

Vérszérum alapú regeneratív terápiás megoldások fejlesztése a térdízület degeneratív elváltozásainak kezelésében

Doktori értekezés

Kardos Dorottya Virág

Semmelweis Egyetem
Elméleti és Transzlációs Orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Skaliczki Gábor, Ph.D., egyetemi adjunktus
Dr. Koltai Erika, Ph.D., tudományos főmunkatárs

Komplex vizsga szakmai bizottság:

Elnök: Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár

Tagok: Dr. Vásárhelyi Barna, DSc., egyetemi tanár
Dr. Ambrus Csaba, Ph.D., klinikai szakorvos

Budapest

2019

Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	6
1. Bevezetés.....	9
1.1. Regeneráció és regeneratív terápia	9
1.2. A vérlemezkék szerepe a regenerációban	12
1.2.1. A vérlemezkék felépítése és funkciói	12
1.2.2. A sebgyógyulás, mint regeneratív folyamat	16
1.3. Vérszeparátumok alkalmazása a regeneratív orvostudományban	21
1.3.1. Vérlemezkében gazdag plazma	21
1.3.2. Vérlemezkében gazdag fibrin	24
1.3.3. Autológ kondicionált szérum.....	26
1.3.4. Hiperakut szérum.....	26
1.4. Regeneratív terápiais megoldások az oszteoarthritisz kezelésében	27
1.4.1. Az oszteoarthritisz patomechanizmusa és tüntei	27
1.4.1.1. A porcshövetben bekövetkező változások.....	28
1.4.1.2. A szinoviális membránban bekövetkező változások.....	28
1.4.1.3. A szubkondrális csontban bekövetkező változások	29
1.4.2. A térdízületi oszteoarthritisz diagnózisa és terápiais lehetőségei	31
1.4.2.1. Konzervatív terápiais megoldások	32
1.4.2.2. Intraartikuláris injekciók	32
1.4.2.3. Műtéti megoldások	34
1.4.3. In vitro modellek használata az oszteoarthritisz tanulmányozásában	35
2. Célkitűzések	39
2.1. Vérszérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut szérum összetételének kvantitatív vizsgálata	39
2.2. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen	39

2.3. Vérvételi üvegcsővel és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása	40
3. Módszerek	41
3.1. Vércsérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut sérum összetételének kvantitatív vizsgálata	41
3.1.1. Vérszeparátumok izolálása	41
3.1.2. Laboratóriumi paraméterek mérése	43
3.1.3. Fehérje-összetétel mérése multiplex immunoesszével és enzimkapcsolt immunoszorbens analízissel	44
3.2. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut sérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen	46
3.2.1. Hiperakut sérum izolálás hypACT Inject eszközzel	46
3.2.2. In vitro térd szövetmodell előállítás	47
3.2.3. Szövetek életképességének mérése.....	48
3.2.4. Szinoviális folyadék minta gyűjtése	49
3.2.5. Szövettenyésztő oldat és humán szinoviális folyadék minták citokin összetételének mérése multiplex immunoesszével	49
3.3. Vérvételi üvegcsővel és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása	50
3.3.1. Minta előkészítés	50
3.3.2. Mechanikai tulajdonságok vizsgálata	50
3.3.2.1. Szakítószilárdság vizsgálata.....	50
3.3.2.2. Felületi és szerkezeti vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal	51
3.3.3. Biológiai tulajdonságok vizsgálata	51
3.3.3.1. Élő/halott sejtfestés	51
3.3.3.2. Mezenchimális össejtek életképességének mérése	52
3.3.3.3. Íny fibroblaszt sejtek életképességének mérése	52
3.3.3.4. Plazmin enzim aktivitásának mérése.....	53

3.4. Statisztikai analízis	53
4. Eredmények	55
4.1. Vérszérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut szérum összetételének kvantitatív vizsgálata	55
4.1.1. Laboratóriumi paraméterek mérése	55
4.1.2. Fehérje-összetétel mérése multiplex immunoesszével és enzimkapcsolt immunoszorbens analízissel	57
4.2. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen	60
4.2.1. Szövettenyésztő oldat és humán szinoviális folyadék minták citokin összetételének összehasonlítása	60
4.2.2. Szövetek életképességének mérése.....	61
4.2.3. IL-1 béta citokin és a hiperakut szérum hatásának vizsgálata.....	62
4.3. Vérvételi üvegcsővel és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása	69
4.3.1. Mechanikai tulajdonságok vizsgálata	69
4.3.1.1. Szakítószilárdság vizsgálata	69
4.3.1.2. Felületi és szerkezeti vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal	70
4.3.2. Biológiai tulajdonságok vizsgálata	72
4.3.2.1. Élő/halott sejtfestés	72
4.3.2.2. Mezenchimális őssejtek életképességének mérése	72
4.3.2.3. Íny fibroblaszt sejtek életképességének mérése	74
4.3.2.4. Plazmin enzim aktivitásának mérése.....	75
5. Megbeszélés.....	76
6. Következtetés.....	85
7. Összefoglalás	86
8. Summary.....	87
9. Irodalomjegyzék	89
10. Saját publikációk jegyzéke	110

11. Köszönetnyilvánítás 111

Rövidítések jegyzéke

- 3D – három dimenzió
- ACD-A – citrát dextróz folyadék
- ACI – autológ kondrocita implantáció
- ACS – autológ kondicionált szérum
- ADP – adenzin-difoszfát
- ALCAM – aktivált leukocita sejt adhéziós molekula
- ALP – alkalikus foszfatáz
- ATP – adenzin-trifoszfát
- AU – tetszőleges egység (arbitrary unit)
- BM-MSC – csontvelő eredetű mezenchimális őssejt
- BSP – csont szialo fehérje (bone sialo protein)
- C1qR1 – komplement komponens q 1 receptor 1
- C5a – komplement komponens 5a
- CCL – CC Kemokin Ligand
- CD – “cluster of differentiation” (nincs magyar megfelelő)
- CD40L – cluster of differentiation 40 Ligand
- CHI3L1 – kitináz 3-szerű fehérje 1
- COL1A1 – kollagén 1 alfa 1
- COMP – porc oligomer mátrix fehérje
- CPDA – citrát+foszfat+dextróz
- CRP – C-reaktív fehérje
- CXCL – CXC Kemokin Ligand
- DMEM – Dulbecco’s modified Eagle’s medium
- DMSO –dimetil-szulfoxid
- EDTA – etilén diamin-tetraecetsav
- EGF – epidermális növekedési faktor
- ELISA – enzimkapcsolt immunoszorbens analízis
- EMMPRIN – extracelluláris mátrix metalloproteináz indukátor
- FGF – fibroblaszt növekedési faktor
- GLUT-3 – glükóz traszporter-3
- GPCR – G-fehérje kapcsolt receptor

GPIIb/IIIa – glikoprotein IIb/IIIa
GT-PRF – vérvételi üvegcsővel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán
HA – hialuron sav
HAS – hiperakut szérum
hGF – humán ínysajt fibroblaszt
HI-PRF – hypACT Inject eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán
HMDS – hexametildiszilazán
IFN- γ – interferon-gamma
IGF – inzulinszerű növekedési faktor
IL – interleukin
IL-1RA – interleukin-1 receptor antagonist
IL-1 β – interleukin-1 béta
IL-4 R α – interleukin-4 receptor alfa
IL-6R α – interleukin-6 receptor alfa
KGF – keratinocita növekedési faktor
KOOS – Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score
LIF – leukémia gátló faktor
MACI – mátrix asszociált kondrocita implantáció
MMP – mátrix metalloproteináz
MPV – vérlemezkék átlagos térfogata
MSC – mezenchimális őssejt
NGF – idegnövekedési faktor
NO – nitrogén-monoxid
OA – oszteoarthritisz
OD – optikai denzitás
OPG – oszteoprotegerin
OSM – onkosztatin-M
P2Y x – purigenik receptor
PAR – proteáz aktivált receptor
PBS – foszfát puffer
PDGF – vérlemezke eredetű növekedési faktor
PF-4 – vérlemezke faktor-4

PRF – vérlemezkében gazdag fibrin

PRP – vérlemezkében gazdag plazma

RANKL – nukleár faktor kappa B ligand receptoraktivátor

rcf – relatív centrifugális erő

rpm – fordulatszám (revolution per minute)

SEM – pásztázó elektronmikroszkóp

TF – szöveti faktor

TGF- β – transzformáló növekedési faktor béta

Th1 – 1-es típusú segítő T-sejt

Th2 – 2-es típusú segítő T-sejt

TIMP – szöveti mátrix metalloproteináz gátló fehérje

TNF- α – tumor nekrosis faktor alfa

TXA2 – tromboxán A2

VAS – vizuális analóg skála

VEGF – vaszkuláris endoteliális növekedési faktor

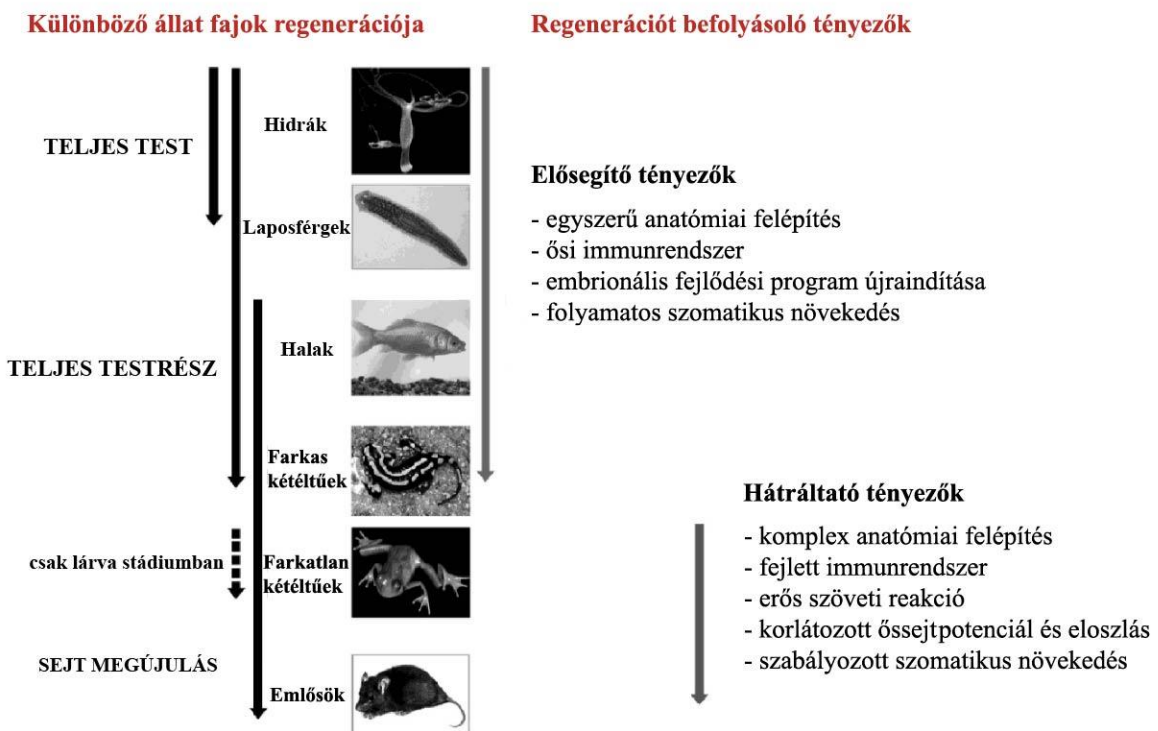
vWF – von Willebrand faktor

WOMAC – Western Ontario and McMaster Universities Arthritis Index

1. Bevezetés

1.1. Regeneráció és regeneratív terápia

A regeneráció alapvető képessége az élő szervezetnek, mely során az élő szervezet pótolja, újranöveszti vagy kiegészíti az elvesztett, elhasznált vagy megsérült részeit. Jól ismert tény, hogy számos élőlény képes a sérült, vagy elvesztett testrészeit pótolni. A regenerációban élenjáró hidrák és laposférgek akár egész testüket is képesek regenerálni¹⁻³. A náluk fejlettebb felépítésű gyűrűsférgek is jelentős regenerációra képesek, míg a rovarok közül sok csak lárva korban rendelkezik szövetmegújító képességgel⁴. A gerincesek regenerációs képessége rendkívül változatos, míg a kétéltűek képesek teljes végtagot újjáépíteni, addig az emlősök csak az utolsó ujjpercet, az ujjhegyet képesek pótolni⁵⁻⁷ (1. ábra).



1. ábra Különböző állatfajok szöveti regenerációs képessége. A hidrák és laposférgek egész testüket képesek regenerálni, míg a náluk fejlettebb rendszertani kategóriába tartozó halak és kétéltűek teljes testrészt tudnak újjá növeszteni. Az emlősök csak szervrészeket tudnak regenerálni sejteik megújítása révén.

Forrás: Luca Bonfanti 2011. 1272.

Az emberi test regenerációs képessége jóval korlátozottabb, mint az alsóbbrendű élőlényeké, habár az emberi szervezet alapvető működéséhez is hozzátartoznak bizonyos újjáépítő folyamatok, mint a vérsejtek és az epitel sejtek folyamatos cserélődése, avagy a csontok átépülése. Az emberi test sérüléseket követően is képes szöveti regenerációra - például a bőr felszíni sebeinek gyógyulási folyamata, vagy a belső szerveinkben történő hegeseddel gyógyuló sérülések- de ennek mértéke korlátozott, nagyobb szervrészeket, avagy teljesen új szervet nem képes létrehozni ^{8,9}. A regenerációban résztvevő sejtek kérdése rendkívül komplex, és a tudományban mai napig sok kérdést felvet. Bizonyos esetekben a meglévő, és a sérülés helyén jelen lévő sejtek transzdifferentiációjával történik, míg sok esetben a még nem differenciálódott, felnőtt őssejtek a sérülés helyéről felszabaduló kémiai ingerek hatására migrációba kezdenek a sérülés helye felé, majd ott letapadva proliferálódnak és differenciálódnak a szöveti környezetnek megfelelő sejttypussá ¹⁰⁻¹². A humán szöveti regeneráció korlátozott mivoltából kifolyólag jelenleg az egyetlen biztos gyógymód a kiterjedt szöveti pusztulással, vagy akár teljes szerv elvesztésével járó betegségekre a szervtranszplantáció. Azonban ez a megoldás is számos problémát vet fel, mivel a transzplantálható szervek korlátozott számban állnak csak rendelkezésre, valamint, minthogy allogen szervbeültetésről van szó, az immunológiai összeférhetetlenség és szervkilökődés is komoly kockázatot jelent. Mindezen okokból kifolyólag évről évre egyre nagyobb hangsúlyt kapnak, és egyre népszerűbbek a különböző regeneratív terápiát létrehozó és fejlesztő kutatások világszerte ¹³.

A regeneratív gyógyászat célja az életkorból adódó, valamint az akut és krónikus betegségektől, avagy traumatikus sérülésektől károsodott szövetek helyreállítása és pótlása. A regeneratív orvostudomány számos stratégiát foglal magába. Egy részük autológ és allogen őssejtek (embrionális, mezenchimális (MSC), indukált pluripotens őssejt terápia) és progenitor sejtek, valamint felnőttkori szomatikus sejtek (porcsejt, fibroblasztok, vérsejtek, izomsejtek) laborban történő felszaporítását követően, a sejtek közvetlen, célzott bejuttatásával próbál új szövetet létrehozni ¹⁴⁻¹⁷. A sejtbeültetés modernebb ágazatánál az implantációt háromdimenziós (3D) szövettenyésztés előzi meg, melynek során az őssejteket, vagy szomatikus sejteket, előzetesen a sérülés helyére történő bejuttatás előtt ránövesztik egy természetes vagy mesterséges anyagból létrehozott 3D-s vázra ¹⁸⁻²³. Az így bejuttatott sejtek a sérülés helyén maradnak, nem következnek be nem kívánt sejt migráció. A sejtthordozó váz többféle természetes (például

kollagén, fibrin) és mesterséges (például politejsav, poli(tejsav-ko-glikolsav)) anyagból készülhet, azonban kritériuma, hogy biológiailag lebomló legyen, biokompatibilitásánál fogva ne okozzon immunológiai reakciót, valamint a mechanikai tulajdonságai minél hasonlóbbak legyenek a pótolni kívánt szövetéhez^{19,24-28}. A háromdimenziós vázon történő sejtnövesztés többnyire bioreaktorokban valósul meg, melyeknek fő feladata, hogy a sejtenyésztő oldatot megfelelő sebességgel áramoltassák, így a váz és a leendő szövet belsejébe is megfelelően jusson el a tápanyag, megelőzve ezzel a későbbi szöveti nekrozist. A folyadék áramoltatásának fenntartása történhet többek között mágneses kevertetéssel, perfúziós pumpával, vagy rotációval²⁹⁻³⁴. A sejt regeneratív terápiák alkalmazásával számos probléma vetődik fel. Egyrészt a sejtek felszaporítása laboratóriumi körülmények között magas költségekkel jár, melyeket a legtöbb beteg nem tud finanszírozni, valamint a sejtek túlélése a beültetés során, valamint a beültetést követően nem garantálható. Másrészt a szervezetbe történő sejtbejutattás magas rizikófaktora miatt engedélyeztetésük nehézkes és hosszú időt igényel, ennél fogva jelentős részük csak preklinikai fázisban tart, illetve csak odáig jut el az anyagi források kimerülése miatt³⁵. A fenti nehézségek kiküszöbölése végett a 21. században teret kaptak a regeneratív kutatásban a sejtmentes vázakkal történő szövetpótló módszerek, melyek a szervezet saját felnőttkori őssejtkészletét hivatottak aktivizálni közvetlenül a sérülés helyén. A vázak természetüknél fogva anyagukban, vagy mesterséges bevonatként olyan fehérjéket és/vagy növekedési faktorokat hordoznak, melyek képesek a sejteket kemotaxis által odavonzani a vázhoz és letapadásukat, valamint proliferációjukat is elősegíteni. Utóbbi módszeren alapul például az albuminbevonatos csontörlemény, melyet főként az állkapocs csontthiány pótlására használnak a fogászatban³⁶⁻³⁹. Az albumin, mely a vérben legnagyobb mennyiségben jelenlévő fehérje, elősegíti a csontvelői mezenchimális őssejtek (BM-MSK) migrációját, megtapadását, és proliferációját a csontörleményen, mely fokozatosan átépül az MSK-k differenciációjának következtében³⁶. A vér az albuminon túl számos fehérjét és növekedési faktort tartalmaz, mely előnyös lehet a szöveti regeneráció elősegítésére. A vér és származékainak szerepét a sebgyógyulásban már az 1990-es években felismerték^{40,41}. Mára a regeneratív orvoslásban történő alkalmazása széles körben elterjedt, továbbá a kutatásban is kedvelt területet képeznek a vérszármazékok regeneratív hatásának vizsgálatait, különös tekintettel az ortopédia területére^{42,43}. Mivel a beteg saját véréből

származnak a termékek, előállításuk meglehetősen olcsó és egyszerű, jóval kisebb kockázattal jár a szervezetbe történő visszajuttatásuk, sok esetben műtéti beavatkozás nélkül, injekció formájában lehetőséget nyújt célzott terápiára.

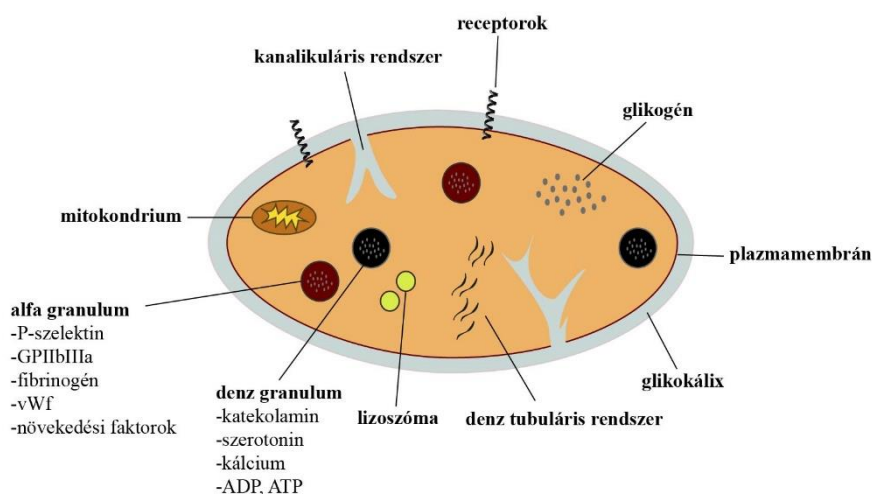
1.2 A vérlemezkék szerepe a regenerációban

1.2.1. A vérlemezkék felépítése és funkciói

A humán vér regenerációs képessége elsősorban a vérlemezkék, más néven trombociták funkciójával hozható összefüggésbe. A trombociták 2-3 mikrométeres átmérőjükkel a legkisebb véralkotó sejtjes elemek a vörösvértestek és fehérvérsejtek mellett. A sejttag nélküli vérlemezkék a vöröscsontvelőben keletkeznek a megakariociták feldarabolódásával. Minden egyes megakariocitából 5000-10000 trombocita keletkezik, egy egészséges emberben naponta 10^{11} vérlemezke képződik, melyek $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ koncentrációban vannak jelen a vérben ⁴⁴. Ezután 5-9 napon át keringenek az érrendszerben, majd a lép vagy a máj sejtjei fagocitózissal lebontják őket. A trombocitákat határoló foszfolipid membránon számos sejtfelszíni marker foglal helyet, mint a CD36, CD40, CD63, CD9, G-fehérje kapcsolt receptorok (GPCR), purinerg receptorok, glikoprotein IIbIIIa (GPIIbIIIa), glikoprotein Ib-IX-V (GPIb-IX-V), glikoprotein VI (GpVI), proteáz aktivált receptor (PAR), ADP receptorok ($P2Y_x$), tromboxán A2 receptor, glükóz transzporter 3 (GLUT-3). Ezeknek többek között a szignál transzdukciós folyamatokban, a gyulladásban, az immunológiai folyamatokban, a vérlemezkék aktivációjában és az aggregációjában, a véralvadásban, a sebgyógyulásban, valamint az érékezésben van szerepe ⁴⁵. A plazmamembránon belül található a mitokondrium, glikogén szemcsék, továbbá három fő tároló granulum, az egyik a sötét (denz) granulum, melyből körülbelül 4-6 darabot tartalmaz minden egyes vérlemezke. Ezekben különféle hemosztatikusan aktív molekulák tárolódnak, mint a katekolamin, szerotonin, kalcium és adenzin-difoszfát (ADP). A trombocita aktiváció kezdeti lépésében a denz granulumok összeolvadnak a plazmamembránnal és tartalmukat az extracelluláris vaszkuláris térbe ürítik, ahol jelátviteli molekulákként működve a vérlemezkék sejtfelszíni receptorához kötődve fejtenek ki hatást. Az egyik legfontosabb kötőreceptoruk a purinerg receptor, ($P2Y_x$) melyen keresztül a vérlemezkék aktivációját indukálják.

