

**Hosszú csöves csontok periosteumának mikrokeringési vizsgálata.
Az ösztrogénhiány következményei.**

Dr. Pócs Levente

Ph.D. Tézis

Multidiszciplináris Doktori Iskola

Témavezető: dr. habil. Szabó Andrea Ph.D.

Sebészeti Műtéttani Intézet

Szegedi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar

Szeged

2019

1. Bevezetés

Részben fontos nutritív funkciói, részben pedig magas őssejt és osteoprogenitor sejt tartalma folytán a periosteum jelentős hatással bír a csontregenerációs folyamatokra. A periostealis mikrokeringés helyreállítása tehát nélkülözhetetlen feltétele a csontos gyógyulási folyamatoknak ortopédiai és traumatológiai műtéteket, valamint a fogászati beavatkozásokat követően. A sejtes szintű differenciálódás elindítása révén a periosteumnak (az endosteumhoz hasonlóan) fontos szerepe van a csontregenerációban és csont újjáépülésben (remodelling) mind a hormon-függő, mind pedig a trauma által kiváltott osteoporosis eseteiben is. Az axiális csontrendszer csontjai (mint például az állkapocscsontok) és a végtagok hosszú csöves csontjai között ugyanakkor különbségek fedezhetők fel nemcsak a vérellátás vagy a csontgyógyulás jellemzőit illetően, hanem az osteoporosis kialakulása és a különböző kezelésekre (pl. biszfoszfonátok) adott válaszok vonatkozásában is. Ezen reakciók a periosteum mikrokeringési funkcióival is összefüggésben állhatnak. A periosteum mikrokeringési vizsgálatainak azonban jelentős metodikai limitációi vannak. Ezért a Tézis első részében a csonthártyát érintő mikrokeringési vizsgálatok legfontosabb aktuális eredményeit foglaltuk össze, összegezve a jelenleg rendelkezésre álló módszertani lehetőségeket és modelleket a különböző anatómiai lokalizációjú csontok periostealis reakciói vonatkozásában.

A mindennapi ortopédiai/traumatológiai gyakorlatban a végtag átmeneti vértelenségét rendszerint érleszorítás (pl. tourniquet) révén érjük el, ami azonban iatrogén ischaemiás reperfüziós (IR) károsodást okozhat. Az IR által kiváltott biokémiai és mikrokeringési változások a periostealis mikrokeringésre is hatással vannak és szisztémás gyulladással válaszreakciókat is kiválthatnak (többek között a keringésben levő polymorphonukleáris leukociták (PMN) aktivációja révén). A szövetek ischaemiás toleranciája azonban növelhető ischaemiás prekondicionálással (IPC), mely során a rövid, átmeneti ischaemiás periódusokat rövid reperfüziós fázisok követnek. A végtag IPC különösen jelentős terápiás előnnyel járhat idős betegeknél, hiszen az senilis osteoporosis következtében az idősökben megnő a csonttörések rizikója, így a tourniquet-ischaemia gyakorisága is. Az osteoporosis/osteopenia állatkísérletes modellezésére rendszerint kétoldali ovariectomiát (OVX) alkalmaznak. Korábbi vizsgálatok igazolták a hosszútávú ösztrogén (E2) pótlás kedvező hatását a PMN reakcióra és a TNF-alfa felszabadulásra, azaz az E2 (a már jól ismert osteoporotikussal együtt járó töréskockázat csökkentő hatásain túl) védelmet nyújthat az IR gyulladással szemben is.

Biszfoszfonátok (BIS) széles körben használatosak osteoporosis és csontáttétes daganatok eseteiben az osteoclast aktivitást és a csontlebontást gátló, valamint az osteoporosis által kiváltott csontdenzitás csökkenést mérséklő hatásuk miatt. A BIS kezelés azonban eltérő hatásokat vált ki a tibia és a mandibula törést követő korai gyógyulási folyamat során, amely hatások a késői callus képződés és csontremodelláció, illetve kóros angiogenesis formájában jelennek meg. Ezen túlmenően csontnecrosis is előfordulhat különösen nitrogén tartalmú BIS vegyületek esetében, például a zoledronsav (ZOL) adását követően. Erre legjellemzőbb példa az állcsont osteonecrosis. Korábban a kutatócsapatunk már kimutatta, hogy a BIS gyulladásozó reakciót vált ki a mandibula periosteumában fogeltávolítást követően, miközben a tibiális régió mikrokeringése érintetlen marad.

2. A kutatás fő célkitűzései

Jelen kutatásunk fő célja a helyi (periostealis) mikrokeringési és a szisztémás gyulladásozó változásokat vizsgálata és befolyásolása volt átmeneti alsó végtagi ischaemia során. Az alábbi magas klinikai relevanciájú, az idősebb, osteoporosisban szenvedő betegeket érintő problémákat vizsgáltuk:

- Korábban már kimutatták az IPC védő hatásait a végtagi ischaemia-indukálta IR káros következményeivel szemben. Jelen kísérleteinkben azt megvizsgáltuk, hogy az IPC-nek érvényesülnek-e gyulladásozókentő hatásai krónikus ösztrogén hiány esetén végtag IR során és hogy az ösztrogénpótlás miként módosítja a periostealis mikrokeringési reakciókat. Ezért az IPC következményeit a helyi periostealis illetve a szisztémás gyulladásozó reakciókra krónikus ösztrogénhiányban illetve ösztrogénpótlás mellett vizsgáltuk hátsó végtag IR során egy rágsáló modellben.
- A BIS kezelés klinikai indikációja széles skálán mozog, így többek között osteoporosisban is használatos, ugyanakkor a terápia súlyos szövödményekkel jár bizonyos csontokban (például osteonecrosis okoz az állcsontokban). A következő célunk tehát annak vizsgálata volt, hogy a krónikus BIS kezelés miként befolyásolja a végtag ischaemia következményeit (a lokális periostealis mikrokeringési reakciókat a tibiában és a szisztémás gyulladásozó jelenségeket) egy klinikailag releváns osteoporosis modellben, krónikus zoledronsav kezelés mellett.

