

SEMMELWEIS EGYETEM
DOKTORI ISKOLA

Ph.D. értekezések

2623.

VÁCZ GABRIELLA

A vérkeringési rendszer normális és kóros működésének mechanizmusai
című program

Programvezető: Dr. Benyó Zoltán, egyetemi tanár

Témavezető: Dr. Lacza Zsombor, tudományos főmunkatárs

Vérkészítmények sejtregenerációra kifejtett hatásának vizsgálata humán csontszöveti iszkémiában

Doktori értekezés

Váczi Gabriella

Semmelweis Egyetem

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lacza Zsombor, DSc., tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Juhász Emese Réka, Ph.D., szakorvos
Dr. Molnár Szabolcs, Ph.D., főorvos

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc, egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Andréka Péter, PhD, főigazgató főorvos
Dr. Zsembery Ákos, PhD, egyetemi docens

Budapest

2021.

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke	4
1. Irodalmi háttér.....	7
1.1. Csontbetegségek általában	7
1.2 Csontregeneráció	8
1.2.1. Csontregeneráció csontszöveti iszkémiában.....	8
1.2.1.1. Konzervatív kezelés	10
1.2.1.2. Alternatív kezelés	11
1.2.1.2.1. Növekedési faktorok	12
1.2.1.2.1.1. Csont morfogénikus fehérje	13
1.2.1.2.1.2. Fibroblaszt növekedési faktor	13
1.2.1.2.1.3. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor.....	14
1.2.1.2.1.4. Inzulinszerű növekedési faktor	15
1.2.1.2.1.5. Trombocitából származó növekedési faktor	15
1.2.1.2.1.6. Transzformáló növekedési faktor.....	16
1.2.1.2.2. Vérképzőanyagok.....	17
1.2.1.2.2.1. Trombocitában gazdag plazma	17
1.2.1.2.2.2. Trombocitában gazdag fibrin.....	21
2. Célkitűzések.....	23
3. Módszerek	24
3.1. Csontexplantátumok	24
3.2. Oxigén-glükóz depriváció modellezése.....	25
3.3. Az explantátumokon lévő sejtek életképességének elemzése kvalitatív módon..	26
3.4. Az explantátumokon lévő sejtek életképességének elemzése kvantitatív módon	26
3.5. Vérképzőanyagok izolálása, aktiválása és kezelése	27
3.5.1. Trombocitában gazdag plazma izolálása.....	27
3.5.2. Trombocitában gazdag plazma heparinizálása	28
3.5.3. Heparinizált-trombocitában gazdag plazma aktiválása.....	29
3.5.4. Heparinizált-különböző koncentrációjú trombocitában gazdag plazma	30
3.5.5. Hiperakut szérum izolálása.....	30
3.6. Kísérleti protokoll.....	31
3.6.1. Kísérleti csoportok	33

3.7. Laboratóriumi paraméterek.....	35
3.8. Növekedési faktor tartalom.....	35
3.8.1. Növekedési faktor tartalom meghatározása részletesen.....	36
3.9. Hisztológia.....	38
3.10. Statisztika.....	39
4. Eredmények.....	40
4.1. Az MTT mérés beállítása.....	40
4.1.1. MTT inkubációs idő beállítása.....	40
4.1.2. Izopropanolos oldási idő beállítása.....	40
4.2. A tenyésztés hatása.....	41
4.3. Oxigén-glükóz depriváció hatása az explantátumokra.....	43
4.4. Trombocitában gazdag plazma hatása oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra.....	46
4.4.1. Natív trombocitában gazdag plazma.....	46
4.4.2. Heparinizált trombocitában gazdag plazma.....	47
4.4.2.1. Heparinizált-aktivált trombocitában gazdag plazma.....	49
4.4.2.2. Heparinizált-különböző koncentrációjú trombocitában gazdag plazma.....	51
4.5. Hiperakut szérum hatása az oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra.....	52
4.5.1. Hiperakut szérum kezelés.....	52
4.5.2. Hiperakut szérum előkezelés.....	53
4.5.3. Hiperakut szérum hatása közvetlenül az oxigén-glükóz depriváció után.....	54
4.6. Rekombináns növekedési faktorok hatása oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra.....	55
4.7. A vérkészítmények laboratóriumi paraméterei.....	57
4.8. Proteome Profiler esszé.....	59
4.9. Hisztológia eredménye.....	61
5. Megbeszélés.....	64
6. Következtetések.....	73
7. Összefoglalás.....	75
8. Summary.....	76
9. Irodalomjegyzék.....	77
10. Saját publikációk jegyzéke.....	98
11. Köszönetnyilvánítás.....	101

Rövidítések jegyzéke

ADSCs	Zsírból származó őssejtek (Adipose-derived stem cells)
AU	Tetszőleges egység (Arbitrary Unit)
AVN	Avaszkuláris nekrozis (Avascular necrosis)
AVFN	Avaszkuláris combfejnekrozis (Avascular necrosis of the femoral head)
bFGF	Bázikus fibroblaszt növekedési faktor (Basic fibroblast growth factor)
BMP	Csont morfogénikus fehérje (Bone morphogenic protein)
BMSC	Csontvelő eredetű őssejt (Bone marrow stromal cells)
EDTA	Etilén-diamin-tetraecetsav (Ethylene diamine tetraacetic acid)
EGF	Epidermális növekedési faktor (Epidermal growth factor)
FCS	Fetális borjú szérum (Fotal calf serum)
FBS	Fetális szarvasmarha szérum (Fotal bovine serum)
FGF	Fibroblaszt növekedési faktor (Fibroblast growth factor)
FGFR	Fibroblaszt növekedési faktor receptor (Fibroblast growth factor receptor)
GF	Növekedési faktor (Growth factor)
HAS	Hiperakut szérum (Hiperacute serum)
HB-EGF	Heparin-kötő epidermális növekedési faktor (Heparin-binding epidermal growth factor)
IGF	Inzulinszerű növekedési faktor (Insulin-like growth factor)
IgG	Immunglobulin G
MMP-8	Mátrix metalloproteináz-8 (Matrix metalloproteinase-8)
MPV	Vérlemezke átlagos térfogata (Mean platelet volume)

MRI	Mágneses rezonancia képalkotás (Magnetic resonance imaging)
MSCs	Mezenchimális őssejtek (Mesenchymal stem cells)
MTT	Metil-tiazol-tetrazólium (Metil-tiazol-tetrazolium)
NSAID	Nem szteroid gyulladáscsökkentő (Non-steroidal anti-inflammatory drug)
OA	Oszteoarthritisz (osteoarthritis)
OGD	Oxigén-glükóz depriváció (Oxygen-glucose deprivation)
OP	Operáció napja
PDGF	Trombocitából származó növekedési faktor (Platelet-derived growth factor)
PF-4	Vérlemezke faktor-4 (Platelet factor-4)
PFH	Plazmamentes hemoglobin (Plasma-free hemoglobin)
PLGA	Poli glikol tejsav (Poly(lactide-co-glycolide))
PPP	Trombocitában szegény plazma (Platelet poor plasma)
PRF	Trombocitában gazdag fibrin (Platelet rich fibrin)
PRP	Trombocitában gazdag plazma (Platelet rich plasma)
PRP_{DS}	Kétszeres centrifugálás során nyert Trombocitában gazdag plazma (Double spin Platelet rich plasma)
PRP_{HP}	Magas trombocita-és fehérvérsejtszámú Trombocitában gazdag plazma (Platelet rich plasma in a high amount of white blood cells and platelets)
PRP_{LP}	Alacsony trombocita-és fehérvérsejtszámú PRP (Platelet rich plasma in lower number of white blood cells and platelets)
RBC	Vörösvértest (Red blood cell)
SEM	Közéérték közepes hibája (Standard error of the mean)
TGF-β	Transzformáló növekedési faktor- β (Transforming growth factor- β)

- TIMP-1** Metalloproteináz szöveti inhibitora-1 (Tissue inhibitor of metalloproteinase-1)
- VEGF** Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular endothelial growth factor)

1. Irodalmi háttér

1.1. Csonbetegségek általában

Csontunk, a testünket támogató szerkezetünk védi létfontosságú szerveinket, a vörsejtek előállításának helyszínéül szolgál és segít a szervezet sav-bázis egyensúlyának megtartásában. A csontok jelentősége és fontossága akkor válik egyértelművé, amikor olyan betegségben szenvedünk, ahol a csont nem működik tökéletesen, mint az oszteonekrózis, oszteoarthritisz, oszteomiELITISZ vagy oszteoporózis. Ezek a betegségek, valamint az ortopédiai traumás sérüléseket követő műtétek, mint a teljes ízületi artroplasztika, implantátum rögzítése vezethetnek a csonthibák és üregek kialakulásához. A csontsérülések kezelésének gazdasági és környezeti hatása pedig számottevő [1]. Az öregedő népességre egyre inkább jellemző az elhízás és a szegényes fizikai aktivitás, ami megnöveli a különböző csonttörések, szkoliózis, oszteoporózis és csontfertőzések előfordulásának esélyét. Tény, hogy évente több mint 20 millió embert érint valamilyen trauma vagy betegség okozta csontszövetveszteség világszerte [2]. A csonthibák, ezen belül az oszteoporózis gyógyítása nagyjából 10 és 22 milliárd \$ költséget jelent az USA-ban [3], az Európai Unióban pedig nagyjából 40 milliárd Euró fedeti le ezeket a kiadásokat, ami becslések szerint 2025-re 25%-kal fog emelkedni [4, 5]. Az izom-és csontrendszeri problémák annyira gyakoriak, hogy egy 2007-es uniós felmérésben azt találták, hogy a lakosság 22%-a érintett volt már valamikor az élete során legyen szó izom, csont vagy ízületi problémáról [6].

Magyarország is hasonló képet mutat mozgásszervi, azon belül csontot érintő betegségek terén. Ezen betegségek korai felismerése, pontos diagnosztizálása és azonnali kezelése nagymértékben hozzájárulhat, hogy elkerüljük a maradandó deformitásokat. Egy hirtelen bekövetkező törés vagy évekig fennálló, kezeletlen állapot azonban sokszor szükségessé teszi az operációt, melyek közül az egyik leggyakoribb a protézisbeültetés: nagyjából 12-15 ezer csípő- és 5-6 ezer térdprotézis beültetés történik évente hazánkban [7]. Sebestyén és munkatársai egy 2010-ben megjelent tanulmánya szerint a 100 000 lakosra jutó csípőprotetizált személyek száma átlagosan 78,86 fő Magyarországon, akik a 70-79 éves betegek köréből kerülnek ki [8]. Egy műtét utáni felépülés akár az időt, akár a költségeket nézzük óriási terhet ró mind az egyén mind a társadalom egészére nézve.

Ezért is szükséges olyan kezelési formákat keresnünk, amelyek minél kisebb beavatkozással képesek segíteni a csont regenerációját.

1.2 Csontregeneráció

A csontbetegségek kialakulásának megértése a csontbiológia ismeretéből indul ki. A csont egy mineralizált kötőszövet, amely fontos szerepet játszik a szervezetben a mozgás, a lágyszövetek védelme és a csontvelő elhelyezése értelmében. A csontszövet olyan nanokompozit, amely a főleg kollagénekből álló szerves részből, a szervetlen nanokristályos hidroxipatitból (HA) és vízből áll [9]. A csontszövet sejtjei az oszteoprogenitor sejtek, a belőlük differenciálódott oszteoblasztok, az oszteoblasztokból alakult oszteociták és a fagocitózist végző oszteoklasztok. Az oszteoblasztok termelik az extracelluláris mátrix minden elemét, amely befolyásolja a sejtek adhézióját és proliferációját és az oszteoblasztokkal együtt alkotják az oszteoid szövetet, a későbbi érett csontszövetet. A csontátépülés, remodeling során az oszteoklasztok csontlebontó és az oszteoblasztok csontépítő tevékenysége összehangolt, és ez teszi lehetővé a sérülések, törések gyors gyógyulását [10].

A csont egyike azon néhány szövetnek, mely egy-egy sérülést követően képes a teljes regenerációra. A csontsérülések többsége hegszövet kialakulása nélkül gyógyul és a csont korábbi tulajdonságait visszaállítva regenerálódik. Bizonyos klinikai esetekben azonban ki kell egészíteni, meg kell támogatni a csont saját regenerációját. Ilyen állapot például a trauma, fertőzés, daganat, csonttritkulás vagy az avaszkuláris nekrosis (AVN) [11]. Napjainkban számos módszer létezik, hogy a csökkent vagy elégtelen csontregenerációt fokozzuk, akár konvencionális akár alternatív terápiát alkalmazva.

Jelen dolgozatban a csípőprotézis beültetéséhez vezető egyik leggyakoribb csontbetegséget, a csontszöveti iszkémiát és a hozzá kapcsolódó avaszkuláris combfejnekroszist (AVFN) szeretném részletesebben tárgyalni.

1.2.1. Csontregeneráció csontszöveti iszkémiában

A csont egy élő szövet, melynek tápanyagellátottsága a véráram segítségével biztosított. Az iszkémia a vérellátás csökkenését jelenti, amely olyan súlyos, hogy miatta működési zavar lép fel, így ugyanis az oxigén és a tápanyag nem jut el a célszövetig. A hosszabb ideig tartó iszkémia szöveti elégtelenséghez és végül sejthalálhoz vezet. A csontszövetben bekövetkezett iszkémia miatt kialakult nekroszist oszteonekroszissnak, avaszkuláris nekroszissnak (AVN) vagy aszeptikus nekroszissnak nevezzük [12]. Az

avaszkuláris nekrozis bármely csontot érintheti, de leggyakrabban a hosszú csontok, ezen belül is a combcsont feji részénél fordul elő.

Az élő szövetek többségét több ér hálózza be, így, ha az egyik sérül valamilyen oknál fogva, a többi ér még elegendő tápanyagot képes juttatni a célszövethez. A csípő ízülete egy olyan terület, amely csak néhány tápláló érrel rendelkezik. A csípőízület fejét alkotó combcsontfej vérellátása a combnyakon keresztül történik. A femorális fej fő vérellátottságát az a. circumflexa femoris medialis (mediális combcsontrendszeri artéria) biztosítja [13]. Akár traumatikus akár nem traumatikus okból sérül ez az artéria, lecsökken a véráram, ami a combfej avaszkuláris nekrozisát (AVFN) és végső soron az oszteociták halálát eredményezi [14].

A combfejnekrozis kialakulásában több kockázati tényező szerepel. A sérülések, törések okozta trauma, az alkoholfogyasztás, a kortikoszteroidok szedése, a hematológiai betegségek vagy a különböző autoimmun állapotok jelenléte mind hajlamosító tényezőt jelentenek [15]. Néhány esetben azonban nem tudjuk az oszteonekrozis kialakulásának okát, ekkor idiopátiás esetekről beszélünk.

Becslések szerint évente 20 000-30 000 új beteget diagnosztizálnak oszteonekrozissal, ami az Egyesült Államokban végzett 250 000 teljes csípőartroplasztika mintegy 10%-át teszi ki [16]. A combfejnekrozis időben elnyúló betegség, így preklinikai, korai klinikai, kifejlett és végstádiumra szokás felosztani. A combfejnekrozist a képalkotó vizsgálatok közül röntgennel lehet beazonosítani, ez lehet az első diagnosztikai lépés. Az MRI (mágneses rezonancia képalkotás) vizsgálattal már a korai stádiumban felismerhető a combfej keringési zavara és degenerációja. A Ficat-féle osztályozás alapján 5 csoportra osztható a combfejnekrozis állapota [17, 18], melyet az 1. ábra szemléltet.

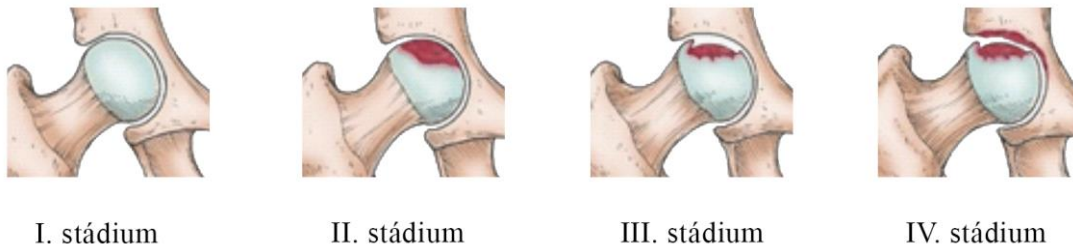
0. Stádium: nincs klinikai tünet, nincs radiológiai tünet, az MRI tünetek bizonytalanok.

I. Stádium: a fájdalom megjelenik, korlátozott a beteg mozgása, MRI vizsgálaton háromszögletű jelgazdag terület vehető ki a combfejben, röntgenfelvételen nincs elváltozás.

II. Stádium: a klinikai tünetek továbbra is fennállnak, a röntgenfelvétel ék alakú nekrotikus területet, diffúz porózist, szklerózist vagy cisztát mutat.

III. Stádium: a fájdalom súlyosbodik, a beteg mozgása minden síkon korlátozott, a femurfej ellapul, az ízfelszín beroppan.

IV. Stádium: beszűkül az ízületi rés, az ízületi porc eltűnik, oszteopiták jelennek meg, a combfej deformált alakot ölt.



1. ábra A Ficat-féle osztályozás stádiumai Az ábrán jól megfigyelhető a femurfej alakjának változása és az ízületi rés beszűkülése a stádiumok előrehaladásával (Beaulé és Amstutz nyomán) [18].

1.2.1.1. Konzervatív kezelés

Az ortopédiai betegségek pontos diagnosztizálása után a beteg többféle kezelésben részesülhet. A konzervatív kezelések, mint a beteg testrész tehermentesítése, a lokálisan és szisztémásan ható gyógyszerek, a fizio-és balneoterápia, a gyógytorna nagy eredményeket képes elérni, de csak akkor, ha a mozgásszervi betegséget korán felismerjük.

A combfejnekrozis konzervatív kezelése közül meg kell említenünk a csípőízület átmeneti tehermentesítését, NSAID (nem szteroid gyulladáscsökkentő) szedését. Javíthatunk a helyzeten a csípő tornáztatásával, úszással, kerékpározással és a csípő vérkeringésének fokozásával pl. keringésjavító gyógyszerek adásával. Néhány esetben elektromos ingerlés is alkalmazható. Mindezek mellett, illetve után léteznek az ún. ízületmegtartó műtéti kezelések is. Ez a korai stádiumban lévő betegeknél alkalmazható, amikor is a combfej nekrotikus részét megfűrjük, így felfrissítik ezt a területet és új erek nőhetnek ide. Ez a core decompression vagy másnéven felfűrés, mely csökkenti a nyomást a combcsont fején belül, így csökkenteni lehet a beteg fájdalmát. Az oszteotómia a késői stádiumban alkalmazható, amikor az elhalt rész kikerül a terhelési zónából. De ma már ezt ritkán használják. Az arthroplastika a megoldások jelentős részét kiteszi. A

csípőprotézis beültetésével ugyanis a fájdalom megszűnik és visszatérhet a beteg az eredeti életéhez [17]. A csípőprotézis végstádiumú betegeknél jelenthet elsősorban megoldást, azonban ennek az élettartama csupán 10-15 év, így az 50-60 évnél fiatalabb betegek számára ez nem túl vonzó lehetőség. Ezért is szükséges néhány kreatív és innovatív kezelés fejlesztése, hogy a fiatalabb generációnak is segíteni lehessen.

1.2.1.2. Alternatív kezelés

Az előző fejezetben ismertetett műtéti beavatkozások többsége kielégítő eredményt tud adni bizonyos ideig, de végleges megoldást nem. Ha a betegség előrehaladott állapotban van illetve kritikus méretűnél nagyobb csontdefektussal állunk szemben, akkor a regeneratív orvoslásban alkalmazott auto - és allograftok segítségével meg lehet közelíteni a beteg korábbi életkörülményeihez hasonló állapotot, de ezek a kezelési módszerek is komoly korlátokat jelentenek mind a javításra, mind a csont regenerációjára nézve. Az autograft alkalmazásának hátrányai közé tartozik a donorhelyen kialakuló fájdalom és a helyi szövődmények, például a hematoma vagy a törés bekövetkezése. Az allogén graftok használata is számos korlátozással bír, úgymint a donorok hiánya, a magas költségek, a sterilizálás, a vírusos betegségek átvitelének kockázata, a bakteriális fertőzés vagy az immunológiai kilökődés [19]. Az auto- és allograftok korlátai ezért újabb irányba vezették a kutatókat.

Ortopédiai betegségek kezelésében olyan csonthelyettesítőre van szükség, ami a lehető legjobban hasonlít a csont eredeti szerkezetére, tulajdonságaira és biológiailag aktív anyagok segítségével fel tudja gyorsítani a regenerációs folyamatokat. Ez a törekvés vezetett a szövetépítéshez, mint egy új, alternatív kezelési módszerhez, amely áthidaló megoldást jelenthet a konzervatív kezelések és a protézisbeültetés között.

A szövetépítés viszonylag új és rendkívül multidiszciplináris terület. Számos tudományágat összekapcsol, úgymint az anyagtudomány, a gépészet, a klinikai orvoslás és a genetika [20]. A szövetépítés fő célja a természetes viselkedés szimulálása, a szövetek funkciójának helyreállítása és javítása porózus, háromdimenziós állványok, ún. scaffoldok előkészítésével, amelyekre ezután sejteket és növekedési faktorokat juttatnak, amit végül egy bioreaktorban helyeznek el [21-23].

A szövetépítés területén belül a csontszövetépítés szolgál a különböző okokból származó csonthibák javítására. A csontátültetés a vér transzfúziót követő 2. leggyakoribb transzplantáció [24]. Mivel az emberek várható átlagos élettartama egyre magasabb, így

folyamatosan növekszik a csontátültetés utáni igény, melyet a hagyományos terápiák alkalmazásán túl a szövetépítési és egyéb módszerekkel lehet orvosolni.

A szövetépítés 3 fő eleme közül a növekedési faktorokra szeretnék fókuszálni a dolgozatban, ezek közül is azokra, amelyek bizonyítottan segítik a csontregenerációt.

1.2.1.2.1. Növekedési faktorok

A növekedési faktorok (GF) olyan polipeptidek, amelyek lokálisan hatnak a sejtaktivitások modulátoraiként. Hármias hatásuk ismert: autokrin hatásuk során befolyásolják a sejt eredetét vagy egy azonos fenotípusú sejtet; parakrin hatásként befolyásolják azokat a szomszédos sejteket, melyek különböző fenotípussal rendelkeznek; endokrin hatásuk révén pedig olyan sejtekre is képesek hatni, amelyek egy távolabbi anatómiai helyen találhatóak. Egyetlen egy növekedési faktor irányíthat több sejtípust és különböző funkciók kialakulásáért felelhet. A csontkárosodás során keletkezett vérrögben a vérlemezkék alfa-granulátumai felszabadítják a TGF- β -át, a PDGF-et, a VEGF-et és az IGF-et. A gyulladásos reakciók beindulása után pedig a makrofágok és a többi gyulladásos sejt FGF-et, PDGF-et és TGF- β -át szekretál [25]. A növekedési faktorok aminosav szekvenciájuk alapján családokba és szupercsaládokba sorolhatók. A növekedési faktorok általában az extracelluláris mátrixban tárolódnak, innen szabadulnak fel egy sérülést követően, majd vesznek részt a csontosodási folyamatokban.

A megfelelő csontgyógyulás a sejtek és citokinek szoros együttműködésén alapul, ami a növekedési faktorokkal együtt fejti ki jótékony hatását. Számos növekedési faktor befolyásolja jelentősen az oszteoblaszt irányú viselkedést, így széles körben alkalmazzák őket csontszöveti regenerációban. A csontjavítás során a csont mikro környezetében lévő sejtek, mint a csontvelő eredetű sejtek (BMSC), endotél sejtek, fibroblasztok, gyulladásos sejtek és oszteoblasztok is termelnek növekedési faktorokat [26].

A csontvázra /csontra ható legfőbb növekedési faktorok az alábbiak: BMP (csont morfogénikus fehérje), FGF (fibroblaszt növekedési faktor), VEGF (vaszkuláris endoteliális növekedési faktor), IGF (inzulinszerű növekedési faktor), PDGF (trombocitából származó növekedési faktor) és TGF- β (transzformáló növekedési faktor).

1.2.1.2.1.1. Csont morfogénikus fehérje

A növekedési faktorok közül a csont morfogénikus fehérjét (Bone morphogenic protein, **BMP**) tartják az elsődleges növekedési faktornak, amely kritikus szerepet játszik a csontregenerációban. A BMP többfunkciós növekedési faktor, amely a TGF- β szupercsaládba tartozik. Több mint 20 fajtája ismeretes, melyek lényegesen különböznek egymástól, így nem is rendelkezik mindegyik csontregeneráló tulajdonsággal [26]. A BMP-nek döntő szerepe van az oszteoprogenitor sejtek kemotaktikus proliferációjában és differenciálódásában, ezáltal csontképződést indukál. A BMP ezen kívül központi szerepet játszik a törésgyógyulás három fő szakaszának szabályozásában: a gyulladásválaszban, a kondrogén fázisban és az oszteogén fázisban [27]. *In vitro* körülmények között a BMP-2 képes stimulálni az oszteoblasztok érését [28]. A BMP-2 és 3 oszteoblaszt irányú differenciációt segít elő kondrocitákon [29], a BMP-2 és 7 pedig javítja az oszteoblaszt irányú differenciációt rágcsálókban [30]. *In vivo* körülmények között egy femorális defektus nyúl modellben a BMP-2 fokozza a törés gyógyulását [31]. A BMP-2 és 6 egy lovakkal végzett kísérletsorozatban gyorsítja a csontképződést és az oszteotómiai gyógyulást [32]. A BMP-2 a csonttrikulás okozta csonttörés javításában is részt vesz [33]. A BMP-2 csontosodást elősegítő hatásáról is beszámolnak a koponyacsont sérülésének kezelésében [34]. Több kísérletsorozat bizonyítja a BMP-k oszteonekrózisra gyakorolt kedvező hatását. A rekombináns BMP-2 adása növelni tudja a csontgraftok klinikai hatását és a csontjavítás minőségét femorális oszteonekrózisban [35]. Sikeres eredményt értek el BMP-7 és autológ csontgraft együttes használatával felkarcsont oszteonekrózisában [36]. Rekombináns BMP-7 és autológ, lábszárcsontból származó graft kombinációja is kedvező hatást mutatott oszteonekrózis esetén és lerövidítette a posztoperációs rehabilitációs időt a növekedési faktor nélkül kezelt csoporthoz képest [37].

1.2.1.2.1.2. Fibroblaszt növekedési faktor

A fibroblaszt növekedési faktor (Fibroblast growth factor, **FGF**) olyan növekedési faktor, amely szöveti regenerációs képességgel rendelkezik [38]. Az FGF család legalább 22 különböző monomer fehérjéből áll, amelyek molekuláris súlya 16-18 kDa. Az FGF receptorokon (FGFR) keresztül a biológiai funkciók széles spektrumát szabályozza, beleértve a sejtproliferációt, a túlélést, a migrációt és a differenciálódást. Az FGF-et sérült szövetek regenerációjában használják, beleértve a bőrt [39, 40], a véredényeket [41, 42],

a zsírt [43-45], az inat [46, 47], a porcot [48-51], a csontot [52-56], a fogat [57, 58] és az ideget [59, 60]. Nyulakon végzett kísérletben kimutatták, hogy az FGF és BMP növekedési faktorok együttes hatása sokkal erősebb, mint külön-külön szegmentális csontsérülés esetén [61]. Egy másik, beagle kutyákkal végzett kutatásban megállapították, hogy az FGF-2 elősegíti a fogászati implantátumok körüli új csontképződést, valamint az azt követő összeintegrációt és fokozza az alacsony primer stabilitású implantátumok stabilitását [62]. Az FGF-2 hatását kritikus és nem kritikus méretű csontdefektusokban is alkalmazták már, és gyorsabb törésgyógyulást [63], megnövekedett periodontális regenerációt [64], fokozott csontregenerációt [65] és oszteogenezist tapasztaltak [66]. Rekombináns humán FGF-2 meggátolta a combcsont összeroppanását és elősegítette az oszteonekrotikus femur fej gyógyulását nyulakon végzett kísérletekben [67].

1.2.1.2.1.3. Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

A Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (Vascular endothelial growth factor, **VEGF**) erős angiogén faktorként ismert, amely az endotél sejtek migrációját és proliferációját stimulálja, továbbá vérerek képződését segíti elő. A VEGF aktiválja a csontképző sejteket, illetve hatással van azok túlélésére, ezért döntő szerepet játszik a csontképződésben és a csont gyógyulásában [26]. Transzgenikus egereket vizsgálva, ahol az oszteoblaszt-specifikus VEGF hiányzott kimutatták, hogy a VEGF elősegítette a makrofágok felépülését és az angiogén válaszokat a gyulladásos fázisban. Továbbá megállapították, hogy az oszteoblaszt eredetű VEGF képes az oszteoblaszt differenciációt és a csontképződést szabályozni, valamint serkenti az oszteoklasztok kialakulását a remodeling végső fázisában [68]. A VEGF fontos szerepet játszik az oszteogenezis fokozásában, anélkül, hogy kóros sejtanyagcserét okozna [69]. A csonttraumát követő hematóma és az ezután fellépő gyulladásos válaszok elősegítik a csont javítását. Egy tanulmány leírta, hogy a VEGF koncentrációja a hematómában 15-ször magasabb volt, mint a plazmában, pedig a plazmában lévő VEGF szint is szignifikánsan magasabb volt a kontroll csoporthoz képest [70]. Egy egér femur modellben a combcsonttörés és a kortikális csonthibák javításának leállítását figyelték meg, melyet a hiányzó VEGF-fel magyaráztak. Ugyanebben a kísérletsorozatban tapasztalták, hogy a VEGF aktivitás nélkülözhetetlen a megfelelő kalluszképződéshez és mineralizációhoz a csontsérülésre adott válaszban [71]. Oszteonekrózis kutyamodellben megfigyelték, hogy a lokálisan adott VEGF injekció csontszöveti remodelinghez és új csont képződéséhez vezet [72].

1.2.1.2.1.4. Inzulinszerű növekedési faktor

Az Inzulinszerű növekedési faktor (Insuline-like growth factor, **IGF-1**) egy olyan polipeptid, mely szekvenciájában nagy mértékben hasonlít az inzulinhoz. A csontváz növekedésének és fejlődésének legnagyobb szabályozója [73]. Az IGF-1-et a dextranszelatin gélen hordozóanyagként használva elősegíthető a periodontális szövetek regenerációja [74], PLGA (Poli glikol tejsav)-val kombinálva pedig új csontosodási formáció figyelhető meg [75]. Az IGF-1 teljes hiánya késleltette a posztnatális növekedést egerekben [76]. Egy másik tanulmány kimutatta, hogy az IGF-1 szükséges az oszteoklasztok és oszteoblasztok közötti normális kölcsönhatás fenntartásához, így gyakorlatilag az oszteoklasztogenezist támogatja a RANKL és a RANK expressziójának a szabályozásával [77]. Kisebb csontsűrűséget mértek azoknál az egereknél, amelyekben alacsonyabb IGF-1 szint volt kimutatható a kontrollhoz képest [78]. Az IGF-1 nagy szerepet játszik a csonttömeg fenntartásában [79] és oszteoblasztikus differenciációt segít elő mezenhimális őssejteken is [80].

