

Cím: Mozgásszervi zavarok mikrokeringési következményeinek vizsgálata és befolyásolása

AZ EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

1. ÚJ IN VIVO MÓDSZEREKET DOLGOZTUNK KI A CSONTHÁRTYA ÉS SYNOVIÁLIS HÁRTYA MIKROKERINGÉSI VIZSGÁLATÁRA

A synoviális hártya intravitális mikrokeringési vizsgálatának metodikáját az Európai Trauma és Sürgősségi Sebészet Kongresszusán (Budapest 2008) ismertettük (előadás absztrakt¹).

A periosteum mikrokeringési vizsgálatának metodikai leírását magyar nyelvű teljes közleményünk tartalmazza²; a metodikai leírás további részleteit egy angol nyelvű teljes közleményben is ismertettük³.

2. A FOSZFATIDILKOLIN KEZELÉS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A VÉGTAG ISCHAEMIA MIKROKERINGÉSI ÉS BIOKÉMIAI KÖVETKEZMÉNYEIRE

Kísérleteinkben az általunk bevezetett új intravitális mikroszkópos technikával vizsgáltuk a parenterálisan alkalmazott foszfatidilkolin (PC) hatását 60 perces teljes végtag ischaemiát követő 180 perc reperfüzió (I-R) során, patkányon. Igazoltuk, hogy az I-R markánsan csökkentette a vörösvérsejt áramlási sebességet a kapillárisokban, és a funkcionális kapilláris denzitás is jelentősen csökkent a reperfüzió során. A mikrokeringési paraméterek a PC kezelés hatására a kontroll szinthez közel stabilizálódtak. A PC terápia emellett jelentősen mérsékelte a gördülő leukociták arányát (20,8%-ról 40,0%-ra) és a kitapadó leukociták számának növekedését (254-ről 872 mm⁻²-ra) a reperfüzió során. A neutrophil leukocyták szöveti akkumulációt jelző mieloperoxidáz enzimaktivitás közel háromszorosára növekedett az I-R csoportban, és szignifikánsan alacsonyabb volt a PC-vel kezelt csoportban. Az I-R jelentős hízósejt degranulációt (82,5%) okozott az izomban a kísérleti periódus végére, melyet a PC szinte teljes mértékben kivédett. Következtetéseink szerint a szisztémás PC kezelés hatékonyan javította a gyulladásos reakció főbb komponenseit, köztük a leukocyta-endothelsejt interakciókat és a hízósejt degranulációt. Ez arra utalhat, hogy a PC által előidézett hízósejt stabilizáció szerepet játszhat a csontthártya mikrokeringés javulásában a postischaemiás időszakban. Publikációk: egy angol és egy magyar nyelvű teljes közlemény^{4,5}.

3. A FOSZFATIDILKOLIN KEZELÉS CSÖKKENTI A KÍSÉRLETES ARTHRITIS KÖVETKEZMÉNYEIT

Kísérleteinkben a foszfatidilkolin (PC) és a nem-szteroid gyulladásgátló diclofenac hatását hasonlítottuk össze carrageenan által kiváltott térd gyulladásos modellben patkányon. A mikrokeringési hatásokat az újonnan kidolgozott módszerünk segítségével vizsgáltuk intravitális mikroszkóppal. Az állatok jobb térdében gyulladást indukáltunk carrageenan-kaolin (C/K) ízületi tokba fecskendezésével, míg a bal térdet fiziológiás sóoldattal kezeltük. A C/K expozíciót követő 6. órában a tibia proximális epifizisének mediális condylusán eredő synoviális hártya mikrokeringését intravitális mikroszkópos technikával vizsgáltuk. A gyulladás által okozott szekunder nociceptív reakciókat (hő és mechanikai hyperalgesia) 24 órával később, a térd átmérő változásokat 48 óra múlva vizsgáltuk. Eredményeink szerint a gyulladást a kitapadt leukocyták számának szignifikáns növekedése jellemzi a synoviális hártya postcapillaris venuláiban, melyet a PC mintegy 40%-kal, míg a diclofenac átlagosan 22%-kal mérsékelte. A perivascularis leukocyta infiltráció és az intercelluláris adhéziós molekula-1 (ICAM-1) expresszió is mérséklődött PC hatására. A termális hyperalgesia 45%-

os növekedése és a mechanikai érzékenység mintegy háromszoros fokozódása mindkét kezelés hatására jelentősen mérséklődött. Következtetéseink szerint a PC jelentős gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik kísérletes arthritisben, a kedvező hatás a leukocyták által közvetített lokális gyulladási reakciók mérséklése révén valósul meg.