3. Anyagok és módszerek

Két állatkísérletes tanulmányt végeztünk. Az első tanulmányban az OVX révén kiváltott ösztrogén hiány és a krónikus ösztrogén pótlás hatásait vizsgáltuk IPC hatékonyságára egy tourniquet ischaemia modellben. A második tanulmányban a krónikus BIS kezelés tibialis periosteum mikrokeringésre kifejtett hatásait vizsgáltuk végtag ischaemiában egy rövidebb OVX perioduson átesett patkányokban. Mindkét vizsgálat során 12 hetes (180g - 200g súlyú) nőstény patkányokat használtunk, melyeket véletlenszerűen osztottunk ovariectomizált, illetve álműtött csoportokba. Az standard bilaterális OVX műtétet anesztéziában (ketamin 25 mg/kg és xylazin 75 mg/kg kombinációja) végeztük.

3.1. Kísérleti sorozatok

I. Tanulmány

Az első tanulmányban krónikus ösztrogén kezelést indítottunk az OVX-en átesett állatok egy részénél 8 héttel OVX után 17béta-estradiol formájában (E2, Sigma, St. Louis, MO, USA, 5 nap/hét, subcután 20 µg/kg alkalmazásával), mely folytatódott további 5 héten át (a kísérleti protokoll végéig). A további OVX-nek kitett, illetve az álműtött állatok az E2 hordozóanyagát kapták (kukorica olaj 100%-os etanolban oldva).

Az *in vivo* vizsgálatok két nagy sorozatban történtek 13 héttel az OVX-et és álműtétet követően (a 25. héten) az állatoknak az alábbi 5 csoport valamelyikébe történt besorolását követően. A hordozóanyaggal kezelt állatokban 60 perces teljes alsó végtagi ischaemiának vetettük alá a proximalis femur körkörös leszorítása, valamint a femoralis artériára felhelyezett miniclipp segítségével, melyet 180 perces reperfúziós időszak követett 9 áloperált állatban (Sham+IR csoport) és 11 OVX állatnál (OVX+IR csoport). Két másik hordozóanyaggal kezelt csoportban 2 ciklus, 10 perces ischaemia/10 perc reperfúziót tartalmazó IPC-t indukáltunk, (Sham+IPC+IR csoport, n=9; OVX+IPC+IR csoport, n=9). Ez az IPC protokoll korábban hatékonynak bizonyult a helyi mikrokeringési és a szisztémás gyulladásos szövődmények mérséklése szempontjából hím patkányokban. Az összes E2-vel kezelt állatban a végtag IR-t IPC-vel kombináltuk (OVX+E2+IPC+IR csoport, n=6) és a vizsgálatok 18-24 órával az utolsó E2 injekciót követően kezdődtek. Ebben a sorozatban a periostealis mikrokeringést intravitális videómikroszkópiával (IVM) vizsgáltuk a kiindulási periódusban, majd 60 percenként a 180 perces reperfúziós periódus alatt.

Az első tanulmány második sorozatában a fentivel megegyező protokollt alkalmaztunk, de a gyulladásos citokin TNF-alfa plazma koncentrációját, a teljes vér szabadgyök tartalmát és a

keringő PMN-ek adhéziós molekula expresszióját vizsgáltuk (lásd fenti csoportok, n=6-9). Azért volt szükséges két külön sorozatban végezni a kísérleteket, hogy az IVM során használt fluoreszcens festékek és a flow citometria, valamint a luminometria során használt jelzéstechika közötti átfedéseket kiküszöböljük. Ebben a vizsgálati szériában a vizsgált kezdetekor, majd a reperfüziós fázis minden 60. percében végeztünk vérvételt. A protokoll végén periosteum mintákat vettünk RNS- és DNS-mentes körülmények között a periostealis ösztrogén receptor (ER) kifejeződés vizsgálata céljából, majd a mintákat -80°C -on tároltuk.

II. Tanulmány

A második tanulmány során krónikus ZOL kezelést indítottunk 16 állatban (OVX+BIS csoport) 5 héttel OVX-t követően (vagyis 17 hetes korban), és 14 áloperált állatban, melyek utóbbiak kontroll csoportként szolgáltak (Sham+BIS csoport). A ZOL kezelést (80 $\mu\text{g}/\text{kg}$ Zometa®, Novartis Europharm, Budapest, Hungary) hetente egy alkalommal végeztünk a farokvénába történt oltás révén, enyhe éteres bódításban. A többi OVX és áloperált állat fiziológiás sóoldatot kapott (OVX+hordozóanyag és Sham+hordozóanyag csoportok, n=16). Ezt heti rendszerességű oltások követték 4 héten át. A kísérleti protokoll végén (a 21. héten) az összes állatot 60 perces komplett alsó végtagi ischaemiának vetettük alá, melyet 180 perces reperfüziós periódus követett. A vizsgálatokat két kísérleti sorozatban végeztük. Az első szériában a periostealis mikrokeringést IVM segítségével vizsgáltuk a vizsgálat kezdetekor, illetve 60 percenként a 180 perces reperfüziós időszak során (n=7-9 csoportonként). A második sorozatban vérminta vételek történtek az a. carotis-ból a kísérlet kezdetekor, valamint 60 percenként a reperfüziós időszak alatt, melyekből a TNF-alfa plazma koncentrációjának, illetve a CD11b adhéziós molekula expressziójának változásait vizsgáltuk (n=7-7).

