

# Fagyasztva szárított humán szérum albumin csont allograftok biokompatibilitására gyakorolt hatásának vizsgálata

Doktori tézisek

**Weszl Miklós**

Semmelweis Egyetem  
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Dr. Lacza Zsombor, DSc, tudományos főmunkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Dr. Piffkó József, PhD, egyetemi tanár  
Dr. Glasz Tibor, PhD, egyetemi docens

Komplex szigorlati bizottság elnöke: Dr. Antal István, PhD, egyetemi docens  
Komplex szigorlati bizottság tagjai: Dr. Benyó Zoltán, DSc, egyetemi tanár  
Dr. Madarász Emília, professzor emerita  
Dr. Szökő Éva, DSc, egyetemi tanár

Budapest  
2017

## 1. Bevezetés

Az ortopédiai szegmentális csonthiányok pótlása nagy kihívást jelent olyan esetekben, amikor a csont saját regenerációs képessége csökkent. Ilyenkor gyakran tapasztalható, hogy a csontgraftok nem, vagy csak részben épülnek be és ún. *nonunion* alakul ki, ami miatt sokszor bizonytalan a rekonstrukciós beavatkozások kimenetele. A jelenleg legjobbnak tartott csontgraft a saját csont transzplant, ami immunológiailag azonos a befogadó szövettel, így beépülése valószínűbb az idegen eredetű csontpótlókhöz képest. Az előnyös tulajdonságok ellenére a saját csont széleskörű klinikai alkalmazásának gátat szab annak korlátozott elérhetősége, ami miatt gyakran donor csont (allograft) alkalmazása válik indokolttá. Az allograftok előkészítésének egyik módja a kémiai sterilizálást és antigén-mentesítést követő fagyaszttva szárítás (liofilizálás), ami biztosítja az allograftok hosszú távú eltarthatóságát. Azonban a kémiai kezelés hatására a liofilizált allograftok veszítenek biokompatibilitásukból, vagyis kevésbé képesek megtapadni a felületükön a csontképződésben fontos szerepet játszó sejttípusok (mesenchimális őssejtek), ami végső soron csökkenti a beépülésük esélyét a csonthiány helyére.

## 2. Célkitűzések

A jelen doktori munka fő célkitűzése kémiaileg sterilizált, antigén-mentesített fagyaszttva szárított humán csont allograftok *in vitro* és *in vivo* biokompatibilitásának vizsgálata és fejlesztése volt.

Specifikus kérdések:

**2.1.** A kémiai kezelés hátrányosan befolyásolja-e a liofilizált humán csont allograftok *in vivo* biokompatibilitását?

**2.2.** Milyen bevonóanyag és módszer lenne alkalmas a kémiailag sterilizált, antigén-mentesített liofilizált humán csont allograftok biológiai értékének javítására?

**2.3.** Hogyan befolyásolja a bevonat a liofilizált humán csont allograftok *in vitro* és *in vivo* biokompatibilitását?

### **3. Anyagok és módszerek**

#### **3.1 Kémiailag sterilizált, antigén-mentesített liofilizált humán csont allograftok *in vivo* biokompatibilitásának vizsgálata**

Az állatkísérletek etikai bizottság jóváhagyásával lettek megvalósítva. Hím, felnőtt, 500–600g súlyú Wistar patkányok (Toxi-Coop, Hungary) altatása 1.5 L/min oxigén, 200cm<sup>3</sup>/min halotán (Sigma Aldrich, St Louis, MO) elegyével történt. A patkányok farkát teljes hosszában braunollal (Braun Medical, Bethlehem PA) háromszor mostuk, majd a faroktövet elkötöttük vérzéscsillapítás céljából. A farok sebészeti eltávolítását követően a C4-C5 kaudális csigolyában kavitális csonthiányt hoztunk létre egy 2mm átmérőjű és 3.5mm behatolóképeségű egyedi kialakítású fűrő segítségével. A spontán csontgyógyulás megakadályozása céljából egy orvosi acél távtartó szeg került elhelyezésre a defektusban. A seb zárása után az állatok visszakerültek a helyükre, majd 12 hét után a távtartó szegeket eltávolítottuk egy következő műtétben. A keletkezett kavitális csontdefektusokat feltöltöttük vagy i) csontcementtel (PMMA, Heraeus Palacos R; n=5), vagy ii) injektálható kalcium-foszfát cementtel (pCPC; n=5), vagy iii) stroncium tartalmú kalcium-foszfát kompozittal (SrCPS; n=5), vagy iv) impaktált, kémiailag sterilizált, antigén-mentesített liofilizált

humán csonttal (Nyugat-magyarországi Regionális Szövetbank; n=5), vagy v) üresen hagytuk (n=7), majd a seb zárásra került. Ekkor egy újabb csoporttal bővült a kísérlet, amely csoport állataiban az előbbieken leírt módon létrehozott kavitális csontdefektust távtartó és csontpótló alkalmazása nélkül bezártuk és gyógyulni hagytuk (pozitív kontrol; n=5). Az állatokat 12 hét után feláldoztuk, majd az operált és a közvetlen mellette lévő csigolyát eltávolítottuk. Az eltávolított csigolyákat 4%-os formaldehydben fixáltuk, majd  $\mu$ CT (Skyscan 1172 X-ray microtomography Skyscan, Kontich, Belgium) és szövettani vizsgálatokban értékeltük.

A  $\mu$ CT felvételek 60 kV feszültség és Al-szűrő alkalmazásával készültek. A  $\mu$ CT felvételek rekonstrukciója 180°-os forgatással (fél fokos léptetéssel), Feldkamp módosított algoritmussal történt Skyscan Nrecon szoftver segítségével. A  $\mu$ CT felvételek 3-dimenziós megjelenítése SkyScan CTvox (Kontich, Belgium) szoftverrel történt.

