

A gyermekkori disztális orsócsont törés kezelési lehetőségeinek retrospektív- és a csontgyógyulás vizsgálata állatkísérletes modellen

Doktori (Ph.D.) értekezés



Dr. Józsa Gergő

Témavezetők: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár
Dr. Juhász Tamás, egyetemi adjunktus

Programvezető: Dr. Reglődi Dóra, egyetemi tanár

Doktori iskola vezetője: Dr. Szekeres Júlia, egyetemi tanár

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai Intézet
Pécs, 2019.

Bevezetés

A PACAP az angol „pituitary adenylate cyclase activating polypeptide” kezdőbetűiből tevődik össze. A fehérjét 1989-ben Arimura és munkatársai birka hypothalamusból izolálták. A PACAP 38 aminosavból áll, C-terminálisán α -amidált peptid. Az adenohipophysisben lévő sejtek adenilát cikláz aktiválása révén a ciklikus adenzin-monofoszfát (cAMP) koncentrációjának az emelkedését idézi elő (Arimura A. 2007., Miyata A. et al. 1989.).

A PACAP eltérő szövetekben lévő funkciói közül kevésbé ismert a csontképződésben betöltött szerepe. A PACAP számos jelátviteli útvonalon keresztül befolyásolja az oszteogenetikus sejtek folyamatait. Az egyik legfontosabb citokinek közé tartoznak a BMP-k, melyek nélkülözhetetlenek a megfelelő csontképződés folyamatához.

A törésgyógyulás három fázisa: a gyulladás, a helyreállítás és a rehabilitáció. A növekedési faktorok és az extracelluláris mátrix fontos szerepet játszanak a csontgyógyulásban. Az előbbiek a célsejtekre hatva sejtproliferációt idéznek elő, aktiválják és alakítják a protein szintézist. A korai szakban a sebbe vándorló leukociták, monociták, makrofágok citokineket választanak ki, melyek stimulálják az angiogenezist. A törési hematómában a vérlemezkékből származó növekedési faktorok közvetítik a törés reparációjában fontos sejtproliferációt, migrációt és a mátrix szintézisét. Az FGF, bFGF és a TGF béta stimulálja a kondrocita és oszteoblaszt proliferációt és a csont szintézist. A gyulladással egérben 3, patkányban 4, míg emberben 7 napig tart. Az akut sérülés hatására a csont, az erek, a lágyrészek károsodnak, aminek hatására a makrofágok és egyéb sejtek elindítják a gyulladással kaszkádot. A törési hematóma fontos szerepet játszik a törésgyógyulásában, a polimorfonukleáris neutrofil sejtek lebontják az elhalt sejteket, ezzel megtisztítják az érintett területet, ezen felül számos kemokint termelnek, mint pl. a CCL2 (chemokine ligand 2) és az IL-6 (interleukin-6), valamint odavonzzák a makrofágokat. A polimorfonukleáris sejtek hatásuk kifejtése után gyorsan elhalnak, amennyiben az aktivitásuk elhúzódik, úgy hátrányosan befolyásolják a törésgyógyulást. Az akut gyulladás fontos a csontgyógyulás folyamatához, stimulálja az érújdonképződést és hozzájárul az oszteoblaszt irányú differenciálódásához és proliferációjához. A gyulladással gátlása károsítja a csontgyógyulás folyamatát és növeli a szövődmények kialakulásának a kockázatát.

Az elsődleges csontosodás az anatómiai repozíciót követően abszolút stabilitást adó oszteosintézist követően alakul ki. A csontosodás e formájában kalluszképződés nem észlelhető. Az oszteoklasztok lebontják a régi csontot a törési résen átfúrva magukat és

nyomukban az oszteoblasztok új csontot termelnek, így a törési rés fokozatosan eltűnik és új vaszkularizált oszteon keletkezik.

A legtöbb törés másodlagos gyógyuláson megy keresztül a nem kellően stabil törés rögzítés miatt, mindezek miatt kevert dezmalis, endokondrális osszifikáció által kialakított kallusz jön létre. A sérülést követő első napokban az intramembranózus osszifikáció által termelt csont a perioszteum alatt helyezkedik el, kondrogenezissel átfedi azt, ami az endokondrális csontosodás fő lépése. A kezdeti folyamatok legfőbb regulátorai a BMP2, 4, és 7 fehérjék. A BMP jelátviteli út csontgyógyulásban betöltött szerepe régóta ismert. A BMP fehérjék fokozzák a mezenchimális őssejtek differenciálódását kondroblaszt és oszteoblaszt irányba és stimulálják az oszteoblasztok érését. Egér törés modell vizsgálat során a BMP2 elindítja a gyógyulási kaszkádot, mely mRNS expressziójának csúcsa 24 órával a csontsérülés után van. A BMP2 egyéb BMP fehérjék expresszióját is befolyásolja. A BMP3, 4, 7 és 8 expresszálódik a csontgyógyulás során, amikor a csontképződés a legkifejezettebb. A BMP5 és 6 expressziója a törés gyógyulás 3. napjától a 21. napig nem változik. Randomizált kontrollált vizsgálat történt 2002 és 2004 között BMP alapú fehérje kezelésével nyílt tibia törések esetén. Egy éves nyomonkövetési időszakban magas koncentrációjú BMP2 elősegítette a csontgyógyulást és a másodlagos műtétet száma is alacsonyabb volt a hagyományosan kezelt csoporthoz képest.

A gyermekkori alkar disztális harmadi törések több mint 90%-ában konzervatív kezeléssel jó eredmény érhető el. Operatív töréskezelés alkalmazandó minden instabil törés esetén. Instabilnak minősül minden teljesen diszlokált törés, a kortikális és a perioszteum nagyfokú vagy teljes sérülése miatt. A ferde-, az ékkítöréssel járó, a hosszanti-, a darabos defektussal járó törések a rövidülés lehetősége miatt fokozottan instabilak. Műtéti kezelés során a megfelelő stabilitás elérése a cél, amit elsősorban minimálisan invazív módszerekkel próbálunk elérni.

