

**Izületbe hatoló sérülések
és az intraartikuláris környezet**

dr. Borsiczky Balázs Ph.D.

Kaposi Mór Oktató Kórház
Aktív Mozgásszegény Sérülései Utókezelő Traumatológiai Egység
Kaposvár

2012. 05. 15.

PTE ETK Egészségtudományi Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. BÓDIS József PhD, DSc
egyetemi tanár, MTA doktora, rektor

PTE ETK Egészségtudományi Doktori Iskola
Vezető: Prof. Dr. BÓDIS József PhD, DSc
egyetemi tanár, MTA doktora, rektor

Az ízületek alkotórészei

Obliquát



Synovialis membrán

Ízületi porc

Rostos ízületi tok

Synovialis folyadék

Ízületi szalagok

Járulékos

- Discusok, meniscusok
- Rostporcos izvápaajkák
- Ízületi tömlők és hüvelyek
- Ízületitok-feszítő izmok

Izületi szalagok

Az ízületi porc I.

I. Szuperficiális zóna
Lapos sejtek, és a porcfelülettel párhuzamosan futó kollagérostok

II. Tranzícionális zóna
Gömb alakú porcs sejtek, sok nagyméretű proteoglycan molekula

III. Radiális zóna
Gömb alakú sejtek, a kollagén rostok az ízületi nyírnal merőlegesen futnak a mechanikai erők elvezetésében vesz részt és ellenáll az összenyomó erőknek,

IV. Kalcifikált zóna
Hipertrófiázott sejtek, meszerakódás

Az összes porctérfogat 1-2 % át kitevő celluláris állomány fő feladata az extra celluláris mátrix folyamatos termelése és fenntartása.

Az összes porctérfogat 1-2% át kitevő celluláris állomány fő feladata az extra celluláris mátrix folyamatos termelése és fenntartása.

Az ízületi porc II.

Kollagének: Főként strukturális (szakítottzilárság) szerepük van 90%-ban II. tp. Kollagén.

IV, VI, IX, X és XI-es st. kollagének, strukturális és szabályozó feladatok

Proteoglikánok: Strukturális (kompressziós ellenállás) és szabályozó szerep

Központi fehérjézől + GAG (Chondroitin-4,6-szulfát, keratán-szulfát, dermatán-szulfát)

Aggrecan: térkitöltő, strukturális funkció, kompressziós ellenállás biztosítása

Decorin: a fibrillogenezisben van szabályozó szerepe, interakció számos bioaktív molekulával

Biglycan: IV. zóna mineralizációjában regulátor funkciója van, BMP-4

Fibromodulin: II kollagénhéz kötődik, fibrillogenezis inhibitora, TGF-beta

Az ízületi porc feladata

- Az ízületi felszínek közötti erőátvitel biztosítása,
- Szinte súrlódásmentes mozgást tesz lehetővé ,
- Az ízületben belül szétoszlatja a ráható erőt
- Csillapítja a rázkódást

- Az üzleti felszínnek közötti erőátvitel biztosítása,
- Szinte súrlódásmentes mozgást tesz lehetővé ,
- Az üzleten belül szétosztja a ráható erőket
- Csillapítja a rázkódást

A synovialis folyadék

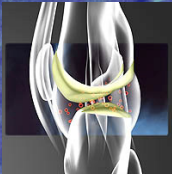
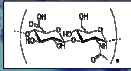
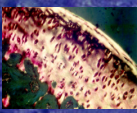
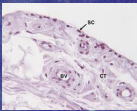
Összetétel

+ LUBRICIN (PG4)

+ Enzimek, Glucose, Proteinek, Lipidek, Ionok, stb.
+ néhány száz fagocitáló mononukleáris sejt

Szerepe:

- Kenés, súrlódás csökkentése ($\mu < 0,001$, $P \leq 100$ atm és $\tau \leq 10^6$ Hz)
- Táp- és salakanyag transzport
- Rázkódás csillapítása