1.2.1.2.1.5. Trombocitából származó növekedési faktor

Szintén a növekedési faktorok családjába tartozik az a kettős láncú polipeptid, mely elsősorban a trombocitákból (vérelemezekből) származik. A trombocitákból származó növekedési faktor (Platelet-derived growth factor, **PDGF**) a vérelemezkek alfa-granulátumában helyezkedik el, elsősorban véralvadás során szabadul fel, illetve, ha a trombociták a sérült véredények oldalára tapadnak [81]. A két leggyakoribb izoformáján, a PDGF-A-n és PDGF-B-n kívül kimutatták már a C és D formát is. Ezek a kettős polipeptidláncnak köszönhetően különböző formációban lelhetők fel, úgy, mint a PDGF-AA, PDGF-BB, PDGF-AB, PDGF-CC vagy a PDGF-DD [82]. A PDGF-ről kimutatták, hogy elősegíti a sebek gyógyulását, ugyanis a mezenhimális eredetű sejtek, mint például a fibroblaszt, a gliasejtek és a sima izom sejtek számára a PDGF a leghatékonyabb mitogén, mely a szérumban elérhető [83]. A PDGF a csontvázsejtek funkciójában autokrin szabályozóként játszhat szerepet. A csontmátrixban jelen lévő és a trombociták által szekretált PDGF szerepet játszik a törés helyén bekövetkezett sérülés szöveti javításában [84]. A PDGF-BB elősegíti a C2C12 mioblaszt sejtek [85] és a BMSC sejtek oszteogén irányú differenciációját [86]. A PDGF-AA pedig a mezenchimális sejtek oszteogén differenciációjában és migrációjában játszik szerepet [87].

1.2.1. 2.1.6. Transzformáló növekedési faktor

A Transzformáló növekedési faktor (Transforming growth factor, **TGF- β**) a csontmátrix egyik legfontosabb növekedési faktora. Ez a multifunkcionális polipeptid számos celluláris aktivitással bír [88], a mezenchimális prekursor sejteket stimulálva pedig azok proliferációjával és differenciációjával hozzájárul az embriológiai szakasz csontképződéséhez és a törések korai gyógyulásához [89]. A TGF- β 1 mind az oszteoblaszt, mind az oszteoklaszt differenciációját kontrollálja egészséges egyensúlyt tartva a csontképződés és reszorpció között [90]. Oszteoblaszt és oszteoklaszt sejtvonalon a TGF- β 1 hatása nagy mértékben függ a sejtek differenciálódási fokától, a sejtsűrűségtől, a TGF- β 1 koncentrációjától és egyéb sejt kultúras körülményektől *in vitro*. *In vivo* körülmények között pedig a TGF- β hatását nagy mértékben befolyásolják a csont környezetében lévő egyéb növekedési faktorok. [91]. A TGF- β 1 növeli a csontképződést elsősorban az oszteoblaszt progenitorok toborzásával és proliferációjuk serkentésével, így elősegíti a differenciálódást és a csontmátrix termelését. Transzgenikus egereket vizsgálva, ahol a TGF- β receptort gátolták, csökkent csont remodelinget és megnövekedett trabekuláris csontnövekedést figyeltek meg, utóbbit elsősorban az oszteoklasztok általi csontreszorpció miatt. A transzgenikus egerekben kisebb oszteocita sűrűsüget mértek, mint a vad típusú csoportban. Így ezek az eredmények is azt mutatják, hogy az endogén TGF- β közvetlenül az oszteoblasztokra hat szabályozva a csont remodelinget és annak szerkezetét [92].

Röviden összefoglalva tehát az előbb említett növekedési faktorok az alábbi mechanizmusok révén hatnak a csontosodásra:

BMP: befolyásolja az oszteoprogenitorok migrációját; proliferációt, differenciációt és mátrix szintézist indukál.

FGF: kondrocita érése hat (FGF-1), oszteoblaszt proliferációt és differenciációt indukál; az éretlen oszteoblasztok apoptózisát gátolja; az érett oszteociták apoptózisát indukálja ill. csontreszorpcióért is felelős (FGF-2).

IGF: oszteoblaszt proliferációt és a csontmátrix szintézisét befolyásolja, csontreszorpcióra hat.

PDGF: oszteoprogenitor migrációért, proliferációért és differenciációért felelős.

TGF- β : differenciálatlan mezenchimális sejt proliferációban és oszteoblaszt prekursor toborzásban vesz részt; oszteoblaszt és kondrociták differenciálódását befolyásolhatja, továbbá hat a csont mátrix termelésre.

VEGF: részt vesz a porc csonttá történő átalakításában; befolyásolja az oszteoblaszt proliferációt és differenciációt [25].

A mozgásszervi betegségek, ortopédiai sérülések kezelésére egyre ígéretesebb eredmények érhetőek el a növekedési faktorok használatával. Létezik egy biológiai anyagcsoport, a trombocitában gazdag vérkészítmények, amelyek a magas vérlemezke tartalom mellett a bennük megtalálható növekedési faktorok miatt mutatnak egyre ígéretesebb eredményeket. A következő fejezet ezen vérkészítmények bemutatására szolgál.

1.2.1.2.2. Vérekészítmények

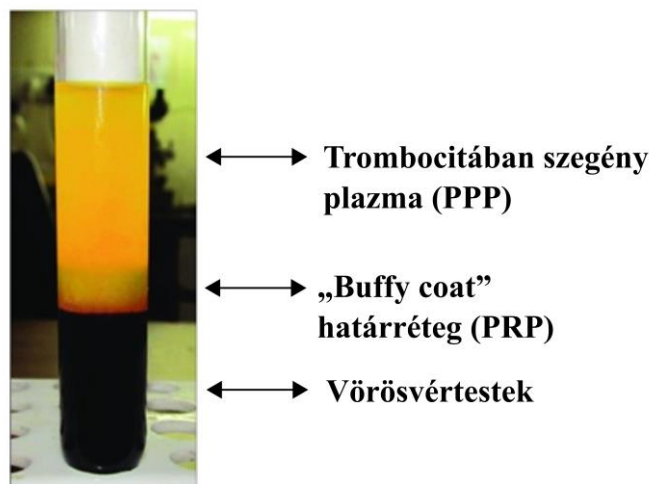
A humán vérből számos, a klinikumban felhasználható biológiai anyag nyerhető: néhány anyagot a magas fibrinogén tartalma, míg mást a változatos növekedési faktor tartalma miatt alkalmaznak. A fibrin alapú bioanyagokat, mint például a fibrinragasztót már több mint 30 éve használják sikeresen sebészi hemosztatikus és tömítőszerként, ami lényegében valamennyi sebészeti területen előnyös, beleértve a rekonstrukciós plasztikai sebészetet és sebkezelést [93].

A klinikai érdeklődés az utóbbi időben egyre inkább a trombocitában gazdag bioanyagok felé irányult. Ezeket a vérlemezke géleket, a trombocitában gazdag plazmát és fibrint elsősorban a sebgyógyulás elősegítésére ill. a lágy és kemény szövetek regenerációjára alkalmazzák. Ezen készítmények pozitív hatását elsősorban a trombocitákban fellelhető növekedési faktoroknak tulajdonítják.

1.2.1.2.2.1. Trombocitában gazdag plazma

A **trombocitában gazdag plazma** vagy **PRP** egy autológ plazmakészítmény, amelyben a vérlemezkek a teljes vérben megszokott értékhez képest nagyobb koncentrációban vannak jelen [94]. A PRP-t autológ módon, antikoaguláns vérvételi cső felhasználásával centrifugálással nyerik, hogy a komponenseket elválasszák egymástól és koncentrálják a vérlemezkéket az alapszint felett. A PRP egy vagy kétlépéses centrifugálás során izolálható. Az egylépéses centrifugálás esetében 300 g

fordulatszámom 5 perc centrifugálás után két különböző PRP frakció nyerhető: az egyik a PRP_{LP}, ahol az LP az alacsony trombocita- és fehérvérsejtszámra utal, míg a másik a PRP_{HP}, ahol a HP magas trombocita-és fehérvérsejtszámot jelent. A kétlépéses vagy kétszeres centrifugálás során nyert PRP frakciót néhány helyen PRP_{DS} vérkészítménynek hívják, ahol a DS (Double spin) jelölés utal a kétszeres centrifugálásra [95], de legtöbb esetben már rövidítés nélkül, egyszerű PRP-ként megnevezve jelölik. A kétlépéses centrifugálás első lépésénél alacsony fordulatszámot alkalmaznak (100-2000g) 5-10 percig, ezáltal a teljes vér 3 különböző részre válik szét: a felső, ún. trombocitában szegény plazma (PPP) réteg, a középső „buffy coat” határréteg és az alsó vörösvérsejt (RBC) réteg (2. ábra). A „buffy coat” határrétegben találhatóak a fehérvérsejtek és a trombociták. A második centrifugálás során a PPP és a „buffy coat” réteget megtartva (a vörösvértesteket tartalmazó részt nem használva) egy magasabb fordulatszám mellett (1010-2330 g) nyerik ki a végső PRP frakciót [96].



2. ábra A PRP izolálása. Az első centrifugálás után a vérvételi cső legalján a vörösvérsejtek találhatóak, legfelül a trombocitában szegény plazma. A két frakciót az ún. „buffy coat” határréteg választja el egymástól, melyben a trombociták és a leukociták helyezkednek el, és amelyből a második centrifugálás során nyerhető ki a PRP (Singh nyomán) [97].

A PRP az alábbi alkotóelemekből áll:

1. Trombociták. A sejtanyag nélküli trombocitákat vagy vérlemezkéket a csontvelői megakarociták termelik. A keringési rendszerben a 2-3 μm legnagyobb átmérőjű trombociták 7-10 napig működnek, amelyek mind az elsődleges, mind a másodlagos hemosztázisban nagy feladatot látnak el: egy-egy szöveti trauma vagy vaszkuláris sérülés során megakadályozzák a vérzést [98], de ezen kívül központi szerepet kapnak azért, hogy felszabadítják az alfa granulátumokban tárolt növekedési faktorokat. A sebek helyreállításának kezdeti fázisaiban az aktivált vérlemezkék kialakítanak egy fibrin mátrixot, ami ezután szöveti állványként, „scaffold”-ként szolgál a kiszabadult növekedési faktoroknak és citokineknek, amelyek a sejtek differenciálódását és kommunikációját stimulálják [99].

2. Leukociták. A leukociták a gyulladásos válasz alapvető mediátorai. A neutrofilek a sérült szövetekbe vándorolnak, ahol megkezdik a fagocitózis folyamatát a nektorikus szövetek és törmelékek bekebelezésével. A monociták, amelyek később makrofágokká alakulnak hozzájárulnak az extracelluláris mátrix lebontásához, így a sejtek könnyebben vándorolnak a szöveten belül hatékonyabbá téve a gyógyulást. A makrofágok tovább folytatják a fagocitózist, valamint a TGF- β , PDGF, a VEGF az IGF-1 és az EGF növekedési faktorok kiválasztásában is szerepet kapnak [100].

3. Vörösvérsejtek. A vörösvérsejtek végzik az oxigén, metabolikus gázok, tápanyagok és a nitrogén oxid szállítását, valamint a bennük lévő vas és hem-komponens segíti az oxigén és a szén-dioxid megkötését. Ha a PRP-ben lévő vörösvérsejt megsérül, a sejtmembránjuk szétesik és ún. plazmamentes hemoglobint bocsájt ki (PFH). A PFH és a bomlástermékei oxidatív stresszt, gyulladásos folyamatokat indukálnak, amely végső soron jelentős szöveti károsodást eredményezhet. Habár a vörösvérsejtek a PRP izolálási eljárása miatt egyáltalán nem vagy csak kis mértékben vannak jelen, az előbb leírtak miatt még a kevés RBC jelenléte is gátló hatású lehet egy-egy sérülés kezelésében [101].

Ahhoz, hogy szabaddá váljanak a vérlemezkékben található növekedési faktorok, a PRP frakciót trombinnal, CaCl_2 -dal, ezek kombinációjával, kollagénnel vagy más aktivátor anyaggal aktiválnunk kell [102]. Létezik egy fizikai aktiválási módszer is, amely során a PRP-n fagyasztási/olvadási ciklusokat alkalmaznak 2-4 alkalommal. Ezáltal a vérlemezke membránok fizikailag károsodnak és a granulátum tartalma felszabadul [103].

A bakteriális fertőzések komoly problémát okoznak a sebgyógyulási folyamatokban, ezért különösen előnyös, hogy a PRP antimikrobiális hatású [104, 105], valamint több tanulmány bizonyítja a gyulladásgátló hatását, melyet elsősorban a trombocitákból felszabaduló TGF- β -nak tulajdonítanak.

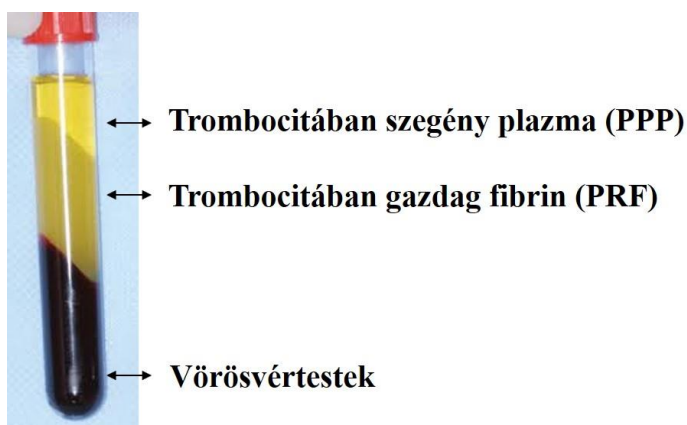
Mivel az autológ PRP nagyobb biztonsággal alkalmazható a regeneratív medicinában, mint a sejtalapú terápiák, a PRP felhasználása egyre nagyobb mértékben terjedt el alternatív kezelési módként [106, 107]. Marx és munkatársai 1998-ban alkalmazták először sikeresen a PRP-t, ahol a PRP-vel kezelt csontgraft fokozott csontosodást eredményezett egy fogászati sérülés kezelésében [108], de egyre jobban elterjedt a használata egyéb területeken, mint a szívsebészet [109-111], a szemészet [112, 113], a parodontális és szájsebészet [114, 115], az ortopédiai sebészet [116, 117], plasztikai sebészet [118, 119] és a kozmetikai gyógyászat [120-122]. A sport-és orvostudományi kutatások is számos pozitív hatásról beszélnek PRP alkalmazásával kapcsolatban [123, 124]. Különösen nagy jelentőségű lehet a PRP terápia alkalmazása, ugyanis néhány szövet, mint az inak, szalagok vagy porc sérülése esetén a javítási folyamatok lassúak a korlátozott vérellátásuk és a lassú sejt turn-over miatt [125, 126]. Az avaszkuláris combfejnecrózis PRP-vel történő kezelése is ígéretesnek bizonyult. Szignifikánsan több növekedési faktor jelentését tapasztalták a PRP-vel kezelt csoportban a kontroll csoporthoz képest, melyet a hisztológiai festés és az angiogenezis jelenléte csak megerősített [127, 128]. A PRP injekció formájában történő adása is képes csökkenteni az oszteonekrózis okozta fájdalmat [129] és funkcionális javulást hozhat [130].

Munkacsoportunk egy korábbi kísérletsorozatában a PRP csontosodásra gyakorolt hatását vizsgálta aseptikus combfejnecrózis esetén. A combcsontfej megtartása és a későbbi protézisbeültetés elkerülése reményében 13 beteget core decompression, vagyis felfúrás kezelésében részesítettek, 19 beteg pedig a felfúrás mellett autológ csont és PRP keverékét kapta. A PRP jótékony hatását követéses vizsgálattal bizonyítottuk. Hat éves utókövetés eredményeképpen megállapítottuk, hogy azok a páciensek, akik a felfúrás mellett autológ csontot és PRP-t is kaptak, 79%-ban elkerülték a protézis beültetést, míg a kezeletlen csoport csupán 39%-ban [131]. A kapott értékek igazán biztatóak voltak, azonban a PRP pontos szerepe nem volt ismeretes, ezért kutatócsoportunk elhatározta ezen csontok *ex vivo* tanulmányozását, mely eredményeket jelen dolgozat tárgyalja.

1.2.1.2.2. Trombocitában gazdag fibrin

A Choukroun és munkatársai által 2001-ben kifejlesztett **trombocitában gazdag fibrin (PRF)** egy második generációs vérlemezkekoncentrátum, melyet széles körben használnak a lágy és kemény szövetek gyógyulásának gyorsításához. Eredetileg autológ leukocita és vérlemezkékből gazdag fibrin bioanyagként definiálták. Előnyei a PRP-hez képest az egyszerűbb előállításában, minimális költségében rejlenek és abban, hogy a növekedési faktorok kiszabadulásához nincs szükség semmilyen aktiváló bioanyagra [132, 133].

A PRF izolálási módja rendkívül egyszerű: egy 6-10 ml-es, natív vérvételi csőbe vért veszünk, majd rögtön a vérvételt követően 3000 rpm-en 10 percig centrifugáljuk. Az antikoaguláns hiánya okozza a vérmintában lévő trombociták szinte azonnali aktiválását, ahogy a centrifugálás során a vérvételi csőfállal érintkeznek és ez a koagulációs kaszkádok felszabadulásához vezet. A fibrinogén kezdetben a cső tetején koncentrálódik, majd a keringő trombin fibrinné alakítja, amely fibrincsomó formájában ezután a cső közepén helyezkedik el. A vérvételi cső legalján a vörösvértestek, a cső tetején pedig az acelluláris plazma (trombocitában szegény plazma) található [134], melyet a 3. ábra mutat be. A vérlemezkéket a fibrincsomóban találhatók. A fibrincsomót ezután egy csipesszel kiemelik, majd ezt a csomót egy ún. PRF Box rácsra helyezve eltávolítják annak tartalmát és a fibrincsomót membránként alkalmazva akár önmagában, akár graft elemekkel összekeverve sikeresen alkalmazzák rekonstrukciós sebészeti területen [132].



3. ábra A Trombocitában gazdag fibrin izolálása. A legalsó frakció a vörösvérsejteket tartalmazza, fölötte a fibrincsomó helyezkedik el vagyis a PRF, majd a felülúszóban a trombocitában szegény plazma található [135].

Az autológ PRF felhasználása jól ismert Choukroun és munkatársai által, akik elsősorban az orál és maxillofaciális sebészetben kezdték a PRF vérkészítményt alkalmazni, hogy javítsák a gyógyulást az implantátumfogászatban [134]. Különböző rekonstrukciós eljárások során új csont létrejöttét figyelték meg PRF jelenléte mellett [136]. A PRF membránok védik a sebészeti helyet, segítik a lágyszövetek gyógyulását és ha a fragmenseit összekeverjük a graft anyagaival biológiai közvetítőként funkcionál a graft különböző elemei között. Továbbá mátrixként működik, amely támogatja az angiogenezist, az őssejtek befogását és az oszteoprogenitor sejtek migrációját a graft középpontjába [137].

Néhány növekedési faktor, mint a PDGF, a TGF- β felszabadul a PRF-ből [138-140]. Dohan és munkatársai azt találták, hogy a PRF 1 hétig bocsátja ki a növekedési faktorokat [139, 140], de már 28 napos kibocsátásról is beszámoltak [141]. Mindez azt jelenti, hogy a PRF vérkészítmény jelentős ideig támogathatja a sérült környezetet a sebgyógyulás során. A PRF a csontregenerációt is elősegítheti, ugyanis megállapították, hogy a PRF stimulálja a humán oszteoblasztok növekedését és a proliferációt [142, 143] és új csont növekedését eredményezi *in vitro* és *in vivo* is [144, 145]. A PRF kedvező hatásáról írnak állkapocs oszteonekrózis kezelésében is [146-148].

A növekedési faktorok és az őket tartalmazó vérkészítmények tehát számos esetben bizonyítottan jól működnek és hozzá tudnak járulni egy-egy sérülést követő gyorsabb regenerációhoz. Az irodalmi bevezetőben tárgyalt kísérletekben azonban a vérkészítmények és a növekedési faktorok hatását elsősorban jó szöveti keringések esetén vizsgálták. Arról lényegesen kevesebb vizsgálat van, hogy kimondottan rossz keringésű szöveteknél a növekedési faktorok és a vérkészítmények milyen hatást képesek kiváltani. Munkacsoportunk célja egy olyan modell kialakítása volt, amely megfelelően tükrözi a rossz keringésű állapotot, melynek segítségével a kezelés során alkalmazott vérkészítmények hatásairól árnyaltabb képet kaphatunk.

2. Célkitűzések

1. Elsődleges célunk egy humán **ex vivo modell** kialakítása volt, amely a végső fokú degeneratív csontbetegségek patológiáját ábrázolja és kellő mértékben tükrözi a csontiszkémiás állapotot.
2. A modell létrejötte után a különböző **vérkészítmények tanulmányozását** tűztük ki célul azt vizsgálva, vajon az adott vérkészítmény milyen hatással van a csontiszkémián átesett, explantátumokon lévő sejtek túlélésére, proliferációjára.
3. Egy adott vérkészítmény hatását egyidőben több dolog is befolyásolhatja, mindenekelőtt a **vérkészítmények összetételét** kívántuk meghatározni, ezért a fehérje-és sejttartalom meghatározása mellett a vérkészítmények növekedési faktortartalma is mérésre került, hogy még pontosabb képet kaphassunk a vérkészítményekről.
4. Végül kíváncsiak voltunk arra, vajon a **csontexplantátumokra** milyen hatással bír az egyik vérkészítmény **iszkémiás körülmény nélkül**.

3. Módszerek

3.1. Csontexplantátumok

A csontexplantátumok kinyerését a 33106-1/2016/EKU számú etikai engedély alapján végeztük.

A szöveti iszkémia modellezéséhez szükséges csontokat oszteoarthritisben, primer coxarthrosisban szenvedő betegek protézisbeültetése során nyertük és kizártunk minden olyan műtétet, ahol szekunder coxarthrosis, gyulladásos ízületi betegség (reumatoid arthritisz, szeronegatív spondylarthritisz stb.) miatt végzett csípőprotézis beültetés, infekció vagy tumor gyanúja szerepelt. A betegek az osztályos felvételre kerülésük során beleegyező nyilatkozatot töltöttek ki arra vonatkozóan, hogy a kivett combcsontfej - amennyiben szükséges és a combcsontfej arra alkalmas - csontbank számára mind klinikai mind kutatási célra felhasználható, csontszövetük más személybe beültethető. A betegek lemondtak a combcsontfejre vonatkozó igényükről.

A műtét közben eltávolított combcsontfej közepéből, a femurfej belső részéből műtéti körülmények között sebészi véső segítségével 40 db, nagyjából 7 mg tömegű csontokat metszettünk ki betegenként. Hogy a sejtkárosodást minimálisra csökkentsük, a kimetszés után ezeket a csontokat testhőmérsékletűre előmelegített, ún. tenyésztő médiumot tartalmazó centrifugacsövekbe tettük. 20-25 perces szállítást követően a csontokat *in vitro* körülmények közé helyeztük, hogy a fiziológiás körülményeket a legjobban megközelíthessük. 12 csontdarab került egy 60 mm átmérőjű Petri-csészébe, melyet ezután 6 ml tenyésztő médiumban, 37 °C-on és 5% CO₂ tartalom mellett 3 napon keresztül inkubáltunk. A tenyésztő médium 1 g/l glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Mediumot (PAA Cell Culture Company, Cambridge), 1% penicillin-sztreptomicint (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) és 10% szarvasmarha szérumot (FBS, Gibco, Paisley, Skócia) jelent. A dolgozatban többször hivatkozom a tenyésztő médiumra, mely minden esetben a fent említett oldatot jelöli.

3.2. Oxigén-glükóz depriváció modellezése

Az operációtól számított 3. napon a csontszöveti iszkémiát oxigén és glükóz együttes megvonásával modelleztük. Az oxigén-glükóz depriváció (OGD) során az addig fiziológias körülmények között tartott explantátumokat a médium előzetes eltávolítását követően 2-szer átmostuk 4 ml 7,3 PH-jú PBS mosó pufferrel (PAN Biotech, Aidenbach, Germany), majd áthelyeztük őket egy 24 lyukú edénybe, és lyukanként 1-1 ml glükóz-és aminosavmentes médiumot pipettáztunk rájuk. Ezután a csontmintákkal teli edényt a Zeiss LSM 510 Meta konfokális, fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss, Jena, Germany) saját inkubációs rendszerébe, az ún. Pecon inkubációs rendszerbe (Erbach-Bach, Németország) helyeztük, amit a mikroszkóp látómezejébe tettünk. Ezután N₂ gáz segítségével a lezárt rendszerben 0,5% alá süllyesztettük az O₂ szintet. Miután ez megtörtént, 20x-os objektívet és DIC szűrőt használva, a sejteket fókuszba hozva elindítottuk a videómikroszkópos megfigyelést, ami lehetővé tette számunkra a sejtfestékekkel (lsd. 3.3. alfejezet) jelölt minták tanulmányozását és a kísérletek rögzítését az OGD egész ideje alatt. Az iszkémia idejét csontszövetre vonatkozóan úgy szeretnénk volna beállítani, hogy a csontexplantátumokon lévő sejteken érzékelhető legyen az OGD okozta sérülés (akár kvalitatív akár kvantitatív módon vizsgáljuk), de ez a hatás visszafordítható legyen, ezért több időtartamot is kipróbáltunk: **1, 2,5, 3,5, 4, 5**, valamint **7** órán keresztül is fenntartottuk az iszkémiás állapotot. Az OGD-s kísérletek nyomon követése során a sejtek színét és morfológiáját vizsgáltuk. Az OGD elején és a végén fényképet készítettünk a csontexplantátumokról és a fényképek elemzése alapján döntöttük el egy-egy OGD időtartamáról, hogy elegendő-e vagy tovább szükséges növelni az iszkémiás időt.

3.3. Az explantátumokon lévő sejtek életképességének elemzése

kvalitatív módon

Az élő sejtek jelölésére Calcein-AM-et használtunk (excitáció/emisszió: 494/517 nm, zöld, koncentráció: 1:2000, 37°C, 5 perc) (LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity esszé része, Molecular Probes). A Calcein-AM egy nem-fluoreszcens, hidrofób vegyület, mely könnyen átjárja az élő, egészséges sejteket és azok citoplazmájába kerül. Itt intracelluláris észterázok elindítják a Calcein-AM hidrolízisét, mely a calcein keletkezését eredményezi. Ez egy hidrofil, erősen fluoreszkáló vegyület, ami ezután a sejt citoplazmájában marad, így könnyen kimutatható.

A halott sejteket ethidium homodimer (excitáció/emisszió: 528/617 nm, vörös, koncentráció: 1:500, 37°C, 5 perc) (LIVE/DEAD Viability/Citotoxicity esszé része, Molecular Probes) felhasználásával jelöltük. Az ethidium homodimer egy membrán-áteresztő fluoreszcens festék. A halott sejtek plazmamembránjai megszakadnak, emiatt az ethidium homodimer belép ezekbe a sejtekbe és kötődik azok DNS-éhez. Mivel az élő sejtek membránjain nem képes átjutni ez a festék, így csak a halott sejtek jelölésére alkalmas.

3.4. Az explantátumokon lévő sejtek életképességének elemzése

kvantitatív módon

A metil-tiazol-tetrazólium (MTT) (Sigma Aldrich, Budapest, Hungary) sejtproliferációs esszé egy kvantitatív kolorimetriás eljárás, mely többek között a celluláris proliferáció, életképesség és citotoxicitás mérésére is alkalmas [149]. Egy, az élő sejtekben jelen lévő mitokondriális enzim, a szukcinát dehidrogenáz hatására a sárga színű tetrazólium só, az MTT vízoldhatatlan, sötétkék formazán kristályokat képez, mely izopropanolos oldás után oldhatóvá válik. A kioldott anyag optikai denzitását spektrofotométer segítségével mérhetjük, mely közvetlen korrelál a metabolikusan aktív sejtek számával.

Az MTT esszé időtartama eltérő a különböző sejtek és szövetek esetén, így optimalizálnunk kellett jelen kísérletsorozatban mind az MTT inkubációt, mind az izopropanolos oldást.

Kísérleteinkben az MTT mérés az alábbi módon zajlott:

- A mérni kívánt explantátumokat egy 96 lyukú edénybe helyeztük, majd MTT oldattal (0,5 mg/ml) inkubáltunk 37 °C-on 5% CO₂ tartalom mellett. 10 perces, 1, 2 és 3 órás inkubálási időt teszteltünk.
- Az MTT oldat leszívása után az explantátumokat izopropanolba tettük, és állandó kevertetés mellett a 10 percig, 1, 2, 3, 4, 5, 16 és 20 óráig tartó oldási időtartamokat próbáltuk ki.

Az izopropanolos oldást követően PowerWave-XS (Biotek, Winooski, VT, USA) spektrofotométer felhasználásával 570 nm-en mértük az oldat denzitását, amely értékből levontuk a 690 nm-en mért, zajnak számított értéket. Mivel az explantátumok csak közelítőleg voltak egyforma tömegűek, ezért a mérés során kapott értéket korrigáltuk az explantátumok száraz tömegével.

3.5. Vérvérvétel izolálása, aktiválása és kezelése

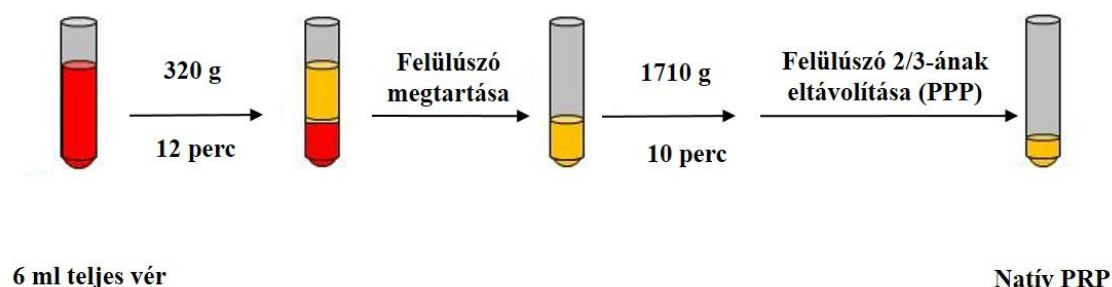
A vérvérvétel izolálásához szükséges vérvételt a 33106-1/2016/EKU számú etikai engedély alapján végeztük.

