

# Vérkészítmények sejtregenerációra kifejtett hatásának vizsgálata humán csontszöveti iszkémiában

**Doktori értekezés**

**Vác Gabriella**

Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola  
Semmelweis Egyetem



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

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

Dr. Molnár Szabolcs, Ph.D., főorvos

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Andréka Péter, Ph.D., főigazgató főorvos

Dr. Zsembery Ákos, Ph.D., egyetemi docens

Budapest  
2021

## 1. Bevezetés

A csont egy mineralizált kötőszövet, amely fontos szerepet játszik a szervezetben a lágyszövetek védelmében, a mozgásban és a csontvelő tárolásában. A csont egyike azon néhány szövetnek, mely egy-egy sérülést követően képes lehet akár a teljes regenerációra. Bizonyos esetekben azonban, ha a vérellátás nem kielégítő, keringési elégtelenség, majd következményes iszkémia jelentkezik, és a regeneráció elmarad. Ennek egyik ismert állapota az aszeptikus combfejnekrozis, amelynek kezelésében a műtéti eljárások, mint a combfej felfúrása vagy a csípőprotézis beültetése fontos szerepet játszanak.

A regeneratív medicinában és az ortopédiai betegségek kezelésében egyre nagyobb teret kapnak a trombocitában gazdag vérkészítmények, amelyeket elsősorban a bennük megtalálható növekedési faktorok miatt alkalmaznak. A trombocitában gazdag plazma (PRP) és a trombocitában gazdag fibrin (PRF) többek között a sejtekre gyakorolt proliferációs képességük miatt segítik elő a jó keringésű szövetek regenerációját. Kimondottan rossz keringésű szöveti betegségek gyógyítására vonatkozóan kevés adat áll rendelkezésünkre, a

vérkészítmények pontos szerepe pedig ezekben a tanulmányokban nem, vagy alig ismeretes.

## 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. Következő lépésként a **vérkészítmények összetételét** kívántuk meghatározni, ezért a fehérje- és sejttartalom meghatározása mellett a vérkészítmények növekedési faktor tartalma is mérésre került.

4. Végül kíváncsiak voltunk arra, vajon a **csontexplantátumokra** milyen hatással bír a HAS (Hiperakut szérum) vérkészítmény **iszkémiás körülmény nélkül**.

### **3. Módszerek**

#### **3.1. PRP izolálása és kezelése**

A PRP vérkészítmény izolálásához 6 ml-es, véralvadásgátlót, ún. EDTA-t (Etilén-diamin-tetraecetsav) tartalmazó vérvételi csöveket használtunk és kettős centrifugálást alkalmaztunk: Szobahőmérsékleten először 320 g fordulatszámon 12 percen keresztül centrifugáltunk. Ekkor a centrifugálás után kapott felülúszót átpipettáztuk egy centrifugacsőbe és 1710 g fordulatszámon további 10 percig ismét centrifugáltunk. Ekkor eltávolítottuk a felülúszó 2/3-adát és a maradék 1/3-ad réteget jól felszuszpendálva jutottunk a PRP-hez, melyet a továbbiakban natív PRP-nek hívunk. Kísérleteinkben ezen kívül 1 kU Cleaxane-nal heparinizált PRP-t, különböző koncentrációjú PRP-t és  $\text{CaCl}_2$ -dal és/vagy trombinnal vagy fagyasztással/olvasztással aktivált PRP-t is használtunk.

#### **3.2. HAS izolálása**

A Hiperakut szérum (HAS) kinyerése a PRF izolálásával kezdődik. Natív, 6 ml-es vérvételi csőbe vénás vért veszünk, majd 1710 g fordulatszámon 5 perc centrifugálás után a kivált PRF csomót egy csipesz

segítségével kiemeljük. A PRF csomó tartalmát ezután óvatosan kipréseljük és a préselt savó jelenti a HAS vérkészítményt.