Kongresszusi előadások:

- Magyar Mikrokeringési Társaság éves kongresszusa (Balatonkenese, 2007), absztrakt⁶.
 - Európai Kísérletes Sebész Kongresszus (Varsó, 2008), absztrakt⁷.
 - Európai Shock Társaság Kongresszusa (Köln, 2008), absztrakt⁸.
- Teljes terjedelmű angol nyelvű közlemény⁹.

4. AZ OSTEOPOROSIS ÉS A KRÓNIKUS ÖSZTROGÉN PÓTLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA.

A VÉGTAG ISCHAEMIA ÁLTAL OKOZOTT MIRKOKERINGÉSI GYULLADÁSOS REAKCIÓK MEGHATÁROZÁSA KÍSÉRLETES OSTEOPOROSISBAN

Kísérleteinkben az osteoporosis és krónikus ösztrogén kezelés hatását vizsgáltuk a végtag ischaemia-reperfúzió (I-R) gyulladási következményeire a posztmenopauzás osteopénia klinikailag releváns modelljében, patkányokon. Ovariectomiát követően az állatok krónikus ösztrogén kezelést kaptak (20 µg/kg/nap), a 60 perces végtag I-R mikrokeringési következményeit 11 hónappal az ovariectomiát követően vizsgáltuk. Eredményeink szerint az ovariectomia által okozott (denzitometriával igazolt) osteoporosist az ösztrogén pótlás jelentősen mérsékelte. Intravitális mikroszkópos vizsgálattal bizonyítottuk, hogy mind az ovariectomizált, mind az álműtött állatokban az I-R a leukocyták mintegy háromszoros kitapadását okozta, és kb. 50-60%-kal fokozódott a kitapadásért felelős CD11b adhéziós molekula expressziója a leukocyták felszínén (flow cytometria). A TNF-α fokozott felszabadulását és az ICAM-1 adhéziós molekula felszaporodását igazoltuk az endothelium felszínén a periosteális erekben. A 17β-estradiol kezelés jelentősen mérsékelte a TNF-α felszabadulást és a leukocytá-endothelialis interakciókat a periosteumban, a CD11b és ICAM-1 expressziók befolyásolása nélkül. Következtetésünk szerint az osteoporosis önmagában nem befolyásolja a végtag I-R által kiváltott gyulladási reakciókat. A krónikus ösztrogén pótlás azonban az osteoporosis mérséklésén túl jelentősen csökkenti a végtag I-R által kiváltott mikrokeringési zavart is.

Előadások:

- MÉT Vándorgyűlés (Pécs 2007)¹⁰
- Angol nyelvű kézirat elbírálás alatt.

5. AZ OSTEOPOROSIS BEFOLYÁSOLÁSA LOKÁLIS Ca^{2+}/PO_4^- IONTOFORÉZISSSEL

A fenti (3. pont alatt részletezett) vizsgálataink folytatásaképpen kooperációban végzett (DTE, Kémia Tanszék) kísérleteink során megvizsgáltuk az osteoporosis következményeit patkányokon (3 hónapos korban végzett ovariectomiával osteoporosist indukáltunk), majd a partnerek által kidolgozott új eljárás segítségével megvizsgáltuk a szervetlen anyagot bevitelének lehetőségét a tibiákba. A csontdenzitás változásokat ultrahangos denzitometriával ellenőriztük az iontoforetikus kezeléseket után az állatok 14 hónapos koráig. Azt tapasztaltuk, hogy szignifikáns és tartós csontdenzitás növekedés érhető el az eljárással, mely új lehetőséget biztosíthat a lokális osteopénias állapotok (pl. Sudeck atrofia) terápiajában. Intravitális mikroszkópos eredményeink azt is igazolták, hogy a kezelésnek nincs mikrokeringési mellékhatása a csonthártyában.

Előadások:

- Európai Kísérletes Sebész Kongresszus (Rostock 2006), absztrakt¹¹

- Közép-Európai Reumatológus Kongresszus (Prága 2008), absztrakt¹²
Egy elfogadott angol nyelvű teljes közlemény¹³ és egy angol nyelvű közlemény elkészítés alatt.

6. VÉGTAG ISCHAEMIÁS PREKONDITIONÁLÁS HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA LOKÁLIS ÉS SZISZTÉMÁS GYULLADÁSOS MECHANIZMUSOKBAN.