3.2. Mikrokeringési mérések

Intravitalis mikroszkópia (IVM)

Mikroszkóp: Zeiss AxioTech Vario 100HD, 100W HBO higanygőz lámpa, Acroplan 20 \times vízimmerziós objektív, Carl Zeiss GmbH, Jena, Németország, Kamera: Teli CS8320Bi (Toshiba Teli Corporation, Osaka, Japán)

Jelöléstechnika: fluoreszcein-izotiocianáttal jelzett eritrociták (0,2 ml iv), rhodamin 6G-vel jelölt PMN-ek (0,2%, 0,1 ml iv) (Sigma, St. Louis, MO, USA,)

Kiértékelés: off-line az IVM szoftver (Pictron Kft., Budapest, Magyarország)

Paraméterek: kitapadó leukociták (sticking): kitapadt PMN-ek száma / mm^2 endothel-sejt felület. Rolling leukociták: a gördülést mutató PMN-ek száma / mm érkerület

3.3. A szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó reakciók kimutatása

PMN-ek CD11b expressziójának vizsgálata

Jelölés: fluoreszcein-izotiocianáttal-konjugált egér anti-patkány monoklonális antitest (OX-42 klón, AbD Serotec, Kidlington, UK)

Flow citometria: CyFlow ML (Partec GmbH, Münster, Németország)

A plazma TNF-alfa szint meghatározása

ELISA: Quantikine Ultraszenzitív ELISA-kit (R&D Systems, Minneapolis, MN, USA)

A vér szabad gyök termelő képességének meghatározása

Zymozán által kiváltott teljes vér kemilumineszcencia növekedés révén (FB12 egycsöves luminométer (Berthold Detection Systems GmbH, Bad Wildbad, Németország), a mérések a perifériás vér leukocitaszámára voltak normalizálva.

A plazma E2 szintjének meghatározása

Az endogén E2 szinteket az Elecsys Estradiol III kit és a Roche Cobas e 601 immunológiai analizátorral (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Németország) határoztuk meg.

A periostealis ösztrogén receptor-alfa (ER-alfa) és béta (ER-béta) mRNS expressziók meghatározása

RNS tisztítás: NucleoSpin® RNS XS kit (Macherey-Nagel GmbH & Co. KG, Düren, Németország) a gyártó által megadott protokoll szerint.

Real-Time PCR: 10 nl-es reakcióközegben 100 ng RNS mennyiségekből PCR segítségével (Verso 1-lépcsős RT-qPCR Mix, ROX készlet; Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). Az amplifikációs körülmények: 50°C-on 15 perc, 95°C-on 15 perc, 40 ciklus 95°C-on 15 másodperc és 58°C-on 15 másodperc. Az RNS-szinteket $\Delta\Delta\text{CT}$ -módszerrel határoztuk meg, és 18S mRNS-re normalizáltuk. A kísérletekhez használt primerek és próbák tervezéséhez az Universal Probe Library rendszert (Roche, Basel, Svájc) használtuk.

3.4. Statisztikai analízis

Az adatok statisztikai analízisét a SigmaStat statisztikai szoftverrel (Jandel Corporation, San Rafael, CA, USA) végeztük. Az adatok eloszlásának megfelelően az alábbi vizsgálatokat alkalmaztuk: 1) kétszemponyos RM ANOVA teszt, majd a Holm-Sidak teszt (1. vizsgálat), 2) Kruskal – Wallis teszt, majd a Dunnett teszt (1. tanulmány, PCR-adatok); 3) kétszemponyos RM ANOVA-t használtak, majd a Holm-Sidak és a Dunn tesztek (2. tanulmány).

4. Eredmények

I. Tanulmány

4.1. Az E2 hatása az IPC által kiváltott periostealis mikrokeringési reakciókra

A tibialis periosteum postkapilláris venuláiban a rolling értékek hasonló mértékben emelkedtek a végtagi IR-t követően a Sham+IR és OVX+IR állatokban a kiindulási értékekhez képest valamennyi vizsgálati időpontban. IPC után mérsékelt csökkenés volt látható a rolling értékekben a nem ovariectomizált patkányokban (Sham+IPC+IR csoport) a késői reperfúziós időszakban (120 és 180 perc), de az OVX-nek alávetett patkányokban (OVX+IPC+IR csoport) ez a csökkenés nem következett be. A reperfúzió 60. és 120. percében a legalacsonyabb rolling értékek a krónikusan E2-vel kezelt állatoknál (OVX+E2+IPC+IR csoport) voltak láthatóak, de ezek a különbségek nem voltak szignifikánsak. A leukocita kitapadás (sticking) a rollingnál megfigyelthez hasonló változásokat mutatott. Ezekben a paraméterekben az IPC védő hatása az OVX-nek alávetett állatoknál (az OVX+IPC+IR csoportban) nem volt megfigyelhető, ám némi mérséklő hatása az E2-nek észlelhető volt (az OVX+E2+IPC+IR csoportban).

4.2. Az E2 hatása az IPC által kiváltott szisztémás gyulladós reakciókra

A PMN-ek felszínén a CD11b adhéziós molekula megnövekedett expressziója volt látható a reperfúzió 120. és 180. percében. Később nem volt észlelhető lényeges különbség a Sham+IR és az OVX+IR csoportok értékei között, azonban kismértékű csökkenés volt megfigyelhető az IPC-t követően az áloperált állatoknál (Sham+IPC+IR). Ez a mérséklődés nem volt látható OVX-t követően (OVX+IPC+IR csoportban). A krónikus E2 kezelés azonban hatékonyan mérsékelte az IR által kiváltott CD11b expresszió fokozódást (OVX+IPC+IR+E2).

