

Femur és mandibula mikromorfológiai vizsgálata osteoporosisban kétféle egér modellen

Doktori tézisek

Kovácsné dr. Körmendi Szandra Katalin

Semmelweis Egyetem

Rácz Károly Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Dobó Nagy Csaba PhD. egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Szalma József DSc. egyetemi docens

Dr. Joób-Fancsaly Árpád PhD. egyetemi docens

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Prof. Dr. Gera István PhD. egyetemi tanár

Tagok: Prof. Dr. Barabás József PhD. egyetemi tanár

Dr. Gerber Gábor PhD. egyetemi docens

Budapest

2022

1. Bevezetés

Az osteoporosis a csontok olyan generalizált megbetegedése, mely csökkent csonttömeg mellett mikroarchitektúra változással jár és ezek következményeképpen a törési rizikó megnövekszik. Mivel a betegség progressziója tünetmentesen vagy tünetszegényen történik, a betegség sokszor csak akkor kerül felismerésre, mikor az első típusos törés megtörténik.

Az, hogy a csontritkulás népbetegség, nem vonható kétségbe, mivel a legelfogadottabb adat szerint a világon 200-250 millió embert, Magyarországon pedig 900 ezer főt érint.

Az osteoporosisok beosztását kóreredet alapján lehet elvégezni. Primer csontritkulásról akkor beszélhetünk, ha a másodlagos osteoporosishoz vezető kórképeket ki lehetett zárni. A primer csontritkulásokat a páciens életkora alapján tudjuk a szakmai konszenzus alapján két csoportra osztani: juvenilis és involutiós osteoporosisra. Ez utóbbi csoportba tartozik a posztmenopauzás osteoporosis. Ebbe a csoportosításba nehezen

illeszthetőek a genetikai rendellenesség talaján kialakuló osteoporosisok, mint például a Frank-ter Haar szindróma esetében kialakuló csontritkulás.

2. Célkitűzés

Vizsgálatainkban a különböző csontok mikromorfológiai analízisét tűztük ki célul mikro-CT segítségével egér modellen. Kutatásainkhoz kétféle egér modellt kívántunk használni.

Az egyik egy génmódosítás eredményeképpen Buday és munkatársai által létrehozott Sh3pxd2b-KO egértörzs volt, ahol a Tks4 scaffold protein hiányát vizsgáltuk.

1. Meg kívántuk mérni a koponya és a femur növekedését, hogy összevessük a normális fejlődést mutató egerekével (WT).

2. El kívántuk végezni a femur kortikális és spongióza mikromorfológiai elemzését annak érdekében, hogy lássuk mutatja-e a Frank-ter Haar szindrómára jellemző osteoporotikus jellegzetességeket.

Másik felhasznált modellünk egy ovariektomizált egér modell volt, melyen a posztmenopauzás osteoporosisban

létrejövő csontmikroarchitektúra változásokat illetve a D3-vitamin terápia dózisu adagolásának hatásait kívántuk megfigyelni három mintavételi helyen.

3. Az egér femur kortikálisában ovariektómia hatására végbemenő osteoporotikus elváltozásokat kívántuk vizsgálni, illetve a D3-vitamin erre a folyamatra gyakorolt hatását.

4. Az egér femur spongiózában ovariektómia hatására végbemenő mikroarchitektúra változásokat és a BMD érték kapcsolatát kívántuk elemezni, illetve a D3-vitamin erre területre gyakorolt hatását.

5. Ovariektomizált egér mandibula spongiózájában a csontmikromorfológiai változások és a BMD érték kapcsolatát kívántuk vizsgálni, valamint a D3-vitamin hatását a folyamatra.