Kísérleteinkben az ischaemiás prekondicionálás (IPC) hatását (2x10 / 10 perc I-R protokoll) vizsgáltuk egy későbbi I-R inzultus (60/180 perc) által kiváltott lokális és szisztémás gyulladási reakciók vonatkozásában. A neutrophil leukocita-endothelsejt interakciókat intravitális videomikroszkóppal végeztük; további paraméterek: intravasculáris neutrophil aktiváció: CD11b expresszió (FACS analízis, B&D Pharmingen); szolubilis ICAM-1 (ELISA, R&D Systems) és szöveti ICAM-1 (immunohisztokémia, B&D Pharmingen, SABC technika) adhéziós molekula expresszió mérés.

Eredményeink szerint az I-R hatására leukocita kitapadás mintegy kétszeresére, a CD11b expresszió mintegy 80% és 72%-kal, a sICAM-1 szint kb. 30% és 45%-kal emelkedett a reperfüzió 2. és 3. órájára. Az IPC kivédte az I-R indukált leukocita kitapadás növekedést és a fokozott CD11b expressziót a sICAM-1 szintek befolyásolása nélkül. Az IPC önmagában nem befolyásolta a vizsgált paramétereket. Immunohisztokémiával az ICAM-1 specifikus festődés csak fokálisan, főleg a csonthártya ereiben volt megfigyelhető. Az IPC nem befolyásolta ezt a változást. Következtetések: az IPC mérsékelte az I-R által kiváltott lokális leukocita aktivációt és szöveti akkumulációt, és csökkenti a szisztémás gyulladási aktivációt is.

Előadások:

- Európai Kísérletes Sebész Kongresszus (Rotterdam 2007), absztrakt¹⁴
 - MÉT Vándorgyűlés (Pécs 2007)¹⁵
 - Kísérletes Sebész Kongresszus (Pécs 2007), absztrakt¹⁶
- Megjelent egy angol nyelvű teljes közlemény¹⁷.

7. A C-AFFERENS INNERVÁCIÓ SZEREPE A VÉGTAG ISCHAEMIÁS PREKONDITIONÁLÁS MIKROKERINGÉSI HATÁSAIBAN.

A továbbiakban altatott patkányokon 60 perc teljes végtag ischaemiát hoztunk létre, melyet 180 perc reperfüzió követett (I-R). Kísérleteinkben az I-R inzultust megelőzve CGRP agonista hCGRP kezelést (0,3 µg/kg iv.) vagy ischaemiás prekondicionálást (IPC) (2x10' ischaemia/10' reperfüzió) alkalmaztunk. Az IPC-t 3 további alcsoportban (n=6-8) a CGRP antagonistá CGRP₈₋₃₇ (30 µg/kg), a TRPV-1 pozitív neuronokat inaktiváló resiniferatoxin (RTX, sc. 3x15 µg/kg/3 nap) vagy hordozóanyag jelenlétében valósítottuk meg. A tibia csonthártya mikrokeringését intravitális fluoreszcens videomikroszkóppal vizsgáltuk. Eredményeink szerint az ischaemia előtt alkalmazott IPC és hCGRP egyaránt mérsékelte az I-R által kiváltott leukocita-endothelsejt interakciókat a reperfüzió során, míg a CGRP₈₋₃₇ és RTX kezelések az IPC kedvező hatását kivédtek. Következtetés: a C-afferens neuronok közvetlen stimulációja és az IPC egyaránt mérsékelheti a tourniquet ischaemia mikrokeringési következményeit a végtag periosteumában.

Előadás:

- Európai Kísérletes Sebész Kongresszus (Nîmes 2009), absztrakt¹⁸
- Egy angol nyelvű közlemény áll elbírálás alatt.

