb helyi gyógyszerkoncentráció elérését teszik lehetővé közvetlenül az alkalmazás helyén. Különböző penetrációs technikákat fejlesztettek ki a biológiai hozzáférhetőség és a transzdermális gyógyszerbeadás hatékonyságának növelése érdekében, beleértve az ultrahangot és az elektroporációt (EP). Az EP-nál a rövid, nagyfeszültségű impulzusok átmeneti szerkezeti zavarokat okoznak a membránok lipid kettősrétegében. Ily módon lipofil vagy hidrofil molekulák, semleges vagy erősen feltöltött vegyületek szállíthatók baktériumok vagy emlős sejtek membránjain át, legfeljebb 40 kDa molekulatömegig. Az EP-val fokozott gyógyszerbevitel általános indikációs területei tehát a biológiai és a mesterséges membránok, de alkalmazhatók olyan összetett struktúrákon történő keresztüljuttatáshoz is, mint például a szinovium.

A konzervatív terápiás lehetőségek kimerülése után a térd végső stádiumú ízületi gyulladásában szenvedő betegek kezelési lehetőségeként a felszínpótló és a teljes térdízületi protézisek (TKA) ajánlottak. A protézis száruk cementált rögzítését minden betegben széles körben alkalmazzák, és ez a TKA arany standardja. Azonban a cement-csont határfelületen megfigyelt osteolysis jelei kérdéseket vetettek fel a cementált TKA-ek hosszú távú tartósságával kapcsolatban. Ezért cement nélküli TKA-eket fejlesztettek ki különböző bevonó anyagokkal. Közülük ígéretes a hidroxipapatit (HA) bevonat, amely potenciálisan képes elérni az implantátumok biológiai rögzítését. Számos tanulmány hasonlítja össze a TKA HA bevonatú és nem HA bevonattal ellátott protézis száruk felhasználásának végeredményét, de ellentmondásos következtetésekkel. A megfelelő választ randomizált tanulmányok összevetésével nyerhetjük el, melyek a HA bevonatos cement nélküli protézisek eredményeit mind a cementes, mind a más típusú cement nélküli protézisekkel veti össze.

## **2. A TANULMÁNY CÉLJAI**

Vizsgálataink célja a leggyakoribb ízületi gyulladásos betegségek, az OA és RA patomechanizmusának feltárása, különös tekintettel a mitokondriális funkcióban bekövetkező változásokra, valamint az arthritis optimális konzervatív és operatív kezelésének megtalálása volt.

- Első lépésként (I. tanulmány) jellemeztük a szinoviális membrán sejtjeinek mitokondriális funkciójában bekövetkező változásokat OA és RA betegeknél. Erre a célra intraoperatív

mintákat használtunk, amelyeket nagy felbontású respirometriával vizsgáltunk, biokémiai elemzésnek és szövettani vizsgálatnak vetettük alá.

- Ezután (II. vizsgálat) a transzdermális gyógyszeradagolás hatékonyságának javítását tűztük ki célul az ízületi gyulladás konzervatív kezelésében. Feltételeztük, hogy az EP felerősítheti a topikális diklofenak transzportját az ízületekbe, és ezáltal nő a helyi adagolás hatékonysága. Célunk az volt, hogy összehasonlítsuk a diklofenak-hidrogél behatolási tulajdonságait a szinoviális folyadékba különböző beadási módszerek után, és megbecsüljük a fájdalomcsillapító és gyulladáscsökkentő reakciókat orális és helyi gyógyszerbeadás után, standardizált, patkány térdízület carrageenan-kaolin (C/K) injekció által kiváltott monoarthritisében.

Végső célunk a protézisbeültetés jelenlegi újításainak vizsgálata volt az arthrosis operatív kezelésében. Ezért metaanalízist végeztünk a TKA kimenetelének összehasonlítására HA bevonattal ellátott és nem HA bevonattal ellátott protézis szárak felhasználásával. A fő cél a jelenlegi tudás frissítése és a tibialis komponens rögzítésének minőségével kapcsolatos adatok bizonyítékainak összehasonlítása volt, amelyeket TKA-ban radiosztereometriás analízissel (RSA) értékelték: HA bevonatú cement nélküli protézissel, vagy bevonat nélküli cement nélküli vagy cement rögzítéssel. Az RSA képes pontosan mérni a szár korai migrációját, és a maximális teljes elmozdulást (maximum total point motion, MTPM), amely a mikromozgások 3-dimenziós vektora és vizsgálatunk elsődleges kimeneti eredményeként a jövőbeli lazulás prediktív értékét adja meg. A másodlagos kimeneti eredményként a TKA-ek klinikai eredményei voltak, beleértve a Knee Society score-t (KSS) és a Knee Functional Score-t (KFS), amelyek validált pontozási rendszerek a páciens mindennapi életben való működésének mérésére és a fájdalom nagyságának megítélésére.