Sérülés

Instabilitás

Immobilizáció

Synovitis

Az ízületi folyadék mennyiségi és minőségi változásai

Porcszöveti stressz

Chondrocyta adaptáció

Chondrocyta apoptózis/nekrozis

Arthrosis

Gyógygyulladás

Gyógyulás

Egyszeri bevérzést követően csökkent az érintett ízület hyalinpórában a hevízőzám tartalom

Experimental Haemarthrosis in Rhesus Monkeys: Morphometric, Biochemical and Metabolic Analyses

D. H. Zeman,* E. D. Roberts,* H. Shoji,* and T. Miwa*

Department of Veterinary Pathology, Louisiana State University, School of Veterinary Medicine, Baton Rouge, LA 70803 and *Department of Orthopaedics, Louisiana State University, Baton Rouge, LA 70803

Proteoglycan degradation in hemarthrosis

The effects of a single episode of acute joint injury on the proteoglycan content of articular cartilage were determined in the knee joints of 12 adult male Rhesus monkeys. The monkeys were divided into two groups: a control group and a hemarthrosis group. The hemarthrosis group was subjected to a single episode of acute joint injury, which resulted in a large volume of blood being injected into the joint space. The monkeys were then sacrificed 24 hours after the injury, and the knee joints were removed and fixed in formalin. The articular cartilage was then sectioned and stained with toluidine blue. The proteoglycan content of the cartilage was determined by measuring the optical density of the stained areas. The results showed that the proteoglycan content of the cartilage was significantly lower in the hemarthrosis group compared to the control group. This suggests that a single episode of acute joint injury can lead to a rapid degradation of proteoglycans in articular cartilage.

BLOOD-INDUCED JOINT DAMAGE

A Human In Vitro Study

GORD RICHMOND, MARIE E. VANDER, JAMES J. M. MARK, H. MARK, and VAN BIERO, TERRY P. G. LATTER, and JOHANNES W. P. BULLMAN

Objective: To investigate mechanisms underlying cartilage damage caused by brief exposure of cartilage to blood, with a view to identifying factors responsible for the damage.

Methods: Human articular cartilage was exposed to blood for 4 days in the presence of various concentrations of protease inhibitors. The cartilage was then stained with toluidine blue and the proteoglycan content was determined by measuring the optical density of the stained areas. The results showed that the proteoglycan content of the cartilage was significantly lower in the blood-exposed group compared to the control group. This suggests that brief exposure of cartilage to blood can lead to a rapid degradation of proteoglycans in articular cartilage.

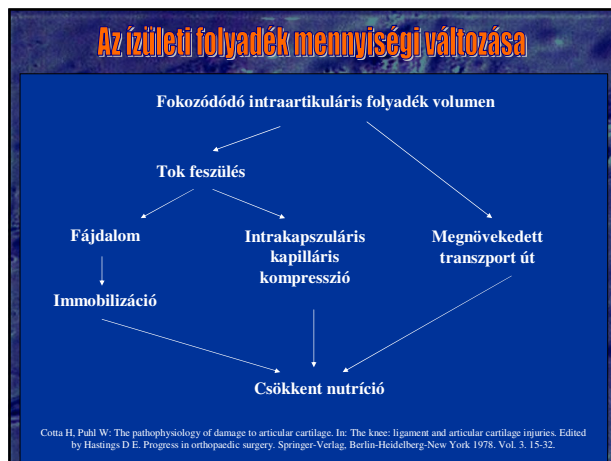
BLOOD-INDUCED JOINT DAMAGE

A Canine In Vitro Study

GORD RICHMOND, JAMES H. DAVENPORT, MARIE E. VANDER, J. M. MARK, H. MARK, and VAN BIERO, TERRY P. G. LATTER, and JOHANNES W. P. BULLMAN

Objective: To investigate the direct and indirect effects of blood on articular cartilage in the canine knee joint.

Methods: Canine articular cartilage was exposed to blood for 4 days in the presence of various concentrations of protease inhibitors. The cartilage was then stained with toluidine blue and the proteoglycan content was determined by measuring the optical density of the stained areas. The results showed that the proteoglycan content of the cartilage was significantly lower in the blood-exposed group compared to the control group. This suggests that brief exposure of cartilage to blood can lead to a rapid degradation of proteoglycans in articular cartilage.