A fixált csigolyák dekalcinálása Biodec-R oldatban 1 hetes inkubálással történt. Paraffinos beágyazás után a mintákból 5 mikronos hosszanti metszetek készültek, majd tárgylemezen hematoxilin-eozin (Merck & Co) festést kaptak.

### **3.2 *In vitro* biokompatibilitási és fizikai vizsgálatok**

Három típusú csontgraftból, azaz kémiaiilag sterilizált, antigén-mentesített liofilizált humán csontgraft blokkból (Nyugat-magyarországi Regionális Szövetbank), liofilizált szarvasmarha csont blokkból (BioOss, Geistlich Pharma AG) és szintetikus hidroxipatit blokkból (META BIOMED) három kísérleti csoport került kialakításra, úgymint kontroll, teszt A és teszt B csoportok (1. Táblázat).

Kémiaiilag sterilizált, antigén-mentesített fagyasztva szárított allograftok előállítás: kadáver csontok 4 órás metanolos denaturálása után 24 órás kémiai emésztése történt 0.1M foszfát-puffer, 10mM nátrium-azid és 10mM jód-ecetsav oldatában. Ezt követően a csontok részleges dekalcinálása történt 0.6M sósav oldatban 4-6 órán át. Az így előállított csontok etilén-oxid sterilizálása következett 27°C-on, majd azok aszeptikus fagyasztva szárítása (1. szárítás: 32°C, 2Pa, 12 óra; 2. szárítás: 32°C, 0Pa, 12 óra).

A Teszt A és Teszt B kísérleti csoportokat további alcsoportokra bontottuk a bevonásukra alkalmazott módszer szerint, úgymint vizes és fagyasztva szárításos bevonás. A bevonóanyagok a) humán szérum albumin (200g/1000ml, BIOTEST), vagy b) humán szérum eredetű fibronektin (20µg/ml, Sigma Aldrich), vagy c) 1,5%-os sertés kollagén I oldatok (Biom' up) voltak. Az albumin oldatot 1:2 arányban hígítottuk foszfáttal pufferolt sóoldattal. A kontroll csoportot bevonat nélküli csontgraftok alkották. A Teszt A csoportban a csontgraftok vagy albumin, vagy fibronektin, illetve kollagén vizes oldatában + 4°C-on inkubálódtak egy éjszakán át. Az inkubációs idő eltelté után a csontgraftokat eltávolítottuk a fehérjék oldatából, majd sejt kultúra edényekbe helyezve azonnal mezenchímális őssejteket (MSC) oltottunk a felületükre. A Teszt B csoportban a csontgraftokat az előbb leírt fehérjék vizes oldatában történt inkubáció eltelté után fagyasztva szárítottuk 32°C-on, 1 Pa nyomáson 24 órán keresztül. Ezt követően a csontgraftokat sejt kultúra edényekbe helyeztük és azonnal MSC-ket oltottunk a felületükre.

A sejtes vizsgálatokhoz készült Teszt A és Teszt B csoportokból mintákat vettünk mechanikai és optikai vizsgálatok céljából. A csontgraftok mechanikai vizsgálatára Vickers mikrokeménységmérési eljárást

alkalmaztunk, míg a graftok strukturális vizsgálatát pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM) (Philips XL 30) végeztük.

A Vickers keménységméréshez egy 136°-os lapszögű négyzet alapú gyémántgúla szűrőszerszámot alkalmaztunk. A minták sima felületein 50g terhelőerővel 5 másodperces terhelési idővel végeztük a méréseket. Minden mintán legalább 5 mérést végeztünk. A szűrőszerszám által létrehozott lenyomat síkvetületének átlóit lemértük és átlagoltuk. A Vickers keménység értékének meghatározása a következő számítás alapján történt: a terhelőerő (F) Newtonban kifejezve osztva a lenyomat síkvetületének mm<sup>2</sup>-ben kifejezett területével (A), amely hányadost egy konstanssal szoroztunk (C=0,102).

Az elektronmikroszkópos vizsgálatokhoz a minták elektromosan vezető aranyréteggel lettek bevonva vákuumporlasztásos módszerrel. A mérések vákuumban történtek. A felvételek szekunder elektron üzemmódban (SE) készültek 15kV gyorsítófeszültséggel. A minták teljes felülete átvizsgálásra került és reprezentatív felvételek készültek 50x, 200x and 1000x nagyítással.

**1. Táblázat. *In vitro* kísérleti csoportok.** A Teszt A csoportban a csontgraftok humán szérumban albumin (A), vagy fibronectin (B), illetve sertés kollagén I (C) vizes oldatában inkubálva készültek. A Teszt B csoportban a csontgraftokat a fehérjék oldatában történt inkubáció után fagyaszttva szárítottuk ( $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ).