A vért egészséges, ismert betegségben nem szenvedő donorokból nyertük. A 20-50 év közötti, nemtől független személyek kiválasztása során kizárást jelentett bármilyen ismert krónikus betegség, akut fertőzés, tumoros megbetegedés, asztma vagy krónikus gyulladási betegség.

3.5.1. Trombocitában gazdag plazma izolálása

A PRP vérvérvételt irodalmi adatok alapján kettős centrifugálással nyertük ki [96]. A mintavétel szárnyas tű segítségével történt, melyhez 6 ml-es, véralvadást gátló, ún. EDTA-t (Etilén diamin tetraecetsav) tartalmazó vérvételi csöveket használtunk. A centrifugálás során az LMC-3000 nevű (Biosan, Riga) centrifugát használtuk. Szobahőmérsékleten először 320 g fordulatszámon 12 percen keresztül centrifugáltunk. Ekkor a centrifugálás után kapott felülúszót (a PPP és a "buffy coat" réteget) átpipettáztuk egy centrifugacsőbe, vigyázva arra, hogy minél kevesebb vörösvértest kerüljön a rendszerbe és 1710 g fordulatszámon további 10 percig ismét centrifugáltunk. Ekkor eltávolítottuk a felülúszó 2/3-adát, mely gyakorlatilag a PPP vérvérvételt jelentette, és

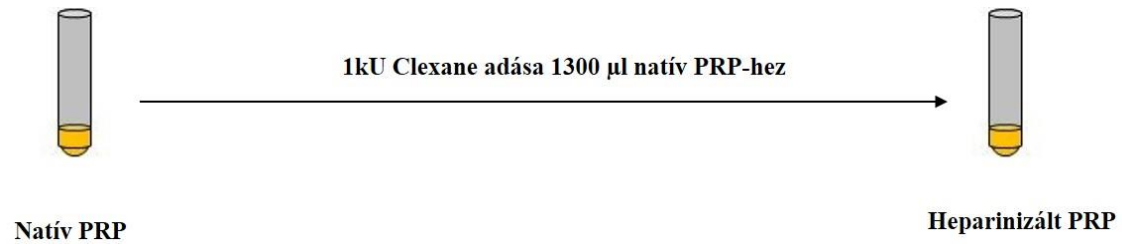
a maradék 1/3-ad réteget jól felszuszpendálva jutottunk a PRP, trombocitában gazdag vérkészítményhez, melyet a továbbiakban natív PRP-nek hívtunk. A 4. ábra mutatja be a laborunkban alkalmazott natív PRP izolálását. A PPP vérkészítményt eltettük egy későbbi vizsgálatra (Isd. Vérkészítmények laboratóriumi paramétereinek összehasonlítása 3.7. alfejezet).



4. ábra Natív PRP izolálása. Az izoláláshoz véralvadásgátlót tartalmazó vérvételi cső szükséges. Laborunk a kétszeres centrifugálás után nyerte ki a natív PRP frakciót.

3.5.2. Trombocitában gazdag plazma heparinizálása

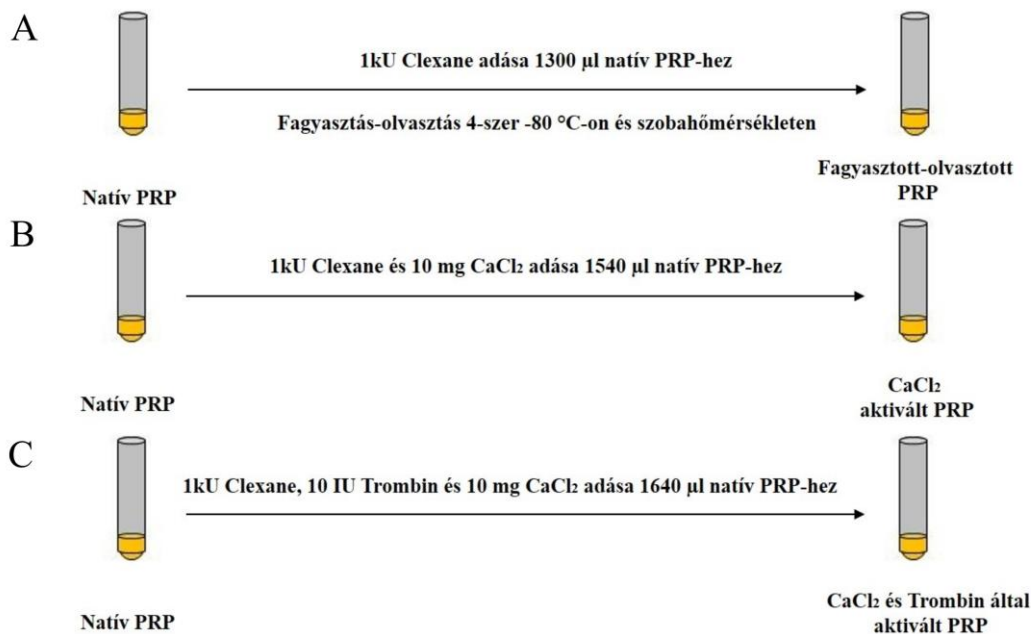
PRP-vel történt kísérleteink során megfigyeltük, hogy amint a PRP-t az ún. tenyésztő médiumhoz adjuk, az kocsonyássá válik. Ez a jelenség így lehetetlenné teszi, hogy a tenyésztő médium és a PRP értékes összetevői eljussanak a médiumban inkubálódott csontokhoz, ezért a PRP-hez véralvadásgátlót, ún. Clexane-t (Sanofi Aventis, Paris, France) adtunk (5. ábra), hogy ismét folyékony halmazállapotúvá, és a csontexplantáumokon lévő sejtek számára elérhetővé váljon a PRP-t tartalmazó tenyésztő médium.



5. ábra A heparinizált PRP előállítása. A natív PRP-hez Clexanet adunk, hogy meggátoljuk a vértartalom alvadását, és így alkalmassá vált az oldat arra, hogy a PRP hatását tesztelni tudjuk.

3.5.3. Heparinizált-trombocitában gazdag plazma aktiválása

A PRP-ben lévő trombociták számos növekedési faktort és egyéb értékes összetevőt tartalmaznak. Ahhoz, hogy ezek kijussanak a trombocitából, aktiválni kell őket. Irodalmi adatok alapján ez többféleképpen történhet. Laborunk 3 különböző módot is alkalmazott a PRP aktiválásához. Az első módszer az ún. fagyasztás/olvasztás módszere, amikor a PRP-t egymás után legalább 3-szor le kell fagyasztani, majd felengedni. Mi négy alkalommal fagyasztottuk le $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ -ra, majd engedték fel szobahőmérsékletűre. A második aktiválási mód a CaCl_2 hozzáadása volt. A harmadik aktiválási módnak a CaCl_2 és a trombin együttes jelenlétét választottuk, mely koncentrációt irodalmi adatok alapján választottuk ki [102]. A kísérleteinkben alkalmazott PRP aktiválási módokat a 6. ábra szemlélteti.



6. ábra A PRP aktiválása. A natív PRP-ben lévő trombociták aktiválása 3 különböző módon történt: fagyasztva-olvasztva (A Panel), CaCl₂-dal (B Panel) és CaCl₂ és Trombin (C Panel) együttes hozzáadásával.

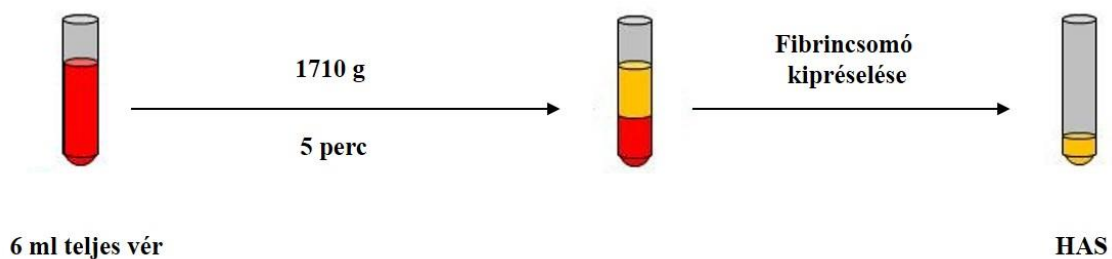
3.5.4. Heparinizált-különböző koncentrációjú trombocitában gazdag plazma

Ebben a kísérletsorozatban különböző mennyiségű heparinizált PRP-t adtunk a tenyésztő médiumhoz, így egyre töményebb koncentrációjú oldatban inkubálódtak a csontok: PRP és tenyésztő médium 1:8, 1:4, valamint 1:2 arányú keverékét teszteltük.

3.5.5. Hiperakut szérum izolálása

A PRP izolálása és különböző módon történt kezelése után hozzáláttunk, hogy a bevezetőben szereplő másik vérkészítményt, a trombocitában gazdag fibrin (PRF) is kinyerjük. A PRF izolálásához Dohan és munkatársai cikkét vettük alapul [134], akik natív vérvételi cső felhasználásával 3000 rpm fordulatszámon (leírásuk alapján ez 400 g relatív centrifugálási erőnek felel meg) 10 perc centrifugálás után nyerték ki a PRF vérkészítményt. Munkacsoportunk is natív, véralvadást gátló nem tartalmazó csőben vette le a teljes vért, majd az általunk használt centrifugán 3000 rpm-et (mely a

munkacsoportunk által használt centrifugán 1710 g relatív centrifugálási erőnek felel meg) beállítva hozzálítottuk a PRF kinyeréséhez. A hivatkozásban alkalmazott 10 perc centrifugálás után azonban a fibrincsomók összeesett és vagy nagyon kis mennyiséget vagy semmit nem lehetett kiemelni a vérvételi csőből (nagy valószínűséggel a magasabb relatív centrifugálási erő miatt), ezért lecsökkentettük a centrifugálási időt 5 percre, mely során sikeres lett a fibrincsomó kinyerése. A PRF fibrincsomót ezután hozzáadtuk a tenyésztő médiumban lévő csontexplantátumokhoz. Azt tapasztaltuk azonban, hogy a fibrincsomó befedi a csontmintákat, a membrán jellege miatt hártóképző a csontmintákon, így a tenyésztő médium komponensei nem tudnak hozzáférni a csontokon lévő sejtekhez. Így az izolált PRF-t módosított formában használtuk: a PRF csomót a centrifugálás végén laminális elszívó fülke alatt kiemeltük a vérvételi csőből, ollóval levágtuk a vörösvértesteket tartalmazó alsó részét, majd a fibrincsomót egy Petri-csészébe áthelyezve kipréseltük a számunkra értékes savót, melyet Hiperakut szérumnak (HAS) neveztünk el. Az izolálási lépéseket a 7. ábra mutatja be.

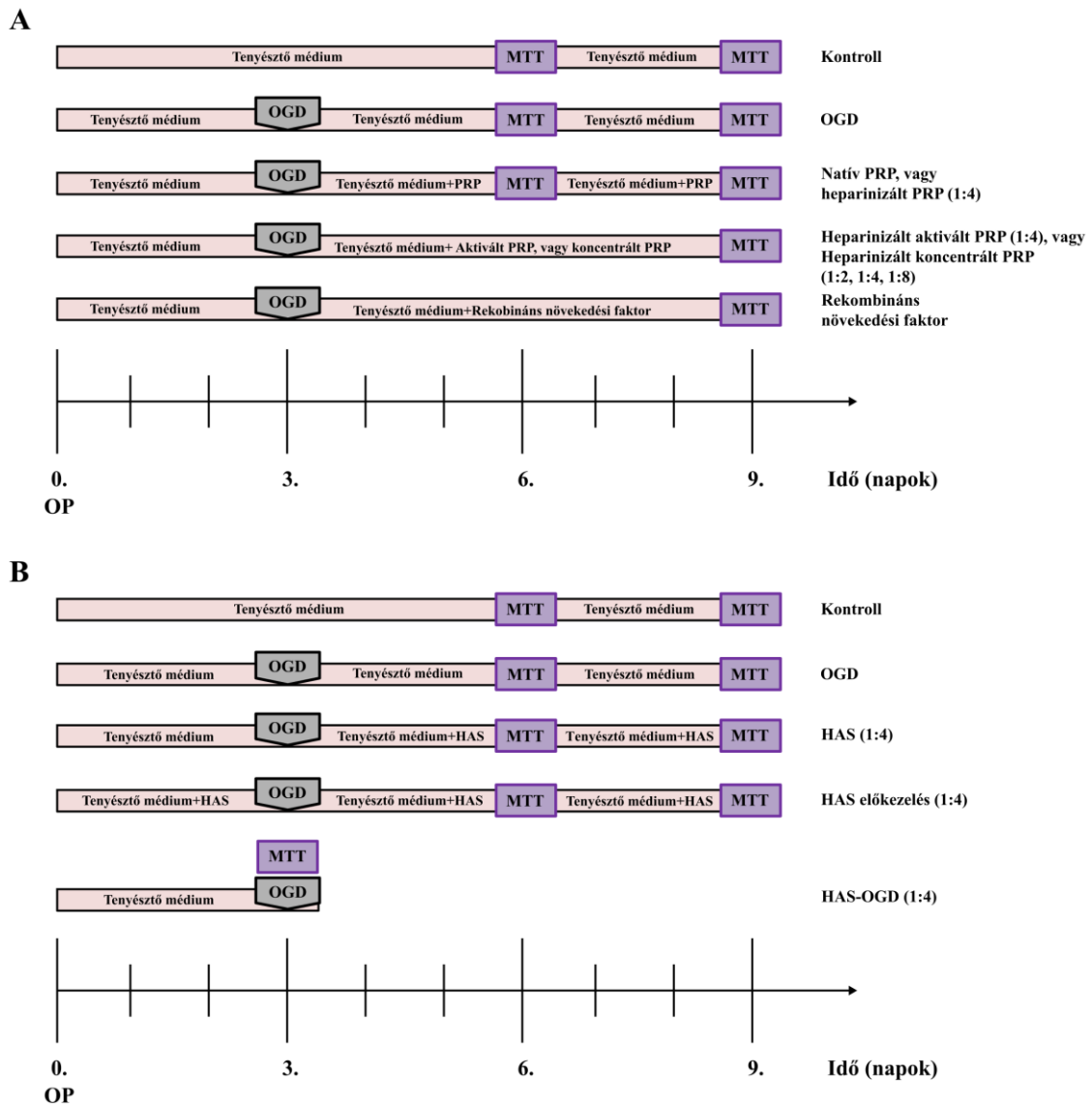


7. ábra HAS izolálása. A Hiperakut szérumot a PRF vérkészítményből nyertük ki egyszeres centrifugálás után a fibrincsomó kipréselésével.

3.6. Kísérleti protokoll

Az operáció napján (OP) az explantátumokon lévő sejtek a mikroszkópos képeink alapján sérültek voltak, amit elsősorban a műtétből adódó stressznek tulajdonítottunk. Ezért, hogy segítsük a sérült sejtek regenerálódását, már a műtét napján ún. tenyésztő médiumba helyeztük őket és három napon keresztül 37 °C-on 5% CO₂ tartalom mellett inkubáltuk őket. A 3. napon a rossz keringést és tápanyaghiányos állapotot OGD segítségével modelleztük, majd ezt követően különböző vérkészítmények és rekombinációs

növekedési faktorok hozzáadásával kezeltük az explantátumokat és MTT-vel mértük az azokon lévő sejtek életképességét. A 8. ábra mutatja be a különböző vérkészítményekkel és rekombináns növekedési faktorral végzett kísérletek protokollját. Az ábrán megjelenítésre került, hogy az adott csoport kapott-e vérkészítményt vagy rekombináns növekedési faktort, ezeket mikor adtuk a tenyésztő médiumhoz, és hogy mikor történt MTT mérés. A csoportok részletes bemutatását a 3.6.1.-es fejezet tárgyalja.



8. ábra Kísérleti protokoll. Az „A” Panel a kontroll és az OGD csoport mellett bemutatja a natív és heparinizált PRP-vel, a heparinizált-aktivált PRP-vel, a heparinizált-különböző koncentrációjú PRP-vel és a rekombináns növekedési faktorokkal végzett kísérletek protokollját. A „B” panel a HAS vérkészítménnyel történt kezelést ábrázolja a kontroll és az OGD csoportok feltüntetésével. A vízszintes tengely az operációt követő napokat, az OGD az oxigén-glükóz deprivációt, az MTT pedig a sejtek életképességének mérését jelenti.

3.6.1. Kísérleti csoportok

Kontroll csoport: Azokat a csontexplantátumokat jelentette, amelyek a műtét napjától egészen a 9. napig tenyésztő médiumban inkubálódtak és OGD-n nem estek át. 3 naponta médiumcsere történt, amely a tenyésztő médium cseréjét jelentette. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

OGD csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak, az OP-től számított 3. napon átestek OGD-n, és ezt követően tenyésztő médiumban inkubálódtak tovább, melyet 3 naponta cseréltünk. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

Natív PRP csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak, OGD-t követően natív PRP-t (lsd. 4. ábra) kaptak, melyet 1:4 arányban juttattunk a tenyésztő médiumhoz. Médiumcsere 3 naponta történt, mely ebben az esetben natív PRP-t tartalmazó tenyésztő médiumot jelentett. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

Heparinizált PRP csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak. A natív PRP-hez heparint adtunk (lsd. 5. ábra), majd a csontexplantátumokat ért OGD-t követően a heparinizált PRP-t 1:4 arányban adtuk a tenyésztő médiumhoz. Médiumcsere 3 naponta volt heparinizált PRP-t tartalmazó tenyésztő médiummal. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

Heparinizált-aktivált PRP csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak. A natív PRP-hez heparint adtunk (lsd. 5. ábra), majd a 3 különböző módon aktivált, heparinizált PRP-t (lsd. 6. ábra) 1:4 arányban juttattuk a

tenyésztő médiumhoz. Médiumcsere szintén 3 naponta történt heparinizált-aktivált PRP-t tartalmazó tenyésztő médiummal. MTT mérés az OP 9. napján történt.

Heparinizált-különböző koncentrációjú PRP csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak. A natív PRP-hez heparint adtunk (lsd. 5. ábra), és 3 különböző hígításban juttattuk ezt a tenyésztő médiumhoz: a korábban alkalmazott 1:4 arány kiegészült egy hígabb (1:8) és egy töményebb (1:2) változattal. Médiumcsere 3 naponta történt 3 különböző koncentrációjú heparinizált PRP-t tartalmazó tenyésztő médiummal. MTT mérés az OP 9. napján zajlott.

HAS csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak. Ezek a csontok az OGD után HAS (lsd. 7. ábra) és tenyésztő médium 1:4 arányú keverékében inkubálódtak. Médiumcsere 3 naponta volt HAS-t tartalmazó tenyésztő médiummal. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

HAS előkezelés csoport: A csontminták már az OP napjától HAS-tenyésztő médium 1:4 arányú kezelésében részesültek, majd OGD-t követően szintén. Médiumcsere 3 naponta volt HAS-t tartalmazó tenyésztő médiummal. MTT mérés az OP 6. és 9. napján történt.

HAS-OGD csoport: A csontminták az OP-től számított 3 napig tenyésztő médiumban inkubálódtak, majd az OGD ideje alatt HAS és glükóz-és aminosavmentes médium 1:4 arányú oldatában voltak. MTT mérés rögtön az OGD után történt.

Rekombinás növekedési faktorok csoportja: Az explantátumokon lévő sejteket nemcsak vérkészítményekre teszteltük, hanem csontosodást elősegítő növekedési faktorokra is. Ezen csoportok mintáit OGD-t követően BMP-2, BMP-7, PDGF és PF-4 rekombináns növekedési faktorról kezeltünk. Irodalmi adatok alapján választottuk ki a növekedési faktorok koncentrációját. A felhasznált cikkekben több koncentrációt kipróbáltak: a BMP-2, BMP-7 [150] és a PDGF [151] esetében az 50 ng/ml koncentráció bizonyult hatásosnak, PF-4 esetén a 200 ng/ml [152]. Mivel ezekben a mérésekben a mi kísérleteinktől eltérő szövettípuson dolgoztak, ezért ezeket a koncentrációkat kiindulópontként kezeltük és a tizedére, illetve a 10-szeresére hígított/töményített koncentrációban is alkalmaztuk az OGD-n átesett mintáinkon. Mivel a PF-4 gyári kiszárlása nem tette lehetővé, hogy 2000 ng/ml koncentrációt is kipróbáljunk, ezért ennél a növekedési faktornál a 10, 100 és 1000 ng/ml koncentrációt használtuk. Ebben a

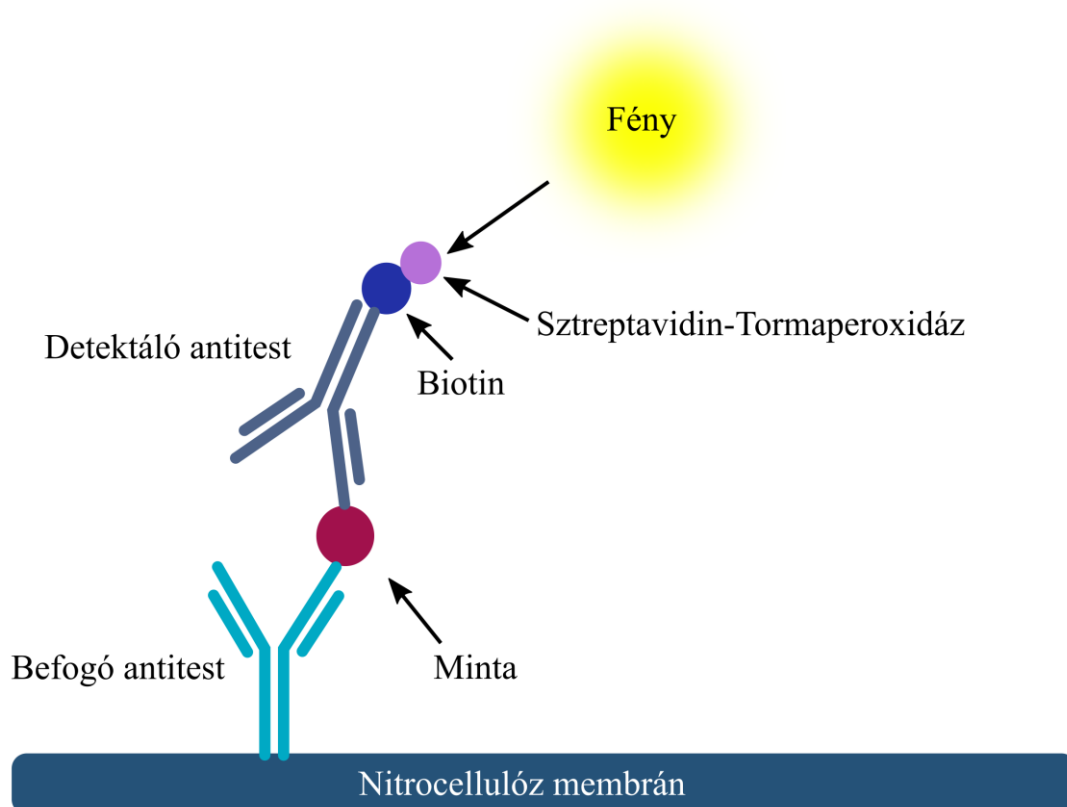
mérési sorozatban csupán az OP-től számított 9. napon mértük a sejtek életképességét, de médiumcsere minden 3. napon történt az adott koncentrációjú rekombináns növekedési faktort tartalmazó tenyésztő médiummal.

3.7. Laboratóriumi paraméterek

Az eredményeink függvényében szeretnénk volna összehasonlítani az általunk használt vérkészítményeket laboratóriumi összetevők alapján is. A PRP, a HAS és a PPP vérkészítmények fehérjetartalmát Beckman Coulter AU5800 (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) automatával mértük le, a szérumokban előforduló vörös-és fehérvérsejtszámokat, illetve a trombociták számát pedig Sysmex XT 400i (Sysmex Hungary, Budapest, Magyarország) készülékkel.

3.8. Növekedési faktor tartalom

A vérkészítmények növekedési faktor tartalmát az ún. Proteome Profiler™ Humán Angiogenesis Kit segítségével határoztuk meg (R&D System, Minneapolis, MN, USA), mely lehetővé teszi 55 különböző, humán angiogenesishez kapcsolódó fehérje expressziójának egyidejű kimutatását. A vizsgálandó mintákat egy biotinilált, detektáló antitesttel inkubáljuk, ezáltal kialakul egy fehérje-antitest komplex, amely kötődik a megfelelő, membránhoz rögzített befogó antitesthez. Sztreptavidin-tormaperoxidáz és kemilumineszcens detektáló reagens hozzáadásával zárjuk a komplexet (9. ábra). A vizsgálat során 2 donorból vettünk mintát és a mérést 3-szor megismételtük.



9. ábra *A proteome profiler sematikus ábrája. A nitrocellulóz membránra rögzített befogó antitest, a mérendő minta, a detektáló antitesttel jelölt minta, a biotin és a szteptavidin-tormaperoxidáz alkotja a komplexet, melyet kemilumineszcens reagens segítségével és röntgenfilm felhasználásával látható jellé alakítunk. Ez a jel pedig a minta növekedési faktor tartalmára utal.*

3.8.1. Növekedési faktor tartalom meghatározása részletesen

Munkánk során a natív PRP és a HAS vérkészítmények növekedési faktor tartalmára voltunk kíváncsiak, ezért ezeket a vérkészítményeket a 3.5.1. és a 3.5.5. fejezetekben leírtak szerint izoláltuk.

Az eljárás során 4 nitrocellulóz membránnal dolgoztunk, melyre előzetesen a gyártó 55 különböző befogó antitestet rögzített duplikátumban.

1. A munka kezdetén minden reagenst és mintát szobahőmérsékletűre hoztunk.

2. A Proteome Profiler Humán Angiogenezis Kitben szereplő oldatokat az alábbi előírás szerint készítettük elő:

Detektáló antitest koktél: 100 µl desztillált vízben oldottuk fel a gyártó által adott biotinilált, detektáló antitestet.

1X mosófolyadék: a gyártó által adott 25X-ös mosófolyadékból 40 ml-et pipettáztunk 960 ml desztillált vízhez.

Kemilumineszcens keverék: a kitben szereplő 1-es és 2-es kémiai reagenset kevertük össze (2,5 ml- 2,5 ml) a felhasználás előtt negyed órával, alufóliával körbetekert centrifugacsőben.

3. A gyártó által megadott ún. 7-es számú mosó pufferből 2 ml-et pipettáztunk egy 4 lyukú edény mindegyik részébe, ami blokkoló pufferként szolgált. Egy csipesz segítségével a membránokon lévő védőlapokat eltávolítottuk, majd az edény mindegyik részébe 1-1 membránt helyeztünk. Ettől a lépéstől kezdve végig rázógépre tettük a 4 lyukú edényt, enyhén billegetve a membránokat és a rajtuk lévő folyadékot, így elkerültük, hogy a membrán kiszáradjon (1 óra inkubáció szobahőmérsékleten).

4. 1-1 ml mintát (PRP és HAS) adtunk 0,5 ml, a gyártó által adott 4-es számú pufferhez. Ezután 15 µl detektáló antitestet pipettáztunk a mintát tartalmazó oldatokba és 1 órán keresztül inkubáltunk szobahőmérsékleten.

4. Az 1 óra inkubáció letelte után, a membránon lévő puffert eltávolítottuk és az előző lépésekben elkészített, mintát és detektáló antitestet tartalmazó oldatot pipettáztuk a membránra. Egész éjszakán inkubálódott 5 °C-on rázógépen.

5. Másnap 1x-es mosó pufferrel lemostuk (20 ml) óvatosan a membránokat, 3-szor 10 percig szobahőmérsékleten.

6. A gyártó által megadott sztreptavidin-tormaperoxidáz enzimet adtuk hozzá a mintákhoz, mintánként 2 ml-et. 30 percig, szobahőmérsékleten.

7. Ezután a membránokat ismét mostuk 3-szor 10 percig 20-20 ml mosófolyadékkal.

8. A membránokat egy műanyag fólia alá tettük, majd a kemilumineszcens anyagból 1-1 ml-t adtunk a membránokra, és 1 percig inkubáltunk, előtte jól kinyomkodtuk a fólia alól a buborékokat a pontos fedés érdekében.

9. Ezután a membránokat röntgenfilm kazettára helyeztük, majd 7 perc inkubálás után röntgenfilmre exponáltunk.

Előhívás után a jel denzitása arányos volt a megkötött analit mennyiségével. A jelek kiértékeléséhez Photoshop programot (Adobe Systems, San José, CA, USA) használtunk és ún. Arbitrary Unit mértékegységben (AU) fejeztük ki azok erősségét.

3.9. Hisztológia

A vizsgálat célja az volt, hogy hisztológiai elemzés segítségével meghatározzuk a csontexplantátumok jellemzőit, amelyeket *in vitro* kezeltünk a csont mineralizációjának javítására.

Három csontbiopsziával dolgoztunk 3 különböző betegből. Minden betegből 3 explantátumot a 0. napon fixáltunk FCS pufferben és további 3-3 explantot FCS pufferben vagy HAS-ban inkubáltunk, így megkaptuk a három kezelési csoportot.

Az FCS puffer az alábbi komponenseket tartalmazta: 4,5 g/L glükóz, GlutaMAX™ és piruvát tartalmú DMEM (Dulbecco's modified Eagle's) médium, (Gibco, Paisley, Skócia), 10% (v/v) magzati borjú szérum (FCS, Gibco, Paisley, Skócia), 2% penicillin/sztreptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) és 1% amfotericin (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA). A HAS puffer összetevőiben nagyon hasonlít az FCS pufferhez, csak a 10% (v/v)-os magzati borjú szérum helyett 10% (v/v)-os HAS vérkészítményt tartalmaz. A két pufferben való inkubálás során a csontexplantátumokat 5 napon keresztül ezekben az oldatokban tároltuk hagyományos sejt kultúras körülmények között, ami 37°C-ot, 5% CO₂-és 95% páratartalmat jelentett. A csontmintákon az 5 nap alatt egyszer cseréltük le a pufferoldatot.

Az FCS pufferben való fixálása során a csontexplantátumok gyakorlatilag kezelés nélkül lettek rögzítve a kísérlet 0. napján, tehát sem az FCS sem a HAS hatását nem tudtuk rajtuk nyomon követni, ezért szolgálhattak kontroll csoportként.

