

Vállzületi protézis műtéten átesett betegek mintáinak vizsgálata termoanalitikai módszerekkel

Doktori (PhD) értekezés - Tézisfüzet

Dr. Bata András Gábor

Témavezető: Prof. Dr. Lőrinczy Dénes, PhD, DSc

Dr. habil. Nőt László Gergely, PhD

Interdiszciplináris Orvostudományok Doktori Iskola (D93)

Iskolavezető: Prof. Dr. Gallyas Ferenc

**B-130/1993 Funkcionális fehérjedinamika vizsgálata biofizikai
módszerekkel**

Programvezető: Prof. Dr. Nyitrai Miklós



*Pécsi Tudomány Egyetem - Általános Orvostudományi Kar – Biofizikai Intézet
Tolna Vármegyei Balassa János Kórház – Traumatológia és Ortopédia Összevont Osztály*

2024

Bevezetés:

Napjainkban a nagyízületi endoprotetika az ortopéd-traumatológia egyik legdinamikusabban fejlődő ágának tekinthető. Az elmúlt évtizedekben jelentősen megnőtt az ilyen típusú műtétek száma, köszönhetően a protézisek és a műtéttechnika folyamatos fejlődésének. Az artroplastikák közül térd- és csípőprotézis-beültetésekre kerül sor a legtöbbször.

A harmadik leggyakrabban protetizált ízület a vállízület, mert a növekvő átlagéletkor miatt egyre gyakrabban kerül sor vállprotézis implantációjára ortopédiai indikációval a vállízület degeneratív elváltozásai és betegségei miatt. Traumatológiai szempontból a humerusz proximális vég darabos törései miatt végeznek növekvő számban vállízületi artroplastikát világszerte. A vállízületi protézisek első generációját Neer professzor fejlesztette ki az 1950-es évek elején. Azóta eltelt közel 70 év során az implantátumok jelentős fejlődésen mentek keresztül. Ma már teljes, reverz teljes, hemiprotézis és részleges felszínpótló protézis áll rendelkezésre a vállízületi kopás, az előrehaladott rotátor köpeny (ROK) károsodás és a jelentős elmozdulással, ficammal társuló 4-rész törések kezelésére.

Osztályunkon (Tolna Vármegyei Balassa János Kórház – Traumatológia és Ortopédia összevont Osztály) 2019 óta végzünk vállprotézis implantációkat ortopédiai (kivéve onkológiai) és traumatológiai indikációval.

Témaválasztás:

Számos protokoll létezik az ortopédiai indikáció felállítására. Traumatológiai indikációk, 4-rész törések esetében a megfelelő implantátum típus kiválasztása már több kihívással jár. A vállízület állapotának felmérésére 'gold standard'-ként ismert MRI vizsgálat nem minden esetben elérhető, alkalmazását korlátozza régebbi fémmimplantátum, pacemaker jelenléte, vagy klausztrofóbia. A hisztológiai vizsgálatok pontos képet adhatnak egy adott struktúra károsodásáról, elkészítésük azonban időigényes. Mindemellett, a legtöbb, nem MRI vizsgálaton (CT, UH) alapuló klasszifikáció (Hamada, Walch) indirekt módon következtet a ROK állapotára és alapvetően nem traumatológiai esetekre fejlesztették ki.

Olyan új vizsgáló módszerek, amelyek a későbbiekben sikeresen felhasználhatók lennének a képalkotó vagy hisztológiai vizsgálatok kiegészítéseként, segíthetnék a vállízületi degeneratív betegségek stádiumának meghatározását, a ROK, a hyalin porc és a szubkondrális csontállomány károsodás biokémiai hátterének felderítését. Ez kiemelkedően fontos lenne azon traumatológiai páciensek körében, akiknél 3-4-rész humeruszfej törés miatt preoperatív

funkcionális vizsgálatok nem kivitelezhetők a ROK állapotának és a sérült vállízület sérülést megelőző mozgástartományának megítélése céljából.

Célkitűzéseink:

A differenciál pásztázó kalorimetriát (differential scanning calorimetry, DSC) korábban már eredményesen alkalmazták degeneratív és gyulladásos vázizomrendszeri kórképek kutatásában, a kollagén szerkezeti elváltozások kimutatására. A TG / DTA (thermogravimetry / differential thermal analysis) szintén megbízható információval szolgál a csontállomány termikus stabilitásáról és a tömegveszteség alapján annak összetételéről.

Hipotézis:

- *Feltételezésünk, hogy a differenciál pásztázó kalorimetria (DSC) és termogravimetria / differenciál termál analízis (TG / DTA) hatékonyan alkalmazható eszközök a különböző (ortopédiai, traumatológiai) indikációval végzett vállízületi protézis beültetések során gyűjtött minták vizsgálatára, a ROK, a hyalin porc és a csont állapotának felmérésére.*
- *Feltételezzük továbbá, hogy a különböző termoanalitikai vizsgálati módszerek (DSC, TG, DTA) segíthetnének meghatározni a vállízületi-endoprotézis műtéten átesett betegek porc- ill. ROK-károsodásának a mértékét, valamint a szubkondrális csont minőségét, ezáltal több adatot nyerhetünk a humán szövetmintákban létrejött szerkezeti károsodásokról.*
- *Feltételezzük, hogy az alap kutatásként szereplő termoanalitikai vizsgálatok olyan információkat adnak a vizsgált szövetek struktúráiról, amelyre az ún. "hagyományos" (pl. képpalkotó diagnosztika, szövettan) vizsgálatok nem képesek, viszont hatással lehetnek a beültetett implantátum sorsára és a beteg további életminőségére. Ezen eredményeink segítenének a jövőben a megfelelő protézis kiválasztásában, így a jelentősen hozzájárulnának a vállízületi protézis műtetre váró betegek gyógyulásához.*

Célkitűzéseinket a következő vizsgálatok elvégzésével szeretnénk igazolni:

Tervezett vizsgálatok:

- 1) **Rotátor köpeny (ROK) degenerációjának felmérése:** vállízületi protézis műtéten átesett betegektől gyűjtött mintákat makroszkópos, hisztológiai és kalorimetriai

vizsgálatoknak (DSC) vetjük alá. A műtétet megelőzően elvégzett képalkotó vizsgálatok segítségével határozzuk meg a ROK károsodás radiológiai stádiumát.

Vizsgálatainkkal a következő kérdésekre keressük a választ:

- A) Megbízhatóan jelzi a differenciál pásztázó kalorimetria a ROK ín kollagén tartalmának változását, az ín degenerációját vállprotézis beültetés során vett humán mintákon?
 - B) Korrelál-e a DSC által jelzett károsodás mértéke a radiológiai vizsgálat által meghatározott stádiummal?
 - C) Segítséget jelent-e a DSC vizsgálat traumatológiai betegektől vett minták esetében a protézis fajtájának pontosabb kiválasztásában?
- 2) **Ízületi porc és csont károsodásának felmérése:** vállízületi protézis műtét során gyűjtött különböző porc és csont mintákat makroszkópos, hisztológiai, differenciál kalorimetriai (DSC) és termogravimetriai vizsgálatoknak (TG/DTA) vetjük alá. A műtétet megelőzően elvégzett képalkotó vizsgálatok segítségével határozzuk meg az ízületi kopás radiológiai stádiumát.