Operatív töréskezelésnél is az első lépés a disztális törtdarab helyretétele, mely általában fedett repozícióval történik, sikertelenség esetén perkután műszeres repozícióval próbáljuk meg a törtdarab helyretételét.

Perkután tűződróttal a törési részbe hatolunk és kétkarú emelő elve alapján a disztális törtdarabot a megfelelő helyzetbe billentjük. Ha nem sikerül fedetten vagy tűződróttal reponálni a törést, akkor nyílt feltárással van szükség. Sikeres repozíció után a törés stabilizálása szükséges, amely elérhető perkután tűződrótos oszteoszintézissel, dorzálisan bevezetett („Slongo-féle”) titanium elastic nail-lel (TEN) és short TEN-nel.

Minimál invazív beavatkozásokon azok a perkután végzett, műszeres beavatkozások értendők, melyeket repozíciós és/vagy retenciós célból végzünk. Számptalan előnnyel rendelkeznek, többek között kevésbé traumatizálnak, minimális a műtéti vérvesztés, csökken az infekció veszélye, az implantátum mérete kicsi, az eltávolításuk atraumatikus, minimális műtéti heggel járnak, nem károsítják a fizist, így a poszttraumas túlnövés mértéke nem haladja meg a konzervatív kezelés utánit és a végtag hamarabb mobilizálható.

Célkitűzés

1. A WT és a PACAP KO egerek femurjainak vizsgálata.
2. A PACAP a törésgyógyulásban betöltött hatásának vizsgálata egér tibia törés modellen. A vad-típusú és a homozigóta PACAP-génhiányos egerek törés gyógyulását hasonlítottuk össze.
3. Micro-CT segítségével morfológiai és denzitometriás méréseket végeztünk, majd a kallusból származó mintákat különböző módszerekkel (Western blot, RT-PCR) vizsgálatuk.
4. A retrospektív vizsgálat alapján meghatározni a három műtéti technika indikációs területeit. Röntgen felvételeken a radius és a radius-ulna együttes átmérőjéből levonható-e olyan következtetés, ami a műtéti technika megválasztását segíti?
5. Megállapítani az egyes műtéti technikák által elért radiológiai kontrollált eredményt, tengelyeltérést.
6. Célunk volt kideríteni, hogy a különböző választott műtéti technika mitől függött? A radius disztális epifízis átmérőjétől, a radius-ulna együttes átmérőjétől, esetleg a törés ízfelszíntől mért távolsága, ami befolyásolta a választást.
7. Annak a kérdésnek a megválaszolása, hogy az ízfelszíntől mért töréstávolság a radius-disztális epifízis átmérőjéhez viszonyítva meghatározza-e a választandó műtéti technikát?

Anyagok és módszerek

Állatkísérletes modell

Kísérleteink során 3 hónapos egerek femurját (vad típusú, wild type (WT) n=18, PACAP knock out (KO) n=18), valamint a tibia törés utáni gyógyulási folyamatokat (WT n=12, PACAP KO n=12) vizsgáltunk. Az állatokat standard laboratóriumi körülmények között, ad libitum táplálék- és folyadékellátás mellett tartottuk 12 órás világos-sötét ciklusban, 20-22°C-on és 40-60% közötti páratartalomban. Az állatok elhelyezését és gondozását az etikai szabályoknak és az egyetemi protokollnak megfelelően végeztük (BA02/2000-24/2011, Pécsi Tudományegyetem). Az állatok genotípezálása a Phire Animal Tissue Direct PCR kit (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA, USA) alapján történt.

Teljes hátsó végtag alizarin festés

A hátsó végtagot előkészítése után PBS oldatban háromszor átmostuk, majd fixáltuk 4:1 arányú abszolút ethanol és 40% formaldehid oldat keverékében. Alkoholos lemosást követően 30, 60 és 80 mM KOH oldatban 3, 2 és 1 napig inkubáltuk, addig, míg a szövetek teljesen áttetszővé váltak. A visszamaradó KOH eltávolítása háromszori PBS oldatban történő mosással történt. A mintákat alizarin festettük 15 percig.

Három pontos femur törésteszt

A femur három pontos törés tesztje Chatillon TCD225 tensile teszt gépen történt. A csont középső, centrális részére 5 mm átmérőjű körkörös fejú eszközzel nyomást gyakoroltunk, a fej sebessége 2 mm/min volt a kísérlet során. A nyomási erőt (F_m) a hajlítás deformációjának mértékét (Δl_m), a törés pillanatában mértük.

Törés modell

Tizenkét KO és 12 vad típusú 20-30 grammos egerek mindkét oldali tibia törésének létrehozása intraperitonealis (Euthasol 1%-os oldat 7 μ l/10 g) narkózisban történt. A tibia proximális harmadában, a ventralis felszínen alakítottuk ki a monokortikális törést.

Micro-Computed Tomography (Micro-CT)

A femur diafizis (n=18) elülső, hátulsó kortikális vastagságát ugyanabban a CT szeletekben, míg a femur denzitását a trochanter major régiójában mértük. A tibia törés igazolására, a

mélység, valamint a lokalizáció ellenőrzése miatt micro-CT (Skyscan 1176 mikro CT) vizsgálat történt a 3., 7. és a 21. napon.

Fénymikroszkópos vizsgálat

A tibia törést követő 3., 7. és a 21. napon 4 PACAP KO és 4 WT egeret pentobarbitállal (100 mg/ttkg) túlaltattuk, majd az eltávolított femurt és tibiát PBS oldatban háromszor átmostuk, majd fixáltuk 4:1 arányú abszolút ethanol és 40% formaldehid oldat keverékében. A csontok a 4 hetes 4%-os EDTA oldatban történő dekalcinálása után puhává váltak. A mintákat felszálló alkohol soron dehidráltuk, majd paraffinba ágyasztuk. A paraffin blokkokból mikrotómmal 5 mikrométeres sorozatmetszeteket készítettünk, melyeket tárgylemezre téve haematoxylin-eosinnal festettük.