A csontexplantátumokat 4%-os formalinban fixáltuk és felszálló alkoholsorban (70%-100%-os etanol, végül xilol) dehidratáltuk szobahőmérsékleten, majd polietilén filmmel fedtük. Ezután egy speciálisan mineralizált szövetekhez fejlesztett gyantába ágyasztuk be (Technit 9100, Kulzer, Hanau, Germany) és dekalcifikáltuk. Leica RM2255 típusú mikrotómmal (Leica Biosystems Nussloch GmbH, Nussloch, Germany) 6-8 mikrométer nagyságú szeleteket vágunk és Hematoxilin-eozinnal, Von Kossával és Masson's trichrommal festettünk. A lemezek értékeléséhez Nikon Eclipse 80i fénymikroszkópot (Nikon Inc., Europe, Germany) használtunk. Az elemzés a csont mineralizált szövet, az oszteoid szövet és az oszteoblasztok jelenlétére összpontosított.

A csont lamella felületén lévő oszteoid szövet százalékos arányának meghatározását ImageJ szoftverrel végeztük. A csont lamella felületén az oszteoid szövet százalékos arányát az alábbiak szerint határoztuk meg: az oszteoid szövet részének területe / az oszteoid szövetszakasz mineralizált csont lamella szakaszának területe.

A csontszerkezet integritásának elemzésére vonatkozó szövettani pontszámokat 4 fő vizsgálta; a lehetséges pontszámok a következők voltak: nincs egységes csontszerkezet = 0, a csontszerkezet integritása minimális = 1, a csontszerkezet integritása átlagos = 2 és a csontszerkezet nagyon egységes = 3.

3.10. Statisztika

A mérési eredmények átlag \pm SEM értékeket jelentenek. A különböző vérkészítményekkel történt kezelések összehasonlítása és rekombináns növekedési faktorok kiértékelése egyutas ANOVÁ-val történt Tukey-féle poszt hoc teszttel. A proteome profiler mérés során kapott növekedési faktor eredményeit kétutas ANOVÁ-val értékeltük és Bonferroni korrekciónak vetettük alá. A $p < 0,05$ eredményt fogadtuk el szignifikánsnak. Az adatokat GraphPad Prism (Graphpad software Inc., CA, USA) adatelemző szoftver segítségével értékeltük.

4. Eredmények

4.1. Az MTT mérés beállítása

A csontexplantátumokon lévő sejtek életképessége utal egyértelműen arra, hogy egy-egy kezelés mennyire sikeres és hogyan befolyásolja a sejtek túlélését, proliferációját. Kísérleteinkben ennek számszerűsítésére az MTT kolorimetriás esszét alkalmaztuk. Csontexplantátumok MTT mérésére vonatkozóan nem találtunk irodalmi adatot, ezért mind az MTT inkubációs idejét mind az izopropanolos oldási időt szükséges volt a méréseink során beállítani. Egy 2007-ben [153] és egy 2009-ben [154] megjelent tanulmányból indultunk ki, ahol monolayer sejt kultúrán (H9c2 és patkány endotél sejteken) vizsgálták a sejtek életképességét MTT esszé segítségével. Egyik esetben egy, másik esetben 3 órás MTT inkubációs időt határoztak meg és mindkét kísérletben azonnal mérték a sejtek életképességét izopropanol hozzáadása után.

4.1.1. MTT inkubációs idő beállítása

Tízperces, 1, 2, és 3 órás MTT inkubációs időt próbáltunk ki. A 10 percig tartó MTT inkubálás kevésnek bizonyult, ugyanis alig láttunk elszíneződést a csontexplantátumok felületén. Ez azt jelentette, hogy az élő sejtekben jelen lévő szukcinát dehidrogenáz enzimnek nem volt elég ideje a sárga színű MTT sötétkék színű formázán kristállyá alakítani, nem ment végbe az enzimes reakció, ezért tovább növeltük az inkubációs időt. Egy, 2 és 3 óra elteltével a csontok már sötétkék színt mutattak és lemértük a csontexplantátumok optikai denzitását. Az értékek enyhe csökkenést mutattak az inkubációs idő előrehaladtával (1 óra elteltével $16,84 \pm 4,85$ AU, $n=3$; 2 óra elteltével $13,67 \pm 2,94$ AU, $n=3$; és 3 óra elteltével $14,76 \pm 4,08$ AU, $n=3$; átlag \pm SEM). Mivel a csontexplantátumok már 1 óra elteltével is kék színűek lettek, tehát az enzimes reakció végbement, illetve a 2 és 3 órás MTT inkubációs idő is kisebb értéket mutatott az 1 órás csoporthoz képest, ezért az 1 órás MTT mellett döntöttünk.

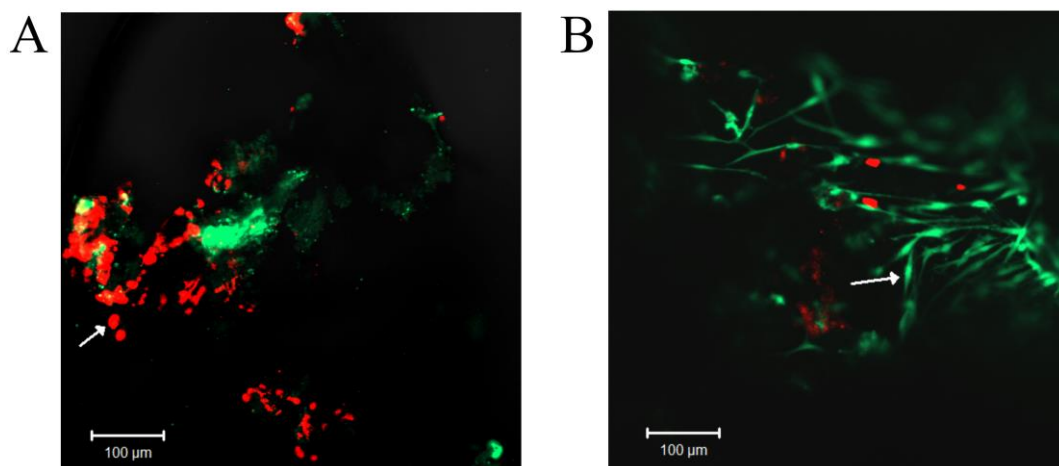
4.1.2. Izopropanolos oldási idő beállítása

Első lépésben egy nagyon rövid és két hosszabb izopropanolos oldást vizsgáltunk: 10 perces, 16 órás és 20 órás oldási időt tanulmányoztunk 3 napos csontexplantátumokon. A mérést a már beállított, 1 órás MTT inkubációs idő alkalmazásával végeztük. Az

eredményeket (10 perces oldás: $26,47 \pm 2,59$ AU, $n=6$; 16 órás oldás: $35,83 \pm 3,46$ AU, $n=6$; 20 órás oldás: $33,37 \pm 3,50$ AU, $n=6$; $\text{átlag} \pm \text{SEM}$) vizsgálva megállapítottuk, hogy a 10 perces izopropanolos oldás kevésnek tűnik, ugyanis a 16 órás idő sokkal nagyobb értéket mutat, a 20 órás viszont már csökkenő értéket, ezért a számunkra megfelelő idő a 10 perc és 16 óra között lesz, így újabb kísérletbe fogtunk. Ekkor 6 napos csontexplantátumokon 10 perc, 1, 2, 3, 4 és 5 órás izopropanolos időintervallumokat néztünk. A mért optikai denzitás értékek 1 órás izopropanolos oldást követően folyamatosan csökkentek (10 perc: $91,20 \pm 19,09$ AU, $n=6$; 1 óra: $100,8 \pm 21,09$ AU, $n=6$; 2 óra: $99,43 \pm 20,77$ AU, $n=6$; 3 óra: $96,36 \pm 20,07$ AU, $n=6$; 4 óra: $93,37 \pm 19,44$ AU, $n=6$; 5 óra: $88,24 \pm 19,14$ AU, $n=6$, $\text{átlag} \pm \text{SEM}$), amit az izopropanol párolgásával magyaráztunk (habár le volt fedve a mérőedény). Ezért, hogy ezt minimalizáljuk, de a csontdarabokban lévő formazán kristályokat is kioldjuk, az 1 óra oldási időt választottuk. Az Eredmények fejezetben feltüntetett „n” elemszám a csontexplantátumok darabszámát jelöli.

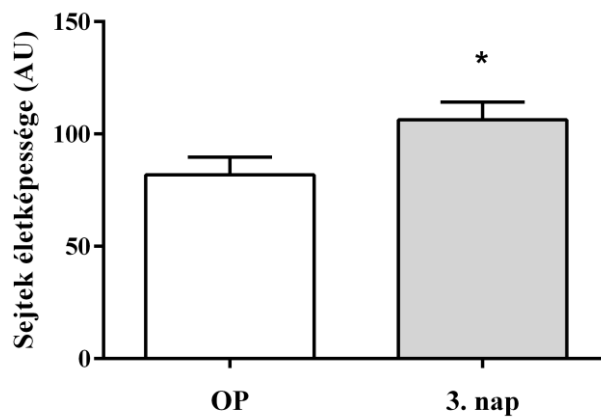
4.2. A tenyésztés hatása

Az operáció napján az explantátumokon lévő sejtek morfológiájuk és a sejtfestés alapján sérültek vagy halottak voltak, amit mi elsősorban a műtéti stressznek tulajdonítottunk, ezért 3 napon keresztül tenyésztő médiumban inkubáltuk őket. A mikroszkópos képek alapján jól kivehető a 3 napos tenyésztés pozitív hatása: a sejtek a csontgerendához és egymáshoz tapadtak és nyúlványos alakzatot mutattak (10. ábra).



10. ábra Az explantátumokon lévő sejtek az operáció napján (A panel) és 3 napos tenyésztést követően (B panel). A halott sejteket ethidium homodimer sejtfestékekkel jelölve piros színben látjuk (A panel, nyíl), míg az egészséges, letapadt sejteket calcein-AM-mel megfestve zöld színben (B panel, nyíl). Míg az operáció napján elsősorban halott sejtek figyelhetők meg, addig 3 napos inkubálás után már az élő, nyúlványos sejtek jelenléte a meghatározó. A képet ZEISS LSM konfokális mikroszkóppal rögzítettük 20x nagyításban.

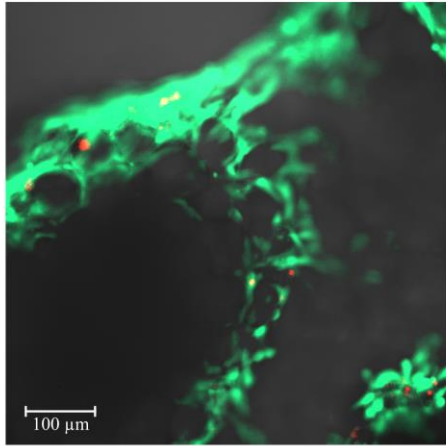
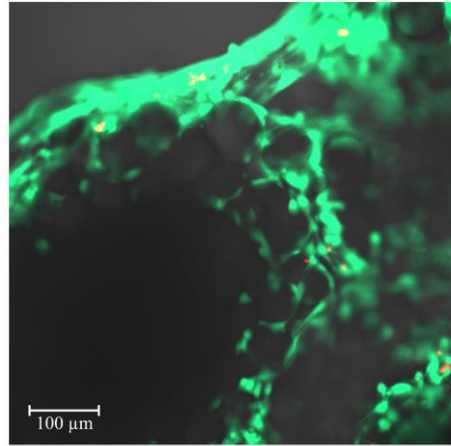
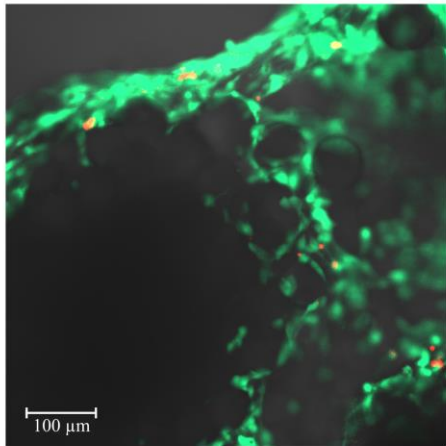
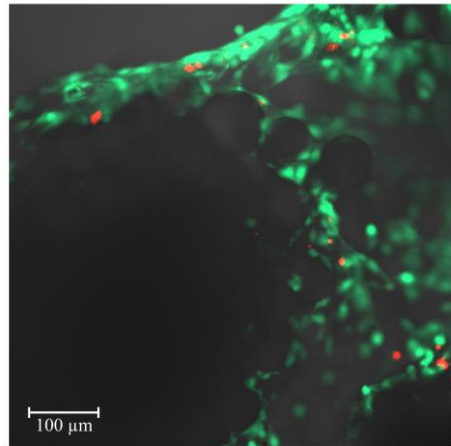
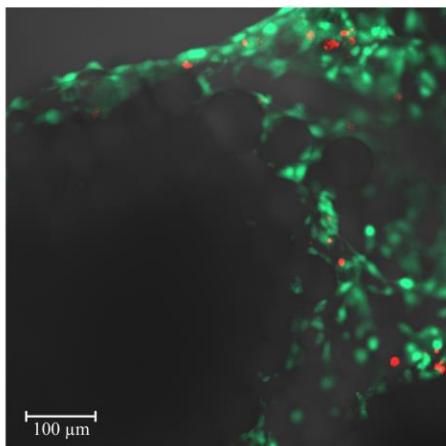
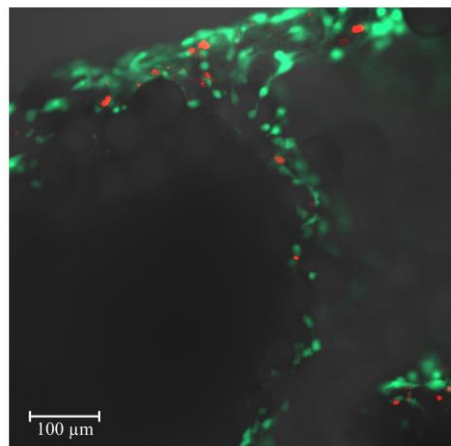
Kvantitatívan, MTT esszé segítségével is értékelve a sejtek száma szignifikánsan magasabb volt 3 napos inkubáció után ($p < 0,05$). Az operáció napján (OP) mért sejtek életképessége $81,75 \pm 7,95$ AU ($n=36$), a 3 napos inkubálás után a sejtek életképessége $106,3 \pm 7,97$ AU ($n=48$). A statisztika t-teszt segítségével történt (11. ábra).



11. ábra A tenyésztés hatása. Az OP-től számított 3 napos inkubálás után a sejtek életképessége szignifikánsan magasabb értéket mutatott az operáció napján (OP) mért értékekhez képest (OP csoport: $81,75 \pm 7,95$ AU, $n=36$; 3. nap csoport: $106,3 \pm 7,97$ AU, $n=48$). Adatok az ábrán: átlag+SEM, $*p < 0,05$, t-teszt.

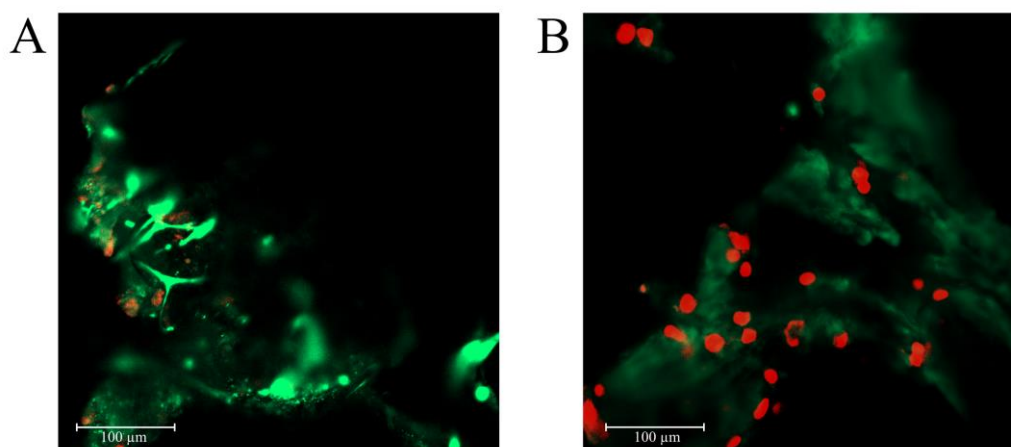
4.3. Oxigén-glükóz depriváció hatása az explantátumokra

Munkánk során OGD segítségével kívántuk modellezni a csontszöveti iszkémiás állapotot. Az OGD kezdetén a csontexplantátumokon lévő sejtek nagyrészt zöld színt mutattak, élő, nyúlványos sejteket láthattunk és csupán néhány sejt mutatkozott piros színben, ami a halott sejtekre utalt (12. ábra, A Panel). Az OGD előrehaladásával az élő sejtek kezdtek elveszíteni nyúlványaikát, kisebbek lettek, kerek formát öltöttek. Az 1 (12. ábra, B Panel), 2,5 (12. ábra, C Panel), 3,5 (12. ábra, D Panel) és 4 órás (12. ábra, E Panel) OGD végén készült fényképek még mindig sok élő (zöld) és kevés halott (piros) sejtet mutattak, ezért tovább növeltük az OGD idejét. Az 5 órás OGD végén már sok halott sejtet láttunk a mikroszkópos fénykép alapján (12. ábra, F Panel), ezért az 5 órás OGD-n átesett csoport mintáin MTT mérést végeztünk, ahol a kontroll, OGD-n át nem esett csoporttal hasonlítottuk össze: *Kontroll csoport: $116,30 \pm 18,42$ AU, $n=24$; OGD csoport: $85,49 \pm 11,52$ AU, $n=24$, t-teszt, átlag±SEM, t-teszt.* Habár az 5 órás OGD csoportba tartozó csontok életképessége kisebb volt, nem mutatott szignifikáns különbséget a kontroll csoporthoz képest, ezért tovább növeltük az OGD idejét 7 órára.

A**B****C****D****E****F**

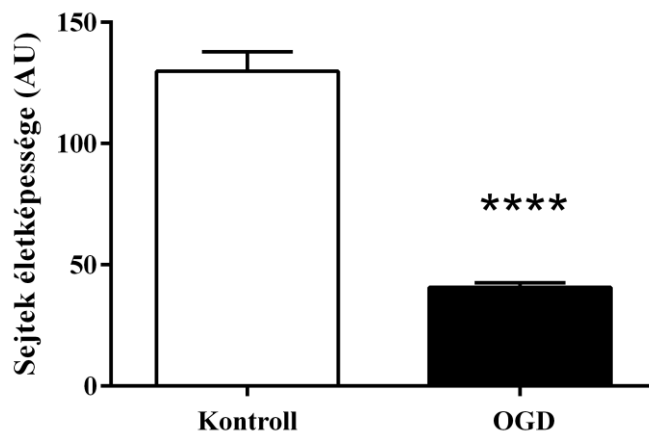
12. ábra OGD hatása a csontexplantátumokon lévő sejtekre. Az A panel az OGD elején készült állapotot mutatja, a B panel 1 órás, a C panel 2,5 órás, a D panel 3,5 órás, az E panel 4 órás, az F panel pedig az 5 órás OGD utáni állapotot tükrözi. Jól látható, hogy az OGD idejének növelésével egyre kevesebb sejt mutatkozik zöld színben (calcein-AM, 488 nm), ami az élő sejtekre utal és egyre fokozottabb lesz a piros (halott) sejtek jelenléte (ethidium homodimer, 546 nm). A képek ZEISS LSM konfokális mikroszkóppal készültek, 20x nagyításban.

A 7 órás OGD után készült mikroszkópos képeken már alig láttunk élő sejtet, a halott sejtek jelenléte vált dominánssá (13. ábra). Ez az idő mutatott egyértelmű károsodást a kontroll csoporttal szemben.



13. ábra Hét órás OGD hatása a csontexplantátumokon lévő sejtekre. Az OGD megkezdése előtt az egészséges, élő sejtek letapadtak, nyúlványos képet mutattak, melyet a zöld színnel jelölő calcein-AM demonstrál (A panel). A 7 órás OGD során ezek a sejtek fokozatosan veszítették el a nyúlványaikat, kerek formát öltöttek és végül halott sejtekké váltak. Míg az OGD előtt csak elvétve láttunk piros színt, mely az ethidium homodimer által festett halott sejteket jelöli, addig az iszkémiás periódust követően ezeknek a száma kimagasló lett (B panel). A kép ZEISS LSM konfokális mikroszkóppal készült 20x nagyításban.

Az explantátumokon lévő sejtek életképességét kvantitatívan is mérve szignifikáns különbség mutatkozott a 7 órás OGD-n átesett csontminták sejtjeinek életképessége és a kontroll csoport között. *Kontroll csoport*: $129,81 \pm 7,98$ AU ($n=48$), *OGD csoport*: $40,67 \pm 1,89$ AU ($n=48$), $p < 0,0001$, t-teszt (14. ábra).



14. ábra A 7 órás OGD hatása MTT esszével értékelve. A 7 órás OGD után szignifikánsan alacsonyabb sejtéletképesség látható a kontroll csoporthoz képest. Adatok az ábrán: átlag+SEM, $n=48$ /csoport, **** $p < 0,0001$, t-teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció.

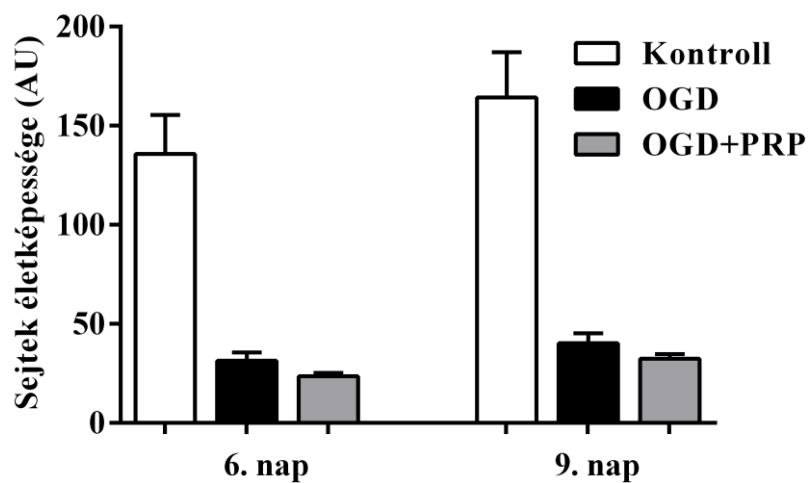
4.4. Trombocitában gazdag plazma hatása oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra

Az OGD idejét optimalizálva sikerült létrehozni egy olyan iszkémiás állapotot a csontexplantátumokon, amely jól modellezi a csontokon lévő sejtek rossz keringését. Ezek után elkezdhetjük a csontexplantátumok kezelését a különböző vérkészítményekkel.

4.4.1. Natív trombocitában gazdag plazma

A PRP vérkészítmények közül először a natív PRP hatását vizsgáltuk. Az MTT esszével mért sejtek életképessége a natív PRP-t is felhasználó kísérletsorozatban az alábbiak szerint alakult az OP 6. napján: *Kontroll csoport*: $135,78 \pm 19,60$ AU, $n=17$; *OGD csoport*: $31,47 \pm 4,12$ AU, $n=18$; *OGD+natív PRP csoport*: $23,53 \pm 1,74$ AU, $n=18$. A sejtek életképessége az OP 9. napján: *Kontroll csoport*: $164,19 \pm 22,82$ AU, $n=18$; *OGD csoport*: $40,29 \pm 4,90$ AU, $n=18$; *OGD+natív PRP csoport*: $32,43 \pm 2,38$ AU, $n=18$.

Egyutas ANOVA-t és Tukey-féle poszt hoc tesztet végezve szignifikáns különbséget csupán a Kontroll (6. és 9. nap) és az OGD-zett csoport (6. és 9. nap) között találtunk: $p < 0,0001$, a natív PRP-vel kezelt és az OGD-n átesett, kezeletlen csoport között nem. A natív PRP az OGD-n átesett explantátumsejteken tehát nem mutatott pozitív hatást sem OP-től számított 6. sem a 9. napon. A natív PRP-vel kezelt csoportban kisebb életképességet mértünk, mint a kezeletlen OGD-n átesett csoportban. A natív PRP nem tudta megállítani a csontmintákon lévő sejtek életképességének csökkenését (15. ábra).

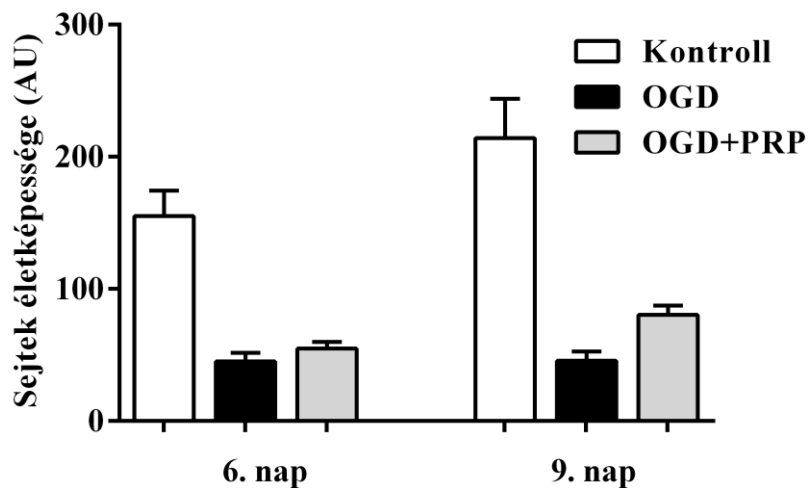


15. ábra: Natív PRP hatása az OGD-n átesett csontexplantátumok sejteire. A natív PRP-vel kezelt csoport mind az OGD-t követő 6. napon mind a 9. napon csökkent életképességet mutatott a csontexplantátumokon az OGD-n átesett, de vérkészítményt nem kapott csoporthoz képest. Adatok az ábrán: átlag+SEM, $n=18$ /csoport kivéve 6. nap kontroll csoport: $n=17$, egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; PRP: Trombocitában gazdag plazma.

4.4.2. Heparinizált trombocitában gazdag plazma

A natív PRP kísérleteink során észrevettük, hogy amint a tenyésztő médiumhoz adtuk a PRP-t, kocsonyássá vált a médium, egy nagy csomóba zárva az explantátumokat, így a csontok nem tudtak szabadon úszni, ezért sem az alapkomponensek sem a PRP nem tudott eljutni az explantátumokon lévő sejtekhez. Heparin hozzáadásával azonban sikerült elkerülni annak kocsonyássá alakulását. Ettől a kísérlettől kezdve a PRP

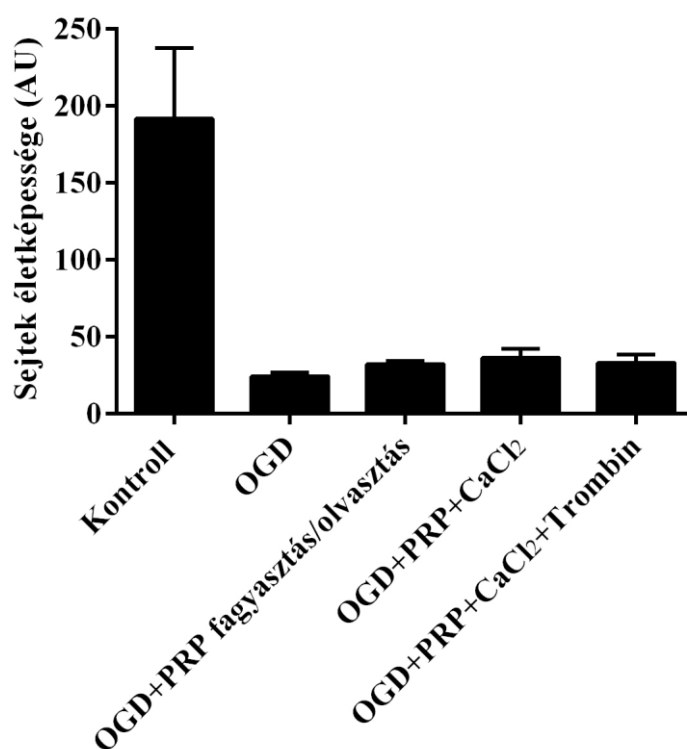
vérkészítményhez mindig adtunk heparint. Ebben a mérési sorozatban azt láttuk, hogy a heparinizált PRP kis mértékben fokozta a sejtek életképességét, de látványos különbséget nem mutatott az OGD-zett, kezeletlen csoporthoz képest. Az MTT esszével mért sejtek életképessége az alábbiak szerint alakult az OP utáni 6. napon: *Kontroll csoport: 155,21±19,15 AU, n=18; OGD: 45,04±6,66 AU, n=18; OGD+heparinizált PRP: 54,79±5,03 AU, n=18.* A 9. napon mért sejtek életképessége: *Kontroll: 214,19±29,74 AU, n=12, OGD: 45,52±6,99 AU, n=18; OGD+PRP: 80,27±7,11 AU, n=18.* A natív PRP-hez hasonlóan egyutas ANOVA-t és Tukey-féle poszt hoc tesztet végezve szignifikáns különbséget csupán a Kontroll (6. és 9. nap) és az OGD-zett csoport (6. és 9. nap) között találtunk: $p < 0,0001$. (16. ábra).



16. ábra Heparinizált PRP. Mind a 6. mind a 9. napon magasabb a sejtek életképessége a heparinizált PRP-vel kezelt csoportokban a kezeletlen, OGD-n átesett csoporthoz képest, de szignifikáns különbséget nem találtunk ezen két csoport között. Adatok az ábrán: átlag+SEM, $n=18$ /csoport kivéve kontroll csoport 9. nap. $n=12$, egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; PRP: Trombocitában gazdag plazma.

4.4.2.1. Heparinizált-aktivált trombocitában gazdag plazma

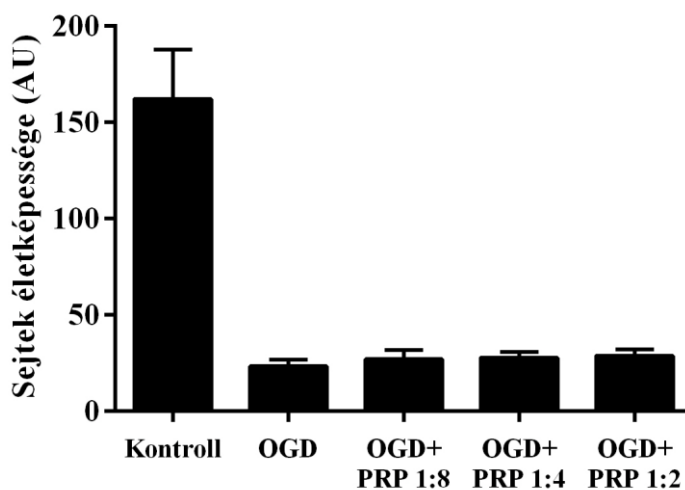
Ahhoz, hogy a trombocitákban lévő növekedési faktorok és egyéb fehérjék felszabaduljanak, sok helyen aktiválják a PRP-t. Munkacsoportunk 3 különböző módon megtette ezt, de ezekben az esetekben sem találtunk pozitív hatást a sejtek életképességére vonatkozóan. Mivel a korábbi, heparinizált PRP-vel történt kezelés javulást csupán az OP 9. napján mutatott határozottabban, ezért ebben a kísérletsorozatban a sejtek életképességét is csak ezen a napon mértük. Úgy gondoltuk, ha lesz változás a kezelt csoportban, akkor ezen a napon már biztosan láthatóvá és mérhetővé válik. Az MTT esszével mért adatok azonban arra utalnak, hogy a heparinizált-aktivált PRP kezelés se képes növelni az OGD után a sejtek életképességét (17. ábra): *Kontroll csoport: 191,83±45,80 AU, n=11; OGD: 24,21±2,51 AU, n=12, OGD+PRP fagyasztás/olvasztás: 32,20±2,14 AU, n=12; OGD+PRP+CaCl₂: 36,43±5,83 AU, n=12; OGD+PRP+CaCl₂+Trombin: 33,29±5,07 AU, n=12.* Egyutas ANOVA-t és Tukey-féle poszt hoc tesztet végezve szignifikáns különbség a Kontroll csoport és az összes többi csoport között volt ($p < 0,0001$), de az OGD-n átesett, kezeletlen és a heparinizált-aktivált PRP vérkészítménnyel kezelt csoportok között nem találtunk.