Vizsgálatainkkal a következő kérdésekre keressük a választ:

- A) Megbízhatóan jelzi a differenciál pásztázó kalorimetria / termogravimetriai porc kopását, illetve csont aszeptikus nekrozisát vállprotézis beültetés során vett humán mintákon?
 - B) Korrelál-e a DSC / TG/DTA által jelzett károsodás mértéke a radiológiai vizsgálat által meghatározott stádiummal?
 - C) Segítséget jelent-e a DSC / TG/DTA vizsgálat traumatológiai betegektől vett minták esetében a protézis fajtájának pontosabb kiválasztásában?
- 3) **Összehasonlító elemzés: ortopédia és traumatológiai minták összehasonlítása**

Vizsgálatainkkal a következő kérdésekre keressük a választ:

A) Található-e eltérés az ortopédiai és a traumatológiai betegek ROK, porc és csont károsodásának mértékében a radiológiai elemzés alapján?

B) Látható-e eltérés az ortopédiai és a traumatológiai betegektől vett minták termoanalitikai paramétereiben?

Fentiek alapján hasznosíthatók-e a termoanalitikai mérések kiegészítő klinikai vizsgálatként az ortopédiai és traumatológiai betegektől intraoperatíván vett minták további biokémiai elemzésében?

Beteganyag

Az általunk tervezett vizsgálatokba olyan felnőtt korú, akut vállízületi sérüléssel vagy krónikus vállízületi elváltozással bíró (fájdalmat, mozgáselmaradást, gyulladással ízületi jegeket mutató) betegeket vonunk be, akiknél szakrendelésünkön vagy akut baleseti ambulanciánkon történő vizsgálatok során olyan vállízületi károsodást – mind traumatológiai, mind pedig ortopédiai eredetű – állapítottunk meg, amelynek megoldásához vállízületi protézis implantációja szükséges.

A betegek demográfiai adatai:

Osztályunkon 2019 óta összesen 51 betegnél történt hemi vagy reverz vállízületi protézis implantációja. A nemek szerint a férfi:nő arány 13:38 volt. A műtét elvégzésnek idején az átlagos életkor (átlag \pm SEM, min. – max., év) 69 ± 1.1 (51 – 86) év volt.

Traumatológiai indikációval összesen 36 esetben végeztünk ilyen típusú műtétet. Ebben a csoportban minden betegnél a humerusz proximális végének darabos, jelentős diszlokációval járó törése fordult elő, a törésvonal ráterjedt a collum anatomicumra is.

A sérülési mechanizmust tekintve túlnyomórészt a relative kis energiájú sérülések (n = 31) szerepeltek, amelyből arra merünk következtetni, hogy a humerusz proximális végének négy- vagy több rész törésének kialakulásában a már meglévő oszteoporózis jelentős rizikófaktorként szerepelhet. A nagyenergiájú sérülések (n = 5) - mint például a „magasból esés” vagy „jármű általi gázolás” csak kevés esetben fordultak elő. A sérülések kialakulásában egyéb tényezőként alkalmanként szerepelt az epilepszia (n = 1), az ittasság (n = 1) és COVID-19 fertőzés (n = 1) okozta általános állapotrosszabbodás, amelynek következtében a sérülés bekövetkezett.

Ortopédiai indikációval összesen 15 esetben végeztünk vállízületi protézis beültetést. Ezekben az esetekben kivétel nélkül a RCA volt megnevezve fő diagnózisként, mint műtéti

indikáció. Itt minden esetben reverz vállízületi protézis implantációjára került sor cementes (n = 4) vagy cement nélküli (n = 11) szárral.

Az ortopédiai indikációval rendelkező betegeknél minden esetben előrehaladott rotátorköpeny-szakadás artropátia (rotator cuff tear arthropathy, RCA) képezte a műtéti indikációt, amelyhez a kórtörténetben gyakran társult degeneratív és / vagy autoimmun betegség is.

Képalkotó vizsgálatok

A képalkotó vizsgálatok eredményeinek elemzése, a vállöv károsodásának klasszifikációja (ROK károsodás: Hamada-beosztás szerint, glenohumerális artrózis foka: Walch-beosztás szerint, porckárosodás mértéke: Outerbridge-beosztás) alapján történik. Fontos mind a CT, mind pedig az MR vizsgálatok elvégzése, mert az eltérő beosztások különböző képalkotó vizsgálatokon alapulnak. Az ortopéd indikációval történő műtétek műtét előtti tervezésére a natív RTG-felvételek felhasználásával a beültetendő protézis szoftveres megtervezésére is lehetőségünk van.

A CT-vizsgálatokat *Siemens Somatom Perspective Dual 64/128*, az MR-vizsgálatokat *Siemens Magnetom Essenza 1.5 T* típusú készülékkel végezzük. A betegek számára képalkotó vizsgálatok a rutin műtéti tervezés részét képezik, külön terheléssel nem járnak.

Műtét technikai leírása és mintavétel

A műtétek során DePuy Synthes Delta Xtend teljes reverz vállízületi protézist vagy Global FX hemiprotézist ültetünk be. Kizárólag olyan szöveteket használunk fel vizsgálatainkban, amelyek egyébként is eltávolításra kerülnek a beavatkozások során.

A műtéteket narkózisban (ITN) végezzük, posztoperatív fájdalom csillapítás részeként *scalenus* blokádot alkalmazunk. A vállízületet deltopektorális feltárásból tárjuk fel. Az ízületi tok megnyitását követően identifikáljuk a *tuberculum maius humeri*-t, amelyen a ROK négy tagja közül három tapad (*m. supra- et infraspinatus*, *m. teres minor*). Hemiprotézis implantációjakor a tuberkulumok épsége és megfelelő rögzítése meghatározza a vállízület későbbi funkcióját. Átvágjuk a *m. biceps brachii* hosszú inát az eredési pontjánál. A humerusz fejet oszcillációs fűrészszel távolítjuk el. A velőűr megnyitását követően a megfelelő méretű szárat ragasztjuk a velőűrbe. Hemiprotézis implantációja esetén a *fossa glenoidalét* épen hagyjuk, a megmaradt *tuberculum maiust* a szárhoz rögzítjük varróanyaggal. Amennyiben a vállízület előrehaladott degenerációja áll fenn, valamint a ROK funkciója már hiányzik, reverz totál vállprotézist ültetünk be, mely során vápa beültetésre is sor kerül. Ebben az esetben a *fossa glenoidalis* területéről – az úgynevezett *glenohumeral contact area* (GCA) területéről - is

porcszövetet (5x5x2.5mm nagyságú), és csontmintát (5x15 mm nagyságú csonthenger) veszünk.