	<b>Allograft</b>	<b>BioOss</b>	<b>Hidroxiapatit</b>
Kontroll	Nem bevont	Nem bevont	Nem bevont
Teszt A	<b>A)</b> Vizes albumin <b>B)</b> Vizes fibronectin <b>C)</b> Vizes kollagén	<b>A)</b> Vizes albumin <b>B)</b> Vizes fibronectin <b>C)</b> Vizes kollagén	<b>A)</b> Vizes albumin <b>B)</b> Vizes fibronectin <b>C)</b> Vizes kollagén
Teszt B	<b><math>\alpha</math></b> ) Liofilizált albumin <b><math>\beta</math></b> ) Liofilizált fibronectin <b><math>\gamma</math></b> ) Liofilizált kollagén	<b><math>\alpha</math></b> ) Liofilizált albumin <b><math>\beta</math></b> ) Liofilizált fibronectin <b><math>\gamma</math></b> ) Liofilizált kollagén	<b><math>\alpha</math></b> ) Liofilizált albumin <b><math>\beta</math></b> ) Liofilizált fibronectin <b><math>\gamma</math></b> ) Liofilizált kollagén

Mezenchímális őssejtek izolálása: Fiatal (2-20 éves) donorokból rutinszerű ortopédiai beavatkozások során kinyert csontvelő mintákat használtunk fel a betegek, illetve szüleik hozzájárulásával és az etikai bizottság engedélyével. Csak olyan szöveteket használtunk fel a kísérletekhez, amik egyébként kidobásra kerültek volna. Az izolált csontvelőt T75-ös sejtenyésztő flaskszába helyeztük és sejtenyésztő oldattal (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) egészítettük ki, ami az alapoldaton kívül 10% borjúsavót, 100 U/ml penicillint, 10 µg/ml streptomycint, 2mM L-glutamint és 1g/l glükózt tartalmazott. A flaskszát 3 napig inkubáltuk 37°C-on vízgőzzel telített és 5% CO<sub>2</sub>-ot tartalmazó légkörben. Az inkubációs idő eltelté után a csontvelő eredetű mezenchímális őssejtek (BMSC) a sejtenyésztő flaska aljához tapadtak. A csontvelő maradék komponenseit foszfát-puffer oldattal kimosztuk. A kísérletekhez 1 és 5 passzázs közötti BMSC-eket használtunk fel. A BMSC-eket Vybrant DiD fluoreszcens membránfestékkel jelöltük (excitáció/emisszió: 644/665 nm, Molecular Probes, Invitrogen, USA) monolayerben 30 percig 37°C-on inkubálva.

Fogpulpa eredetű mezenchímális őssejtek (DPSCs) izolálása Gronthos és *mtsai*. által kidolgozott a munkacsoportunk által részben módosított eljárással történt. Fiatal felnőttekből (18–26 éves) eltávolított impaktált harmadik molárisokat használtunk donorként. A fogakat steril fúróval bevágtuk a zománc-cement határ mentén, hogy feltárjuk a pulpakamrát. A pulpa szövetet eltávolítottuk a koronából, majd a gyökereket emésztettük kollagenáz I (3 mg/ml) és diszpáz (4 mg/ml) enzimek oldatában 37°C-on 1 órán át. A kapott sejtuszupenziót 70 µm pórusméretű szűrőn áteresztettük, majd a sejteket 6-lyukú plate-be tettük és sejtenyésztő tápoldattal egészítettük ki (α-MEM), ami 20% borjúsavót, 100 µM L-aszcorbinsav-2-

foszfátot, 100 U/ml penicillin, 100 µg/ml streptomycint és 2mM L-glutamint tartalmazott. A DPSC-k nem vették fel a Vybrant DiD fluoreszcens membránfestéket ellentétben a BMSC-kkel, ezért nem tudunk azonos jelölést alkalmazni a két sejttípusnál. A DPSC-k proliferációját UV-VIS spektrofotométerrel (BIOTEK Powerwave XS) követtük nyomon AlamarBlue jelölést alkalmazva (Biosource, Invitrogen, USA).

A sejtek karakterizálása áramlási citometriával (BD<sup>®</sup> FacsCalibur, Becton Dickinson, NJ, USA) hematopoetikus (CD34, CD45) és mezenchímális sejtfelszíni markerek (CD73, CD90, CD105 és CD166) vizsgálatával alapján történt.

A csontgraftok felületére két módszerrel vittük fel az MSC-eket, úgymint A) normál sejtenyésztési körülmények között; és B) dinamikus sejtenyésztési körülmények között:

A) Az MSC-eket tripszines emésztést követően szuszpendáltuk a sejtenyésztő tápoldatban, majd automata pipettával 100.000 sejt/graft adagoltuk a csontgraftok felületére. Ezt követően a sejteket növesztettük a csontgraftok felületén normál sejtenyésztési körülmények között 18 napig. A sejtek proliferációját a 3. és 18. napokon vizsgáltuk.

B) Első lépésben 100.000 sejtet vittünk fel a csontgraftok felületére az előbb leírt módon és 24 órán keresztül növesztettük őket normál sejtenyésztési körülmények között. Ezt követően a csontgraftokat forgó bioreaktor csövekbe helyeztük és 25ml térfogatban 1,5 millió szuszpendált MSC-t tartalmazó sejtenyésztő tápoldattal egészítettük ki, majd 24 órán keresztül inkubáltuk együtt a csontgraftokat és az MSC-eket a bioreaktorban. Az inkubációs idő eltelte után a csontgraftok sejtenyésztő edényekbe kerültek és 18 napig növesztettük rajtuk a sejteket normál sejtenyésztési körülmények között. A sejtek proliferációját a 3. és 18. napokon vizsgáltuk.



A fluoreszcens membránfestékekkel jelölt BMSC-ket konfokális mikroszkóppal (LSM 510 META, Zeiss) vizsgáltuk a csontgraftokon. A mérések során három egymással át nem lapoló látóteret választottunk ki véletlenszerűen, ahol a BMSC-k fluoreszcens jeléhez tartozó pixelek mennyiségét mértük a felvételeken.