6. Egér mandibula condylus mikroszerkezetét kívántuk megfigyelni a fenti kísérleti körülmények közt.

3. Módszerek

3.1. Cephalometriai analízis mikro-CT segítségével az Sh3pxd2b-KO egér modellen

A vizsgált csoportokban 6-6 darab 8 hónapos egér volt. Az egyik csoportba az Sh3pxd2b-KO egerek tartoztak, a másikat a kontroll csoportot biztosító C57Bl/6 egerek alkották. Az állatok tartása a kísérleti állatok tartására vonatkozó európai ajánlás (Guidelines for Accomodation and Care of Animals) alapján történt, a PEI/001/2042-6/2014 engedélyben foglaltakkal megegyező módon. Az állatok exterminalása után a bal femur és a teljes koponya eltávolításra került. A szkennelést Skyscan 1172 mikro-CT készülékkel (Bruker, Kontich, Belgium) végeztük. Femur esetén a beállítások a következők voltak: a feszültség 50 kV, az áramerősség 198 μ A, a voxel méret 5,02 μ m. 0,5 mm-es alumínium filtert használtunk. A léptetés szöge 0,5 fokos volt. A koponya szkennelésekor a feszültség 60 kV, az áramerősség 166 μ A, a voxelméret 8,2 μ m volt, 0,5 mm-es alumínium filtert és 0,5 léptetési szöget alkalmazva. A rekonstrukcióhoz az NRECON (Skyscan, Bruker) szoftvert használtunk, majd a méréseket a CT Analyser 1.7.0.0. (Skyscan, Bruker)

szoftverben végeztük. A szegmentációhoz globális manuális threshold technikát alkalmaztunk.

A mérőpontokat a Richtmeister és munkatársai által közzétett tanulmánnyal azonos módon állapítottuk meg. Mértük a koponya hosszúságot, szélességet, magasságot, a mandibula ramusok hosszát és a bal femur hosszát. Hogy a mérések pontosságát megnöveljük, minden mérőpont azonosítást és mérést minden csonton háromszor végeztünk el. Ezek középértékét használtuk a statisztikai analízisben, mely elkészítéséhez GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., California, USA) szoftvert használtunk. Student-féle t-próbát végeztünk és a szignifikancia szintje 0,05 volt.

3.2. A Tks4 deficiencia hatásának vizsgálata a csont mikromorfológiára Sh3pxd2b-KO egértörzsön

A csontmikroarchitektúra vizsgálatát a femuron végeztük az Sh3pxd2b-KO és WT egerek esetén 4 és 8 hónapos korban. Az állatok tartása és kezelése az előzőekben ismertetett módon történt.

A szkennelési protokoll ebben az esetben a következő volt: a feszültség 50 kV, az áramerősség 198 μ A, a voxel méret 5,02 μ m. 0,5 mm-es alumínium filtert használtunk. A léptetés szöge 0,5 fokos volt. A rekonstrukcióhoz NRECON (Skyscan, Bruker) szoftvert alkalmaztunk, majd a csont mikromorfológiai elemzést CT Analyser 1.7.0.0. (Skyscan, Bruker) segítségével végeztük. A szegmentációt globális manuális threshold technikával végeztük.

A region of interest (ROI) a femur distalis epiphysisnél található növekedési lemeztől határoztuk meg. Innen a diaphysis irányába mért ötvenedik szelet magasságától 400 szeleten (1,807mm) keresztül vizsgáltuk a trabekuláris csontot. A kortikális vizsgálatát a növekedési lemeztől mért 500. és 600. szelet között végeztük.

A statisztikai analízishez GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., California, USA) szoftvert használtunk. Student-féle t-próbát végeztünk és a szignifikancia szintje 0,05 volt.

