

Pyogén csontfertőzések célzott, lokális antibiotikus terápiájának lehetősége polymethylmetacrylat kapszulák közvetítésével.

PhD értekezés tézisei

Dr. Börzsei László Zoltán

Doktori iskola vezetője: Prof. Nagy Judit M.D., PhD., D.Sc.
Programvezető: Prof. Róth Erzsébet M.D., PhD., D.Sc.
Témavezető: Prof. Nyárády József M.D., PhD.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2006.

Pyogén csontfertőzések célzott, lokális antibiotikus terápiájának lehetősége polymethylmetacrylat kapszulák közvetítésével.

PhD értekezés tézisei

Dr. Börzsei László Zoltán

Doktori iskola vezetője: Prof. Nagy Judit M.D., PhD., D.Sc.
Programvezető: Prof. Róth Erzsébet M.D., PhD., D.Sc.
Témavezető: Prof. Nyárády József M.D., PhD.

Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar

Pécs, 2006.

Bevezetés

A motorizáció elterjedésével gyakorivá váltak a nagyenergiájú sérülések és nőtt a számaránya a súlyos légyszöveti, ízületi és csontsérüléseknek. A létrejövő szövetkárosodás elősegíti a baktériumok megtapadását, elszaporodását és invázióját. A fertőzések jelentős része a mikroorganizmusok sikeres multiplikációját jelenti a szervezetben. Fertőzés akkor alakul ki, ha egy baktérium képes elegendő számban megsokszorozni önmagát, mielőtt a szervezet eltávolítaná. Traumatológiai ellátások során gyakran találkozunk szeptikus folyamatokkal. A pyogen csontfertőzések manapság is nagy kihívást jelentenek az ellátó sebész számára. Napjainkban az exogén osteitis, osteomyelitisek száma szaporodik. A kórokozók részben a környező lágyrészek gennyes folyamataiból, részben sérülések, nyílt törések, csonton végzett műtéti beavatkozások során fertőzik meg a csontot. Zárt törések osteosynthesisei után 1 – 3%-ban, nyílt törések után 8 – 10%-ban fordul elő osteomyelitis. Exogén, purulens osteitis jöhet létre komplikált törés, lövés, szilánk sérülés okozta törés, osteosynthesisek, amputációk, csonttranszplantáció után. A fertőzés a csontra per-continuitatem terjed át, érinti a csontvelőt, a periosteumot, és a csont compact állományát is. A devitalizált csontdarabokból, szabad szilánkokból kialakult necroticus részek jó táptalajt biztosítanak a kórokozók számára. A chronicus osteomyelitisek kezelésében meghatározó az ép szövetig hatoló, kiterjesztett sebészi debridement és a hosszantartó, célzott parenterális antibiotikus terápia mellett, a lokális baktericid szintet biztosító antibiotikumot tartalmazó implantátum is.

A traumatológiai gyakorlatban néhány évtizede újdonságként jelent meg a lokális antibiotikus védelem lehetősége, melynek gyakorlata főként tapasztalati elveken nyugszik. Az antibiotikus öblítések kapcsán az öblítő folyadék mechanikus szerepén túlmenően, a mosófolyadékból az antibiotikumok, a szövetek, implantátumok felszínén elhelyezkedő baktériumokat is képesek előltni.

A védekezés ezen formájában szelektálni szükséges az antibiotikumok között. Az antibiotikumnak vízdékonynak és hőstabilnak kell lennie, hogy kibírja a csontcement polimerizációjakor felszabaduló hőt, mely akár a 100 C^o-ot is meghaladhatja. Az antibiotikum nem befolyásolhatja a csontcement mechanikai tulajdonságait, és hozzáférhetőnek kell lennie por formájában. Ezen kritériumok alapján csak néhány antibiotikum jöhet szóba. Eddigi ismereteink szerint a használatos antibiotikum a gentamicin, az oxacillin és a cefuroxim. Európán kívül, főleg Észak-Amerikában használatos a tobramicin, a vancomycin, illetve a clindamycin, az eritromicin, valamint cefalosporinok: cefazolin, cefotaxim, cefamandol.