A kontrollcsoporthoz olyan fiatal betegekből veszünk mintákat, akiknek olyan súlyos fokú (jelentős diszlokációval járó 4-rész törés) humeruszfej törése van, hogy az ízületi felszín helyreállítása már nem lehetséges. Kritérium, hogy a kontroll csoportba tartozó sérült nem rendelkezhet degeneratív vagy gyulladásos vállízületi elváltozással.

A műtétek során a következő szövetekből veszünk mintákat: humeruszfej porc, humeruszfej szubkondrális csont, rotátorköpeny (*tuberculum maiushoz* tapadó szupraszpínátusz ín), bicepsz ín intraartikuláris szakasza, *cavitas glenoidealis* porc, *cavitas glenoidealis* szubkondrális csont. A ROK ínak meghatározásához egy kb. 5x5x10 mm nagyságú szövetmintát veszünk általában a szupraszpínátusz ínból, az ín tapadásától proximálra kb. 1,5 cm távolságra, amely az ín ún. kritikus zónájának felel meg. A humeruszfej felszínéről (a humerusz-*fossa glenoidalis* kontaktfelületnek megfelelően) 5x5x2,5 mm nagyságú hyalinporc mintákat veszünk. A humeruszfej szubkondrális csontjából és a *fossa glenoidalis* ízfelszínéből és szubkondrális csontjából egy 5 mm belső átmérőjű hengerfúróval veszünk mintát.

Az intraoperatívan vett mintákat előre sterilizált, zárható műanyag mintatartókba helyezük, amelyeken a minta beazonosítására szükséges adatokat feltüntetjük.

A szövettani metszetekhez szükséges mintákat 4%-os formalinba, a DSC és TG/DTA vizsgálatokhoz szükséges szövetmintákat hideg fiziológiás sóoldatba helyezük, amelyeket mély hűtve szállítunk és tárolunk feldolgozásig.

Differenciál pásztázó kalorimetria (DSC):

A DSC-vizsgálat elvégzése előtt a mintákat háromszor 4 °C-os steril fiziológiás sóoldattal mostuk. A kalorimetriás mérések standardizált módon, SETARAM Micro DSC-II (Franciaország, Caluire) kaloriméterrel történtek. Referenciának fiziológiás sóoldatot használtunk. Valamennyi mérés 0 és 100 °C közötti tartományban, 0,3 °K/perc felfűtési sebességgel történt. A tipikus nedves minta tömeg a kalorimetriás mérések során 50 – 150 mg között változott. A mérőcellákba pufferben tárolt mintákat, a referencia cellába a tiszta pufferoldatot helyeztük. A mérő- és referencia cellákat ± 0.1 mg pontossággal kiegyensúlyoztuk. A hőkapacitás tekintetében nem volt szükség korrekcióra a minta és referencia cellák között. Kiinduláskor a cellák és az őket tartó blokk között is a hőmérséklet különbség zérus volt.

Ha a minta és a referencia termikus tulajdonságai azonosak, egyikben sem megy végbe fázisátalakulás, akkor azonos mennyiségű energia kell hőmérsékletük azonos módon történő

változtatásához és így a kimenő jel zérus lesz. Ha a mintában egy endoterm (hőelnyelő) folyamat indul be valamilyen szerkezeti átalakulás következtében akkor hőmérséklete csak extra energia betáplálásával képes követni a referencia cella hőmérséklet változását úgy, hogy a két cella közti különbség továbbra is zérus maradjon. Ez az extra energia, amely állandó nyomáson zajló folyamatnál (hermetikusan lezárt cella) a fellépő hőkapacitás változást adja, kimenő jelként jelenik meg a hőmérséklet függvényében.

A kalorimetriás entalpiát a hőabszorpciós görbe alatti területből számoltuk két-pontos SETARAM csúcs integráló szoftver segítségével. Az adatfeldolgozás ASCII konverzió után az Origin 6.0 program segítségével történt.

Termogravimetria (TG) és Differenciál Termikus Analízis (DTA):

A csontminták termoanalitikai vizsgálatait egy *SSC/5200 TG/DTA készülékkel* (SII Seiko Instruments Inc. - Japán) hajtottuk végre. A mintákat nyitott, alumíniumból készült, 5,2 mm átmérőjű és 5 mm mélységű mintatartókba helyeztük. A vizsgálatokat a környezeti hőmérséklet és 550°C közötti tartományban végeztük 10-40 °K/min felfűtési sebességgel (10 °K-es emelésekkel) végeztük. A mérések során inert nitrogén gázt használtunk 100 ml/min áramlási sebesség mellett.

A termogravimetriai vizsgálatok során regisztráltuk a vizsgált anyag százalékos tömegváltozását a hőmérsékletemelkedés függvényében. A kapott termogramm során információt kaptunk az adott minta termikus stabilitásáról. A DTG (derivatív termogravimetria) a TG görbével egy időben kerül regisztrációra, és a TG görbe adatpontjaiból számolt derivált TG görbét jelenti.

Differenciáltermoanalízis (DTA) során a vizsgált mintát (egy inert anyaggal együtt) egyenletes sebességgel hevítjük, miközben mérjük a két anyag közötti hőmérsékletkülönbséget, amit a felfűtés függvényében regisztrálunk. Így a mintában lejátszódó entalpiaváltozásról kapunk információt.

Statisztikai számítások

DSC vizsgálataink során a statisztikai analízist GraphPad Prism 6 (GraphPad, San Diego, CA) és SPSS 2 6.0 (SPSS, Chicago, IL) szoftverek segítségével végezzük el, ahol a $p < 0.05$ eltéréseket vesszük statisztikailag szignifikánsnak.

Termogravimetriai vizsgálataink értékeléséhez a korrelációelemzést és a grafikonok készítését az MS Excel szoftver segítségével végeztük el.

A rotátorköpeny minták DSC vizsgálati eredményei

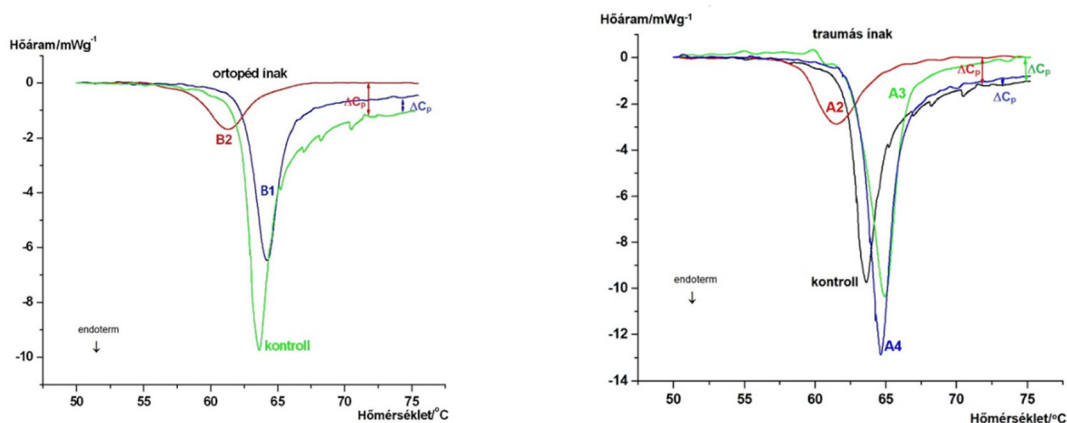
Az ortopédiai és a traumatológiai minták eredményeit ugyanazon kontroll minta eredményeivel hasonlítottuk össze. A hőáramlási görbéket három futtatás átlagából számoltuk, a nedves minta tömegére normalizálva.