### **3. ANYAGOK ÉS MÓDSZEREK**

#### **3.1. Az I. tanulmány protokollja**

Monocentrikus, prospektív klinikai vizsgálatot végeztünk a Szegedi Tudományegyetem Traumatológiai Klinikáján, ami egy I-es szintű traumaközpontnak számít, 2019. szeptember 1. és 2020. november 30. között. Az adatokat olyan felnőtt (18 évesnél idősebb) betegektől gyűjtöttük, akik tájékoztatást követően aláírták a beleegyező nyilatkozatot, és nyílt vagy artroszkópos térd- vagy csípőízületi műtétet kaptak. A résztvevőket RA, OA és kontroll

csoporthoz soroltuk orvosi dokumentációik, a reumás ízületi gyulladás osztályozás kritériumai (2010. évi American College of Rheumatology / European League Against Rheumatism (ACR / EULAR)) és a Kellgren-Lawrence (KL) besorolás alapján.

A mitokondriális funkciók vizsgálatához, valamint a biokémiai és szövettani elemzéshez szükséges szinoviális folyadék- és szövetmintákat RA, OA és kontroll betegektől intraoperatív módon vettük a betegek engedélyével és aláírt beleegyezésével.

### **3.1.1. Mitokondriális funkció és citokrom c felszabadulás mérése**

A szövetmintákat 200 µl MiRO5 respirációs médiumban homogenizáltuk, majd ebből 50 µl-t a szobahőmérsékleten 200 nmol / ml oxigénkoncentrációra kalibrált detektáló kamrákba helyeztük. Szubsztrátnak glutamátot (10 mM) és malátot (2 mM), szukcinátot (10 mM), ADP-t (5 mM), inhibitorokként rotenont (0,5 µM) és oligomicint (1 mM), szétkapcsoló szernek pedig karbonil-cianid p-trifluor-metoxi-fenil-hidrazint (FCCP) (0,5 µM) adtunk a respirációs médiumhoz. A belső mitokondriális membrán épségét citokrom C (10 µM) hozzáadása után értékeltük.

**3.1.2. Gyulladásos enzimaktivitás és citokintermelés** A szöveti xantin-oxidoreduktáz (XOR) és a mieloperoxidáz (MPO) aktivitást, valamint a szabad nitrotirozint, mint a peroxinitrit-képződés markerét és a gyulladásos citokin (TNF $\alpha$ , RANKL) szinteket enzimhez kapcsolt immunszorbens vizsgálattal mértük (ELISA)

### **3.1.3. Szövettan**

Az intraoperatíván összegyűjtött szinovium biopsziákat konfokális lézer-pásztázó endomikroszkóppal (CLSM) és hagyományos szövettannal is vizsgáltuk a résztvevők vizsgálati csoportokhoz való megfelelő hozzárendelésének igazolása érdekében.

## **3.2. A II. tanulmány protokollja**

Ezt a vizsgálatot három kísérleti sorozatban hajtottuk végre. Az első kísérleti sorozat célja a helyileg alkalmazott vagy EP-val bevitt topikális diklofenak szérum- és szinoviális koncentrációinak értékelése nagy teljesítményű folyadékkromatográfiával (HPLC).

A második kísérletsorozatban a szinoviális mikrokeringés gyulladással kapcsolatos változásait közvetlenül vizsgáltuk intravitális videomikroszkóppal (IVM). Az állatokat négy csoportra osztottuk a diklofenak beadási módja szerint: per os diclofenak bevitel az 1. csoportban (n = 6), a 2. csoportban helyi vagy más néven topikálisan alkalmazott diklofenak gél és a 3. csoportban az EP-vel kombinált topikális diklofenak gél (n = 6). A 4. csoport per os sóoldattal kezelt kontrollként szolgált. A kezeléseket mindig 2 órával az ízületi gyulladás indukálása előtt és 2 órával azután alkalmaztuk.

A harmadik kísérleti sorozatban összehasonlítottuk a diklofenak kezelés módszereinek hatékonyságát a fájdalomérzetre és a gyulladással járó ödéma képződésére C / K indukálta ízületi gyulladásban. Az állatok fent említett kezelési csoportjaiban a kezeléseket naponta kétszer (12 óránként) alkalmaztuk. A fájdalomérző teszteket 24 órával a C / K injekció után végeztük, míg a térdízület duzzanatát az ödéma kialakulásának csúcsán 48 órával az ízületi gyulladás kiváltása után értékeltük. Ízületi mosófolyadékot és szinovium szövetmintákat gyűjtöttünk biokémiai mérésekhez és szövettani vizsgálatra.