A teljes vér szabadgyök eredetű kemilumineszcenciája a legkorábban (a reperfúzió 60. percében) az IPC-vel kezelt csoportokban jelentkezett mind áloperált (Sham+IPC+IR csoport), mind pedig az OVX állatok esetében (OVX+IPC+IR csoport), de ez az emelkedés mérsékelt volt az E2-vel kezelt OVX+IPC+IR állatoknál. A szabadgyök képződés tekintetében nem volt további eltérés a különböző kísérleti csoportok között. Az IR az összes vizsgálati csoportban szignifikáns TNF-alfa plazma szint emelkedést okozott, az adatok nagymértékű szóródása miatt azonban nem volt statisztikailag szignifikáns különbség kimutatható a kísérleti csoportok között. A legkisebb mértékű emelkedés az E2-vel kezelt állatoknál volt megfigyelhető.

Az alkalmazott protokoll nem került szinkronizálásra az állatok hormonális ciklusának változásaival és hüvelyváladék vizsgálat sem készült. A szérumban E2 koncentráció 9,57 és 15,87 pg/ml értékek között mozgott az álműtött állatok esetén, míg ezek az értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak OVX állatoknál ($p < 0,001$), ahol alig érték el a detekciós limitet ($5 > \text{pg/ml}$).

Habár az OVX állatok egy része krónikus E2 kezelésben részesült, ezek E2 szintjei (átlag 20,06 pg/ml, $p < 0,05$) alig voltak magasabbak az álműtött OVX csoportban mért értékeknél.

4.3. Az ösztrogén pótlás hatása OVX által kiváltott ER expresszió változásokra

Azonos szintű ER-béta transzkripció volt detektálható periosteumban az álműtött és OVX állatoknál, a legmagasabb transzkripciós szint pedig krónikus E2 pótlás esetén volt észlelhető. Az ER-alfa mRNS szint azonban a detekciós szint alatt maradt periosteumban. A kísérlet során kizártunk minden esetleges módszertani hibalehetőséget az ER-alfa detektálásával kapcsolatban azáltal, hogy egyidejűleg vizsgáltuk egyezően állatok uterusait mindkét receptor vonatkozásában.

4.4. A krónikus BIS kezelés hatása a végtag IR által kiváltott mikrokeringési változásokra

A krónikus ZOL kezelés nem okozott eltérést a periostealis mikrokeringés PMN-endothel-sejt interakciókban a kiindulási értékekben. Habár az IR szignifikáns növekedést okozott mind a PMN rolling, mind pedig a PMN adhézió tekintetében az egész reperfüzió alatt, ezek a változások megegyező mértékűek voltak álműtött és az OVX patkányokban is. A BIS kezelés átmeneti növekedést okozott a PMN rollingban az OVX+IR állatokban és egy korábbi fokozódást az adhézióban a Sham+IR és OVX+IR állatokban 60 perces reperfüziós időpontban, de nem volt további hatással a PMN-endothel-sejt interakcióra a reperfüzió későbbi szakaszában.

4.5. A krónikus BIS kezelés hatása a végtag IR által kiváltott szisztémás gyulladósos reakciókra

A kiindulási értékhez viszonyítva a TNF-alfa felszabadulás jelentős növekedést mutatott a vizsgált reperfüziós időszak alatt, nem volt azonban különbség megfigyelhető a különböző csoportok között. A kezdeti értékekhez képest a CD11b adhéziós molekula expressziója hasonló mértékű, szignifikáns emelkedést mutatott a hordozóanyaggal kezelt áloperált és az OVX patkányok reperfüziója során, ez az emelkedést azonban alacsonyabb mértékű volt a krónikus BIS kezelést követően.

5. Megbeszélés

5.1. A krónikus ösztrogénpótlás hatása az IPC hatékonyságára a helyi (periostealis) mikrokeringési reakciók tekintetében

A kutatócsoportunk korábban is végzett klinikailag releváns, hosszú távú vizsgálatokat osteoporotikus patkányok felhasználásával, ahol a tourniquet-ischaemia periostealis

mikrokeringési következményeit vizsgálta. Kimutattuk, hogy az OVX nem növeli az IR-indukálta periostealis mikrokeringés zavar kockázatát, de a krónikus ösztrogénpótlás csökkenti a helyi gyulladásos szövődményeket. A jelen protokoll szerint rövidebb idejű OVX-t használtunk, mely nem okoz osteopaeniát, de elegendő ahhoz, hogy krónikus ösztrogén hiányt idézzon elő patkányokban. Elmondható, hogy az IPC a periosteumban elsősorban az IR által kiváltott PMN-endothel-sejt interakciók második szakaszát (sticking) befolyásolja hím és nőnemű állatokban egyaránt, melyet az IPC-nek az leukocita adhézióért felelős molekulákra kifejtett kedvező hatása magyarázhat. Ez a védelem elmarad OVX-nek alávetett állatokban a PMN rolling és adhézió vonatkozásában egyaránt. Ez arra utalhat, hogy ösztrogénhiányos állapotban az IPC periostealis védő hatása limitált; ennek a megfigyelésnek potenciális klinikai implikációi lehetnek. Hasonlóképpen a keringő PMN aktiváció markerének, a CD11b expresszióinak mértéke is alacsonyabb volt IPC-nek alávetett állatoknál, mely szintén elmaradt OVX mellett. Ezek alapján feltételezhető, hogy nőstény állatokban/nőkben az endogén ösztrogén jelenléte elengedhetetlen feltétele az IPC kedvező gyulladásellenes hatásai megvalósulásának a periosteumban. Ezt a hipotézist támasztja alá az a megfigyelés is, mely szerint az E2 pótlás visszaállítja OVX+IPC+IR állatokban a kiesett védő hatást. Hasonlóan a jelenlegi eredményeinkhez, az IPC pozitív hatásai eltűntek az E2-vel kezelt OVX patkányokban IR-t követően a szívnél is. Ezt megelőzően az E2 pótlás mikrokeringési előnyeit IR-t követően, IPC nélkül vizsgáltuk. A tourniquet-ischaemia postischaemiás periostealis mikrokeringési következményei visszafordíthatók voltak E2 pótlás mellett, ezen kívül az E2 mikrokeringésre kifejtett kedvező hatását számos egyéb IR modellben is kimutatták. Mivel az E2 protektív hatásai IPC mellett és anélkül is egyaránt jelen vannak, nehéz megkülönböztetni az E2 önálló előnyös hatásait az IPC-re gyakorolt hatásától. Ezért feltételezhetjük, hogy a jelen modellben E2-nél látott védős hatások függetlenek az IPC-re gyakorolt hatásoktól.