17. ábra Heparinizált-aktivált PRP hatása az explantátumokon lévő sejtekre 7 órás iszkémiás periódust követően. A csoportok életképességét ebben a mérési sorozatban csak az OP-tól számított 9. napon mértük, de sem az olvasztás-fagyasztási eljárás, sem a CaCl₂ hozzáadása, sem a CaCl₂ és trombin együttes adása nem eredményezett pozitív hatást. A heparinizált-aktivált PRP sem képes visszaállítani a sejtek proliferációs képességét. Adatok az ábrán: átlag+SEM, n=12/csoport kivéve kontroll csoport: n=11, egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; PRP: Trombocitában gazdag plazma.

4.4.2.2. Heparinizált-különböző koncentrációjú trombocitában gazdag plazma

Végül a PRP hatását különböző koncentrációban is kipróbáltuk, ezért a korábban alkalmazott 1:4 (PRP:tenyésztő médium) arány mellett teszteltünk egy PRP szempontjából töményebb (1:2) és egy hígabb koncentrációt (1:8) is. Ebben az esetben is heparinizált PRP-vel dolgoztunk és az OP 9. napján mértük a sejtek életképességét, mely az alábbiak szerint alakult: *Kontroll csoport: 162,25±25,52 AU, n=6; OGD csoport: 23,49±3,20 AU, n=6; OGD+PRP 1:8 csoport: 27,13±4,65 AU, n=6; OGD+PRP 1:4 csoport: 27,85±3,10 AU, n=6; OGD+PRP 1:2 csoport: 28,88±3,40 AU, n=6.* Az eredmények alapján megállíthatjuk, hogy a különböző koncentrációjú PRP-vel történt kezelés nem segíti a sejtek számának növekedését, hasonló eredményt kaptunk a kezelt és a kezeletlen csoportokban. Egyutas ANOVA-t és Tukey-féle poszt hoc tesztet végezve szignifikáns különbség a Kontroll csoport és az összes többi csoport között volt ($p < 0,0001$), de az OGD-n átesett, kezeletlen és a heparinizált-különböző koncentrációjú PRP vérkészítménnyel kezelt csoportok között nem. Az MTT mérés eredményeit a 18. ábra mutatja be.

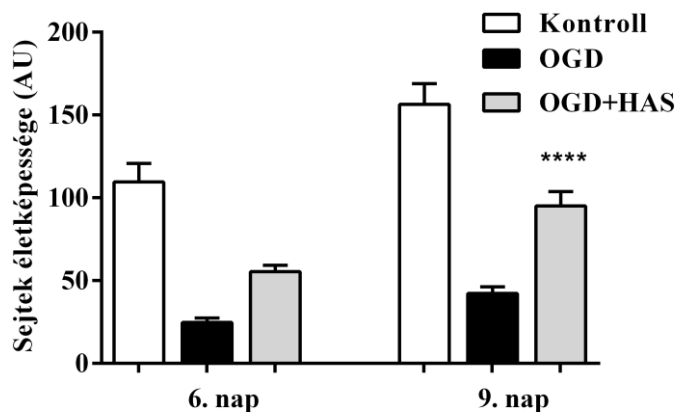


18. ábra Heparinizált-különböző koncentrációjú PRP hatása. Az OGD-t követően a csontok a tenyésztő médium:PRP 1:8, 1:4 és 1:2 arányú elegyében inkubálódtak 9 napon keresztül, ám a sejtek életképessége sem a híg, sem a tömény PRP oldatban nem mutatott változást a kezeletlen, OGD-n átesett csoporthoz képest. Adatok az ábrán: átlag+SEM, n=6/csoport, egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; PRP: Trombocitában gazdag plazma.

4.5. Hiperakut szérum hatása az oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra

4.5.1. Hiperakut szérum kezelés

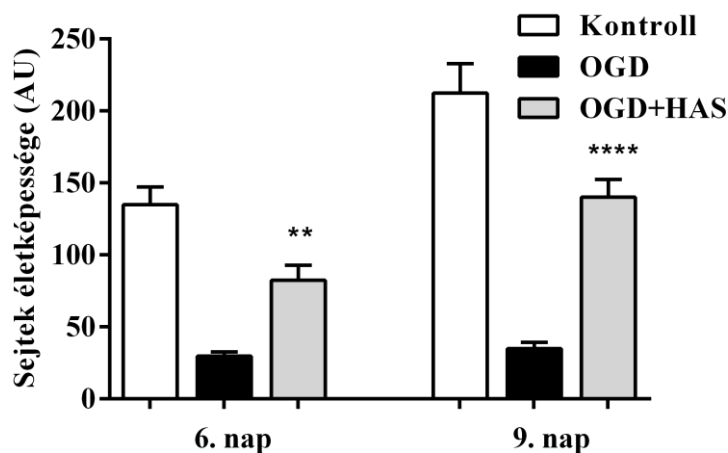
Ebben a mérési sorozatban a 7 órás OGD után HAS-sal kezeltük az egyik csoportot 9 napon keresztül és mértük a sejtek életképességét az OP 6. és 9. napján (19. ábra). Az eredmények a következően alakultak az OP 6. napján: *Kontroll csoport*: $109,52 \pm 11,20$ AU, $n=30$; *OGD csoport*: $24,75 \pm 2,70$ AU, $n=30$; *OGD+HAS csoport*: $55,44 \pm 3,88$ AU, $n=30$. Az OP 9. napján a sejtek életképessége: *Kontroll csoport*: $156,35 \pm 12,59$ AU, $n=25$; *OGD csoport*: $42,18 \pm 4,03$ AU, $n=30$; *OGD+HAS csoport*: $95,01 \pm 8,78$ AU, $n=30$. A mért értékek alapján elmondható, hogy a HAS hozzáadása helyreállította a csontsejtek proliferációs képességét az OGD után (19. ábra). Már az OP utáni 6. napon látványosan emelkedett a HAS-sal kezelt csoport az OGD-zett, kezeletlen csoporthoz képest, mely hatás az OP 9. napjára szignifikáns különbséget eredményezett: $p < 0,0001$, OGD vs OGD+HAS, Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt.



19. ábra HAS hatása a 7 órás OGD-t követően. A HAS vérkészítmény pozitív hatást gyakorol az explantátumokon lévő sejtek proliferációs mértékére az MTT mérés alapján, mely az OP 9. napján szignifikanciát mutatott az OGD-zett, kezeletlen csoporthoz képest. Adatok az ábrán: átlag+SEM, $n=30$ /csoport kivéve Kontroll 9. nap: $n=25$, **** $p < 0,0001$, 9. nap OGD vs. OGD+HAS, Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; HAS: Hiperakut szérum.

4.5.2. Hiperakut szérum előkezelés

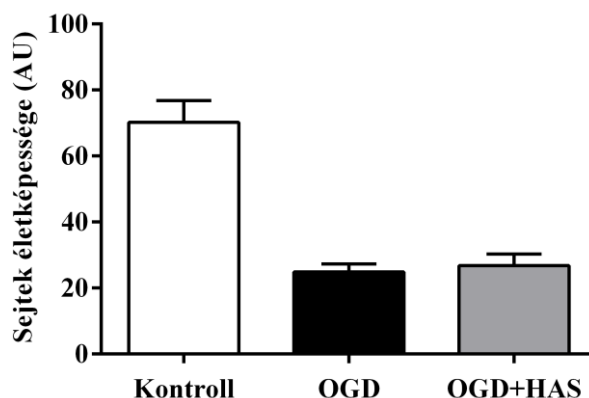
Ez a különbség csak tovább fokozódott, amikor az explantátumokat már az operáció napján HAS vérkészítménnyel kezeltük. A 20. ábrán jól látható, hogy a HAS csoportban már a 6. napon szignifikáns különbség mutatkozott az OGD-n átesett, kezeletlen csoport és a HAS-t kapott csoport között ($p < 0,01$), mely tovább növekedett az OP 9. napjára ($p < 0,0001$). Az OP 6. napján mért életképesség: *Kontroll csoport: $134,85 \pm 12,34$ AU, $n=24$; OGD csoport: $29,74 \pm 2,87$ AU, $n=24$; OGD+HAS csoport: $82,40 \pm 10,40$ AU, $n=24$.* Az OP 9. napján mért értékek: *Kontroll csoport: $212,49 \pm 20,41$ AU, $n=18$; OGD: $34,80 \pm 4,42$ AU, $n=24$; OGD+HAS csoport: $140,12 \pm 12,21$ AU, $n=23$,* Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt.



20. ábra OGD-n átesett explantátumok előkezelése HAS vérkészítménnyel. A HAS pozitív mértékben befolyásolja a sejtek proliferációs képességét, hatása már az OP-tól számított 6. napon is szignifikáns eltérést mutatott a kezeletlen, OGD-n átesett csoporthoz képest, mely az OP 9. napjára még nagyobb eltérést mutatott. Adatok az ábrán: *átlag+SEM, $n=24$ /csoport, kivéve OGD+HAS a 9. napon $n=23$, $**p < 0,01$ OGD vs OGD+HAS 6. nap; $****p < 0,0001$ OGD vs OGD+HAS 9. nap, Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; HAS: Hiperakut szérum.*

4.5.3. Hiperakut szérum hatása közvetlenül az oxigén-glükóz depriváció után

Az eddigi eredményeink alapján kíváncsiak voltunk arra, vajon a HAS mikor kezdi el kifejtteni jótékony hatását az OGD-n átesett sejtekre, ezért új kísérletbe fogtunk. Ebben a mérési sorozatban HAS-t adtunk az OGD ideje alatt a csontokhoz, majd a sejtek életképességét rögtön a 7 órás OGD-t követően vizsgáltuk. MTT esszével mérve a sejtek életképességét az alábbi eredményeket kaptuk: *Kontroll csoport: 70,18±6,64 AU, n=18; OGD csoport: 24,85±2,41 AU, n=24; OGD+HAS csoport: 26,78±3,49 AU, n=24.* Egyutas ANOVA-t és Tukey-féle poszt hoc tesztet alkalmazva szignifikáns különbség csupán a kontroll és a többi csoport között volt ($p < 0,0001$), a HAS-sal kezelt és az OGD-zett, kezeletlen csoport között nem találtunk. A mérési eredményeink azt mutatták, hogy a HAS vérkészítmény nem képes megvédeni a sejteket az iszkémia akut hatásától (21. ábra).



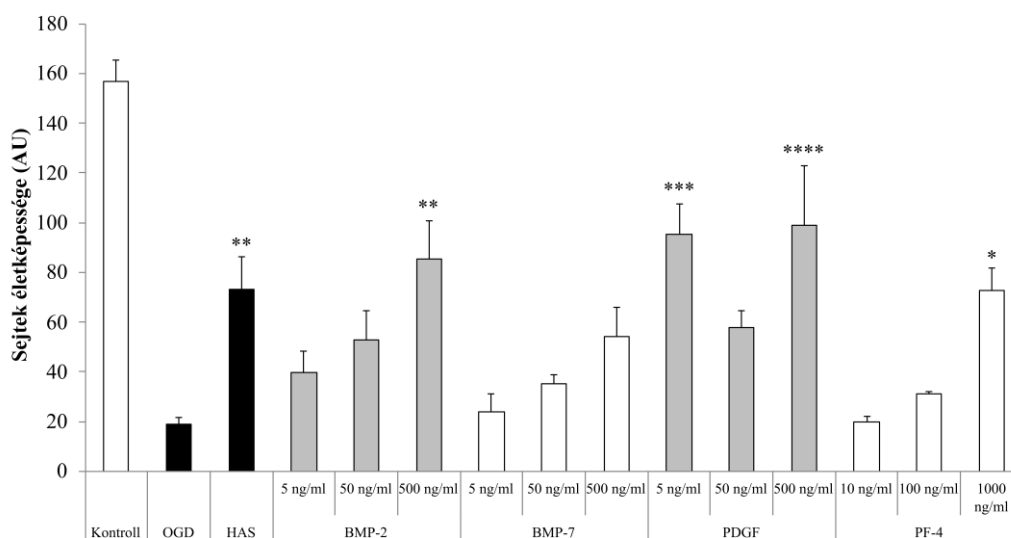
21. ábra HAS hatása közvetlenül az OGD után. A 7 órás OGD ideje alatt a csontokhoz adott HAS nem képes megállítani a sejtek pusztulását, így nem véd az iszkémiás károsodás közvetlen hatásától. A HAS vérkészítményt kapott csoport hasonló életképességet mutat mint az OGD-n átesett, kezeletlen csoport. Adatok az ábrán: átlag+SEM, n=24/csoport kivéve Kontroll csoport n=18, Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt. OGD: oxigén-glükóz depriváció; HAS: Hiperakut szérum.

4.6. Rekombináns növekedési faktorok hatása oxigén-glükóz depriváción átesett csontexplantátumokra

A PRP és HAS tesztelése után egyértelmű pozitív hatás igazolódott a HAS kezelés esetében. Kíváncsiak lettünk, vajon mennyire összehasonlítható ennek a hatásnak a mértéke azokkal a növekedési faktorokkal, amelyek irodalmi adatok alapján egyértelműen segítik a csontok gyógyulását. Négy különböző növekedési faktort, 3 különböző koncentrációban adtunk az OGD-n átesett explantátumokhoz a korábban leírt protokollt használva és mértük a sejtek életképességét. Az eredményeket az 1. táblázat mutatja be, grafikusán kiértékelve pedig a 22. ábra. A mért értékek alapján megállapítható, hogy a beállított csontszöveti iszkémia modellünk alkalmas arra, hogy tesztelje különböző anyagok hatását iszkémán átesett csontexplantátumok sejtjeire vonatkozóan. Azt láttuk ugyanis, hogy a 7 órás OGD után adott növekedési faktorok (a PDGF kivételével) dóziszfüggően növelték a sejtek proliferációs képességét. A növekedési faktorok legnagyobb koncentrációja szignifikáns különbséget mutatott az OGD-zett, kezeltlen csoporthoz képest (a BMP-7 tendeciózus különbséget mutatott). Egyutas ANOVÁ-t, Tukey féle poszt hoc tesztet alkalmazva pedig nem találtunk szignifikáns különbséget a növekedési faktorok és a HAS vérkészítmény között, tehát hasonló mértékben hat a HAS vérkészítmény az iszkémián átesett sejtekre, mint az irodalomban már bizonyítottan csontregenerálódást elősegítő növekedési faktorok.

1. Táblázat Rekombináns növekedési faktorok hatása

Mérés ideje	Kezelés típusa	Koncentráció	MTT esszé/ sejtek életképessége (AU)
9. nap	Kontroll	-	156,80±8,74 (n=13)
	OGD	-	19,01±2,38 (n=12)**
	HAS	1:4 arányú tenyésztő médium keverék	72,96±13,29 (n=8)
	BMP-2	5 ng/ml	39,83±8,5 (n=4)
		50 ng/ml	52,98±11,73 (n=4)
		500 ng/ml	85,38±15,44 (n=5)**
	BMP-7	5 ng/ml	23,72±7,24 (n=4)
		50 ng/ml	35,03±3,89 (n=4)
		500 ng/ml	53,94±12,15 (n=5)
	PDGF	5 ng/ml	95,32±12,23 (n=4)***
		50 ng/ml	57,87±6,84 (n=4)
		500 ng/ml	98,93±24,08 (n=5)****
	PF-4	10 ng/ml	20,00±2,20 (n=4)
		100 ng/ml	31,17±0,67 (n=4)
		1000 ng/ml	72,86±8,80 (n=5)*



22. ábra Rekombináns növekedési faktorok hatása OGD-n átesett csontexplantátumokra. Mindegyik növekedési faktor képes sejtproliferációt indukálni, mely hatás összehasonlítható a HAS vérkészítménnyel. Adatok az ábrán: *: $p < 0,05$; OGD vs. PF-4 (1000 ng/ml) **: $p < 0,01$. OGD vs. HAS és OGD vs. BMP-2 (500 ng/ml); ***: $p < 0,001$; OGD vs. PDGF (5 ng/ml); ****: $p < 0,0001$; OGD vs. PDGF (500 ng/ml). Egyutas ANOVA, Tukey-féle post hoc teszt, átlag+SEM. OGD: oxigén-glükóz depriváció; HAS: Hiperakut szérum. BMP: Csontmorfogenikus fehérje; PDGF: Trombocitából származó növekedési faktor; PF-4: Vérlemezke faktor-4.

4.7. A vérkészítmények laboratóriumi paraméterei

Ahogy az irodalmi bevezetőben említettük, a vérkészítményeket, különösen a trombocitában gazdag plazmát elsősorban a magas trombocitaszáma és az azokban lévő növekedési faktorok miatt alkalmazzák egyre több klinikai területen. Mivel a Hiperakut szérum trombocitaszáma nem ismert, ezért egyéb laboratóriumi paraméterek mellett hozzáláttunk annak meghatározásához. Mivel a dolgozatban bemutatott eredmények voltak az elsők a HAS vérkészítménnyel, ezért mi magunk sem tudtuk, hogy pontosan mit tartalmaz a HAS. Felmerült bennünk, hogy összetételében talán a trombocitában szegény plazmához hasonlít (PPP), ezért a 3.5.1. fejezetben bemutatott, natív PRP izolálása során kinyert PPP vérkészítmény sejt-és fehérjetartalmát is vizsgáltuk a natív

PRP és a HAS mérése mellett. A mérést kiértékelve megállapítható, hogy a vérkészítmények hasonló adatokat mutatnak teljes fehérje, albumin és IgG tekintetében (2. táblázat). Eltérést a hemoglobin szintben és a fibrinogén mennyiségében láttunk. A HAS izolálása során a centrifugálási lépést követően keletkezett fibrincsomó aljáról levágtuk a csomó aljára kivált vért, ezzel magyarázható, hogy nem találtunk hemoglobint ebben a vérkészítményben. A fibrinogén hiánya pedig azzal indokolható, hogy a HAS izolálása közben natív vérvételi csövekkel dolgozunk, a vérvételi cső falával érintkező vérminta vérlemezkéi a centrifugálás ideje alatt aktiválódnak és elindítják a koagulációs kaszkádot. Ennek során az addig oldható fibrinogén fibrinné alakul, amely egy csomó formájában a vérvételi cső közepében helyezkedik el. A Hiperakut szérum vagyis a HAS ennek a PRF csomónak a kiperéselt leve, a visszamaradt fibrin membránt nem használjuk, ezért nem mértünk fibrinogén szintet a HAS mintákban a laboratóriumi vizsgálatokban.

A vérkészítmények sejtösszetétele is eltérő képet mutatott (3. táblázat). A PRP gazdag volt trombocitában, a PPP-ben lényegesen kevesebb trombocita található, a HAS szinte alig tartalmazott trombocitákat, vörös-és fehérvérsejteket.

2. Táblázat Vérkészítmények fehérjetartalma [155].

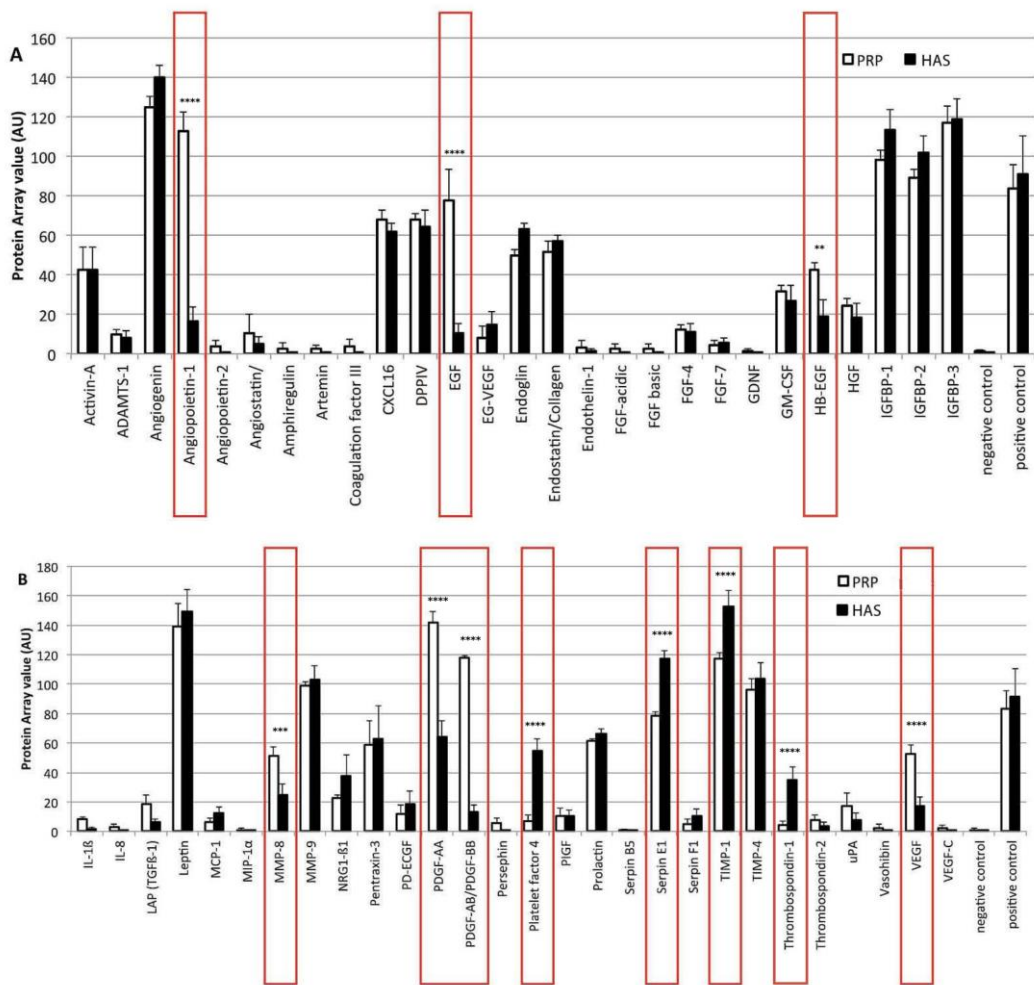
	HAS	PRP	PPP	Referencia	Egység
Teljes fehérje	74,87 ± 1,53	75,50 ± 2,10	75,40 ± 2,70	60–80	g/l
Albumin	49,67 ± 0,07	48,05 ± 0,05	48,40 ± 0,30	35–52	g/l
IgG	12,04 ± 1,34	11,68 ± 2,28	11,69 ± 2,35	6,9–14	g/l
Hemoglobin	0,00 ± 0,00	12,00 ± 3,00	0,00 ± 0,00	115-155	g/l
Fibrinogén	0,00 ± 0,00	3,20 ± 0,30	3,15 ± 0,35	1,5–4	g/l

3. Táblázat Vérkészítmények sejt tartalma [155].

	HAS	PRP	PPP	Referencia	Egység
Vörösvérsejt	0,00 ± 0,00	0,61 ± 0,08	0,00 ± 0,00	4,2–6,1	T/l
Fehérvérsejt	0,01 ± 0,01	12,10 ± 1,60	0,00 ± 0,00	4,8–10,8	G/l
Trombocita	1,33 ± 0,33	2354,50 ± 90,50	34,50 ± 11,50	150–400	G/l

4.8. Proteome Profiler esszé

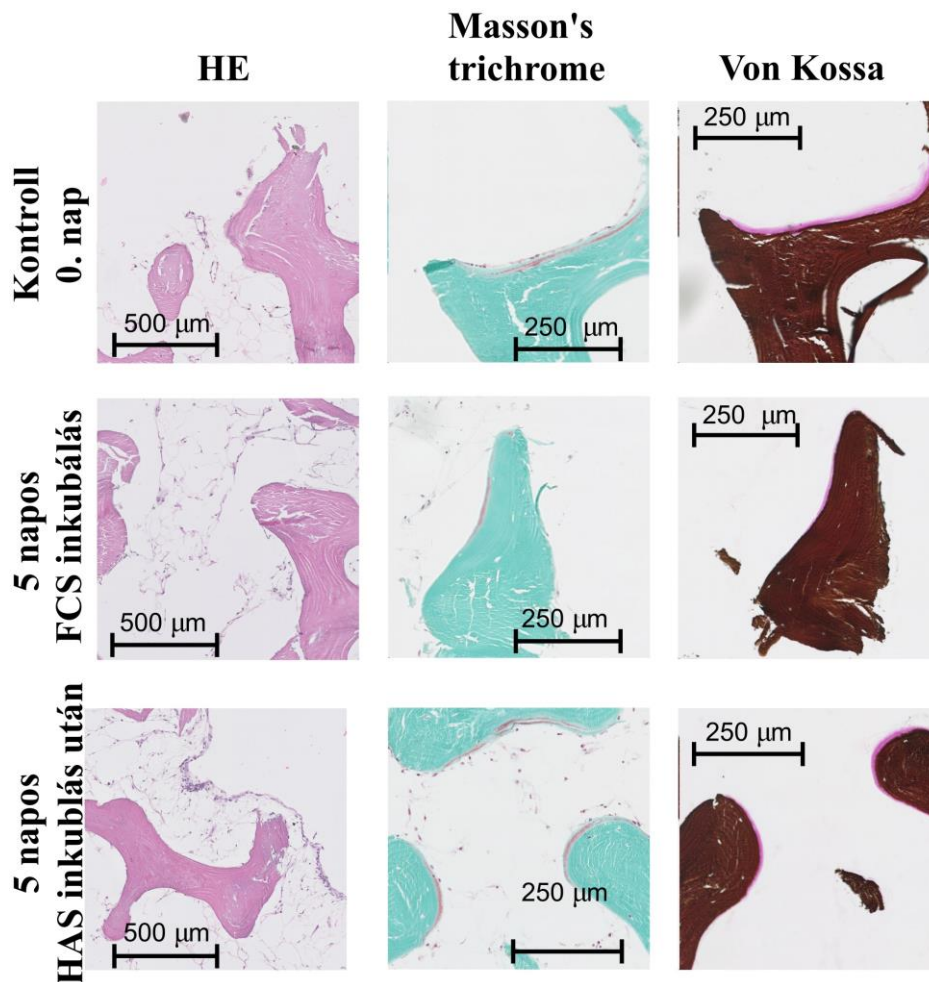
A PRP és HAS vércsítmények növekedési faktor tartalmát Proteome Profiler segítségével határoztuk meg. A röntgenfilmre előhívott pixel denzitások arányosak a vércsítményben jelenlévő növekedési faktorok mértékével. Az eredményeket diagram segítségével kiértékelve jól látható, hogy az esszében szereplő 55 analit mindegyike jelen van a vércsítményekben, de szignifikánsan eltérő képet mutat vércsítményenként az alábbi növekedési faktorok tekintetében: Az Angiopoietin-1 ($p < 0,0001$), az EGF ($p < 0,0001$), a HB-EGF ($p < 0,01$), az MMP-8 ($p < 0,001$), a PDGF AA ($p < 0,0001$), PDGF BB ($p < 0,0001$) és a VEGF ($p < 0,0001$) a PRP-ben mutatható ki szignifikánsan nagyobb mennyiségben, míg a PF-4 ($p < 0,0001$), a Serpin E1 ($p < 0,0001$), a Thrombospondin-1 ($p < 0,0001$) és a TIMP-1 ($p < 0,0001$) a HAS-ban (23. ábra). A statisztikát kétutas ANOVÁ-val és Bonferroni poszt hoc teszttel végeztük.



23. ábra A PRP és HAS növekedési faktor tartalma Proteome Profiler esszé segítségével. Az eredmények 3 mérés eredményeit mutatják, ahol minden mintát duplikátumban mértünk. A piros keret jelöli a vérkészítmények közötti szignifikáns különbséget. A denzitási adatok átlag+SEM értékeket jelentenek: *: $p < 0,01$, **: $p < 0,001$ és ****: $p < 0,0001$. A statisztikát Kétutas ANOVA-val és Bonferroni post hoc teszttel értékeltük ki. HAS: Hiperakut szérum; PRP: Trombocitában gazdag plazma [155].

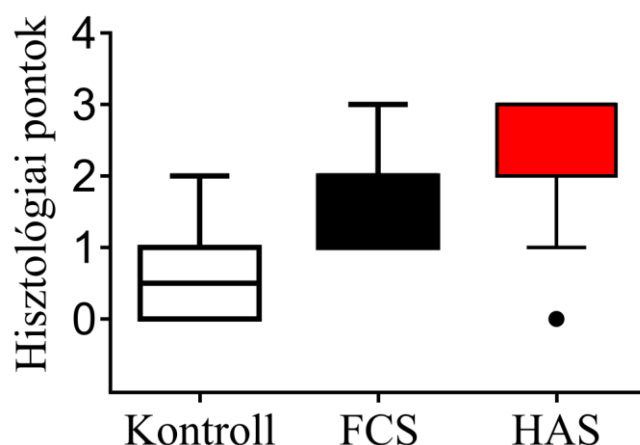
4.9. Hisztológia eredménye

A festéseket kiértékelve látható, hogy a csontexplantátumok nagy, mineralizált csontlamellákból állnak, ahol az oszteociták és oszteoblasztok kis mértékben figyelhetőek meg. A csontexplantátumok kezelése eltérő képet mutatott a különböző csoportokban. Ez a különbség elsősorban a szöveti épség megtartásában és a csontlamellák töredezettségében jelentkezett. A kontroll, kezelést nem kapott csontexplantátumok esetében szakadozott szöveti struktúrát láttunk, a csontlamellák nagy része törést mutatott. Ezzel szemben a HAS-sal kezelt csoport mintái kevésbé voltak szakadtak, sokkal integráltabb képet mutattak, a csontlamellák ebben a csoportban maradtak épek a legnagyobb mértékben. Az FCS-sel kezelt csoport metszetei már árnyaltabb képről tanúskodnak. A csontlamellák több helyen eltörtek, de még nem annyira, mint a kontroll esetén és kisebb mértékben őrizték meg az integritásukat, mint a HAS-sal kezelt csoport (24. ábra).