### **3.2.1. Arthritis indukció**

Az arthritis indukciójához 2%  $\lambda$ -karragenin és 4% kaolin (C / K) fiziológiás sóoldatban készült keverékéből 75  $\mu$ l mennyiséget adtunk a jobb térdízületbe. Az ellenoldali térdet fiziológiás sóoldattal injektáltuk. A C / K ezen intraartikuláris injekciója az osteoarthritisre emlékeztető akut monoarthritis közismert modellje. Ebben a modellben az ízületi gyulladást valószínűleg a szinovium belső felületének mechanikai károsodása indítja el, amely gyulladással járó választ indirekt módon indukál a szinoviális barrier endotheliális oldalának aktiválására.

### **3.2.2. Elektroporációs protokollok**

Az EP-kezelést Mezoforte Duo Mez 120905-D műszerrel hajtottuk végre. 230  $\mu$ l diklofenak-hidrogélt használtunk, és az EP kezelési ideje 8 perc volt.

### **3.2.3. Diklofenakot tartalmazó hidrogél készítmény és HPLC mérések**

A hidrogélt a következő eljárással állítottuk elő. 5 tömeg% diklofenak-nátriumot feloldunk tisztított víz keverékében, és ehhez az oldathoz 30 tömeg% etanolt és 2 tömeg% hidroxipropilmetilcellulózt adunk. A szinoviális mosófolyadék és a plazma minták diklofenak-tartalmát Agilent HPLC rendszerrel analizáltuk, amely automatizált oldószeradagoló rendszerrel volt felszerelve.

### **3.2.4. Nociceptív tesztek és térdízületi duzzanat (morfológiai értékelés)**

A mechanikus túlérzékenységet plantáris aesthesiométerrel határoztuk meg, és mancsvisszahúzási küszöbként fejeztük ki. Termikus túlérzékenységet a mancsvisszahúzási teszttel Hargreaves készülék segítségével detektáltunk. A kiindulási méréseket az ízületi gyulladás kiváltása előtt, míg a gyulladás kialakulását a fájdalomérzékenység csúcsán, 24 órával a C / K injekció után végeztük. Az ízületi gyulladást az ízületek átmérőjének változása jellemezte 48 órával a C / K injekció után. Az anteroposterior és a mediolaterális átmérőket tolómérővel határoztuk meg, és kiszámítottuk a térdkeresztmetszet területét.

### **3.2.5. Intravitális videómikroszkóp (IVM) vizsgálatok**

A gyulladássos szinoviális mikro környezetben a posztkapilláris endothel sejteken az adhézios molekulák jelenléte megfelelő bizonyítékként szolgál a gyulladás becsléséhez. Ezeket a reakciókat az IVM kvantitatív módon értékelheti, és a különféle terápiás beavatkozások hatékonysága objektíven is megítélhető. A szinoviális mikrocirkulációt fluoreszcens IVM segítségével vizsgáltuk, míg a szinoviális membránt 37°C-os fiziológias sóoldattal szuperfundáltuk. Az vörösvértesteket fluoreszcens izotiocianáttal jelöltük, a leukocitákat pedig rodamin-6G-vel festettük.

### **3.3. Protokoll a III. Tanulmányban.**

Szisztematikus szakirodalmi keresést végeztünk a MEDLINE, a Scopus, az EMBASE és a Cochrane Library adatbázisok felhasználásával 2019. május 31-ig bezáróan. Az beválasztási kritériumok szerint 11 randomizált kontrollált vizsgálatot (RCT) vontunk be a végső elemzésbe, amelyben 902 beteg kapott első TKA-t. Az elsődleges kimeneti eredmény a tibialis komponens MTPM-je volt. Ezt a paramétert radioszterometriás elemzéssel határoztuk meg, ami a protézis száruk migrációs mintázatára utal. Az implantált ízületek klinikai eredményeit a KSS és a KFS segítségével értékeltük. A Cochrane Risk of Bias eszközt alkalmaztuk az elfogultság kockázatának felmérésére az egyes vizsgálatok során.

### **3.4. Statisztikai analízis**

Az I. vizsgálatban a statisztikai elemzést a SigmaStat 13.0 statisztikai szoftverrel végeztük. Tukey próbával egyirányú ANOVA-t használtunk, és az adatokat átlag  $\pm$  SD-ként fejezzük ki.  $P < 0,05$  statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

A II. Vizsgálatban az adatok elemzését az SPSS 17.0 szoftverrel végeztük. A változók változását a csoportokon belül és a csoportok között kétirányú ANOVA-val elemeztük, majd ezt követte a Holm – Sidak teszt. Az összes adatot átlagként  $\pm$  az átlag szórása (SD) fejeztük ki. A  $< 0,05$  P értékeket statisztikailag szignifikánsnak tekintettük.