Az előrehaladott ín károsodás (B1), valamint a kifejezetten előrehaladott ínkárosodás (B2) termodinamikai következményét a kontrollhoz képest jól mutatta a kapott görbék alakja és lefutása.

A kalorimetriás entalpia jelentős csökkenése jól korrelál a műtét előtt elvégzett fizikális vizsgálat során véleményezett ROK-diszfunkcióval. A denaturálást követő alapvonal változás a hőkapacitás növekedését jelezheti, ami az ín kisebb rugalmasságának következményeként értékelhető, amely egy kompaktabb (sűrűbb, jobban „csomagolt”) szerkezetre utal (**1. és 2. Grafikon**).

A traumás minták esetében a mérsékelten degenerált ín (A2) szintén jelentős eltérést mutatott a kontrollhoz képest a hődenaturációs görbék alakjában és azok termikus paramétereiben is.

Az A2-es minta hődenaturációs görbéje a többi traumás mintához képest igazolja már a sérülést megelőzően meglévő degenerációját a ROK-nak, amelyet a műtét előtt elvégzett röntgen vizsgálat szerint „4b-stádiumúnak” ítéltünk meg a Hamada-beosztás szerint. Ugyanakkor a többi traumás eredetű minta jóval kisebb termodinamikai eltérés mutatott a kontrollal összehasonlítva.



1. és 2. Grafikon: A ROK-ínak denaturációs görbéi (ortopédiai indikáció: B1 és B2; traumatológiai indikáció: A2, A3 és A4), valamint az egészséges (kontroll) ROK-ín denaturációs görbéje

Az elvégzett DSC-vizsgálatok segítségével sikerült alátámasztani, hogy jelentős különbség van az ortopédiai- és traumatológiai indikációval végzett műtétek során gyűjtött ROK-minták termoanalitikai paramétereit között az egészséges kontrollhoz képest.

Hyalinporc minták DSC vizsgálati eredményei

A hyalinporcban II. típusú kollagén van. Attól függően, hogy melyik típusú kollagénről beszélünk, lehet a kollagénfehérjének rigid (csont), puha (ínak) vagy átmeneti (porc) szerkezete. A DSC alkalmazásának a lényege, hogy segítségével meghatározhatók a fizikai-kémiai átmenetekhez kapcsolódó **entalpia** (hőmennyiség) **változások** és az a hőmérséklet, amelyen a szerkezeti változások bekövetkeznek.

A **denaturáció** az a folyamat, amely során a makromolekulák elveszítik negyedleges, majd harmadlagos szerkezetüket, vagyis a polipeptid láncok széttekerednek.

A ΔT a denaturáció kezdete és vége közötti különbséget jelzi °C-ban. A T_m az úgynevezett denaturációs hőmérséklet, amelynél a széttekeredés a minta közel 50 %-ban lezajlott. A minta annál stabilabb hőtanilag, minél magasabb hőmérsékleti fokon fog a kollagén „széttekeredni”. A ΔH az a tömegre normalizált energiamennyiség, amely az adott szerkezeti változás létrejöttéhez szükséges.

A hőtani paraméterek változásaiból következtethetünk a porc szerkezeti eltéréseire, különös tekintettel a porcot alkotó II. típusú kollagén szerkezeti változásaira.

A DSC-görbék lefutásából következtetni lehet a hőstabilitásra és a porcban található II. típusú kollagén szerkezeti épségére. Az O1 és O2 minták esetében a kontrollhoz képest a csúcs balra tolódott, a görbe pedig kiszélesedett. A kiszélesedett görbe, vagyis a megnövekedett ΔT , a szélesebb denaturációs hőmérsékleti tartományt jelzi, ami azt jelenti, hogy a kollagénszerkezet károsodott, kisebb a kooperativitás a különböző strukturális domain-ek között. A szerkezete instabilabb, hiszen a denaturáció már alacsonyabb hőmérsékleten megkezdődik (**3. és 4. Grafikon**).

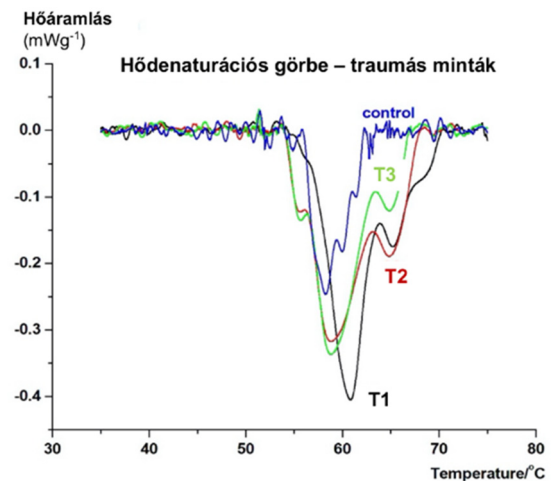
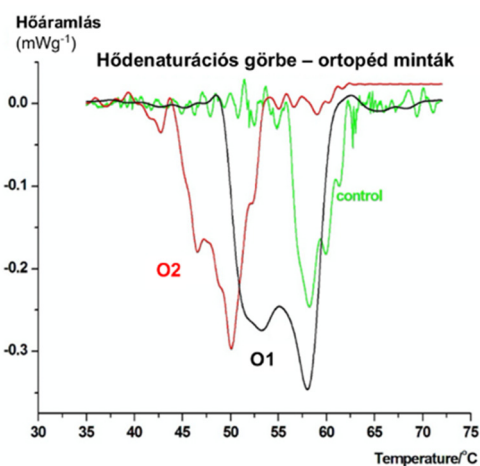
Az ortopéd minták esetében látható, hogy a T_m hőmérséklet csökkent, amely azt jelzi, hogy a minták hőtanilag kevésbé stabilak.

A kalorimetriás entalpia is jelentős különbségeket mutatott mindkét minta esetében a kontrollhoz képest. A magasabb entalpia változás - különösen az O1 minta esetében – jelzi a megemelkedett kollagén tartalmat, kompaktálódást, amely indirekt módon szintén utalhat porckárosodásra.