RT-PCR, Western blot

A tibia felületének megtisztítása után kb. 2 mm³ kalluszt távolítottunk el. Megfelelő előkészítést követően RT-PCR, és Western blot reakciót végeztünk, belső kontrollként aktint használtunk. Az optikai denzitást ImageJ 1,40 g freeware segítségével mértük. Az eredményt a kontroll szövet optikai denzitásához viszonyítottuk a változásokat az aktinra normalizáltuk.

Statisztikai analízis

A kísérleteink során minimum 4 független kísérletet hasonlítottunk össze, majd az adatok átlagát határoztuk meg. Az eltéréseket a kontroll (nem operált) és operált oldal között egyutas ANOVA és Tukey teszttel vizsgáltuk. A szignifikancia küszöbértéket $p < 0,05$ -ként határoztuk meg.

Humán vizsgálat

A pécsi Gyermekklinika Gyermeksebészeti osztályán 2009 január és 2018 december között minimál invazív módszerrel disztális harmadi alkartörés, illetve izolált disztális radius törés miatt operált gyermekek különböző adatait vizsgáltuk.

A retrospektív tanulmányban vizsgáltuk a nemek közti megoszlást, a különböző műtéteknikák típusát és számát, a posztoperatív röntgenek számát, a fémkivétel időpontját és a tengelyeltérés mértékét a fémkivétel után. Nagy hangsúlyt fektettünk a törési rés ízfelszínétől való távolságának a mérésére, a radius disztális epifízis átmérőjének, valamint a radius és az ulna együttes disztális

epifízis átmérőjének a nagyságára. A méréseket a preoperatív röntgeneken végeztük. A vizsgált adatokból próbáltunk következtetéseket levonni, hogy a dia- metafízis határán lévő törések esetén melyik operatív eljárás biztosít jobb eredményt.

Vizsgálatunk során a radius disztális epifízis átmérője, valamint a radius és az ulna együttes disztális epifízis átmérője alapján szerkesztett négyszögeket vettük alapul. A kis négyszög esetén a radius epifízis átmérője alapján határoztuk meg a négyzet nagyságát. A radius disztális epifízis átmérőjének két végpontjára, a diafízis irányába állított két merőlegessel és a merőlegesekre ráért oldalhosszúsággal és azok összekötésével kaptuk meg a négyzetet. A nagy négyszöget a kis négyszöghöz hasonlóan szerkesztettük meg, annyi különbséggel, hogy itt a négyszög oldalának a hosszát a radius és az ulna együttes átmérője képezte. Ezek a négyszögek az operatív ellátást igénylő, disztális harmadi alkartörések esetén segíthetik a megfelelő műtétechnika kiválasztását.

Vizsgálataink során a törési rés négyszögekhez való viszonyára helyeztük a fő hangsúlyt. Azt tanulmányoztuk, hogy van-e összefüggés az alkalmazott műtétechnika és a törési rés kis és nagy négyszöghöz való viszonya között. A disztális radius epifízis átmérő és a törési rés ízfelszíntől mért távolságának a hányadosa alapján egy mintás t-próbával 0,05 szignifikancia szinten vizsgáltuk az adatokat. A disztális radius epifízis átmérő és a töréstávolság hányadosa alapján három csoportot különítettünk el. 1-es csoportba tartoztak a kis négyszögbe eső törések, a 3-as csoportba a nagy négyszögön, kívül, proximálisabban lévő törések, míg a 2-es csoportba tartoztak az átmeneti zóna sérülései.

Eredmények

Állatkísérletes modell

A PACAP KO és a WT egerek femurjának vizsgálata

A WT és a PACAP KO egerek morfológiai mérései során jelentős eltérést nem találtunk. A tibia és a femur hosszában különbséget nem észleltünk és egyéb makroszkópos anatómiai eltérést sem találtunk a vizsgálataink során. A CT vizsgálat nem mutatott különbséget a tibia hosszmérése során, míg a femur a PACAP KO egerekben rövidebb volt, de ennek mértéke nem érte el a szignifikáns különbséget.

A femur festése HE-nal keresztmetszeti mintákon történtek, jól vizualizálható volt a vastagságbeli - és a velőüreg átmérőjének a különbsége. A CT vizsgálat eredményei alapján az elülső kortikális csont a PACAP KO egerek mintáiban, míg a hátsó kortikális csont rész a WT egerek mintáiban volt vastagabb. A velőüreg átmérője a WT egerek femurjában szélesebb volt. A nagy tompor területén mért denzitás a PACAP KO egerekben szignifikánsan alacsonyabb volt. A kalcium depozitumok alizarin, míg a kalcium foszfát depozitumok kimutatása von Kossa festéssel történt. Ezek alapján elmondható, hogy egyenetlen kalcium foszfát eloszlást észleltünk a PACAP KO egerek femur diafizis egyes részein. A femur diafizis disztális részén magasabb, míg a proximális részén alacsonyabb kalcium foszfát szintet észleltünk a PACAP KO egerek femur mintáiban.

Az erő, ami a komplett diafizis femur törés kialakításához szükséges volt, szignifikánsan alacsonyabb volt a PACAP KO egerek mintáiban. A femur diafizis refleksiója nem mutatott jelentős eltérést a két genotípus között, bár a PACAP KO egerek femurjában magasabb elhajlást detektáltunk.