A III. Vizsgálatban a statisztikai elemzést a Stata 15 SE (Stata Corp) alkalmazásával végeztük. A folytonos változók 95% -os CI-mal (konfidenciaintervallummal) összesített súlyozott átlagkülönbségét (weight mean difference, WMD) számoltuk. Véletlenszerű hatás modellt alkalmaztunk minden elemzés során DerSimonien-Laird becsléssel.

## **4. EREDMÉNYEK**

### **4.1. I. tanulmány**

Összesen 528 betegnél végeztek csípő- vagy térdízületi műtétet 2019. szeptember 1. és 2020. november 30. között a Szegedi Tudományegyetem Traumatológiai Tanszékén. A



bevonási kritériumok 71 esetben teljesültek, ezek közül 17 beteg szenvedett RA-ben és 31 OA-ban. A kontroll csoport 23, 40 évnél fiatalabb betegből állt, akiknek anamnézisében nem volt OA, és akiknek trauma miatt műtétre volt szükségük.

#### **4.1.1. Mitokondriális funkcionális mérések**

A mitokondriális légzési funkciók változását glutamát és malát vagy szukcinát jelenlétében értékeltük, hogy megkülönböztessük az I-es és a II-es komplex-alapú aktivitást. Az ízületi gyulladásos csoportok szignifikánsan csökkent C I aktivitást mutattak a kontroll csoporthoz képest telített mennyiségű ADP jelenlétében. Ezenkívül az RA csoport OxPhos kapacitása szignifikánsan csökkent az OA csoporthoz képest is. A légzési kontroll arányt (RCR) és a kapcsolás szabályozási arányt (CCR) definiáltuk az elektronátviteli lánc kapcsolásának változásainak számszerűsítésére. A kontroll csoporthoz képest a Complex I alapú RCR és a CCR egyaránt jelezte az elektrontranszfer lánc jelentős károsodását az RA csoportban. A vizsgálati csoportok között azonban nem találtak szignifikáns különbséget a C II-vel kapcsolatos légzési aktivitásban, RCR és CCR-ben. Az OA csoport szignifikánsan magasabb Complex I-alapú választ mutatott az exogén citokróom c-re, míg az RA csoportban mind a Complex I-, mind a Complex II-vel kapcsolatos aktivitás szignifikánsan megnőtt.

#### **4.1.3. Gyulladásgátló citokinek és oxidoreduktív stressz markerek**

A RANKL koncentrációja szignifikánsan megnőtt az RA csoportban a kontroll csoporthoz képest, míg a TNF- $\alpha$  szintek az RA csoportban szignifikánsan magasabbak voltak nemcsak a kontroll csoporthoz, de az OA csoporthoz képest is. Jelentősen magasabb XOR aktivitást mértek RA és OA betegek szinoviális membrán homogenizátumaiban a kontroll csoporthoz képest. Az RA betegek szinoviális szövetei szignifikánsan magasabb MPO aktivitást mutattak az OA betegek és egészséges egyének szinoviális szöveteihez képest. Jelentős különbség mutatkozott az MPO aktivitásában az OA és a kontroll csoport között is. Az RA csoportban a nitrotirozin szignifikánsan emelkedett az OA, mind a kontroll csoporthoz képest.

#### **4.1.5. Szöveti vizsgálat**

CLSEM és H&E festést alkalmaztunk a résztvevők vizsgálati csoportokhoz való megfelelő besorolásához. A szöveti értékelést két vizsgáló (P. J. és P. H.) egymástól függetlenül és vakon végezte el a kódolt tárgylemezeken, egy korábban leírt 0–4 fokozatú szöveti pontrendszer alkalmazásával, amelyben az angiogenezis és a fibrózis mértékének együttesét értékelik. Ezenkívül a H&E-nal festett metszeteken megvastagodott szinoviális membrán és fokozott limfocita infiltráció volt látható az OA-ban szenvedő betegek

mintáiban. Fokozott limfocita infiltráció, angiogenezis, sőt egyes esetekben nagy kiterjedésű fibrózis is megfigyelhető volt az RA mintákban.

## **4.2. II. tanulmány**

### **4.2.1. A plazma és a szinoviális diklofenak koncentrációja**

A diklofenak plazma- és szérumkoncentrációja a legmagasabb volt az EP-kezelés után 10 perccel; ezután 30 percnél csökkentek, 60 és 120 percnél állandóak maradtak. Az EP – kezelést követően szignifikánsan magasabb plazma diklofenak szintet mértünk, mint 10 perccel az egyszerű topikális alkalmazás után. Az EP-kombinált topikális alkalmazást követően az ízületi folyadék és a plazma diklofenak tartalmában nem volt szignifikáns különbség. Ugyanannyi idő elteltével az egyszerű topikális alkalmazás azonban nem eredményezett kimutatható diklofenak tartalmat a szinoviális folyadékban.