A második tároló egység az alfa granulum (α -granulum), melyből 60-80 darab fordul elő a vérlemezkékben, és a koagulációs kaszkád megindításában szerepet játszó molekulákat tárolja, mint a von Willebrant faktor (vWF), fibrinogén, GPIIbIIIa; ezentúl a trombocita funkció szemponyjából jelentős molekulákat tartalmazza, mint a P-szelektin, amely többek között a neutrofil granulociták kemotaxisában játszik szerepet. A harmadik granulum a lizoszóma, melyben a fehérjék lebontása történik ⁴⁶.

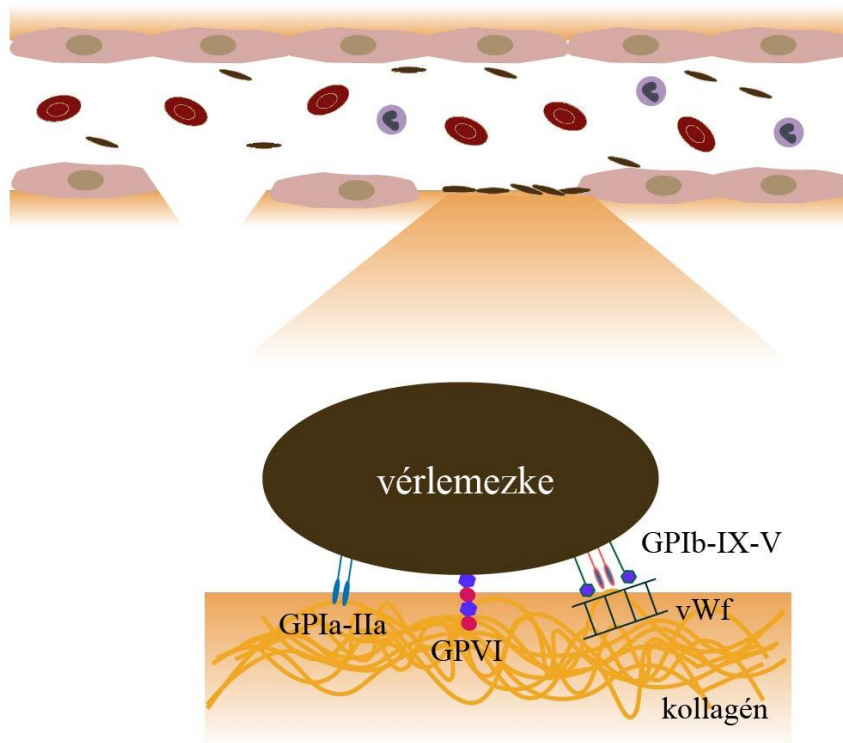
A trombocitákat átszövő, plazmamembránhoz is kapcsolódó hálózat, a kanalikuláris rendszer, mely a környezetből érkező molekulák felvételére, és a vérlemezkék granulumjainak környezetbe történő ürülésében játszik fő szerepet. A denz tubuláris rendszer ezzel szemben zárt, a külvilággal nem érintkező, belső hálózat, melyben a tromboxán és prosztaglandin szintézis történik, valamint a vérlemezke aktivációhoz szükséges kalcium szállítását végzi a denz granulumokból a citoplazmába, ahol a kalcium felszabadul és megindítja a vérlemezkék kontrakciós fehérjéinek összehúzását ^{47,48} (2. ábra).



2. ábra A vérlemezkék felépítése. A vérlemezkék glikokálix és plazmamembrán által körülhatárolt sejtes elemek, melyek sejtmagot nem tartalmaznak. Három fontos tároló granulum található bennük, az alfa, a denz és a lizoszomális granulum.
Forrás: saját ábra

A vérlemezkék fontos feladata a hemosztázis és a vér áramlásának fenntartása. A vérerek biofizikai jellegének köszönhetően a véráramban a vérlemezkék az érfal közvetlen közelében haladnak, így azonnal tudnak reagálni a véreret ért sérülésekre.

A hemostázis iniciációs szakaszában a vérér sérülését követően az érfal simaizom rétege összehúzódik lassítva ezzel a vér áramlási sebességét. A véráramban keringő vWF hozzákötődik a sérült érfal kollagénszállaihoz, melyhez a lelassult keringésű vérlemezkék kapcsolódnak a GPIb-IX-V receptor komplexen keresztül. A vérlemezkék közvetlenül, a vWF nélkül is képesek a kollagénhez kapcsolódnak a GPIaIIa és GPVI receptoruk révén (3. ábra).

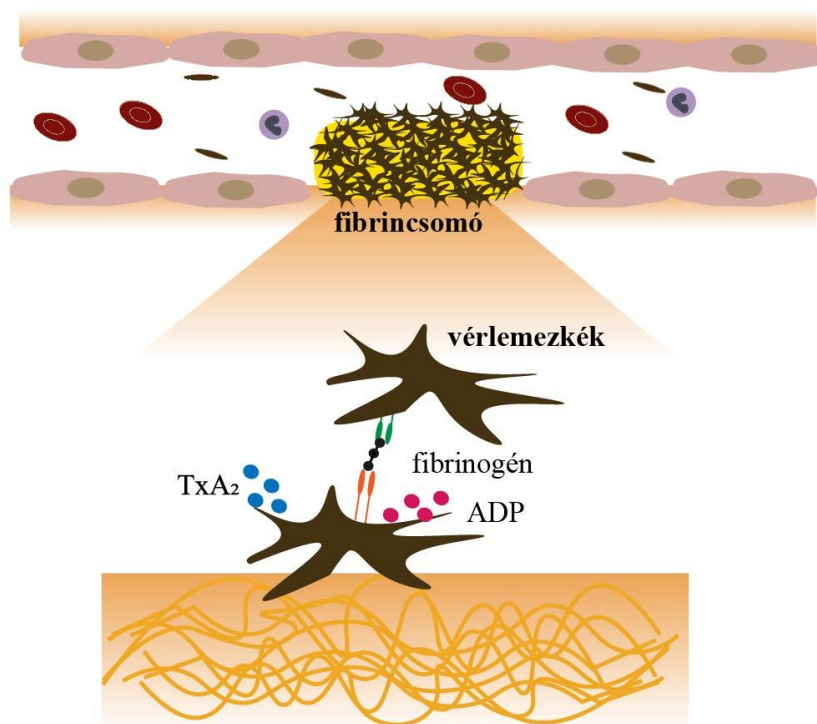


3. ábra Véralvadás: az ér sérülése és a vérlemezkék adhíziója. Az érét sértés után a véráramban keringő vWF hozzákötődik az érfal kollagénszállaihoz, melyhez a lelassult keringésű vérlemezkék kapcsolódnak a GPIb-IX-V receptor komplexen keresztül.

Forrás: saját ábra

Az adhíziót követően a trombociták aktiválódnak a GPVI, adenosin trifoszfát (ATP) és ADP, valamint a GPI-IX-V receptorokon keresztül, és konformációváltáson esnek át, melynek folyamán kerek formájú, filopódiummal rendelkező sejtekké alakulnak, majd az intracelluláris kalciumszint emelkedését követően az α - és denz granulum tartalmát az extracelluláris vaszkuláris térbe bocsájtják. Az így kibocsájtott ADP és az aktivált vérlemezkék által de novo szintetizált és kibocsájtott tromboxán A₂ (TXA₂) aktiválják a még inaktív keringésben lévő vérlemezkéket, amelyek GPIIb/IIIa receptorukon keresztül a már aggregálódott vérlemezke GPIIb/IIIa receptorához kapcsolódnak fibrinogén

molekulák közvetítésével. Minden fibrinogén molekula két GPIIbIIIa kötőhellyel rendelkezik, így képesek két szomszédos aktivált állapotba került vérlemezket összekapcsolni ⁴⁹ (4. ábra).

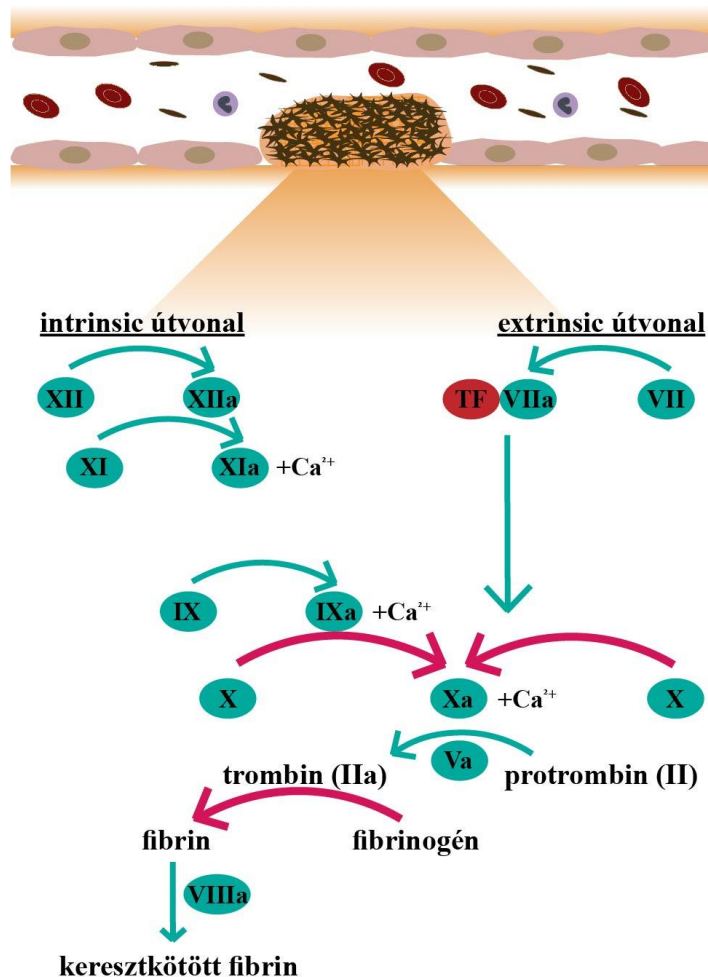


4. ábra Véralvadás: a vérlemezke aggregáció. Az adhéziót követően a vérlemezkek aktiválódnak, filopódiummal rendelkező sejtekké alakulnak, és fibrinogén molekula közvetítésével kapcsolódnak egymással, ezzel trombocita aggregátumot képezve.
Forrás: saját ábra

Az így kialakult laza szerkezetű komplex stabilitásáért a véralvadási kaskád folyamata felelős, mely a trombocita aggregációt követően két útvonalon indul meg. Az extrinsic útvonal során az endotélsejtek által kibocsátott szöveti faktor (TF) komplexet képez a VII faktorról, majd hasítja a X faktort. Az így keletkezett Xa faktor komplexet képez az Va és II faktorról (protrombin), és utóbbit aktiválva trombin keletkezik. A folyamathoz kalcium jelenléte szükséges.

Az intrinsic út során elsőként a XII faktor aktiválódik, majd a kollagénnel tapad és hasítja a XI faktort, melynek aktivált formája hasítja és ezzel aktiválja a IX faktort. Utóbbi a VIII faktorról kalcium jelenlétében hasítja a X faktort, és ezen a ponton kapcsolódik össze az extrinsic útvonallal. A kaskád végén aktivált trombin hasítja a fibrinogén molekulát, és

a XIII faktor segítségével kialakult fibrin monomerek közötti kötések stabil fibrinhálót hoznak létre. Míg az extrinsic útvonal kizárólag az élő szervezetben játszódik le, addig az intrinsic út in vitro körülmények között, üvegfelületen is lejátszódik ^{47,50} (5. ábra).



5. ábra Véralvadás: a véralvadási kaszkád. A kaszkád két, végül összecsatlakozó útvonalon (intrinsic és extrinsic útvonal) képes megindulni, melynek végeredményeképp alakul ki az alvadt, keresztkötött fibrinkötegekből álló vérrög. Forrás: saját ábra

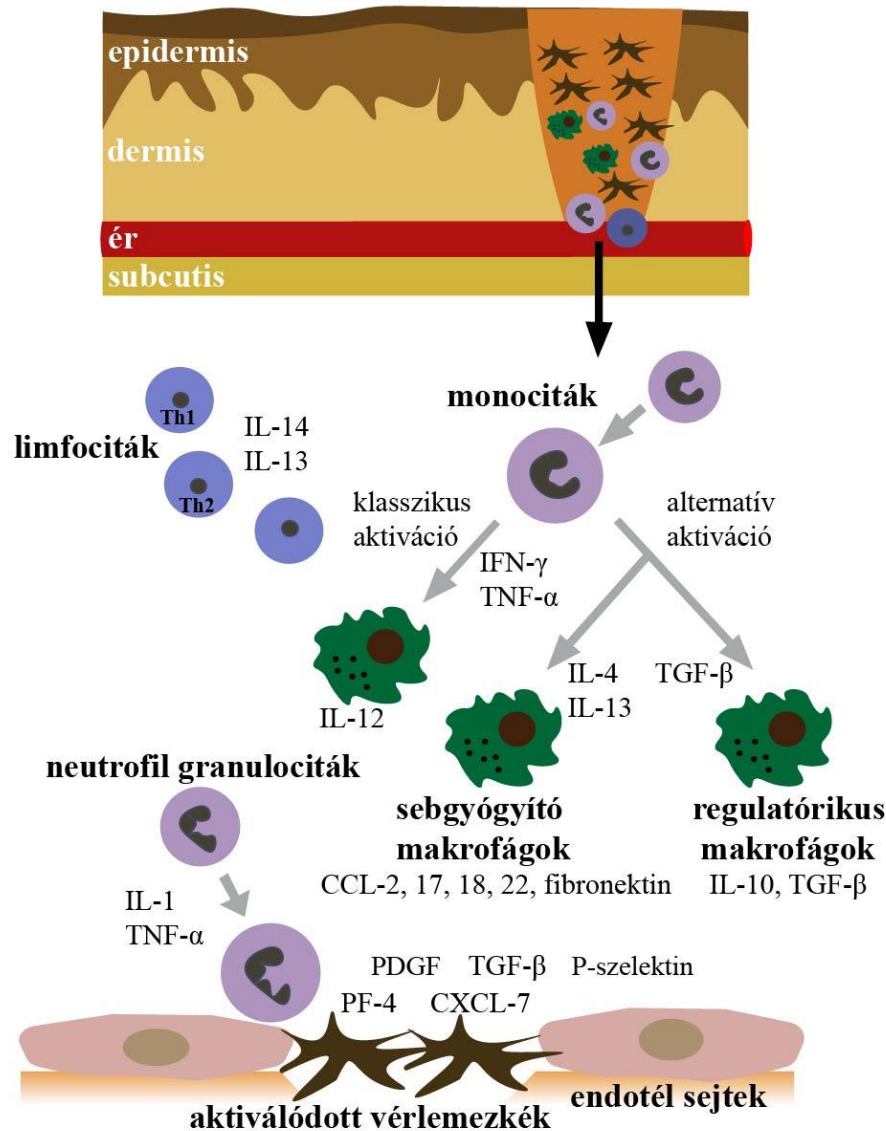
1.2.2. A sebgyógyulás, mint regenerációs folyamat

A véralvadáson kívül a vérlemezkék fontos szerepet játszanak a sérülést követő szöveti regenerációban is, mely a bőrfelszíni sebgyógyulási folyamatával szemléltethető a legjobban. A regenerációs folyamat három fázisra bontható, melyből első a gyulladásoz fázis, második a sejtproliferációs fázis, az utolsó pedig az érési és újjáépülési fázis. A hemosztázis folyamata körülbelül 1 óra alatt lejátszódik, majd megindul a gyulladásoz

fázis, mely akár több hónapig is tarthat az adaptív immunrendszer működésbe lépésének következtében. Azonban nagyjából egy nappal a gyulladás megindulása után kezdetét veszi a proliferációs fázis, majd az átépülési fázis, mely 1-2 évig is eltarthat a sérülés méretétől függően⁵¹.

A gyulladásos fázis már a vérlemezkék endotéliummal történő kapcsolódásánál megkezdődik. Az endotélsejtek által termelt és kibocsátott interleukin-1 (IL-1), IL-8 és tumor nekrozis faktor alfa (TNF- α), továbbá az aktivált trombociták α -granulumból felszabaduló P-szelektin, a transzformáló növekedési faktor-béta 1 (TGF- β 1) és vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF) hatására neutrofil granulociták érkezik a sérülés helyére, majd a szintén vérlemezke eredetű CXC kemokin ligand 7 (CXCL-7) és vérlemezke faktor 4 (PF-4) molekulák hatására letapadnak és megkezdik a jelen lévő patogének és a szövettörmelék fagocitózist. A neutrofil granulocitákon kívül a P-szelektin és PDGF hatására monociták érkezik a helyszínre és makrofágokká differenciálódnak. A monocitákból történő makrofág irányú differenciáció két útvonalon történhet, az egyik a klasszikus útvonal, melyhez interferon gamma (IFN- γ) és TNF- α jelenléte szükséges⁵². Az így keletkezett makrofágok gyulladásos citokineket termelnek, a legnagyobb mennyiségben IL-12 molekulát. A másik útvonal az alternatív útvonal, melynek során TGF- β hatására szabályozó makrofágok jönnek létre, melyek gyulladáscsökkentő hatásúak, valamint a 2-es típusú helper T-sejtek (Th2) sejtek által kibocsátott IL-4 és IL-13 molekulák hatására úgynevezett sebgyógyító makrofágok keletkeznek⁵³. A sebgyógyító makrofágok nagy mennyiségű fibronectint állítanak elő, valamint CC kemokin ligandokat termelnek (CCL-2, 17, 18, 22), melyek közül a CCL-18 jelentősen fokozza a kollagéntermelést. A makrofágok fő feladata a kezdeti gyulladásos fázis során a szövettörmelék bekebelezése. A limfociták közül az antifibrotikus 1-es típusú helper T-sejtek (Th1) és profibrotikus Th2 sejtek játszanak fontos szerepet a sebgyógyítás során keletkező gyulladásos folyamatban⁵⁴. A vérlemezkék önállóan, a neutrofil granulociták érkezése előtt is képesek védekező mechanizmust indukálni az érsérülés helyén véráramba lépni szándékozó patogének ellen a felszínükön található Toll-like receptorokkal. Ezek aktiválódva a PF-4 és CCL-5 molekulák termelését indukálják a vérlemezkékben, melyek azonnali válaszreakciót váltanak ki az immunsejtekben⁵⁵⁻⁵⁷.

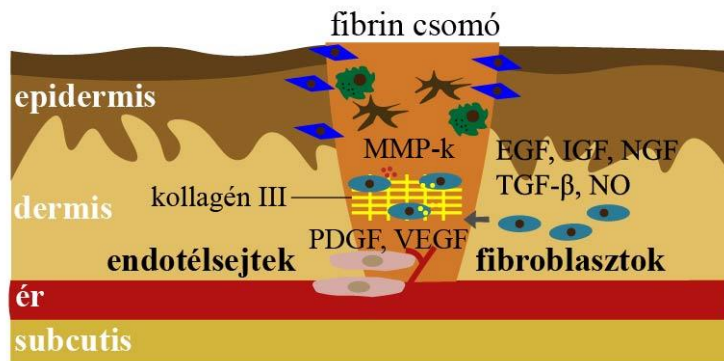
Miután a szövettörmelék és patogének fagocitózisa megtörtént, a helyi gyulladós folyamat véget ér, és bár az adaptív immunrendszer működésének köszönhetően a B- és T-sejtek által késleltetett immunválasz jön létre, eközben már megkezdődik a sebgyógyulás proliferációs fázisa (6. ábra).



6. ábra A regeneráció folyamata: a gyulladós fázis. A hemosztázis befejeztével a neutrofil granulociták és monocitákból differenciálódott makrofágok bekebelezik a sérülés következtében keletkezett szövettörmeléket, valamint önállóan és az adaptív immunrendszer aktiválásával védik a szervezetet a patogénektől. Az immunrendszer védekező mechanizmusa a sérülés helyén és az egész szervezetben gyulladós folyamatot eredményez. Forrás: saját ábra

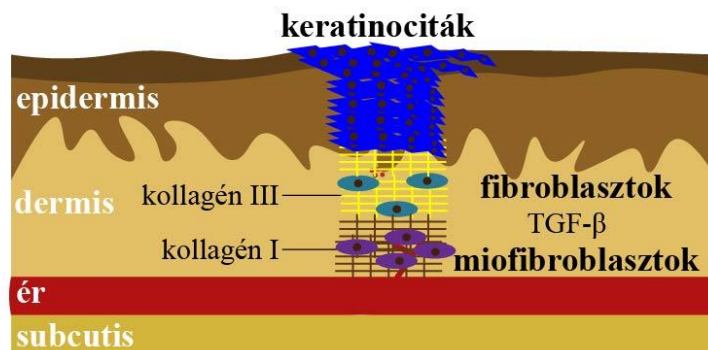
A proliferációs szakasz az epitelizációt, szövetgranulációt és angiogenezis folyamatát foglalja magába. A szöveti sérülést követő néhány órán belül az epitél réteg helyreállítása a keratinociták és a szőrtüszőkben felelhető epitél őssejtek proliferációjával és a sérülés felszínére történő migrációval kezdődik meg⁵⁸. A folyamatot többek között makrofágok által termelt nitrogén monoxid (NO), valamint az idegnövekedési faktor (NGF), az epidermális növekedési faktor (EGF), az inzulinszerű növekedési faktor (IGF-1), a TGF- β és a keratinocita növekedési faktor (KGF) irányítják. Az új erek képződése különösen fontos ahhoz, hogy az újraképződött szövet tápanyag- és oxigénellátása normálisan működjön. Az extracelluláris mátrixból és a seb epitél rétegéből származó vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), és a vérlemezke eredetű PDGF, valamint a fibroblaszt növekedési faktor (bFGF) a trombinnal együtt aktiválják az erek belső falát borító endotélsejteket, melyek proteolitikus enzimeket termelnek⁵⁹. Az enzimek feloldják a bazális réteget, így az endotélsejtek a frissen képződő szövetbe migrálnak, és az ott található simaizomsejtekkel helyreállítják az érhálózatot. Ezzel egyidejűleg a csontvelőből származó endotél progenitor sejtek is migrációba kezdenek a frissen képződő szövet irányába, ahol új ereket hoznak létre^{60,61}.