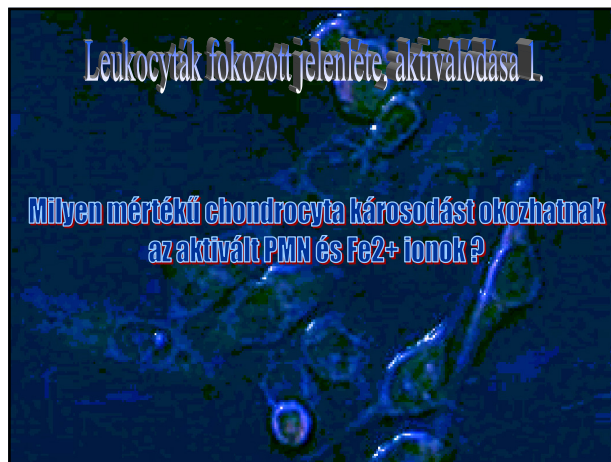
Az ízületi folyadék minőségi változása

	Synovial fluid	Plasma
Na ⁺ (mM)	145	135-145
Cl ⁻ (mM)	111	100-108
Urea (mg/100ml)	8.2	3-7
Urate (mg/100ml)	1.55	1.84
Glucose (mg/100ml)	66	70-110
Total lipid (g/100ml)	0.24	0.7
Phospholipid (g/100ml)	0.08	0.2
Protein (g/100ml)	1.9	6.77
Albumin (g/100ml)	1.2	3.27
γ-Globulin (g/100ml)	0.24	1.13
Hyaluronate (g/100ml)	0.2-0.4	4.2x10 ⁻⁶
Colloid osmotic pressure (cmH ₂ O)	12-15	35
Cellular components	WBC: 60-375/mm ³ (mainly mononuclear phagocytes)	WBC: 4.3-10.8x10 ⁹ /mm ³ RBC: 4.2-5.9x10 ¹² /mm ³

Ozmotikus stressz:
intracelluláris jelátviteli utak aktiválódása

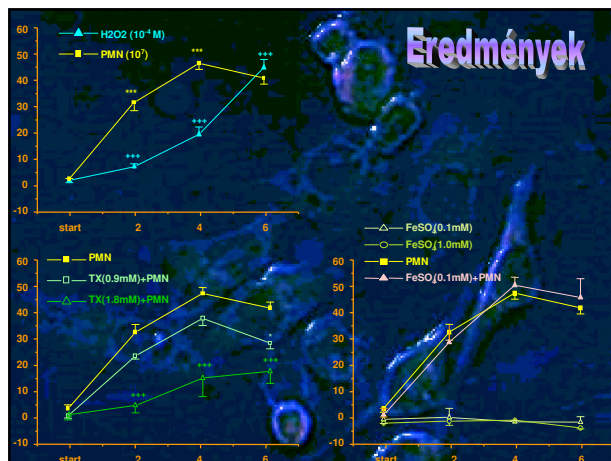
Leukocyták fokozott jelenléte, aktiválódása:
Oxidatív stressz
Cytokín túlterhelés

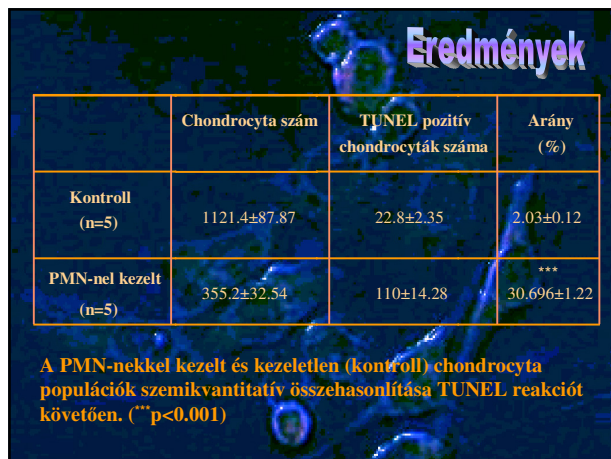
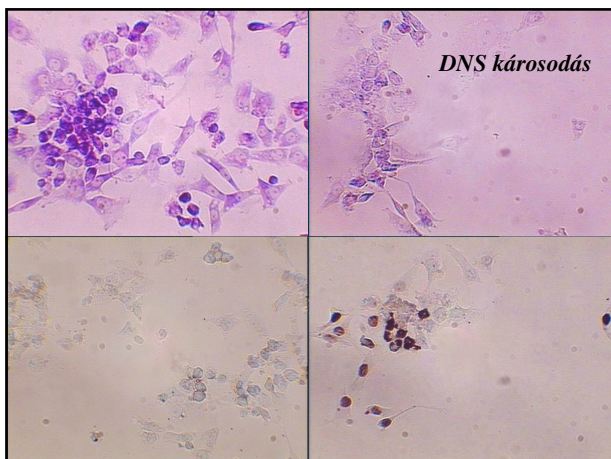
Levick JR. Synovial fluid and the joint. In: The joint. A practical approach. Oxford: Blackwell Science, 1997:150-152.