Az ortopédiai mintákkal szemben látható, hogy a traumás eredetű minták esetében T_m a magasabb hőmérséklet felé tolódik el. A hődenaturációs görbe kiszélesedése kevésbé markánsan jelentkezik, ezáltal jelezve, hogy a kooperativitás nagyobb, így a minták kollagén tartalma hőtanilag stabilabb, vagyis jobban megőrizték harmadlagos és negyedleges szerkezetüket az ortopédiai mintákkal szemben. A denaturációs hőmérsékletek (T_m) azt

mutatják, hogy a betegség okozta szerkezeti változás (O2) nagyobb, mint a sérüléskor a hyalinporcot ért károsító hatás.

A DSC-görbék alakja és a termikus jellemzők alapján azt találtuk, hogy a degeneratív betegségek okozta szerkezeti változások nagyobbak, mint a traumás indikációval operált betegek esetén megfigyelt változások. A traumás betegeknek észlelt szerkezeti károsodás vagy egy már meglévő állapot, vagy maga a trauma hatása lehet.



3. és 4. Grafikon: Az ortopédiai (O1, O2) és traumatológiai (T1, T2 és T3) indikációval végrehajtott műtétek során nyert hyalinporc minták hődenaturációs görbéi az egészséges hyalinporc mintával összehasonlítva

A humeruszfejből vett spongiózus csontminták termogravimetriás vizsgálata

A vállízületi protézis implantációját követően esetenként kialakuló protézis komponens lazulás megértése céljából a műtétet megelőzően meg kell ítélni a humeruszfej spongiózus csontállományának minőségét. Ennek vizsgálatához műtét közben egy 5 mm átmérőjű és 15 mm hosszú csonthengert távolítunk el.

A termogravimetriás vizsgálatok már többször bizonyultak hasznosnak a csontszövet *in vitro* és *post mortem* vizsgálataiban. Ezért feltételeztük, hogy a termogravimetriás vizsgálatok az emberi humeruszfej mintákon különbséget fog mutatni az ortopédiai és a traumás betegek csontminőségében. Gyengébb csontállományt és kevesebb mineralizációra számítottunk a ortopédiai minták esetén fennálló degeneratív elváltozások miatt a traumás mintákhoz képest. Valamint feltételeztük azt is, hogy az ortopédiai betegek csontvesztése korrelál a degeneratív elváltozások fokával.

A kontrollmintát egy fiatal betegből vételeztük, aki diszlokációval járó négyrészes proximális humerusztörést szenvedett és intraoperatív úgy ítéltük meg, hogy a törött humeruszfej makroszkópiusan egészséges spongiózus csontállománnyal rendelkezik. Ezt az

elvégzett szövettani vizsgálat is megerősítette. Az ortopédiai műtétekből származó minták tömege 14 és 110 mg között változott, míg a traumatológiai vizsgálati minták tömege 12 és 49 mg között mozgott.

A mintákat nyitott alumínium mintatartókba helyeztük. Az alumínium olvadáspontja 933.47 °K (660.32 °C). A vizsgálati hőmérséklettartomány 550 °C-ig terjedt. A felfűtési sebesség 10-40 °K min⁻¹ (10 °K-nel lépésenként emelve). A mérésekhez inert gázként nitrogént használtunk 100 mL min⁻¹ áramlási sebességgel. A kimeneti jelként megjelenő adatok adják az adott minta DTA (hőáramlás), TG (tömegvesztés %-ban) és DTG (a tömegvesztés sebessége) értékeit. TG/DTA vizsgálatok eredményei minden esetben három mérés átlagából keletkeztek.

A DTA-eredmény a kontrollminta esetében négy jól elkülöníthető hőátmenetet (75-103-335 és 407 °C) és összesen 40%-os tömegvesztést mutatott a vizsgált hőmérséklettartományban. A DTG görbék (nem ábráztuk őket) az első két csúcshőmérséklet esetében 1,5 és 2,1 mg min⁻¹ értékkel követték a DTA görbéket, de a magasabb termikus átmenetek esetében csak egy DTG-csúcsot tudtunk kimutatni 402 °C körül. 2,7 mg min⁻¹ értéket észleltünk.

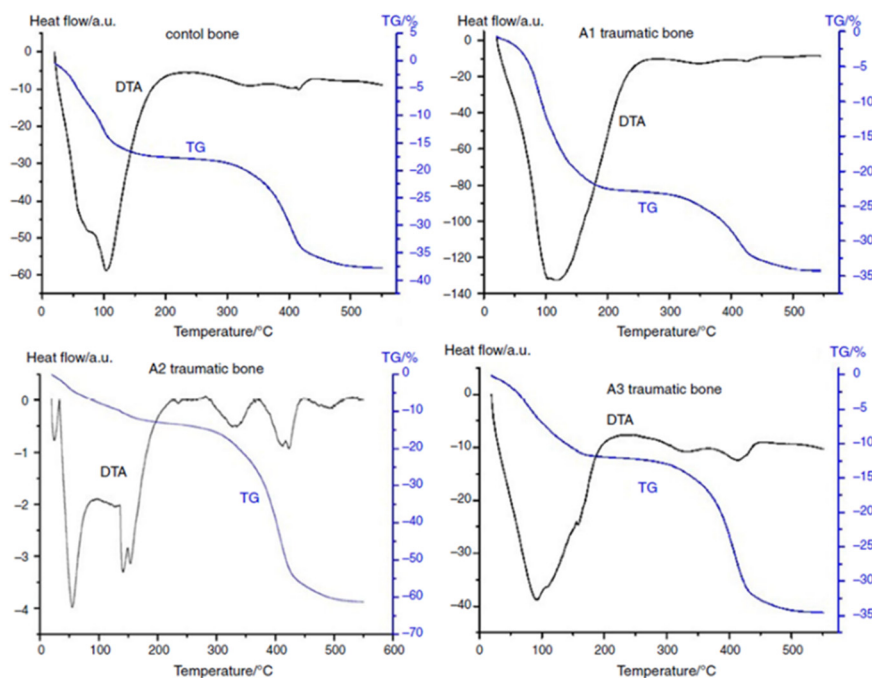
Az A1 minta 50 (inflexió) és 120 °C körüli átmenetet mutatott, kétszer nagyobb kalorimetrikus entalpiával, mint a kontroll. A termikus átmenetek a magasabb hőmérsékleti tartományba, 348 és 423 °C-ra tolódtak el, gyakorlatilag a kontrollmintával azonos entalpia értékekkel. A tömegvesztés kb. 30% volt. A DTG 100 °C-on magasabb, 4 mg min⁻¹ értéket, 414 °C-on pedig 2,7 mg min⁻¹ értéket mutatott, ami szintén magasabb volt, mint a kontrollnál.