A véralvadási folyamat során kialakult fibrinmátrix helyét a proliferációs fázis végén granulációs szövet helyettesíti, mely nagy számú fibroblasztot, makrofágot, granulocitát tartalmaz kollagén mátrixba ágyazva. A granuláció során a hemosztázis alatt kialakult fibrinhálóba tapadt vérlemezkék és makrofágok által termelt PDGF és TGF- β , valamint a fibrin és fibronektin stimuláció hatására fibroblasztok migrálnak a mátrixba. A fibroblasztok letapadnak és proliferálódnak a fibrinhálóban, majd mátrix metalloproteinázokat (MMP) termelnek, melyekkel lebontják a fibrin mátrixot és III-as típusú kollagénnel, fibronektinnel, hialuronsavval, glükózaminoglikánokkal töltik ki a fibrin mátrix helyét. A fibroblasztok által előállított mátrix ezután vázát képez a szöveti átépülés során odaérkező sejtek számára⁶² **(7. ábra)**



7. ábra A regeneráció folyamata: a proliferációs fázis. A fázis három folyamatot foglal magában, melyek az epitelizáció, szövetgranuláció és angiogenezis. Ennek során keratinociták, fibroblasztok és endotélisejtek migrálnak a fibrin csomóba. A keratinociták a bőrfelszín regenerációjáért felelősek, a fibroblasztok lebontják a fibrint és kollagén III-mal töltik ki a helyét, míg az endotélisejtek az új vérerek létrehozásáért felelősek. Forrás: saját ábra

A granulációs szövetben lévő fibroblasztok a mechanikai feszültség, valamint a TGF- β hatására miofibroblaszttá differenciálódnak, és α -simaizom aktint termelnek, amely összehúzza a sebet. A sebet kitöltő, fibroblasztok által termelt III-as típusú kollagént, jóval nagyobb szakítószilárdságú I-es típusú kollagén helyettesíti, melynek termelődése hosszabb időt vesz igénybe, majd a miofibroblasztok apoptózissal megsemmisülnek, és eltűnnek a szövetből. Az angiogenezis lassan leáll, és helyreáll a normál szöveti működés⁶³ (8. ábra).



8. ábra A regeneráció folyamata: az átépítési fázis. Az átépítés a fibroblasztok miofibroblaszttá való differenciációjával zárul, melyek az általuk szintetizált III-as típusú kollagén révén új, stabil szövetet hoznak létre. Forrás: saját ábra

1.3. Vérszeparátumok alkalmazása a regeneratív orvostudományban

1.3.1. Vérlemezkében gazdag plazma (PRP)

Az aktivált vérlemezkék által kibocsátott, főleg α -granulum eredetű fehérjék regeneratív hatását az orvosi gyakorlatban vérszeparátum termékek, többségében vérlemezke preparátumok izolálásával hasznosítják⁴⁶.

A PRP egy autológ vérszeparátum, melynek előállítása során alvadásgátlót tartalmazó műanyag vérvételi csőben vénásvért egy vagy két lépésben centrifugálnak. Az első lépésben szeparálják a fehérvérsejt és vérlemezke tartalmú plazmát a vörösvértest frakciótól, a második centrifugálás során a plazmában lévő vérlemezkéket ülepitik a cső aljára, és a plazma folyadék részét csökkentik, így egységnyi térfogatú plazmában nő a vérlemezkék száma⁶⁴. Míg a vérben a trombociták átlagosan $150-400 \times 10^3/\mu\text{l}$ koncentrációban vannak jelen, addig a PRP-ben átlagosan $2-3 \times 10^6/\mu\text{l}$ koncentrációban találhatók meg, bár utóbbinál a trombocitaszám nagyban függ az izolálási módtól^{65,66}. A PRP preparálás során utolsó lépésként általában aktiválják a vérlemezkéket, így a vérlemezkék α -granulum tartalma hatékonyabban képes az extracelluláris térbe ürülni⁶⁷ (9. ábra).



9. ábra Vérlemezkében gazdag plazma (PRP) előállítása. A vénásvért alvadásgátló csőbe gyűjtik, melyet ezután általában két lépésben centrifugálnak. Az első során elkülönítik a plazmafrakciót a vörösvértest frakciótól, míg a második centrifugálás során dúsítják a vérlemezkék számát egységnyi térfogatú plazmában. Forrás: saját ábra

Az így előállított PRP több, mint 1500 féle fehérje alapú bioaktív molekulát tartalmaz, melyek funkciójukat tekintve adhéziós fehérjék, angiogenikus faktorok, növekedési faktorok, immun mediátorok, kemokinek, citokinek, és véralvadási faktorok **(1. táblázat)** ^{68,69}.

1. táblázat PRP-ben található, regeneratív hatású növekedési faktorok.

Forrás: Pavlovic V. és mtsai 2016. 244.

Név	Rövidítés	Funkció
Fibroblaszt növekedési faktor	FGF	Fokozza az MSC, porcsejt és oszteoblaszt proliferációját és utóbbi kettő differenciációját
Epidermális növekedési faktor	EGF	fokozza az epitél sejtek proliferációját és differenciációját
Inzulinszerű növekedési faktor	IGF	fokozza a sejtproliferációt és differenciációt a csontokban és erekben, fokozza a kollagénszintézist
Transzformáló növekedési faktor-béta	TGF- β	fokozza az I-es típusú kollagénszintézist, az angiogenezist, az immunsejtek kemotaxisát, valamint gátolja a csontban az osteoklaszt képődést
Vérlemezke eredetű növekedési faktor	PDGF	fokozza a kollagénszintézist, a csontsejtek proliferációját, a fibroblasztok kemotaxisát és proliferációját, valamint a makrofág aktivációját
Vaszkuláris endoteliális növekedési faktor	VEGF	fokozza az endotélsejtek proliferációját, az angiogenezist, a makrofágok és neutrofilek kemotaxisát, valamint az erek permeabilitását

A PRP használata a klinikumban és kutatási szinten is széles körben elterjedt mára. Alkalmazása a sebgyógyításban és ortopédiában a legelterjedtebb, utóbbi területen alkalmazzák többek közt porc, csont, izom és ízületi szalag regenerációra műtétek során, valamint ízületi részbe adva injekció formájában ⁷⁰⁻⁷⁵. Az ortopédiai használaton kívül sikeresen alkalmazták már endometriózis és vitiligo kezelésére és krónikus bőrfekély kezelésére is ⁷⁶⁻⁸⁰.

A PRP széleskörű és sikeres használatának ellenére számos hátrányos tulajdonsággal rendelkezik. A legfőbb gondot az izolálás standardizálásának hiánya jelenti, mivel több mint 40-féle egymástól eltérő protokoll és kit áll rendelkezésre ⁸¹. Az izolálás módja már a vérvételnél eltér a használt véralvadásgátlók fajtájában, valamint az egyes protokollok különböző sebességen és intervallumban történő centrifugálási lépéseket tartalmaznak, sőt a vérlemezkék aktiválása is több módon lehetséges ⁸². Ennek eredményeképpen a végtermék térfogata, a vérlemezke és fehérvérsejt száma, valamint a növekedési faktorok koncentrációja is eltérhet ^{64,83}.

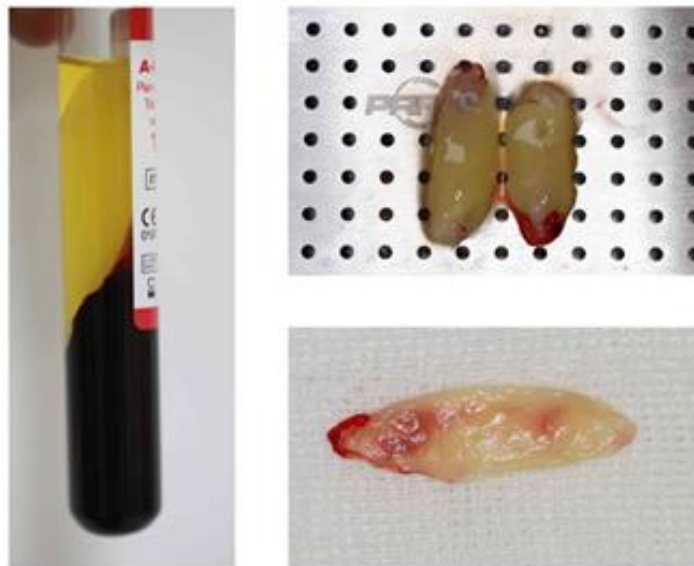
A vérvételhez használt, zárt vákumcső véralvadásgátlóként általában etilén-diamin tetraecetsavat (EDTA), citrátot – ezen belül nátrium-citrát, citrát + dextróz-A (ACD-A), citrát + foszfát + dextóz (CPDA-1)- vagy heparint tartalmaz. Az EDTA és citrát a kalcium ionok megkötésével gátolja az alvadást, míg a heparin az antitrombin III-val való komplexképzés révén gátolja a trombin létrejöttét. A szakirodalom számos információt tartalmaz a véralvadásgátló szerek összehasonlításáról, előnyeiről, hátrányairól. Az EDTA és citrát használatának fő hátránya, hogy felborul a PRP és vérplazma ionegyensúlya, mivel mindkettő kelát képző, és megköti a kétszeresen pozitív ionokat ⁸⁴. Bár az EDTA-val jóval több vérlemezke különíthető el, mivel a plazma és vörösvértest frakció élesebben elhatárolódik, mint citrát használata közben, szakirodalmi adatok szerint az EDTA szignifikánsan növeli a vérlemezkék átlagos térfogatát (MPV), melyből a vérlemezkék funkciójának romlására következtethetünk ^{83,85}. Szintén szakirodalmi adatok szerint az EDTA erősebb gátló hatást fejt ki a vérlemezkék aggregációjára, mint a citrát és heparin ^{83,86}. Az ACD-A és heparin PRP-t összevetve megállapították, hogy az ACD-A PRP injekció beadása kisebb fájdalommal jár, mint a heparinos PRP beadása ⁸⁷. Ezentúl az ACD-A PRP-ben a vérlemezkék jobban megőrizték struktúrájukat és inaktivált állapotukat, mint a nátrium citráttal és heparinnal előállított PRP-ben ⁸⁸.

A legtöbb izolálási eljárás aktiválja a PRP-ben lévő vérlemezkéket, de előfordul olyan protokoll is, ahol nem alkalmaznak aktiválást ⁷³. Az aktiválás történhet trombinnal és/vagy kalcium-kloriddal, avagy hőmérséklet változással ^{67,89}. A trombin és kalcium-klorid az alvadásgátlók hatását képes feloldani, míg a hőmérséklet különbség a vérlemezkék membránjának károsításával éri el, hogy fehérjetartalmuk az extracelluláris térbe ürüljön. Mint korábban említettem, a végtermék fehérvérsejt száma is eltérő lehet. Ez alapján a PRP két típusát különböztethetjük meg, a fehérvérsejtekben szegény PRP-t (P-PRP) és a fehérvérsejtben gazdag PRP-t (L-PRP) ⁹⁰. A fehérvérsejt tartalom hatásával kapcsolatban ellentétes vélemények találhatók a szakirodalomban. Bár a neutrofilek és makrofágok segítenek a szövettörmelék eltakarításában, valamint utóbbi képes a regenerációban fontos szerepet játszó növekedési faktorok szekretálására (TGF- β 1, PDGF, VEGF, IGF-1, EGF), a fehérvérsejtek által nagy mennyiségben termelt gyulladáskeltő molekulák felerősíthetik a sérült szövet gyulladós állapotát ⁹¹⁻⁹⁴. Az izolálás rengeteg variációján túl további hátrányt jelent az, hogy a PRP szervezetbe való beadásával az alvadásgátlók és az aktiválásra leggyakrabban használt trombin és kalcium szintén bekerül a szervezetbe, mely nem várt mellékhatásokat okozhat ^{64,85}.

1.3.2. Vérlemezkében gazdag fibrin (PRF)

A PRF a PRP számos hátrányát képes kiküszöbölni. A PRF előállítását elsőként Choukroun és munkatársai írták le 2001-ben. Izolálása során üvegfalú (vagy szilícium-dioxid bevonatú) csőbe levett vért azonnal, egylépésben centrifugálnak 3000 rpm-en, 5-10 percig, így a vér alvadás közben szétválik a csőben alul található vörösvértest frakcióra és a felső fibrincomóra ⁹⁵. Az üvegfelülettel érintkezve a vérlemezkék aktivált állapotba kerülnek és granulomtartamukat kibocsájtják a fibrincomóba. Előállításához sem véralvadásgátlóra, sem vérlemezke aktivátorra nincs szükség, és a módszer egyszerűen standardizálható a megfelelő centrifugális erő, és centrifugálás idő intervallumának fixálásával ⁹⁶. Ennek ellenére a PRF nem alkalmas a PRP teljes körű helyettesítésére, mivel a végtermék egy kompaktabb, 3D-s zselé, mely injekcióval nem adható be ⁹⁷. (Bár az utóbbi három évben Choukroun és munkatársai az eredeti PRF-et átnevezték L-PRF-re, azaz leukocitát tartalmazó PRF-re, és a protokoll megváltoztatásával létrehoztak egy úgy nevezett I-PRF-et, mely beinjektálható. Azonban a tudományos világ többnyire még csak az eredeti protokoll alapján előállított verzióra hivatkozik PRF-ként ⁹⁶⁻⁹⁸.) A PRF-et eredetileg fogászati alkalmazásra fejlesztették, ahol

a szubmandibuláris csontpótlást követően az ínyn keletkezett sérülés pótlására és regenerálására használták, mivel a PRF növeli az ínsejt fibroblasztok (hGF) adhézióját és proliferációját in vitro körülmények között⁹⁹⁻¹⁰¹. Legtöbb esetben a műtéti beavatkozás előtt a PRF csomóból kinyomják, vagy hagyják kicsepegni egy pórusokkal teli felületen a szérumot, hogy egy stabilabb membránt kapjanak, melyet aztán a szövetsérülés helyére varrnak be. A PRF membrán szakszerű és egyszerű előállítására kitek állnak az orvosok rendelkezésére, melyek tartalmazzák a szükséges vérvételi csöveket, a csövekkel kompatibilis centrifugát, valamint a PRF csomó folyadéktartalmának eltávolításához szükséges eszközöket^{102,103} **(10. ábra)**.



10. ábra A PRF membrán előállítása. Üvegcsőbe történő vérvételt és centrifugálást követően, a kialakult fibrincomót kivesszük, összepréseljük, majd a visszamaradó membránt szövetregenerációs célokra használják fel.

Forrás: Yingdi Zhang et al. 2018. 2281.

A fogászati alkalmazáson kívül a PRF membránt az ortopédiában csontpótlásra, meniszkuszregenerálásra, izom- és szalagregenerálásra is előszeretettel használják¹⁰⁴⁻¹⁰⁶. Továbbá szerkezetének és dermális fibroblasztokra gyakorolt pozitív sejtproliferációs hatásának köszönhetően a sebgyógyítás területén is sikeresen alkalmazható¹⁰⁷. Csontpótlás során Li Q. és munkacsoportja kimutatta, hogy a fagyasztva szárítás növeli a PRF membrán pozitív hatását. A liofilizált membrán fokozatosabban, hosszabb időn keresztül bocsájtja ki a növekedési faktorokat, és erősebb oszteogénikus hatással rendelkezik, mint a friss PRF membrán. A fagyasztva szárítás nem befolyásolja negatívan

a biofaktorok stabilitását, a fibrin szerkezetét és klinikai használhatóságát a szakirodalom szerint ¹⁰⁸.

Egyértelmű regeneratív hatása és a PRP-vel szemben lévő számos előnye mellett a PRF membrán előállítás és klinikai felhasználása során is felmerülnek máig még megoldatlan problémák. Egyrészt a steril csőből való kivétel után a membránt a műtőben, rendelőkben szepsztikus körülmények között preparálják, mely a műtétet követően a szövetek felülfertőzősését okozhatja ¹⁰⁹. Másrészt a PRF csomóból történő folyadék eltávolításával létrehozott membrán szakítószilárdsága gyenge, nehezen varrható. Ezenfelül a PRF membrán biológiai bomlásában szerepet játszó plazmin enzim és a felületén letapadt, majd belsejébe migrált sejtek együttes hatására a membrán gyorsabban bomolhat le, mint ahogy a szövet átépülne, mely elégtelen regenerációhoz vezethet ^{110,111}.

1.3.3. Autológ kondicionált szérum (ACS)

Az autológ kondicionált szérum egy a PRP és PRF alapján készült termék, mely az „Orthokine” fantázia néven vált ismertté. Lényege, hogy egy speciális üvegyöngyöket tartalmazó fecskendőbe teljes vénás vért vesznek, majd a vért 6-9 órán át inkubálják 37°C-on, hogy a vérben lévő monociták az üveggel érintkezve aktiválódjanak és az IL-1 receptor antagonist (IL-1 RA) molekula nagy mennyiségben felszabaduljon ¹¹². Ez a molekula képes az oszteoarthritiszban (OA) szerepet játszó IL-1 molekula receptorhoz kötődését megakadályozni, így a degeneratív folyamatokat lassítani és a fájdalmat csökkenteni. A megalvadt vért az izolálás végén centrifugálják, a szérumot leszívják és átszűrrik sterilizálás céljából, majd az OA-es betegek térdízületi részébe injektálják. Bár rövidtávon sikeres tanulmányokat készítettek használatáról, melyben csökkentette az OA-es betegek fájdalmát, hosszútávon nem sikerült pozitív hatást kimutatni és több tanulmány igazolta, hogy a placebónál nem fejtett ki jobb hatást ¹¹³. Ennek oka lehet, hogy az IL-RA és egyéb gyulladásgátló molekulán (TGF- β , IL-4) kívül számos gyulladáskeltő molekula (TNF- α , IL-1 β , IL-6) is felszabadul az inkubáció közben, melyek gyulladásba hozhatják az ízületet ¹¹⁴⁻¹¹⁶.

1.3.4. Hiperakut szérum

A hiperakut szérum, vagy más néven vérlemezkében gazdag fibrinből származó szérum (SPRF), mint neve is jelzi, az üveg vérvételi csővel izolált PRF csomóból kinyert szérum, melyet Dr. Lacza Zsombor és kutatócsoportja szabadalmaztatott. A hiperakut szérum

egyesíti a PRP és PRF előnyeit, viszont in vitro kísérletekben az EDTA PRP-nél jóval hatékonyabbnak bizonyult. Korábbi kísérleteink alapján a hiperakut szérum szignifikánsan növeli a BM-MSK, oszteoblasztok és OA-es porcsejtek proliferációját sejtenyészetben a PRP-hez képest, valamint szignifikánsan növeli az MSC-k oszteoblaszt irányú differenciációját OA-es femur csontvelő explantokban, szintén az EDTA PRP-hez képest¹¹⁷⁻¹²⁰. Korábbi kísérletek során a hiperakut szérum összetételét Proteome Profiler analízissel vizsgáltuk és hasonlítottuk össze a vérszérum, vérplazma és EDTA PRP összetételével. Eredményeink szerint az angiogenikus, anti-angiogenikus fehérjék és citokinek közül összeségében a PRP tartalmazta a legnagyobb mennyiségű fehérjét, majd a hiperakut szérum, plazma és szérum következett a sorban. Továbbá megállapítható volt, hogy a PRP inkább angiogenikus természetű fehérjéket, míg a hiperakut szérum angiogenezist gátló molekulákat tartalmaz nagyobb mennyiségben. Mivel a Proteome Profiler kvantitatív mérésre, és statisztikára nem alkalmas, pontos következtetést nem tudunk belőle levonni az összetételről¹²¹. Az előzetes kísérletek alapján a hiperakut szérum minden esetben szignifikánsan jobbnak mutatkozott a PRP-nél in vitro sejtes kísérletekben, viszont a pontosabb összetétel, és oszteoartritikus szövetekre gyakorolt hatásának ismeretéhez további vizsgálatok szükségesek, hogy humán vonatkozásban is biztonságosan alkalmazható legyen.

1.4. Regeneratív terápiás megoldások a térdízület oszteoarthritisz kezelésében

1.4.1. Az oszteoarthritisz patomechanizmusa és tüneteti

Az OA a leggyakrabban előforduló ízületeket érintő degeneratív betegség. A világ populációjának 15%-át érinti, míg az Egyesült Államokban az emberek 37,5 %-a szenved tőle. Bármilyen ízületben kialakulhat, de leggyakrabban a csípő és térdízületet érinti¹²². A betegség kialakulásának okai nem pontosan ismertek, de szerepet játszhat az életkor (65 év feletti a betegnek nagy része), genetikai tényezők, az elhízás, mozgásszegény életmód, valamint a térdízületet ért sérülések¹²³. A tünetek közé tartozik a krónikus ízületi fájdalom, merevség, ízületi instabilitás és deformitás. A betegség fő tüneteinek sokáig a degenerálódó, hiányos porcfelszint tekintették, de mára már jól ismert tény, hogy egész ízületet érinti, beleértve a szinóviumot, a szalagokat, a szubkondrális csontot és a meniszkuszt¹²⁴.

1.4.1.1. A porcszövetben bekövezhető változások

Az egészséges felnőtt porc extracelluláris mátrixból (víz, kollagén, proteoglikán, kalcium) és porcsejtekből áll. Az egészséges porcszövet épülésének és lebomlásának folyamatát és sebességét a proteolitikus enzimek -többet között az MMPk-, a szöveti mátrixmetalloproteináz gátló fehérjék (TIMP) és az extracelluláris mátrix fehérjék termelődésének egyensúlya szabályozza ¹²⁵. Az OA esetén a porcsejtek normál homeosztázisa felborul, és az egyensúly eltolódik a proteolízis irányába, mely a gyorsabb bomlás és lassú mátrix szintézis okán, valamint a gátolt TIMP fehérjék miatt hiányos, degradált porcfelszínhez vezet. A homeosztázis felborulásának oka máig nem ismert, annyi bizonyos, hogy az ízület gyulladása és a porcfelszín ért traumák elősegítik ennek kialakulását. A kollagén és proteoglikán bomlásból származó molekulákat a szinoviális membrán makrofágjai felveszik és hatásukra gyulladáshoz vezető citokineket kezdenek termelni, főként IL-6, IL-1 β , TNF- α , IL-8 és IL-17 fehérjéket ¹²⁶. A gyulladáskeltő molekulákat a porcsejtek képesek sejtfelszíni receptorokon megkötni, mely tovább gátolja a II-es típusú kollagén termelődését, valamint fokozza az MMP-k keletkezését és indukálja a kondrociták apoptózisát ¹²⁴.

1.4.1.2. A szinoviális membránban bekövetkező változások

Az sem pontosan ismert, hogy a szinoviális belhártya gyulladása megelőzi vagy követi a porc és szubkondrális csontban kialakult változásokat. Mint korábban említettem, a porcdegradáció során keletkező molekulák képesek aktiválni a CD68+ makrofág típusú szinoviocitákat, melyek gyulladáshoz vezető molekulákat termelnek (főként IL-6, IL-1 β , TNF- α), mely egyrészt tovább bontja a porcszövetet, másrészt az immunrendszert aktiválva a szinoviális membrán gyulladását idézik elő ¹²⁷ (**11. ábra**). A porc és szinoviális fibroblasztok általi fokozott IL-1 β termelés hatására az IL-1RA szintje lecsökken a szövetekben. Korábbi tanulmányokban fokozott IL-1 receptor I (IL-1RI) expressziót figyeltek meg a porcsérülésekhez közeli porcsejtek felszínén, valamint a szinoviális fibroblasztokon, mely az IL-1 β megnövekedett kötődéséhez vezetett. Állatkísérletekben kimutatták, hogy az IL-1 β fokozza a sejtek metabolikus funkcióját, például az MMP-1, 3 és 13 expresszióját kondrocitákban, valamint elnyomja a porcsejtek anabolikus funkcióit, mely a gátolt kollagén II termelésben nyilvánul meg ^{124,128}.