### **3.3. Csontexplantátumok**

A szöveti iszkémia modellezéséhez szükséges csontokat oszteoarthritisben, primer coxarthrózisban szenvedő betegek protézisbeültetése során nyertük. A műtét közben eltávolított combcsontfej közepéből, a femurfej belső részéből műtéti körülmények között sebészi véső segítségével 40 db, nagyjából 7 mg tömegű csontot metszettünk ki betegenként. Az explantátumokat ezután 37 °C-on és 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett ún. tenyésztő médiumban (1 g/l glükóz tartalmú Dulbecco's Modified Eagle Medium, 1% penicillin-sztreptomycin és 10% magzati szarvasmarha-szérum) tárolva 3 napon keresztül inkubáltunk.

### **3.4. Iszkémiás állapot létrehozása oxigén-glükóz depriváció segítségével**

Az operációtól számított 3. napon a csontszöveti iszkémiát oxigén és glükóz együttes megvonásával, ún. oxigén-glükóz deprivációval (OGD) modelleztük a

ZEISS LSM mikroszkóp Pecon inkubációs, zárt rendszerével, ahol N<sub>2</sub> gáz segítségével 0,5% alá süllyesztettük az O<sub>2</sub> szintet. Pontos adat nem állt rendelkezésünkre az iszkémia idejére vonatkozóan, ezért több időtartamot is kipróbáltunk: **1, 2,5, 3,5, 4, 5 és 7** órán keresztül tartottuk fent az iszkémiás állapotot.

### **3.5. Csontexplantátumok kezelése PRP-vel, HAS-sal és rekombináns növekedési faktorokkal**

A natív, a heparinizált és a heparinizált-aktivált PRP vérkészítményeket a korábban leírt tenyésztő médiumhoz 1:4 arányban adtuk az OGD-t követően az operációtól (OP) számított 9. napig. Egy kísérletsorozatban pedig a PRP-t 1:8 illetve 1:2 arányban juttattuk a tenyésztő médiumhoz. Mérés az OP 6. és 9. napján történt.

A HAS vérkészítményt különböző időpontokban adtuk a csontexplantátumokhoz, mely 3 mérési csoportot eredményezett: az első csoport csupán az OGD ideje alatt részesült HAS kezelésben, a másik csoport már az operáció napjától egészen a 9. napig, a 3. pedig csak az OGD után kapott HAS vérkészítményt az OP 9. napjáig. Mérés az OGD után rögtön, illetve az OP 6. és 9. napján történt.

Az explantátumokon lévő sejteket nemcsak vérkészítményekkel teszteltük, hanem csontosodást elősegítő növekedési faktorokkal is. Ezek a csoportok OGD-t követően 5, 50 és 500 ng/ml koncentrációjú BMP-2, BMP-7 vagy PDGF rekombináns növekedési faktoral lettek kezelve, illetve 10, 100 és 1000 ng/ml dózisé PF-4 növekedési faktoral. Ebben a mérési sorozatban az OP 9. napján mértük a sejtek életképességét. Minden esetben 3 naponta cseréltük az inkubáló oldatokat médiummal és növekedési faktoral/frissen izolált vérkészítménnyel.

A csontexplantátumokon lévő sejtek életképességét kvalitatív módon az élő sejteket jelölő calcein-AM (excitáció/emisszió: 494/517 nm, zöld, koncentráció: 1:2000, 37°C, 5 perc) és a halott sejteket jelölő ethidium homodimer (excitáció/emisszió: 528/617 nm, vörös, koncentráció: 1:500, 37°C, 5 perc) sejtfestékek segítségével elemeztük ZEISS LSM konfokális, fluoreszcens mikroszkóp felhasználásával. A metil-tiazol-tetrazólium (MTT) sejtproliferációs esszé a kvantitatív meghatározást tett lehetővé: a csontmintákat 1 órán keresztül MTT oldatban (0,5mg/ml) inkubáltuk 37 °C-on 5% CO<sub>2</sub> tartalom mellett, majd az 1 órás izopropanolos oldást követően spektrofotométer felhasználásával mértük

az oldat denzitását. A kapott érték (mértékegysége: Arbitrary Unit: AU) arányos a metabolikusan aktív sejtek számával, amelyet ezután az explantátumok száraz tömegével korrigáltunk.

### **3.6.Vérkészítmények összetételének meghatározása**

A vérkészítmények növekedési faktor tartalmát az ún. Proteome Profiler Humán Angiogenezis Kit segítségével határoztuk meg, mely lehetővé tette 55 különböző, humán angiogenezishez kapcsolódó fehérje expressziójának egyidejű kimutatását. A vérkészítmények fehérje- és sejt tartalmát Beckman Coulter AU5800 automatával és Sysmex XT 400i készülékkel mértük le.