8. KOLLOID OLDATOK ELTÉRŐ HATÁSA A VÉGTAG ISCHAEMIA-REPERFÚZIÓ ÁLTAL KIVÁLTOTT GYULLADÁSOS REAKCIÓKRA

Az általunk alkalmazott intravitális mikroszkópos módszerrel három kolloid oldat (4% zselatin, 6% dextran, és 6% hydroxyethyl-keményítő 130/0.4 /HES/) mikrohemodinamikai és gyulladásgátló hatását hasonlítottuk össze végtag ischaemia-reperfúziós (I-R) modellben patkányon. Eredményeink szerint a végtag I-R után a csonthártyában a leukocytá gördülés mintegy 2,6-, a kitapadás 7,1-szeres növekedést okoz, a funkcionális kapilláris denzitás és a vörösvértest áramlási sebesség jelentősen csökkent, a neutrophil leukocyták felszínén a CD11b adhéziós molekula fokozott expressziója mellett. A HES mérsékelte a leukocyták adhézióját a postcapilláris venulákban és csökkentette a CD11b sejtfelszíni aktivációját, emellett mérséklete a perfúziós zavart is a reperfúziós során. Ezzel szemben a dextrán és a zselatin kezelés nem mutatott jelentős hatást ezekben a paraméterekben. Következtetésünk szerint a HES oldat a dextránnál és a zselatinnál sokkal kedvezőbben befolyásolja a kísérletes végtag I-R által kiváltott periosteális mikrokeringési zavart és a neutrophil-endotheliális interakciókat. Megjelent egy angol nyelvű teljes közlemény³.

9. ENDOMEDULLÁRIS IMPLANTÁTUMOK HATÁSÁNAK VIZSGÁLATA A PERIOSTEÁLIS EREK DENZITÁSÁRA

Mikrokeringési vizsgálatainkat az endomedulláris implantátumok hatásainak objektív megítélése céljából folytattuk. Patkányok tibiájában az endosteális keringést roncsoltuk, ill. a velőürbe polietilén vagy titánium implantátumokat helyeztünk be. A műtétet követő 12. héten OPS intravitális mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a periosteális érdenzitást az anteromediális és anterolaterális felszíneken. Eredményeink szerint az endomedulláris felfűrés önmagában nem befolyásolta a periosteális erek denzitását (teljes érhossz/vizsgált terület). A polietilénnel implantált tibiákban magasabb érdenzitás volt megfigyelhető az anteromedialis és anterolateralis periosteumban (40% és 70%), mint az ellenoldali felfűrt tibiákban. A titánium implantátumok esetén az érdenzitás csak mintegy 20%-kal nőtt a periosteumban. A titánium implantátumok hatására a nagy erek aránya mintegy 20%-kal nőtt, míg a polietilén esetében hasonló mértékű csökkenést figyeltünk meg, azaz ebben az esetben a kis erek aránya fokozódott. Eredményeink szerint az endomedulláris implantátumok fokozzák az érképződést a periosteum ereiben, a reakciók azonban függnék a behelyezett implantátum anyagától. A polietilén növeli az érdenzitást a periosteumban és a képződött új erek zömét kis erek teszik ki. Ezzel szemben a biológiailag inert endomedullaris titanium kevesebb kompenzatórikus reakciót indukál, mint a polietilén, amely vélhetően mérsékli az endosteális erek regenerációját, ami végső soron a periosteális erek számának kompenzatórikus emelkedéséhez vezethet.

Előadás:

- Osteoarthritis Világkongresszus (Quebec 2009), absztrakt¹⁹.

Egy angol nyelvű közlemény áll elkészítés alatt.

PUBLIKÁCIÓS LISTA

1. Török L, Hartmann P, Erős G, Gurabi D, Szabó A. Examination of the microcirculatory consequences of carrageenan-induced subacute arthritis in rats. EUROPEAN JOURNAL OF TRAUMA AND EMERGENCY SURGERY 34(Suppl.1):6 (2008)
2. Török L, Hartmann P, Szabó A, Varga R, Kaszaki J, Greksa F, Boros M. A csonthártya mikrokeringésének kísérletes vizsgálata intravitális fluoreszcens videó-mikroszkópiával.

3. Varga R, Török L, Szabó A, Kovács F, Keresztes M, Varga G, Kaszaki J, Boros M. Effects of colloid solutions on ischemia-reperfusion-induced periosteal microcirculatory and inflammatory reactions: comparison of dextran, gelatin, and hydroxyethyl starch. *CRITICAL CARE MEDICINE* 36(10): 2828-2837 (2008)

IF: 6.594

4. Varga R, Gera L, Török L, Kaszaki J, Szabó A, Nagy K, Boros M. A foszfatidilkolin utókezelés hatása a végtag ischemia-reperfúziós károsodásra. *MAGYAR SEBÉSZET* 59(6): 429-436 (2006)

5. Gera L, Varga R, Török L, Kaszaki J, Szabó A, Nagy K, Boros M. Beneficial effects of phosphatidylcholine during hindlimb reperfusion. *JOURNAL OF SURGICAL RESEARCH* 139(1): 45-50 (2007)

IF: 1.836

6. Gurabi D, Török L, Erős G, Varga G, Szabó A, Boros M. Kísérletes modell az arthritis funkcionális és mikrokeringési vizsgálatára. *ÉRBETEGSÉGEK Suppl.* 1:11-12 (2007)