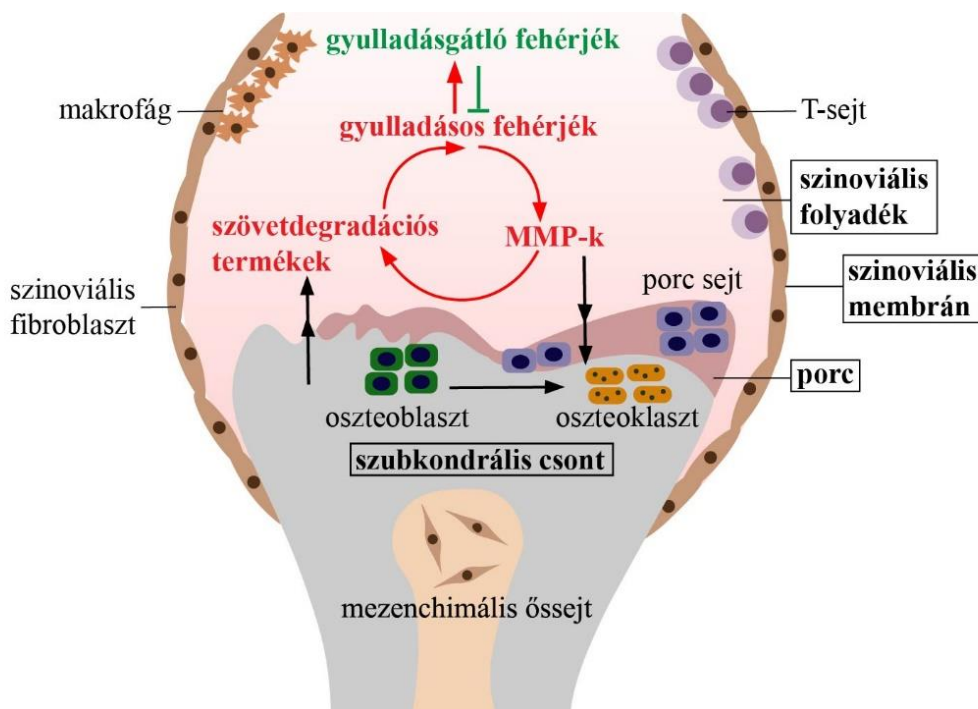
A TNF- α az IL-1 β citokinnel szinergikusan hat és hatásmechanizmusuk is hasonló. Receptora fokozottan expresszálódik porcsejteken, és fokozott termelődése gátolja a proteoglikán szintézist, stimulálja az MMP-1, 2, 3, 9 és 13 termelődését, továbbá gátolja a szöveti mátrix metalloproteináz gátló fehérje (TIMP) termelődését. Az IL-6 citokin korábbi tanulmányok szerint a TNF- α az IL-1 β citokinek hatására kezd termelődni és szintén növeli a porcsejtek katabolikus aktivitását, az MMP-1, 3 termelődést, valamint gátolja a kollagén II szintézist¹²⁷. A három fő citokin mellett számos gyulladáscsökkentő citokin (IL-2, IL-4, IL-5, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IL-18, IL-21, leukémia gátló faktor (LIF)), kemokinek (CCL-1, 2, 3, 5, fraktalkine, CXCL-10) és adipokinek (onkosztatin-M (OSM), rezisztin) játszanak szerepet az OA immunpatológiájában és patomechanizmusában, melyeket a makrofágok, szinoviociták, oszteoblasztok, BM-MSK-k és porcsejtek mellett az adaptív immunrendszer sejtjei is termelnek¹²⁵. Ezek nagy része ígéretes lehet az OA diagnózisában, stádiumának megállapításában, valamint potenciális terápiás targetként. A természetes immunválasz mellett adaptív és humorális immunválasz is kialakul szinovitiszben, melyre a szinoviális membránba infiltrálódott CD 3+ T-sejtek (mind a CD 4+ helper és CD 8+ citotoxikus T-sejtek), valamint a B-sejtek a bizonyíték. Sőt a szinoviális folyadékából számos porcdegradációs fehérje ellen termelődött antitestet sikerült kimutatni korábbi tanulmányokban OA-es betegek szinoviális folyadékában¹²⁹.

1.4.1.3. A szubkondrális csontban bekövetkező változások

Máig nem világos, hogy a szubkondrális csontrétegben bekövetkező változások megelőzik-e a porcdegradációt, vagy annak okaként alakulnak ki. A két folyamat szoros együttműködését jelzi a porc oligomer mátrix fehérje (COMP) és csont szialo fehérje (BSP) mennyiségének együttes növekedése korai OA-ban¹²⁶.

A szubkondrális csont tulajdonságait a remodelláció és modelláció egyensúlya határozza meg. A remodelláció során a csontszövet bomlik és helyén új szövet keletkezik, tehát átépül a szövet, míg a modelláció során a csont szerkezete és térfogata változik. A szubkondrális csontban bekövetkező szklerotikus változásokat és csontvelőléziókat, cisztákat MRI-vel lehet detektálni. A csontvelőléziók, fibrózis és nekrozis mind a csont fokozott metabolikus aktivitásának markere, jelenlétük további porcdegradációhoz vezet. A csontvelő elváltozások helye és progressziója összefüggésbe hozható a porcdegradáció súlyosságával és helyével. A csontvelőciszta kialakulásának folyamata még nem pontosan ismert, de feltehetően a teljesen degradált porcfelszín helyén a

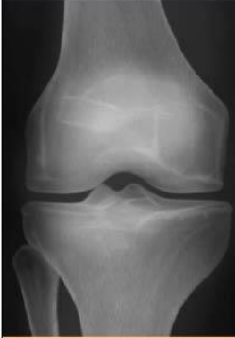
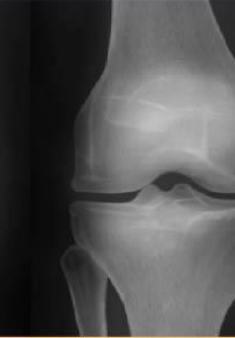
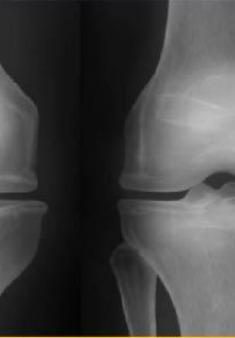

csontvelőbe szivárgott szinoviális folyadék miatt kialakult megnövekedett intraartikuláris ízületi nyomás okán alakul ki. A szubkondrális csont felső részének folyamatos vastagodása, és szerkezeti változása figyelhető meg, és az ízületi porcszéléken új csontnövekedés indul meg, melyeket oszteofitáknak nevezünk^{130,131}. Az oszteoartritiszes csontban az I-es típusú kollagénszintézis fokozódik, azonban a kollagént alkotó láncok heterotrimerjének aránya felborul, mely hipomineralizációhoz vezet. A folyamat kialakulásáért az oszteoblasztok által termelt TGF- β 1 felelős. A megváltozott szerkezetű csont nem képes az őt érő terhelést megfelelően elnyelni és az ízületben elosztani, mely az ízület további deformitását okozza¹²⁴. A szinoviális membrán makrofágjai és fibroblasztjai által termelt IL-6, IL-1 β , TNF- α , és IL-17 citokinek a nukleáris faktor kappa B receptor ligand (RANKL) szintézist fokozva eltolják a RANKL/oszteoprotegerin (OPG) arányát, ami fokozza az oszteoklasztogenezist és gátolja az oszteoblasztok működését és ezzel a csontreszorpció irányába tolja el a csontanyagcsere folyamatát¹³² (11. ábra).



11. ábra Az oszteoartritisz patomechanizmusa. Az oszteoartritisz az ízület minden szövetét érinti, beleértve a porc-, csont- és szinoviális membránt. A gyulladásos fehérjék fokozott termelődése gátolt mátrix fehérjeszintézishez és emelkedett MMP expresszióhoz vezet, mely fokozott szöveti degradációt eredményez. Forrás: saját ábra

1.4.2. A térdízületi oszteoartritisz diagnózisa és terápiája

Az OA diagnózisának felállítására számos módszer áll rendelkezésre. Radiológiai módszerek közül a kontrasztanyagot CT és MRI alkalmas az ízületben bekövetkezett változások kiértékelésére. Ezekkel a módszerekkel detektálható az ízületi rés beszűkülése, a szubkondrális szklerózis, az oszteofiták, csontvelőléziók és ciszták jelenléte¹³³. A fenti tünetek megléte szerint egy egységes skála, a Kellgren és Lawrence osztályozási rendszer alapján sorolják a betegeket 4 különböző stádiumba, melyet az alábbi táblázat szemléltet¹³⁴. **(12. ábra)**.

			
1-es szint	2-es szint	3-as szint	4-es szint
ízületi rés esetleges beszűkülése, oszteofiták esetleges jelenléte	oszteofiták és enyhe szklerózis jelenléte, az ízületi rés látható mértékű beszűkülése	közepes nagyságú oszteofiták, az ízületi rés jelentős beszűkülése, szklerózis és esetleges ciszta képződés, ízületi deformitás	nagy oszteofiták az ízületi rés szinte teljes eltűnése, súlyos szklerózis, ciszták és ízületi deformitás

12. ábra Kellgren és Lawrence osztályozási rendszer. Az OA betegek súlyosság szerinti csoportba sorolása az ízületi rés beszűkülése, a szubkondrális szklerózis, az oszteofiták, csontvelőléziók és ciszták jelenléte alapján történik. Forrás: Joseph Antony et al. 2016. Conference Paper: International Conference on Pattern Recognition, ICPR 2016, alapján

A radiológiai vizsgálat mellett számos betegkérdőív is alkalmas az OA diagnosztizálására. A csípő- és térdízületnél a WOMAC (Western Ontario and McMaster Universities Arthritis) indexet használják a leggyakrabban, mely 33 kérdéssel igyekszik az ízületek érintettségét kideríteni. A beteg által észlelt tünetek, ízületi merevség, fájdalom és a mindennapi élet korlátozottságára maximum 100 pont adható, a magasabb pontszám jobb funkciót feltételez. A skála hibája, hogy alábecsüli az aktív életvitelű, fiatalabb személyek funkcionális korlátozottságát. Emiatt gyakran használják

a KOOS (Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score) tesztet. Itt is 100 pont a maximum elérhető, és a magasabb pontszám jobb funkciót feltételez ¹³⁵. A betegség következtében fellépő fájdalom felmérésére a VAS (Visual Analogue Pain Scale) tesztet szokás alkalmazni. A beteg egy 0-100-ig terjedő skálán jelöli meg önállóan az ízületi fájdalom mértékét ¹³⁶. A Lysholm-Tegner féle teszt alkalmas a mobilitás és a mozgástartomány beszűkülés detektálására. Szintén 100 pont a maximálisan elérhető, ahol minél magasabb az elért pontszám, annál jobb állapotban lévő ízületeket feltételezhetünk ^{137, 138}.

1.4.2.1. Konzervatív terápiás megoldások

Az OA diagnosztizálása után különböző konzervatív kezelésekre van lehetőség, viszont a betegséget gyógyítani jelenleg semmivel nem lehet, mindössze a fájdalmat és gyulladást tudják csökkenteni, és kitolni a protézis beültetés idejét ¹³⁹. Az egyszerű fájdalomcsillapítók mellett a paracetamol tartalmú gyógyszerek, nem szteroid gyulladásgátlók a COX-1 és COX-2 receptorokra hatva csökkentik a fájdalmat és gyulladást, de mellékhatásként gasztrointesztinális panaszok léphetnek fel. Az újabb COX-2 specifikus gyógyszerek kevesebb gasztrointesztinális panaszt okoznak, ellenben növelik az szívelégtelenség kockázatát. Kortikoszteroidokat is sikeresen alkalmaznak a fájdalom mérséklésére, azonban mellékhatásaik miatt hosszútávú kezelésre nem alkalmasak. Kiegészítő terápiaként, illetve megelőzés céljából nem vényköteles, gyógyszernek nem minősülő táplálékkiegészítők javasolhatóak, például a glükaminoglikán, proteoglikán, kondroitin-szulfát tartalmú készítmények ¹³³.

1.4.2.2 Intraartikuláris injekciók

Az OA-es betegek ízületében a szinoviális folyadék mennyisége gyakran lecsökken, összetétele megváltozik, így az ízületi porcfelszínborítás fokozott terhelésnek van kitéve, mely további degradációhoz vezet. Az így kialakult fájdalmat és porcdegradációt gyakran hialuronsavas (HA) injekcióval szokták csökkenteni az ortopédusok ¹⁴⁰. A hialuronsav a szinoviális folyadék fő összetevője, mely a tibia, femur és patella súrlódásának csökkentésében játszik fontos szerepet, így védve az egészséges porcfelszínt a sérülésektől. A hialuronsav injekciót általában heti egy alkalommal, akár 5-8 héten keresztül alkalmazzák. Szakirodalmi adatok szerint a WOMAC, KOOS, VAS teszteket

alkalmazva a betegek több, mint felénél (59%) csökkentette a fájdalmat valamint növelte a mobilitást a HA injekció ^{141,142}.

A hialuronsav injekció mellett széles körben elterjedt a PRP injekció térdízületi alkalmazása. Számos in vitro kísérletben vizsgálták a PRP hatásmechanizmusát OA-es térdízületben. Porcszövetben megnövelte az anabolikus funkciókat és lecsökkentette a katabolikus folyamatokat, segítve ezzel a porc átépülését, növelte a porcsejtek proliferációját és II-es típusú kollagén valamint egyéb mátrix fehérjék szintézisét ¹⁴³⁻¹⁴⁵. Az OA-es kondrociták apoptotikus jelátviteli útvonalának génjeinek expresszióját csökkentette, mely a porcsejtek apoptózisát gátolta a beteg szövetben ¹⁴⁶. A kondrociták és szinoviociták fő gyulladáshoz vezető molekulájának, az IL-1 β -nak, valamint a katalitikus hatású MMP fehérjék szintézisének csökkentésével, továbbá a HA szekréció növelésével javította a szinoviális folyadék összetételének minőségét. Az így megnövekedett viszkozitású szinoviális folyadék hozzájárult a porc felszín védelméhez ¹⁴⁷⁻¹⁴⁹.

Szakirodalmi adatok szerint a PRP az IL-1 β és TNF- α szekréció csökkentésével gátolta a COX-2 fehérje génexpresszióját, mely fájdalomcsökkenést eredményezett az ízületben ¹⁵⁰. A PRP a porcon és szinoviális membránon kívül a csontszövet regenerációját is elősegítette ¹⁵¹. Szignifikánsan növelte a humán oszteoblasztok proliferációját és differenciációját ^{152,153}. Az egyértelműen pozitív kimenetelű in vitro sejt és szövetkísérletek ellenére a klinikai tanulmányok eredményei egymásnak ellentmondóak. Számos kísérlet számolt be pozitív, gyulladáshoz és fájdalomcsökkentő hatásról, míg több eredmény szerint a PRP nem mutatott jobb hatást egyéb intraartikuláris injekciónál, avagy a placebónál. Sőt, néhány esetben gyulladást idézett elő és rontott a betegek állapotán ¹⁵⁴⁻¹⁵⁶.

Számos tanulmány készült a HA és PRP hatékonyságának összehasonlításáról, viszont az eredmények azonban eltérőek voltak. Egyes tanulmányok szerint a PRP injekció hetenkénti beadás után nagyobb hatékonysággal csökkentette a fájdalmat és tüneteket, valamint hosszabb ideig hatott, mint a HA injekció ¹⁵⁷⁻¹⁵⁹. Több kísérlet azonban a HA estében mutatott ki szignifikáns javulást. Viszont a PRP és HA injekció kombinációja minden esetben hatékonyabbnak bizonyult, mint egyenkénti használata. Az injekciók beadásának ideje eltérő volt a kísérletekben, volt, ahol kéthetenként egy-egy injekciót adtak be összesen háromszor és volt, ahol hetente adták be az injekciókat, de olyan is előfordult, ahol összesen két injekció beadása történt háromhetes szünet közbeiktatásával.

Szakirodalmi adatok alapján nincs jelenleg egységes rendszer a PRP injekciók beadását illetően ¹⁵⁹⁻¹⁶¹. Egyrészt a beadott PRP térfogata eltérő, kb. 2-6 ml között változik, az összesen beadott injekciók száma is eltérő, és az egyes injekciók beadása között eltelt idő is rendkívül széles skálán mozog. Legtöbb esetben csak 1 vagy 2 hetet vártak hasonlóan a hialuronsav injekcióhoz, de előfordult egyhónapos várakozás is. Az egységes alkalmazási protokoll problémáját tovább növeli a már korábban említett PRP előállításban előforduló egységesség hiánya, mely magában foglalja az eltérő ideig és fordulatszámon történő centrifugálást, az előállításhoz szükséges lépések számát és a vérelemek aktiválás módjában történő eltéréseket. A kezeléseknél használt PRP egy része tartalmazott leukocitákat, míg másik részében nem volt megtalálható fehérvérsejt ¹⁶².

A PRP mellett más vérszeparációs termékek is alkalmazhatóak OA-ban. A korábban említett ACS alkalmazása, mely az IL-1 β útvonal gátlásán alapszik, számos esetben gyulladást eredményezett és több tanulmány szól alkalmazása ellen ¹¹³. A szintén korábban részletezett hiperakut szérum in vitro sejtes és csontvelő explantos kísérletekben szignifikánsan növelte a porcsejtek, oszteoblasztok, BM-MSK-k proliferációját, valamint differenciációját és szignifikánsan jobb hatást fejtett ki a vizsgált szempontok alapján, mint a PRP, viszont in vivo alkalmazás még nem történt eddig ^{117,118}.

1.4.2.3. Műtéti megoldások

A degradálódott porcfelszín helyreállítására számos artroszkópos beavatkozás áll már rendelkezésre. Hátrányuk egyrészt az, hogy a betegség patomechanizmusába nem avatkoznak be, így az eredendő problémát nem képesek megoldani, valamint gyulladt szövetben ezek sem jelentenek hosszú távú megoldást. Alkalmazásuk csak kis területű porchiányok kezelésére alkalmas. 2 cm²-nél kisebb hiányok kezelésére a mikrofraktúrát lehet alkalmazni, melynek során egy hegyes eszközzel fúrást végeznek a porcon és csonton át a csontvelőig. Így a BM-MSK-k vérrrel keverve kiáramlanak, és a bealvadt vérbe tapadva, a vérrögben lévő fibrinhálót 3D-s vázként használva elszaporodnak és kitöltik a teret, közben pedig kondrocitává differenciálódnak. A módszer problémája, hogy az így kialakult rugalmasrostos jellege miatt a porc mindössze pár évig alkalmas az ízületre nehezedő tehernek ellenállni ¹⁶³⁻¹⁶⁵. Kis és közepes nagyságú hiányok pótlására alkalmas a mozaikplasztika, melynél a beteg saját csontos porc rétegéből henger alakú explantokat izolálnak egy nem terhelő régióból és átültetik a terhelő régióban lévő porchiány helyére.

Bár itt a porc hialin jellegge megmarad és ellenáll a későbbi terhelésnek, az eltávolítás helyénél később panaszokat okozhat az így ott fellépő hiány¹⁶⁶.

Az autológ kondrocita implantáció (ACI) akár 10 cm² terjedelmű hiányok pótlására alkalmas. Ennek során azonban két artroszkópos beavatkozásra is szükség van. Először eltávolítanak egy rizsszemnyi nagyságú porcós részt, melyből steril laboratóriumi körülmények között kollagenáz, pronáz, esetleg tripszin enzimekkel izolálják a porcsejteket, melyeket felszaporítanak steril laboratóriumi körülmények között, majd egy második műtét alkalmával egy mesterséges vagy természetes módon előállított hártát varrnak a porchiány felszínére és befecskenedezik alá a porcsejt szuszpenziót. A módszer laboratóriumi része rendkívül költséges és a képződött új szövet szintén rostos jellegű, kevésbé teherbíró¹⁶⁷⁻¹⁶⁹.

Az előző módszer továbbfejlesztett változata a mátrix asszociált kondrocita implantáció (MACI). A módszer annyiban változik az ACI-hoz képest, hogy az izolált porcsejteket egy 3D-s polimerhálóra, vázra ültetik és azon növesztik, majd ezt varrják és ragasztják be a porchiány helyére. A probléma az előzőnél is magasabb laboratóriumi költség, valamint a rostos jellegű porc kialakulása¹⁷⁰⁻¹⁷³.

A fent leírt módszerek a klinikumban már használt, meghonosodott módszerek, azonban számos még klinikai kísérleti vagy in vitro kísérleti fázisban lévő technika létezik. Előszeretettel használják a BM-MSK-t injekció formájában vagy 3D-s vázra növesztve önmagukban, avagy porcsejtekkel keverve¹⁷⁴. A felnőttkori zsír- és BM-MSK-k megfelelő szöveti körülmények hatására képesek csont-, porc-, izom-, zsír- és idegsejteké differenciálódni. Porcszövetbe jutattatva az MSC-k először proliferálódnak és kondroprogenitor sejtekké differenciálódnak, majd tovább differenciálódnak és érés után kondroblasztá, majd kondrocitává alakulnak¹⁷⁵.

A kondrogenézist fokozni lehet külsőlegesen hozzáadott faktorokkal, mint az FGF-2 és 18, TGF- β , PDGF, IGF-1. Mivel a legfontosabb faktorok megtalálhatóak a vérben, pontosabban a vérlemezkék α -granulumban, a PRP és PRF rendkívül hatékonyan alkalmazhatók ilyen célokra is. Számos állatkísérletben sikerrel használtak PRF-re ültetett és PRP-be szuszpendált MSC-ket porc regenerálásra^{106,176,177}.

1.4.3. In vitro modellek használata az oszteoarthritisz tanulmányozásában

Az OA patomechanizmusának, valamint az OA kezelése hatásának tanulmányozására számos in vitro sejt és szövetmodellt használnak a szakirodalomban mind állat, mind

humán vonalon. A legtöbb modell egy sejttípust alkalmazó egy sejtréteg kultúrájából áll, vagy több sejttípus kokultúrájából tevődik össze, melyeket vagy OA-es szövetből izolálnak, vagy mesterségesen, citokinek hozzáadásával keltenek OA-szerű patológiás állapotot a sejtekben ¹⁷⁸⁻¹⁸⁰. A felhasznált sejtek típusa változatos kombinációkban porcsejt, oszteoblaszt, MSC, szinovociták, makrofágok és egyéb immunsejtek lehetnek. Az így előállított modellek konkrét problémák vizsgálatára alkalmasak, mint az egyes sejttípusok proliferációjának, génexpressziójának vizsgálata. Bár meglehetősen egyszerű és olcsó az előállításuk, felépítésük és molekuláris, valamint sejtes működésük nem közelíti meg a valódi izületét, így a betegség okait és a kezelések hatékonyságát csak pár szempont alapján vizsgálják. Ezek alapján egy konkrét OA kezeléssel sem a hatékonyságot, sem pedig a hatásmechanizmust illetően nem lehet pontos következtetést levonni. Állatokból izolált sejteknél ez a probléma tovább fokozódik a fajok közötti eltérések miatt ¹⁸¹.

