

A támogatáshoz szükséges első átutalást csak a 2003. év végén kaptuk meg, így a kutatómunkát egy év késéssel kezdhettük el.

Vizsgálatainkban három fő célkitűzésünk volt. Egyrészt humán (cadaver) anyagon dolgozva, az életkor függvényében csontszerkezet vizsgálatokat kívántunk végezni, amelyben a csontok változását néztük az életkor függvényében. Másik fő célkitűzésünk az volt, hogy állatkísérletes mérésekben standard körülmények között a callus-képződés részleteit megmérjük. Ezekben a mérésekben egyrészt az alapvető szövettani és vérellátási változásokat kívántuk megmérni, illetve a beidegzés szerepét vizsgáltuk a csontok vérellátására. További kutatásainkban a csontpótló anyagoknak a törésgyógyításban játszott szerepét is vizsgálni akartuk.

Alkalmazott módszerek:

1. Cadaver mérések: A proximalis femurból, a csípőlapátból és a lumbalis csigolyákból csontmintákat vettünk (ötéves korcsoportokat képeztünk a 60 és 90 éves kor közt elhunytak között). Formalinos fixálás után a mintákat dekalcináltuk, majd beágyazás után fénymikroszkópos vizsgálatokat végeztük (HE festés). A sejtsűrűséget mértük. A rostszerkezetben az I. típusú kollagént immunhisztokémiai módszerrel festettük meg. A rostszerkezet lefutását és annak sűrűségét tanulmányoztuk. A csontokról röntgenfelvételeket készítettünk a csontsűrűség szemikvantitatív értékelése céljából. A csontsűrűséget denzitásmérővel is meghatároztuk.
2. Állatkísérletek: A kísérletes munkát altatott nyulakon végeztük. A mérésekhez a már korábban kidolgozott osteotomia modellt használtuk fel. A képződő callusban immunhisztokémiai módszerekkel a precursor sejtek érését határoztuk meg. Ugyanitt a mikrokeringés reakcióit

vizsgáltuk lézer-Doppler áramlásmérővel. Ezeket a reakciókat az azonos oldali femur csontvelő érreakcióival hasonlítottuk össze. A csontképződés befolyásolására különböző csontpótló anyagokat (autológ, heterológ csontkészítményt, biokorallt, kollagénkivonatot, hidroxí-apatitot) helyeztünk el a résben. A mikrocirkuláció változásait lézer-Doppler áramlásmérővel megmértük, szövettani (normál hisztológia, HE) vizsgálatokat végeztünk és a képződő callus mechanikai vizsgálatát végeztük el. A vizsgálatokat a gyógyulás 21. napjáig végeztük. A neuraxis sülését a lumbalis, a thoracalis és a corticalis régióban hoztuk létre. A beavatkozás után 21 nappal megmértük a tibia és a femur mikrokeringési reakcióit.

Fontosabb eredmények és következtetések:

1. A cadaver mérésekben az egyes körcsoportok között számos hisztomorfometriai paraméterben (sejtszám, kollagénrostok mennyisége) szignifikáns különbség adódott. Ezek az eredmények a porózis (életkor) előrehaladtával korreláltak a röntgenogrammok és a denzitogrammok eredményeivel. Több olyan eset is előfordult, hogy a proximális femurból vett minták szövettani eredményei a lumbalis csigolyákból vett minták eredményeitől jelentősen különböztek. Ennek alapján megállapíthatjuk, hogy a csontrendszer különböző területeiről vett szövetmintákból nem mindig tudjuk a csont státuszát kelő pontossággal értékelni. A több mint 100 cadaver anyagának feldolgozása még folyamatban van, így további közlemények várhatóak annak elkészülte után.
2. Állatkísérletes vizsgálatok: A csontgyógyulás 5. napján már a precursor sejtek jelentős differenciálódáson mennek keresztül. Az angiogenesis sejteiben SP (P-anyag) jelenik meg, és ez a 20. napig eltűnik. Az osteogenesis sejteiben főleg CGRP (kalcitonin gén rokon peptid) mutatható ki, és ez a későbbi érés folyamán szintén eltűnik. A két peptid

eltűnésével párhuzamosan egyre több béta-akin (a citoszkeleton részeként) NOS II (NO-szintetáz) és az NFkB (nukleáris faktor-kappa-B) jelenik meg a sejtekben, amelyek az érett sejtformákat jellemzik.