7. Hartmann P, Szabó A, Gurabi D, Erős G, Török L, Boros M. Phosphatidylcholine ameliorates the consequences of carrageenan-induced subacute arthritis in rats. *BRITISH JOURNAL OF SURGERY* 95(S6): p22 (2008)

8. Hartmann P, Szabó A, Gurabi D, Varga R, Erős G, Boros M. Effects of phosphatidylcholine in carrageenan-induced subacute arthritis. *SHOCK* 29: p76 (2008)

9. Hartmann P, Szabó A, Erős G, Gurabi D, Horváth G, Németh I, Ghyczy M, Boros M. Anti-inflammatory effects of phosphatidylcholine in neutrophil leukocyte-dependent acute arthritis in rats. *EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY* 622: 58-64 (2009)

IF: 2.787 (2008)

10. Varga R, Szabó A, Keresztes M, Kaszaki J, Németh I, Rázga Zs, Nagy K, Boros M: Végtag ischaemia által okozott gyulladáshoz vezető reakciók ovariektomizált és ösztrogénnel kezelt patkányokon, Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Programfüzet (2007)

11. Varga R, Szabó A, Gomez I, Jánvári K, Varga G, Pap L, Boros M. Responses of the tibial microcirculation to local iontophoretic treatment for osteopenia in rats. *EUROPEAN SURGICAL RESEARCH* 38(S1): 95 (2006)

12. Gomez I, Pap L, Szabó A, Boros M, Szekanecz Z. Calcium and phosphate delivery into osteoporotic rat tibia by a new iontophoretic treatment in vivo. *ANNALS OF THE RHEUMATIC DISEASES* 67 p146 (A50-A51) (2008)

13. Pap L, Gomez I, Pap L jr., Szabó A, Szekanecz Z. Development of natural calcium- and phosphate-donating microparticles and a new iontophoretic apparatus for the topical treatment of osteoporosis. Preliminary in vitro and in vivo studies. *JOINT BONE SPINE* (in press) (2010).

IF: 1.953 (2008)

14. Varga R, Szabó A, Keresztes M, Kaszaki J, Németh I, Rázga Z, Boros M. Inflammatory changes after short-term ischemic preconditioning of the rat hindlimb. *EUROPEAN SURGICAL RESEARCH* 98(S1): O187 (2007)
15. Varga R, Szabó A, Keresztes M, Kaszaki J, Németh I, Rázga Zs, Nagy K, Boros M: Adhéziós molekulák expressziójának változása ischaemiás prekondicionálás hatására teljes hátsó végtag ischaemia-reperfúziót követően patkányon, Magyar Élettani Társaság LXXI. Vándorgyűlése, Programfüzet (2007)
16. Varga R, Szabó A, Keresztes M, Kaszaki J, Németh I, Rázga Zs, Nagy K, Boros M. Végtagon végzett ischaemiás prekondicionálás hatása neutrophil-endothel sejt interakciókat befolyásoló adhéziós molekulák expressziójára patkányon. *MAGYAR SEBÉSZET* 3:p187 (2007)
17. Szabó A, Varga R, Keresztes M, Vízler C, Németh I, Rázga Z, Boros M. Ischemic limb preconditioning downregulates systemic inflammatory activation. *JOURNAL OF ORTHOPAEDIC RESEARCH* 27(7): 897-902 (2009)
IF: 2.963 (2008)
18. Hartmann P, Szabó A, Varga R, Zobolyák Z, Csősz B, Héger J, Boros M. C-afferent innervation mediates the microcirculatory effects of limb ischemic preconditioning in rats. *BRITISH JOURNAL OF SURGERY* 96(S5): p69 (2009)
19. Greksa F, Szabó A, Wellinger K, Sohár G, Boros M, Tóth K. The effects of endomedullary implants on the periosteal vessel structures of the rat tibia *OSTEOARTHRITIS AND CARTILAGE* 17 (S1): p155 (2009)

Title: Assessment and modification of the microcirculatory consequences of locomotor disorders

SUMMARY OF FINDINGS

1. DEVELOPMENT OF NOVEL METHODS FOR THE EXAMINATION OF MICROCIRCULATION OF THE PERIOSTEUM AND THE SYNOVIAL MEMBRANE

Description of the methodological background for in vivo examination of the synovial microcirculation was given at the 9th European Congress of Trauma and Emergency Surgery (Budapest 2008 - meeting abstract¹). Description of the methodological background of the examination of the periosteal microcirculation: full paper in Hungarian². The methodological background is also detailed in a full-length English paper³.