ALP expresszió a kalluszban

Három különböző napon vizsgáltuk a szervesen állomány termeléséért felelős ALP expresszióját. A törésgyógyulás 3. és a 7. napján hasonló eredményeket kaptunk, az ALP mRNA expressziója a WT kalluszban emelkedett volt, míg a PACAP génhányos egerekben jelentősen alacsonyabb értékeket kaptunk. PACAP KO tibia mintákban magasabb ALP fehérje expressziót mértünk a PACAP KO kallusz mintákhoz képest. Az ALP fehérje expressziója nem korrelált az mRNA expressziójával. A PACAP KO egerek tibia mintájában emelkedett ALP fehérje expressziót észleltünk hasonlóan a femurban vizsgáltakhoz. A WT kallusz mintákban emelkedett ALP fehérje expressziót észleltünk a 3. és a 7. napon,

aminek a mértéke a 21. napra csökkent. A PACAP KO egerek kalluszában az ALP fehérje expressziója nem mutatott emelkedett koncentrációt a vizsgált napokon.

I-es típusú kollagén expresszió a kalluszban

Három különböző napon vizsgáltuk az I-es típusú kollagén expresszióját. Alacsony mRNS expressziót észleltünk a WT egerek tibiájában és kalluszában, a 7. és a 21. napon az expresszió csökkent. A PACAP KO egerekben magasabb I-es típusú kollagén expressziót észleltünk. Hasonlóan a WT egerekhez alacsony, alkalmanként nem detektálható I-es típusú kollagén expressziót mutatott a PACAP KO egerek kallusz mintája is.

A fehérje expresszió nem korrelált az mRNS expresszióval. A WT egerek mintájában alacsony koncentrációt detektáltunk. A 3. napon emelkedett, míg a 21. napon csökkent expressziót észleltünk, a csúcspont koncentráció a 7. napon volt. Emelkedett volt az I-es típusú kollagén expresszió a 3. napon a PACAP KO egerekben összevetve a WT egerekkel. A 7. napon az expresszió növekedése kismértékben elmaradt a PACAP KO egerek kalluszában a WT egerek kalluszához képest. A 21. napra jelentősen csökkent az expresszió, de továbbra is magasabb volt a WT egerek mintájában.

BMP2,4,6 fehérjék expressziója

A BMP az egyik legfontosabb faktor a kallusz képződésében. A BMP jelátviteli útvonal közvetlen kapcsolódik a PACAP szignalizációs útvonalhoz. A BMP2 mRNS expressziója a 3. napon emelkedett volt a WT egerek mintájában, míg a 7. naptól csökkent és a 21. napra jelentősen csökkent az expressziója. A PACAP KO egerek mintájában nem találtunk változást a 3. és a 7. napon, azonban a 21. napon jelentősen csökkent a BMP2 mRNS expressziója. Minden vizsgálati napon a WT egerek BMP4 mRNS expressziója emelkedett volt. Mérsékelt expressziót figyeltünk meg a PACAP KO kallusz mintákban, a PACAP KO tibia és a WT kallusz mintákkal összehasonlítva. Csökkent BMP6 jelintenzitást figyeltünk meg a WT tibia mintákban, míg az intenzitás fokozott volt a 3. és a 7. napon a kallusz mintákban. A törésgyógyulás 21. napján a BMP6 expresszió csökkent volt a WT mintákban. Ezzel szemben a 7. és a 21. napon jelentősen csökkent jelintenzitást észleltünk a nem operált PACAP KO egerek mintájában. Smad1 mRNS expressziója a 3. és a 7. napon emelkedett volt a WT kalluszban, míg a vizsgálat végére csökkent. Kisfokú volt a jel intenzitás a 3. napon a PACAP KO kalluszban, ami csökkent a 7. és a 21. napra.

A WT egerek kalluszában a BMP2 fehérje expressziója 3. és a 21. napon emelkedett volt, ami a törésgyógyulás 7. napján sem mutatott változást. A PACAP KO egerek kalluszában a jelintenzitás a 3. napon jóval alacsonyabb volt, mint a nem operált tibiában, azonban a 7. és a 21. napon nem találtunk összefüggést.

A BMP4 fehérje expressziója a 3. napon emelkedett volt mind a WT, mind a PACAP KO egerek kalluszában. Emelkedett BMP4 fehérje expresszió volt látható a WT egerek kalluszában, de a 3. napon jelentős emelkedett expressziót mutattunk ki a PACAP KO egerek tibia mintájában, amit a 7. és a 21. napon nem észleltünk.

A BMP6 fehérje expresszió mindhárom vizsgálati napon fokozott volt a WT egerek kalluszában. PACAP KO egerek kallusz mintáiban a 3. napon emelkedett volt az expresszió, ami a regeneráció során csökkenő tendenciát mutatott. A BMP jelátviteli út downstream célpontja a Smad 1, aminek az expressziója nem változott a WT egerek mintájában, de a PACAP KO egerek kalluszában erősen emelkedett volt a törésgyógyulás végső fázisában.

Humán vizsgálat

A nemek közti megoszlás alakulása: a 218 gyermekből 151 (69%) fiú és 67 (31%) lány sérült. A nemek arányát évekre lebontva a legtöbb évben megfigyelhető a 2:1 fiú-lány arány. A retrospektív vizsgálat eredménye alapján 2011-ben a műtétet igénylő disztális alkartörések száma a korábbi évekhez képest közel duplájára emelkedett. Az ezt követő négy évben az alkartörés miatt operált gyermekek száma nem változott jelentősen.

A 218 gyermekből 153 esetben tűződróttal, 51 esetben dorzálisan bevezetett („Slongo-féle”) TEN-nel és 14 esetben short TEN-nel történt a törés stabilizálása. Az operatív ellátást igénylő disztális harmadi alkartörések fixálása legnagyobb számban tűződróttal történt.

A tűződróttal kezelt esetekben átlagosan 4,3, a Slongo TEN-nel kezelt gyermekek esetében átlagban 2,6 és a short TEN-nel kezelt gyermekek esetében átlagosan 3,4 alkalommal volt szükség kontroll röntgenfelvétel készítésére. A legtöbb röntgenfelvétel készítésére a tűződrótos oszteosintézisnél, míg a legkevesebbre a Slongo TEN alkalmazása esetén volt szükség.