Vizsgálataink célja

A septicus sebészetben, traumatológiában és ortopédiában használatos antibiotikum hordozó a PMMA. A csontsebészetben csontcementként használt anyag egyik fontos felhasználási területe a chronicus osteomyelitisek, a septicus ízületi és csont gennyedések terápiájában van. Mint lokális antibiotikum hordozó, a kereskedelmi forgalomban is kapható Gentamicin golyólánc vagy antibiotikum tartalmú spacer formájában. Localis antibiotikus kezelésre hőstabil, vízdékony és por formában hozzáférhető antibiotikumok alkalmazhatók, mert a PMMA polimerizációja során igen magas hő szabadul fel (80-100 °C), mely károsítja az antibiotikum szerkezetét. Ilyen tulajdonságokkal csak néhány antibiotikum rendelkezik, így nagyon beszűkül a célzottan lokálisan adható antibiotikumok köre. Ha a polimerizáció már lezajlott, akkor megszűnik a hőhatás, így gyakorlatilag bármely antibiotikum elhelyezhető egy PMMA-ból készült hordozó edényben (kapszulában), ha az antibiotikum annak falán penetrálni képes. Az előre legyártott és sterilizált kapszulákban ismert mennyiségű, az antibiogram alapján célzottan adható antibiotikum. A kiválasztott antibiotikum steril kapszulákba való töltése a műtét előtt, de akár a műtét közben is elvégezhető. Ezzel a módszerrel lényegesen kitágul a lokálisan adható antibiotikumok köre.

1. Célunk egy antibiotikum hordozó PMMA-ból készült edény kialakítása, melybe tetszés szerinti antibiotikum elhelyezhető és képes hosszú idejű terápiás koncentrációt biztosítani az infect területen.
2. Vizsgáljuk, hogy az antibiotikum képes-e áthatolni különböző vastagságú PMMA falakon.
3. Választ keresünk arra a kérdésre, hogy milyen összefüggés van a PMMA lapok vastagsága és az áthatoló antibiotikum mennyisége közt az idő függvényében.
4. Megtervezzük a legalkalmasabb és legegyszerűbben előállítható edényformát, mely a célnak megfelelhet.
5. Vizsgáljuk különböző antibiotikumok penetrációját különböző falvastagságú edényekből az idő függvényében.
6. Összehasonlító vizsgálatokat végzünk, azonos mennyiségű antibiotikumokat tartalmazó polymethylmethacrylatból készült gyöngyök és kapszulák antibiotikum kiáramlása között.
7. In vivo vizsgálataink során bizonyítani kívánjuk, hogy a kísérletesen létrehozott, radiológiailag és bakteriológiailag igazolt osteomyelitis modell esetén, terápiás hatást értünk el az általunk kifejlesztett PMMA antibiotikumot hordozó edény segítségével.
8. Szükségesnek tartjuk vizsgálni az állatkísérletek során a terápiás szakaszban lokálisan adott antibiotikum szisztémás keringésbe való jutását.

Az alábbiakban a módszereket és eredményeinket az értekezésben szereplő fejezetek tagolásában ismertetem.

Anyagok és módszerek I.

Polymethylmetacrylat (PMMA) cementlapok készítése

Különböző vastagságú cementlapokat készítettünk, melyhez Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone Cement-et (Howmedica, Rutherford, U.K.) használtunk. Az ismert csontcement sugárfogó anyagot is tartalmazó két steril komponensből áll, a gyógyászatban már hosszú ideje használatos. A két komponens összekeverését követően képlékeny állapotban helyeztük el a cementmasszát két, egymástól ismert távolságú tárgylemez közé. Ezt úgy készítettük, hogy egy tárgylemezre két oszlopban 0,1 mm vastagságú fedőlemezeket helyeztünk, majd a csontcement behelyezése után egy másik tárgylemezzel zártuk. Száradás után az üveglapokat lepattintottuk a csontcement lapocskákról. Ezen módszerrel 0,2 mm-től 0,8 mm vastagságig gyártottunk csontcement lapokat. A lapokat apró kádak középső válaszfalaként szilikonba ágyazva helyeztük el. Előzőleg fiziológiás oldattal meggyőződünk a falak vízzáróságáról. Az edényeket gázsterilizálással csíramentesítettük

Clindamycin penetrációjának vizsgálata PMMA falon keresztül

Két kísérletsorozatot végeztünk. Az elsőnél a kád egyik felét 2 ml 200 µg/ml koncentrációjú clindamycin oldattal, a kád másik felét 2 ml fiziológiás konyhasóoldattal töltöttük fel. A másiknál 300 µg/ml koncentrációjú clindamycin oldatot használtunk. Mikrobiológiai vizsgáló módszerrel standard körülmények között figyeltük meg az antibiotikum megjelenését és koncentrációjának változását a fiziológiás sóoldatot tartalmazó kádban, vagyis a különböző vastagságú csontcement lapokon történő penetrációját az idő függvényében.