Jelen vizsgálatunkban elsőként mutattuk ki az IPC-nek a mikrokeringési vonatkozású csökkent hatékonyságát OVX mellett, azonban más paramétereknél is hasonlókat észleltünk egyéb szervek postischaemiás szöveti károsodása tekintetében (pl. szívelégtelenségben). Az E2 pótlással kapcsolatos következtetések azonban továbbra sem mondhatók egyértelműnek. Patkányokon végzett vizsgálatokban az OVX-mellett az IPC-hez köthető kardiális védő hatások szintén visszaállíthatóak voltak E2 adásával. Az eredmények azonban némileg ellentmondásosak, hiszen az IPC védő hatása nyulaknál kimutatható volt OVX mellett is. Emellett az E2-nek nem volt protektív hatása más tanulmányokban, ahol az IPC-t OVX-el kombinálták. A hosszú- és rövidtávú ösztrogénkezelés szintén eltérő hatásokat eredményezhet és nem lehet kizárni szerv- és fajspecifikus különbségeket sem. Elmondható tehát, hogy az endogén és exogén ösztrogén

hatásokban megfigyelhető különbségek magyarázata (a különböző kísérleti modellekben) további vizsgálatokat tehet szükségessé.

Bizonyos fentebb felvetett különbségek hátterében az adott szövet ösztrogén receptorainak számbeli vagy funkcióbeli eltérése, vagy az E2-nek és OVX-nek az ösztrogén receptor expresszióra gyakorolt hatása állhat. Ismert, hogy az E2 transzkripciós faktorként is működik, mivel az E2 az ER-alfa vagy ER-béta receptorhoz történő kötődése jól ismert folyamatokat módosíthat azáltal, hogy a különböző gének expresszióját befolyásolja (pl. nitrogénmonoxid szintetáz). Emellett az E2-nek membrán receptorokhoz (plazma vagy mitokondriális) való kötődése nem-genomiális hatásokat is okoz, beleértve a sérülés/stressz által kiváltott apoptosist és citokróm c felszabadulást a miokardiális mitochondriumból. Vizsgálatainkban az ER-béta periosteumban történő expressziója nem változott OVX hatására, a krónikus E2 kezelés hatására azonban emelkedést mutatott (miközben az ER-alfa expresszió a detekciós küszöb alatt maradt). Mások szerint az ER-béta receptornak az E2 által kiváltott fokozott mitokondriális expressziója és az anti-apoptotikus hatása összefüggésben van az E2-nek a trauma-vérzés során észlelhető védő hatásával. Ezen túlmenően az E2 kardioprotektív hatását az ER-béta receptorral összefüggő, bizonyos gén-transzkripciós változásokhoz kötötte egy másik tanulmány. Minden valószínűség szerint az ER-béta részt vesz az ösztrogén-függő nitrogénmonoxid szintetáz aktivitás szabályozásában, illetve mások már igazolták az ER-alfa hasonló hatását is. Traumás-vérzéses shockot követően OVX patkányokban a PMN-hez köthető gyulladási folyamatok fokozódtak, amit az E2 illetve az ER-béta agonisták adása kivédett. Az ER-béta receptornak az endotheliumhoz köthető hatása csökkentette az IR-indukálta reaktív oxigén gyökök képződését, növelte a nitrogénmonoxid képződést és helyreállította a mitokondriális funkciót a szomszédos szívizomsejtekben. Vizsgálatunkban a gyulladási folyamatok egy része (a PMN-ek CD11b expressziója és a vérben lévő szabadgyökök mennyisége) krónikus E2 adással mérsékelhető volt és az ER-béta up-reguláció lehetséges szerepét ezekben a reakciókban szintén nem lehet kizárni. Meg kell jegyeznünk azonban, hogy az ösztrogéneknek közvetlen szabadgyök fogó hatásuk is van a fenolos A-gyűrűjükhöz kapcsolódóan, valamint a glutathion-dependens és a NADPH aktivitást közvetlen moduláló hatásuk révén is. Az E2 antioxidáns hatásai szintén összefügghetnek az NFκB jelátvitellel és az Nrf2 up-regulációjára gyakorolt hatásával. Ami a szisztémás hatásokat illeti, az E2-nek ER-alfához köthető hatásai szerepet játszhatnak az IPC mechanizmusában (például ahogy a szívnél kimutatták), de ezek a lehetséges vonatkozások, csakúgy mint a szelektív ösztrogénmodulátorok által kiváltható hatások is, a jelen tanulmány vizsgálati célkitűzésein kívül esnek. Amint azt Murphy és Steenbergen feltételezte, az E2 rövidebb távú hatásait az ER-alfa okozhatja, míg a hosszabb távú hatásai elsősorban az ER-béta

által közvetítődnek. Ezen kívül az E2-nek ER-től független hatásait sem lehet kizárni. Meg kell jegyezni, hogy az E2 receptorok periostealis expressziója még nem ismert emberben, habár a kortikális és a trabekuláris csontszövetekben mindkét ER-fehérje kimutatható (immunhisztokémiai úton) a csontfejlődés során. Eddig csak az ER-béta mRNS expressziót vizsgálták patkányok tibialis periosteumában, a jelen tanulmányban viszont csak az ER-alfa mRNS expressziót tudtunk kimutatni a periosteumban. Ez arra utalhat, hogy az ER-alfa mRNS expresszió nem mutatható ki a periosteumban. A jelenlegi eredmények (az ER-alfa mRNS expresszió periostealis hiánya) emberre történő vonatkoztatása további vizsgálatokat tenne szükségessé.