A fémkivétel átlagos ideje tűződrótos rögzítésnél volt a legrövidebb - 3,8 hónap. A Slongo TEN-nel kezelt gyermek esetén a fémkivétel átlagosan 5,9 hónap múlva történt. A short TEN-nel kezelt gyermeknél az elasztikus szeg eltávolítását átlagosan 6,1 hónappal a műtét után végeztük el.

218 gyermeket a fémkivétel után mért tengelyeltérés nagysága alapján három csoportra osztottuk. Az első csoportba az 5°-nál kisebb; a második csoportba az 5°-nál nagyobb, de

10°-nál kisebb; a harmadik csoportba a 10°-nál nagyobb tengelyeltéréssel gyógyult törések tartoztak. A tűződróttal kezelt gyermekek közül 127 betegnél észleltünk 5° alatti, 18 betegnél 5-10° közötti, míg további 8 gyermeknél találtunk 10° feletti tengelyeltérést. A Slongo TEN technikát alkalmazott gyermekeknél 42 betegnél mértünk 5° alatti és 9 betegnél észleltünk 5-10° közötti tengelyeltérést. Ennél a műtétechnikánál 10°-nál nagyobb szögleteltérést nem tapasztaltunk. A short TEN-nel kezelt gyermekeknél mind a 14 esetben 5°-nál kisebb tengelyeltérést mértünk.

Vizsgáltuk az ízfelszíntől mért töréstávolságot. A tűződrótos rögzítésnél mértük a legkisebb átlagos töréstávolságot, 23,6 mm-t, ezt követik a short TEN-nel kezelt esetek, 32,7 mm-rel. A legnagyobb töréstávolságot 45,0 mm-t a Slongo TEN-nel operált gyermekeknél mértünk.

Vizsgáltuk a radius disztális epifízis átmérőjének a nagyságát. Tűződrótos rögzítés esetén a radius disztális epifízis átmérők átlaga 25,8 mm nagyságú, Slongo TEN-nél 26,4 mm és a short TEN-nel kezelt gyermekeknél pedig 27,0 mm volt. Legnagyobb radius epifízis átmérőt a short TEN esetén mértünk, a legkisebbet pedig a tűződrótos oszteoszintézisnél.

Megmértük az ulna és a radius disztális epifízisének együttes átmérőjét is. A legkisebb értéket - 40,6 mm-t - a Slongo TEN-nel kezelt gyermekeknél mértünk, tűződrótos rögzítés esetén az átlag 41,7 mm volt, a legnagyobb átmérő - 42,7 mm - a short TEN-nel kezelt esetekben fordult elő.

Megbeszélés

Állatkísérletes modell

A PACAP egy neuropeptid, ami fontos szerepet játszik számos differenciálódás folyamatában, a központi idegrendszerben és a periférián is. A porcsejtek differenciálódásában betöltött szerepét, valamint a preventív funkcióját az oxidatív stresszben korábban már bizonyították. UMR-106 sejtvonalon az *in vitro* csontdifferenciációban betöltött szerepét is korábban már igazolták, azonban *in vivo* funkciójáról nem rendelkezünk részletes információkkal.

A PACAP KO egerek nem mutatnak makroszkópos (vizuálisan megítélhető) eltérést a WT egerekhez képest, azonban néhány rendellenességet azonosítottak PACAP hiányában különböző szövetek fejlődése során, mint például a fogakban, gonádokban. A PACAP hiánya hatással van az állatok magatartására és befolyása van az idegrendszer fejlődésére. Korábbi vizsgálatokban bizonyították, hogy a PACAP növeli az intracelluláris kalcium felszabadulását az oszteoblasztokban és indukálja a differenciálódásukat. Kísérleteink során tanulmányoztuk a PACAP KO egerek femurjainak morfológiai eltéréseit. A combcsont kortikális vastagsága és a velőüreg átmérője eltérő volt ezekben az állatokban. Ezen túlmenően a szövetlen állomány megoszlás nem egyenletes a PACAP génhányos egerek combcsontjának kortikális részében. Ezek a szövettani eltérések kutatási eredményeink szerint megváltoztathatják a csontok törés együttthatóit is. Azt is tudjuk, hogy a PACAP KO egerek kisebb szövettani, morfológiai eltérései nem befolyásolják nagymértékben az állatok életfolyamatait, azonban ha valamilyen sérülés vagy stressz éri az állatot, nagyon nehezen regenerálódik, vagy a hatások sokkal erőteljesebbek, mint egy vad típusú alomtársban. Az utóbbi évtizedben igazolták, hogy a PACAP kompenzálja az oxidatív stressz és a túlzott mechanikai inger által kiváltott káros hatásokat a kondrogenézis során, illetve protektív retinopátiában és iszkémiás károsodásokban. A PACAP hatását *in vivo* vizsgálták csont gyulladáisos modellen. Mindezek alapján megvizsgáltuk, hogy milyen szerepet tölthet be a csontgyógyulásban.

Az egér kallusz kialakulásának vizsgálata széles körben alkalmazott a törésgyógyulás nyomkövetése és tanulmányozása céljából. A fémesszközzel történő stabilizálás zárt tibia törés modell esetén korábban leírt jól bevált módszer a törésgyógyulás vizsgálatára. Hátránya, hogy a stabilizáló belső eszköz nem ad kellő rotációs és axiális stabilitást, valamint térdízületi diszlokációjának és a velőüreg károsításának kockázata is igen magas. A kallusz képződés vizsgálatára standardizált, könnyen reprodukálható törés modellt fejlesztettünk ki. A vizsgálatunk során 24 KO és 24 WT egér kallusz mintáját hasonlítottuk össze a nem operált tibia hasonló magasságában lévő ép csontjával.