2. EXAMINATION OF THE EFFECTS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE ON THE MICROCIRCULATORY AND BIOCHEMICAL CONSEQUENCES OF LIMB ISCHEMIA

In these experiments, the consequences of a 60 min of complete hindlimb ischemia followed by a 180-min reperfusion (I-R) with or without phosphatidylcholine (PC) treatment were examined. The periosteal capillary RBC velocity (RBCV) and the functional capillary density (FCD) were decreased after reperfusion, while the primary and secondary leukocyte-endothelial cell interactions were increased by the end of reperfusion (rolling: from 20.8 to 40.0%, firm adherence: from 254 to 872 mm⁻²). I-R significantly increased the muscle myeloperoxidase (MPO) activity (from 14.94 to 63.45 mU/mg) and the proportion of degranulated mast cells (to 82.5%). PC treatment decreased the leukocyte rolling and sticking, preserved the FCD and improved the RBCV. The MC degranulation and MPO activity diminished significantly in the muscle layer. Conclusions: PC administration improves I-R-induced periosteal microcirculatory dysfunctions and ameliorates secondary inflammatory reactions. Systemic PC treatment could offer a potential treatment modality during hypoperfusion or inflammatory conditions of the bones and periosteum. Publications: full papers in English and Hungarian^{4,5}.

3. ANTI-INFLAMMATORY EFFECTS OF PHOSPHATIDYLCHOLINE IN NEUTROPHIL LEUKOCYTE-DEPENDENT ACUTE ARTHRITIS

We investigated the effects of exogenous phosphatidylcholine (PC) and non-steroidal diclofenac supplementation on polymorphonuclear cell influx in carrageenan-induced arthritis in rats. The microcirculatory consequences were evaluated by a novel method developed for direct intravital microscopic observation of the synovial membrane. Arthritis was induced by injection of a mixture of λ -carrageenan and kaolin into the knee joints and the animals were treated orally with PC (150 mg/kg twice daily), sodium diclofenac (0.5 mg/kg twice daily) or saline vehicle. Intravital videomicroscopy was used to investigate the leukocyte-endothelial interactions directly in the synovial membrane at 6 h after the challenge. The inflammation-induced thermal and mechanical secondary hyperalgesic reactions were assessed at 24 h, and the knee volume changes at 48 h after the insult. We have shown that the development of arthritis was accompanied by a significant increase in the number of adherent leukocytes in the synovial postcapillary venules, but this increase was reduced significantly (by approx. 40%) by PC, and slightly (by 22%) by diclofenac treatment. The perivascular infiltration of the neutrophil leukocytes and the intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expressions were reduced only by PC treatment. The significant decrease (45%) in the thermal nociceptive

latency, the 3-fold increase in the mechanical touch sensitivity and the knee cross-sectional area (which was increased by 35% by the arthritis induction) were significantly ameliorated by both treatments. This study demonstrated the anti-inflammatory effects of PC in experimental arthritis. The therapeutic potential may be linked to the reduction of neutrophil leukocyte-mediated microcirculatory inflammatory reactions.

Lectures:

- Congress of the Hungarian Microcirculation Society (Balatonkenese, 2007), abstract⁶
 - Congress of the European Society for Surgical Research (Warsow, 2008), abstract⁷
 - Congress of the European Shock Society (Cologne, 2008), abstract⁸
- Full-length paper in English⁹.

4. EXAMINATION THE EFFECT OF OSTEOPOROSIS AND CHRONIC ESTROGEN SUPPLEMENTATION.

LIMB ISCHEMIA-INDUCED MICROCIRCULATORY INFLAMMATORY COMPLICATIONS IN EXPERIMENTAL OSTEOPOROSIS

In this study, we examined how osteoporosis and chronic estrogen supplementation influence the microcirculatory complications of limb ischemia-reperfusion (I-R) in a clinically relevant time frame in ovariectomized rats, an experimental model of postmenopausal bone loss. Bilateral ovariectomy or sham operation was performed in 3-months-old rats, five months later, estrogen replacement therapy with 17 β -estradiol (20 μ g/kg/day) or vehicle treatment was initiated. The microcirculatory inflammatory consequences of 60-min total hindlimb ischemia followed by 180-min reperfusion were examined 11 months after ovariectomy.