### **4.2.2. Intravitális videomikroszkóp (IVM)**

Meghatároztuk a polimorfonukleáris sejt (PMN) – endoteliális kölcsönhatásokat (gördülő és tapadó) a szinoviális membrán poszt-kapilláris venuláiban. A PMN-ek gördülő frakciója a poszt-kapilláris szinoviális venulákban nagyfokú diszperziót mutatott, és nem észleltek kiindulási különbségeket a C / K- és sóoldattal injektált térdek, illetve a kezelési protokollokban résztvevő csoportok között (az adatokat nem közöljük). A C / K injektálásával azonban a PMN adhézió (tapadás) statisztikailag szignifikáns növekedése kísérte az endoteliális réteget a kontroll oldallal összehasonlítva. Ez a reakció jelentősen csökkent az orális diklofenak beadásával. Ezt a diklofenak-hidrogél EP-kezeléssel azonban csak mérsékelten javította, és a hidrogél egyszerű topikális alkalmazására adott válasz nem változott.

### **4.2.3. Gyulladásos enzimaktivitások és citokintermelés**

A XOR és MPO aktivitás, valamint a TNF- $\alpha$  koncentráció szignifikánsan megnőtt az ízületi gyulladás indukciója után, a sóoldattal injektált térdízülethez képest. Ezek az értékek hasonló mértékben, szignifikánsan csökkentek az orális diklofenakkal és az EP-vel fokozott topikális diklofenakkal kezelt csoportokban, azonban a hagyományos topikális bevétel nem befolyásolta a arthritisben megnövekedett MPO aktivitást.

### **4.2.4. Fájdalmérző tesztek és a gyulladásos ödéma**

Az ízületi gyulladás indukciója után a mechanikus túlérzékenység jelentősen fokozódott, mivel a C / K-nal injektált végtagok alacsonyabb kiváltási ingerre reagáltak, mint a sóoldattal injektált kontroll állatok végtagjai. Ez a paraméter szignifikánsan csökkent az orális és az EP által fokozott topikális diklofenak kezelés hatására. A sóoldattal kezelt csoportban a termikus

túlérzékenység latenciája szignifikánsan csökkent a sérült lábon (kisebb hőhatásra és gyorsabban mancsvisszahúzással reagált), az orális és az EP által fokozott topikális diklofenak-kezelés pedig hasonló védőhatást váltott ki mint a mechanikus túlérzékenységi teszt esetén.

A térdkeresztmetszet a C / K-injekcióval kezelt térdekben 48 órával a provokáció után jelentősen megnövekedett, de jelentősen csökkent mind a hagyományos topikális, mind az EP-vel fokozott topikális diklofenak-kezelés után is. Orális diklofenak alkalmazás a duzzanatot a sóoldattal befecskendezett kontroll térdekhez hasonlóan csökkentette.

#### **4.2.5. A diklofenak bevitelének káros hatásai**

A diklofenak bevitelének káros hatásait a gyomorra, a gyomornyálkahártya fekélyeinek planimetrius elemzésével értékeltük. A helyileg, topikálisan alkalmazott diklofenak EP-vel vagy anélkül nem volt káros hatással a gyomor nyálkahártyájára; az orális diklofenak ekvivalens dózisa azonban az állatok 70%-ában fekélyképződést eredményezett. A gyomorfekélyek a patkány gyomrában változó helyeken voltak, és csak enyhe elváltozásokat, például ödémát, irritációt és petechia képződést észleltünk.

### **4.3. III. tanulmány**

Tizenegy RCT-t vontunk be a kvantitatív elemzésbe, amelyben a HA-tal bevont tibialis szárral rendelkező TKA-eket összehasonlítottuk a többi tibialis rögzítési módszerrel (cementált és cement nélküli protézis). Minden vizsgálat homogén volt a demográfiai jellemzők tekintetében.

#### **4.3.1. Radiológiai kimenetel**

Elsődleges eredmény ebben a metaanalízisben a tibialis szár MTPM-je volt, amelyet 2 éves utánkövetésnél elemeztünk. A magasabb MTPM az implantátum kisebb stabilitásával jár, 0,2 mm-es cut-off érték mellett. Ennek megfelelően, ha az MTPM meghaladja a 0,2 mm-t, a protézist instablnak minősítik, ami nagymértékben növeli az egyéb szövődmények, például az aszeptikus lazulás valószínűségét. Ha az MTPM kisebb, mint 0,2 mm, a protézis hosszú távon stabilnak tekinthető. Tizenhárom vizsgálatot vontunk be az MTPM elemzéséhez. Az eredmények azt mutatták, hogy a HA bevonatú cement nélküli száruk MTPM értéke szignifikánsan alacsonyabb, mint a nem cementált száruké (WMD = 0,28, 95% CI: 0,01 - 0,56, P = 0,045). Ha a HA bevonattal ellátott implantátumokat összehasonlítottuk a cementált protézisekkel, ez utóbbi alacsonyabb MTPM-t mutatott (WMD = -0,29, 95% CI: -0,41-0,16, P <0,001).