A gyógyulás 10. napján már számos ér és idegrost van jelen a callusban, de a véráramlás még passzívan követi a nyomásváltozásokat. A véráramlási reakciók, amelyek az érfal válaszait tükrözik csak a 15 napon jelennek meg, de még nem érik el az ép csontvelőben mért szabályozási módot.

Az idegrendszer sérülései ugyancsak befolyásolják a csontvelő vérellátását, különösen akkor, ha a sérülés magasan (a thoracalis, corticalis) szinten történik. Ezekben az esetekben az érreakciók fokozottabbak, valószínűleg azért, mert az ellenregulációs mechanizmusok még nem eléggé kifejezettek.

A különféle csontpótló anyagok alkalmazásakor a leggyorsabb gyógyulást akkor tapasztaltuk, ha autológ csontbeültetést végeztünk. Ez megmutatkozott mind a szöveti struktúra alakulásában, mind a véráramlási reakciók kifejlődésében, mind a csont mechanikai stabilitásában.

A jelentős volumenű kísérletes munka nagy része még feldolgozásra vár. Ezért további közlemények megjelenése a közeli jövőben várható.

Our research could be started only after one year delay, because the first support money arrived only at the very end of the starting year.

We had three main goals in our research. In human (carried out on cadaver material) studies changes of the bone structure was investigated as a function of age. Our second aim was to study the details of callus building under standardized conditions in animal studies. Basic histological changes were followed, reactions of tissue blood flow were analysed, and the role of innervation on the blood flow was also measured. In further studies the role of bone replacement materials was also investigated in bone healing.

Important methods:

1. Cadaver studies: Tissue samples were collected from the proximal femur, from the ileal crest, and from lumbar spine. Five-year group were made between the ages of 60-90. Following fixation in paraformaldehyde, tissue samples were decalcified and embedded. Normal histology was carried out with HE-staining. Cell density was measured. Fibre structure and quantity of type I collagen was also measured with immunocytochemistry. A semi quantitative analysis of bone density was also carried out by X-ray. Bone density was quantified as well.
2. Animal studies: Experiments were carried out on the anaesthetized rabbit. Our earlier osteotomy model was used for the measurements. Development and maturation of precursor cells in the developing callus was measured with immuno histochemistry. Reactions of the microcirculation were also measured in the callus with laser-Doppler flowmetry. Vascular reactions of the callus were compared with those of the ipsilateral femur. Bone healing was influenced by different bone replacement materials (autologous, heterologous bone, biocoral, collagen extract, hidroxi-apatit) applied into the gap of osteotomy. Reactions of the microcirculation were measured by laser-Doppler flowmetry, normal histology was carried out (HE stain), and mechanical testing was also carried out of the developing bone. These measurements were carried out up to the 21st day of healing. The neuraxis was damaged at different levels: lumbar, thoracal, and cortical regions. Microcirculation of the tibia and femur were measured 21 days after surgery.

Main results and conclusions:

1. There was a significant difference among different age groups in many parameters (cell counts, quantity of collagen fibres). Results of histology had a close correlation with the roentgenograms and densitogrames and these measured values had also close correlation with the age. In some case results of the femur differed significantly from those of the lumbar spine. On the basis of these finding we can state that tissue samples taken from different parts of the skeleton can not exactly characterize the actual status of all bones. Analyses of the samples collected from more than 100 cadavers is still under processing. Further publications can be expected in the near future.
2. Animal studies: There was a significant differentiation of the precursor cells on the 5th day of bone healing. Substance P (SP) appears in the cells of angiogenesis, but SP disappears until day 20. Calcitonin gene related peptide (CGRP) appears early in the cells of osteogenesis and it also disappears later during callus maturation. Parallel to the disappearance of these peptides the quantity of beta-actin (as part of the cytoskeleton) increases, and NO-synthase NOS II), and nuclear factor kappa B (NFkB) appear in the cells. These proteins are characteristic components of the mature cells. On day 10 of bone healing, there are a number of vascular and neural structures

in the developing callus, however, blood flow regulation is missing, changes of flow. Flow reactions reflecting the participation of the vessel wall appear on the 05th day of healing, however, there are still different from those of the normal bone marrow.

Injuries of the neuraxis influence of bone marrow blood supply. These changes are particularly important is after injuries at higher (thoracal or cortical) levels. Vascular reactions of the marrow in these cases are more exaggerated, because counter-regulating mechanisms are missing.

The quickest bone formation and healing was observed when autologous bone was applied among the many replacement materials used. This statement was supported by mechanical testing, measurements of the microcirculation, and histology of the developing callus.

A significant bulk of the experimental material still awaits analyses and the results of those will be published in the near future.