We have shown that the osteoporosis that developed 5 months after ovariectomy was significantly ameliorated by estrogen replacement therapy. Both in ovariectomized and in non-ovariectomized animals, ischemia-reperfusion elevated the neutrophil adherence ~3-fold in the postcapillary venules of the periosteum (intravital microscopy), with an ~50-60% increase in intravascular neutrophil activation (CD11b; FACS analysis), an enhanced TNF- α release (ELISA) and periosteal expression of ICAM-1 (the endothelial ligand of CD11b; immunohistochemistry). Exogenous 17 β -estradiol considerably reduced TNF- α release and the number of neutrophil-endothelial interactions in the periosteum, without affecting the CD11b and ICAM-1 expression changes. We concluded that osteoporosis itself does not increase the magnitude of the limb ischemia-reperfusion-associated periosteal inflammatory reaction. Chronic estrogen supplementation, however, reverses osteoporosis and significantly ameliorates the microcirculatory consequences of transient ischemia.

Lectures:

- Meeting of the Hungarian Society of Physiology (Pécs 2007)¹⁰
- A full-length paper in English was submitted for publication.

5. LOCAL TREATMENT OF OSTEOPOROSIS WITH Ca²⁺/PO₄⁻ IONTOPHORESIS

In these studies osteoporosis was induced in 3-month-old rats and local osteoporosis (developed at the tibia within 21 weeks) was treated with a special method using Ca²⁺/PO₄⁻ iontophoresis (invention of our partners at the University of Debrecen). Bone density changes were determined using an ultrasonic device and the effectiveness of the iontophoretic treatment was checked until the age of 14 months. We could demonstrate a significant and long-lasting increase in the bone density in response to this treatment which may provide potential therapeutic benefit in local osteopenic diseases (such as Sudeck atrophy). Our intravital microscopic examinations also demonstrate that this treatment modality has no microcirculatory side effects in the periosteum.

Lectures:

- Congress of the European Society for Surgical Research (Rostock 2006), abstract¹¹
- Central European Congress of Rheumatology (Prague 2008), abstract¹²

A full-length publication in English is accepted for publication (in press)¹³ and another one is under preparation.

6. EXAMINATION OF THE EFFECT OF LIMB ISCHEMIC PRECONDITIONING ON THE LOCAL AND SYSTEMIC FORMS OF INFLAMMATORY ACTIVATION

In these experiments, the effects of ischemic preconditioning (IPC) induction (2 cycles of 10 min of complete limb ischemia and 10 min of reperfusion) followed by 60 min of ischemia / 180 min of reperfusion (I-R) were examined. Neutrophil leukocyte-endothelial cell interactions (intravital videomicroscopy), intravascular neutrophil activation (CD11b expression changes by flow cytometry), and soluble and tissue intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1; ELISA and immunohistochemistry, respectively) expressions were assessed.

Results: I-R induced enhanced leukocyte rolling and adherence in the periosteal postcapillary venules after 120 and 180 min of reperfusion. This was associated with a significantly enhanced CD11b expression (by ~80% and 72%, respectively) and moderately increased soluble and periosteal ICAM-1 expressions. IPC prevented the I-R-induced increases in leukocyte adherence and CD11b expression without influencing the soluble and tissue ICAM-1 levels. The results show that limb IPC exerts not only local, but distant anti-inflammatory effects through significant modulation of neutrophil recruitment.

Lectures:

- Congress of the European Society for Surgical Research (Rotterdam, 2007), abstract¹⁴
- Congress of the Hungarian Physiological Society (Pécs 2007)¹⁵
- Congress of the Hungarian Society of Experimental Surgery (Pécs 2007), abstract¹⁶

Full-length paper in English¹⁷.

7. C-AFFERENT INNERVATION MEDIATES THE ANTI-INFLAMMATORY MICROCIRCULATORY EFFECTS OF LIMB ISCHEMIC PRECONDITIONING IN RATS

In these experiments 60-min complete limb ischemia was followed by 180 min of reperfusion (I-R). In further rat experiments, the CGRP agonist hCGRP (0.3 µg/kg iv.) or ischemic preconditioning (IPC) (2x10' ischemia/10' reperfusion) was applied prior to the I-R insult. IPC was performed in 3 subgroups where the CGRP antagonist CGRP₈₋₃₇ (30 µg/kg/h), the TRPV-1 positive neuron inactivator resiniferatoxin (RTX, sc. 3x15 µg/kg/3 days) or vehicle was administered (n=6-8). The effects of CGRP₈₋₃₇ and RTX in the presence of I-R without IPC were also evaluated (n=6-7). Neutrophil-endothelial interactions in the tibial periosteum were investigated with intravital fluorescence microscopy.