Óránként 3MM szűrőpapírból (Macherey-Nagel Limited, U.K.) vágott 6 mm átmérőjű korongokkal mintát vettünk a sóoldatból.

Antibiotikum átáramlásának vizsgálata mikrobiológiai módszerrel

A fiziológiás sóoldatból vett korongokat Mueller-Hinton agaron (OXOID Limited U.K.) tenyésztett *Micrococcus luteus* ATCC 9341-es tesztörzsszel vizsgáltuk, 24 óras 37 °C-on történő inkubálás után olvastuk le a gátlási zónákat. A sóoldatok antibiotikum tartalmának kvalitatív jelzője a gátlási zóna jelenléte, kvantitatív mutatója a gátlási zóna szélessége

volt. A méréseket tolómérővel végeztük. A gátlási zónák mm-ben mért adatait standard hígítási sor alapján $\mu\text{g/ml}$ antibiotikum koncentrációkra számoltuk át.

Eredmények I.

Megállapítottuk, hogy a clindamycin ilyen koncentrációk mellett 4-5 nap múlva jut át kimutatható mennyiségben a PMMA lapokon, mind a 200, mind a 300 $\mu\text{g/ml}$ antibiotikum koncentráció esetében.

Anyagok és módszerek II.

PMMA kapszulák gyártására alkalmas présgép tervezése, kivitelezése és különböző falvastagságú, de azonos méretű kapszulák készítése
A kapszulákat magunk által tervezett és kivitelezett, bakelitből és alumíniumból álló présgéppel készítettük. Azonos nagyságú, de különböző falvastagságú edényeket gyártottunk, melyek 15 mm magas, 6 mm átmérőjű, 0.3-0.6 mm falvastagságúak, és 0.44 ml űrtartalmúak voltak. A gyártás során vízőldékony formaleválasztó oldatot használtunk. Ennek a kapszulákról történő eltávolítása után gázban sterilizáltuk és rugalmas szilikon rúdból készített dugókkal zártuk.

Különböző antibiotikumok kiáramlásának vizsgálata PMMA kapszulákból
A steril kapszulákat aszeptikus körülmények között 100 μl különböző antibiotikumot tartalmazó oldattal töltöttük fel:

- a. clindamycin 15 és 22.5 mg (Pharmacia & Upjohn, N. U/S. A. PUURS, Belgium)
- b. amoxicillin-clavulánsav 112.5 mg (Richter-Gedeon Rt., Hungary)
- c. amikacin 25 mg (Bristol-Mayers Squibb, Italy)
- d. cefotaxim 112.5 mg (Pfizer, Italy)

Vérszállító csőben lévő 1-1 ml fiziológiás NaCl oldatba helyeztük a lezárt, steril antibiotikummal telt kapszulákat. A kapszulákból kidiffundáló antibiotikumot a fent leírt, ismert, standard mikrobiológiai vizsgálmódszerrel mértük. Minden mérést háromszor végeztünk el, az eredményeket átlagoltuk, a standard hibát is feltüntettük a grafikonokon.

Eredmények II.

A clindamycin penetrációja különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:

A kapszulákkal végzett vizsgálatoknál az antibiotikum felszabadulását az 5. naptól kezdve detektáltuk. A gátlási zónák szélessége az idő előrehaladtával mindkét koncentráció (15 mg/100 µl, 22.5 mg/100 µl) esetében a falvastagságtól függetlenül növekedett, de vékonyabb falvastagság esetén (0.4 mm) a növekedés mértéke kisebb, mint a nagyobb falvastagságú kapszulák (0.5-0.6 mm) esetén.

Amoxicillin-clavulánsav penetrációja különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:

A vékony falú (0.3-0.4-0.5 mm) kapszulákból az antibiotikum felszabadulást a harmadik naptól észleltük. Állandó, de kis átmérőjű gátlási zónák voltak megfigyelhetők a 17-29. napig. A 0.4 mm-es falvastagságú kapszulákból a diffúzió a 29. napig tartott.

A cefotaxim kiáramlása különböző falvastagságú PMMA kapszulákból:

A cefotaxim felszabadulás minden esetben már az első naptól mérhető volt. Vékony (0.3 mm) falvastagság esetén tartósan magas antibiotikum diffúziót figyeltünk meg 38 napon keresztül, a gátlási zónák 30-40 mm átmérőjűek voltak. Vastagabb falú kapszulák esetében a penetráció kisebb mértékűnek bizonyult és 15-21 napig zajlott.