3.3. A D-vitamin hatása a femur csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

30 darab 6 hetes, 22 g-os CRL:OF1 (Charles River Laboratories) egeret három csoportra osztottunk. A D3 csoport 10 tagja miután átesett az ovariektómián, a műtét napjától kezdve 6 héten át minden nap per os D-vitamint kapott (4 ng/nap Alpha D3-TEVA 0,25 µg) 1 csepp mogyoróolajban, míg az OVX csoport 10 tagja a műtét után, illetve a SHAM csoport 10 tagja az álműtét után a vizsgálat ideje alatt a D-vitamin vivőanyagát, 1 csepp mogyoróolajat kapott. Az egerek étrendjét az ajánlásoknak megfelelően úgy alakítottuk ki, hogy az 0,025 mg kolekalciferolt/kg (0,65 µmol vagy 1000 NE/kg) tartalmazzon és normál konzisztenciájú legyen. Az állatok kezelésében és tartásában a Semmelweis Egyetem Állatkísérleti Szabályzatának és a kiadott engedélynek megfelelően jártunk el (22.1/2756/003/2007). Az állatok exterminálása után a bal femurt és a bal hemimandibulát eltávolítottuk. A vizsgálatot Skyscan 1172 mikro-CT készülékkel (Bruker, Kontich, Belgium) végeztük. A femur esetében a szkennelési protokoll a következő volt: a

feszültség 50 kV-ra, az áramerősség 198 μ A-ra, a voxel méret 5,02 μ m-re volt beállítva. 0,5 mm-es alumínium filtert használtunk. A léptetés szöge 0,5 fokos volt. A rekonstrukcióhoz NRECON (Skyscan, Bruker) szoftvert alkalmaztunk, majd a csont mikromorfológiai elemzést CT Analyser 1.7.0.0. (Skyscan, Bruker) segítségével végeztük. A szegmentációt globális manuális threshold technikával végeztük.

A region of interest (ROI) a femur distalis epiphysisnél található növekedési lemeztől lett meghatározva. Innen a diaphysis irányába mért ötvenedik szelet magasságától 400 szeleten (1,807mm) keresztül vizsgáltuk a trabekuláris csontot. A kortikális vizsgálatát a növekedési lemeztől mért 500. és 600. szelet között végeztük.

A statisztikai kiértékeléskor SPSS 24.0 (SPSS, Chicago, IL, USA) szoftvert használtunk. Az adatokon Kruskal-Wallis teszt után, ahol a szignifikancia szint 0,05 volt, post-hoc tesztként Dunn tesztet alkalmaztunk.

3.4. A D-vitamin hatása a mandibula csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

Ahogy a femur mikromorfológiai elemzésének módszertanánál ismertetésre került, az állatok bal hemimandibuláját is eltávolítottuk. Az előzőkkel megegyező módon a szkennelést Skyscan 1172 mikro-CT készülékkel (Bruker, Kontich, Belgium) végeztük.

A mandibula estében a feszültség 70 kV, az áramerősség 114 μ A és a voxel méret 7,1 μ m volt. 0,5 mm-es alumínium filtert és 0,5 fokos léptetési szöveget alkalmaztunk. A mintákon a mandibula spongióza paramétereinek vizsgálatára az 1. moláris fog gyökerei közti területet használtuk fel. A mandibula kortikális ROI a 3. moláris gyökerének distalis felszínétől kezdve mesialisan 250 szeleten át vizsgáltuk a mandibula bázisán. A rekonstrukció, szegmentáció, elemzés és statisztikai kiértékelés a femurnál ismertetett módon történt.

3.5. A D-vitamin hatása a mandibula condylus csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

A mandibula esetén leírásra került körülmények és paraméterek mellett vizsgáltuk az egerek eltávolított bal hemimandibuláján a condylus csontszerkezetét is. Ebben az esetben a szkennelési protokoll úgy változott, hogy a feszültség 60 kV, az áramerősség 156 μ A és a voxel méret 3,9 μ m volt. A filter mérete és típusa, valamint a léptetési szög megegyezett a mandibula többi területén alkalmazottal.

Itt a ROI a fejecs teljes szivacsos csontállományát jelentette.

A rekonstrukció, szegmentáció, elemzés és statisztikai kiértékelés a femurnál ismertetett módon történt.