A DPSC-k sejtenyészítő tápoldatát 10 w/w% AlamarBlue festéket tartalmazó, a többi komponensét tekintve az eredetivel azonos összetételű tápoldattal egészítettük ki. A csontgraftokat 4 órán keresztül inkubáltuk normál sejtenyészítési körülmények között, majd 200  $\mu$ l mintát vettük a sejtenyészítő tápoldatból, majd 96-lyukú plate-n mértük a minta abszorbanciáját 570 nm és 600 nm hullámhosszokon.

A Teszt A és Teszt B csoportokat hosszszetszeti kísérleti elrendezésben vizsgáltuk, ahol a közös expozíció az MSC-k ráoltása volt a csontgraftok felületére, amelyek proliferációját (az expozíció eredménye) két időpontban mértük a 3. és 18. napokon (1. Táblázat). Az expozíció lehetséges eredményeit előre meghatározott verifikációs kritériumok alapján osztályoztuk, amely egyben az alapját képezte a csontgraftok *in vitro* teljesítőképesség értékelésének (2. Táblázat). Csak azokat a csontgraftokat vizsgáltuk tovább *in vivo* állatmodellben, amelyek elősegítették az MSC-k proliferációját az *in vitro* kísérletekben.

Ismételt méréses egyszempontos ANOVA (Tukey post-hoc teszt) analízist végeztünk az MSC-k mennyiségének összehasonlítására a csontgraftokon ( $p < 0.05$  értéknél tekintettük a különbséget szignifikánsnak).

**2. Táblázat. Bevonatos csontgraftok *in vitro* teljesítőképességének verifikációs kritériumai.** Azok a csontgraftok kizárásra kerültek a további vizsgálatokból, amelyek nem segítettek elő az sejtek megtapadását, vagy azok proliferációját összehasonlítva a nem bevonatos kontroll csontgraftokkal.

	<b>Kontroll</b>	<b>Csökkenés</b>	<b>Stagnálás</b>	<b>Növekedés</b>
Kitapadás	Megtapadt sejtek mennyisége nem bevonatos graftokon	Kitapadt sejtek mennyiségének csökkenése a kontrollhoz képest <b>Kizárás</b>	Nem változik a kitapadt sejtek mennyisége a kontrollhoz képest <b>Kizárás</b>	Kitapadt sejtek mennyiségének növekedése a kontrollhoz képest <b>Megtartás</b>
Proliferáció	Sejt-proliferáció nem bevonatos graftokon	Kitapadt sejtek proliferációja csökken a kontrollhoz képest <b>Kizárás</b>	Nem változik a kitapadt sejtek proliferációja a kontrollhoz képest <b>Kizárás</b>	Kitapadt sejtek proliferációja növekszik a kontrollhoz képest <b>Megtartás</b>

### 3.3. Bevonatos csontgraftok *in vivo* biokompatibilitás vizsgálata

A műtéti beavatkozások az etikai bizottság engedélyével történtek. A bevonatos csontgraftok *in vivo* biokompatibilitásának vizsgálata egy patkány combcsontban létrehozott szegmentális csontdefektus modellben történt, amelyben a saját csont regenerációs képessége csökkent volt (nonunion modell). Felnőtt hím 496–692g súlyú Wistar patkányok (n=39) altatása halotán, N<sub>2</sub>O és O<sub>2</sub> elegyével történt. A combról a szárt leborotváltuk, majd a műtéti területet felületi fertőtlenítőkkel előkészítettük. A bőrön és a subcutan szöveteken átjutva a fasciát hosszában behasítottuk, majd a tensor fasciae latae és a vastus lateralis izmok leválasztottuk a femurról, így rájutottunk a csontra. A combcsontot a csipőtől a térdig tártuk fel úgy, hogy a periosteum ne sérüljön. Ezután egy 5 lyukú minilemezt (Sanatmetal, Eger) rögzítettünk a csontra 4 darab 1.5 mm vastag és 8 mm hosszú csavarral (Sanatmetal, Eger) úgy, hogy a lemez középső lyukát szabadon hagytuk, csavar csak a két proximalis és két distalis lyukba került.

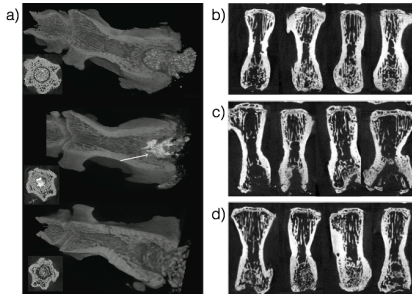
A rögzítés után oszcillációs fűrésszel (Electric Pen Drive, Synthes GmbH, Oberdorf, Svájc) eltávolítottunk egy 2mm vastag osteoperiostealis szegmentumot a csont diaphysiséből, onnan, ahol a középső lyuk volt. Az osteotomiás résbe 2 milliméter vastag, poly-methyl-metacrilate csontcementből (PMMA, Heraeus Medical, Wehrheim, Németország) kézzel készített lemezt helyeztünk, majd az interpozitumot 3–0-ás, nem felszívódó fonállal erősítettünk a lemezhez, hogy megakadályozzuk az esetleges kimozdulását a résből. Az izmokat 3–0-ás felszívódó fonállal, csomós öltésekkel egyesítettük, majd a bőrt 3–0-ás fonállal, tova futó öltésekkel zártuk. Az állatokat visszatettük a ketrecükbe, és naponta megfigyeltük őket, súlyukat hetente mértük. Az állatoknál 4 hét eltelte után ismételt beavatkozást végeztünk, amelynek során a fent leírt módon feltártuk a femuron az osteotomia helyét, majd a csontcement távtartót eltávolítottuk és a csonthiányt pótoltuk vagy I) fagyasztva szárított albuminnal bevont, vagy II) bevonat nélküli humán csontgrafttal, vagy III) üresen hagytuk a csonthiányt. A sebet a fent leírt módon zártuk, az állatokat visszatettük a ketreceikbe, majd 4 hét után feláldoztuk őket. Az állatok feláldozását követően az operált combcsontokat kioperáltuk, majd a lemezt és a csavarokat eltávolítottuk, a vizsgálatot az így előkészített csontokon végeztük. A regeneráció mértékét, valamint az esetleges csontos gyógyulást  $\mu$ CT készülék (Skyscan 1172 X-Ray microtomograph, Konti ch, Belgium) segítségével figyeltük meg.