I.: Chondrocyták + PMA + PMN
II.: Chondrocyták + PMA + H₂O₂ (10⁻⁴ M)
III.: Chondrocyták + PMA + FeSO₄ (0.1mM)
IV.: Chondrocyták + PMA + FeSO₄ (1.0mM)
V.: Chondrocyták + PMA + PMNs + FeSO₄ (0.1mM)
VI.: Chondrocyták + PMA + PMNs + Trolox (0.9mM)
VII.: Chondrocyták + PMA + PMNs + Trolox (1.8mM)

4 Referencia csoport





Következtetések 1.

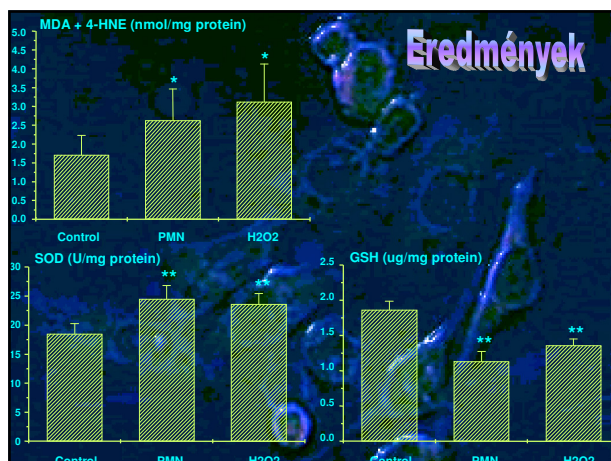
- Az akut haemarthros során drámaian megnövekvő létszámuknak és az általuk termelt ROI közvetlen cytotoxikus hatása miatt a PMN-ek joggal tarthatók a porc-károsodás egyik fő okozójának.
- Bár a vasionokat sokan kulcs fontosságú résztvevőnek tartják a haemarthrosis patomechanizmusában, rövid távú szerepe a chondrocyta degradációban nem egyértelmű.
- Az aktivált PMN-ek chondrocyta DNS-t károsító hatása szerepet játszhat az akut traumás haemarthros későbbi következményeinek kialakulásában.

Leukocyták fokozott jelenléte, aktiválódása 2.

Aktivált PMN-ek létrehozhatják-e az oxidatív stressz állapotát chondrocytákban?

Módszer

- Chondrocyta izolálás és tenyésztés, PMN izolálás
- Chondrocyták inkubálása 6 órán át PMN-ekkel és 10^{-4} M hidrogén peroxiddal
- Az oxidatív stressz biokémiai monitorozása
 - A chondrocyták endogén scavenger statusának meghatározása: intracelluláris glutathion (GSH) mennyiségének mérése intracelluláris superoxid dizmutáz (SOD) aktivitásának meghatározása (Colorimetric assay kit Calbiochem; USA)
 - A porcsejtek lipidperoxidációs membránkárosodásának vizsgálata: chondrocyta homogenizátum malondialdehid (MDA) és 4-hidroxi-2(E)-nonenal (4-HNE) mennyiségének meghatározása (Colorimetric assay kit, Calbiochem; USA)



Következtetések 2.