Results: IPC or hCGRP administration prior to ischemia attenuated the leukocyte-endothelial interactions (rolling and adherence in the postcapillary venules) evoked by I-R during the reperfusion phase. CGRP receptor antagonism by CGRP₈₋₃₇ or C-afferent depletion by RTX did not influence the periosteal microcirculatory consequences of I-R, but reversed the microcirculatory inflammatory effects of limb IPC. Conclusions: direct stimulation of C-afferent neurons or IPC both may exert therapeutic benefits by ameliorating the periosteal microcirculatory consequences of tourniquet ischemia.

Lecture:

- Congress of the European Society for Surgical Research (Nimes 2009), abstract¹⁸.

A full-length paper in English is submitted.

8. THE EFFECTS OF DIFFERENT COLLOID SOLUTIONS ON THE INFLAMMATORY RESPONSE CAUSED BY LIMB ISCHEMIA-REPERFUSION

We have compared the microhemodynamics and anti-inflammatory reactions of colloid resuscitation with 4% gelatin, 6% dextran, or 6% hydroxyethyl starch (HES) 130/0.4 solutions in a limb ischemia-reperfusion (I-R) model in rats.

Results: reperfusion significantly increased the leukocyte rolling and firm adhesion (by 2.6 and 7.1-fold, respectively), evoked marked decreases in periosteal functional capillary density and red blood cell velocity (56% and 39%, respectively), and increased the CD11b expression on the circulating leukocytes (by 85%). HES, but not gelatin or dextran pretreatment, significantly inhibited the firm adherence of the leukocytes and reduced the elevated CD11b expression. HES pretreatment also effectively attenuated the decreases in functional capillary density and red blood cell velocity, whereas gelatin and dextran did not improve the microhemodynamics. Finally, ischemia had no direct effect on the soluble intercellular adhesion molecule-1 levels, whereas gelatin treatment increased significantly this parameter. Conclusions: when compared with gelatin or dextran solutions, hydroxyethyl starch provided a therapeutic advantage in this setting by exerting an inhibitory effect on the ischemia-reperfusion-induced local and systemic leukocyte reactions and the postischemic periosteal microvascular dysfunction. Publication: full-length paper in English³.

9. THE EFFECTS OF DIFFERENT ENDOMEDULLAR IMPLANTS ON THE PERIOSTEAL VESSEL STRUCTURE IN THE RAT TIBIA

Medullary cavities of tibias were drilled out with a series of microdrills (after opening the proximal metaphyseal cortices of the shin bones) and implants (polyethylene or titanium) were infixed tightly into the moulded cavity. After a 3-month-long follow up period, the anteromedial and anterolateral surfaces of tibial periosteum were exposed and the periosteal microarchitecture examined under a Cytoscan A/R-type intravital microscope. Vessel density of the anteromedial and anterolateral surfaces of tibial periosteum was evaluated using a computer software.

Results: endomedullary drilling (without implants) did not induce changes in the periosteal vascular density (total vessel length/examined area). In bones with polyethylene endomedullary implants, higher vascular density was observed in the anteromedial and anterolateral periosteum (by 40% and 70%, respectively) as compared to those of the intramedullarily drilled contralateral tibias. With titanium implants, however, the vascular density in the periosteum was higher only by 20%. A moderate, albeit not significant increase in the ratio of high diameter vessels in the periosteum was seen in response to endomedullary drilling and titanium infixing. In polyethylene implants opposite changes were observed; the ratio of larger vessels decreased by ~20% suggesting the predominance of small-diameter vessels in the periosteum. In conclusion, surgical damage of the endosteal vessels itself does not induce significant changes in the vascular structure of the rat periosteum. Endomedullary implants, however, induce an enhanced vessel formation in the periosteal compartment. The quality of the implant has a strong impact on these structural changes. Specifically, polyethylene brings about a marked increase in periosteal vascular density with a concomitantly increased rate of small vessels. Our results demonstrate that the biologically inert endomedullary titanium causes less pronounced, but the less bio-inert polyethylene induces more intense compensatory vessel hypertrophy in the periosteum. These results can be explained by the lesser degree of osteo-integrative features of polyethylene. Such a

material may inhibit the regeneration of the endosteal vessels which can be compensated by vascular neogenesis reactions of the periosteum.

Lecture:

- World Congress on Osteoarthritis (Quebec 2009), abstract¹⁹

A full-length paper in English is under preparation.