24. ábra A csontexplantátumok szövettani festése Hematoxin-eozinnal, Masson's trichrommal és Von Kossával. A kontroll csoportba tartozó explantátumok szegényes szöveti struktúráról árulkodnak, a csontlamellák sok helyen töredezetek. Az FCS kezelés kis mértékben hozzájárul az egységesebb szöveti kép kialakításához, de még ebben a csoportban is sok töredezett lamella figyelhető meg. A festési képek alapján a HAS kezelést kapott csontexplantátumok őrizték meg legjobban a szöveti épségüket, a csontszerkezet itt mutatta a legintegráltabb képet és a legkevesebb töredezett lamellát
 HE: hematoxin-eozin; FCS: magzati borjú szérum; HAS: Hiperakut szérum [156].

A Hematoxilin-eozin festéseket pontozásos módszerrel is kiértékeltek vizsgálva egy-egy minta épségét, lamelláinak töredezettségét. Ez az eredmény is azt találta, hogy az 5 napos HAS kezelés esetén a csontszerkezet nagyobb mértékben maradt meg vagy alakult ki, mint a kontroll és az FCS kezelés után, a HAS kezelés őrzi meg legjobban a csontexplantátumok szöveti épségét (25. ábra).



25. ábra A csontszerkezet integritása hisztológiai score alapján. A csont integritására jellemző szövettani pontszámokat számszerűsítve a HAS kezelés tűnik a leghatékonyabbnak a kontroll és az FCS kezeléshez képest. Az ábrán lévő fekete pont egy, az átlagtól eltérő hisztológiai pontszámot jelöl. HAS: Hiperakut szérum; FCS: Magzati borjú szérum [156].

Az oszteoid szövet meghatározását a Von Kossa festéssel jelölt mintákon végeztük. Az oszteoid szövetet manuálisan körvonalaztuk és a megfelelő területet számszerűsítettük. Ezután a színes képet szürke árnyalatúvá alakítottuk, meghatároztuk a küszöbértéket, hogy számszerűsíthessük a mineralizált csontlemezek területét. Az oszteoid szövet alacsony százalékát észlelhetjük a csontexplantátumokon kezeléstől függetlenül. Az oszteoid szövet százalékos meghatározása a csontlamellákon kisebb mértékű csökkenést mutatott a HAS csoportban, mint az FCS csoportban a kontrollhoz képest (kontroll 0. nap: $0,0047 \pm 0,0010\%$, 5 nap az FCS-ben: $0,0025 \pm 0,0003\%$, 5 nap a HAS-ben: $0,0037 \pm 0,0006\%$).

5. Megbeszélés

Számos tanulmány számol be arról, hogy különböző vérkészítmények használatával egy-egy sérült szövet regenerációja fokozottabbá válhat. Jelen tanulmányban két vérkészítmény potenciális regeneratív tulajdonságait hasonlítottuk össze egy új, iszkémiás csontdegeneráció modelljében és megállapítottuk, hogy a HAS megbízható sejtszintű regenerálódást váltott ki iszkémián átesett csontokon, míg a PRP-nél ezt a hatást nem értük el.

Kísérleteinkben a szöveti iszkémia modellezéséhez oszteoarthritisben szenvedő betegek csontmintáit használtuk. Az oszteoarthritis (OA) a krónikus arthritisz leggyakoribb formája és az egyik leggyakrabban előforduló mozgásszervi betegség. Igaz, hogy elsősorban az ízfelszín pusztulásával jár, mégis összekapcsolható a csontszöveti iszkémiával [157]. Az OA a szinoviális ízületek olyan rendellenessége, amelyben az ízületi porc elvékonyodik és a szubkondrális csont is átalakul. Ha a szubkondrális csontban bármilyen okból a kis vérereken keresztül lecsökken a véráramlás, lecsökken az intersticiális véráramlás is. Mivel ez a csont táplálékkal látja el az ízületi porcot, ezért a porc integritására is kihatással van. Csontiszkémiában megkezdődik az oszteociták apoptózisa, beindul a csont oszteoklasztikus felszívódása, mely végül csökkenti a porc tápanyagellátottságát és ízületi változásokat okozhat. Bár a porc maga avaszkuláris, a csontot érő keringési probléma alapja lehet az OA kialakulásának [158]. Mivel a kísérleteinken felhasznált csontexplantátumok oszteoartrikus tulajdonságaik miatt eleve rossz állapotban vannak, amin az őket ért csontszöveti iszkémia tovább ront, ezért ezek a csontok jól modellezhetik a degeneratív csontbetegségek végállapotát. Ha egy kevésbé regeneráló csontot teszünk ki iszkémiás hatásnak, majd vizsgáljuk a különböző terápiás kezelések sikerességét, úgy gondoltuk, egyértelműen eldönthető az adott terápiáról, hogy sikeres-e vagy sem. Jelen dolgozatban a HAS és a PRP vérkészítmények hatásait hasonlítottuk össze MTT kolorimetriás esszé segítségével, ahol a HAS-sal kezelt, iszkémián átesett oszteoartrikus csontok nagyobb sejtproliferációt mutattak, ami utalhat a HAS-sal kezelt csontok jobb csontregenerációs képességéhez.

A vérkészítmények pozitív hatásáról számos esetben olvashatunk, például a szájszövetben, ortopédiában, sportgyógyászatban és a plasztikai sebészetben [159], ahol a vizsgált vérkészítmények kielégítő keringésű szövetek sérüléseinek regenerációjában vettek részt. Arról már lényegesen kevesebb tanulmány ír, vajon van-e

hatása ezeknek a vércsízítményeknek egy kimondottan rossz keringésű állapotban, iszkémián átesett szöveteken. Az elmaradt regeneráció egyik oka ugyanis feltehetően a nem megfelelő keringés lehet. Az iszkémia megfordíthatatlan hatást eredményezhet, mely hatás a különböző sejtek/szövetek esetén eltérő idő után jelentkezik. A csontszövetre vonatkozóan két adatot találtunk: az egyik kísérletben megállapították, hogy már néhány óránál hosszabb iszkémia a csont halálát eredményezi [160], egy másik tanulmány pedig arról ír, hogy a csontszövet akár 4 napon keresztül is képes tolerálni az iszkémiát [161]. Első lépésként egy olyan modellt kellett létrehoznunk, amely megbízhatóan demonstrálja a csontnekrózis rossz keringésű modelljét elsősorban azzal, hogy meghatározzuk az iszkémiás periódus pontos idejét. Kísérletünkben ez 7 órás oxigén-glükóz megvonást jelentett. Ezt elegendő időnek láttuk, hogy a combcsontfej explantátumokon lévő sejtek száma szignifikáns mértékben csökkenjen, de a csontokat különböző módon kezelve még reverzibilis hatást érhetünk el.

Eredményeinket vizsgálva és az irodalmi háttérrel alaposan tanulmányozva számos kísérletről olvastunk, amely a PRP elmaradt jótékony hatásáról ír a PRF-fel szemben. He és munkatársai a PRP és a PRF vércsízítmények patkány oszteoblasztokra kifejtett proliferációs és differenciációs hatását vizsgálta *in vitro*. Vizsgálataikban megállapították, hogy a PRF fokozatosan bocsájtotta ki az autológ növekedési faktorokat, ezáltal erősebb és tartósabb hatást fejt ki a patkány oszteoblasztok proliferációjára és differenciálódására, mint a PRP [141]. Wang és munkatársai nyulakon végzett kísérletekben a PRP és a PRF zsírszövetből származó őssejtek (ADSC) proliferációjára és differenciálódására gyakorolt hatását elemezték és ők is erősebb hatást figyeltek meg a PRF-nél, mint a PRP-nél [162]. Egy fogászati vizsgálatban PRP-vel és PRF-fel összekevert graftok csontképződését tanulmányozták beagle kutyákon, ahol megállapították, hogy a PRF-fel összekevert csontgraftok tudták nagyobb mértékben növelni a csontosodást [163]. Különböző vércsízítményeket hasonlítottak össze a sebgyógyulás területén is és arra a megállapításra jutottak, hogy a PRF-et tartalmazó zselatin gél gyorsabb sebgyógyulást eredményez, mint a PRP-t tartalmazó gél [164]. Hasonló hatást tapasztaltak, amikor PRP-t keverték össze csontallografttal. Ez a kísérletsorozat is azt mutatta, hogy a PRP nem képes fokozni vagy felgyorsítani juhok maxilláris sinusában a csont regenerálódását [165]. Garcia és munkatársai azt vizsgálták vajon a PRP-vel kevert peri-implantátum fokozza-e a csontképződést a vércsízítményt

nem kapott kontroll csoporthoz képest. A beültetést követő 55. napon nem láttak szignifikáns különbséget a két csoport között, a PRP nem fokozta a csontképződést [166]. Yelamali és társai PRF és PRP vérkészítményekkel kezelte a harmadik örlőfog kihúzása után keletkezett üreget. Eredményeik azt mutatták, hogy a PRF szignifikánsan javítja a lágyszövetek gyógyulását és a csont gyorsabb regenerálódását a PRP-hez képest. Ezt ők a PRF egyszerűbb izolálási protokolljának és a PRF-ben megtalálható növekedési faktorok szabályozott módon történő felszabadulásának tulajdonítják [167]. A növekedési faktorok vérlemezkékből történő kibocsátását is mérték, ahol megállapították, hogy a PRP szinte azonnal kibocsátja azokat, a PRF azonban még 10 nappal később is, így hosszú távú hatása nagyobb lehet [168].

Egy másik tanulmányban a BMP növekedési faktor és a PRP csontstimuláló képességét elemezték Wistar patkányok állkapocscsontját vizsgálva és arra a következtetésre jutottak, hogy a BMP-7 jelenlétében figyelhető meg újonnan keletkezett csont, a PRP viszont nem fokozta a csontképződést [169].

Habár a PRP egyre nagyobb népszerűségnek örvend mind a sportgyógyászatban mind az ortopédiában, hiszen elősegíti a fiziológiai gyógyulást és hamarabb működhetnek a sérült részek, de minden PRP termék függ a betegről, akiktől izoláljuk a PRP-t és az izolálási módtól. Utóbbi pedig egyáltalán nincs még standardizálva. A PRP definiálására több paramétert is meghatároztak. Az egyik definíció szerint akkor beszélünk PRP-ről, ha az autológ vérkészítmény meghaladja az 1 000 000 trombocitát μ l-enként vagy legalább 5-ször nagyobb mennyiségben van jelen a trombocita, mint a teljes vérben [170, 171]. Egy másik meghatározás ennél sokkal kevesebb trombocitaszámot tart elegendőnek, ugyanis ezen definíció szerint, ha a vérkészítmény trombocitataralma a normál érték felett van, vagyis meghaladja a 150 000-350 000 mikrolitert, már PRP vérkészítményről beszélünk. Boswell és munkatársai megjelent cikke alapján is a PRP legalább 200 000 trombocitát tartalmaz μ l-enként [125].

Egy másik, szintén kulcsfontosságú dologban különbözhetnek a PRP izolálási technikák, ez pedig az antikoaguláns anyaga. A legtöbb esetben EDTA-t vagy nátrium citrátot tartalmazó vérvételi csövet alkalmaznak a PRP kinyeréséhez. Munkacsoportunk nemrégiben végzett egy összehasonlító mérést az előbb említett két antikoagulánssal, melyben bebizonyosodott, hogy a trombociták száma magasabb az EDTA-s PRP-ben, mint a citrátosban, azonban a vérlemezke átlagos térfogata (MPV), ami a vérlemezkék

funkciójára utal hasonló értéket mutatott mindkét antikoaguláns esetében [172]. A dolgozatban szereplő eredményeink az EDTÁ-s PRP hatását tükrözik és elmaradt proliferációs határról szólnak. Hasonló eredményeket közölt Amaral munkatársaival, aki szintén nagyobb trombocitaszámot mért az EDTÁ-s PRP-ben, mint a citrátosban, ennek ellenére mégsem az EDTÁ-s, hanem a citrátos PRP adása bizonyult hatásosabbnak MSC kultúra proliferációját vizsgálva [173]. A PRP összetevői tehát izolálásonként különbözőek, amelyek részben magyarázhatják az egymástól eltérő eredményeket. Kutatók körében egyre nagyobb az igény a PRP egységes előállítására vonatkozóan, ugyanis csak a pontos és részletes leírás segítségével lehet a vizsgálatokat összehasonlítani és a reprodukálhatóságot biztosítani [95, 174, 175].

A PRP komponensei bioaktív funkcióval rendelkeznek, amelyek befolyásolják az izom-csontrendszeri (muszkuloszkeletális) szövetek regenerálódását és gyógyulását. Habár a leukociták kulcsszerepet játszanak a szövetek helyreállításában és védelmet nyújtanak a fertőző ágensek ellen, proinflammatorikus és immunológiai hatásuk is okozhat nemkívánatos helyi sejt és szövetkárosodást, amely a PRP terápia gyógyító hatását akadályozhatja. *In vitro* tanulmányok kimutatták, hogy a PRP-ben lévő magas leukocita koncentráció olyan gyulladást eredményezhet, amely gátolhatja a gyógyító hatás kialakulását [176-179]. Ezzel összhangban Boswell és kollégái egy inmodell tanulmányozása során megfigyelték, hogy a csökkentett leukocita koncentráció és az ezáltal csökkent gyulladást sokkal fontosabb, mint maximalizálni a trombocitákat ahhoz, hogy optimalizáljuk a PRP hatékonyságát. Mindezek után tehát további klinikai vizsgálatok szükségesek minden egyes célszövet típus esetén, hogy tisztázzuk a leukociták optimális koncentrációját, hogy károsodás nélküli gyógyulást érhesünk el [180].

A vérlemezkék magas koncentrációjának terápiás lehetősége elsősorban abban rejlik, hogy azok képesek az alfa granulátumokból esszenciális növekedési faktorokat és citokineket felszabadítani, és így olyan regeneratív ingereket biztosítanak, amelyek elősegítik a lassabban gyógyuló szövetek javítását [99]. Ezek alapján feltételezhetnénk, hogy a nagyobb számú vérlemezke jelenléte nagyobb regenerációs képességgel bír. Eredményeink azonban ezt a feltételezést megcáfolják, ugyanis a HAS vérkészítményben a PRP-vel összehasonlítva sokkal kevesebb trombocita fordul elő, az iszkémián átesett sejtekre gyakorolt proliferatív hatása azonban mégis neki a nagyobb.

A keringő trombociták felezési ideje 7 nap, és a citokin tartalma a granulátumukban marad, amíg bizonyos események kiváltják a vérlemezkék aktiválódását és a növekedési faktorok szekrécióját [181]. Az aktivált vérlemezkék azonnal elkezdik szekretálni a növekedési faktorukat. Ezeknek a növekedési faktoroknak körülbelül 70% -a az aktiválást követő első 10 percben szekretálódik, és egy órán belül közel 100%-ot választanak ki [170]. A vérlemezkék aktiválása számos módszerrel kezdeményezhető. Több tanulmány vizsgálta, vajon az eltérő aktiválási módok hatással vannak-e egy-egy adott növekedési faktor kibocsátására. A válasz több esetben is egyértelműnek mutatkozott, például a CaCl_2 -dal történő aktiválás szignifikánsan magasabb PDGF felszabadulást eredményez [102], az I-es típusú kollagén aktivációja viszont szerényebb növekedési faktor kibocsátást okoz [182]. Azonban olyan tanulmány is megjelent, mely szerint a vérlemezkék trombinnal vagy CaCl_2 -dal történő aktiválása nem döntő fontosságú, mert már az előkészítési körülmények között is aktiválódhatnak a vérlemezkék [183]. Jelen kísérletsorozatban az aktiválás kérdéskörét alaposan körbejárva a PRP-t először aktiválás nélkül alkalmaztuk, majd CaCl_2 -dal, CaCl_2 és trombin együttes alkalmazásával, és a PRP négyszeri fagyasztás-felolvasztás módszerével igyekeztünk a növekedési faktorokat szabaddá tenni, de a PRP egyik esetben sem mutatott pozitív eredményt az iszkémián átesett sejteken.

A PRF vérkészítmények centrifugálása során a fibrin lassú és természetes polimerizációja homogén, háromdimenziós szerkezetet eredményez. Az így kialakult fibrinháló még inkább koherensebb, mint a természetes fibrinrögök [138]. A PRF fibrinhálója a növekedési faktorok fokozatos felszabadulásának kedvez, ami javíthatja biológiai hatékonyságát. A fibrin mátrix hiánya korlátozhatja a HAS hatékonyságát a PRF-hez képest, ugyanis a HAS előállítása során éppen ezt a fibrinmátrixot szüntetjük meg és a membrán helyett csupán a fibrincsomó kipréselt levével dolgozunk. A megfigyelt hatásunkat és a pozitív eredményünket látva azonban arra a következtetésre jutottunk, hogy éppen a fibrin eltávolítása növeli annak valószínűségét, hogy a bennük lévő növekedési faktorok szabaddá váljanak és elkezdjék jótékony működésüket az általunk használt modellben.

Míg a PRF és HAS úgy tűnik, hogy tartalmazzák azokat az elemeket, amelyek szükségesek az iszkémiás oszteocita proliferáció helyreállításához a fibrin mátrixtól függetlenül, a PRP ezekkel nem rendelkezik. Ezt alátámasztja továbbá az a

megfigyelésünk, hogy sem a heparinizált sem a natív PRP-nek nem volt proliferatív hatása, így kizárta a felszabadulási kinetika hatását ebben a konkrét modellben. Ezért ezeknek a megfigyeléseknek a legvalószínűbb magyarázata a növekedési faktor összetételének különbségében rejlik a PRP és a HAS között. Valójában több fő eltérés figyelhető meg a növekedési faktor profilok között a két vérkészítményt vizsgálva. Bár a növekedési faktorok többsége összehasonlítható szinten volt jelen, az általános minta azt sugallja, hogy a PRP angiogén hatású. Korábban ezt már bizonyították is, ugyanis Kakudo és munkatársai megállapították, hogy a PRP által felszabadult növekedési faktorok *in vitro* és *in vivo* is angiogenezist indukálnak az ERK és a foszfatidil-inozitol-3-kináz-Akt útvonalon keresztül [184]. A PRP-ben nagyobb koncentrációban lévő növekedési faktorok tehát kísérleteink esetében erősebb angiogén tulajdonsággal rendelkeznek, mint a HAS-ban előforduló növekedési faktorok. A PF-4 és a thrombospondin 1, melyek ismert antiangiogén tényezők nagyobb számban fordultak elő a HAS-ban. A jelenlegi eredmények azt mutatták, hogy csak az antiangiogén növekedési faktor profil támogatja a csontsejtek regenerálódását szimulált iszkémiás károsodást követően. Mivel kísérleti konstrukciónk életképes érrendszer nélküli csontszövetekre összpontosított, további vizsgálatokra van szükség a PRP és a HAS angiogén tulajdonságainak megfelelő modellekben történő vizsgálatára.

A Proteome Profiler eredményeit tovább elemezve megállapítottuk, hogy a Serpin E1 magasabb koncentrációt mutatott a HAS készítményben, mint a PRP-ben. Egy 2009-es tanulmány leírta, hogy a Serpin E1 terápiás adása képes megakadályozni a hipoxiás agykárosodást újszülötteknél [185]. Valójában a PF-4, mely szintén nagyobb mennyiségben volt jelen a HAS-ban, mint a PRP-ben bizonyítottan indukálja a sejtek helyreállítását az iszkémiás károsodás után [186]. Más tényezők hozzájárulását azonban nem lehet figyelmen kívül hagyni, ugyanis a vérlemezke kibocsátásának teljes proteomikai elemzése nagyjából 3500 fehérjét érint, ami lényegesen több, mint ami az antigén alapú vizsgálatainkkal mérhető [187, 188].

Két másik szérumfehérjét, az albumint és a fibrinogént gyakran figyelmen kívül hagyják a csontproliferációt befolyásoló tényezők elemzésében [189-193]. Korábban leírtuk a szérum albumin *in vitro* és *in vivo* csontképződését kiváltó hatását [194, 195], ami felveti annak a lehetőségét, hogy maga az albumin is aktív faktor a HAS-ban. Mivel azonban az albumin mindkét szérumfrakcióban összehasonlítható szinten volt jelen, és

mindkét kezelési körülmények között az FBS részeként a tenyésztőközeghez adtuk, nem valószínű, hogy ez hozzájárult volna a HAS hatékonyságához. Továbbá, a fibrinogén / fibrin a PRP-ben bőséges és a HAS-ból hiányzik, ami azt jelzi, hogy a fibrin önmagában kevés hatással van az oszteocita proliferációjának fokozására az OGD után.

A rekombináns fehérjék iszkémián átesett explantátumokhoz történő adása több célt is szolgált. Egyrésztől megerősített bennünket abban, hogy az általunk létrehozott 7 órás oxigén-glükóz megvonás alkalmas a csontiszkémia modellezésére, valamint a különböző kezelési formák teszteléséhez. Másrészt az általunk pozitív hatást mutatott HAS összehasonlíthatóvá vált azokkal a növekedési faktorokkal, amelyek bizonyítottan elősegítik a csontosodási folyamatokat. A BMP-2, PDGF és PF-4 rekombináns növekedési faktorok legnagyobb koncentrációjával kezelve a posztiszkémiás sejteket azok életképessége és proliferációja a HAS-hoz hasonlóan szignifikánsan növekvő értéket mutatott a kezeletlen, OGD-n át nem esett csoporthoz képest (BMP-7 esetben tendenciózus emelkedés). Ezen növekedési faktorokról ismert, hogy csontregenerációs induktorok [196-198]. Ezen túlmenően a HAS a többi növekedési faktoral összehasonlítva nem mutatott szignifikánsan különbséget, tehát hasonló hatást vált ki az iszkémián átesett sejtekre. Ez az *ex vivo* bizonyíték összhangban van a korábbi megállapításokkal, miszerint a PRF ugyanúgy képes a csontnövekedést *in vivo* modellben kiváltani nyúl-koponya defektus gyógyulásában, mint a PRP és koncentrált növekedési faktor [199]. Tehát a HAS a méréseinkben szereplő növekedési faktorokhoz hasonló regeneráló hatást váltott ki és ez hangsúlyozza annak a lehetőségét, hogy a degeneratív csontbetegségek kezelésében részt vegyen.

Jelen dolgozat kísérletei az elsők között vannak, amelyek a Hiperakut szérum vérkészítmény hatását vizsgálják, de számos új eredménnyel sikerült munkacsoportunknak a kezdeti adatokat és megfigyeléseket kiegészíteni. Kísérleteink során megállapítottuk, hogy a HAS humán csontvelő eredetű őssejtek proliferációját segíti és adipogén differenciációt okoz [200], valamint a HAS nagymértékben hat a kondrociták proliferációjára is [201]. Munkacsoportunk megállapította, hogy *in vitro* körülmények között a HAS adása szignifikánsan nagyobb proliferációt okoz MSC sejtkultúrán a PRP-hez képest. Ezeket a vizsgálatokat a csontexplantátumokra kiterjesztve és génexpressziós mérésekkel is alátámasztva a HAS-sal kezelt explantátumokon lévő kevert sejtkultúra az MSC-k és az oszteoblaszt markerek

(COL1A1 és ALPL) növekedését mutatta [156]. A HAS tehát elősegíti az explantátumokon lévő MSC-k átalakulását az oszteoblasztikus vonal felé. Ezt igazolták a szövettani elemzéseink is, ahol az 5 napos HAS kezelés után a csontlamellák alig voltak töredezetek, a csontszerkezet integráltabb képet mutatott és a minták jobban megőrizték szöveti épségüket.

A kísérleteink tervezésénél a PRP vérkészítmény mellett a PRF hatásainak vizsgálatát is terveztük, hiszen irodalmi adatok alapján ezt a vérkészítményt egyre sikeresebben alkalmazzák csontsérülések kezelésében. A PRF eredeti formájában történő felhasználása technikai okok miatt nem vált lehetővé a kísérleti modellünkben. Eredményeink alapján azonban azt találtuk, hogy a PRF-ből kiperéselt HAS számos előnnyel bír a PRF-fel szemben. A PRF izolálása során egy háromdimenziós fibrinmátrix keletkezik, amely állványként szolgálhat a szövetek regenerálódásához, miközben a benne lévő számos növekedési faktor segíti a sebgyógyulást. A centrifugálás során nyert PRF csomót egy csipesz segítségével kiemelik a vérvételi csőből, és vagy ezt a csomót vagy a csomó lecsepegtetése után, egy ún. PRF Box segítségével előállított, állandó vastagságú membránt alkalmazzák gyógyászati célra [132]. A PRF izolálásának egyik hátránya, hogy miközben a PRF csomót kiemeljük a vérvételi csőből, az addig zárt, steril rendszert megbontjuk, továbbá a membrán lecsepegtetése is időigényes folyamat. A másik hátránya pedig, hogy éppen a membrán jellege miatt korlátozottan vagy egyáltalán nem használható sok gyógyászati területen. A HAS legfőbb előnye a PRF-fel szemben a halmazállapotában rejlik, ugyanis a HAS folyékony halmazállapotú, injektálható, ezért könnyebben kezelhető. Munkacsoportunk kifejlesztett és engedélyezettett HypACT Inject néven egy orvostechikai eszközt, amely lehetővé teszi a HAS készítmény teljesen zárt rendszerben történő izolálását és steril injektálását az adott szöveti területre. Ezzel az eszközzel kedvező eredményeket sikerült elérni oszteoartritiszes térd szöveti kezelésében [202]. A HAS injekció formájában történő alkalmazása tehát megoldást jelenthet a vérkészítmény szélesebb körű felhasználására, mint például a sportgyógyászat, ahol a PRF membrán jellegéből adódóan nehezen vagy egyáltalán nem alkalmazható például porc- vagy ínsérülések kezelésében. Egy injektálható készítményt sok esetben egyszerűbben lehet eljuttatni az adott kezelési helyre sterilitását megtartva, ahol gyorsabban fejtheti ki kedvező hatását.

Ez az első vizsgálat, amely a csontiszkémia *ex vivo* modelljét használja a szérum faktorok regeneratív potenciáljának értékelésére. A jelen vizsgálatban alkalmazott modell a csontok gyógyulását nem normál körülmény között vizsgálja, hanem iszkémiát követően elemzi a sérült szövet regeneratív potenciálját. Bár az egészséges csont akut sérülését követő gyulladáshoz hasonló válasz előnyös lehet, ez ellentétes hatású egy degeneratív szövetben, amelyekben a sejtek remodeling kapacitása sérült vagy károsodott. Hisszük, hogy a jelenlegi modellünk az utóbbi helyzetre hasonlít, melyben sikerült az iszkémiás állapotot megfelelően modellezni. Reméljük hogy az általunk használt degeneratív modell hozzájárulhat a rossz keringésű állapotok jobb megismeréséhez és hatásos kezeléséhez.

6. Következtetések

1. Eredményeink azt mutatják, hogy a combfejnekrozis rossz keringésű környezetét 7 órás oxigén-glükóz megvonással (OGD) lehetséges elérni. Ez elegendő idő, hogy a combcsontfej explantátumokon lévő sejtek szignifikáns mértékben károsodjanak a kontroll, OGD-n át nem esett csoporthoz képest.

2. A 7 órás OGD-n átesett explantátumokat ezután különböző vérkészítménnyel és rekombináns növekedési faktoral kezelve az alábbi hatást észleltük:

a. A PRP-t natív, heparinizált, heparinizált-aktivált és heparinizált-különböző koncentrációjú formában adva méréseink alapján megállapíthatjuk, hogy az általunk használt rendszerben a PRP-nek nincs pozitív hatása a posztisztkémiás sejtekre.

b. Ezzel ellentétben a HAS szignifikánsan növeli az iszkémián átesett sejtek életképességét. Elegendő közvetlenül az iszkémiás periódust követően adnunk a HAS vérkészítményt, ugyanis már ekkor is mérhető annak pozitív hatása. Ha már a műtét napján HAS kezelésben részesítjük az explantátumokat, az iszkémián átesett sejtekre gyakorolt kedvező hatása csak fokozottabb lesz.

c. A BMP-2, BMP-7, PDGF és PF-4 rekombináns növekedési faktorok különböző koncentrációjával kezelve a posztisztkémiás sejteket azok életképessége és proliferációja dóziszfüggő mértékben növekszik (a PDGF kivételével). Szignifikáns különbség mérhető a növekedési faktorok legnagyobb koncentrációja és az OGD-n átesett, kezeletlen csoport között (BMP-7-nél tendenciális). A HAS-sal kezelt csoport és a kísérletben szereplő növekedési faktorok csoportjai között pedig nem találtunk szignifikáns különbséget, tehát a HAS összehasonlítható mértékben segíti az iszkémián átesett sejtek proliferációját, mint az irodalomban már bizonyítottan csontregeneráló hatású növekedési faktorok.

3. A vérkészítmények összetételében kerestük a választ, amely a posztisztkémiás sejtekre gyakorolt hatásukat magyarázhatja. A növekedési faktor tartalmát, a celluláris és a fehérje tartalmát mérve az alábbi eredményt kaptuk:

a. A vérkészítmények növekedési faktor tartalmát megvizsgálva megállapítottuk, hogy számos növekedési faktorban egyezik a PRP és a HAS, de az alábbiakban különböznek:

- az angiopoietin, EGF, HB-EGF, PDGF, VEGF és MMP-8 szignifikánsan nagyobb koncentrációban van jelen a PRP-ben,
- a PF-4, Serpin E1, Thrombospondin-1 és TIMP-1 szignifikánsan magasabb értéket mutatott a HAS-ban.

b. A vérkészítmények celluláris és fehérjetartalmát vizsgálva pedig láttuk, hogy a HAS-ban nincs jelen sem hemoglobin, sem fibrinogén, továbbá lényegesen kevesebb trombocita található, mint a PRP-ben.

4. A hisztológiai elemzés során, ahol OGD-n át nem esett explantátumokat kezeltünk HAS-sal és FCS-sel megállapítottuk, hogy a HAS kezelés jobban megőrizte a csont szerkezetét és szöveti épségét.

Következtetésként elmondhatjuk, hogy a PRP a magas növekedési faktor-tartalom és trombocitaszám ellenére nem mutat pozitív hatást az iszkémián átesett sejtek proliferációs képességére, míg a HAS ezzel ellentétben igen. A vérkészítmény kedvező hatása tehát nem a magas trombocitaszámban keresendő.

A HAS hatékony és könnyen izolálható, így megkísérelhető az alkalmazása csontszöveti nekrozisok kezelésében, mely hozzájárulhat új, lehetséges terápiák kialakításához, de további vizsgálatokra van szükség a hatásmechanizmusok tisztázásához.