3.6. A D-vitamin hatása a femur és a mandibula bone mineral density (BMD) értékére

A BMD meghatározásához a Burker-Micro-CT BMD kalibrációs protokollt követve, szükség van két különböző koncentrációjú kalcium-hidroxiapatit (CaHA) henger szkennelésére a vizsgálandó csontok szkennelését

követően. Egerek esetén ez 2 mm-es 0,25 g/cm³ és 0,75 g/cm³ sűrűségű rudakkal végzett kalibrációt jelent. A denzitás értékek tartományának meghatározása után az alábbi képlet alapján tudtuk kiszámolni az egyes mintavételi helyek BMD értékét, ahol a mért Hounsfield units (HU) értékeket használtuk:

$$BMD = \frac{124,961805 - HU}{4912,70746} \left(\frac{g}{cm^3} \right)$$

A BMD mérést a femur spongióza és a mandibula spongióza mintavételi helyén végeztük el. Az adatokon Kruskal-Wallis teszt után, ahol a szignifikancia szint 0,05 volt, Dunn-féle post-hoc tesztet alkalmaztunk.

4. Eredmények

4.1. Cephalometriai analízis mikro-CT segítségével az Sh3pxd2b-KO egér modellen

A KO egerek koponyája szignifikánsan rövidebbnek és keskenyebbnek bizonyult a WT egerekéhez viszonyítva, a koponyamagasságban azonban nem volt szignifikáns különbség.

A KO egereknél mért szignifikánsan alacsonyabb hossz/szélesség/magasság arány mutatja, hogy ezeknek az állatoknak leginkább antero-posterior irányban erősen összenyomott koponyájuk van. Ha a femur hosszát vetjük össze a koponya illetve a mandibula hosszával, akkor mindkét esetben szignifikánsan alacsonyabb értéket kapunk a KO egércsoportnál. A KO egerek esetén fogtorlódás és oldalsó nyitott harapás is megfigyelhető volt.

4.2. A Tks4 deficiencia hatásának vizsgálata a csontmikromorfológiára Sh3pxd2b-KO egértörzsön

A percent bone volume (BV/TV) szignifikánsan magasabb volt a WT egereknél mindkét korcsoportban a KO egerekhez mérten. A trabekulák száma (Tb.N) szintén szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét korcsoportban a KO egereknél, mint a WT-nál. A trabekulák vastagsága (Tb.Th) a 8 hónapos egereknél szignifikánsan kisebbnek mutatkozott a KO egereknél, mint a WT csoport tagjainál. A trabecular bone pattern faktor (Tb.Pf) mindkét korcsoportban szignifikánsan magasabb volt a KO

egereknél, mint a WT csoportban. A teljes porozitás (tot) értéke szignifikánsan magasabb volt a KO csoport mindkét korosztályában, mint a vad típusnál. A kortikális vastagság (Ct.Th) szignifikánsan alacsonyabb volt mindkét korcsoportban a KO egereknél, mint a WT egereknél.

4.3. A D-vitamin hatása a femur csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

A femur kortikális vizsgálata során a Ct.Th szignifikánsan alacsonyabb volt az OVX ($175,1 \pm 5,8 \mu\text{m}$) csoportban, mint a SHAM ($202,7 \pm 4,9 \mu\text{m}$) vagy a D3 ($203,8 \pm 6,1 \mu\text{m}$) csoportban.

A spongióza vizsgálata során a BV/TV szignifikánsan alacsonyabb volt az OVX ($10,98 \pm 1,78 \%$) csoportban, mint a SHAM ($21,68 \pm 3,62 \%$) csoportban. BV/TV értéknél a D3 csoportnál ($15,0 \pm 2,5 \%$) nem volt szignifikáns eltérés a SHAM csoporttól. A Tb.Th szignifikánsan alacsonyabb volt az OVX ($61,4 \pm 2,7 \mu\text{m}$) csoportban a SHAM ($70,3 \pm 2,4 \mu\text{m}$) és a D3 ($67,0 \pm 2,2 \mu\text{m}$) csoporthoz képest.