- A lipidperoxidáció fokozódása és az endogén scavenger státusz változásai azt mutatják, hogy aktivált PMN-ek in vitro körülmények között, képesek chondrocytáknak oxidatív károsodásokat okozni.

Leukocyta fokozott jelenléte, aktiválódása 3.



Van-e leukocita aktiváció in vivo, akut klinikai haemarthros esetén?

Módszer

Az ízületi üregben és a perifériás vérben lévő leukocyta és különösen a PMN-ek funkcionális állapotának vizsgálata a chemiluminometria, a flow cytometria módszereivel.

PTE ÁOK Balesetsebészeti és Kézsebészeti Klinika

22 akut térdizületi haemarthrosban szenvedő beteg (4 nő és 18 férfi)

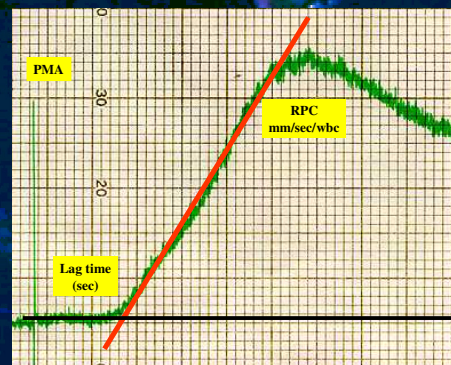
A sérüléstől a punctioig eltelt idő: 18.27 ± 17.2 óra

Sérülés	No.
ACL sérülés	5
Distorsio *	11
Meniscus sérülés	1
Osteochondralis törés	5
Patella	3
Tuberculum intercondylare	2
Femur condylus	1

*Definitív sérülést frizálás és Rtg vizsgálatnál nem tudunk igazolni

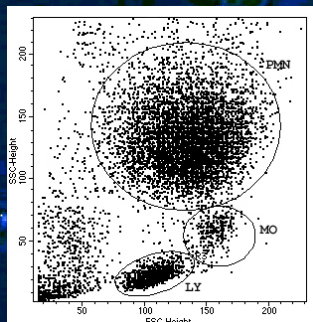
Chemiluminometria

CHRONO-LOG 560-VS dual channel, whole blood lumi-aggregometer



Flow cytometria

Az izülettől és a perifériás vérből származó minták festése (FITC)-conjugált egér anti-human CD11a, CD18 and CD97 monoclonális antitestekkel

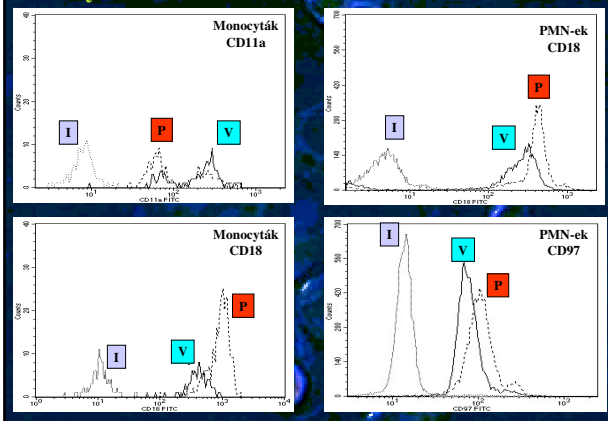


Eredmények

Chemiluminometria

	RPC	Lag time
Periféria	0.0308 ± 0.004	238.7 ± 26.1
Izület	$0.05913 \pm 0.01^*$	$178.0 \pm 17.07^{**}$
P<0,05 *		
P<0,001 **	0.01461	0.00272

Flow cytometria



Mean channel fluorescence intensity

	CD11a		CD18		CD97	
	Blood	Effusion	Blood	Effusion	Blood	Effusion
PMN	75.25±12.76	74.78±14.8	285.41±52.45	345.98±53.3***	65.53±10.99	76.6±19.15**
Lymphocyte	137.85±32.57	128.56±34.21	115.13±30.84	162.99±116.3	59.08±15.85	49.18±16.54
Monocyte	224.20±54.23	188.4±56.8**	476.18±114.6	592.92±159.4	171.16±44.91	173.65±67

Percentage of mAb positive cells (* p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.)