Amikacin kiáramlása PMMA falon keresztül:

Minden falvastagság esetén a harmadik napot követően 5 mm-t meghaladó gátlási zónákat mértünk. Mindez tartósan fennállt a 40 napos vizsgálati periódus alatt mindhárom falvastagság esetében. A 0,5 mm falvastagságú kapszulákból felszabaduló antibiotikum vizsgálata során 30-40 mm átmérőjű gátlási zónákat mértünk.

Anyagok és módszerek III.

PMMA-ból készült antibiotikum hordozó kapszulák és gyöngyök összehasonlító vizsgálata

Azonos térfogatú és falvastagságú kapszulák készítése és különböző antibiotikumokkal való töltése

A PMMA-ból készített vivőedény falán az antibiotikumok képesek átáramolni. Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone cementből (Howmedica Rutherford UK) kapszulákat állítottunk elő az általunk tervezett és kivitelezett présgép segítségével, mely bakelitből és alumíniumból készült. A kapszulák azonos nagyságúak, 15 mm magasak, 6 mm átmérőjűek, 0.3 mm falvastagságúak (0.44 ml űrtartalmú) voltak. A gyártás során vízdékony és

zsiroldékony formaleválasztó oldatokat használtunk. Ezek eltávolítása után a kapszulákat sterilizáltuk és szilikon rúdból készült dugóval zártuk. Csoportonként 6-6, összesen 36 kapszulába steril körülmények között 2 ml-es fecskendővel 23 G-s tűvel az alábbi antibiotikumok valamelyikét töltöttük. A szám adatok az egy kapszulába töltött antibiotikum mennyiségét mutatják 0.4 ml térfogatban:

- a. amikacin (0.1 g)
- b. clindamycin (0.06 g)
- c. piperacillin+tazobactam (0.08 g)
- d. amoxicillin+clavulansav (0.02 g)
- e. cefotaxim (0.1 g)

Különböző antibiotikumokat tartalmazó gyöngyök készítése

Ismert mennyiségű csontcementhez (5 g por, 2 ml oldószer) ismert mennyiségű antibiotikumokat kevertünk steril körülmények között, ezekből 6-6, összesen 36 db, átlagosan 12 mm átmérőjű és 1 g átlagos tömegű gyöngyöt készítettünk. A kapszulák és a gyöngyök töltését steril körülmények között végeztük.

A gyöngyök alapanyaga Howmedica Surgical Simplex P Radiopaque Bone cement volt (5 g por és 2 ml oldószer; Howmedica, Rutherford, UK), melyhez a megszilárdulás előtt steril körülmények között az alábbi antibiotikumok valamelyikét kevertük és 6 db gyöngyöt készítettünk belőle. Az alábbi szám adatok a gyöngyök átlagos átmérőjét és tömegét mutatják \pm s.e.m.

- a. amikacin (0.6 g; Amikin, Bristol Myers Squibb, USA): 12.25 \pm 0.28 mm átmérőjű és 1.17 \pm 0.06 g tömegű gyöngyök
- b. clindamycin (0.36 g; Dalacin, Pharmacia & Upjohn N U/S. A. PUURS, Belgium): 13.0 \pm 0.37 mm átmérőjű és 1.27 \pm 0.07 g tömegű gyöngyök
- c. piperacillin+tazobactam (0.5 g; Tazocin, Wyeth,): 12.33 \pm 0.21 mm átmérőjű és 0.98 \pm 0.15 g tömegű gyöngyök
- d. amoxicillin+clavulansav (0.14 g; Augmentin, SmithKline Beecham UK): 12.33 \pm 0.24 mm átmérőjű és 1.11 \pm 0.09 g tömegű gyöngyök
- e. cefotaxim (0.57 g; Claforan, Human Hungary): 12.25 \pm 0.16 mm átmérőjű és 1.18 \pm 0.07 g tömegű

A lezárt, steril, antibiotikumokat tartalmazó kapszulákat és gyöngyöket külön-külön 2 ml fiziológiás NaCl oldatot tartalmazó edényekbe helyeztük.

Eredmények III.

Amikacin kiáramlás

Az amikacin mártogatásos módszerrel mért eredményei során a kapszulák esetében magas (850 µg/ml) értékeket mértünk a 15. napig, ezt követően a vizsgálat befejezéséig, a 31. napig az érték egyenletesen 150-180 µg/ml-es koncentrációra állt be. A kapszuláknál a gyógyszerleadás dinamikáját vizsgálva azt kaptuk, hogy az 1. napon az antibiotikum 56 %-át adta le, majd a 9. napig folyamatosan egyenletes leadás történt, ezt követően nem volt mérhető antibiotikum leadás. A gyöngyök vizsgálatakor az 1. naptól a 31. napig közel egyenletes, 200-300 µg/ml-es értékeket mértünk, míg a leadás dinamikáját vizsgálva az 1. naptól a 8. napig egyenletesen csökkenő értékeket kaptunk. A MIC érték *Micrococcus luteus*-ra vonatkoztatva 0,1 µg/ml.