A fentiéknél korszerűbb és pontosabb vizsgálatokra alkalmasak a 3D vázakon tenyésztett sejtek, valamint a szövetexplantok. Ezek fenntartása bonyolultabb és jóval költségesebb, a bennük végzett vizsgálatok standardizálása pedig problémásabb. Viszont pontosabb képet adnak a 2 dimenziós egysejtréteg kultúra és kokultúra modelleknél. Az explant kultúráknál használt szövetek még nagyobb arányban származnak állatból – egér, patkány, nyúl, marha, kutya, disznó - mint a sejtes kísérleteknél, melynek főként etikai okai vannak. Az egyes in vitro modellek előnyeit és hátrányait a következő táblázatban foglaltam össze ¹⁸²⁻¹⁸⁷.

2. táblázat Az oszteoarthritisz kutatásban alkalmazott in vitro rendszerek előnyei és hátrányai. Forrás: Cope P.J. és mtsai. 2019. 231.

Modell típusa	Előnyök	Hátrányok
2D egy sejtrétegű sejtenyészet	- olcsó - és hosszú ideig fenntartható	- extracelluláris mátrix hiánya - 2D-ben a sejtek viselkedése és fenotípusa eltér a szövetben lévő sejtektől, könnyen dedifferenciálódnak a sejtek - a különböző sejtípusok közötti kommunikáció nem vizsgálható
2D Kokultúra	- olcsó - könnyen és hosszú ideig fenntartható - eltérő sejtípusok közötti kommunikáció is vizsgálható	- extracelluláris mátrix hiánya - 2D-ben a sejtek viselkedése és fenotípusa eltér a szövetben lévő sejtektől, könnyen dedifferenciálódnak a sejtek
3D monokultúra	- extracelluláris mátrix megléte, és a sejtek 3D-ban történő növekedése miatt közelebb van a fiziológiához a sejtek fenotípusa és differenciáltsága	- költségesebb - rövidebb ideig fenntartható - különböző sejtípusok közötti kommunikáció nem vizsgálható
3D kokultúra	- extracelluláris mátrix megléte, és a sejtek 3D-ban történő növekedése miatt közelebb van a fiziológiához a sejtek fenotípusa és differenciáltsága - eltérő sejtípusok közötti kommunikáció is vizsgálható-	- költségesebb - rövidebb ideig fenntartható - nehezebben standardizálható mérések

Explant monokultúra	- a sejtek eredeti környezetben vannak jelen, így fenotípusuk, differenciáltságuk nem veszít eredeti állapotából - egy szöveten belüli sejtek közötti kommunikáció vizsgálható	- költségesebb - limitált ideig fenntartható - gyakori sejtnekrózis a szövet belsejében - nehezebben standardizálható mérések - különböző szövettípusok közötti kommunikáció nem vizsgálható
Explant kokultúra	- a sejtek eredeti környezetben vannak jelen, így fenotípusuk, differenciáltságuk nem veszít eredeti állapotukból - különböző szövettípusok közötti kommunikáció vizsgálható	- költségesebb - limitált ideig fenntartható - gyakori sejtnekrózis a szövet belsejében - nehezebben standardizálható mérések

Mivel az OA a teljes ízületet érintő betegség és patomechanizmusában egyértelműen kulcsfontosságú szerepet játszik a különböző szövettípusok között lejároló kommunikáció, az OA-t vizsgáló modelleknek tartalmaznia kell minimum a porc- és csontszövetet. Egyre elterjedtebb az oszteokondrális explantok használata, melyet általában IL-1 β és/vagy TNF- α citokinekkal hoznak az OA-ban lejátszódó gyulladásos állapotba, pótolva ezzel a szinóvium és szinoviális folyadék hiányát, mely számos gyulladásos citokint, kemokint és egyéb fehérjéket tartalmaz. Az oszteokondrális modellekben elengedhetetlen lenne a szinóvium használata, mivel csak citokinekkal lehetetlen a szinovitiszben lejátszódó komplex immunológiai folyamatok indukálása¹⁸⁷.

2.Célkitűzések

2.1. Vérszérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut szérum összetételének kvantitatív vizsgálata

A hiperakut szérum sejtproliferatív hatása jóval erőteljesebbnek bizonyult a korábbi kísérleteink alapján, mint a vele összehasonlított PRP sejtszaporító hatása, melyből arra a feltételezésre jutottunk, hogy bár előállításuk hasonló, citokin, növekedési faktor és egyéb fehérje-összetételükben eltérhetnek egymástól^{117,120}. Ebből kifolyólag korábbi kísérletek során összehasonlítottuk a hiperakut szérum, EDTA PRP, vérszérum és vérplazma összetételét Proteome Profiler analízissel. Eredményeink szerint az angiogénikus fehérjék és citokinek közül összeségében a PRP tartalmazta a legnagyobb mennyiségű fehérjét, majd a hiperakut szérum, plazma és szérum következett a sorban. Mivel a Proteome Profiler nem ad megbízható kvantitatív eredményt, így jelenlegi vizsgálatunk során az eltérő arányban előforduló fehérjék mennyiségét multiplex immunoesszével hasonlítottuk össze, valamint megvizsgáltuk a vérszeparátumok általános laboratóriumi paramétereit. Fő célunk a hiperakut szérum, PRP, vérszérum és vérplazma fehérje-összetételének pontos vizsgálata volt, különös tekintettel a gyulladáskeltő és gyulladásgátló fehérjék szintjére, továbbá az ionegyensúly, ALP enzim aktivitásának és alakos elem mennyiségének összehasonlítására.

2.2. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen

Miután a hiperakut szérum számos kísérletben hatékonyabbnak bizonyult sejtproliferációt illetően mint a PRP, valamint összetétele kevésbé gyulladáskeltő és angiogénikus a PRP-nél, arra a feltételezésre jutottunk, hogy a PRP-hez hasonlóan jótékony hatással bírhat a degenerált OA-es ízületi szövetekre sőt, akár hatékonyabb is lehet nála. A konkrét humán kísérletek előtt, hogy áthidaljuk az in vitro sejtes és a humán kísérletek közötti szakadékot, egy 3D szövetmodellt hoztunk létre, mely tartalmazta az OA-es térdízület mindhárom fő alkotóelemét, nevezetesen a porc- és csontszövetet valamint a szinoviális membránt. A szöveteket először gyulladásba hoztuk két napon át történő IL-1 β citokinnel történő inkubáció során, majd öt napon át hiperakut szérummal és kontrollként humán szérum albuminnal kezeltük. A hozzáadott hiperakut szérumot a hagyományos üvegcső helyett egy, az erre a célra kifejlesztett speciális fecskendővel, a

hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izoláltuk, mely alkalmas teljesen zárt rendszerben történő vérvételre, szérumizolálásra, és a szérum steril, közvetlenül a felhasználás területére történő bejutására. Kísérletünk célja egyrészt egy, az OA vizsgálatára alkalmas 3D ízületi szövetmodell létrehozása volt, melyben releváns eredményeket kaphattunk a vizsgált kezelések hatékonyságáról, továbbá az IL-1 β stimuláció és a hiperakut szérum kezelés OA-es szövetekre kifejtett hatásának vizsgálata volt, különös tekintettel a gyulladásos fehérjék koncentrációváltozására.

2.3. Vérvételi üvegcsővel és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása

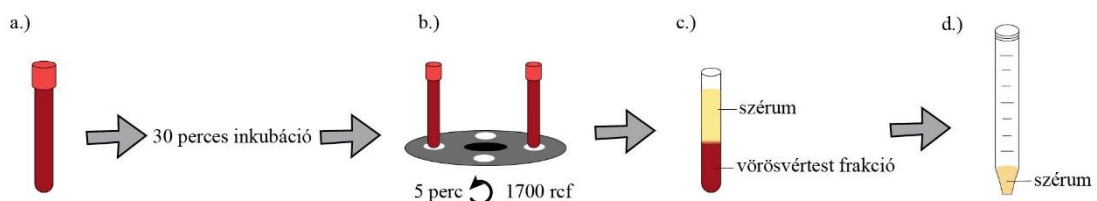
A fentebb leírt hypACT Inject orvostechnikai eszközből a hiperakut szérum izolálás után kiszedhető a visszamaradt PRF membrán, viszont formája, átmérője és vastagsága eltér a hagyományos vérvételi üvegcsővel előállított membránétól. Mivel a PRF membrán számos, főleg sebészeti alkalmazása során fontos az anyag rugalmassága és homogenitása; kísérleteink során összehasonlítottuk a vérvételi üvegcsővel és hypACT Injecttel izolált PRF membrán mechanikai és biológiai tulajdonságait. Ezenfelül a membránokat fagyasztás/olvasztás és fagyasztva szárítás után is teszteltük, feltételezve, hogy szerkezetükben változást idéz elő a fagyasztás, olvasztás, és fagyasztva szárítás folyamata. Célunk a klinikai és sebészeti használatra leginkább alkalmas PRF membrán kifejlesztése volt.

3. Módszerek

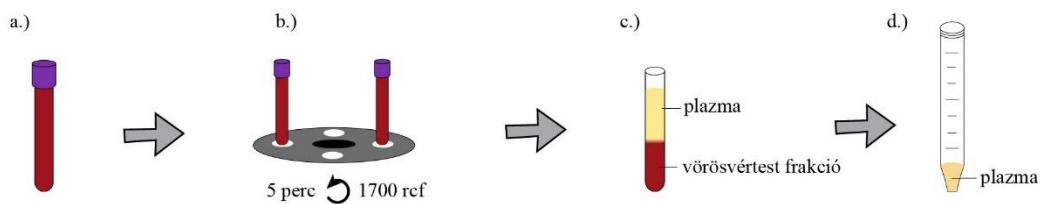
3.1. Vérszérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut szérum összetételének kvantitatív vizsgálata

3.1.1. Vérszeparátumok izolálása

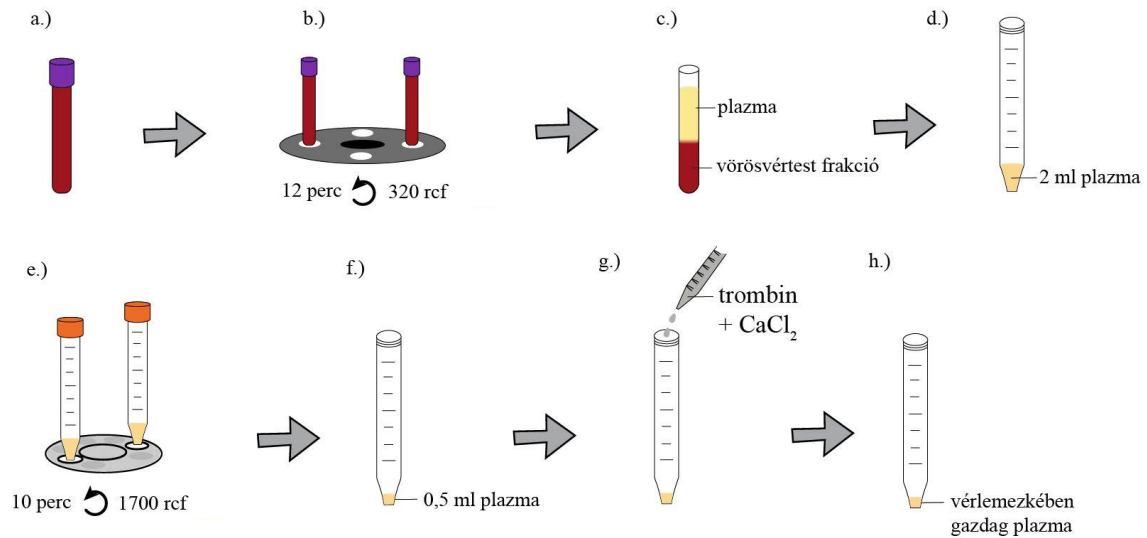
A felhasznált vérminták 24-45 év közötti, egészséges női és férfi donoroktól származtak (etikai engedély száma: 33106-1/2016/EKU). A vérszeparátumok izolálásának módja a **13.-16. ábrákon** láthatók. A centrifugálást követően az izolálást minden esetben steril körülmények között végeztük.



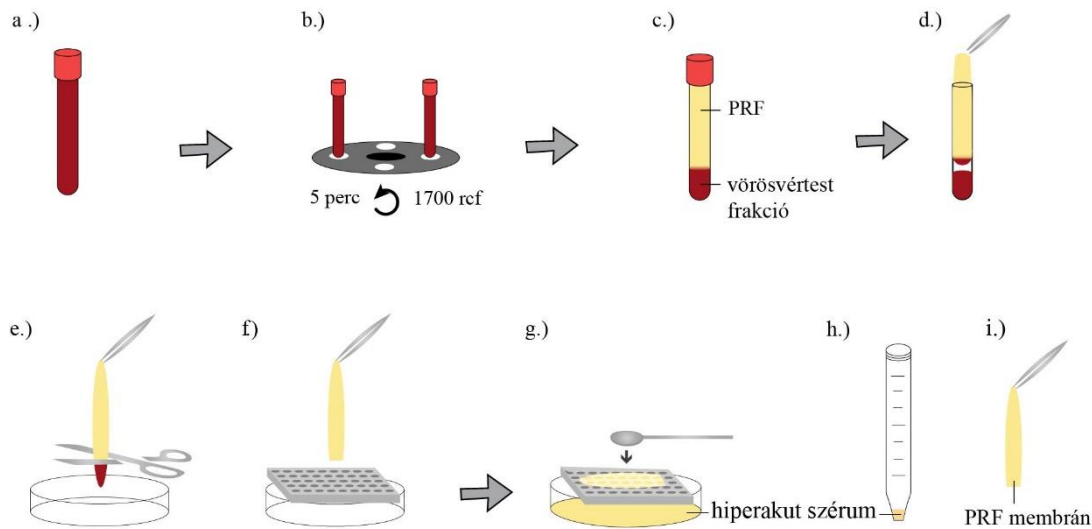
13. ábra Vérszérum izolálása. Vénás vért vettünk VACUTTE 9mL Z Serum C/A üvegfalú vérvételi csőbe (a.) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), majd 30 percen át inkubáltuk szobahőmérsékleten (a.). 1700 rcf-en 5 percen át centrifugáltuk (b.), melynek során a szérum- és vörösvértest-frakció elvált egymástól (c.). A szérumfrakciót leszívtuk és üres centrifugacsőbe tettük (d.). Forrás: saját ábra



14. ábra Vérplazma izolálása. Vénás vért vettünk VACUTTE 9mL K₃EDTA és VACUTTE 3,5 ml nátrium citrát 3,2% alvadásgátlóval bevont műanyag vérvételi csövekbe (a.) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), majd 1700 rcf-en 5 percen át centrifugáltuk (b.), melynek során a plazma- és vörösvértest-frakció elvált egymástól (c.). A plazmafrakciót leszívtuk és üres centrifugacsőbe tettük (d.). Forrás: saját ábra



15. ábra PRP izolálása. Vénás vért vettünk VACUTTE 9mL K_3EDTA és VACUTTE 3,5 ml nátrium citrát 3,2% alvadásgátlóval bevont műanyag vérvételi csövekbe (a.) (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria), majd 320rcf-en 12 percen át centrifugáltuk (b.), melynek során a plazma- és vörösvértest-frakció elvált egymástól (c.). A plazmafrakciót leszívtuk és üres centrifugacsőbe tettük (d.). Ezt 1700 rcf-en 10 percen át centrifugáltuk, hogy a vérlemezék leülepedjenek a cső aljára (e.). A plazmából 0,5 ml-t hagytunk a cső aljában, a többit eltávolítottuk, így ugyanannyi vérlemezke kevesebb térfogatban lesz jelen (f.). Végül a vérlemezkéket 10 IU trombinnal és 10 mg kalcium-kloriddal (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) aktiváltuk (g.-h.). Forrás: saját ábra



16. ábra Hiperakut szérum izolálása üveg vérvételi csővel. Vénás vért vettünk VACUTTE 9mL Z Serum C/A üvegfalú vérvételi csőbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Austria) (a.), majd azonnal 1700 rcf-en 5 percen át centrifugáltuk (b.), melynek során az alvadt fibrincomó (PRF) és a vörösvértest-frakció elvált egymástól (c.). A PRF csomót steril csipesz segítségével eltávolítottuk (d.) és aljáról a vörösvértesteket steril olló segítségével eltávolítottuk (e.). A PRF csomót ezután steril rácsra helyeztük (f.) és spatula segítségével kinyomtuk belőle a hiperakut szérumfrakciót (g.), melyet centrifugacsőbe gyűjtöttünk össze pipetta segítségével (h.). A rács tetején maradt kompakt szerkezetű hártya a PRF membrán (i.). Forrás: saját ábra

3.1.2. Laboratóriumi paraméterek mérése

Elsőként a PRP és vérplazma, valamint vérszérum és hiperakut szérum ion- és sejtes összetételét hasonlítottuk össze, általános laboratóriumi mérésekkel. Bár korábbi kísérleteinkben kizárólag EDTA PRP-t használtunk, felmerült, hogy az EDTA esetleg szignifikánsan növeli a MPV-t rontva ezzel a vérlemezkék funkcióját. Így citrát PRP és citrát vérplazma mintákat is belevettünk utólagosan a vizsgálatba.

A vizsgált ionok (kálcium, magnézium, réz, cink, vas, nátrium, kálium, foszfát) koncentrációját, valamint az alkalikus foszfatáz enzim (ALP) aktivitását Beckman Coulter AU5800 automata laboratóriumi műszerrel (Beckman Coulter Inc., Brea, CA) határoztuk meg a mintákban. A vörösvértest, fehérvérsejt és vérlemezke szám (n=4)

Sysmex XN-1000 Sa-01 sejtszámláló készülékkel (Sysmex Hungary, Budapest, Magyarország) került meghatározásra a Semmelweis Egyetem Klinikai Központi Laboratóriumában. Minden esetben 4 párhuzamos mintát mértünk le vérszeparátumonként, melyek 4 különböző egyénből származtak.

3.1.3. Fehérje-összetétel mérése multiplex immunosszé és enzimkapcsolt immunoszorbens analízissel (ELISA)

Korábbi Prometo Profiler adataink alapján az EDTA PRP szignifikánsan több angiogenikus és gyulladáscsökkentő fehérjét tartalmaz, mint a hiperakut szérumban, azonban a Proteom Profiler módszer nem alkalmas kvantitatív mérésekre. Így korábbi eredményeink alapján kiválasztottunk 23 gyulladáscsökkentő, gyulladásgátló és angiogenikus fehérjét, melyeknek mennyiségét a vérszeparátumokban Humán Mágneses Luminex (R&D System Inc., Minneapolis, Canada) és ELISA (Abcam, Cambridge, UK) módszerekkel határoztuk meg (**3. táblázat**). Minden esetben 8 párhuzamos mintát mértünk le vérszeparátumonként, melyek 8 különböző egyénből származtak.

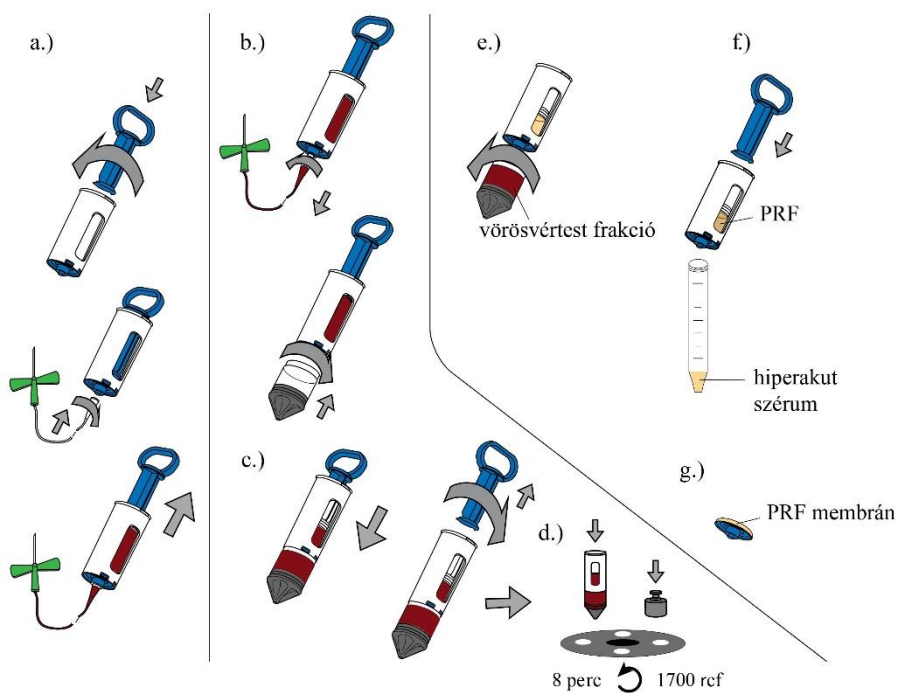
3. táblázat A vérszeparátumokban multiplex immunosszéval és enzimkapcsolt immunoszorbens analízissel vizsgált fehérjék

Szisztémás gyulladáskeltő fehérjék	Vérlemezke eredetű gyulladáskeltő fehérjék	Gyulladásgátló fehérjék
kitináz 3-szerű fehérje 1 (CHI3L1)	EGF	IL-1RA
komplement komponens 5a (C5a)	VEGF	angiopoetin
IL-17a	trombospondin-1	
CD40 ligand (CD40L)	PDGF-AA	
C-reaktív fehérje (CRP)	PDGF-BB	
oszteopontin	TGF- β	
extracelluláris mátrix metalloproteináz indukátor (EMMPRIN)	fibrinogén	
lipokalin-2		
pentraxin-3		
mieloperoxidáz (MPO)		
aktivált leukocita sejt adhéziós molekula (ALCAM)		
CD97		
komplement komponens 1 Q receptor 1 (C1qR1)		
CXCL-5		

3.2.HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen

3.2.1. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum előállítása

A hypACT Inject a munkacsoportunk által fejlesztett, engedélyezett orvostechnikai eszköz, mely alkalmas a hiperakut szérum izolálására zárt, steril körülmények között, valamint az eszköz alkalmas a szérum szervezetbe való visszajuttatására szintén steril módon. Felépítése és működése alapján egy belső üvegbetéttel rendelkező fecskendő. **(17. ábra)**. Az in vitro kísérletekben felhasznált vérminták 24-45 év közötti, egészséges nő és férfi donoroktól származtak (etikai engedély száma: 33106-1/2016/EKU, 2016.07.12.). A minták 5 donortól származtak és poolozásra kerültek használat előtt.