7. Összefoglalás

Az ortopédiai betegségek száma folyamatosan növekszik világszerte, melyek társadalmunkra és az egészségügyi kiadásokra jelentős terhet rónak. A konzervatív és műtéti technikák alkalmazása mellett a vérkészítmények felhasználása alternatív megoldást szolgáltat. A trombocitában gazdag plazma (PRP) és a trombocitában gazdag fibrin (PRF) regeneráló hatását a bennük lévő növekedési faktoroknak tulajdonítják. A vérkészítmények rossz keringésű környezetben történt hatásáról kevés adat áll rendelkezésünkre. Jelen tanulmányban egy új, *ex vivo* humán csontiszkémia modellt használtunk, amely nagymértékben hasonlít a végstádiumú degeneratív betegségek által károsodott szövetek patológiájára. Munkacsoportunk egy új vérkészítményt, a hiperakut szérumot (HAS) is megvizsgált és annak biológiai hatását mérte össze különböző típusú PRP-vel. Feltételeztük, hogy a koncentrált vérlemezkészármazékok fejtik ki a legnagyobb proliferatív hatást az iszkémián átesett csontszövetre. Az explantátumokat primer coxarthrózisban szenvedő betegek protézisbeültetése során kiműtött combcsontfejből nyertük, melyeket 3 napi sejtenyésztést követően átmeneti oxigén-glükózhányagnak (OGD) tettünk ki 7 órán keresztül. PRP, HAS és rekombináns növekedési faktorokat adtunk az OGD-n átesett explantátumokhoz és MTT segítségével számszerűsítettük azok életképességét. Proteome Profiler Humán Angiogenezis kit felhasználásával azonosítottuk a vérkészítményekben található növekedési faktorokat. A PRP sem natív, sem heparinizált, sem aktivált módon nem gyakorolt hatást a posztiszkémiás sejtekre ellentétben a HAS-sal, amely helyreállította a sejtproliferációs kapacitást. A rekombináns növekedési faktorok, mint a BMP-2, a BMP-7, a PDGF és a PF-4 a HAS-sal hasonló mértékű csontproliferációs hatást fejtenek ki, de csak a legnagyobb dózisokban. Az angiopoietin, az EGF, a PDGF, a HB-EGF, a VEGF és az MMP-8 a PRP-ben, a PF-4, a Serpin E1, a Thrombospondin-1 és a TIMP-1 a HAS-ban magasabb, míg 17 másik faktor hasonló szintet mutat. Eredményeink azt mutatják, hogy a HAS a kevés trombocitaszám ellenére jelentősen javította az iszkémia által károsodott sejtek proliferatív kapacitását. A PRP-nél ilyen hatás nem mutatkozott még magas koncentrációban sem. Az explantátumok HAS-sal történő kezelése iszkémiás körülmény nélkül *in vitro* pedig egységesebb csontszerkezetet mutatott. A HAS új terápiás eszköz lehet degeneratív csontbetegségekben, de további vizsgálatok szükségesek a HAS hatásmechanizmusának tisztázásához.

8. Summary

Orthopedic diseases place a significant burden on our society and healthcare expenditure. Regenerative medicine still holds the promise of rebuilding lost tissue functions. The most widespread clinically applied regenerative agents are blood derivatives, mainly platelet-rich plasma (PRP). Blood cells activated by injury secrete a plethora of proliferation factors into the serum. This raises the possibility of using serum products like PRP, platelet-rich fibrin or hyperacute serum (HAS) therapeutically in degenerative bone diseases and other cases of impaired tissue remodeling. In the present study, we used a novel *ex vivo* human model of bone ischemia, which closely resembles the pathology of tissue damaged by end-stage degenerative diseases. We tested HAS and compared its biological effects to various PRP protocols. We hypothesized that the concentrated platelet-derivative will have the most proliferative effect on the ischemically challenged bone tissue. Osteoarthritic subchondral bone pieces were harvested from discarded femoral heads during hip replacement operations. The explants were grown in culture for 3 days then subjected to transient oxygen glucose deprivation (OGD) for 7 h. PRP, HAS and recombinant growth factors were added to bone explants undergoing OGD and MTT assay was performed to quantify cell viability. Proteome Profiler Human Angiogenesis Array Kit was applied for determination of the growth factors and angiogenesis-related proteins in blood derivatives. Adding either native or heparinized PRP, or activated by calcium, thrombin or physical means did not have any effect on the postischemic cells. However, HAS restored cell proliferation capacity. Proteome-profiler analysis showed that Angiopoietin, EGF, PDGF, HB-EGF, VEGF and MMP-8 were more abundant in PRP, PF-4, Serpin E1, Thrombospondin-1 and TIMP-1 were more abundant in HAS, while 17 other factors were at comparable levels. Recombinant growth factors like BMP-2, BMP-7, PDGF and PF-4 have strong effects on bone proliferation similar to HAS but only in higher concentration. In histology analysis good tissular preservation was demonstrated after HAS treatment *in vivo* in osteoarthritic explant. Our results indicate that HAS significantly improved the proliferative capacity of cells damaged by ischemia, while PRP did not have a positive effect, even at high concentrations, and thus HAS can be a new therapeutic tool in degenerative bone diseases.

9. Irodalomjegyzék

1. Porter JR, Ruckh TT, Popat KC (2009) Bone tissue engineering: a review in bone biomimetics and drug delivery strategies. *Biotechnol Prog*, 25: 1539-1560.
2. Habibovic P (2017) Strategic Directions in Osteoinduction and Biomimetics. *Tissue Eng Part A*, 23: 1295-1296.
3. Blume SW, Curtis JR (2011) Medical costs of osteoporosis in the elderly Medicare population. *Osteoporos Int*, 22: 1835-1844.
4. Hernlund E, Svedbom A, Ivergard M, Compston J, Cooper C, Stenmark J, McCloskey EV, Jonsson B, Kanis JA (2013) Osteoporosis in the European Union: medical management, epidemiology and economic burden. A report prepared in collaboration with the International Osteoporosis Foundation (IOF) and the European Federation of Pharmaceutical Industry Associations (EFPIA). *Arch Osteoporos*, 8: 136.
5. Oral A, Kucukdeveci AA, Varela E, Ilieva EM, Valero R, Berteanu M, Christodoulou N (2013) Osteoporosis. The role of physical and rehabilitation medicine physicians. The European perspective based on the best evidence. A paper by the UEMS-PRM Section Professional Practice Committee. *Eur J Phys Rehabil Med*, 49: 565-577.
6. EUMUSC (2012) Musculoskeletal Health in Europe Report v5.0. Available from: <http://www.eumusc.net/myUploadData/files/Musculoskeletal%20Health%20in%20Europe%20Report%20v5.pdf>.
7. Szendrői T (2016) Csípőprotézis a XXI. században. *Orvosok Lapja*, 20: 28-29.
8. Sebestyén A, Vámhidy L (2010) Csípőprotézis implantációk igénybevételének jellegzetességei Magyarországon. *Magyar Traumatológia, ortopédia, kézsebészet, plasztikai Sebészet*, 53: 173-180.
9. Roseti L, Parisi V, Petretta M, Cavallo C, Desando G, Bartolotti I, Grigolo B (2017) Scaffolds for Bone Tissue Engineering: State of the art and new perspectives. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 78: 1246-1262.
10. Fonyó A. A csontszövet élettana: a csontsejtek differenciálódása és működése. in Fonyó A (szerk). *Az orvosi élettan tankönyve*. Medicina Könyvkiadó Zrt., Budapest, 2011: 412-413.

11. Dimitriou R, Jones E, McGonagle D, Giannoudis PV (2011) Bone regeneration: current concepts and future directions. *BMC Med*, 9: 66.
12. Richards RN (2007) Short-term corticosteroids and avascular necrosis: medical and legal realities. *Cutis*, 80: 343-348.
13. Zlotorowicz M, Czubak J, Caban A, Kozinski P, Boguslawska-Walecka R (2013) The blood supply to the femoral head after posterior fracture/dislocation of the hip, assessed by CT angiography. *Bone Joint J*, 95-B: 1453-1457.
14. Rackwitz L, Eden L, Reppenhagen S, Reichert JC, Jakob F, Walles H, Pullig O, Tuan RS, Rudert M, Noth U (2012) Stem cell- and growth factor-based regenerative therapies for avascular necrosis of the femoral head. *Stem Cell Res Ther*, 3: 7.
15. Martin JR, Houdek MT, Sierra RJ (2013) Use of concentrated bone marrow aspirate and platelet rich plasma during minimally invasive decompression of the femoral head in the treatment of osteonecrosis. *Croat Med J*, 54: 219-224.
16. Moya-Angeler J, Gianakos AL, Villa JC, Ni A, Lane JM (2015) Current concepts on osteonecrosis of the femoral head. *World J Orthop*, 6: 590-601.
17. Szendrői M. Felnőttkori idiopathiás combfejelhalás., *Ortopédia.*, e-tankönyv, Semmelweis Egyetem, Budapest, 2011: 129-132.
18. Beaulé PE, Amstutz HC (2004) Management of Ficat stage III and IV osteonecrosis of the hip. *J Am Acad Orthop Surg*, 12: 96-105.
19. Delloye C, Cornu O, Druetz V, Barbier O (2007) Bone allografts: What they can offer and what they cannot. *J Bone Joint Surg Br*, 89: 574-579.
20. Berthiaume F, Maguire TJ, Yarmush ML (2011) Tissue engineering and regenerative medicine: history, progress, and challenges. *Annu Rev Chem Biomol Eng*, 2: 403-430.
21. Chaudhari AA, Vig K, Baganizi DR, Sahu R, Dixit S, Dennis V, Singh SR, Pillai SR (2016) Future Prospects for Scaffolding Methods and Biomaterials in Skin Tissue Engineering: A Review. *Int J Mol Sci*, 17: 1-31.
22. O'brien FJ (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Materials Today* 14: 88-95.

23. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, Trombelli L, Barbanti-Brodano G, Martini F, Tognon M (2019) Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci*, 20: 1-17.
24. Shegarfi H, Reikeras O (2009) Review article: bone transplantation and immune response. *J Orthop Surg (Hong Kong)*, 17: 206-211.
25. Devescovi V, Leonardi E, Ciapetti G, Cenni E (2008) Growth factors in bone repair. *Chir Organi Mov*, 92: 161-168.
26. Yun YR, Jang JH, Jeon E, Kang W, Lee S, Won JE, Kim HW, Wall I (2012) Administration of growth factors for bone regeneration. *Regen Med*, 7: 369-385.
27. Krishnakumar GS, Roffi A, Reale D, Kon E, Filardo G (2017) Clinical application of bone morphogenetic proteins for bone healing: a systematic review. *Int Orthop*, 41: 1073-1083.
28. Yamaguchi A, Katagiri T, Ikeda T, Wozney JM, Rosen V, Wang EA, Kahn AJ, Suda T, Yoshiki S (1991) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 stimulates osteoblastic maturation and inhibits myogenic differentiation in vitro. *J Cell Biol*, 113: 681-687.
29. Hiraki Y, Inoue H, Shigeno C, Sanma Y, Bentz H, Rosen DM, Asada A, Suzuki F (1991) Bone morphogenetic proteins (BMP-2 and BMP-3) promote growth and expression of the differentiated phenotype of rabbit chondrocytes and osteoblastic MC3T3-E1 cells in vitro. *J Bone Miner Res*, 6: 1373-1385.
30. Zhu W, Rawlins BA, Boachie-Adjei O, Myers ER, Arimizu J, Choi E, Lieberman JR, Crystal RG, Hidaka C (2004) Combined bone morphogenetic protein-2 and -7 gene transfer enhances osteoblastic differentiation and spine fusion in a rodent model. *J Bone Miner Res*, 19: 2021-2032.
31. Southwood LL, Frisbie DD, Kawcak CE, Ghivizzani SC, Evans CH, McIlwraith CW (2004) Evaluation of Ad-BMP-2 for enhancing fracture healing in an infected defect fracture rabbit model. *J Orthop Res*, 22: 66-72.
32. Ishihara A, Shields KM, Litsky AS, Mattoon JS, Weisbrode SE, Bartlett JS, Bertone AL (2008) Osteogenic gene regulation and relative acceleration of healing by adenoviral-mediated transfer of human BMP-2 or -6 in equine osteotomy and ostectomy models. *J Orthop Res*, 26: 764-771.

33. Yi Y, Choi KB, Lim CL, Hyun JP, Lee HY, Lee KB, Yun L, Ayverdi A, Hwang S, Yip V, Noh MJ, Lee KH (2009) Irradiated human chondrocytes expressing bone morphogenetic protein 2 promote healing of osteoporotic bone fracture in rats. *Tissue Eng Part A*, 15: 2853-2863.
34. Liu K, Meng CX, Lv ZY, Zhang YJ, Li J, Li KY, Liu FZ, Zhang B, Cui FZ (2020) Enhancement of BMP-2 and VEGF carried by mineralized collagen for mandibular bone regeneration. *Regen Biomater*, 7: 435-440.
35. Sun W, Li Z, Gao F, Shi Z, Zhang Q, Guo W (2014) Recombinant human bone morphogenetic protein-2 in debridement and impacted bone graft for the treatment of femoral head osteonecrosis. *PLoS One*, 9: e100424.
36. Marsell R, Hailer NP (2014) Successful treatment of a humeral capitulum osteonecrosis with bone morphogenetic protein-7 combined with autologous bone grafting. *Ups J Med Sci*, 119: 287-289.
37. Papanagiotou M, Malizos KN, Vlychou M, Dailiana ZH (2014) Autologous (non-vascularised) fibular grafting with recombinant bone morphogenetic protein-7 for the treatment of femoral head osteonecrosis: preliminary report. *Bone Joint J*, 96-B: 31-35.
38. Yun YR, Won JE, Jeon E, Lee S, Kang W, Jo H, Jang JH, Shin US, Kim HW (2010) Fibroblast growth factors: biology, function, and application for tissue regeneration. *J Tissue Eng*, 2010: 218142.
39. Kawai K, Suzuki S, Tabata Y, Ikada Y, Nishimura Y (2000) Accelerated tissue regeneration through incorporation of basic fibroblast growth factor-impregnated gelatin microspheres into artificial dermis. *Biomaterials*, 21: 489-499.
40. Khor E, Lim LY (2003) Implantable applications of chitin and chitosan. *Biomaterials*, 24: 2339-2349.
41. Yoon JJ, Chung HJ, Lee HJ, Park TG (2006) Heparin-immobilized biodegradable scaffolds for local and sustained release of angiogenic growth factor. *J Biomed Mater Res A*, 79: 934-942.
42. Perets A, Baruch Y, Weisbuch F, Shoshany G, Neufeld G, Cohen S (2003) Enhancing the vascularization of three-dimensional porous alginate scaffolds by incorporating controlled release basic fibroblast growth factor microspheres. *J Biomed Mater Res A*, 65: 489-497.

43. Kawaguchi N, Toriyama K, Nicodemou-Lena E, Inou K, Torii S, Kitagawa Y (1998) De novo adipogenesis in mice at the site of injection of basement membrane and basic fibroblast growth factor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95: 1062-1066.
44. Tabata Y, Miyao M, Inamoto T, Ishii T, Hirano Y, Yamaoki Y, Ikada Y (2000) De novo formation of adipose tissue by controlled release of basic fibroblast growth factor. *Tissue Eng*, 6: 279-289.
45. Kimura Y, Ozeki M, Inamoto T, Tabata Y (2003) Adipose tissue engineering based on human preadipocytes combined with gelatin microspheres containing basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 24: 2513-2521.
46. Kimura Y, Hokugo A, Takamoto T, Tabata Y, Kurosawa H (2008) Regeneration of anterior cruciate ligament by biodegradable scaffold combined with local controlled release of basic fibroblast growth factor and collagen wrapping. *Tissue Eng Part C Methods*, 14: 47-57.
47. Sahoo S, Toh SL, Goh JC (2010) A bFGF-releasing silk/PLGA-based biohybrid scaffold for ligament/tendon tissue engineering using mesenchymal progenitor cells. *Biomaterials*, 31: 2990-2998.
48. Fujita M, Kinoshita Y, Sato E, Maeda H, Ozono S, Negishi H, Kawase T, Hiraoka Y, Takamoto T, Tabata Y, Kameyama Y (2005) Proliferation and differentiation of rat bone marrow stromal cells on poly(glycolic acid)-collagen sponge. *Tissue Eng*, 11: 1346-1355.
49. Isogai N, Morotomi T, Hayakawa S, Munakata H, Tabata Y, Ikada Y, Kamiishi H (2005) Combined chondrocyte-copolymer implantation with slow release of basic fibroblast growth factor for tissue engineering an auricular cartilage construct. *J Biomed Mater Res A*, 74: 408-418.
50. Komura M, Komura H, Kanamori Y, Tanaka Y, Suzuki K, Sugiyama M, Nakahara S, Kawashima H, Hatanaka A, Hoshi K, Ikada Y, Tabata Y, Iwanaka T (2008) An animal model study for tissue-engineered trachea fabricated from a biodegradable scaffold using chondrocytes to augment repair of tracheal stenosis. *J Pediatr Surg*, 43: 2141-2146.

51. Ma Z, Gao C, Gong Y, Shen J (2005) Cartilage tissue engineering PLLA scaffold with surface immobilized collagen and basic fibroblast growth factor. *Biomaterials*, 26: 1253-1259.
52. Lisignoli G, Zini N, Remiddi G, Piacentini A, Puggioli A, Trimarchi C, Fini M, Maraldi NM, Facchini A (2001) Basic fibroblast growth factor enhances in vitro mineralization of rat bone marrow stromal cells grown on non-woven hyaluronic acid based polymer scaffold. *Biomaterials*, 22: 2095-2105.
53. Jeong I, Yu HS, Kim MK, Jang JH, Kim HW (2010) FGF2-adsorbed macroporous hydroxyapatite bone granules stimulate in vitro osteoblastic gene expression and differentiation. *J Mater Sci Mater Med*, 21: 1335-1342.
54. Hong KS, Kim EC, Bang SH, Chung CH, Lee YI, Hyun JK, Lee HH, Jang JH, Kim TI, Kim HW (2010) Bone regeneration by bioactive hybrid membrane containing FGF2 within rat calvarium. *J Biomed Mater Res A*, 94: 1187-1194.
55. Gao Y, Zhu S, Luo E, Li J, Feng G, Hu J (2009) Basic fibroblast growth factor suspended in Matrigel improves titanium implant fixation in ovariectomized rats. *J Control Release*, 139: 15-21.
56. Maehara H, Sotome S, Yoshii T, Torigoe I, Kawasaki Y, Sugata Y, Yuasa M, Hirano M, Mochizuki N, Kikuchi M, Shinomiya K, Okawa A (2010) Repair of large osteochondral defects in rabbits using porous hydroxyapatite/collagen (HAp/Col) and fibroblast growth factor-2 (FGF-2). *J Orthop Res*, 28: 677-686.
57. Murakami S, Takayama S, Ikezawa K, Shimabukuro Y, Kitamura M, Nozaki T, Terashima A, Asano T, Okada H (1999) Regeneration of periodontal tissues by basic fibroblast growth factor. *J Periodontal Res*, 34: 425-430.
58. Shirakata Y, Taniyama K, Yoshimoto T, Miyamoto M, Takeuchi N, Matsuyama T, Noguchi K (2010) Regenerative effect of basic fibroblast growth factor on periodontal healing in two-wall intrabony defects in dogs. *J Clin Periodontol*, 37: 374-381.
59. Tsai EC, Dalton PD, Shoichet MS, Tator CH (2006) Matrix inclusion within synthetic hydrogel guidance channels improves specific supraspinal and local axonal regeneration after complete spinal cord transection. *Biomaterials*, 27: 519-533.

60. Komobuchi H, Hato N, Teraoka M, Wakisaka H, Takahashi H, Gyo K, Tabata Y, Yamamoto M (2010) Basic fibroblast growth factor combined with biodegradable hydrogel promotes healing of facial nerve after compression injury: an experimental study. *Acta Otolaryngol*, 130: 173-178.
61. Li X, Lin Z, Duan Y, Shu X, Jin A, Min S, Yi W (2015) Repair of large segmental bone defects in rabbits using BMP and FGF composite xenogeneic bone. *Genet Mol Res*, 14: 6395-6400.
62. Nagayasu-Tanaka T, Nozaki T, Miki K, Sawada K, Kitamura M, Murakami S (2017) FGF-2 promotes initial osseointegration and enhances stability of implants with low primary stability. *Clin Oral Implants Res*, 28: 291-297.
63. Kawaguchi H, Nakamura K, Tabata Y, Ikada Y, Aoyama I, Anzai J, Nakamura T, Hiyama Y, Tamura M (2001) Acceleration of fracture healing in nonhuman primates by fibroblast growth factor-2. *J Clin Endocrinol Metab*, 86: 875-880.
64. Oortgiesen DA, Walboomers XF, Bronckers AL, Meijer GJ, Jansen JA (2014) Periodontal regeneration using an injectable bone cement combined with BMP-2 or FGF-2. *J Tissue Eng Regen Med*, 8: 202-209.
65. Yoshida T, Miyaji H, Otani K, Inoue K, Nakane K, Nishimura H, Ibara A, Shimada A, Ogawa K, Nishida E, Sugaya T, Sun L, Fugetsu B, Kawanami M (2015) Bone augmentation using a highly porous PLGA/beta-TCP scaffold containing fibroblast growth factor-2. *J Periodontal Res*, 50: 265-273.
66. Zellin G, Linde A (2000) Effects of recombinant human fibroblast growth factor-2 on osteogenic cell populations during orthopic osteogenesis in vivo. *Bone*, 26: 161-168.
67. Kuroda Y, Akiyama H, Kawanabe K, Tabata Y, Nakamura T (2010) Treatment of experimental osteonecrosis of the hip in adult rabbits with a single local injection of recombinant human FGF-2 microspheres. *J Bone Miner Metab*, 28: 608-616.
68. Hu K, Olsen BR (2016) Osteoblast-derived VEGF regulates osteoblast differentiation and bone formation during bone repair. *J Clin Invest*, 126: 509-526.
69. Yang Y CL, Liao C, Qu JY (2014) Effects of VEGF on Bone Cells' Metabolism and Activity. *Dentistry*, 4: 1000247.

70. Street J, Winter D, Wang JH, Wakai A, McGuinness A, Redmond HP (2000) Is human fracture hematoma inherently angiogenic? *Clin Orthop Relat Res*, 378: 224-237.
71. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9656-9661.
72. Dailiana ZH, Stefanou N, Khaldi L, Dimakopoulos G, Bowers JR, Fink C, Urbaniak JR (2018) Vascular endothelial growth factor for the treatment of femoral head osteonecrosis: An experimental study in canines. *World J Orthop*, 9: 120-129.
73. Elis S, Courtland HW, Wu Y, Fritton JC, Sun H, Rosen CJ, Yakar S (2010) Elevated serum IGF-1 levels synergize PTH action on the skeleton only when the tissue IGF-1 axis is intact. *J Bone Miner Res*, 25: 2051-2058.
74. Chen FM, Zhao YM, Wu H, Deng ZH, Wang QT, Zhou W, Liu Q, Dong GY, Li K, Wu ZF, Jin Y (2006) Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of insulin-like growth factor-I from dextran-co-gelatin microspheres. *J Control Release*, 114: 209-222.
75. Meinel L, Zoidis E, Zapf J, Hassa P, Hottiger MO, Auer JA, Schneider R, Gander B, Luginbuehl V, Bettschart-Wolfisberger R, Illi OE, Merkle HP, von Rechenberg B (2003) Localized insulin-like growth factor I delivery to enhance new bone formation. *Bone*, 33: 660-672.
76. Liu JP, Baker J, Perkins AS, Robertson EJ, Efstratiadis A (1993) Mice carrying null mutations of the genes encoding insulin-like growth factor I (Igf-1) and type 1 IGF receptor (Igf1r). *Cell*, 75: 59-72.
77. Wang Y, Nishida S, Elalieh HZ, Long RK, Halloran BP, Bikle DD (2006) Role of IGF-I signaling in regulating osteoclastogenesis. *J Bone Miner Res*, 21: 1350-1358.
78. Rosen CJ, Ackert-Bicknell CL, Adamo ML, Shultz KL, Rubin J, Donahue LR, Horton LG, Delahunty KM, Beamer WG, Sipos J, Clemmons D, Nelson T, Bouxsein ML, Horowitz M (2004) Congenic mice with low serum IGF-I have

- increased body fat, reduced bone mineral density, and an altered osteoblast differentiation program. *Bone*, 35: 1046-1058.
79. Niu T, Rosen CJ (2005) The insulin-like growth factor-I gene and osteoporosis: a critical appraisal. *Gene*, 361: 38-56.
 80. Xian L, Wu X, Pang L, Lou M, Rosen CJ, Qiu T, Crane J, Frassica F, Zhang L, Rodriguez JP, Xiaofeng J, Shoshana Y, Shouhong X, Argiris E, Mei W, Xu C (2012) Matrix IGF-1 maintains bone mass by activation of mTOR in mesenchymal stem cells. *Nat Med*, 18: 1095-1101.
 81. Shah P, Keppler L, Rutkowski J (2014) A review of platelet derived growth factor playing pivotal role in bone regeneration. *J Oral Implantol*, 40: 330-340.
 82. Ahmed SS, Adnan A, Batool A, Rahman Z, Ilyas M, SS J (2011) Investigating the potential role of platelet derived growth factor (PDGF). *Biotechnol Mol Biol Rev*, 6: 133-141.
 83. Deuel TF, Huang JS (1984) Platelet-derived growth factor. Structure, function, and roles in normal and transformed cells. *J Clin Invest*, 74: 669-676.
 84. Rao MV, Berk J, Almojaly SA, Goodloe Iii S, Margarone Iii J, Sullivan M, Dziak R (2009) Effects of platelet-derived growth factor, vitamin D and parathyroid hormone on osteoblasts derived from cancer patients on chronic bisphosphonate therapy. *Int J Mol Med*, 23: 407-413.
 85. Davies OG, Grover LM, Lewis MP, Liu Y (2018) PDGF is a potent initiator of bone formation in a tissue engineered model of pathological ossification. *J Tissue Eng Regen Med*, 12: e355-e367.
 86. Zhang M, Yu W, Niibe K, Zhang W, Egusa H, Tang T, Jiang X (2018) The Effects of Platelet-Derived Growth Factor-BB on Bone Marrow Stromal Cell-Mediated Vascularized Bone Regeneration. *Stem Cells Int*, 2018: 3272098.
 87. Li A, Xia X, Yeh J, Kua H, Liu H, Mishina Y, Hao A, Li B (2014) PDGF-AA promotes osteogenic differentiation and migration of mesenchymal stem cell by down-regulating PDGFRalpha and derepressing BMP-Smad1/5/8 signaling. *PLoS One*, 9: e113785.
 88. Ozkan K, Eralp L, Kocaoglu M, Ahishali B, Bilgic B, Mutlu Z, Turker M, Ozkan FU, Sahin K, Guven M (2007) The effect of transforming growth factor beta1

- (TGF-beta1) on the regenerate bone in distraction osteogenesis. *Growth Factors*, 25: 101-107.
89. Joyce ME, Roberts AB, Sporn MB, Bolander ME (1990) Transforming growth factor-beta and the initiation of chondrogenesis and osteogenesis in the rat femur. *J Cell Biol*, 110: 2195-2207.
 90. Rosen DM, Stempien SA, Thompson AY, Seyedin SM (1988) Transforming growth factor-beta modulates the expression of osteoblast and chondroblast phenotypes in vitro. *J Cell Physiol*, 134: 337-346.
 91. Janssens K, ten Dijke P, Janssens S, Van Hul W (2005) Transforming growth factor-beta1 to the bone. *Endocr Rev*, 26: 743-774.
 92. Filvaroff E, Erlebacher A, Ye J, Gitelman SE, Lotz J, Heillman M, Derynck R (1999) Inhibition of TGF-beta receptor signaling in osteoblasts leads to decreased bone remodeling and increased trabecular bone mass. *Development*, 126: 4267-4279.
 93. Burnouf T, Goubran HA, Chen TM, Ou KL, El-Ekiaby M, Radosevic M (2013) Blood-derived biomaterials and platelet growth factors in regenerative medicine. *Blood Rev*, 27: 77-89.
 94. Malanga GA, M G (2014) PRP: review of the current evidence for musculoskeletal conditions. *Curr Phys Med Rehabil Rep*, 2: 1-15.
 95. Mazzocca AD, McCarthy MB, Chowaniec DM, Cote MP, Romeo AA, Bradley JP, Arciero RA, Beitzel K (2012) Platelet-rich plasma differs according to preparation method and human variability. *J Bone Joint Surg Am*, 94: 308-316.
 96. Araki J, Jona M, Eto H, Aoi N, Kato H, Suga H, Doi K, Yatomi Y, Yoshimura K (2012) Optimized preparation method of platelet-concentrated plasma and noncoagulating platelet-derived factor concentrates: maximization of platelet concentration and removal of fibrinogen. *Tissue Eng Part C Methods*, 18: 176-185.
 97. Singh S (2018) Comparative (Quantitative and Qualitative) Analysis of Three Different Reagents for Preparation of Platelet-Rich Plasma for Hair Rejuvenation. *J Cutan Aesthet Surg*, 11: 127-131.
 98. Davi G, Patrono C (2007) Platelet activation and atherothrombosis. *N Engl J Med*, 357: 2482-2494.

99. Wu PI, Diaz R, Borg-Stein J (2016) Platelet-Rich Plasma. *Phys Med Rehabil Clin N Am*, 27: 825-853.
100. Pavlovic V, Ciric M, Jovanovic V, Stojanovic P (2016) Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med (Wars)*, 11: 242-247.
101. Everts P, Onishi K, Jayaram P, Lana JF, Mautner K (2020) Platelet-Rich Plasma: New Performance Understandings and Therapeutic Considerations in 2020. *Int J Mol Sci*, 21: 7794.
102. Textor JA, Tablin F (2012) Activation of equine platelet-rich plasma: comparison of methods and characterization of equine autologous thrombin. *Vet Surg*, 41: 784-794.
103. Roffi A, Filardo G, Assirelli E, Cavallo C, Cenacchi A, Facchini A, Grigolo B, Kon E, Mariani E, Pratelli L, Pulsatelli L, Marcacci M (2014) Does platelet-rich plasma freeze-thawing influence growth factor release and their effects on chondrocytes and synoviocytes? *Biomed Res Int*, 2014: 692913.
104. Burnouf T, Chou ML, Wu YW, Su CY, Lee LW (2013) Antimicrobial activity of platelet (PLT)-poor plasma, PLT-rich plasma, PLT gel, and solvent/detergent-treated PLT lysate biomaterials against wound bacteria. *Transfusion*, 53: 138-146.
105. Badade PS, Mahale SA, Panjwani AA, Vaidya PD, Warang AD (2016) Antimicrobial effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin. *Indian J Dent Res*, 27: 300-304.
106. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost*, 91: 4-15.
107. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P (2010) Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 31: 3572-3579.
108. Marx RE, Carlson ER, Eichstaedt RM, Schimmele SR, Strauss JE, Georgeff KR (1998) Platelet-rich plasma: Growth factor enhancement for bone grafts. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 85: 638-646.