A Tb.Pf az OVX ($0,023 \pm 0,009 \text{ mm}^{-1}$) csoportban szignifikánsan magasabb volt, mint a SHAM ($0,011 \pm 0,003 \text{ mm}^{-1}$) csoportban. A D3 csoport ($0,018 \pm 0,002 \text{ mm}^{-1}$) nem mutatott szignifikáns eltérést.

4.4. A D-vitamin hatása a mandibula csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

A mandibula spongiózában az OVX csoportnál ($50,2\% \pm 4,3$) a BV/TV szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a SHAM ($68,4\% \pm 3,9$) vagy a D3 ($61,9\% \pm 4,9$) csoportnál. A BS/BV az OVX csoportban ($0,041 \pm 0,005 \text{ mm}^{-1}$) szignifikánsan nagyobb volt, mint a SHAM csoportnál ($0,03 \pm 0,006 \text{ mm}^{-1}$). A D3 csoport ($0,035 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$) nem mutatott szignifikáns eltérést a SHAM csoporttól, sem az OVX csoporttól.

A Tb.Th az OVX csoportban ($108,5 \pm 5,6 \text{ }\mu\text{m}$) szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a SHAM ($150,0 \pm 2,4 \text{ }\mu\text{m}$) vagy a D3 csoportnál ($151,4 \pm 2,6 \text{ }\mu\text{m}$). A mandibula kortikálisában nem voltak szignifikáns változások a vizsgált paraméterekben.

4.5. A D3-vitamin hatása a condylus csontszerkezetének mikromorfológiai tulajdonságaira

A condylusban a BV/TV értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az OVX csoportban ($44,93 \pm 4,09$ %), mint a SHAM ($57,61 \pm 4,5$ %) és a D3 ($51,47 \pm 5,01$ %) csoportban és szignifikáns volt a különbség a SHAM és D3 csoport között is. A BS/BV érték szignifikánsan magasabb volt az OVX ($0,125 \pm 0,015 \text{ mm}^{-1}$) és a D3 ($0,109 \pm 0,016 \text{ mm}^{-1}$) csoportban, mint a SHAM ($0,088 \pm 0,012 \text{ mm}^{-1}$) csoportban.

A Tb.Th érték szignifikánsan magasabbnak bizonyult a SHAM csoportban ($42,8 \pm 3,1 \text{ }\mu\text{m}$), mint az OVX ($34,42 \pm 4,9 \text{ }\mu\text{m}$) és D3 ($36,23 \pm 3,1 \text{ }\mu\text{m}$) csoportokban. A Tb.Pf érték szignifikánsan magasabb volt az OVX csoportban ($-0,01 \pm 0,003 \text{ mm}^{-1}$), mint a SHAM ($-0,039 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$) és D3 ($-0,043 \pm 0,01 \text{ mm}^{-1}$) csoportokban.

4.6. A D-vitamin hatása a femur és a mandibula bone mineral density (BMD) értékére

A femur területén mért BMD értékek szignifikánsan alacsonyabbak voltak az OVX csoportban ($0,14 \pm 0,02$

g/cm^3), mint a SHAM ($0,25 \pm 0,05 \text{ g/cm}^3$) és a D3 ($0,18 \pm 0,03 \text{ g/cm}^3$) csoportban.

A mandibulában mért BMD értékek szintén szignifikánsan alacsonyabbak voltak az OVX csoportban ($0,5 \pm 0,07 \text{ g/cm}^3$), mint a SHAM ($0,69 \pm 0,08 \text{ g/cm}^3$) és a D3 ($0,64 \pm 0,07 \text{ g/cm}^3$) csoportban.

A SHAM és D3 csoport között egyik mintavételi helyen sem volt szignifikáns különbség.