17. ábra Hiperakut szérum izolálás hypACT Inject eszközzel. A vérvételhez elsőként behelyeztük a dugattyút, majd alulra szárnyas tűt csatlakoztattunk. A dugattyút felfelé húzva az eszközzel 18 ml vénás vért vettünk (a.). Ezután a tűt eldobtuk és helyére felcsavartuk az úgynevezett vörösvértest tárolót (b.), majd a dugattyút lefele nyomva megtöltöttük ezt is vérrel (c.). A dugattyút eltávolítottuk, és 1700 *rcf*-en 8 percen át centrifugáltuk az eszközt. (d.) A centrifugálás alatt a PRF csomó és a vörösvértest frakció úgy váltak szét, hogy a felső, üveg részben kizárólag a PRF csomó, míg az alsó, műanyag vörösvértest tárolóban a vörösvértest és fehérvérsejtek helyezkedtek el

A dugattyút visszahelyeztük és lefele nyomtuk, így a PRF csomó az eszköz aljába épített szűrőhöz nyomódott, miközben a hiperakut szérumot kipréseltük a szűrőn át, és vékony sugárban az eszköz alján lévő lyukon egy steril centrifugacsőbe engedték (f.). Az eszköz aljáról steril spatula segítségével eltávolítottuk az alsó zárószelepet, melynek belső oldalához csatlakozik a szűrő. Ennek felületén volt található a hiperakut szérum kipréselése után visszamaradt PRF membrán, melyet steril csipesz segítségével lehúztuk a műanyag felületről (g.). Forrás: saját ábra

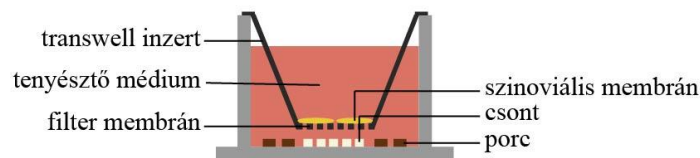
3.2.2 In vitro térd szövetmodell előállítása

Rutin térdprotézis műtét során eltávolított (Ortopédiai Klinika, Általános Orvostudományi Kar, Semmelweis Egyetem, Budapest, etikai engedély száma: 33106-1/2016/EKU) hialinporcból és szubkondrális csontból 5 mm átmérőjű körkessel egyenlő nagyságú darabokat izoláltunk steril körülmények között, míg szinoviális membrán izolátumból 5 mm² alapterületű darabokat vágunk szike segítségével. A csont blokkokból 5 darabot, porcból 4 darabot tettünk lyukanként egy 12 lyukú, alacsony kitapadást biztosító lemez aljára. Ezután minden lyukba 0,4 µm pórusnagyságú transwell inzeret (Corning, New York, USA) helyeztünk, melyekbe 2-2 darab szinoviális membránt tettünk. A 0,4 µm pórusnagyság szabad áramlást enged a sejtek által kibocsátott molekulák számára, míg gátolja a sejtek migrációját, melyre azért volt szükség, hogy a szöveteket alkotó sejtek tudjanak egymással kommunikálni, azonban a helyváltoztatásuk akadályoztatva legyen (**18. ábra A. Panel**). A szöveteket 4 ml/lyuk Dulbecco's modified Eagle's medium Ham's F-12 1:1 Mix (DMEM/F12) (Lonza, Walkersville USA) tenyésztő oldatban tartottuk, mely tartalmazott 12 mM Hepszt és L-Glutamint (Lonza, Walkersville USA). A tenyésztő oldatot 50 µg/ml L-aszcorbinsav-2 foszfáttal (Sigma-Aldrich, St. Louise, MO) és 2 µg/ml Primocin oldattal (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) egészítettük ki. Fehérjeként 5% humán albumin oldatot (20%-os) (Biotest, Dreiech, Germany) használtunk. Az oldathoz további 10 ng/ml IL-1β citokint tettünk, melynek célja az volt, hogy az erősen gyulladásos szöveti környezetből kiemelt szövetexplantokat tápanyagdús tenyésztőoldatba téve, ne csökkenjen a gyulladás szintje a kezelés előtt. Két napig tartó inkubáció után a szöveteket eltávolítottuk a lemezzel, háromszor mostuk PBS-el, hogy a citokint eltávolítsuk a szövetek felületéről, majd IL-1β citokint nem tartalmazó oldatot tettünk a szövetekre. A minták felénél továbbra is humán szérum albumint használtunk, viszont a kezelt csoportnál az albumin oldatot 10% hiperakut

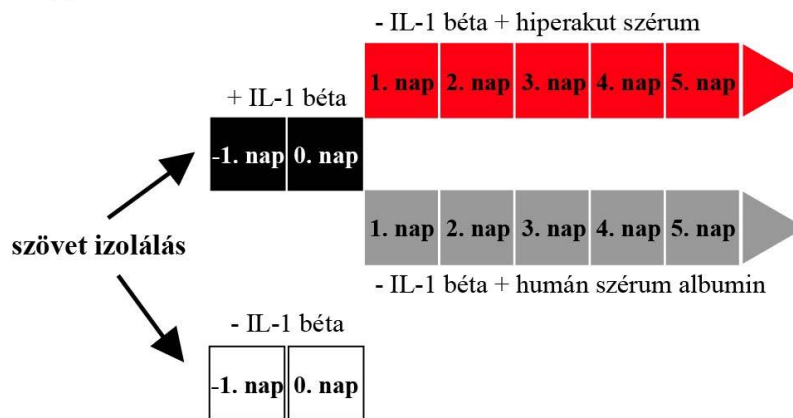
szérummal helyettesítettük (**18. ábra B. Panel**). Az 5% humán szérum albumin és 10% hiperakut szérumfehérje tartalma közel azonos volt, így ugyanannyi tápanyagot biztosítottunk a sejteknek. A 2., 5., és 7. napon történő tenyésztőoldat csere során mintát vettünk minden lyukból és 20 °C-on tároltuk. Összesen 12 biológiailag különböző modellt készítettünk 4 különböző beteg szöveteivel, a méréseket duplikátumban hajtottuk végre.

3.2.2. Szövetek életképességének mérése

A.



B.



18. ábra Az *in vitro* OA térd modell felépítése és a kísérlet menete. Egy 12 lyukú lemez minden lyukának alján 5-5 darab szubkondrális csont és 4-4 darab hialinporc blokkot helyeztünk el, melyek alapterülete azonos volt. A lyukakba transwell inzertet helyeztünk, melyeknek permeábilis membránja 0,4 μm nagyságú. Az inzertekbe 2-2 darab 5 mm² alapterületű szinoviális membránt helyeztünk. A szinoviális folyadékot a sejtenyésztő oldat helyettesítette (A. panel). A kísérlet első két napján IL-1 β citokinnel stimuláltuk a szöveteket, majd humán szérum albumin és hiperakut szérum tartalmú tenyésztőoldatban növesztettük őket (B. panel). Forrás: saját ábra

A kísérletek 2., 5. és 7. napján meghatároztuk a szövetek életképességét Cell proliferation Kit II (XTT, Roche, Mannheim, Germany) segítségével. Az esszé a sejtek mitokondriális NADH redox potenciálját méri. Az XTT esszében lévő tetrazólium származékot a sejtek mitokondriális NADH láncá formazánná alakítja, mely narancssárga színnel a sejttenyésztő oldatba kerül. 4 órás inkubáció után 480 nm hullámhosszon, 650 nm referencia hullámhosszt használva lemértük az oldatok abszorbanciáját PowerWave mikroplate spektrofotométerrel (BioTek, Winooski, VT, USA). Az optikai denzitás (OD) értékeket a szövetek egyenkénti száraz tömegével normáltuk, mivel a szövetekben lévő sejtek számát nem ismertük, valamint a csont és szinoviális membrán szövetblokkok többféle sejtet tartalmaztak, ahol az egyes sejtípusok életképessége egymástól eltérő lehet.

3.2.3. Szinoviális folyadékminta gyűjtése

A Kellegren-Lawrence skála szerinti 2-es és 3-as osztályba sorolt OA-es betegektől (n=12) leszívott felesleges szinoviális folyadékot -20 °C-on fagyasztottuk (etikai engedély száma: 6906/2017/EKU).

3.2.4. Szövettenyésztő oldat és humán szinoviális folyadékminták citokin összetételének mérése multiplex immunoesszével

A szakirodalom alapján 39 citokint választottunk ki, mely megtalálható az OA-es szinoviális folyadékban, és szerepet játszhat a betegség patomechanizmusában. A fehérjéket a betegség patomechnizmusában betöltött szerepük szerint a következő csoportokba osztottuk:

1. Az OA fő gyulladáscitokinjei: *IL-1 β , IL-6 receptor alfa (IL-6R α), TNF- α , IL-8, IL-12, IL-17A, IL-15, IL-18, IL-22*
2. Gyulladáscitokinek: *CCL-1, CCL-2, CCL-3, CCL-5, CXCL-10, CX3CL1/fraktalkin*
3. Gyulladásgátló citokinek: *IL-1 receptor antagonist (IL-1RA), IL-4receptor alfa (IL-4R α), IL-13*
4. Mátrix metalloproteinázok és aggregán: *MMP-1, MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13, aggregán*
5. Szöveti átépülés biomarkerei: *kollagén I alfa1 (COL1A1), oszteonektin, RANKL*

6. *Egyéb gyulladássos fehérjék:* IFN- γ , IL-2, IL-33, rezisztin, CD163, IL-23, IL-10, IL-31, LIF, OSM, IL-5, VEGF-A, IL-7

A kísérletek során összegyűjtött és a mérés napjáig -20°C -on tárolt felülúszó és szinoviális folyadékmintákat, valamint a szöveti minták kezelésére használt 5% humán szérum albumint és 10% hiperakut szérumot tartalmazó tenyésztő oldatokat Humán Mágneses Luminex Esszével (R&D System Inc., Minneapolis, Canada) mértük le, Magpix Luminex Xmap Technológiával (Thermofischer Scientific, Waltham, Massachusetts, USA) ¹⁸⁸.

A szövetek által termelt fehérjék mennyisége függ a szövetet alkotó sejtek életképességétől, ezért a mért fehérjekoncentrációs értékeket normáltuk a szövetek átlagos életképességével. A számolásnál a kiindulási szövetéletképességet (IL-1 β citokinnel nem stimulált 0. nap) 1-nek véve, az ehhez az értékhez viszonyított változással normáltuk a koncentrációs adatokat, hogy az értékek oszlopdiaagrammon ábrázolhatóak legyenek.

3.3.Vérvételi üvegcsővel izolált és hypACT Inject orvostechikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása

3.3.1. Mintaelőkészítés

A PRF membránok izolálása a **16. és 17. ábrákon** bemutatott módon történt. A membránokat a kísérletek során frissen, fagyasztott/olvasztottan és fagyasztva szárítottan használtunk. A fagyasztott/olvasztott PRF membránt az izolálás után -20°C -on fagyasztottuk egy éjszakán át, majd $+4^{\circ}\text{C}$ -on olvasztottuk ki. A fagyasztva szárított mintákat fél órára -80°C -ra helyeztük, majd egy éjszakán át -54°C -on, 12 Pa nyomás alatt fagyasztva szárítottuk liofilizátorban (Labconco, Canvas City, USA). A mintákat a kísérletek előtt magnéziumion és kalciumion mentes foszfát pufferrel (PBS) (Lonza, Walkersvillw USA) megnedvesítettük.

3.3.2. Mechanikai tulajdonságok vizsgálata

3.3.2.1. Szakítószilárdság vizsgálata

A friss, fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított, üvegcsővel (GT) és hypACT Inject orvostechikai eszközzel izolált (HI) PRF membránok szakítószilárdságát univerzális tesztelőgéppel mértük meg (Instron 5566) (Budapesti Műszaki Egyetem, Fizikai Kémiai

és Anyagtudományi Tanszék). A mintákból 10 mm átmérőjű, 25 mm hosszú darabokat vágunk szike segítségével, majd hosszanti irányban mindkét végüket gumibevonatos bilinccsel rögzítettük. A két bilincs közötti kezdőtávolság 5 mm, a húzófeszültség 10 mm/perc volt minden esetben. A műszer a minta maximális terhelését rögzítette, melynél a minták elszakadtak és ebből került kiszámításra a szakítószilárdság az $S=F/A$ képlet segítségével, ahol az F a maximális erő (N), az A az egységnyi terület (m^2). A terhelési görbét Instron Bluehill szoftverrel rögzítettük (Grove City, PA, USA).

A varrhatóság ellenőrzésének céljából a PRF membránokat megkíséreltük rutin térdprotézis műtét (Ortopédiai Klinika, Általános Orvostudományi Kar, Semmelweis Egyetem, Budapest, etikai engedély száma: 33106-1/2016/EKU) során eltávolított hialinporcos femurvégén mesterségesen kialakított porchiányba varrni nylon (ethilon) fekete monofil, 6-0, P1 tűvel ellátott fonállal (Ethicon Inc. Sommerville New Jersey, USA).

3.3.2.2. Felületi és szerkezeti vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM)

A membránok felületének mikrostruktúráját pásztázó elektronmikroszkóppal (JEOL JSM-8380LA, Jeol Ltd. Tokió, Japán) vizsgáltuk. A mikroszkópos vizsgálat előtt a mintákat 2,5% glutáraldehiddel fixáltuk 20 percen át. Ezt követően a membránokat dehidratáltuk felszálló alkoholsorral (50%, 70%, 80%, 90%, 100% etanol) egyenként 5 percen át. Végül a mintákat 100% hexametildiszilazán (HMDS) kezeltük 5 percen át, melyeket elszívófülke alatt hagytunk egy éjszakán át, hogy a HMDS elpárologhasson. A minták felszínét közvetlenül a mikroszkópozás előtt arannyal vontuk be (JEOL JFC-1200 Fine Coater, 12 mA, 20 s). A membránok középső régióját 500-as és 5000-es nagyításon SEM-mel vizsgáltuk.

3.3.3. Biológiai tulajdonságok vizsgálata

3.3.3.1. Élő/halott sejtfestés

A PRF membránba fiziológiásan beágyazódott vérsejteket élő/halott festéssel vizsgáltuk. A membránokat háromszor mostuk PBS-sel majd 1 ml PBS-ben inkubáltuk 30 percig, melyhez 1 μ M Calcein-AM (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és 5 μ g mL ethidium-homodimert (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) adtunk. Ezután újabb háromkörös mosás következett PBS-sel. Konfokális mikroszkóppal (Nikor A1R, Nikon Instrument Inc. Melville, USA) 20-szoros nagyításon Z-stack képeket készítettünk (Magyar Tudományos

Akadémia, Kísérleti Orvostudományi Kutatóintézet). A képek maximális intenzitását ábrázoltuk Fiji-ImageJ szoftverrel .

3.3.3.2. Mezenchimális őssejtek életképességének mérése

BM-MSK-eket (MSCs, ATCC, Manassas, VA, USA) tenyésztettünk T-75 tenyésztő flaskában (Biologix, Shandon, Kína), tenyésztő inkubátorban 37°C-on, 5% CO₂ szint és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket Dulbecco's modified Eagle's mediumban (DMEM) (Lonza, Walkersvillw USA) tartottuk, mely 4,5 g/L glükózt, piruvátot, GlutaMAXTM-ot (Gibco, Paisley, Scotland), 10% magzati borjú szérumot (FCS), 2 µl/ml Primocint (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és 0,75 ng/ml fibroblaszt növekedési faktort (bFGF, Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) tartalmazott. A sejttenyésztő médiumot kétszer cseréltük hetente.

Az MSC-eket 24 lyukú, letapadásgátlóval bevont lemezekre tettük, minden lyukba ¼ hypACT eszközzel izolált membránt, és ½ üvegcsővel izolált membránt tettünk, melyeket tömegük alapján standardizáltunk. Ezután minden lyukba 35 ezer sejtet tettünk. A kísérletek 1., 7. és 14. napján meghatároztuk a sejtek életképességét Cell proliferation Kit II (XTT, Roche, Mannheim, Germany) segítségével. 4 órás inkubáció után 480 nm hullámhosszon, 650 nm referencia hullámhosszt használva lemértük az oldatok abszorbanciáját PowerWave microplate spektrofotométerrel (BioTek, Winooski, VT, USA). Mezenhimális őssejtek szuszpenziójából hígítási sort csináltunk és a mérés alapján kalibrációs görbét készítettünk, hogy a sejtéletképességi adatokból kiszámoljuk a sejtszám értékeket.

A membránok nedves tömegét lemértük a kísérletek 1., 3., 6., 8., 10. és 13. napján digitális analitikai mérleggel.

3.3.3.3. Íny fibroblaszt sejtek életképességének mérése

Ínysejt fibroblasztokat (hGF, ATCC, Manassas, VA, USA) tenyésztettünk T-75 tenyésztő flaskában (Biologix, Shandon, Kína), tenyésztő inkubátorban 37°C-on, 5% CO₂ szint és 95%-os páratartalom mellett. A sejteket Dulbecco's modified Eagle's medium HAM's F-12 1:1 keverékében (DMEM/F-12) (Lonza, Walkersvillw USA) tartottuk, mely 12mM HEPES, L-Glutamin (Lonza, Walkersvillw, MD, USA), 10% magzati borjú szérumot (FCS), 2 µl/ml Primocint (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) és 0,75 ng/ml fibroblaszt növekedési faktort (bFGF, Sigma-Aldrich, St. Louise, MO, USA) és 50µg/ml L-

aszorbinsav-2 foszfátot tartalmazott. A sejtenyésztő médiumot kétszer cseréltük hetente.

Az hGF sejteket 24 lyukú, letapadásgátlóval bevont lemezekre tettük, minden lyukba $\frac{1}{4}$ hypACT eszközzel izolált membránt, és $\frac{1}{2}$ üvegcsővel izolált membránt tettünk, melyeket tömegük alapján standardizáltunk. Ezután minden lyukba 35 ezer sejtet tettünk. A kísérletek 1., 7. és 14. napján meghatároztuk a szövetek életképességét Cell proliferation Kit II (XTT, Roche, Mannheim, Germany) segítségével. 4 órás inkubáció után 480 nm hullámhosszon, 650 nm referencia hullámhosszt használva lemértük az oldatok abszorbanciáját PowerWave microplate spektrofotométerrel (BioTek, Winooski, VT, USA). Mezenhimális össejtek szuszpenziójából hígítási sort csináltunk és a mérés alapján kalibrációs görbét készítettünk, hogy a sejtéletképességi adatokból kiszámoljuk a sejtszám értékeket.

A kísérletek 3., 5. és 7. napján felülűszót gyűjtöttünk, melyekben meghatároztuk az I. típusú pro-kollagén koncentrációját, Human Pro-Collagen I alpha 1 ELISA Kittel (Abcam, Cambridge, UK).

3.3.3.4. Plazmin enzim aktivitásának mérése

A membránok endogén bomlási képességének meghatározására plazmin enzim aktivitás esszét végeztünk. 50 mM szubsztrát oldatot készítettünk 157,5 μ l dimetil-szulfoxidból (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 5 mg N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilid acetát sóból (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). 97 μ l esszé pufferhez (0,1 M Na_3PO_4 , pH 7,8) 2 μ l szubsztrát oldatot adtunk, majd 50 mg súlyú PRF membrán darabot adtunk hozzá. Az oldat abszorbanciáját 410 nm-en mértük le, kinetikusan, PoweWave XS microplate spektrofotométerrel.

3.4. Statisztikai analízis

Adatsorainkon D'Agostino-Pearson normalitás vizsgálatot végeztünk, majd egyutas varianciaanalízissel (ANOVA) és Tukey post hoc teszttel hasonlítottuk össze az adatainkat. A különbségeket $p < 0,05$ esetén vettük szignifikánsnak. Az ábrán *, #, † jelöltük ahol $0,01 < p < 0,05$, **, ##, †† jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ###, ††† jelöli, ahol a $p < 0,001$.

A korrelációanalízist Pearson-féle korrelációs teszttel végeztük. A különbségeket $p < 0,05$ esetén vettük szignifikánsnak. A korrelációt $r \geq 0,75$ nagyon szorosnak vettük. A

statisztikai analízishez Prism GraphPad 7 szoftvert (Irvine, CA, USA) használtunk. Az eredményeket pedig átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

4. Eredmények

4.1. Vérszérum, vérplazma, vérlemezkében gazdag plazma és hiperakut szérum összetételének kvantitatív vizsgálata

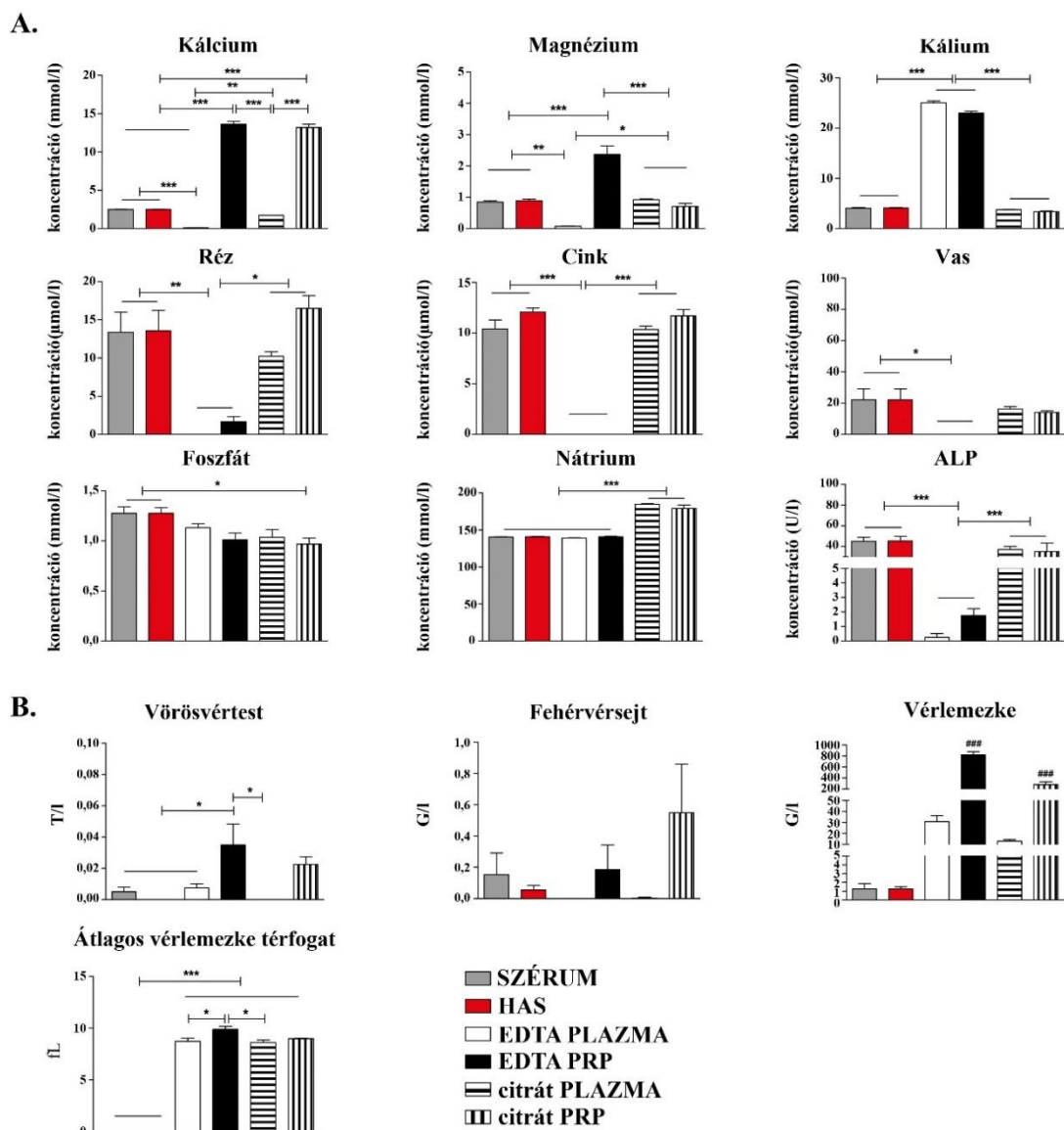
4.1.1. Laboratóriumi paraméterek mérése

Elsőként a fontosabb ionok és az inorganikus foszfát mennyiségét, az ALP enzim aktivitását, valamint a vér sejtjes alkotóinak mennyiségét hasonlítottuk össze a vérszeparátumokban. Bár korábbi kísérleteinkben és a továbbiakban csak az EDTA PRP és plazmát vizsgáltuk, szakirodalom szerint a citrát és EDTA segítségével előállított plazmatermékek eltérnek az izolálható vérlemezke számban és azok funkciójában, melyet az átlagos vérlemezke térfogat jellemez.