## 4. Eredmények

### 4.1. Kémiailag sterilizált, antigén-mentesített liofilizált humán csont allograftok *in vivo* biokompatibilitása

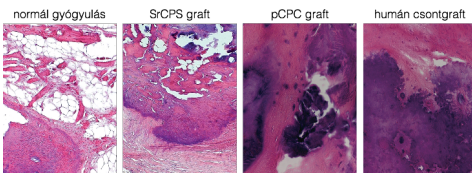
Az 1. ábra a) panel felső képe mutatja, hogy a kavitális csonthiányt teljes egészében kitölti a PMMA és csontosodás nem figyelhető meg. Szintén az a) panel alsó képén a humán csontpótló részleges felszívódása látható

csontképződés nélkül. Ezzel szemben pCPC csontpótló átépülése látható az a) panel középső képén, amit fehér nyíl jelez. A csontpótlóval és távtartóval nem kezelt csonthiányok teljes gyógyulást mutattak az esetek 100%-ában, amit a CT felvételeken látható



1. Ábra: reprezentatív micro-CT felvételek a csigolyákról 12 héttel az operációk után a kísérletek végeztével.

trabekuláris szerkezet igazol (1. Ábra, b) panel). Abban a kísérleti csoportban, ahol a távtartó eltávolítása után nem töltöttük fel a csonthiányt csontpótlóval az esetek 43%-ban tapasztaltunk csontgyógyulást (1. Ábra, c panel). Az SrCPS csontpótlóval kezelt állatok 80%-ában történt teljes csontgyógyulás úgy, hogy négy esetben teljes volt a csontosodás, míg egy



2. Ábra: Reprezentatív hematoxin-eozin festett szövettani metszetek az operált csigolyák distalis végeiből 12 héttel a csontpótlás után.

esetben csak részleges a kísérlet végeztével (1. Ábra, d panel). A szövettani vizsgálatok azt mutatták, hogy a humán csontpótló esetében is történt csontátépülés, és

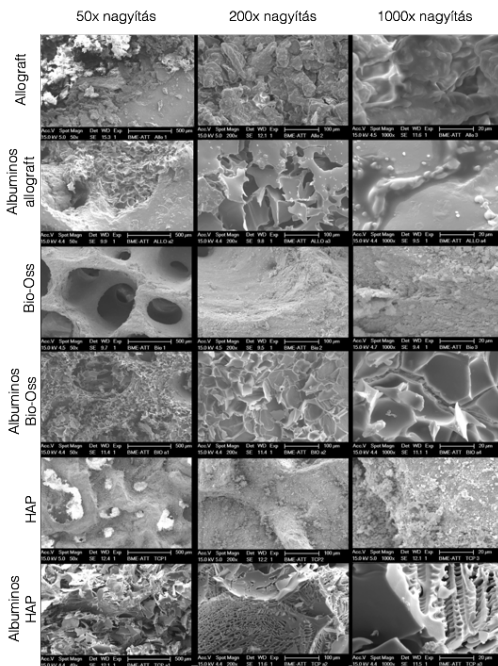
habár az új és a régi szövet között közvetlen kontaktus figyelhető meg a

szövethatárok markánsan elkülönülnek (2. Ábra). Ezzel szemben az SrCPS és pCPC csontpótlók teljesen szervültek, nem voltak fénymikroszkóppal felfedezhető visszamaradt csontpótló maradványok az újonnan képződött szövetben.

#### **4.2. Bevonatos csontpótlók fizikai tulajdonságai, összejtek megtapadása és proliferációja azok felületén**

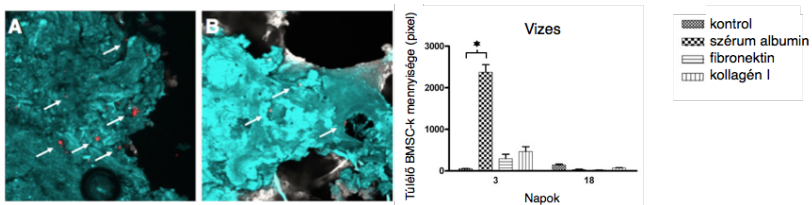
A SEM vizsgálat lényeges makro-, és mikroszerkezeti különbségeket tárt fel a liofilizált emberi és szarvasmarha csontgraftok (Bio-Oss), valamint a szintetikus hidroxipatit között (3. Ábra). A hidroxipatit mutatta a legkompaktabb szerkezetet viszonylag alacsony felületi porozitással. Ezzel szemben a szivacsos liofilizált szarvasmarha csontot sűrűn átszövik a nagy átmérőjű intertrabekuláris csatornák. A liofilizált szivacsos humán csontgraft változatos képet mutatott különböző átmérőjű intertrabekuláris csatornáival. A fagyasztva szárított humán albumin pehelyszerű bevonatot képzett a csontgraftok felületén, ami elfedte a mikrostruktúrák közötti látható különbségeket. Az albumin bevonat a Bio-Oss felületén mutatta a legnagyobb fokú homogenitást, míg véletlenszerű albumin-mentes területek voltak megfigyelhetőek a humán csontgraftok trabekulái között.

