

ZÁRÓJELENTÉS

OTKA 46615

2004-2007

AZ ÉP ÉS KÓROS PORCSZÖVET VÁLTOZÁSA IN VITRO

KÍSÉRLETEKBEN

Témavezető: Prof. Dr. Módis László

A 2004-ben elnyert OTKA pályázatunk „Az ép és kóros porcszövet változása in vitro kísérletekben.” révén lehetőségünk nyílt in vitro porcdifferenciációs tanulmányaink „high density” porcosodó mesenchyma sejt kultúrákon történő folytatására (I), valamint ugyancsak folytattuk a nemzetközileg elfogadott ízületi felszín rekonstrukciós technika, a Mozaiplasztika (MP) továbbfejlesztését szolgáló morfológiai, hisztokémiai munkánkat is (II).

(I)

A porcdifferenciálódás egyik világszerte elfogadott in vitro modelljét, a korai (4 napos) csirkeembriók végtagtelepeiből izolált mesenchyma sejtek porcosodó „high density” (HD) kultúráit (Ahrens és mtsai., 1977, Hadházy és mtsai., 1983) használva kimutattuk, hogy milyen intracelluláris változások zajlanak, ha hidrogén-peroxiddal vagy peroxinitrittel kiváltott oxidatív stressz-nek tesszük ki a „high density” kultúrákban differenciálódó sejteket. Eddigi eredményeink azt mutatják, hogy az oxidatív stressznek kitett porcosodó sejtekben fokozódik a PKC μ expressziója és enzimaktivitása, valamint az ERK Tyr-foszforilációja. A PKC μ porcdifferenciációban betöltött szerepét bizonyítja az a tény, hogy az aktivitását gátló resveratrol erőteljesen csökkenti a porcképződést. Az elvégzett hisztokémiai és morfometriás

vizsgálataink azt mutatják, hogy az oxidatív stressz nagymértékben csökkentette a képződő porc mennyiségét és a porcosodó sejtek proliferációs képességét, jóllehet a sejtek vitalitása nem változott szignifikánsan. Az oxidatív stressz nem csupán kinázok működését befolyásolja, hanem egy fontos celluláris protein foszfatáz, a PP2B (calcineurin) aktivitását is módosíthatja, nevezetesen csökkenti. A PP2B esetében mRNS és fehérje szinten is csökkenést tapasztaltunk a hidrogén-peroxiddal kezelt kultúrákban. Emellett a PP2B specifikus inhibitora a ciklosporin A (CSA) gátolja a porcképződést. CSA hatására az ERK1/2 fokozott Tyr foszforilációját tapasztaltuk, ezért eredményeink összességében azt sugallják, hogy az oxidatív stressz különböző kináz és foszfatáz aktivitások modulálása révén az ERK 1/2 aktivitás fokozódását kiváltva csökkenti a porcképződést. Ezeket az eredményeket különböző hazai, illetve nemzetközi kongresszusokon ismertettük, és az alábbi tudományos folyóiratokban közzétettük (Zákány és mtsai 2005, Zákány és mtsai, 2006).

(II)

A mozgásszervi, ezen belül az ízületi betegségek gyakoriságuk miatt a népbetegségek csoportjába tartoznak hazánkban is. Ezen betegségek nagymértékben rontják a betegek életminőségét, és jelentős gazdasági terhet rónak a társadalomra is (Bálint és mtsai., 2003). Az ízületi betegségek hátterében legtöbbször az ízületi porc degeneratív, traumás, vagy gyulladásos eredetű károsodása áll. Az ízületi felszín rekonstrukciójának több módszere van. Az egyik legelfogadottabb módszer a ma már világszerte elterjedt mozaikplasztika (MP) (Hangody és mtsai., Hangody és mtsai., 1997, Hangody és mtsai., 2001, Hangody és mtsai., 2003, Hangody és mtsai., 2004). Az MP lényege: bizonyos nagyobb ízületek (térd, boka) károsodott teherbíró részeinek pótlása autolog osteochondralis graftokkal.

Az elnyert OTKA pályázat révén laboratóriumunknak lehetősége nyílt részt venni a Dr. Hangody László által kidolgozott mozaikplasztika (autológ osteochondrális

mozaikplasztika) eredményeinek modern molekuláris morfológiai analízisében, melynek során mozaikplasztikán átesett betegek biopsziás mintáikon mikroszkópos és különböző szövettani vizsgálatokkal bizonyítottuk a mozaikplasztika eredményességét.