Az A2 minta mutatta a legnagyobb különbséget a kontrollhoz vagy bármely már traumatológiai és ortopédiai mintához képest. A grafikonon jól látható, hogy egyetlen átmenet ~ 50 °C-on, valamint egy jól elkülöníthető kettős állapot változás következett be 150 °C közelében. A többi átmenet 340, 420 és 500 °C-on következett be. Nagyon meglepő, hogy a teljes kalorimetriai entalpia 20-220 °C között sokkal alacsonyabb volt, mint a kontroll minta esetében. Az entalpia hozzájárulás mindhárom tranziens fázisban magasabb volt a kontrollhoz képest. A teljes tömegvesztés kb. 60% volt. A DTG értékek a következők voltak: ~ 48 °C 0.23 mg min⁻¹, ~ 137 °C 0.25 mg min⁻¹ and ~ 150 °C 0.18 mg min⁻¹. A magasabb tartományokban 338 °C-on 0.31 mg min⁻¹, 410 °C-on 1.2 mg min⁻¹ volt.

Az A3-as minta esetén a hőátmeneteket 90, 110 és 150 °C-on különböztethetjük meg. E három csúcs entalpia-hozzájárulása a 20-210 °C-os intervallumban, valamint a magasabb tartományokban is a kontrollmintának megfelelő tartományban van. A teljes tömegvesztés kb. 35% volt, a DTG értékek pedig 85 °C-on 1.12 mg min⁻¹, 408 °C-on 3.3 mg min⁻¹ volt.

Az ortopédiai mintáknál első pillantásra egy nagyon határozottan eltérő termikus folyamat (amely a belső szerkezeti eltérésre utal) látható a traumatológiai mintákhoz képest. A grafikonok szemmel láthatóan jól mutatják az eltéréseket a különböző traumás és ortopédiai minták között (**5. és 6. Grafikon**).

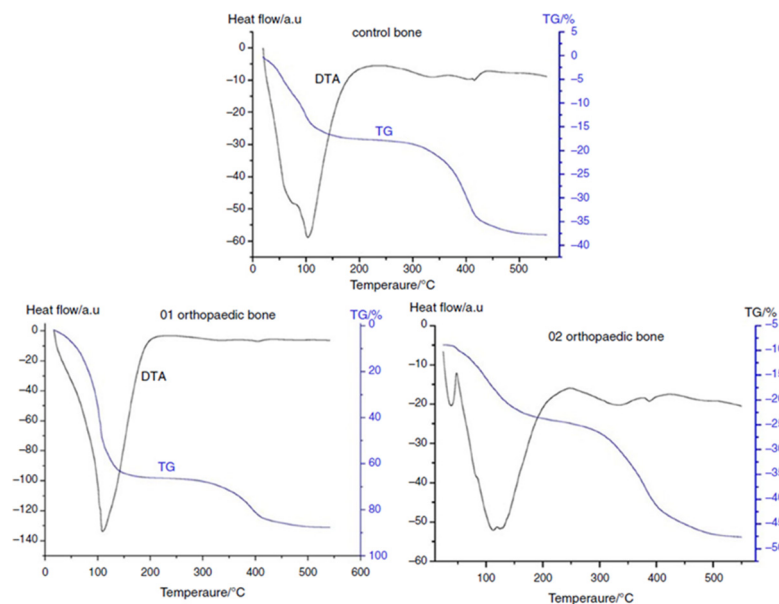
Az O1 ortopéd minta kétszer nagyobb effektust mutatott a kontrollmintához képest. Az alsó hőmérsékleti csúcsok 50 és 107 °C-ra tolódtak el, és az endoterm változás négyszer nagyobb volt, mint a kontrollminta esetében. A magasabb átmenetek nagyjából ugyanazon a hőmérsékleten maradtak (333 és 404 °C). A kétszer nagyobb végső tömegveszteség kiugrott a három grafikonból (a DTG 107 °C-on ~ 4,6 mg min⁻¹ és 1,3 mg min⁻¹ 390 °C-on).



5. Grafikon: a kontroll és traumatológiai minták TG/DTA görbéi (az adatok három mérés átlagai)

Az O2 minta karakterisztikája és a hőáram hőmérsékletgörbéje hasonló tendenciát mutatott a kontrollmintához képest. Viszont a két alsó denaturációs csúcs jobban elkülönült (38 és 118 °C), ami azonos kalorimetrikus entalpiát eredményezett. A magasabb hőmérsékleti tartományban kettő helyett (lásd kontroll) három denaturációs csúcs jelent meg (333, 388 és 485 °C), ahol a 333 °C-os átmenet entalpiája nagyobb volt, mint a kontrollé 335 °C-on, és itt sokkal nagyobb volt az entalpia-hozzájárulás is, mint a második, 388 °C-os értéknél (ez utóbbi kisebb volt, mint a 407 °C-os hasonló kontrollé). A teljes tömegveszteség kb. 40 %, és a DTG-

értékek a legnagyobb alsó átmenetre vonatkozóan $1,43 \text{ mg min}^{-1}$, 380 °C -on pedig $2,3 \text{ mg min}^{-1}$ voltak.



6. Grafikon: a kontroll és ortopédiai minták TG/DTA görbéi (az adatok három mérés átlagai)

A szövetkárosodás/degeneráció mértéke és a termikus paraméterek közötti összefüggések

Regressziós elemzéseket végeztünk a termikus paraméterek és a degeneratív folyamatok egyéb mutatói, például a makroszkópos pontszámok vagy a radiológiai értékelések közötti kapcsolat megtalálására.

A porcminék közül "mérsékeltlen erős" kapcsolatot figyeltünk meg az OA pontszám és a denaturációs hőmérséklettartomány között ($R^2 = 0,74$, $p = 0,06$, tendencia a statisztikai szignifikancia felé). Továbbá, az OA pontszámot mint prediktort és a legnagyobb hőáramnál a félszélességet mint függő változót ábrázolva szintén hasonló mintázatot mutatott ($R^2 = 0,76$, $p = 0,05$, tendencia a statisztikai szignifikancia felé).

A radiológiai értékelés és a kalorimetriás mérések eredményét összehasonlítva az OA pontszám és a kalorimetriás entalpia között az alacsonyabb hőmérsékleti csúcsoknál ok-okozati összefüggést találtunk ($R^2 = 0,61$, $p = 0,067$, szignifikancia felé mutató tendencia). Meg kell jegyezni, hogy a T2 minta eltávolításával az összefüggés sokkal erősebb lenne ($R^2 = 0,92$). Véleményünk szerint nagyobb mintanagyság esetén az adatok statisztikailag szignifikáns, erős korrelációt mutathatnának a radiológiai és termikus adatok között.