#### **4.3.2. Klinikai eredmények**

Másodlagos eredmények a KSS és a KFS pontszámai voltak. 4 RCT-t vontunk be a klinikai elemzésbe. Az eredmény azt mutatta, hogy a HA bevonatú cement nélküli protézisek KSS-je nem szignifikánsan magasabb a cement nélküli csoporthoz képest (WMD = -0,64, 95% CI: -3,02-1,73, P = 0,596).

Érdekesség, hogy a HA bevonatú cement nélküli és cementált protézis KSS-jében nem volt statisztikailag szignifikáns különbség (WMD = -0,29, 95% CI: -2,27-1,69, P = 0,775). Hasonló eredmények érhetők el a vizsgálatok KFS elemzésével, azonban ezeknek az értékek korlátozott, mivel a HA-tal bevont és a cement nélküli csoportok összehasonlítása hiányos. Nem volt megfigyelhető különbség a HA bevonatú cement nélküli és cementált implantátumok között (WMD = -4,95, 95% CI: -13,59-3,69 P = 0,069). Azonban a HA-tal bevont és a cement nélküli csoportok összehasonlítását nem lehetett elvégezni a cement nélküli csoportban végzett vizsgálatok alacsony száma miatt. A KSS adatai a funnel plot ábrán láthatók, de sajnos nem tudunk lefuttatni rajta Egger tesztet.

## 5. DISZKUSSZIÓ

### 5.1. Különböző mitokondriális funkciók az RA és OA betegek szinoviájában

Ez a tanulmány kvantitatív klinikai adatokat szolgáltat a mitokondriális eltérésekről RA-ban és OA-ban. Ahhoz, hogy a résztvevőinket megfelelően el tudjuk osztani a különböző vizsgálati csoportjainkba, a gyulladással állapotok jelenlétét vagy hiányát a pro-inflammatorikus citokinek mérésével erősítettük meg pácienseink szinoviális folyadékmintáiban. Ezen kívül az RA és OA szövettani jellemzőinek demonstrálására a szinoviumot *in vivo* CLSEM-el valamint hagyományos szövettannal vizsgáltuk. Eredményeink megfeleltek a szakirodalomban leírtakkal, mivel az RA betegeknél szignifikánsan magasabb volt a pro-inflammatorikus citokinek szintje, a ROS termelő enzimek aktivitása, és hisztopatológiai szempontból krónikus gyulladás, neoangiogenesis és fibrosis jelei voltak láthatóak.

A vizsgált csoportokban az ETC komplexek kapacitását HRR-rel teszteltük. Érdekes, hogy a C I aktivitás erősen csökkent az RA csoportban, míg a C II aktivitásban csoportok között nem volt szignifikáns különbség. Ez az eredmény rávilágít az RA mitokondriális diszfunkciójában a C I központi szerepére, és a jövőbeni RA terápiák fő célkitűzésévé téve ezt. A C I a légzési lánc első, legnagyobb és legbonyolultabb alkotóeleme. Továbbá, mivel a légzési lánc elektronjainak fő bejutási pontja, a C I-t tekintik a teljes mitokondriális légzés sebességkorlátozó tényezőjének. Ezenkívül jelentős mitokondriális eredetű ROS-szintet

generál, különösen a reverz elektron transzport során. A RA-ban szenvedő betegekkel összehasonlítva az OA csoport tagjai enyhébb, de még mindig figyelemre méltó csökkenést mutattak a C I aktivitásban a kontroll csoport egészséges egyéneihez képest. Ismételten nem jelentkezett jelentős hiány a C II aktivitásban.

## **5.2. A diklofenak EP térdízületbe történő bejuttatásának jótékony hatásai**

Tanulmányunk során bizonyítottuk, hogy az EP képes fokozni a diklofenak transzdermális bejuttatását a térdízületbe, kísérletes körülmények között kiváltott ízületi gyulladás esetén, patkányban. Az EP-vel kombinált topikális bevitel fájdalomcsillapító hatása összehasonlítható mértékű volt a diklofenak orális alkalmazásával. Ez csökkent fájdalomérzékenységet, csökkent ízületi duzzanatot és az ízületi folyadék alacsonyabb citokin koncentrációjában mutatkozott meg, valamint alacsonyabb gyulladásos enzimaktivitásban a szinoviális szövetben. Az EP kezelés befolyásolta a PMN – endothelialis kölcsönhatások számát a szinoviális mikrocirkuláció szintjén is.