5. Következtetések – Új megállapítások

1. Az Sh3pxd2b-KO egértörzs vizsgálatai jól mutatják, az egész koponya és femur mérései és arányai tekintetében, a Frank-ter Haar szindrómás (FTHS) páciensekhez hasonló csont makromorfológiai elváltozásokat.

2. Az Sh3pxd2b-KO egértörzs mikro-CT-vel végzett mikromorfológiai vizsgálata a femuron kimutatta, hogy annak szerkezete osteoporotikus jelleget mutat a Tks4 állványprotein hiánya miatt.

3. A femur kortikális postmenopauzás osteoporosisban bekövetkező elvékonyodását a D3-vitamin terápiás dózisé

adagolása egymagában is képes volt megakadályozni egér modell esetén.

4. A femur trabekuláris csontszerkezeti paramétereinek és BMD szintjének figyelembe vételével elmondható, hogy a D3-vitamin terápiás dózisú adagolása egymagában is képes volt kivédeni a kezdeti gyors csontvesztést ovariektomizált egér modell esetén.

5. A mandibula trabekuláris csontarchitektúrájának és BMD szintjének megőrzésében a D3-vitamin terápiás dózisú adagolása egymagában is eredményesnek bizonyult ovariektomizált egérmódelletén.

6. A D3-vitamin a mandibula condylusának csontszerkezetére korlátozott védőhatást fejtett ki terápiás dózisú adagolás mellett, ovariektomizált egér modell esetén.

6. Saját publikációk jegyzéke

6.1. A doktori értekezés alapját képező publikációk:

Körmendi Sz, Vecsei B, Ambrus Sz, Orhan K, Dobó-Nagy Cs. (2021) Evaluation of the effect of vitamin D3 on mandibular condyles in an ovariectomized mouse model: a micro-CT study. *BMC Oral Health*, 21:627-634 DOI: <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01980-8> IF:3,748

Körmendi Sz, Vecsei B, Orhan K, Dobó-Nagy Cs. (2019) Micro-CT in Osteoporosis Research In: Orhan K. (editor), *Micro-computed Tomography (micro-CT) in Medicine and Engineering*. Springer, Cham. 87-107 DOI: https://doi.org/10.1007/978-3-030-16641-0_7

Vas V, Kovács T, **Körmendi Sz**, Bródy A, Kudlik Gy, Szeder B, Mező D, Kállai D, Koprivanacz K, Merő BM, Dülk M, Tóvári J, Vajdovich P, Şenel SN, Özcan I, Helyes Zs, Dobó-Nagy Cs, Buday L. (2019) Significance of the Tks4 scaffold protein in bone tissue homeostasis. *Sci Rep*. 9:5781-5791 IF:3,998

6.2. A doktori értekezés témájával összefüggő publikációk:

Kertész Zs, Győri D, **Körmendi Sz**, Fekete T, Kis-Tóth K, Jakus Z, Schett G, Rajnavölgyi E, Dobó-Nagy Cs, Mócsai A. (2012) Phospholipase C γ 2 is required for basal but not oestrogen deficiency-induced bone resorption. Eur J Clin Invest, 42(1):49-60 IF:3,365

Joós-Kovács G, Vecsei B, **Körmendi Sz**, Gyarmathy VA, Borbély J, Hermann P. (2019) Trueness of CAD/CAM digitization with a desktop scanner – an in vitro study. BMC Oral Health, 19:280-294 IF:1,911

Jász B, Jász M, **Körmendi Sz**, Vecsei B, Joós-Kovács G, Hermann P, Borbély J. (2022) Ex vivo digital comparison of four impression techniques using an industrial laser scanner. Stoma Edu J, 9(1):17-22

Palaszkó D, König J, Borbély J, Hermann P, **Körmendi Sz**. (2022) Digitális munkafolyamatok teljes alsó-felső lemezes fogpótlás készítésekor (esetismertetés). Fogorvosi Szemle. 114(1):29-36 DOI: <https://doi.org/10.33891/FSZ.114.1.29-36>