A Bio-Oss mutatta a legkisebb Vickers keménységet ( $14,9 \text{ HV} \pm 4,1$ ), míg azt a humán csont követte a sorban ( $55,1 \text{ HV} \pm 7,7$ ), aminek a keménységét nem befolyásolta a fagyasztva szárított albumin bevonat ( $53,9 \text{N} \pm 7,9$ ). Érdekes módon a szintetikus hidroxipatitnak egy nagyságrenddel nagyobb volt a Vickers keménysége, mint a két természetes eredetű csontgraftnak ( $320,4 \text{ HV} \pm 44,6$ ).



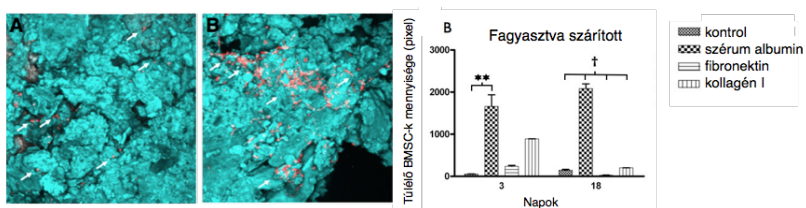
**3. Ábra. Fagyasztva szárított albuminnal bevont csontgraftok makro-, és mikroszerkezete.** A pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat lényeges különbségeket tárt fel a liofilizált emberi (allografft) és szarvasmarha csontgraftok (Bio-Oss), valamint a szintetikus hidroxiapatit (HAP) között. A hidroxiapatit mutatta a legkompaktabb szerkezetet viszonylag alacsony felületi porozitással. A szivacos liofilizált szarvasmarha csontot sűrűn átszövik a nagy átmérőjű intertrabekuláris csatornák. A liofilizált szivacos humán csont graft változatos képet mutatott különböző nagyságú intertrabekuláris csatornáival. A fagyasztva szárított humán albumin pehelyszerű bevonatot képzett a csontgraftok felületén, ami elfedte a mikro-struktúrák közötti látható különbségeket.

A humán csontgraftok bevonása vizes kollagénnel, vagy fibronektinnel alig növelte a kitapadó BMSC-k mennyiségét a kontrollhoz képest, viszont a sejtek mennyisége csökkent a 3. és 18. nap között (4. Ábra). Ezzel szemben a vizes albumin bevonat jelentősen megnövelte a kitapadó BMSC-k számát a humán csontgraftokon, viszont a 18. npra lényegében eltűntek a sejtek a graftok felületéről (pixelek átlaga a 3. napon:  $2373 \pm 142$ ; illetve a 18. napon: 0).



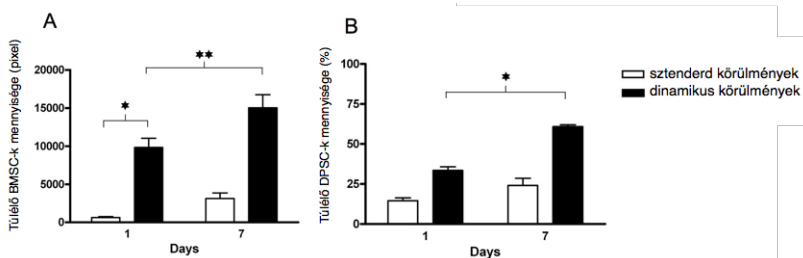
**4. Ábra. BMSC-k adhéziója és proliferációja vizes fehérjékkel bevont humán csontgraftok felületén.** Az oszlopdiagram azt mutatja, hogy az graftok bevonása vizes albuminnal szignifikánsan megnövelte a 3. napon megfigyelhető sejtek mennyiségét a kontrollhoz képest ( $p < 0.05$ ), azonban a fibronektin és a kollagén csak kismértékben növelte a sejtek kezdeti kitapadását. Függetlenül az alkalmazott bevonófehérje minőségétől alig maradt detektálható sejt a 18. napon a humán csontgraftok felületén. A A-B panelek reprezentatív konfokális felvételeket mutatnak a bevonat nélküli kontroll humán csontgraftok (kék) felületén található Vybrant-DiD-el jelölt BMSC-kről (piros). A 3. napon is kevés megtapadt sejt mennyisége szinte nullára csökkent a 18. napra.

Az albumin fagyasztva szárítása a humán csontgraftok felületére megfordította az előzőekben leírt tendenciát, vagyis a kitapadt BMSC-k proliferáltak a 3. és 18. nap között (pixelek átlaga a 3. napon:  $1658 \pm 278$ ; illetve a 18. napon:  $2082, \pm 110$ ;  $p < 0.05$ ). Érdekes módon a fibronektin és a kollagén fagyasztva szárítással történt kezelése nem befolyásolta a BMSC-k kitapadását vagy proliferációját (5. Ábra).



**5. Ábra. BMSC-k adhéziója és proliferációja fagyasztva szárított fehérjékkel bevont humán csontgraftok felületén.** Az oszlopdiagram azt mutatja, hogy az albumin fagyasztva szárítása szignifikánsan megnövelte a 3. napon megfigyelhető sejtek mennyiségét a fagyasztva szárított fibronektines és kollagénes allograftokhoz képest. Azonban a kitapadt sejtek proliferációja mérsékelt volt a fagyasztva szárított albuminnal bevont humán allograftok felületén. Az A-B panelek reprezentatív konfokális felvételeket mutatnak a fagyasztva szárított albumin bevonatos allograftokról. A kitapadt sejtek mennyiségének növekedése figyelhető meg a 3. és 18. nap között.