109. Khalafi RS, Bradford DW, Wilson MG (2008) Topical application of autologous blood products during surgical closure following a coronary artery bypass graft. *Eur J Cardiothorac Surg*, 34: 360-364.
110. Okamura T, Koh E, Yokoyama S (2001) Effect of autologous platelet-rich plasma (PRP) in cardiac surgery. *Kyobu Geka*, 54: 397-400.
111. Patel AN, Selzman CH, Kumpati GS, McKellar SH, Bull DA (2016) Evaluation of autologous platelet rich plasma for cardiac surgery: outcome analysis of 2000 patients. *J Cardiothorac Surg*, 11: 62.
112. Alio JL, Abad M, Artola A, Rodriguez-Prats JL, Pastor S, Ruiz-Colecha J (2007) Use of autologous platelet-rich plasma in the treatment of dormant corneal ulcers. *Ophthalmology*, 114: 1286-1293 e1281.
113. Arnalich F, Rodriguez AE, Luque-Rio A, Alio JL (2016) Solid Platelet Rich Plasma in Corneal Surgery. *Ophthalmol Ther*, 5: 31-45.
114. Nikolidakis D, Jansen JA (2008) The biology of platelet-rich plasma and its application in oral surgery: literature review. *Tissue Eng Part B Rev*, 14: 249-258.
115. Albanese A, Licata ME, Polizzi B, Campisi G (2013) Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing*, 10: 23.
116. Savarino L, Cenni E, Tarabusi C, Dallari D, Stagni C, Cenacchi A, Fornasari PM, Giunti A, Baldini N (2006) Evaluation of bone healing enhancement by lyophilized bone grafts supplemented with platelet gel: a standardized methodology in patients with tibial osteotomy for genu varus. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 76: 364-372.
117. Hsu WK, Mishra A, Rodeo SR, Fu F, Terry MA, Randelli P, Canale ST, Kelly FB (2013) Platelet-rich plasma in orthopaedic applications: evidence-based recommendations for treatment. *J Am Acad Orthop Surg*, 21: 739-748.
118. Eppley BL, Pietrzak WS, Blanton M (2006) Platelet-rich plasma: a review of biology and applications in plastic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 118: 147e-159e.
119. Cervelli V, Gentile P, Scioli MG, Grimaldi M, Casciani CU, Spagnoli LG, Orlandi A (2009) Application of platelet-rich plasma in plastic surgery: clinical and in vitro evaluation. *Tissue Eng Part C Methods*, 15: 625-634.

120. Anitua E, Sanchez M, Nurden AT, Nurden P, Orive G, Andia I (2006) New insights into and novel applications for platelet-rich fibrin therapies. *Trends Biotechnol*, 24: 227-234.
121. Man D, Plosker H, Winland-Brown JE (2001) The use of autologous platelet-rich plasma (platelet gel) and autologous platelet-poor plasma (fibrin glue) in cosmetic surgery. *Plast Reconstr Surg*, 107: 229-237; discussion 238-229.
122. Leo MS, Kumar AS, Kirit R, Konathan R, Sivamani RK (2015) Systematic review of the use of platelet-rich plasma in aesthetic dermatology. *J Cosmet Dermatol*, 14: 315-323.
123. Foster TE, Puskas BL, Mandelbaum BR, Gerhardt MB, Rodeo SA (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 37: 2259-2272.
124. Ficek K, Kaminski T, Wach E, Cholewinski J, Cieszczyk P (2011) Application of platelet rich plasma in sports medicine. *J Hum Kinet*, 30: 85-97.
125. Boswell SG, Cole BJ, Sundman EA, Karas V, Fortier LA (2012) Platelet-rich plasma: a milieu of bioactive factors. *Arthroscopy*, 28: 429-439.
126. Sanchez M, Anitua E, Azofra J, Andia I, Padilla S, Mujika I (2007) Comparison of surgically repaired Achilles tendon tears using platelet-rich fibrin matrices. *Am J Sports Med*, 35: 245-251.
127. Tong S, Yin J, Liu J (2018) Platelet-rich plasma has beneficial effects in mice with osteonecrosis of the femoral head by promoting angiogenesis. *Exp Ther Med*, 15: 1781-1788.
128. Zhang XL, Wang YM, Chu K, Wang ZH, Liu YH, Jiang LH, Chen X, Zhou ZY, Yin G (2018) The application of PRP combined with TCP in repairing avascular necrosis of the femoral head after femoral neck fracture in rabbit. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 22: 903-909.
129. Ibrahim V, Dowling H (2012) Platelet-rich plasma as a nonsurgical treatment option for osteonecrosis. *PM R*, 4: 1015-1019.
130. Aggarwal A, Poornalingam K, Marwaha N, M P (2018) Good functional outcome with use of platelet-rich plasma in osteonecrosis of femoral head. *Orthop Proc*, 100-B: 19.

131. Lakatos T, Major B, Somogyi P, Vacz G, Simon M, Hornyak I, Z L (2017) Platelet-Rich Plasma Enhanced Bone Autograft in Femoral Head Necrosis-A Case Series Report on a Six-Year Follow-Up Period. *J Osteopor Phys Act*, 5: 1-4.
132. Toffler M, Toscano N, Holtzclaw D, Corso MD, DM D (2009) Introducing Choukroun's platelet rich fibrin (PRF) to the reconstructive surgery milieu. *J Implant Adv Clin Dent* 1: 22-31.
133. Dohan Ehrenfest DM, Del Corso M, Diss A, Mouhyi J, Charrier JB (2010) Three-dimensional architecture and cell composition of a Choukroun's platelet-rich fibrin clot and membrane. *J Periodontol*, 81: 546-555.
134. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part I: technological concepts and evolution. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101: e37-44.
135. Naik B, Karunakar P, Jayadev M, Marshal VR (2013) Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *J Conserv Dent*, 16: 284-293.
136. Mazor Z, Horowitz RA, Del Corso M, Prasad HS, Rohrer MD, Dohan Ehrenfest DM (2009) Sinus floor augmentation with simultaneous implant placement using Choukroun's platelet-rich fibrin as the sole grafting material: a radiologic and histologic study at 6 months. *J Periodontol*, 80: 2056-2064.
137. Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM (2009) The relevance of Choukroun's platelet-rich fibrin and metronidazole during complex maxillary rehabilitations using bone allograft. Part II: implant surgery, prosthodontics, and survival. *Implant Dent*, 18: 220-229.
138. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part II: platelet-related biologic features. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101: e45-50.
139. Dohan DM, Choukroun J, Diss A, Dohan SL, Dohan AJ, Mouhyi J, Gogly B (2006) Platelet-rich fibrin (PRF): a second-generation platelet concentrate. Part III: leucocyte activation: a new feature for platelet concentrates? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 101: e51-55.

140. Dohan Ehrenfest DM, de Peppo GM, Doglioli P, Sammartino G (2009) Slow release of growth factors and thrombospondin-1 in Choukroun's platelet-rich fibrin (PRF): a gold standard to achieve for all surgical platelet concentrates technologies. *Growth Factors*, 27: 63-69.
141. He L, Lin Y, Hu X, Zhang Y, Wu H (2009) A comparative study of platelet-rich fibrin (PRF) and platelet-rich plasma (PRP) on the effect of proliferation and differentiation of rat osteoblasts in vitro. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*, 108: 707-713.
142. Tsai CH, Shen SY, Zhao JH, YC. C (2009) Platelet-rich fibrin modulates cell proliferation of human periodontally related cells in vitro. *J Dent Sci* 4: 130-135.
143. Chang IC, Tsai CH, Chang YC (2010) Platelet-rich fibrin modulates the expression of extracellular signal-regulated protein kinase and osteoprotegerin in human osteoblasts. *J Biomed Mater Res A*, 95: 327-332.
144. Dohle E, El Bagdadi K, Sader R, Choukroun J, James Kirkpatrick C, Ghanaati S (2018) Platelet-rich fibrin-based matrices to improve angiogenesis in an in vitro co-culture model for bone tissue engineering. *J Tissue Eng Regen Med*, 12: 598-610.
145. Du J, Mei S, Guo L, Su Y, Wang H, Liu Y, Zhao Z, Wang S, Liu Y (2018) Platelet-rich fibrin/aspirin complex promotes alveolar bone regeneration in periodontal defect in rats. *J Periodontal Res*, 53: 47-56.
146. Cano-Duran JA, Pena-Cardelles JF, Ortega-Concepcion D, Paredes-Rodriguez VM, Garcia-Riart M, Lopez-Quiles J (2017) The role of Leucocyte-rich and platelet-rich fibrin (L-PRF) in the treatment of the medication-related osteonecrosis of the jaws (MRONJ). *J Clin Exp Dent*, 9: e1051-e1059.
147. Zeynep B. Gönen, Canay Y, Asan (2017) Treatment of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw using platelet-rich fibrin. *Cranio*, 35: 332-336.
148. Soydan SS, Uckan S (2014) Management of bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw with a platelet-rich fibrin membrane: technical report. *J Oral Maxillofac Surg*, 72: 322-326.
149. Mosmann T (1983) Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods*, 65: 55-63.

150. Hakki SS, Bozkurt B, Hakki EE, Kayis SA, Turac G, Yilmaz I, Karaoz E (2014) Bone morphogenetic protein-2, -6, and -7 differently regulate osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 102: 119-130.
151. Xu L, Lv K, Zhang W, Zhang X, Jiang X, Zhang F (2012) The healing of critical-size calvarial bone defects in rat with rhPDGF-BB, BMSCs, and beta-TCP scaffolds. *J Mater Sci Mater Med*, 23: 1073-1084.
152. Tanabe N, Tanaka M, Ogura M, Morishita Y, Takamatu J, Saito H (1991) The effect of low affinity platelet factor 4 (LAPF4) secreted by human megakaryoblastic cell line (MEG-01) upon human bone marrow fibroblasts. *Haematologica*, 76: 193-199.
153. Gero D, Modis K, Nagy N, Szoleczky P, Toth ZD, Dorman G, Szabo C (2007) Oxidant-induced cardiomyocyte injury: identification of the cytoprotective effect of a dopamine 1 receptor agonist using a cell-based high-throughput assay. *Int J Mol Med*, 20: 749-761.
154. Modis K, Gero D, Nagy N, Szoleczky P, Toth ZD, Szabo C (2009) Cytoprotective effects of adenosine and inosine in an in vitro model of acute tubular necrosis. *Br J Pharmacol*, 158: 1565-1578.
155. Vacz G, Major B, Gaal D, Petrik L, Horvathy DB, Han W, Holczer T, Simon M, Muir JM, Hornyak I, Lacza Z (2018) Hyperacute serum has markedly better regenerative efficacy than platelet-rich plasma in a human bone oxygen-glucose deprivation model. *Regen Med*, 13: 531-543.
156. Simon M, Major B, Vacz G, Kuten O, Hornyak I, Hinsenkamp A, Kardos D, Bago M, Cseh D, Sarkozi A, Horvathy D, Nehrer S, Lacza Z (2018) The Effects of Hyperacute Serum on the Elements of the Human Subchondral Bone Marrow Niche. *Stem Cells Int*, 2018: 4854619.
157. Bullough PG, DiCarlo EF (1990) Subchondral avascular necrosis: a common cause of arthritis. *Ann Rheum Dis*, 49: 412-420.
158. Findlay DM (2007) Vascular pathology and osteoarthritis. *Rheumatology (Oxford)*, 46: 1763-1768.

159. Bielecki T, Dohan Ehrenfest DM (2012) Platelet-rich plasma (PRP) and Platelet-Rich Fibrin (PRF): surgical adjuvants, preparations for in situ regenerative medicine and tools for tissue engineering. *Curr Pharm Biotechnol*, 13: 1121-1130.
160. Catto M (1977) Ischaemia of bone. *J Clin Pathol Suppl (R Coll Pathol)*, 11: 78-93.
161. Blaisdell FW (2002) The pathophysiology of skeletal muscle ischemia and the reperfusion syndrome: a review. *Cardiovasc Surg*, 10: 620-630.
162. Wang M, Li J, Liu J, Lin X, Xu W (2012) The comparison of platelet-rich fibrin and platelet-rich plasma in releasing of growth factors and their effects on the proliferation and differentiation of adipose tissue-derived stem cells in vitro. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*, 30: 641-644, 649.
163. Jeong KI, Kim SG, Oh JS, Lee SY, Cho YS, Yang SS, Park SC, You JS, Lim SC, Jeong MA, Kim JS, Lee SY (2013) Effect of platelet-rich plasma and platelet-rich fibrin on peri-implant bone defects in dogs. *J Biomed Nanotechnol*, 9: 535-537.
164. Suzuki S, Morimoto N, Ikada Y (2013) Gelatin gel as a carrier of platelet-derived growth factors. *J Biomater Appl*, 28: 595-606.
165. Grageda E, Lozada JL, Boyne PJ, Caplanis N, McMillan PJ (2005) Bone formation in the maxillary sinus by using platelet-rich plasma: an experimental study in sheep. *J Oral Implantol*, 31: 2-17.
166. Garcia RV, Gabrielli MA, Hochuli-Vieira E, Spolidorio LC, Filho JG, Neto FA, de Cardoso LA, Shibli JA (2010) Effect of platelet-rich plasma on peri-implant bone repair: a histologic study in dogs. *J Oral Implantol*, 36: 281-290.
167. Yelamali T, Saikrishna D (2015) Role of platelet rich fibrin and platelet rich plasma in wound healing of extracted third molar sockets: a comparative study. *J Maxillofac Oral Surg*, 14: 410-416.
168. Kobayashi E, Fluckiger L, Fujioka-Kobayashi M, Sawada K, Sculean A, Schaller B, Miron RJ (2016) Comparative release of growth factors from PRP, PRF, and advanced-PRF. *Clin Oral Investig*, 20: 2353-2360.
169. Roldan JC, Jepsen S, Miller J, Freitag S, Rueger DC, Acil Y, Terheyden H (2004) Bone formation in the presence of platelet-rich plasma vs. bone morphogenetic protein-7. *Bone*, 34: 80-90.

170. Marx RE (2001) Platelet-rich plasma (PRP): what is PRP and what is not PRP? *Implant Dent*, 10: 225-228.
171. Weibrich G, Kleis WK, Hafner G, Hitzler WE (2002) Growth factor levels in platelet-rich plasma and correlations with donor age, sex, and platelet count. *J Craniomaxillofac Surg*, 30: 97-102.
172. Kardos D, Simon M, Vacz G, Hinsenkamp A, Holczer T, Cseh D, Sarkozi A, Szenthe K, Banati F, Szathmary S, Nehrer S, Kuten O, Masteling M, Lacza Z, Hornyak I (2019) The Composition of Hyperacute Serum and Platelet-Rich Plasma Is Markedly Different despite the Similar Production Method. *Int J Mol Sci*, 20: 721.
173. do Amaral RJ, da Silva NP, Haddad NF, Lopes LS, Ferreira FD, Filho RB, Cappelletti PA, de Mello W, Cordeiro-Spinetti E, Balduino A (2016) Platelet-Rich Plasma Obtained with Different Anticoagulants and Their Effect on Platelet Numbers and Mesenchymal Stromal Cells Behavior In Vitro. *Stem Cells Int*, 2016: 7414036.
174. Chahla J, Cinque ME, Piuzzi NS, Mannava S, Geeslin AG, Murray IR, Dornan GJ, Muschler GF, LaPrade RF (2017) A Call for Standardization in Platelet-Rich Plasma Preparation Protocols and Composition Reporting: A Systematic Review of the Clinical Orthopaedic Literature. *J Bone Joint Surg Am*, 99: 1769-1779.
175. Oudelaar BW, Peerbooms JC, Huis In 't Veld R, Vochteloo AJH (2019) Concentrations of Blood Components in Commercial Platelet-Rich Plasma Separation Systems: A Review of the Literature. *Am J Sports Med*, 47: 479-487.
176. Assirelli E, Filardo G, Mariani E, Kon E, Roffi A, Vaccaro F, Marcacci M, Facchini A, Pulsatelli L (2015) Effect of two different preparations of platelet-rich plasma on synoviocytes. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 23: 2690-2703.
177. Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Dragoo JL (2014) The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med*, 42: 1204-1210.
178. Dragoo JL, Braun HJ, Durham JL, Ridley BA, Odegaard JI, Luong R, Arnoczky SP (2012) Comparison of the acute inflammatory response of two commercial

- platelet-rich plasma systems in healthy rabbit tendons. *Am J Sports Med*, 40: 1274-1281.
179. McCarrel TM, Minas T, Fortier LA (2012) Optimization of leukocyte concentration in platelet-rich plasma for the treatment of tendinopathy. *J Bone Joint Surg Am*, 94: e143(141-148).
 180. Boswell SG, Schnabel LV, Mohammed HO, Sundman EA, Minas T, Fortier LA (2014) Increasing platelet concentrations in leukocyte-reduced platelet-rich plasma decrease collagen gene synthesis in tendons. *Am J Sports Med*, 42: 42-49.
 181. Blair P, Flaumenhaft R (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev*, 23: 177-189.
 182. Cavallo C, Roffi A, Grigolo B, Mariani E, Pratelli L, Merli G, Kon E, Marcacci M, Filardo G (2016) Platelet-Rich Plasma: The Choice of Activation Method Affects the Release of Bioactive Molecules. *Biomed Res Int*, 2016: 6591717.
 183. LQ Silva, SC Huber, SA Montalvão, FD Santiago Bassora, Paula E, Annichino-Bizzacchi J (2016) Platelet Activation Is Not Crucial for Platelet-Rich Plasma (PRP), When Used As Autologous Therapeutic Product, and Could be Lyophilized without Any Growth Factor Loss *Blood*, 128: 2639.
 184. Kakudo N, Morimoto N, Kushida S, Ogawa T, Kusumoto K (2014) Platelet-rich plasma releasate promotes angiogenesis in vitro and in vivo. *Med Mol Morphol*, 47: 83-89.
 185. Yang D, Nemkul N, Shereen A, Jone A, Dunn RS, Lawrence DA, Lindquist D, Kuan CY (2009) Therapeutic administration of plasminogen activator inhibitor-1 prevents hypoxic-ischemic brain injury in newborns. *J Neurosci*, 29: 8669-8674.
 186. Lapchak PH, Ioannou A, Rani P, Lieberman LA, Yoshiya K, Kannan L, Dalle Lucca JJ, Kowalska MA, Tsokos GC (2012) The role of platelet factor 4 in local and remote tissue damage in a mouse model of mesenteric ischemia/reperfusion injury. *PLoS One*, 7: e39934.
 187. Burkhart JM, Vaudel M, Gambaryan S, Radau S, Walter U, Martens L, Geiger J, Sickmann A, Zahedi RP (2012) The first comprehensive and quantitative analysis of human platelet protein composition allows the comparative analysis of structural and functional pathways. *Blood*, 120: e73-82.

188. O'Neill EE, Brock CJ, von Kriegsheim AF, Pearce AC, Dwek RA, Watson SP, Hebestreit HF (2002) Towards complete analysis of the platelet proteome. *Proteomics*, 2: 288-305.
189. Fugl A, Gasser H, Watzak G, Bucher A, Feierfeil J, Jurgens G, Watzek G, Hallstrom S, Gruber R (2014) S-nitroso albumin enhances bone formation in a rabbit calvaria model. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 43: 381-386.
190. Gallego L, Junquera L, Garcia E, Garcia V, Alvarez-Viejo M, Costilla S, Fresno MF, Meana A (2010) Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng Part A*, 16: 1179-1187.
191. Oliveira MI, Pinto ML, Goncalves RM, Martins MCL, Santos SG, Barbosa MA (2017) Adsorbed Fibrinogen stimulates TLR-4 on monocytes and induces BMP-2 expression. *Acta Biomater*, 49: 296-305.
192. Vasconcelos DM, Goncalves RM, Almeida CR, Pereira IO, Oliveira MI, Neves N, Silva AM, Ribeiro AC, Cunha C, Almeida AR, Ribeiro CC, Gil AM, Seebach E, Kynast KL, Richter W, Lamghari M, Santos SG, Barbosa MA (2016) Fibrinogen scaffolds with immunomodulatory properties promote in vivo bone regeneration. *Biomaterials*, 111: 163-178.
193. Santos SG, Lamghari M, Almeida CR, Oliveira MI, Neves N, Ribeiro AC, Barbosa JN, Barros R, Maciel J, Martins MC, Goncalves RM, Barbosa MA (2013) Adsorbed fibrinogen leads to improved bone regeneration and correlates with differences in the systemic immune response. *Acta Biomater*, 9: 7209-7217.
194. Weszl M, Skaliczki G, Cselenyak A, Kiss L, Major T, Schandl K, Bognar E, Stadler G, Peterbauer A, Csonge L, Lacza Z (2012) Freeze-dried human serum albumin improves the adherence and proliferation of mesenchymal stem cells on mineralized human bone allografts. *J Orthop Res*, 30: 489-496.
195. Horvathy DB, Vacz G, Szabo T, Szigyarto IC, Toro I, Vamos B, Hornyak I, Renner K, Klara T, Szabo BT, Dobo-Nagy C, Doros A, Lacza Z (2016) Serum albumin coating of demineralized bone matrix results in stronger new bone formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 104: 126-132.

196. El Bialy I, Jiskoot W, Reza Nejadnik M (2017) Formulation, Delivery and Stability of Bone Morphogenetic Proteins for Effective Bone Regeneration. *Pharm Res*, 34: 1152-1170.
197. Yilgor P, Sousa RA, Reis RL, Hasirci N, Hasirci V (2010) Effect of scaffold architecture and BMP-2/BMP-7 delivery on in vitro bone regeneration. *J Mater Sci Mater Med*, 21: 2999-3008.
198. Li X, Yi W, Jin A, Duan Y, Min S (2015) Effects of sequentially released BMP-2 and BMP-7 from PELA microcapsule-based scaffolds on the bone regeneration. *Am J Transl Res*, 7: 1417-1428.
199. Kim TH, Kim SH, Sandor GK, Kim YD (2014) Comparison of platelet-rich plasma (PRP), platelet-rich fibrin (PRF), and concentrated growth factor (CGF) in rabbit-skull defect healing. *Arch Oral Biol*, 59: 550-558.
200. Kuten O, Simon M, Hornyak I, De Luna-Preitschopf A, Nehrer S, Lacza Z (2018) The Effects of Hyperacute Serum on Adipogenesis and Cell Proliferation of Mesenchymal Stromal Cells. *Tissue Eng Part A*, 24: 1011-1021.
201. Jeyakumar V, Niculescu-Morzsza E, Bauer C, Lacza Z, Nehrer S (2017) Platelet-Rich Plasma Supports Proliferation and Redifferentiation of Chondrocytes during In Vitro Expansion. *Front Bioeng Biotechnol*, 5: 75.
202. Kardos D, Hornyak I, Simon M, Hinsenkamp A, Marschall B, Vardai R, Kallay-Menyhard A, Pinke B, Meszaros L, Kuten O, Nehrer S, Lacza Z (2018) Biological and Mechanical Properties of Platelet-Rich Fibrin Membranes after Thermal Manipulation and Preparation in a Single-Syringe Closed System. *Int J Mol Sci*, 19: 3433.

10. Saját publikációk jegyzéke

A PhD értekezés tárgyát képező közlemények:

1. **Vacz G**, Major B, Gaal D, Petrik L, Horvathy DB, Han W, Holczer T, Simon M, Muir JM, Hornyak I, Lacza Z (2018) Hyperacute serum has markedly better regenerative efficacy than platelet-rich plasma in a human bone oxygen-glucose deprivation model. *Regen Med*, 13: 531-543. **IF: 2,383**
2. Simon M, Major B, **Vacz G**, Kuten O, Hornyak I, Hinsenkamp A, Kardos D, Bago M, Cseh D, Sarkozi A, Horvathy D, Nehrer S, Lacza Z (2018) The Effects of Hyperacute Serum on the Elements of the Human Subchondral Bone Marrow Niche. *Stem Cells Int*, 2018: 4854619. **IF: 3,902**

Egyéb lektorált tudományos közlemények:

1. Kardos D, Simon M, **Vacz G**, Hinsenkamp A, Holczer T, Cseh D, Sarkozi A, Szenthe K, Banati F, Szathmary S, Nehrer S, Kuten O, Masteling M, Lacza Z, Hornyak I (2019) The Composition of Hyperacute Serum and Platelet-Rich Plasma Is Markedly Different despite the Similar Production Method. *Int J Mol Sci*, 20: 721. **IF: 4,556**
2. Lakatos T, Major B, Somogyi P, **Vacz G**, Simon M, Hornyak I, Lacza Z (2017) Platelet-Rich Plasma Enhanced Bone Autograft in Femoral Head Necrosis-A Case Series Report on a Six-Year Follow-Up Period. *J Osteopor Phys Act*, 5: 1-4. **IF: 0**
3. Horvathy DB, Simon M, Schwarz CM, Masteling M, **Vacz G**, Hornyak I, Lacza Z (2016) Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering. *Biofactors*, 43: 315-330. **IF: 3,038**
4. Horvathy DB, **Vacz G**, Toro I, Szabo T, May Z, Duarte M, Hornyak I, Szabo BT, Dobo-Nagy C, Doros A, Lacza Z (2015) Remineralization of demineralized bone matrix in critical size cranial defects in rats: A 6-month follow-up study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 104: 1336-1342. **IF: 3,189**

5. **Vacz G**, Cselenyak A, Cserep Z, Benko R, Kovacs E, Pankotai E, Lindenmair A, Wolbank S, Schwarz CM, Horvathy DB, Kiss L, Hornyak I, Lacza Z (2016) Effects of amniotic epithelial cell transplantation in endothelial injury. *Interv Med Appl Sci*, 8: 164-171. **IF: 0**
6. Horvathy DB, **Vacz G**, Szabo T, Szigyarto IC, Toro I, Vamos B, Hornyak I, Renner K, Klara T, Szabo BT, Dobo-Nagy C, Doros A, Lacza Z (2016) Serum albumin coating of demineralized bone matrix results in stronger new bone formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*, 104: 126-132. **IF: 3,189**
7. Ureczky D, **Vacz G**, Costa A, Kopper B, Lacza Z, Hortobagyi T, Tihanyi J (2014) The effects of short-term exercise training on peak-torque are time- and fiber-type dependent. *J Strength Cond Res*, 28: 2204-2213. **IF: 2,075**
8. Torma F, Bori Z, Koltai E, Felszeghy K, **Vacz G**, Koch L, Britton S, Boldogh I, Radak Z (2014) Eating habits modulate short term memory and epigenetical regulation of brain derived neurotrophic factor in hippocampus of low- and high running capacity rats. *Brain Res Bull*, 107: 54-60. **IF: 2,718**
9. Hornyak I, Madacsi E, Kalugyer P, **Vacz G**, Horvathy DB, Szendroi M, Han W, Lacza Z (2014) Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating. *Biomed Res Int*, 2014: 459867 **IF: 1,579**
10. Horvathy DB, **Vacz G**, Cselenyak A, Weszl M, Kiss L, Lacza Z (2013) Albumin coated bioactive suture for cell transplantation. *Surg Innov*, 20: 249-255. **IF: 1,338**
11. Horvathy DB, **Vacz G**, Szabo T, Renner K, Vajda K, Sandor B, Lacza Z (2013) Absorption and Tensility of Bioactive Sutures Prepared for Cell Transplantation. *Materials (Basel)*, 6: 544-550. **IF: 1,879**
12. Koltai E, Zhao Z, Lacza Z, Cselenyak A, **Vacz G**, Nyakas C, Boldogh I, Ichinoseki-Sekine N, Radak Z (2011) Combined Exercise and IGF-1 supplementation induces neurogenesis in old rats, but do not attenuate age-associated DNA damage. *Rejuvenation Res*, 14: 585-596. **IF: 3,826**

13. Horvathy DB, Nardai PP, Major T, Schandl K, Cselenyak A, **Vacz G**, Kiss L, Szendroi M, Lacza Z (2011) Muscle regeneration is undisturbed by repeated polytraumatic injury. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 37: 161-167. **IF: 0,328**
14. Horvath EM, Magenheim R, Kugler E, **Vacz G**, Szigethy A, Levardi F, Kollai M, Szabo C, Lacza Z (2009) Nitrate stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in healthy and gestational diabetic pregnancies. *Diabetologia*, 52: 1935-1943. **IF: 6,551**

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönetemet szeretném kifejezni témavezetőmnek, Dr. Lacza Zsombornak, aki a szakmai segítségével és türelmével nagymértékben hozzájárult a tudományos munkáim eléréséhez.

Köszönettel tartozom Dr. Horváthy Dénes Balázsnak, aki lendületes munkájával és szakmai alázatával kiváló példaképpé vált számomra.

Köszönöm Dr. Major Bálintnak, aki a Hiperakut szérum izolálási ötletét adta, és akinek segítségével sokszor sikerült továbbjutnunk egy-egy kísérleti lépésben.

Köszönetet szeretnék mondani Dr. Benyó Zoltán és Dr. Kollai Márk professzor uraknak, akik intézetvezetésük alatt lehetővé tették a PhD munkám kivitelezését.

Köszönettel tartozom a Szövetépítő munkacsoport minden jelenlegi és korábbi munkatársának a közös munkát és a baráti kapcsolatokat: Dr. Pankotai Eszter, Dr. Cselenyák Attila, Dr. Weszl Miklós, Dr. Kiss Levente, Dr. Petrik Laura, Dr. Gaál Dorottya, Dr. Horváth Eszter Mária, Dr. Benkő Rita, Dr. Orbánné Simon Melinda, Hinsenkamp Adél, Dr. Kardos Dorottya.

Köszönetemet szeretném kifejezni Trencsényiné Dr. Balázs Bernadett Évának, aki mind szakmailag mind barátilag sokat segített a munkám során.

Köszönettel tartozom a Transzlációs Medicina Intézet minden korábbi és jelenlegi munkatársainak, akikkel nemcsak munka, hanem baráti kapcsolatot is sikerült kialakítani.

Köszönetet szeretnék mondani a Doktori Iskola munkatársainak.

Köszönetemet szeretném kifejezni szeretett Férjemnek, Katics Dánielnek, aki nyugodtságával és állandó optimizmusával mindig átsegített a nehezebb időszakokban. Köszönöm gyermekeimnek, Emmának, Hédinek és Áronnak, akik vállalták a többi családtag szeretetteljes társaságát, amíg a disszertáció elkészült. Köszönöm Szüleimnek a segítséget, akik mindig buzdítottak a tanulásra és a folyamatos fejlődésre. Köszönöm Nővéremnek, Erikának, Nagymamámnak, férjem szüleinek és minden Családtagnak a támogató szavakat és idejüket.