Méréseink alapján a kalciumion koncentráció szignifikánsan magasabb volt EDTA és citrát PRP-ben és szignifikánsan alacsonyabb volt EDTA és citrát plazmában, mint vérszérumban és hiperakut szérumban. A magnéziumion szintje érdekes módon EDTA plazmában volt a legalacsonyabb, míg EDTA PRP-ben szignifikánsan magasabb volt a többi mintával összevetve. Az EDTA és citrát PRP-ben előforduló magas kalciumszint az előállítás módjából adódik, mivel a PRP aktiválása trombin mellett kalcium-kloriddal történt. A káliumszint szignifikánsan emelkedett értéke az EDTA PRP és plazma mintákban a K_3EDTA bevonatú csövekből adódott, míg a nátriumion emelkedett koncentrációja a citrátos mintákban a nátrium-citrátos csövekből eredt. A réz-, cink-, és vasionok koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt EDTA PRP és plazmában, mint a szérum és hiperakut szérumban a K_3EDTA kelátképző képessége miatt. A foszfát ionok mennyisége csak a citrát PRP-ben tért el a többi mintától, itt szignifikánsan alacsonyabb koncentrációt mértünk. Az ALP enzim aktivitása az EDTA-t tartalmazó mintákban szignifikánsan alacsonyabb volt, mivel az EDTA kelátot képez a magnézium-, és cinkionokkal, melyeknek nélkülözhetetlen szerepe van az ALP enzim stabilitásában **(19. ábra A. Panel)**.

A sejtjes elemeket a PRP minták aktiválása előtt mértük le, hogy megőrizzük a vérlemezkék membránjának épségét. Az EDTA és citrát PRP minták tartalmaztak vörösvértestet a legnagyobb számban. A fehérvérsejtszám a citrát PRP-ben volt a legmagasabb. A vérlemezkeszám szignifikánsan magasabb volt EDTA PRP-ben, mint citrát PRP-ben, míg a többi szérum és plazmamintában rendkívül alacsony számban

fordult csak elő. Az MPV értéke értelemszerűen a szérumból és hiperakut szérumból mintákban nulla volt, mivel itt aktivált állapotban voltak a vérlemezék, tehát membránjuk szétesett. Az EDTA és citrát PRP között nem találtunk különbséget a vérlemezke funkcióban. Miután megbizonyosodtunk róla, hogy a PRP nem rontotta a vérlemezék funkcióját a további mérésekben már csak EDTA PRP-t használtunk (19. ábra B. Panel).

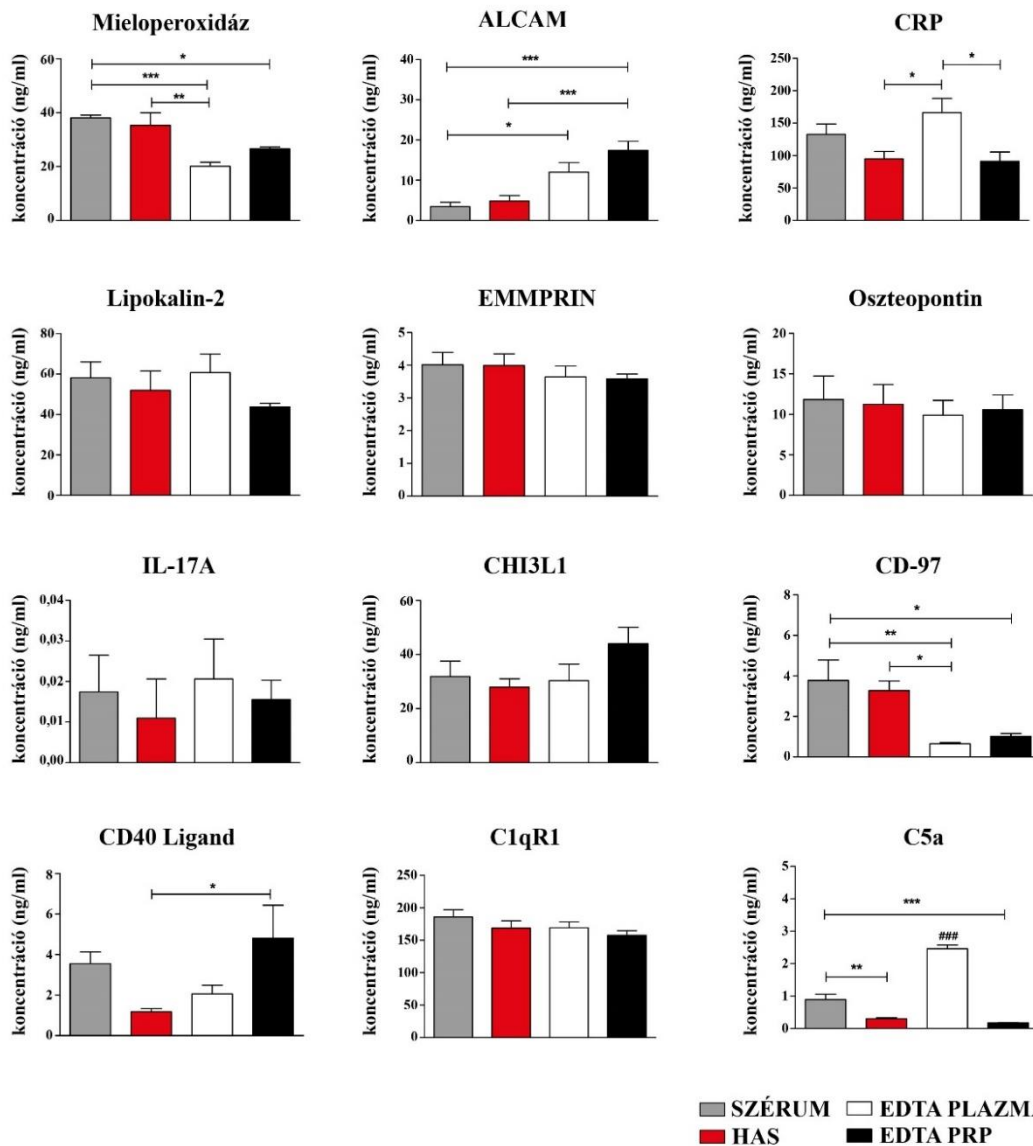


19. ábra Releváns ionok koncentrációjának, az ALP enzim aktivitásának, valamint a vér alakos elemeinek mennyiségi összehasonlítása. AZ EDTA felborította a PRP ionegyensúlyát, valamint gátolta az ALP enzim aktivitását. A citrát is okozott kisebb eltéréseket az ionösszetételben, míg a szérumból és hiperakut szérumból ionegyensúlya megmaradt, és az ALP enzim működését sem befolyásolta az előállítás módja (A. Panel).

*A vörösvértestek és a vérlemezkék száma EDTA PRP-ben volt a legmagasabb, míg az MPV értékében a citrát és EDTA PRP között nem volt szignifikáns eltérés (B. Panel). (n=4, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ### jelöli, ahol $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.*

4.2.1. Fehérje-összetétel mérése multiplex immunoesszé és enzimkapcsolt immunoszorbens analízissel (ELISA)

A kvantitatív fehérjeméréshez Luminex és ELISA esszéket használtunk, melyekkel szisztémás gyulladáskeltő, vérlemezke eredetű gyulladáshoz és gyulladásgátló fehérjék, valamint komplement és angiogenezissel kapcsolatos fehérjék mennyiségét vizsgáltuk. A lipokalin-2, EMMPRIN, oszteopontin, IL-17A és CHI3L1 hasonló koncentrációban volt jelen az összes mintában. A CD97 és MPO szignifikánsan magasabb koncentrációban volt mérhető a szérum és hiperakut szérum mintákban, mint a plazma és PRP-ben, míg az ALCAM fehérje a plazma és EDTA PRP mintákban volt jelen magasabb koncentrációban, mint a szérum és hiperakut szérumban. A CD40L koncentrációja magasabb volt EDTA PRP-ben, mint hiperakut szérumban, a CRP pedig szignifikánsan magasabb volt plazmában, mint hiperakut szérumban és PRP-ben. A mért komplement fehérjék közül a C5a a plazmában volt a legmagasabb koncentrációban jelen, míg a C1qR1 fehérje mennyisége azonos volt a mintákban (20. ábra).

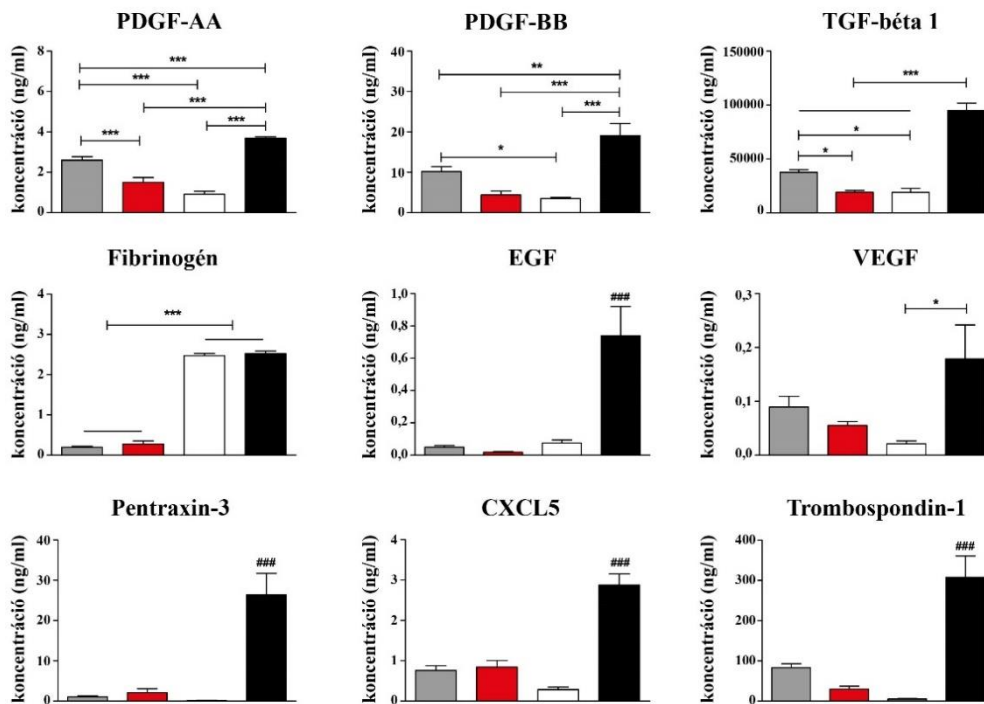


20. ábra Szisztémás gyulladáskeltő fehérjék és komplement fehérjék mennyisége vérszérum- és plazmamintákban. A szisztémás gyulladáskeltő fehérjék közel azonos koncentrációban fordultak elő PRP-ben és hiperakut szérumban, kivéve az ALCAM-ot mely szignifikánsan magasabb koncentrációban fordult elő PRP-ben. ($n=8$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ### jelöli, ahol $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk

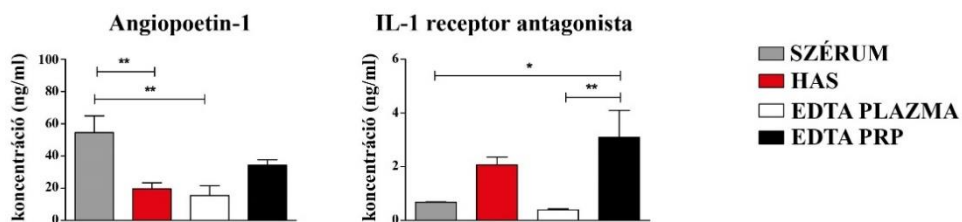
A vérlemezke eredetű és gyulladáskeltő fehérjék és növekedési faktorok egyértelmű mintázatot követnek. A fibrinogén kivételével kiugróan magasabb koncentrációban fordult elő PRP-ben, mint a többi mintában. A fibrinogén mennyisége plazmában szintén

szignifikánsan magasabb, mint a szérummintákban (**21. ábra A. Panel**). A gyulladásgátló fehérjék közül az IL-1RA szintje PRP és hiperakut szérumban a legmagasabb, az angiopoetin-1 pedig szérumban volt a legmagasabb koncentrációban mérhető (**21. ábra B. Panel**).

A.



B.

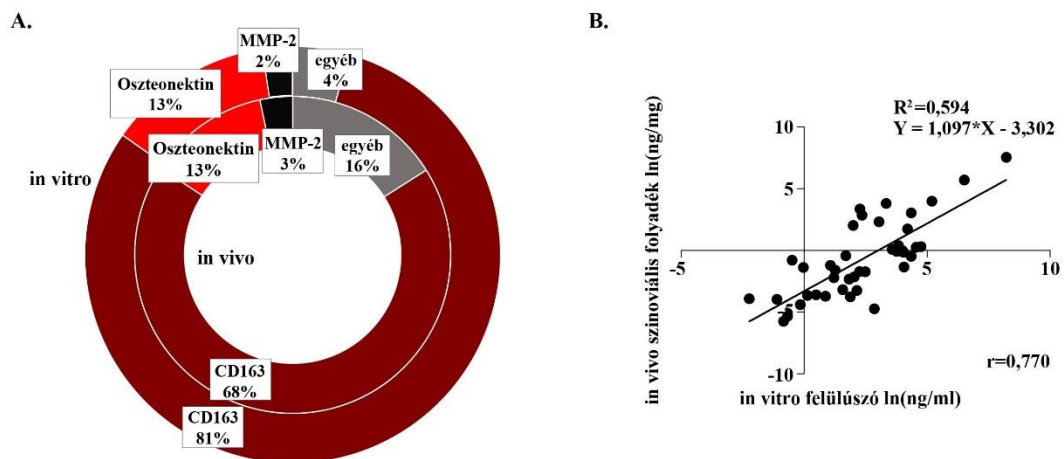


20. ábra Vérlemezke eredetű gyulladáskeltő, angiogenikus és gyulladásgátló fehérjék mennyisége vérszérum- és plazmamintákban. A PRP szignifikánsan több vérlemezke eredetű gyulladós fehérjét tartalmazott, mint a hiperakut szérumban (A. Panel). A gyulladásgátló fehérjék szintjében a hiperakut szérumban és PRP között nem találtunk szignifikáns eltérést (B. Panel) ($n=8$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ### jelöli, ahol $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

4.2. HypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata in vitro térd szövetmodellen

4.2.1. Szövettenyésztő oldat és human szinoviális folyadékminták citokin összetételének összehasonlítása

In vitro térd modellben végzett kísérletünk során 39 különböző, az OA-ban szerepet játszó fehérje mennyiségét mértük le (39-40 oldal) a szövetek felülúszójában az IL-1 β citokinnel történő 48 órás stimuláció után, valamint OA-es betegek szinoviális folyadékjában. Az OA-es térdízületi modellünk használhatóságának validálására összehasonlítást végeztünk a felülúszó és szinoviális folyadékok fehérje-összetételét illetően. Az mintákban mért koncentráció értékeket átlagoltuk egyenként minden fehérjére nézve, és a kapott értékeket %-ban fejeztük ki, melynek során a 39 fehérje összkoncentráció értékét vettük 100%-nak. A legnagyobb arányban a felülúszóban és a szinoviális folyadékban is a CD-163 fordult elő, melyet az Oszteonektin és MMP-2 követett a sorban. A többi fehérje szintén előfordult az in vivo és in vitro mintákban is, bár alacsonyabb koncentrációban (**22. ábra A. Panel**). Korrelációanalízissel vizsgáltuk meg, hogy az egyes citokinek mennyisége milyen mértékben egyezik meg a felülúszóban és az ízületi folyadékban. Mivel a CD-163, oszteonektin és MMP-2 kiugróan magas koncentrációban fordult elő mindkét esetben, a kiugró értékekből adódó statisztikai hibát az adatsor természetes alapú logaritmikus transzformációjával küszöböltük ki. Eredményeink alapján nagyon szoros kapcsolat volt ($r=0,770$) az in vitro és in vivo folyadék fehérje-összetétele között, mely alapján alkalmasnak találtuk modellünket az OA patomechanizmusát célzó vizsgálatok elvégzésére. (**22. ábra B. Panel**).

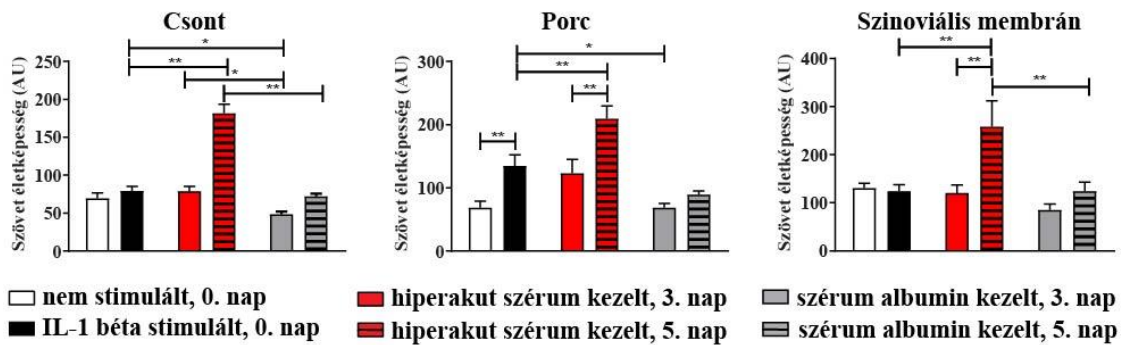


22. ábra Az *in vitro* térd model és az *in vivo* szinoviális folyadék összetétele. A legnagyobb arányban a felülúszóban és a szinoviális folyadékban is a CD-163 fordult elő, melyet az oszteonektin és MMP-2 követett a sorban (A. Panel). A mért 39 fehérje koncentrációja *in vitro* és *in vivo* nagyon szorosán korrelált egymással (B. Panel). $n_{\text{felülúszó}} = 19$, $n_{\text{szinoviális folyadék}} = 12$. A korrelációt $r \geq 0,75$ nagyon szorosnak vettük, a különbséget $p < 0,05$ esetén vettük szignifikánsnak Pearson-féle korrelációanalízis esetében.

4.2.2. Szövetek életképességének mérése

A kétnapos IL-1 β stimulációt követően megmértük a három különböző szövetben a sejtproliferációt és összehasonlítottuk a kontroll, nem stimulált mintákéval. A csont- és szinoviális membrán esetén nem tapasztaltunk jelentősebb változást, míg a porcsejtek proliferációját érdekes módon növelte az IL-1 β . A második napon lecseréltük az IL-1 β citokint tartalmazó tápoldaltot, és hiperakut szérum vagy humán szérum albuminos kontrolloldat került a szövetekre. A 3. kezelési napon szintén megmértük a sejtproliferáció értékét, majd tápoldatsere után további két napig tenyésztettük őket és a kísérlet utolsó napján újabb mérést végeztünk. Az 5. napra szignifikánsan megnőtt a sejtek száma mindhárom szövetben, mind a 0. napi kontrollhoz, mind pedig az albuminos

kontrollhoz képest. Az albuminos kontrollcsoport sejtproliferációs értéke az 5. napra sem tért el jelentősen a 0. napitól (**23. ábra**).