Az irodalmi adatoknak megfelelően eredményeink feltárták, hogy az EP magasabb szérumkoncentráció-értékeket okoz, mint az egyszerű helyi alkalmazás. Az EP-kombinált kezelésnél a szinoviában a diklofenak koncentrációja megegyezett a szérumkoncentrációval; a hagyományos helyi kezelés azonban nem eredményezett kimutatható mennyiségű diklofenak-nátriumot az ízületi folyadékban.

A mikrocirkulációs változásokat IVM-val vizsgáltuk. A többi nem szelektív ciklooxygenáz inhibitorhoz hasonlóan a diklofenak is csökkenti a PMN – endothelialis kölcsönhatások számát. A szinoviális erek tapadása jelentősen csökkent a diklofenak orális alkalmazásával. Az EP-dúsított diklofenak-hidrogél azonban ezt csak mérsékelten javította, és a hidrogél egyszerű topikális alkalmazására adott válasz nem változott.

A C / K injekció beadása a térdízületbe elsődleges és másodlagos túlérzékenységet eredményezett. A mancs nyomásérzékenysége másodlagos túlérzékenység miatt alakult ki a hő és a mechanikai ingerek hatására, a gyulladt térdízület felett viszont elsődleges túlérzékenység volt jelen. A másodlagos túlérzékenységi reakciókat az ízületi gyulladás csúcspontján vizsgáltuk, és mindkettő szignifikáns enyhülést mutatott a diklofenak-kezelés következtében. Az orális diklofenak kezeléshez hasonlóan az EP teljesen visszaállította a termikus fájdalomérzékenységet és a megnövekedett mechanikai érintési érzékenységet, de csak kisebb mértékben. A térd-duzzanat, amely az ízületi gyulladás objektív paramétere, jelentősen csökkent, mind az orális, mind az EP-vel kombinált diklofenak-kezeléssel. Ez a

megnövekedett térfogat 48 órával az ízületi gyulladás kiváltása után ismét szignifikánsan csökkent mind az orális, mind az EP-vel kombinált diklofenak-kezelésnél.

Klinikai körülmények között kimutatták a szabadgyökök képződését az ízületi folyadékban és az ízületi membránban, valamint az ízületi rendellenességek kiváltó okának javasolták. Az arthritises szinoviumban fokozott XOR aktivitást mind az orális, mind a topikális diklofenak bevitel csökkentette, ez utóbbi esetén az EP kezelés fokozottabb mértékben. Az IVM-el meghatározott PMN – endoteliális interakciók közül a PMN kitapadásra vonatkozó adatok jól korreláltak a PMN-ek szöveti felhalmozódásával, amelyet az MPO-aktivitás jellemez. A diklofenak-kezelés orális vagy EP kombinált topikális alkalmazás útján is csökkentette az MPO-aktivitást a gyulladt szinoviális szövetben.

### **5.3. A HA bevonatú implantátumok jobb rögzítést biztosítanak a TKA-ban**

Tanulmányunkban áttekintettük a jelenlegi bizonyítékokat és frissítettük az ismereteket a HA-tal bevont tibialis szár használatáról az elsődleges TKA beültetés esetében. A kezelési csoportok homogének voltak a betegek jellemzőit tekintve, így a protézis beültetésénél az elsődleges és a másodlagos kimeneti eredmények (azaz az MTPM, valamint a KSS és a KFS) előrejelzése valószínűleg független volt az egyéni kockázati változóktól, a beteg kiválasztásától vagy a csonttrikulás általános súlyosságától. Direkt metaanalízist végeztünk, amiben a tanulmányok mintanagysága elég nagy volt ahhoz, hogy jó bizonyítékot szolgáltatasson arra, hogy a HA-bevonat jobb stabilitást eredményez, mint más, cement nélküli protézisek. A protézis szárak cementrögzítése azonban még mindig nagyobb stabilitást ad a migráció ellen. Ennél is fontosabb, hogy a HA-bevonatos protézisszárak a cementált protézissel megegyező funkcionális eredményt nyújtanak a fájdalomintenzitás, a mozgástartomány és a mobilitás szempontjából.