Clindamycin kiáramlás

A clindamycin a vizsgálat teljes ideje alatt igen magas, 2000-5000 µg/ml-es antibiotikum leadást detektáltunk a kapszulák esetében, amely valószínűleg tovább is folytatódott volna. A leöntéses módszerrel azt tapasztaltuk, hogy az 1. napon meghaladta a leadás az 53 %-ot. A gyöngyöknél alacsony, 100-500 µg/ml-es értékeket detektáltunk a 17. napig. A dinamikára vonatkozóan az 1. nap a teljes antibiotikum tartalom 12 %-át adta le, majd egyenletesen csökkenő értékeket mértünk a 15. napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

Piperacillin+tazobactam kiáramlás

A piperacillin+tazobactam tartalmú kapszulák vizsgálatakor a 15. napig egyenletesen emelkedő koncentrációkat mértünk 1200 µg/ml-es értékig, majd meredek csökkenés után a 22. naptól nem volt detektálható antibiotikum leadás. A dinamikáját tekintve 3 nap alatt a teljes érték 69 %-át adta le, majd a 12. napig egyenletes értékeket mértünk. A gyöngyöknél igen alacsony antibiotikum leadás volt tapasztalható a 19. napig, 5-40 µg/ml-es értékeket mértünk. A leadás dinamikáját vizsgálva a 3. napig 38 %-os antibiotikum leadás történt, majd egyenletesen csökkenő tendenciát mutatott a 12. napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,8 µg/ml.

Amoxicillin+clavulansav kiáramlás

Az amoxicillin/clavulansavat tartalmazó kapszulák 10 napig egyenletesen csökkenő leadást mutattak, a 6. napon hirtelen eséssel 10 µg/ml-ről 3 µg/ml-re. Ezután gyorsan csökkenő, majd a 19. naptól mérhetetlen koncentrációkat kaptunk. A kapszulák az 1. napon az összmenyiség 72 %-át adta le, majd igen alacsony értékeket detektáltunk a 12. napig. A gyöngyökből csak a 3. napon volt mérhető a felszabaduló antibiotikum koncentráció igen alacsony, 0,2-0,5 µg/ml volt, mely a 17. nap után már nem volt mérhető. A dinamikáját tekintve is egyenletesen alacsony antibiotikum koncentrációt mértünk 10 napig. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

Cefotaxim kiáramlás

A cefotaxim tartalmú kapszulákból 100-250 µg/ml koncentrációval szabadult fel az antibiotikum a 13. napig, majd egyenletesen csökkenő leadás volt mérhető a 30. napig. Az antibiotikum leadás dinamikája oly módon alakult, hogy a 3. napig 10 %-ot, majd a 10. napig 87 %-ot adott le, ezt követően még 10 napig egyenletesen alacsony értékek voltak mérhetőek. A gyöngyök esetében alacsony, 20-120 µg/ml koncentrációkat mértünk a 12. napig, majd egyenletesen csökkenőket a méréssorozat végéig. Az antibiotikum tartalom 63 %-a a 3. napig felszabadult, majd a 6. nap után nem mértünk aktivitást. A *Micrococcus luteus* ATCC 9341-re vonatkoztatott MIC értéke 0,1 µg/ml.

Anyagok és módszerek IV.

In vivo vizsgálatok

Kísérletes osteomyelitis létrehozása házinyúl tibia modellben

A PTE Központi Állatházában eltelt két hetes akklimatizációs periódust követően chronicus osteomyelitist indukáltunk 20 egészséges nőtény házinyúl (2.2-2.3 kg) bal tibiájában. Az operációkat narkózisban végeztük úgy, hogy a narkózis beálltával a műtéti területet 1 %-os Lidocainnal infiltráltuk is. Testsúlykilogrammonként 1-1 ml diazepam (Seduxen®) és ketaminum (Calypsol®, Richter Gedeon Rt., Hungary) intramusculáris adását követően a műtéti területet szörtelenítettük, majd kellő dezinficiálás után (Betadine®, Polyvidonum jodátum komplex, Mundipharma AG-Basel, Svájc) a steril műtéti területre 2-3 ml 1%-os Lidocaint fecskendeztünk. A tibia proximális elülső felszínét tártuk fel kb. 2-3 cm-es metszésből. A tuberositas tibiae magasságában kb. 4 × 8 mm-es csontlemezt véstünk ki, a velőúrt curettáltuk és fiziológiás sóoldattal kiöblítettük. Az eltávolított cortikális darabot öt