5.2. A krónikus ösztrogénpótlás hatása az IPC hatékonyságára a szisztémás gyulladásos reakciók tekintetében

Az első vizsgálatban a szisztémás gyulladásos paraméterek szintén karakterisztikus változásokat mutattak: a keringő PMN-ek CD11b expressziójának IR által kiváltott fokozódása szintén csökkent IPC hatására az álműtött állatokban, de OVX esetén ez a mérséklődés nem volt megfigyelhető. Ezt a jelenséget azonban helyreállította az E2 kezelés. Mások kísérleteiben a PMN eredetű CD11b expressziót az E2 hasonlóképpen csökkentette *in vitro* és traumavérzéses shockban *in vivo* is más adhéziós molekulák, például az E-selectin tekintetében. Nincs azonban tudomásunk olyan vizsgálatról, ahol az IPC hatékonyságát nézték volna OVX állatoknál az adhéziós molekulák expressziója szempontjából. Jelen tanulmányban a teljes vér szabad gyök mennyisége szintén szignifikánsan nőtt az összes csoportban. Az Sham+IR és az OVX+IR csoportoknál a helyi (periostealis) és a szisztémás gyulladásos reakciókban egy kismértékű időbeli eltolódás volt megfigyelhető, hiszen IVM segítségével kimutatható PMN rolling és adhézió-fokozódás 60 perccel a reperfüziót követően jelentkezett (ami egyidejű endothelialis és leukocita aktivációt feltételez), ugyanakkor a szuperoxid szint később mutatott emelkedést (a 120. perct követően). Ezen jelenség háttere nem ismert jelenleg, de mivel a perifériális leukocitákban a CD11b expresszió-növekedés a reperfüzió későbbi szakaszaiban jelen volt (a 120. perct követően), feltételezhető más elemek (például aktivált makrofágok) hozzájárulása a megnövekedett szuperoxid-termeléshez. Érdekes, hogy az IPC-nek nem sikerült csökkenést okoznia a teljes vér szabadgyök mennyiségében, sőt korábbi növekedést váltott ki az áloperált és OVX csoportokban egyaránt. Meg kell azonban jegyezni, hogy ez az emelkedés nem volt jelen az E2-vel kezelt csoportban. A szabadgyököknek ugyanakkor ismert szerepe van az IPC pathomechanizmusában: a szabadgyökök emelkedett szintje mutatható ki IPC hatására és a szuperoxid gyökfogók blokkolják az IPC szövetvédő hatását. Máshol már

kimutatták, hogy az ER-béta részt vesz a PMN aktiváció mérséklésében és az E2 szabadgyök csökkentő hatása is ismert. Érdekes, hogy az IPC nem befolyásolta az egyik központi gyulladás-szabályzó ágens, a TNF-alfa szintjét. Meglepő módon az OVX után emberekben megfigyelt TNF-alfa szint emelkedés a jelen vizsgálatban nem volt igazolható (azaz a kezdeti TNF-alfa értékek nem különböztek egymástól OVX után), sőt kissé alacsonyabb értékeket találtunk mindegyik OVX állatban (120 perc reperfüzió után). Ezek az eltérések a fajok közötti különbségeknek vagy az OVX után észlelt immunológiai válaszok következményeinek tudhatók be (melyek a jelen vizsgálat látókörén kívül esnek). Számos vizsgálatban (OVX-vel vagy anélkül) kimutatták, hogy hím állatokban is csökken az E2 hatására a TNF-alfa felszabadulás. Ebben a tekintetben a reperfüzió vagy az IPC+IR által kiváltott változásokat mások még nem hasonlították össze hasonló OVX vizsgálatokban. A jelen kísérletben a legalacsonyabb postischaemiás TNF-alfa értékeket az E2 alkalmazása után találtuk (bár a relatív magas adatszóródás miatt nem mutathattunk ki statisztikailag szignifikáns különbséget). A jelen kísérletekben a csökkent CD11 expresszió és szuperoxid termelődés egy mérsékelt szisztémás gyulladásos reakció megnyilvánulásaként értékelhető az E2 hatásának köszönhetően.

Az első tanulmány következtetései

Vizsgálatunkban kimutattuk, hogy a végtag IPC előnyös mikrokeringési hatásai kiesnek OVX hatására patkányokban. Ez a megfigyelés arra utalhat, hogy postmenopausális nőknél ortopéd-traumatológia beavatkozások során alkalmazott végtag IPC hatékonysága korlátozott lehet a tourniquet-ischaemia gyulladásos szövődményeinek mérséklése céljából. Ezt a következtetést erősítik meg az eredményeink, melyek szerint az E2 pótlás visszaállítja a fenti hatásokat. Korábbi és jelenlegi patkányokon végzett vizsgálataink eredményei szerint az E2 kezelés védő hatásai függetlenek lehetnek az IPC-re gyakorolt hatásától és az E2 kezelés periostealis ER-béta expresszióra kifejtett hatásaival lehetnek összefüggésben. Ennek a megállapításnak a klinikai jelentősége azonban még további vizsgálatokat tehet szükségessé.