A kallusz képződés egyik legfőbb indikátora az emelkedett ALP expresszió. A PACAP hatással van az ALP funkciójára, és a hiányában csökkent ALP expresszió és aktiváció volt kimutatható a PACAP KO egerek combcsontjában és a lábszárcsontjában egyaránt. Jelentősen csökkent mRNS expressziót mutattunk ki PACAP KO egerek tibia kallusz mintáiban, valamint bizonyítottuk, hogy a PACAP hatással van a poszttranszkripció folyamatokra is, amely eredményünk a kutatócsoportunk korábbi eredményeivel, illetve az azokból levont következtetésekkel összhangban van. A vad típusú egerek kallusz mintáiban folyamatosan csökkenő ALP fehérje szintet mértünk a csontgyógyulás végéig, mely összhangban van azzal az eredménnyel, hogy a PACAP KO egerek femurjában eltérő szeretlen állomány detektálható, mellyel a törési paraméterek is változnak. A magasabb ALP szint a PACAP KO egerek kallusz mintájában a csontgyógyulás végére sem csökkent, jelezve a zavart kallusz képződést. Togari és munkatársai igazolták, hogy a különböző neuropeptidok és azok receptorai hatással vannak az ALP funkciójára és a csont metabolizmusára, amit a PACAP esetében is igazoltunk mind a femur, mind a tibia mintáinkban. Vizsgálatainkban bizonyítottuk a PACAP szerepét az *in vivo* csontgyógyulás folyamatában, ami két útvonalon keresztül is végbemehet: direkt útvonalon, a PKA-Runx2-ALP tengelyen keresztül, ahogy azt a femurban végzett kísérleteink is mutatják, míg indirekt módon a β -catenin WNT jelátviteli útvonalon.

Az I-es típusú kollagén és a mátrix organikus elemeinek képződése károsodott volt a PACAP KO egerek csontjaiban és jelentősen emelkedett volt a kollagén lamellák vastagsága az oszteonban. A normális kallusz képződés során az I-es típusú kollagén expressziója csúcsosodik, majd a csontgyógyulás végére normalizálódik. Hasonló eredményt mutattunk ki a kísérleteink során, míg ép csontgyógyulási folyamatot észleltünk a WT egerekben. A kollagén expresszió szignifikánsan emelkedett volt a PACAP KO egerek kallusz mintáiban, ami bizonyítja a kereszt kapcsolatot a WNT- β -catenin jelátviteli út és a PACAP jelátvitel között, ami tovább erősíti a hipotézisünket, hogy a PACAP szerepet játszik a megfelelő csontképződés és kallusz képződés kiegyensúlyozott folyamatában. A BMP fehérjék a kallusz kialakulásnak fontos indikátorai, vizsgálatainkban a BMP2, 4 és 6 expresszióját vizsgáltuk, amik bizonyítottan fontos szerepet játszanak a csont remodellációs folyamatában. A BMP fehérjék mRNS expressziója csökkent volt, ez a látszólagos ellentétes momentum a PACAP poszttranszkripció hatásával magyarázható. A BMP2 expressziója alacsonyabb volt a PACAP KO egerek kallusz mintáiban, azonban a WT egerek tibia és femur mintáiban szignifikánsan emelkedett expressziót észleltünk. A BMP4 fehérje expressziója magasabb volt a WT típusú egerek mintáiban, azonban a csontgyógyulás során nagyon korai csökkenést detektáltunk a

PACAP KO egerek kalluszában. A BMP6 az egyik legfontosabb BMP fehérje, ami fontos szereppel bír a homeosztázis fenntartásában a csontgyógyulás során. A WT egerek kalluszában a BMP6 expressziója fokozatosan emelkedett, de korai csökkenést figyeltünk meg a PACAP KO egerek kalluszában, ami a regeneráció végére tovább csökkent. Ezzel ellentétben a Smad1 expresszió emelkedett volt a csontgyógyulás végső fázisában. Ez az eredmény rámutat a PACAP BMP független Smad1 aktivációra a csont regenerációja során. A PACAP hiányában a normál BMP felszabadulás zavart szenvedett és fokozta a korai regenerációt a BMP4 és 6 expressziójának növekedésével. Ezen citokinek aktivitását nem segíti elő a PACAP hiánya, de végeredményképp késleltetve aktiválja a PACAP független Smad jelátviteli útvonalat. Az így kapott eredmények alapján következtethetünk, hogy a PACAP a BMP jelátviteli útvonalon keresztül játszik meghatározó szerepet a megfelelő csontgyógyulás folyamatában. Kísérleteink során kidolgoztunk egy jól és könnyen reprodukálható törés modellt, ami lehetővé tette a csontgyógyulás molekuláris szintű vizsgálatait. Ennek köszönhetően összehasonlítottuk a WT és a PACAP KO egerek törésgyógyulását. Kísérleteink során bizonyítottuk, hogy a PACAP KO egerek csontfejlődése és kallusz képződése károsodott volt, ezek alapján elmondható, hogy a PACAP fontos szerepet játszik a megfelelő csont újraképződésében a törésgyógyulás folyamatában.

Humán vizsgálat

A gyermekkori distalis harmadi alkar-törések előfordulása gyakori, a kezelése szerteágazó. A dolgozatban a distalis harmadi alkar-törés és az izolált distalis harmadi radius törés különböző operatív kezelési lehetőségeit vizsgáltuk. A retrospektív vizsgálat 9 év beteganyagát tekintette át.

Vizsgálatunk során a nemek közti megoszlás a nemzetközi adatokhoz hasonlóan azt mutatta, hogy a fiúk háromszor gyakrabban sérültek, mint a lányok.