	CD11a		CD18		CD97	
	Blood	Effusion	Blood	Effusion	Blood	Effusion
PMN	94.17±8.42	86.79±21.20	94.73±6.86	93.44±7.76	94.81±5.58	87.1±19.31
Lymphocyte	94.39±3.67	92.59±6.68	95.85±2.95	92.77±8.77	22.69±16.34	38.9±20.5***
Monocyte	99.09±1.69	99.57±0.90	99.82±0.36	99.80±0.61	98.60±1.82	98.78±2.22

Következtetések 3.

• Az ízületből származó minták esetén a PMN-eken mérhető fokozott CD18 és CD97 sejtfelszíni antigén expresszió továbbá a CD97 pozitív leukocyták számának emelkedése és a megnövekedett ROI produkció meggyőzően bizonyítja a leukocyták aktiválódását.

• Tekintettel arra, hogy a legkorábbi synovialis elváltozások az egyszeri haemarthrost követő 4. napon mutathatók ki, a leukocyta aktiváció mindenbizonnyal ezt megelőzi.

• Ezek alapján úgy gondoljuk, hogy a leukocytáknak, de különösen a PMN-eknek iniciátor szerepük lehet az akut haemarthros okozta ízületi elváltozások patomechanizmusában.

Leukocyták fokozott jelenléte, aktiválódása 4.

Intraartikuláris cytokin túlterhelés akut haemarthrosban

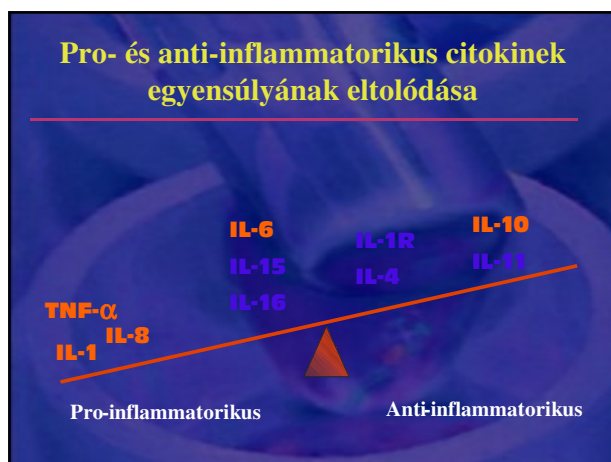
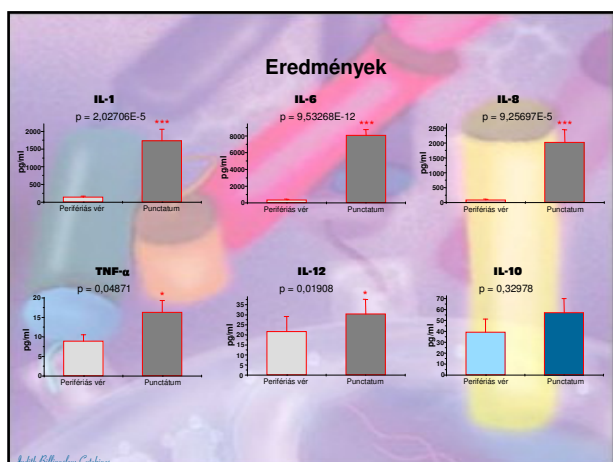
Módszer

Vizsgálataink során 28 (23 férfi és 5 nő) akut térsérülést szenvedett betegről, a sérülést követő 12±11 órában, steril körülmények között elvégzett ízületi punctio során az ízületi folyadékból mintát vettünk, amelyet vénás vérrel hasonlítottunk össze. Flow cytometriás mérések során, Human Inflammation Kit (BD Biosciences, USA) segítségével határoztuk meg az IL-1, IL-6, IL-8, IL-10, IL-12 és TNF-alfa mennyiségét az egyes mintákban, majd statisztikai analízist végeztünk.