5.3. A krónikus BIS kezelés hatása a végtag IR által kiváltott periostealis gyulladásos reakciókra

A BIS vegyületek a csontmetasztázisok és a csontritkulás hatékony gyógyszerei és ígéretes kezelési lehetőséget biztosíthatnak a törés utáni gyógyuláskor jelentkező komplex regionális fájdalom szindrómára is. Kimutatták, hogy a ZOL osteoporosisban történő alkalmazása pozitív hatással van a gerinc fúziójára, elősegíti a fogorvosi implantátumok osseointegrációját és

rögződését autológ csontgraftokban. A ZOL emellett mérsékli a periapikális lézió által kiváltott csontvesztést a mandibulában és a titán implantátumok csontintegrációját a postmenopausális osteoporosisban. Ezeken túlmenően a ZOL fokozott periostealis csontképződést eredményezett foghúzást követően osteopéniás bányókban. A ZOL-kezelés ugyanakkor ugyanebben az osteopéniás bányó modellben reaktív periostealis hipertrófiát és az állkapocs osteonecrosist is okozott. Mindazonáltal osteopéniás modellben mások még nem vizsgálták a BIS-ek az IR által kiváltott helyi mikrokeringési és szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó reakciókra gyakorolt hatását.

Figyelemre méltó tény, hogy gyulladáscsökkentő és gyulladást fokozó hatását egyaránt kimutatták a különböző BIS vegyületeknek. A BIS-ek gyulladáscsökkentő hatásai közé tartozik a monociták és makrofágok számának és proliferációjának, valamint életképességének és apoptózisának modulálása, valamint a proinflammatorikus citokinek, például a TNF-alfa, valamint más citokinek, például az IL-1, az IL-6 és a neurogén növekedési faktor mennyiségének csökkentése. Hasonlóképpen beszámoltak a BIS neurogén gyulladást gátló hatásairól is. Másrészt a különböző BIS-ek (beleértve a ZOL-t is) akut fázis reakciót (<3 nap) indukáltak betegekben, míg állatmodellekben megnövekedett TNF-alfa felszabadulást, a PMN-ek szöveti felhalmozódását és jelentős oxidatív stresszt mutattak ki bizonyos szövetekben, mint például a fogíny és a máj. A fentiekben túl a ZOL immunológiai reakciókat is kiválthat. A BIS-ek gyulladáshoz kapcsolódó komplikációkat is okoznak egyes klinikai esetekben és gyógyulási problémákat invazív fogászati beavatkozást követően az állkapocsban, sőt akár osteonecrosist is. Kimutatták, hogy a ZOL súlyosbítja a vesekárosodást (növelve a citokin termelést, a metabolikus acidózist és az apoptózist) patkányokban IR során.

A BIS kezelés következtében fokozott leukocita-endothel-sejt interakciókat mutattak ki egy egér arthritis modellben, de keveset tudunk a ZOL által kiváltott periostealis mikrocirkulációs reakciókról. Korábban azt láttuk, hogy a krónikus BIS-kezelés bizonyos mértékű mikrocirkulációs gyulladást okoz a mandibulában, de ilyen hatásokat nem észleltünk a tibialis periosteumban. Ezért az aktuális vizsgálatban a krónikus ZOL kezelés hatását vizsgáltuk egy végtag ischaemiás állat modellben, ahol a PMN-endothel-sejt interakciók a postischemiás mikrocirkulációs gyulladáshoz kapcsolódó reakciók kialakulásában jól ismert. Kimutattuk, hogy az OVX által kiváltott, csökkent endogén ösztrogénszint önmagában nem hajlamosít a fokozott periostealis mikrocirkulációs szövődményekre és hogy az OVX mellett alkalmazott krónikus ZOL kezelés a PMN-endothel-sejt interakciók átmeneti fokozódását leszámítva nem okoz jelentős gyulladáshoz kapcsolódó mikrokeringési komplikációkat a tibiában végtag IR során.

5.4. Krónikus BIS kezelés hatása végtag IR indukálta szisztémás gyulladáshoz kapcsolódó reakciókra

Korábban kimutatták, hogy az ösztrogénhiány következtében létrejövő TNF-alfa felszabadulás részt vesz a nők osteoporoticus csontvesztésének pathomechanizmusában, ebben a vizsgálatban azonban nem találtunk különbséget az OVX utáni TNF-alfa szintekben sem a posztischaemiás fázisban sem pedig a kontroll periódusban. Mindazonáltal meg kell jegyezni, hogy a TNF-alfa szérumszintje patkányokban meglehetősen alacsony és az alapértékek közel állnak a vizsgálat detektálási határához.

A CD11b expresszió-fokozódás kritikus lépés az aktivált PMN-nek endothel-sejtekhez történő adhéziójában. A ZOL beadása után azonban IR csoporthoz képest alacsonyabb CD11b expressziót észleltünk a reperfüzió során. A BIS-ekről kimutatták, hogy befolyásolják a PMN funkciókat; ez károsodott PMN kemotaxisban és megnövekedett reaktív oxigén szabadgyök termelésben manifesztálódik *in vivo*, *in vitro* pedig csökkent myeloperoxidáz és NADPH aktivitásban. A BIS gátló hatását más immunsejtekben, például makrofágokban is kimutatták. Vizsgálatunkban a ZOL csökkentette a CD11b expresszióját a keringő PMN-ek felületén, de nem befolyásolta a PMN-ek kitapadását a periostealis posztkapilláris venulákban. Ezt az eredményt csak a ZOL által kiváltott fokozott endotheliális aktiváció, vagy az endothelium eredetű adhéziós molekulák fokozott expressziója magyarázhatja. E mögött magyarázatként az adhéziós molekulák ZOL által kiváltott fokozott endotheliális expressziója állhat (a CD11b endothelialis ligandja), aminek pontos mechanizmusa azonban további vizsgálatokat tenne szükségessé.