percig forró vízfürdőben hagytuk. Ezt a devitalizált csontdarabot, mint preformált sequestert a velőürbe visszahelyeztük és mellé 1 ml 10^9 csíra/ml *Staphylococcus aureus* (OKI 118003) fiziológias sóoldatban injiciáltunk és a műtéti sebet két rétegben zártuk.

Mini kapszulák készítése és Tazocinnal való töltése

Magunk által tervezett és bakelitből és alumíniumból kivitelezett présgépet módosítottuk mini kapszulák készítésére. Azonos nagyságú, de különböző falvastagságú edényeket gyártottunk, melyek 8 mm magas, 6 mm átmérőjű és 0.3-0.6 mm falvastagságúak voltak (0.23 ml űrtartalom). A gyártás során vízőldékony formaleválasztó oldatot használtunk. Ennek a kapszulákról történt eltávolítása után sterilizáltuk, 0.1 ml Tazocin oldattal (0.02 g piperacillin + 0.005 tazobactam; Wyeth-Lederle Pharma, USA) töltöttük és szilikon rúdból készült dugóval zártuk

Mikrobiológiai vizsgálómódszerek

A bakteriológiai vizsgálatokat közvetlenül a terápiás műtétet megelőzően (sebészi debridement és Tazocin tartalmú kapszula implantációja) a velőürből történt mintavétel után végeztük. A direkt leoltás véres és csokoládé agaron, eozin–metilénkék táptalajon, valamint Holman dúsítóban történt. Ugyanezekre a táptalajokra oltottuk ki a Holman dúsítóból Gram-festéssel telepmorphológiai vizsgálattal és biokémiai próbákkal (Koaguláz teszt, polyprop táptalaj) azonosítottuk a kitenyésztett baktériumokat. A keringésbe jutott antibiotikum mennyiségének meghatározásához minden harmadik napon vérmintát vettünk a nyulakból és a Tazocin koncentrációt mikrobiológiai lemezöntéses technikával vizsgáltuk

Radiológiai vizsgálatok

Az első röntgenképeket 6 héttel a *Staphylococcus aureus*-szal történt velőür infekció után készítettük, hogy megbizonyosodjunk az osteomyelitis kifejlődéséről. A második radiológiai vizsgálatot a Tazocinnal telt PMMA kapszulák implantációját követő nyolcadik héten végeztük, hogy megítéljük a gyógyulás mértékét, valamint vizsgáltuk a kontroll csoportot is. Független vizsgáló értékelt ki a Rtg felvételeket, aki nem ismerte a kezelési protokollt. Norden és munkatársai (1986) által leírt szemikvantitatív score-rendszer alapján értékelt ki a röntgenfelvételeket. Öt paramétert figyeltek meg minden csont esetén (sequestrált csont formáció, periostealis új csont, csontdestrukció, lágyszöveti csont calcificatio, lágyszöveti duzzanat mértéke).

Histológiai vizsgálatok

A második röntgen vizsgálatot követően a 15 állatot altatás után kivérettük, majd a bal csípőízületet exartikulálva eltávolítottuk az állatok végtagját, és mind az implantált, mind a kontroll csoport mintáit szövettani vizsgálatra küldtük. A nyúl combcsont mintákból 4 %-os pufferolt formalinban (PTE ÁOK Gyógyszertár) történt fixálást követően a lágyrészek egy részét eltávolítottuk, a makroszkóposan kóros megjelenésű izom- ill. kötőszövetes területekből szövettani vizsgálatra mintát tettünk félre. A csontos anyagot ezt követően szükség szerint változó ideig (általában 5-7 napig) dekalcináltuk. Több síkban metszeteket készítettünk, ezeket haematoxylin-eosinnal festettük

A szövettani vizsgálatok szemikvantitatív értékelését független patológus végezte a granulocytá szám, a necrosis kiterjedése, a trabecularis corticalis destrukció mértéke, reparációs jelek és a lágyszöveti érintettség kiterjedése alapján. A metszeteket az alább látható szemikvantitatív histológiai rendszer alapján értékeltük, melynek paramétereit magunk határoztuk meg (2. táblázat). Az ezen paraméterek alapján adott pontszámokat összegeztük és így egy összesített osteomyelitis pontszámot kaptunk, melynek maximális értéke 8 volt.