A cytokinek hatásai

Név	Szekretálódás	Hatás
IL-1	PMN-ek, synovialis sejtek, Chondrocyták, monocyták	Makrofágok: IL-6, PGE2 és MMP szekréció fokozódik. T és B lymphocyták stimulációja. Chondrocyták: katabolikus folyamatok aktiválódása, apoptózis, ADAMTS4 fokozott expressziója
TNF-alfa	PMN-ek, synovialis sejtek, chondrocyták	IL-6, IL-8 szekréció fokozódása. Chondrocyták: katabolikus folyamatok aktiválódása, apoptózis, ADAMTS4 fokozott expressziója
IL-6	synovialis sejtek, Chondrocyták, monocyták	PGE2 és MMP szekréció fokozódik. B lymphocyták stimulációja és antitest termelése fokozódik
IL-8	synovialis sejtek, chondrocyták, monocyták, makrofágok	PGE2, MMP és ROS szekréció és leukocyta kemotaxis fokozódik.
IL12	B sejtek, makrofágok	INF-γ termelés és sejt mediálta immunfunkciók stimulációja
IL-10	chondrocyták, monocyták, makrofágok	Gátolja a többi citokin termelődését. Gátolja a lymphocyták és makrofágok mediálta celluláris immunfolyamatokat. Fokozza a B-sejt proliferációt és az antitest termelést



Következtetések 4.

Az általunk mért jelentősen megemelkedett intraarticularis citokin értékek egyrészt ismételtten alátámasztják a synovitis megelőzően kialakuló sejt aktivációt, amelyben előkelő helyet foglalnak el a PMN-ek. Továbbá eredményeink magyarázatul szolgálhatnak a korábban már in vitro kimutatott chondrocyta pusztulásra, illetve apoptotikus elváltozásokra, amelyek végső soron a porc szövet degradációjához vezethetnek.

Ozmotikus stressz és szignáltranszdukció

A porc szövet intersticiumának ozmolaritása (350-450 mOsm) terheléstől függően változik, amelyhez adaptálódott ozmoregulációs rendszerrel rendelkeznek a chondrocyták.

Ez, a fiziológiásan is változó ozmotikus környezet, befolyásolja metabolikus aktivitásukat és felelős bizonyos jelátviteli utak regulációjáért.

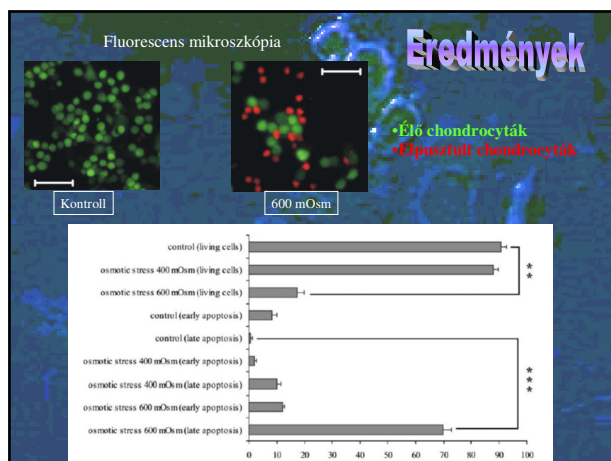
Az intraartikuláris környezet kolloid ozmotikus nyomása duplájára nő

Ez elvileg akadály nélkül terjedhet át a mátrix intersticiumára

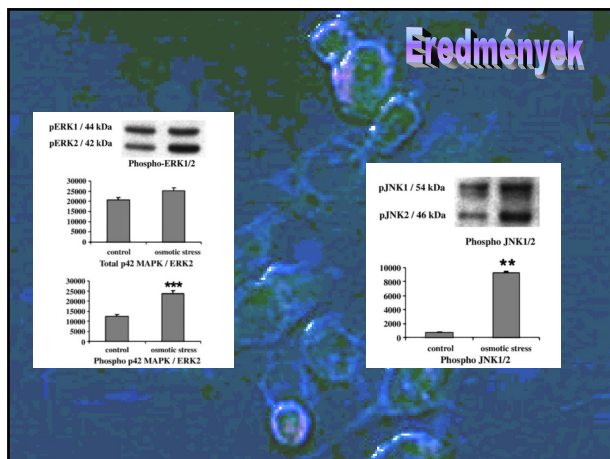
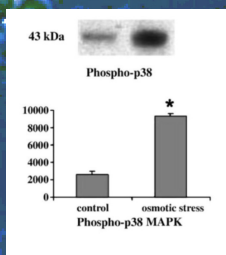
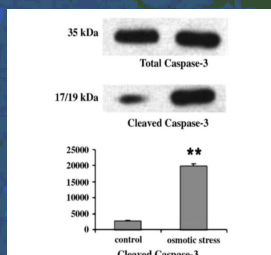
Milyen hatással van a hiperozmotikus stressz a chondrocyták túlélésére?
Milyen intracelluláris jelátviteli utakat aktivál az ozmotikus nyomás emelkedése?