### **3.7. HAS hatása OGD-n át nem esett csontexplantátumokra**

A csontexplantátumokat 10% (v/v) HAS-t vagy 10% (v/v) FCS oldatot tartalmazó médiummal kezeltünk 5 napon keresztül, majd Hematoxilin-eozinnal, Von Kossával és Masson trichrommal festettünk. A kontroll csoport az operáció napján FCS oldatban fixált, kezeletlen csontmintákat jelentette. A festések kiértékelése Nikon Eclipse 80i fénymikroszkóppal



történt. Az elemzés a csontban található mineralizált szövet, az oszteoid szövet és az oszteoblasztok jelenlétére összpontosított.

## **4. Eredmények**

### **4.1. Az oxigén-glükóz depriváció csökkenti a csontexplantátumokon lévő sejtek életképességét**

A különböző iszkémiás időtartamokat tesztelve azt tapasztaltuk, hogy a 7 órás OGD idő okoz egyértelmű károsodást a kontroll, OGD-n át nem esett csoporthoz képest, mely különbség a sejtek életképességét vizsgálva szignifikáns mértéket mutatott (*Kontroll csoport*:  $129,80 \pm 7,98$  AU (n=48), *OGD csoport*:  $40,67 \pm 1,89$  AU (n=48),  $p < 0,0001$ , t-teszt).

### **4.2. A PRP vérkészítmény nem képes megvédeni a sejteket az OGD hatásától.**

Sem a natív, sem a heparinizált PRP hozzáadása nem tudta megállítani a csontmintákon lévő sejtek életképességének csökkenését, vagy helyreállítani a proliferációs kapacitást (n=18/csoport). Hasonló eredményt kaptunk a heparinizált-különböző módon aktivált PRP esetében is (n=12/csoport). A

legkoncentráltabb PRP adása sem növelte a posztisztkémián átesett sejtek számát (n=6/csoport). A statisztikák során egyutas ANOVA-t, Tukey-féle poszt hoc tesztet használtunk.

#### **4.3. A HAS vérkészítmény növeli a sejtek proliferációját OGD-t követően.**

A HAS hozzáadása helyreállította a csontsejtek proliferációs képességét az OGD után. A sejtek életképessége szignifikánsan magasabb volt a HAS-sal kezelt csoportban, mint a kezeletlen OGD csoportban az OP-től számított 9. napon (n=30/csoport;  $p < 0,0001$ ). Ez a proliferációs hatás még jelentősebb, ha a HAS vérkészítményt már az operáció napjától adtuk a csontmintákhoz. Ebben az esetben már az OP 6. napján szignifikáns különbség mutatkozott a kezeletlen, OGD-n átesett és a HAS-sal kezelt csontminták között (n=24/csoport,  $p < 0,01$ ), mely különbség fokozódott az OP 9. napjára ( $p < 0,0001$ ) (Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt). Ha azonban közvetlenül az OGD után mértük a HAS hatását, nem volt szignifikáns növekedés az életképes sejtek számában (OGD csoport vs. HAS csoport, n=24, t- teszt). A HAS elsődleges hatása tehát a

posztisztkémiás proliferáció helyreállítása, nem pedig az OGD okozta akut károsodás elleni védelem.

#### **4.4. A vérkészítmények sejt- és fehérjetartalma**

Az azonos donorokból kinyert HAS és PRP vérkészítmények hasonló adatokat mutatnak teljes fehérje, albumin és IgG koncentráció tekintetében, a HAS azonban hemoglobint, fibrinogént, vörös-és fehérvérsejteket nem tartalmaz. Míg a PRP magas trombocitaértéket mutatott ( $2354,50 \pm 90,50$  G/l, n=2), addig a HAS vérkészítményben alig fordult elő trombocita ( $1,33 \pm 0,33$  G/l, n=3).