Humán térdízületeken végzett mozaikplasztika műtétek után biopsziás mintákat vettünk különböző időpontokban, amelyek során nyert minták hisztológiai és hisztokémiai elemzése azt mutatta, hogy a vizsgált esetek döntő többségében a károsodott ízületi felszínnek porcát tökéletesen sikerült rekonstruálni ezzel a műtéti eljárással. Az elvégzett hisztokémiai és immunhisztokémiai reakciókat, valamint kvalitatív és kvantitatív polarizációs mikroszkópos vizsgálatokat követően megállapítottuk, hogy a graft és a befogadó területek tökéletesen fuzionáltak, a graft porcos része megőrizte proteoglycan tartalmát, azaz hyalin jellegét. Csupán néhány esetben tapasztaltuk a graft hyalin porcának rostos porccá alakulását a beültetés után egy évvel. Ezen eljárásokról és a mozaikplasztika eredményességéről összefoglaló tudományos cikket jelentettünk meg (Hangody és Módos, 2006). Ezzel a tudományos publikációnkkal elnyertük a Martkusovszky Lajos díjat (2007, Orvosi Hetilap).

A mozaikplasztika során a nyitva hagyott donor csatornában ritkán ugyan, de jelentős vérzés indulhat el, ami irreverzibilisen károsítja a porc PG struktúráját. Ezen káros folyamat kialakulási valószínűségének csökkentésére a klinikumban többféle anyagot kipróbáltak. Egy nemzetközi tudományos együttműködés keretein belül lehetőségünk nyílt tesztelni egy biodegradabilis polimer, a PolyAktív (polyethylen glycol terephthalat - polybutylenterephthalat, Polyactive, PA, IsoTis OrtoBiologics, Bilthoven, Hollandia) a donor csatornában kifejtett bioaktív hatását. Kísérleteink során a PolyAktívet tartalmazó eltávolított biopsziás mintákban vizsgáltuk a donor csatornában megtalálható a PA állagát, valamint a csatornában keletkezett szövet hisztokémiai jellemzőit. Vizsgálataink során megállapítottuk, hogy a donor csatornák tömeszelésére alkalmazott biodegrábilis szintetikus polimer garantálja a donor csatorna megfelelő zárását, valamint a környező szövettel való

kitöltődését. A kísérleti eredményeinkből tudományos kézirat született. (Bartha és mtsai, közlésre beküldve)

Az elmúlt években elsőként Magyarországon végeztek mozaikplasztika műtéteket lovak ízületi felszínén. Jelen kísérleteink célja az volt, hogy a műtétek után nyomon kövessük, hogy milyen mértékben él túl és épül be a subchondrális csontba, illetve az ízületi porcba az átültetett ostochondralis transplantatum a teherviselő ízületi felszínen lovak csüdízületében. Klinikai és hisztokémiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy a mozaikplasztika lovakon is sikerrel végezhető, mely eredményt az irodalomban először publikáltunk. (Bodó és mtsai, 2004) Emellett az elmúlt két évben mintákat vettünk lovak mozaikplasztikája után a donor csatornák területéről is. Közel 70 – különböző műtéti eljárásból származó - mintát gyűjtöttünk. A minták egyrészt olyan műtétekből származtak, melyek a humán műtéteknél sikerrel alkalmazott Polyaktivval tömeszelt donorcsatornákat tartalmaznak. Néhány esetben a porc felszínét csak megvéstük, illetve a donor csatornát nem tömeszeltük. Ezen mintákat szövettani vizsgálatra feldolgoztuk, az eredmények feldolgozása, összefoglalása jelenleg folyik.

Az OTKA pályázatban résztvevő kutatók egyéb tudományos tevékenységének publikációval igazolható eredményei:

1. Hangody doktor és munkatársai által elvégzett kísérleteik során tanulmányozták a különböző hosszúságú és átmérőjű osteochondrális graftok stabilitását. A disznó femur condylusokon végzett összehasonlító vizsgálataik révén megállapították, hogy a nagyobb átmérőjű graftok alkalmasabbak ízfelszíndefektusok pótlása. Ezen kísérleti eredményeiket egy nívós nemzetközi tudományos folyóiratban is publikálták (Kordas és mtsai., 2006).

2. Az autolog osteochondralis mozaikplasztika ígéretes módszernek bizonyult az emberi könyökízületben észlelt osteochondrális defektusok műtéti kezelésére is (Zengerink és mtsai., 2006).

3. Arthroscopos biomechanikai mérésekkel hasonlítottuk össze humán femurok lateralis és medialis condylus felszíneinek szilárdságát, azaz teherbíróképességét. A lateralis condyluson szignifikánsan nagyobb értékeket mértünk, mind a medialis condyluson (Szerb és mtsai., 2006).

4. Összefoglaltuk azokat a lehetőségeket, amelyek lehetőséget adnak a rheumatoid arthritis terápiájára az angiogenezis befolyásolásával. (Szekanecz és mtsai, 2005) Vizsgáltuk a makrofágok hatását a rheumatoid arthritisben, bizonyítottuk, hogy kulcs fontosságúak a RA patogenezisében, és megfelelő terápiás célpontok (Szekanecz és Koch, 2007).