Eredmények IV.

A kísérletes osteomyelitis létrehozását követő fizikális, radiológiai és mikrobiológiai vizsgálatok eredményei

A kísérleteket 20 egészséges állaton végeztük. Első lépésként az összes állatot *Staphylococcus aureus* (OKI 118003) műtétilag fertőztük. Az operált állatokat hetente fizikálisan kontrolláltuk. A műtétet követő harmadik héten négy állatnál étvágytalanságot, gyengeséget, az operált végtag atrofiját és a térdízületi flexiós kontraktúráját figyeltük meg. Az első négy héten öt állat elpusztult septicus szövődmények következtében, ezeket minden értékelés alól kizártuk. A sebek váladékából izoláltuk a *Staphylococcus aureus* OKI 118003-as tesztörzset. Az osteomyelitis kifejlődése utáni hatodik hét során az összesített radiológiai pontszámok közt nem volt szignifikáns különbség (kontroll csoport: $5,5 \pm 0,2$; a később antibiotikummal kezelt csoport: $5,3 \pm 0,03$). Alapvetően minden állat súlyos osteomyelitisben szenvedett az Rtg képek alapján a második sebészi beavatkozás előtt.

A sebészi debridement és Tazocin tartalmú kapszula implantációt követő fizikális, mikrobiológiai és radiológiai vizsgálatok eredményei

A postoperatív hatodik héten a röntgen vizsgálat után 12 állatnál végeztünk sebészi beavatkozást, mely során a sebészi debridementet követően Tazocinnal telt mini kapszulákat implantáltunk a velőűrbe, ez volt a tulajdonképpeni kísérleti csoport. A három kontroll állatnál kapszula beültetés nélküli sebészi debridement történt. A következő radiológiai vizsgálatokra a második műtétet követő nyolcadik héten került sor, melyben kiderült, hogy a csont szélesebb és duzzadtabb. A corticalis terület a beavatkozás oldalán vékonyabb a kontroll állatok esetén, mint a PMMA-kapszulákkal kezelt nyulaknál. A klinikai tünetek korreláltak a radiológiai jelekkel: a kontroll állatok bal alsó végtagja atrófiás volt, kontraktúrával a bal térdízületben és solid fisztulával az incisio helyén. Ezzel ellentétben a Tazocin tartalmú PMMA kapszulával kezelt állatok közül 7 teljesen meggyógyult mind fizikálisan, mind radiológiailag. 5 esetben atrófiás bal végtagot és a térdízület minimális kontraktúráját mutatták a fizikális vizsgálatok, valamint a röntgenképek is csak kis duzzanatot mutattak a medullaris régióban. A radiológiai score értékek is szignifikáns különbséget mutattak a két csoport között (kontroll: $4,8 \pm 0,04$; kezelték: $2,9 \pm 0,03$; $**p < 0,01$; Mann-Whitney U-teszt).

Mikrobiológiai vizsgálómódszerrel, lemezőntéses technikával vizsgáltuk, hogy kerül-e antibiotikum, és milyen mennyiségben a szisztémás keringésbe a lokális antibiotikus terápia során. Azt tapasztaltuk, hogy a vizsgálat egész ideje alatt csak egy alkalommal sikerült kimutatni antibiotikumot, mely egy 20mm átmérőjű gátlási zónát hozott létre a becséppentett szisztémás keringésből vett vérminta körül. Mivel csupán ez az egyetlen pozitív eredmény volt a vizsgált időszakban, ezt külső szennyezésnek tulajdonítottuk, mely vagy a mintavétel, vagy a szállítás során keletkezhetett.

Histológiai vizsgálatok eredményei

A szövettani értékek vizsgálatakor számottevő különbséget találtunk a két csoport között. A histológiai vizsgálatok összességében az antibiotikummal kezelt kísérleti csoportnál hét esetben szövettanilag gyógyulást, három esetben a reparáció jeleit láthattuk és csak két esetben nem tapasztaltuk a gyógyulás semmilyen formáját. Az összesített szövettani score a kontroll csoportban $6,8 \pm 0,5$, a Tazocinnal telt PMMA kapszulákkal kezelt csoport esetében $3,7 \pm 0,4$ ($p = 0,002$). A különbség szignifikánsan kisebb.