A szubkondrális csontminták esetén a radiológiai értékelés és a kalorimetriás mérések eredményeivel összehasonlítva kimutattuk, hogy összefüggés van a OA pontszám és az alacsonyabb hőmérsékleti csúcsokon észlelt kalorimetriás entalpia között. A korrelációelemzés

"mérsékelt" korrelációt mutatott ($R^2 = 0,609$), $p = 0,067$ értékkel, ami a statisztikai szignifikancia irányába mutató tendenciát jelez. Meg kell jegyezni, hogy az egyik "outliner" (T2 minta, lásd a magyarázatot) kizárásával, a korreláció sokkal erősebb lenne. ($R^2 = 0.922$). Úgy véljük, hogy egy további vizsgálatban egy nagyobb n-számú vizsgálatban az adatok statisztikailag is jelezhetnék szignifikáns, erős korrelációt a radiológiai pontszámok között és a kalorimetriás adatok között.

A termodinamikai paraméterek és az oszteoarthritisz-score között mérsékeltlen erős kapcsolatot mutattunk ki, regressziós analízis segítségével a hyalinporc- és a szubkondrális csontminták esetében. Érdekes módon a ROK-minták esetében nem találtunk statisztikailag alátámasztott összefüggést a radiológiai pontszámok és a termikus mérések eredménye között. Ennek lehetséges magyarázata, hogy az oszteoarthritisz pontszám a glenohumerális ízület radiológiai morfológiáján alapul, amely leírja a csont konzisztenciáját, valamint az ízületi teret. Sem a hagyományos röntgenfelvételek, sem a CT-vizsgálatok nem képesek részleteket szolgáltatni a ROK károsodásának mértékéről. Tapasztalataink szerint ennek valószínű degeneratív elváltozásaira csak közvetve tudunk következtetni az ízület radiológiai morfológiájából.

A különböző eredetű minták közötti különbségek nem mindig egyértelműek. A traumás betegeknél előfordulhat, hogy már meglévő oszteoarthritisz tünetei vannak, az ortopédiai betegeknél pedig a korábbi trauma következtében az AVN jelei alakulhatnak ki. Valószínűleg a degeneratív betegség és az akut trauma fokozott hatásának kombinációját észleltük a "körvonalazódó" traumás mintában.

Ezért gondoljuk, hogy a traumás betegek és az ortopédiai betegek között a ROK, a hyalinporc, valamint a szubkondrális csont várható állapotában mutatkozó különbségeket bemutató adatok segíthetnek a műtéti tervezésben, és javíthatják a terápiás protokollokat is.

Megbeszélés

Vizsgálataink során a DSC hatékony módszernek bizonyult a traumatológiai és ortopédiai eredetű hyalinporc- és ROK-ín minták vizsgálatára.

A DSC-görbék egyértelmű különbséget mutattak a reverz vállízületi protézis implantáción átesett betegek egészséges és patológiás rotátorköpeny-mintáinak termikus paraméterei között, ahogyan a DSC-görbék alapján a hyalinporc minták is elkülöníthetővé válnak azok károsodásának mértéke alapján. Ezért a kapott eredmények alapján biztosan állíthatjuk, hogy a DSC hasznos kiegészítő módszer lehet a GH-ízületi artrózis mértékének és a rotátorköpeny-szakadásos artropathiák értékelésében a jövőbeli vizsgálatokban.

Az emberi humeruszfej minták DTA/TG-analízise az ortopédiai és traumás betegek csontminőségében jelentős különbségeket mutatott a kontrollhoz képest.

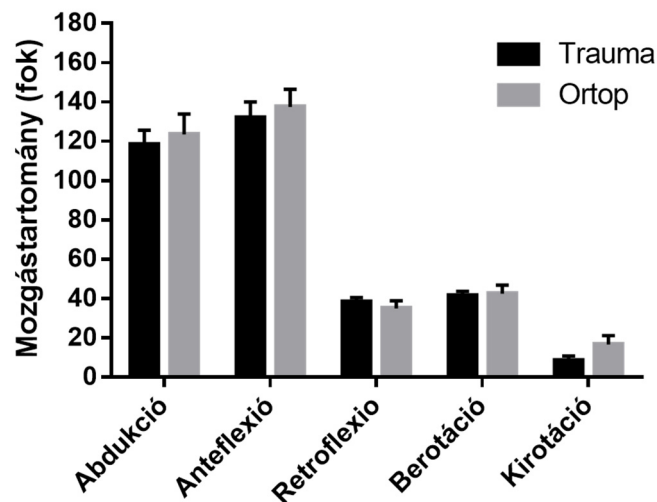
Vizsgálatainkból arra következtetünk, hogy a protokollok és irányelvek terén a közelmúltban elért előrelépések ellenére továbbra is szükség van a ROK-degeneráció, a hyalinporc és a szubkondrális csontkárosodás biokémiai alapjait vizsgáló tanulmányokra. Ezek a vizsgálatok részletesebb képet adhatnak a sebésznek az ízületi gyulladás várható mértékéről, különösen olyan körülmények között, amikor MR-vizsgálat nem áll rendelkezésre.

Új eredmények:

1. A vállízületi reverz protézis beültetésén átesett betegektől gyűjtött rotátor köpeny (ROK) minták differenciál pásztázó kalorimetriás vizsgálata (DSC) során nyert hőtani paraméterek megbízhatóan jelzik a ROK kollagén struktúrájának megváltozását és a degenerációjának mértékét.
2. A DSC-vizsgálatok segítségével sikerült bizonyítani, hogy jelentős különbség van az ortopédiai- és a traumatológiai indikációval végzett műtétek során gyűjtött ROK-minták termoanalitikai paraméterei között az egészséges kontrollhoz képest.
3. A különböző indikációval végzett reverz vállprotézis műtétek során vett hyalin porc minták DSC-vel nyert termikus jellemzői követik a hyalin porc struktúrájának degeneratív elváltozását.
4. Az ortopédiai és traumatológiai eredetű hyalin porc minták termikus paraméterei a differenciál pásztázó kalorimetriás méréseken alapuló hőtani elemzés során egyértelmű különbséget mutattak.
5. A műtétek során gyűjtött szubkondrális csont állomány TG / DTA (termogravimetria / differenciál termál analízis) vizsgálata jelentős hőtani különbséget mutatott az ortopédiai és traumatológiai minták esetében, a kontrollhoz viszonyítva. Az ortopédiai indikációval végzett műtétek során vett minták esetében a termogravimetria (TG) gyengébb minőségű csontállományt, kevesebb ásványi anyag tartalmat (mineralizációt) igazolt.
6. A radiológiai értékelés és a hőtani mérések eredményeit összehasonlítva, a hyalin porc esetében a termikus paraméterek közül a denaturációs hőmérsékleti tartomány (T_m) és a maximális hőáram félszélessége ($T_{1/2}$), a szubkondrális csont esetében a kalorimetrikus

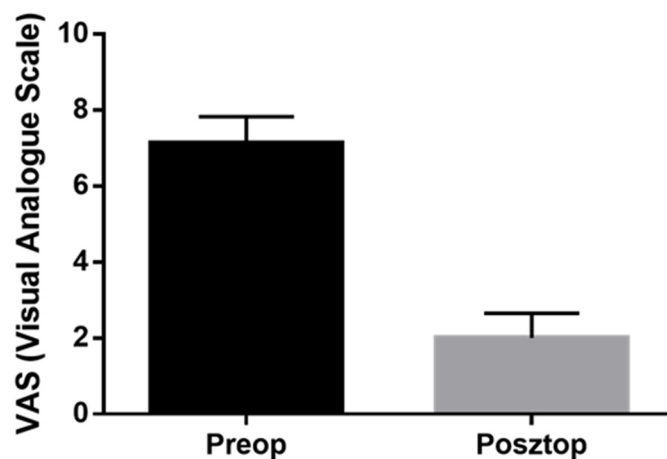
entalpia (ΔH_{cal}) mutatott közepesen szoros kapcsolatot az ízület degenerációját, kopását jelző oszteoarthritisz-score-al (OA).