A törések nagy részét tűződróttal rögzítettük, ami alátámasztja azt a tényt, hogy a gyermekkori distális radius törések gold standard műtéti megoldása a tűződrótos oszteoszintézis. Számos variációja ismert a tűződrótos rögzítésnek, hazánkban a Kapandji és a Müller technika terjedt el. Legnagyobb előnye, hogy minimális műszerezettséget igényel, könnyen és gyorsan elvégezhető minimál invazív eljárás. A leggyakrabban alkalmazott technika esetén is kialakulhatnak szövődmények, ami miatt más műtéti megoldások is kidolgozásra kerültek. A leggyakrabban előforduló szövődmények a következők: a tűződrót elvándorlás, a drótvég okozta bőr irritáció, a perforáció és a növekedési zóna sérülés. Egyes szerzők a törés jellege, lokalizációja miatt a transzsepifizeális dróttűzést javasolják, míg mások a növekedési zóna

sérülése és a későbbi növekedési zavar kialakulása miatt nem javasolják a fizis áttűzését. A nem megfelelő stabilitás miatt kiegészítő gipszrögzítésre van szükség. Mindkét alkarcsont sérülése esetén hosszú felső végtagi, míg izolált disztális radius törés esetén rövid gipszsin szükséges. A retrospektív vizsgálat eredményei alapján a tűződrótos oszteosintézis alkalmazásakor készítettük a legtöbb posztoperatív röntgent, csak itt mértünk 10° -nál nagyobb tengelyeltérést a fémkivétel után. A fémkivétel átlagos ideje ennél a rögzítés típusnál volt a legrövidebb, illetve az ízfelszíntől mért töréstávolság is itt volt a legkisebb. A nagyobb visszamaradó tengelyeltérés egyik oka az lehet, hogy a tűződrótok eltávolítása korábban történt meg, mint az elasztikus szegek eltávolítása, így a gyermekkorban jól ismert remodelláció még nem következhetett be, így a későbbi nyomonkövetés során nagy valószínűséggel kisebb tengelyeltéréseket mértünk volna.

Az elasztikus velőűrszegezés két évtizede ismert és alkalmazott módszer hazánkban, azonban a rövid elasztikus szegezés mindössze öt éve alkalmazott technika, ezzel magyarázható az alacsony esetszám. A gyermekek közel negyedében a disztális radius törés fixálása dorzálisan bevezetett elasztikus szeggel történt. A módszer előnye, hogy minimál invazív, nagyobb stabilitást ad, mint a tűződrótos oszteosintézis, de számos szerző ennek ellenére javasolja a külső rögzítést. Hátránya, hogy a túl hosszán visszahagyott elasztikus szeg a bőr irritációját és perforációját alakíthatja ki, míg a túl röviden az extensor inak alatt visszavágott szegvég az ín, leggyakrabban az EPL szakadását okozhatja. A velőűrszeg bevezetése során a fizis megkímélésre kerül, így a fizis károsodás előfordulása minimalizálható.

A dorzálisan bevezetett velőűrszeggel kezelt gyermeknél készítettük a legkevesebb posztoperatív röntgent, illetve itt mértük a legnagyobb töréstávolságot az ízfelszíntől.

A short TEN technika lényege, hogy két előre meghajlított rövid elasztikus szeget vezetünk a radiusba. A módszer előnye, hogy kellőstabilitást ad és külső rögzítésre az esetek döntő többségében nincs szükség, a bevezetési pontok respektálják a fizist, így a növekedési zóna sérülése elkerülhető. Az eljárás hátránya, hogy két bevezetési ponton történik a szegek bevezetése, a dorzális behatolás során sérülhet az EPL, a radialis szeg bevezetése kapcsán a nervus radialis érző ága. A rövid elasztikus szegezéssel kezelt gyermekek esetén a posztoperatív röntgenek száma és az ízfelszíntől mért töréstávolság az előző két műtéttechnika értékei közé esett. Az elasztikus szegek eltávolítása később történt meg, mint a tűződrótoké.

A radius és a radius ulna együttes átmérőjének, valamint a törési rés ízfelszínhez való viszonyát korábbi közleményekben nem közölték. A preoperatív röntgenfelvételeken végzett retrospektív mérések alapján a törés magassága a disztális radius törések esetén meghatározhatja a választott műtétet. Amennyiben a törési rés a distalis radius epifízis átmérő alapján szerkesztett kis

négyszögön belül helyezkedett el, úgy tűződrótos oszteosintézist végeztünk. Az ulna és a radius distalis epifízisének együttes átmérője alapján szerkesztett nagy négyszögön kívül, proximálisan elhelyezkedő törésnél Slongo TEN-nel történt a fixálás. Abban az esetben, ha a törési rés a kis négyszögön kívül, de a nagy négyszögön belül volt, a törés rögzítése mindhárom műtétechnikával történt. A rövid elasztikus szegezést azonban csak az átmeneti zóna sérülései esetén alkalmaztunk.

Az egyértelműen elmondható, hogy a dia- metafízis határon lévő törések kezelése a mai napig vitatott és komoly problémát, kihívást jelent az ellátó orvosnak. A tűződróttal történő kezelés esetén sok a szövődmény és a rediszlokáció, ennek ellenére a leggyakrabban alkalmazott műtéti technika. A dorzális ESIN technika alkalmazása során a szegvég okozta bőrirritáció és az EPL ruptura komoly komplikációt jelent, így alkalmazása széles körben nem terjedt el. A rövid elasztikus szegezés egy új műtéti eljárás, ami a dia- metafízis határán lévő törések stabil rögzítésére ad lehetőséget. Az új módszerrel szerzett kezdeti tapasztalataink jók, a szegek bevezetési pontjain a szövődmény kialakulásának esélye fokozott, így a technika kivitelezése nagy tapasztalatot igényel. Az átmenti zóna törések fixálási módszereinek biomechanikai vizsgálata a későbbiekben tervezett, ami segítségével a 3D nyomtatott csontokon a stabilitási sorrend felállítható.