A dinamikus sejtenyésztési körülmények szignifikánsan megnövelték a kezdetben kitapadó BMSC-k mennyiségét a fagyasztva szárított albuminnal bevont allograftok felületén (6. Ábra) összevetve a normál sejtenyésztési körülményekkel. Ezen túlmenően a kitapadt sejtek intenzív proliferációja volt megfigyelhető (pixelek átlaga normál körülmények között az 1. napon:  $197 \pm 23$ , dinamikus körülmények között az 1. napon:  $9825 \pm 1208$ ; illetve a 7. napon:  $15025 \pm 1704$ ). Hasonló tendencia volt megfigyelhető akkor is, amikor DPSC-ket oltottunk a fagyasztva szárított albuminnal bevont humán csontgraftok felületére normál és dinamikus sejtenyésztési körülmények között (normál körülmények: redukált AlamarBlue átlag (%) a 3. napon:  $14.5 \pm 2.23$ ; átlag a 7. napon:  $33.7 \pm 0.06$ ; dinamikus körülmények: redukált AlamarBlue átlag (%) az 1. napon:  $33.5 \pm 2.23$ ; átlag a 7. napon:  $60.9 \pm 1.09$ ).



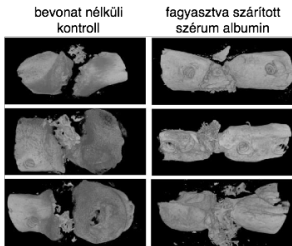
**6. Ábra. BMSC-k és DPSC-k kitapadása fagyasztva szárított albuminnal bevont humán csontgraftok felületén dinamikus sejtenyésztési körülmények között.** A dinamikus sejtenyésztési körülmények lényegesen megnövelték a kezdeti kitapadását a ( $p^{\dagger} < 0.05$ ) BMSC-knek (A) és a ( $p^* < 0.05$ ) DPSC-knek (B), továbbá a megfigyelhető sejtek mennyisége lényegesen megnövekedett az 1. és 7. nap között.

### 4.3. Fagyasztva szárított humán szérum albuminnal bevont humán csontgraftok összeintegrációja

A fagyasztva szárított albuminnal bevont humán csontgraftok lényegesen jobb beépülést mutattak a csontiány helyére a szegmentális nonunion modellben, mint a bevonat nélküli kontroll csontgraftok. Minden állatban a graftok az osteotomiás résben maradtak, viszont csak a fagyasztva szárított



albumin bevonatos csontgraftok esetében történt meg a csontvégek egyesülése (6. Ábra).



**6. Ábra. Patkány osteotomizált combcsontjáról készült  $\mu$ CT felvételek 3-dimenziós rekonstrukciója 4 héttel a csontpótlás után.** A bal oldali oszlopban látható felvételeken az látszik, hogy az albumin bevonat nélküli humán csontgraftok nem épültek be a csonthiány helyére. Ezzel szemben a jobb oldali oszlopban az látható, hogy a fagyasztva szárított humán szérumban albuminnal bevont humán csontgraftok esetében a femur visszanyerte a folytonosságát.

## 5. Megbeszélés

Az eredmények azt mutatják, hogy a kémiai sterilizált, antigénmentesített fagyasztva szárított humán csontgraftok *in vivo* biokompatibilitása elmarad a komparátor szintetikus csontpótlókéttől. Az eredményeink azt is mutatják, hogy a humán szérumban albumin bevonat javítja a kémiai sterilizált, antigénmentesített fagyasztva szárított humán csontgraftok *in vitro* és *in vivo* biokompatibilitását. A fagyasztva szárítási módszer alkalmas a reprodukálható biológiai teljesítőképesség elérésére, habár az albumin bevonat nem mindig folytonos a szivacsos humán csontgraftok intertrabekuláris csatornáiban. A fagyasztva szárított albumin bevonat nem befolyásolja a humán csontgraftok mikroeménységét, illetve az agitáció nem rontja az albumin bevonat biológiai teljesítőképességét. Érdekes módon fagyasztva szárított albumin bevonat leginkább a kezdetben kitapadt sejtek mennyiségét növelte meg, míg a sejtek szignifikáns proliferációja csak dinamikus sejtenyészési körülmények között volt kimutatható. A fagyasztva szárított albuminnal bevont humán csont allograftok elősegítették a csontgyógyulást patkányok

combsontjában létrehozott szegmentális nonunion modellben. Ezzel szemben a fagyasztva szárított albumin bevonat nem javította az *in vitro* biokompatibilitását sem a liofilizált szarvasmarha csontgraftnak, sem pedig a szintetikus hidroxipatit csontpótlónak.

Feltételezhetően azonos okra vezethető vissza a kémiailag sterilizált, antigén-mentes fagyasztva szárított humán csongraftok alacsony *in vitro* és *in vivo* biokompatibilitása. Az érélyes kémiai kezelés során a patogén ágensek mellett vélhetően denaturálódnak mindazok az oszteoinduktív fehérjék és egyéb szerves molekulák, amelyek szükségesek lennének a csontképződésben fontos szerepet játszó sejtek megtapadásához és életképességéhez. Ezek hiányában a humán csontgraftok biológiai értéke lecsökken, ami magyarázatául szolgálhat annak, hogy nem képesek beépülni olyan csonthiányokba, ahol a vérellátás korlátozott, így a saját csont regenerációs képessége is csökkent. Habár az albumin hatásmechanizmusa nem ismert mégis feltételezzük, hogy kulcsszerepe lehet a csontképződésben fontos sejtek toborzásában és aktiválásában, amit a kolloid szuszpenziók térfogatnövekedésének képességére vonatkozó elméletre alapozunk.