Megbeszélés, új eredmények

A tézis célkitűzéseinek megfelelően olyan antibiotikum hordozó edényt fejlesztettünk ki, melybe bármely gyárilag készült antibiotikum behelyezhető és ez az edény falán áthatolva baktericid koncentrációt képes elérni a fertőzött területeken. Az antibiotikum hordozóul választott anyag a PMMA volt, mely már hosszú ideje használatos a csontsebészetben. A PMMA-t nem a szokásos formában kívántuk alkalmazni (intraoperatív kevert antibiotikum hordozó), hanem már a polimerizáció lezajlását követően kialakított kész edény formájában használtuk fel. Ezen kísérletek és vizsgálatok újdonságnak értékelhető eredményei:

1. In vitro kísérletekkel bizonyítottuk, hogy különböző falvastagságú PMMA lapokon át (0,2-0,8 mm) a clindamycin magas és alacsony koncentrációban is penetrál a fizioiógias sóoldatba a vizsgálat kezdetét követő 4-5. nap után. Azt tapasztaltuk, hogy a tesztkádakban elhelyezett antibiotikum oldatok koncentrációja egyenesen arányos az átáramló antibiotikum mennyiségével.
2. Az általunk vizsgált különböző falvastagságú PMMA lapok antibiotikum áteresztőképessége között nem találtunk szembetűnő lényeges különbséget.
3. Magunk által tervezett és kivitelezett, bakelitből és alumíniumból álló prégépet készítettünk, melynek segítségével különböző falvastagságú vivőedényeket (kapszulákat) tudunk sajtolni és ezen kapszulák segítségével tesztelhetjük a különböző antibiotikumokat in vitro és in vivo vizsgálatokkal.
4. Ugyancsak in vitro vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az általunk kiválasztott antibiotikumok mindegyike a *Micrococcus luteus* ATCC 9341 MIC értékét több százszor meghaladóan képes penetrálni a különböző falvastagságú kapszulákból.
5. In vitro összehasonlító vizsgálataink során, melynél azonos mennyiségű antibiotikumokat tartalmazó PMMA-gyöngyök és kapszulák antibiotikum kiáramlása között szignifikáns különbséget találtunk a kapszulák javára minden általunk vizsgált antibiotikum esetében.
6. In vivo vizsgálatainkkal bizonyítottuk, hogy a nyúl tibián létrehozott kísérletes osteomyelitis modellben a sebészi debridement-et követően Tazocin tartalmú PMMA kapszulák beültetése fizikális, radiológiai és histológiai gyógyulást is eredményezett.
7. Mikrobiológiai vizsgálatokkal igazoltuk, hogy az in vivo kísérletek során, annak terápiás szakaszában a lokálisan adott antibiotikum a szisztémás keringésbe nem jut be.

Köszönetnyilvánítás

Őszinte hálás köszönetemet fejezem ki Prof. Dr Róth Erzsébetnek, programvezetőmnek és Prof. Dr Nyárády Józsefnek, témavezetőmnek, egyben munkahelyi főnökömnek, akik helyes útmutatásukkal, lényegretörő tanácsaikkal segítették munkámat.

Köszönöm dr Kocsis Béla Tanár Úrnak és Kocsis Erikának a mikrobiológiai vizsgálatok elvégzésében és kiértékelésében végzett nélkülözhetetlen munkáját, valamint azt a baráti biztatást, mely erőt adott a már-már feladni készült feladat elvégzéséhez.

Ezúton köszönöm Prof Dr Seres Lászlónak az elektromikroszkópos vizsgálatok elvégzéséhez nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönöm dr Kereskai Lászlónak a szövettani vizsgálatok elvégzésében és értékelésében végzett hathatós munkáját.

Hálásan köszönöm dr Helyes Zsuzsannának azt a rendkívül sok segítséget és hasznos tanácsot, mellyel hozzájárult munkám létrejöttéhez.

Megköszönöm dr Mintál Tibor, dr Horváth Aranka és dr Koós Zoltán kollégáimnak és barátaimnak a kísérletes munkák során végzett odaadó hasznos segítségüket.

Köszönetemet fejezem ki Alföldi Éva radiológus szakaszsztensnek az Rtg felvételek elkészítéséért és Szvacsek Ferenc Úrnak a kapszulák előállításához szükséges présgép pontos és gyors legyártásáért.

Szeretnék köszönetet mondani minden kollégámnak és munkatársamnak, akik valamilyen módon segítséget nyújtottak, hozzájárultak munkám sikeres befejezéséhez.

Végül megköszönöm családomnak, feleségemnek, Máriának, lányomnak, Ritának és fiamnak, Artúrnak azt a megértést, türelmet és segítőkész hozzáállást, mellyel körülvettek ez idő alatt.