Vizsgálatunk elsődleges kimeneti eredményének az RSA-val meghatározott MTPM-et tekintettük, ami megadja a tibialis protézisszár bármely pontján a mikromozgások legnagyobb 3 dimenziós migrációját. A bevont tanulmányokban a migrációs mintát legalább 2 posztoperatív követési pillanatban határozták meg az utánkövetés első 2 évében. Az MTPM főleg olyan mechanikai tényezőktől függ, mint a csont-implantátum határfelülete vagy a határfelületen lévő különböző biológiai reakciók, ezért az implantátum felületén a HA-bevonat hozzáadott értékének felmérésére egy megbízható paraméter.

A metaanalízisünkben szereplő RCT-k esetén az MTPM kisebb mértékű volt a HA bevonatú implantátumok esetén, összehasonlítva azokat más, nem cementált szárakkal, egy tanulmány kivételével. Ami a HA bevonatú cement nélküli és cementált csoport

összehasonlítását illeti, az MTPM nagyon kis mértékű volt a cementált csoportban, és alacsonyabb előfordulási gyakoriságot mutatott, mint a HA bevonattal ellátott cement nélküli protézis. A protézisszárak funkcionális eredményeit a KSS és KFS alapján hasonlítottuk össze. Ezek az értékelési rendszerek validált és érzékeny módszerek a TKA utáni objektív és szubjektív eredmények értékelésére. A KSS egy súlyozott pontszám, amely figyelembe veszi a fájdalom intenzitását, a mozgástartományt, a stabilitást, a flexiós deformitásokat, a kontraktúrákat és a gyenge illeszkedést. A KFS figyelembe veszi a páciens mobilitási paramétereit, például a gyaloglási távolságot és a lépcsómászást, levonva ebből a járást segítő eszközöket. Metaanalízisünk során a klinikai eredmények alapján a KSS és a KFS tekintetében a HA bevonatú cement nélküli és cementált implantátumok azonos funkcionalitást mutatták.

## **6. AZ ÚJ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA**

Eredményeink alátámasztották a mitokondrium szerepét az OA és RA patomechanizmusában. Először kimutattuk, hogy a klinikai kép hasonlósága ellenére a mitokondriális diszfunkció lényegesen különbözik OA-ban és RA-ban. Bemutattuk az I komplex meghatározó szerepét és az ETC integritásának zavarát a belső mitokondriális membránban.

Az ízületi gyulladás konzervatív kezelésében az EP-val egy hatékonyabb gyógyszerbeviteli módot mutattunk be. Alátámasztottuk az EP-kombinált transzdermális diklofenak-nátrium bevitel közvetlen hatását a szinoviális mikrocirkulációra, amit a leukociták csökkent gördülése és kitapadása bizonyított. A biokémiai vizsgálatok során a diklofenak hatékony szövetkoncentrációt ért el a szinoviumban, mivel a gyulladásos enzimaktivitások csökkentek. Összefoglalva, az EP által fokozott transzdermális diklofenak-nátrium-bevitel csökkentette a mikrokeringés romlását és a szöveti gyulladás egymást követő szakaszait; ezért ez a beviteli mód egy új fejlesztési irányt mutathat ízületi gyulladás terápiás stratégiáiban.

Az implantátumok eredményeinek áttekintése a rendelkezésre álló legjobb bizonyítékot szolgáltatja arra vonatkozóan, hogy a HA bevonatú cement nélküli protézis mind a stabilitás, mind a funkcionalitás tekintetében felülmúlja a többi cement nélküli protézist. A protézisek cementált rögzítése biztosítja a legjobb stabilitást egy 2 éves utánkövetés során, azonban a funkcionális eredmények nem jobbak, mint a HA bevonatú cement nélküli rögzítésnél. Ezen eredmények alapján a HA bevonatú cement nélküli TKA ajánlott kezelési lehetőség a térd

ízületi gyulladásának végstádiumában. Így a klinikusok a betegek bevonásával figyelembe tudják venni a revízió kockázatával járó tényezőket a legmegfelelőbb eljárás kiválasztásakor.

## **7. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS**

Hálás vagyok Dr. Varga Endre Professzor Úrnak, aki bevezette tudományos pályafutásomat, és lehetőséget biztosított számomra, hogy értékes tudományos irányításával és közreműködésével végezhessem tudományos munkámat a Sebészeti Kutató Intézetben. Köszönettel tartozom Dr. Hartmann Petrának, aki segített az alapvető kísérleti készségek elsajátításában, és napi korlátlan segítséget nyújtott a tanulmányok elvégzésében és a publikációk megírásában. Hálás vagyok továbbá Dr. Jávor Péternek és Jász Kurszán Dávidnak, Csonka Endrének, akik kutatómunkámat a nagy felbontású respirometrikus elemzésben irányították. Köszönetet mondok a Sebészeti Kutató Intézet minden technikusának, hogy stabil háttérrel biztosítottak a kísérletekhez és a biokémiai vizsgálatokhoz.