Csontműtétet vagy csontsérülést követően egy gyors és aktív immunválasz indul, amikor fehérvérsejtek, vérlemezkék, monociták, makrofágok és egyéb sejtek árasztják el a sérült területet. Ennek a folyamatnak az eredményeképpen a sérült terület izolálódik a környező szövetektől, avaszkulárisává válik, ami megakadályozza, hogy az heves gyulladásos reakció generalizálódjon. Ennek a szegregációs folyamat következtében alakul ki a regenerálódó csont-blasztéma, a callus. A csonttörés (műtét) okozta vérömleny bizonyítottan a forrásául szolgál számtalan jelátviteli molekula felszabadulásának, úgymint interleukinok,

tumor nekrozis faktor- $\alpha$ , fibroblaszt növekedési faktor, inzulinszerű növekedési faktor, vérlemezke eredetű növekedési faktor, vaszkuláris endoteliális növekedési faktor és a transzformáló növekedési faktor  $\beta$  szupercsalád tagjai, amelyek sejtválaszok sorozatát váltják ki, ami végül összességében iniciálja a csontgyógyulást. Ezeket a molekulákat feltételezhetően az albumin adszorbeálja, ezáltal növeli azok lokális koncentrációját, amelyek időben elnyújtva szabadulnak fel, így hosszabban képesek kifejteni hatásukat. Ez a feltételezés nagyban támaszkodik az albumin ismert nagy, nem szelektív affinitására számos biomolekulához, és így ismert nagy kapacitású puffereként szolgál a vérben. Az ilyen módon megnövekedett lokális koncentrációja és hosszantartó elérhetősége a biokémiai szignáloknak növelheti a csontgyógyulásban szerepet játszó sejtes folyamatok aktivitását, illetve volumenét, ami magyarázatául szolgálhat az albuminos humán csontgraftok nonunion modellben megfigyelt nagy beépülési arányának.

Ugyancsak a kolloid szuszpenziók térfogatnövekedési képessége magyarázhatja a fagyasztva szárított albumin bevonatos humán csontgraftok megnövekedett *in vitro* biokompatibilitását. Egy lehetséges magyarázat, hogy amikor a fagyasztva szárított albumin érintkezésbe kerül a sejtek oldatával, akkor azonnal adszorbeálja vizet. A víz adszorpciója miatt az albumin térfogata hirtelen megnő és kolloid szuszpenzióként a nagy viszkozitásának köszönhetően átmenetileg csapdázza a vizes oldatban felvitt sejteket a szivacsos csont trabekulái között. Az így ott ragadt MSC-knek elegendő ideje kínálkozik extracelluláris mátrix termelésre és fokális adhézió kialakítására a csontgraft felületén.

## 6. Következtetések

**6.1.** A kémiaiilag sterilizált, antigén-mentesített fagyasztva szárított humán csontgraftok *in vivo* biokompatibilitása elmarad a szintetikus csontpótlóktól olyan kísérleti modellben, ahol a saját csont regenerációs képessége korlátozott.

**6.2.** A humán szérum eredetű albumin megfelelő bevonóanyag a fagyasztva szárított szivacsos humán csontgraftok reprodukálható előállításához.

**6.3.** A fagyasztva szárított humán szérum albumin bevonat javította az *in vitro* és *in vivo* biokompatibilitását a kémiaiilag sterilizált, antigén-mentesített humán csontgraftoknak.

## 7. Publikációk

### Értekezéshez kapcsolódó közlemények

[1] **Weszl M**, Skaliczki G, Cselenyák A, Kiss L, Major T, Schandl K, Bognár E, Stadler G, Peterbauer A, Csöngé L, Lacza Z. Freeze-dried human serum albumin improves the adherence and proliferation of mesenchymal stem cells on mineralized human bone allografts. *J Orthop Res*. 2012 Mar;30(3):489-96.

[2] Hulsart-Billström G, Xia W, Pankotai E, **Weszl M**, Carlsson E, Forster-Horváth C, Larsson S, Engqvist H, Lacza Z. Osteogenic potential of Sr-doped calcium phosphate hollow spheres in vitro and in vivo. *J Biomed Mater Res A*. 2013 Aug;101(8):2322-31.

[3] Aberg J, Pankotai E, Hulsart Billström G, **Weszl M**, Larsson S, Forster-Horváth C, Lacza Z, Engqvist H. In vivo evaluation of an injectable premixed radiopaque calcium phosphate cement. *Int J Biomater*. 2011;2011:232574.

### Értekezéshez nem kapcsolódó közlemények

[1] Horváthy DB, Vác G, Cselenyák A, **Weszl M**, Kiss L, Lacza Z. Albumin-coated bioactive suture for cell transplantation. *Surg Innov*. 2013 Jun;20(3):249-55.

[2] Skaliczki G, **Weszl M**, Schandl K, Major T, Kovács M, Skaliczki J, Redl H, Szendrői M, Szigeti K, Máté D, Dobó-Nagy C, Lacza Z. Compromised bone healing following spacer removal in a rat femoral defect model. *Acta Physiol Hung*. 2012 Jun;99(2):223-32.

[3] Skaliczki G, Schandl K, **Weszl M**, Major T, Kovács M, Skaliczki J, Szendrői M, Dobó-Nagy C, Lacza Z. Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study. *Int Orthop*. 2013 Apr;37(4):741-5.

[4] Terdik A , Klára T , Csöngé L , Lacza Z , Bognár E , **Weszl M**. Csontpótló anyagok összehasonlító mikrokeménység vizsgálata *BIOMECHANICA HUNGARICA* 6:(2) pp. 13-17. (2013)