7. A hőtani elemzések mélyebb betekintést nyújtanak az operált vállízület károsodott képleteinek elváltozásairól (kollagén szerkezeti elváltozás, csontszerkezeti változások, mineralizáció foka) és egyes denaturációs paraméterek prediktív értékkel is bírnak. Ezek alapján a termikus analízis hasznos lehet az ortopédiai és a poszttraumás vállbetegségek hátterében álló összetett folyamatok további vizsgálatában és az adott elváltozáshoz legjobban illő protézis típus kiválasztásában.
8. Az ortopédiai és a traumatológiai esetek mozgástartományának összehasonlítása azt igazolta, hogy a két betegcsoport között nincs szignifikáns különbség az elért (műtét utáni) mozgástartományt tekintve (**7. Grafikon**).



7. Grafikon: A különböző indikációval végzett műtétek utáni mozgástartományok összehasonlítása a 12. posztoperatív hónapban. Statisztikai teszt: kétutas ANOVA, a grafikonon feltüntetett értékek: átlag \pm SEM (standard error of the mean, átlag standard hibája). Nincs szignifikáns eltérés az eredményességben.

9. Vizsgálataink során vizsgáltuk a fájdalom mértékét, amelyhez a vizuális analóg skálával (VAS) analóg numerikus skálát használtuk. Ez egy egydimenziós fájdalommérő skála, amely gyakorlatilag egy vízszintes tengelyből áll, amelyen a betegnek be kell jelölni a fájdalom mértékét. Ennek egyik végpontja az "egyáltalán nem fáj" (= 0), másik pedig az "elviselhetetlenül fáj" (= 10) felirat. Az ortopédiai műtétek előtti és utáni (12 hónap) értékek átlagát az 8. Grafikon mutatja, amely bizonyítja, hogy a beavatkozással szignifikánsan sikerült csökkenteni a betegek fájdalmát.



8. Grafikon: Ortopédiai esetek. VAS (vizuális analóg skála) általi pontszám a műtét előtt és a műtét után 12 hónappal. Statisztikai teszt: Student t-teszt, a grafikonon feltüntetett értékek: átlag \pm SEM. Szignifikáns javulást értünk el a műtét elvégzésével (átlag érték szignifikánsan csökkent).

7. Távolabbi célkitűzéseink

- A jövőben a különböző eredetű minták közötti szerkezeti különbségek további feltárását tervezzük nagyobb esetszámban.
- Tervezzük a csontminták további DTA/TG vizsgálatát is, amely során a különböző kalorimetriai paraméterek és a csontrétegek válhatnak szétválaszthatóvá.
- A porc különböző rétegeinek szétválasztása meghaladja jelenlegi vizsgálatunk kereteit; azonban érdemes lehet további vizsgálatokat végezni.

Nagyobb esetszámot elérve korreláció-analízis vizsgálat elvégzését tervezzük a radiológiai vizsgálatok és a DSC-vizsgálatok eredményei között.

Köszönetnyilvánítás

- Témavezetőmnek: **Prof. Dr. Lőrinczy Dénes, PhD, DSc** (PTE-ÁOK Biofizika Intézet)
- Társ témavezetőmnek: **Dr. habil. Nöt László Gergely, PhD** oszt. vez. főorvos (TVBJK Szekszárd - Traumatológia és Ortopédia összevont Osztály)
- A Biofizika Intézet Termoanalitikai Labor összes dolgozójának
- **Dr. Szabó Hajnalka** – radiológus szakorvos (TVBJK Szekszárd)
- **Dr. Cifra János** – pathológus oszt. vez. főorvos (TVBJK Szekszárd)
- A betegeknek, akik hozzájárultak a vizsgálatokhoz szükséges mintavételhez

Dolgozathoz köthető közlemények:

Nöt LG, **Bata A**, Szabó H, Cifra J, Lőrinczy D. DSC examination of rotator cuff damage in patients with total shoulder arthroplasty. *J Therm Anal Calorim.* 2021;146:165–70. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-10402-w> **IF: 4.755**

Bata A, Nöt LG, Szabó H, Cifra J, Lőrinczy D. DSC examination of cartilage damage of patients undergoing shoulder replacement. *J Therm Anal Calorim.* 2022;147:1275–80. <https://doi.org/10.1007/s10973-020-10421-7> **IF (2021): 4.755**

Bata A, Nöt LG, Szabó H, Cifra J, Lőrinczy D. Thermogravimetric analysis of cancellous bone of humerus head in patients undergoing total shoulder arthroplasty. *J Therm Anal Calorim.* 2022;147:3107–15. <https://doi.org/10.1007/s10973-021-10702-9> **IF (2021): 4.4**

Dolgozat értékeléséhez első szerzős cikkek impakt faktora: 9.155

Dolgozat alapjait képező publikációk impakt faktora: 13.91

Dolgozathoz köthető előadások, poszterek:

1. **Bata A**, Nöt LG, Lőrinczy D: Vállízületi protézis műtéten átesett betegek porckárosodásának vizsgálata termoanalitikai módszerrel. *Magyar Traumatológus Társaság 54. Kongresszusa*. Tapolca, 2021. október 8., A-0004
2. Lőrinczy D, **Bata A**, Lábás Z, Szabó H, Cifra J. Nöt LG: Thermal analysis of tendon, cartilage and bone samples of patients underwent shoulder replacement with differential

scanning calorimetry (DSC) and thermogravimetry (DTA/TG). *Chemistry towards Biology (CTB10)*. Bratislava, Slovakia, 11-14. 09. 2022. Oral presentation.

3. Nöt LG, **Bata A**, Lábás Z, Szabó H, Cifra J, Lőrinczy D: Thermal analysis of biceps tendon of patients underwent reversed shoulder arthroplasty due to comminuted proximal humerus fractures. *3rd Journal of Thermal Analysis and Calorimetry Conference and 9th V4 (Joint Czech-Hungarian-Polish-Slovak)*. June 20-23 2023, Poster presentation.