#### **4.5. Növekedési faktor tartalom**

A Proteome Profiler angiogenezis esszében szereplő 55 analit mindegyike jelen van a PRP és HAS vérkészítményekben, de szignifikánsan eltérő képet mutat 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 ( $p < 0,0001$ ) és a VEGF ( $p < 0,0001$ ) a PRP-ben mutatható ki nagyobb mennyiségben, míg a PF-4 ( $p < 0,0001$ ), a Serpin E1 ( $p < 0,0001$ ) és a TIMP-1 ( $p < 0,0001$ ) a HAS-ban (Kétutas ANOVA, Bonferroni teszt).

#### **4.6. Rekombináns növekedési faktorok regeneráló tulajdonságai**

Csontosodást elősegítő rekombináns növekedési faktorok hatását is vizsgáltuk arra vonatkozóan, vajon képesek-e az OGD-n átesett sejtek életképességén javítani. A BMP-2 ( $p < 0,01$ ), a PDGF ( $p < 0,0001$ ) és a PF-4 ( $p < 0,05$ ) legnagyobb koncentrációban történő felhasználása, valamint a HAS vérkészítmény ( $p < 0,01$ ) adása szignifikánsan nagyobb életképességet eredményezett az OGD-n átesett, kezeletlen csoporthoz képest (a BMP-7 tendeciózus különbséget mutatott). A HAS vérkészítmény hatását összehasonlítva a növekedési faktorok hatásaival nem találtunk a csoportok között szignifikáns különbséget, tehát hasonló mértékben hat a HAS vérkészítmény az iszkémián átesett sejtekre, mint az irodalomban már bizonyítottan csontregenerálódást elősegítő növekedési faktorok (Egyutas ANOVA, Tukey-féle poszt hoc teszt).

#### **4.7. Hisztológia eredménye**

Azok a csontexplantátumok, amelyek 5 napon keresztül HAS vérkészítményt is tartalmazó tápközegben

inkubálódtak, jobban megőrizték csontintegritásukat, egységesebb szöveti képet mutattak, mint a kontroll és az FCS-sel kiegészített tápközegben tartott csontminták.

## **5. Következtetések**

1. Eredményeink azt mutatják, hogy a combfejnekrózis rossz keringésű környezetét 7 órás oxigén-glükóz megvonással (OGD) lehetséges modellezni. 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 kezelést natív, heparinizált, heparinizált-aktivált és heparinizált-különböző koncentrációban 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 a sejtek életképességét iszkémia után. Elegendő közvetlenül az iszkémiás periódust követően adnunk a HAS vérkészítményt, ugyanis már ekkor is mérhető annak pozitív hatása. Ha már az operáció napján HAS kezelésben

részesítjük az explantátumokat, az iszkémián átesett sejtekre gyakorolt kedvező hatása csak fokozottabb lesz.

c. 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 mutat a kezeletlen, OGD-n át nem esett csoporthoz képest (BMP-7 esetében tendenciózus emelkedés). A HAS kezelést összehasonlítva a többi növekedési faktoral nem találtunk szignifikáns eltérést, ezért a HAS hasonló mértékű hatást fejt ki az iszkémián átesett sejtekre, mint a csontosodást elősegítő növekedési faktorok.

3. A vérkészítmények összetételében kerestük a választ, amely a posztiszkémiás sejtekre gyakorolt hatásukat magyarázhatja.

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, TIMP-1 és a Thrombospondin-1 szignifikánsan magasabb értéket mutatott a HAS-ban.

b. A vérkészítmények sejt- és fehérjetartalmát vizsgálva láttuk, hogy a HAS-ban nincs jelen sem hemoglobin, sem fibrinogén, továbbá lényegesen kevesebb trombocita található benne, 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 megőrzi a csontexplantátumok szöveti épségét.

Következtetésként elmondhatjuk, hogy a PRP a magas növekedési faktortartalom 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, hanem az eltérő növekedési faktortartalomban keresendő.

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

## **6. Saját publikációk jegyzéke**

A disszertáció alapjául szolgáló közlemények listája:

**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**

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:

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**

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**

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**

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**

**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**

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**

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**

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**

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**

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**

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**

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**

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**

Horvath EM, Magenheim R, Kugler E, **Vacz G**, Szigethy A, Levardi F, Kollai M, Szabo C, Lacza Z (2009) Nitritative stress and poly(ADP-ribose) polymerase activation in healthy and gestational diabetic pregnancies. *Diabetologia*, 52: 1935-1943. **IF: 6,551**