Ph.D. értekezés alapjául szolgáló saját és egyéb közlemények

Ph.D. értekezés alapjául szolgáló közlemények

Józsa G, Szegeczki V, Pálfi A, Kiss T, Helyes Z, Fülöp B, Cserhádi C, Daróczi L, Tamás A, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2018) Signalling alterations in bones of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) gene deficient mice. *Int J Mol Sci.* 27;19(9). pii: E2538. doi: 10.3390/ijms19092538 (**IF: 3.687**)

Varga M, **Józsa G**, Fadgyas B, Kassai T, Renner A (2017) Short, double elastic nailing of severely displaced distal pediatric radial fractures: A new method for stable fixation. *Medicine* 96(14):e6532. (**IF: 2.028**)

Fadgyas B, **Józsa G**, Varga R, Czene D, Varga M, Kelemen M, Wéber G, Kassai T (2018) A gyermekkori distalis alkar- és radius törések minimál invazív kezelési lehetőségei. Három módszer adatainak retrospektív vizsgálata három gyermek-traumatológiát ellátó intézetben. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet* 61. 1-2.

Józsa G, Fülöp B, Kovács L, Czibere B, Szegeczki V, Kiss T, Hajdú T, Tamás T, Helyes Zs, Zákány R, Reglődi D, Juhász T (2019) Lack of pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) disturbs callus formation. *Front Neurosci. Neuroendocrinology* (revision resubmitted)

Egyéb közlemények

Józsa G, Mohay G, Pintér A, Vástyán A (2011) Congenitalis rekeszsérv vagy hiatus hernia: diagnosztikus problémák öt hónapos csecsemőben *Orvosi Hetilap* 152. évf. 37. sz 1500-1503.

Józsa G, Farkas A (2013) Egyidejű bilaterális avulziós tuberositas tibiae törés ellátása gyermekkorban. *Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet* 56(3):219-224.

Józsa G, Mohay G, Pintér A, Vástyán (2015) A hasi cysták és cystosus képletek differenciáldiagnózisa gyermekkorban [Differential diagnosis of abdominal cysts in children. Case reports]. Orvosi Hetilap 156(37), 1519–1523.(**IF: 0.291**)

Józsa G, Juhász Zs, Kassai T (2015) Az olecranon és a radius fej egyidejű nagy elmozdulással járó törésének kezelése gyermekkorban [Treatment of the dislocated simultaneous olecranon and radial head fracture in children]. Magyar Traumatológia, Ortopédia, Kézsebészet, Plasztikai Sebészet 58. 2-3.

Molnár K, **Józsa G**, Oberritter Z, Cholnoky E, Pankovics P, Reuter G, Tornóczky E (2016) Ujjon lévő cystosus elváltozás háttérében diagnosztizált dirofilariosis. [An unusual cause of the hand cyst: finger dirofilariasis]. Orvosi Hetilap 157(39):1571-1574. (**IF: 0.349**)

Józsa G, Tóth E, Juhász Zs (2017) New dressing combination for the treatment of partial thickness burn injuries in children. Ann. Burns Fire Disasters 30(1): 43–46.

Varga M, Gáti N, Kalóz E, Bíró Zs, Szeverényi Cs, Kardos D, **Józsa G** (2017) Gyermekkori csuklótáji törések diagnosztikája ultrahanggal. [Ultrasonographic diagnosis of distal pediatric forearm fractures]. Orv Hetilap 158(24): 943–947.(**IF: 0.322**)

Józsa G, Kardos D, Oberritter Zs (2017) The Ishiguro technique for the treatment of mallet fingerfracture in adolescent. Novel techniques in arthritis and bone research 1 (1):555552.

Józsa G, Vajda P, Garami A, Csenkey A, Juhász Zs (2018) Treatment of partial thickness hand burn injuries in children with combination of silver foam dressing and zinc-hyaluronic gel. Case reports. *Medicine* 97:13 (e9991).(IF: 2.028)

Témához kapcsolódó publikációk összesített impakt faktora: **3.687**

Összes publikáció kumulatív impakt faktora: **8.705**

Köszönetnyilvánítás

Hálámat és köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőimnek, Prof. Dr. Reglódi Dórának az MTA PACAP Kutatócsoport vezetőjének, a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Anatómiai Intézet vezetőjének és Dr. Juhász Tamásnak, a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet egyetemi adjunktusának, a támogatásukért és kutatásaim során, valamint dolgozatom elkészítésében nyújtott segítségükért. Köszönettel tartozom Bíró Krisztina laborasszisztensnek, Dr. Zákány Róza egyetemi docensnek és Szegeczki Vincének a Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézetéből; Prof. Dr. Helyes Zsuzsanna egyetemi tanárnak és Kiss Tamásnak a Pécsi Tudományegyetem, Általános Orvostudományi Kar Farmakológiai és Farmakoterápiai Intézet és Szentágothai János Kutatóközpont munkatársainak. Köszönet illeti az Anatómiai Intézet minden dolgozójának, kiváltképpen Dr. Kovács László egyetemi tanársegédnek, az állatkísérletek során a közös munkát és a mindenkori támogató együttműködését. Köszönöm a sok segítséget Dr. Juhász Zsolt egyetemi adjunktusnak és Dr. Varga Rita rezidens orvosnak, akik a klinikai tanulmány kidolgozásában és ellenőrzésében nyújtottak segítséget. Szeretném, megköszönni a Pécsi Tudományegyetem, Klinikai Központ, Gyermekklinika Manuális Tanszék Sebészeti Osztály dolgozóinak támogatásukat és megértésüket. Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni Feleségemnek, Dórinak és Gyermekeimnek, Zalánnak és Daninak szeretetüket, támogatásukat és türelmüket.

Támogatás: GINOP-2.3.2-15-2016-0050 „PEPSYS”, MTA-TKI 14016, Nemzeti Agykutatási Program EFOP-3.6.1.-16-2016-00004, EFOP-3.6.2-16-2017-00008.