A fentiek mellett ismert továbbá, hogy a BIS gátolja endothelialis proliferációt és fokozza az endothelium apoptózisát illetve a BIS (pl. alendronát) esetén azt is kimutatták, hogy gátolja a nitrogénmonoxid szintetáz expresszióját, amely a PMN-endothel-sejt interakciók fontos endogén modulátora. Ezek a ZOL által kiváltott, az endotheliumot érintő akut posztischaemiás reakciók további vizsgálatokat indokolhatnak.

A második tanulmány következtetései

Összefoglalva elmondható, a BIS kezelés csak kismértékben befolyásolja a végtag IR által kiváltott PMN rollingot és adhéziót a periosteumban, a PMN eredetű adhéziós molekula (CD11b) expresszió enyhe mérséklése mellett. A ZOL szintén nincs hatással a postischaemiás TNF-alfa felszabadulásra. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy bár a lokális endothelialis aktiváció bizonyos szintje tulajdonítható a kezelésnek, a krónikus ZOL adás nem befolyásolja jelentősen a tibiális periosteumban a posztischaemiás gyulladással mikrokeringési komplikációk kockázatát.

6. Az új eredmények összefoglalása

1. Az IPC előnyös lokális periostealis mikrokeringési hatásai elmaradnak OVX után végtag IR-t követően patkányokban. Ennek megfelelően a végtag IPC által nyújtott védelem hatékonysága a tourniquet-ischaemia gyulladással szövődményei vonatkozásban limitált lehet ortopéd-traumatológiai beavatkozások során postmenopausalis nőknél.
2. A krónikus ösztrogén pótlás visszaállítja a védelmet bizonyos a lokális és szisztémás gyulladással reakciók vonatkozásában, de az E2 védő hatása részben független lehet az IPC-re gyakorolt hatásától és az E2 a periostealis ER- β expresszióra kifejtett hatásaival állhat összefüggésben.
3. A BIS kezelés nem okoz jelentős szisztémás szövődményeket a leukocita aktiváció tekintetében, de mérsékelten fokozza a periostealis mikrokeringési reakciókat végtag IR során. Ez a jelenség bizonyos mértékű a lokális endothelialis aktivációval magyarázható, mely a krónikus ZOL kezelés következtében alakul ki.
4. Osteoporosisban történő alkalmazása esetén a krónikus ZOL kezelés nem okoz jelentős akut posztoperatív szövődményeket a periostealis mikrokeringésben ortopéd-traumatológiai beavatkozások során.

7. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Boros Mihály professzornak, hogy lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatást folytassak a Szegedi Tudományegyetem Sebészeti Műtéttani Intézetében és hogy hozzájárult a publikációim elkészítéséhez. Hasonlóképpen köszönettel tartozom Dr. Szabó Andreának a kísérletek tervezéséért, a kísérleti tanulmányok során végzett útmutatásáért és segítségért és a publikációim valamint az értekezésem megírásában való közreműködéséért. Szintén hálás vagyok Dr. Janovszky Ágnesnek a kísérletek végrehajtásában nyújtott segítségéért és támogatásáért. Ezenkívül szeretnék köszönetet mondani minden munkatársamnak a tanulmányokban való közreműködéséért, valamint a Sebészeti Műtéttani Intézet összes technikusának, hogy biztosították a kísérletekhez és a biokémiai vizsgálatokhoz szükséges feltételeket. Továbbá szeretném megköszönni klinikai főnökömnek, Dr. Gera Lászlónak és kollégáimnak, hogy támogattak és megengedték, hogy a kutatásomhoz szükséges időt Szegeden tölthessem. Végül nagyon hálás vagyok a feleségemnek és a családomnak a szeretetükért és támogatásukért és hogy bátorítottak céljaim elérésében.

Kutatási támogatások: OTKA 104656, OTKA 109388, GINOP-2.3.2-15-2016-00015, NKFIH K116689, EFOP 3,6,2-16-2017-00006.

**AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES TERJEDELMŰ
KÖZLEMÉNYEK:**

- I. Szabó A, Janovszky Á, **Pócs L**, Boros M. The periosteal microcirculation in health and disease: An update on clinical significance. *Microvasc Res.* 2017;110:5-13. doi: 10.1016/j.mvr.2016.11.005. **IF: 2,465**
- II. **Pócs L**, Janovszky Á, Garab D, Terhes G, Ocsovszki I, Kaszaki J, Boros M, Piffkó J, Szabó A. Estrogen-dependent efficacy of limb ischemic preconditioning in female rats. *J Orthop Res.* 2018;36(1):97-105. doi: 10.1002/jor.23621. **IF: 3,414**
- III. **Pócs L**, Janovszky Á, Ocsovszki I, Kaszaki J, Piffkó J, Szabó A. Microcirculatory consequences of limb ischemia/reperfusion in ovariectomized rats treated with zoledronic acid. *J Orthop Surg Res.* 2019;14(1):95. doi: 10.1186/s13018-019-1117-x. **IF: 1,610**

AZ ÉRTEKEZÉS ALAPJÁUL SZOLGÁLÓ TELJES ELŐADÁSKIVONAT:

- IV. Szabó A, Janovszky Á, Garab D, Bodnár D, **Pócs L**, Nyíri S, Varga R, Hartmann P, Boros M, Piffkó J. Periosteal microcirculatory effects of chronic bisphosphonate treatment in ovariectomized rats. *Shock* 2013;40(Suppl 1): 41-41.