Módszer

1. Chondrocyta izolálás és tenyésztés
2. Reverz transzkriptáz-PCR a chondrocyta de-differenciálódás vizsgálatára
3. Chondrocyta viability tesztek (MTT és flowcytometriás „live/dead viability cytotoxicity assay”)
4. Apoptózis vizsgálat Annexin-V és propidium jodid kettős jelölésű flowcytometriával
5. Western blot analízis az ERK1/2, p38MAPK, JNK1/2, caspase-3 expressziójának vizsgálatára



Eredmények



Összegzés

Igazoltuk, hogy az aktivált PMN-ek jelentős chondrocyta károsító hatást fejtenek ki in vitro körülmények között, amely reakciókban a vas ionoknak korlátozott szerepe van.

Kimutattuk, hogy a PMN eredetű ROI felelősek az oxidatív stressz kialakulásáért, az endogén védelmi rendszerek károsodásáért és a chondrocyta DNS sérüléséért in vitro chondrocyta tenyészetekben.

Klinikai vizsgálataink alapján rávilágítottunk arra, hogy a leukocita aktivációnak, ezen belül az aktivált PMN-ekből felszabaduló ROI, valamint az intraartikuláris citokin túlterhelésnek fontos szerepe lehet az ízületbe hatoló sérülések pathomechanizmusában.

In vitro vizsgálataink során kimutattuk, hogy az ozmotikus stressz hatására a porcszövetek főként késői apoptózissal pusztulnak el. Ezt támasztja alá, hogy a hyperozmotikus környezet számos proapoptotikus jelátviteli molekulát (JNK, p38, caspase-3, ER1/2) aktivált ezekben a sejtekben.

Köszönetnyilvánítás

PTE ÁOK Kísérletes Sebészeti Intézet

Prof. Dr. Róth Erzsébet
Dr. Temes Gyula PhD
Dr. Lantos János PhD
Dr. Szántó Zsolt PhD
Dr. Ferencz Andrea PhD
Dr. Gasz Balázs PhD
Dr. Jancsó Gábor PhD
Dr. Mohamed T. Jaberansari PhD
Dr. Süvecz Györgyné
Karádiné Sztárai Mária
Pintérné Henrich Éva
Tóthné Fajók Csilla
Abrudbányai Katalin
Horváth Beáta
Gelencsér Györgyné
Bakainé Matus Ilona
Csizmadia Jánosné

PTE ÁOK Anatómiai Intézet

Prof. Dr. Csérnus Valér
Dr. Reglődi Dóra DSc
Dr. Tamás Andrea PhD

PTE ÁOK Balesetsebészeti és Kézbetegségi Klinika

Prof. Dr. Nyárády József
Dr. Zadrávecz György PhD
Dr. Kovács Ákos PhD
Dr. Fodor Barnabás

PTE ÁOK Biokémia és Orvosi Kémiai Intézet

Prof. Dr. Ifj. Gallyas Ferenc
Dr. Rácz Boglárka PhD

Singapore General Hospital Department of Experimental Surgery

Peter Mack MD, PhD
Mr. Robert Teck Hin Ng
Ms. Song In Chin

PTE ÁOK Biofizikai Intézet

Prof. Dr. Sotonyi Béla
Gramm László PhD

PTE ÁOK Orvosi Biológiai Intézet

Prof. Dr. Szeberényi József
Dr. Kiss Katalin PhD