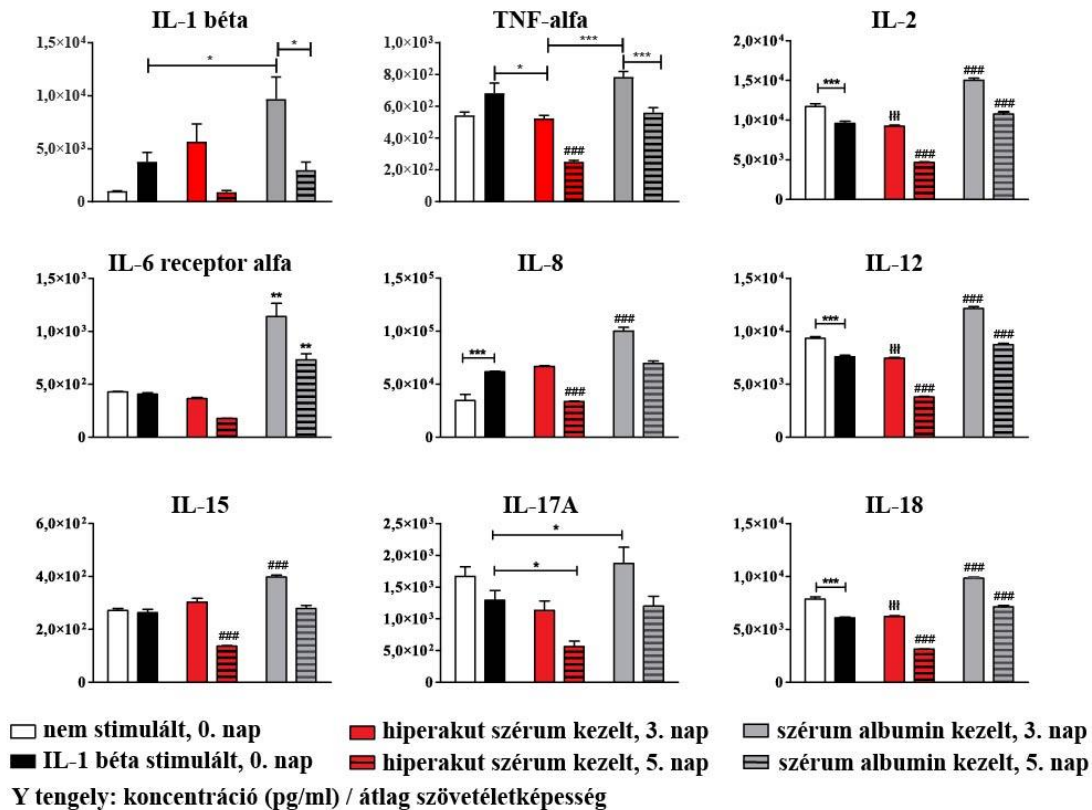


23. ábra Csont, porc és szinoviális membránszövetek életképességének változása a kísérlet során. A hiperakut szérummal kezelt csont, porc és szinoviális membrán életképessége szignifikánsan megnőtt az 5. napra a 0. napi és a humán albuminos kontrollmintához képest is. ($n=12$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és *** jelöli, ahol a $p < 0,001$, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

4.2.3. IL-1 béta citokin stimuláció, valamint humán szérum albumin és hiperakut szérum kezelés hatásának vizsgálata

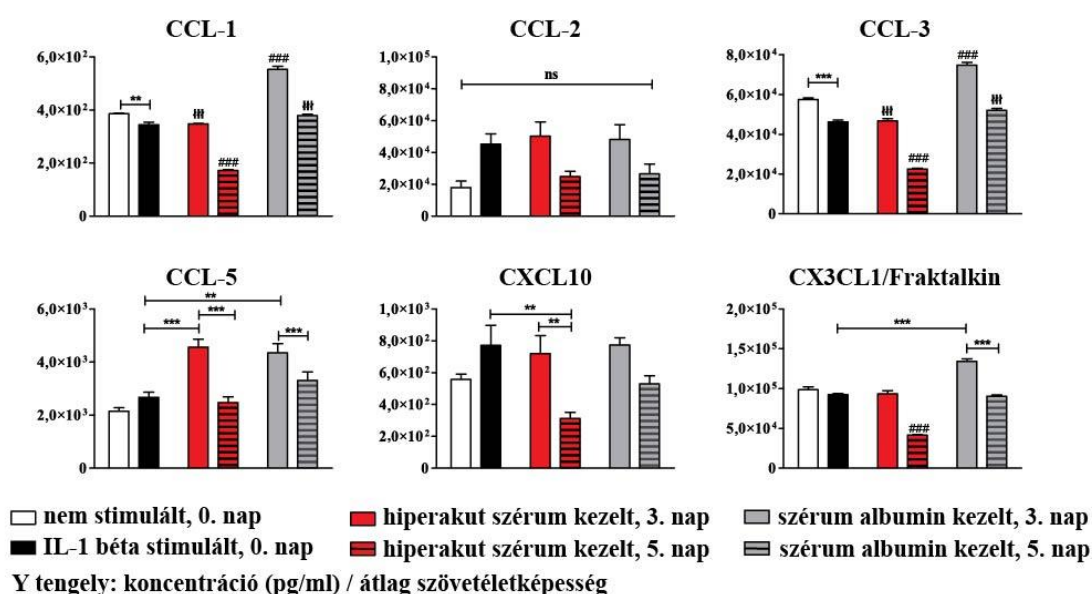
Elsőként az OA gyulladáscitokinjeinek koncentrációját mértük le a felülúszó mintákban, melyeket a szövetek átlagéletképességével normalizálva ábrázoltunk (50. oldal). A stimuláció során hozzáadott 10 ng/ml IL-1 β citokint levontuk az eredményből. A vizsgált fehérjék közül csak az IL-8 koncentrációja nőtt szignifikánsan a kezelés hatására, míg a normalizálás után az IL-2, IL-12 és IL-18 csökkent értéket mutatott. Ennek oka, hogy a stimuláció hatására a porcszövetek életképessége olyan mértékben megnőtt (**22. ábra**), hogy bár a felülúszóban nőtt a gyulladáscitokin koncentrációja, a normalizálás több esetben csökkentette ezeket a változásokat. A hiperakut szérum kezelés hatására, a 3. napig nem következett be szignifikáns változás, míg a kezelés utolsó, 5. napjára az IL-1 β és IL-6R α fehérjét kivéve, minden citokin koncentrációja szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a kezelés 0. napján. Ezzel szemben a kontroll, albuminos kezelés hatására a TNF- α fehérje kivételével minden a 24. ábrán látható citokin koncentrációja szignifikánsan nőtt az IL-1 β stimulált mintákhoz képest. Továbbá a TNF- α , IL-2, IL-6R α , IL-8, IL-12, IL-15 és IL-18 koncentrációja szignifikánsan magasabb volt a humán szérum

albumin kezelés 3. napján, mint a hiperakut szérum kezelés 3. napján. A humán szérum albumin kezelés 5. napjára az IL-2, az IL-6R α , az IL-12 és IL-18 szintje szignifikánsan magasabb volt, mint a a kezelések előtt, és a hiperakut szérum kezelés 5. napján (24. ábra).



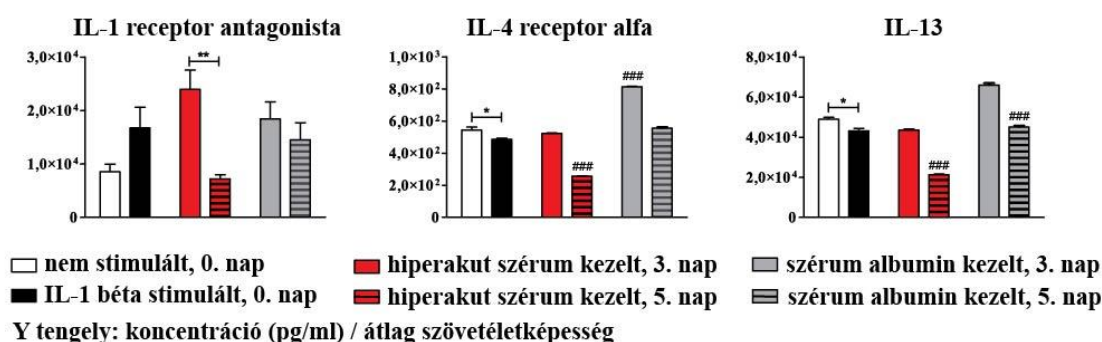
24. ábra Az oszteoarthritisz fő gyulladásoos citokinjeinek koncentrációja. Az IL-1 β stimuláció hatására csak az IL-8 koncentrációja nőtt, míg a hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent a TNF- α , IL-2, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17 és IL-18 koncentrációja az IL-1 β stimulált 0. napi értékekhez képest. Ezzel szemben a humán szérum albumin kezelés 5. napjára egyik gyulladásoos fehérje szintje sem csökkent szignifikánsan a 0. naphoz képest. A hiperakut szérum és albumin kezelést összehasonlítva egymással kezelés utolsó napjára a TNF- α , IL-2, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 és IL-18 szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a hiperakut szérum hatására, mint az albumin kezelés esetén. ($n=12$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ###, lll jelöli, ahol a $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, míg a l azokat az oszlopokat jelöli, melyek csak az IL-1 β stimulált mintáktól nem tértek el szignifikánsan, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

A vizsgált gyulladásos kemokinek esetén az IL-1 β stimuláció hatására egyik kemokin szintje sem nőtt szignifikánsan. A hiperakut szérum kezelt 3. napi szöveti felülúszóban szignifikánsan nőtt a CCL-5 szintje, míg az 5. napra szignifikánsan csökkent a CCL-1, CCL-3, CXCL-10 és CX3CL1/fraktalkin mennyisége a 0. napi koncentrációhoz képest. Az albuminos kezelés 3. napjára a CCL-1, CCL-3, CCL-5 és CXCL3/fraktalkin szintje nőtt szignifikánsan az első naphoz képest, míg a kezelés előtti szinthez képest egyik fehérje mennyisége sem csökkent szignifikánsan az 5. napra. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összevetve, a CCL-1, CCL-3, CCL-5 és CX3CL1/fraktalkin szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a szérummal kezelt mintákban (25. ábra).



25. ábra Az oszteoarthritisz gyulladásos kemokinjeinek koncentrációja. A hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent a CCL-1, CCL-3, CXCL-10 és CX3CL1/fraktalkin koncentrációja az IL-1 β stimulált 0. napi értékekhez képest. Ezzel szemben a humán szérum albumin kezelés 5. napjára egyik gyulladásos kemokin szintje sem csökkent szignifikánsan a 0. naphoz képest. A hiperakut szérum és albumin kezelést összehasonlítva egymással, a kezelés utolsó napjára a CCL-1, CCL-3, CCL-5 és CX3CL1/fraktalkin szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a hiperakut szérum hatására, mint az albuminos kezelés esetén. ($n=12$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ###, H# jelöli, ahol a $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, míg a l azokat az oszlopokat jelöli, melyek csak az IL-1 β stimulált mintáktól nem tértek el szignifikánsan, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

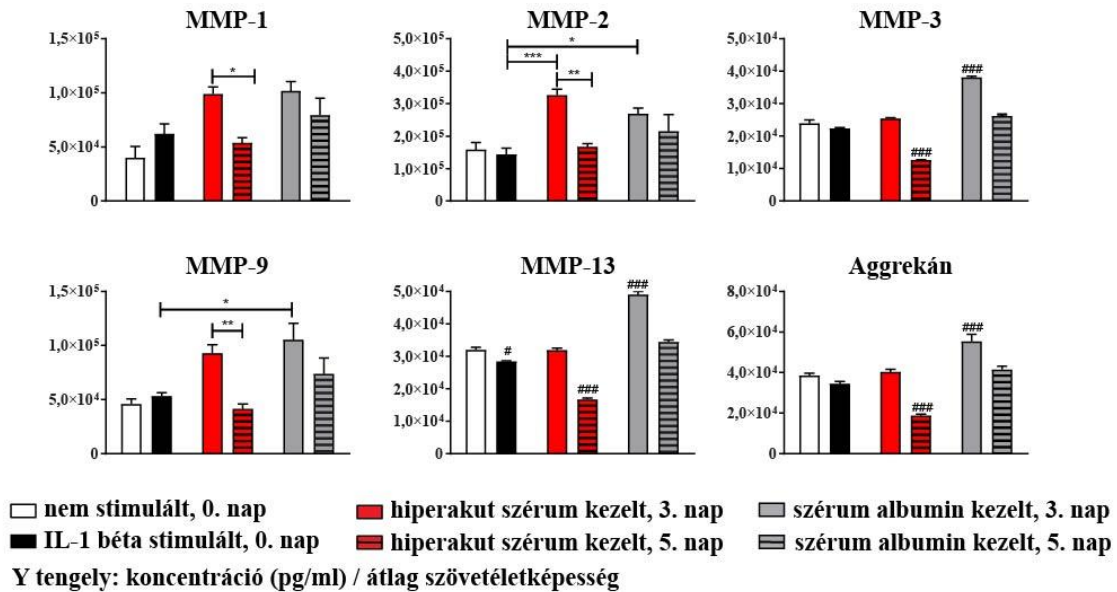
A vizsgált gyulladásgátló citokinek esetén az IL-1 β stimuláció hatására egyik citokin szintje sem nőtt szignifikánsan. A hiperakut szérummal kezelt 3. napi szöveti felülúszóban szignifikánsan nőtt az IL-1RA szintje, míg az 5. napra szignifikánsan csökkent az IL-4R α és IL-13 mennyisége a 0. napi koncentrációhoz képest. Az albuminos kezelés 3. napjára az IL-4R α és IL-13 szintje szignifikánsan nőtt az első naphoz képest, míg a kezelés előtti szinthez képest egyik fehérje mennyisége sem csökkent szignifikánsan az 5. napra. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összevetve, az IL-4R α és IL-13 szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a szérummal kezelt mintákban (26. ábra).



26. ábra Az oszteoarthritisz gyulladásgátló citokinjeinek koncentrációja. A hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent az IL-4R α és az IL-13 koncentrációja az IL-1 β stimulált 0. napi értékekhez képest. Ezzel szemben a humán szérum albumin kezelés 5. napjára egyik gyulladásgátló citokin szintje sem csökkent szignifikánsan a 0. naphoz képest. A hiperakut szérum és albumin kezelést összehasonlítva egymással, a kezelés utolsó napjára az IL-4R α és az IL-13 szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a hiperakut szérum hatására, mint az albumin kezelés esetén. ($n=12$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ###, jelöli, ahol $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

Az MMP enzimeknek a porc- és csontszövet bontásában van fontos szerepe az OA patomechanizmusa során, míg az aggregán a porcszövet sejtközötti állományának egyik fő alkotóeleme, melynek fragmentjei a porc bomlása során szabadulnak fel és ürülnek a szinoviális folyadékba (11. ábra). Az általunk vizsgált MMP fehérjék egyike sem nőtt szignifikánsan az IL-1 β stimuláció hatására. A hiperakut szérummal kezelt 3. napi szöveti felülúszóban szignifikánsan nőtt az MMP-2 szintje, míg az 5. napra szignifikánsan

csökkent az MMP-3, MMP-13 és aggregán mennyisége a 0. napi koncentrációhoz képest. Az albuminos kezelés 3. napjára az MMP-2, MMP-3, MMP-9, MMP-13 és aggregán szintje szignifikánsan nőtt az első naphoz képest, míg a kezelés előtti szinthez képest egyik fehérje mennyisége sem csökkent szignifikánsan az 5. napra. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összevetve, az MMP-3, MMP-13 és aggregán szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a szérummal kezelt mintákban (**27. ábra**).



27. ábra Az oszteoarthritisz mátrix metalloproteináz enzimjeinek és az aggregán koncentrációja. A hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent MMP-3, MMP-13 és aggregán koncentrációja az IL-1β stimulált 0. napi értékekhez képest. Ezzel szemben a humán szérum albumin kezelés 5. napjára egyik gyulladásgátló citokin szintje sem csökkent szignifikánsan a 0. naphoz képest. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összehasonlítva egymással, a kezelés utolsó napjára az MMP-3, MMP-13 és aggregán szintje volt szignifikánsan alacsonyabb a hiperakut szérum hatására, mint az albumin kezelés esetén. (n=12, * jelöli, ahol 0,01<p<0,05, ** jelöli, ahol 0,001<p<0,01, és ***, ###, jelöli, ahol a p<0,001, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag ± standard hibaként ábrázoltuk.

A COL1A1 fehérjét az oszteoblasztok termelik és a csontszövet egyik fő alkotóeleme, míg az emelkedett RANKL a csontreszorpció biomarkerének tekinthető. Az oszteonektint a regenerálódó porcsejtek termelik nagy mennyiségben (30. oldal). Az IL-1 β stimuláció hatására szignifikánsan nőtt a RANKL koncentrációja. Míg a hiperakut szérummal kezelt 3. napi szöveti felülúszóban szignifikánsan nőtt az COL1A1 és oszteonektin szintje, addig a RANKL mennyisége szignifikánsan csökkent a 0. naphoz képest. Az albuminos kezelés 3. és 5. napjára az szignifikánsan csökkent az oszteonektin és nőtt a RANKL mennyisége az első naphoz képest. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összevetve, a COL1A1 szintje szignifikánsan magasabb volt, míg a RANKL szintje szignifikánsan alacsonyabb volt a felülúszóban a hiperakut szérumkezelés végére (28. ábra).



28. ábra A szöveti átépülés biomarkereinek koncentrációja. Az IL-1 β stimuláció hatására csak az RANKL koncentrációja változott szignifikánsan, míg a hiperakut szérum kezelés 3. napjára szignifikánsan nőtt a COL1A1 és oszteonektin koncentrációja és szignifikánsan csökkent a RANKL szintje az IL-1 β stimulált 0. napi értékekhez képest. A humán szérum albuminos kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent a COL1A1 és oszteonektin szintje, míg szignifikánsan nőtt a RANKL mennyisége a 0. naphoz képest. A hiperakut szérum és albuminos kezelést összehasonlítva egymással, a kezelés utolsó napjára a COL1A1 szintje szignifikánsan alacsonyabb, míg a RANKL szintje szignifikánsan magasabb volt a hiperakut szérum hatására, mint az albumin kezelés esetén. ($n=12$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és ***, ###, ††† jelöli, ahol a $p < 0,001$, a # jelöli azokat az oszlopokat, melyek minden más mintától szignifikánsan eltértek, míg a † azokat az oszlopokat jelöli, melyek csak az IL-1 β stimulált mintáktól nem tértek el szignifikánsan, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

A szöveti minták kezelésére használt 5% humán szérumbalbumint és 10% hiperakut szérumbalbumint tartalmazó tenyésztő oldatokban szintén lemértük a vizsgált fehérjék mennyiségét, hogy bizonyítsuk a felülcsúszó mintákban történő koncentráció változásokat nem a kezelésként hozzáadott oldatok okozták. A **4. táblázat** alapján a hozzáadott 5% humán szérumbalbumint és 10% hiperakut szérumbalbumint tartalmazó tenyésztőoldatban nagyságrendekkel alacsonyabb koncentrációban voltak jelen a vizsgált OA biomarkerek.

4. táblázat Az oszteoarthritisz biomarkerjeinek koncentrációja 10% hiperakut szérumbalbumint és 5% humán szérumbalbumint tartalmazó tenyésztőoldatban.

Fehérje neve	Koncentráció (pg/ml)	
	10% hiperakut szérumbalbumint tartalmazó médium (pg/ml)	5% human szérumbalbumin tartalmazó médium (pg/ml)
<i>Az oszteoarthritisz fő gyulladáscitokinjei</i>		
IL1-β	44,376	1,526
TNF-α	24,744	2,064
IL-2	614,999	8,006
IL-6Rα	3097,122	268,567
IL-8	7,277	2,464
IL-12	459,922	33,039
IL-15	12,111	1,075
IL-17A	87,949	0,000
IL-18	382,946	8,196
<i>Az oszteoarthritisz gyulladáscitokinjei</i>		
CCL-1	19,270	0,000
CCL-2	200,819	21,508
CCL-3	2881,027	5,559
CCL-5	588,443	92,465
CXCL-10	17,349	0,485
CX3CL1/fraktalkin	4649,019	120,716
<i>Az oszteoarthritisz gyulladásgátló citokinjei</i>		
IL-1RA	200,674	1,225

IL-4Rα	0,938	4,788
IL-13	2410,747	218,770
Az oszteoarthritisz mátrix metalloproteináz enzimjeinek és aggregán		
MMP-1	204,341	16,157
MMP-2	9416,864	1360,354
MMP-3	76,393	4,783
MMP-9	3967,262	251,319
MMP-13	45,656	0,000
aggregán	6785,508	198,682
Szövetépítő biomarkerek		
COL1A1	360,290	32,691
oszteonektin	40571,472	180,257
RANKL/TRANCE	311,739	3,095

Az eredményekben csak az OA legfőbb gyulladáshoz köthető citokinjeit ábrázoltuk, az egyéb, vizsgált gyulladáshoz köthető fehérjék, melyek koncentrációjában nem következett be jelentős változás (OSM, LIF, IFN- γ , rezisztin, VEGF-A, CD-163, IL-5, IL-7, IL-13, IL-22, IL-23, IL-31, IL-33) nem kerültek bemutatásra.

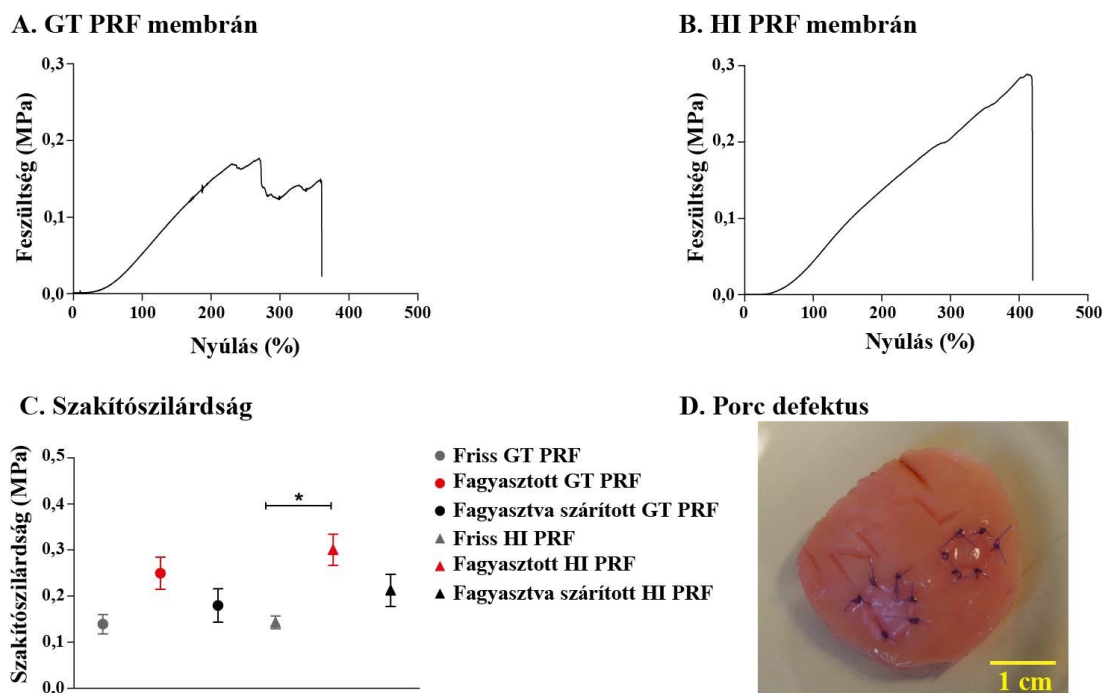
4.3. Vérvételi üvegcsővel izolált és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrinmembrán tulajdonságainak összehasonlítása

4.2.2. Mechanikai tulajdonságainak vizsgálata

4.2.2.1. Szakítószilárdság vizsgálata

Az üvegcsővel és hypACT Inject eszközzel izolált PRF membrán összehasonlítása során elsőként a mechanikai tulajdonságokat vetettük össze egymással. Mint azt az **29. ábrán** a GT (**29. ábra A. Panel**) és HI (**29. ábra B. Panel**) membránok tipikus szakítása görbéje mutatja, mindkét membrán az eredeti hosszának három-négyszeresére képes megnyúlni. A GT membránban a szálak különböző időpontokban szakadtak el, míg a HI membránban az egész anyag egy időpillanatban szakadt el, keresztirányban, az anyag középvonalában. A diagrammokat összevetve látszik, hogy így a HI membránban minden pontnak azonos a szakítóerővel szembeni ellenállása (**29. ábra A. és B. Panel**). A szakítószilárdságot mérve szignifikáns különbséget csak a fagyasztott/olvasztott és friss HI PRF között

találtunk. A friss, fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított GT és HI minták közül a legmagasabb szakítószilárdsággal a fagyasztott HI PRF membrán rendelkezett (**29. ábra C. Panel**). A minták közül csak a HI PRF membrán volt varrható, mely a klinikai használatban, például porc pótlásnál elengedhetetlen tulajdonság. A membránok közül csak a fagyasztott HI PRF membránt tudtuk szakadás nélkül hialinporc defektusba bevarni (**29. ábra D. Panel**).

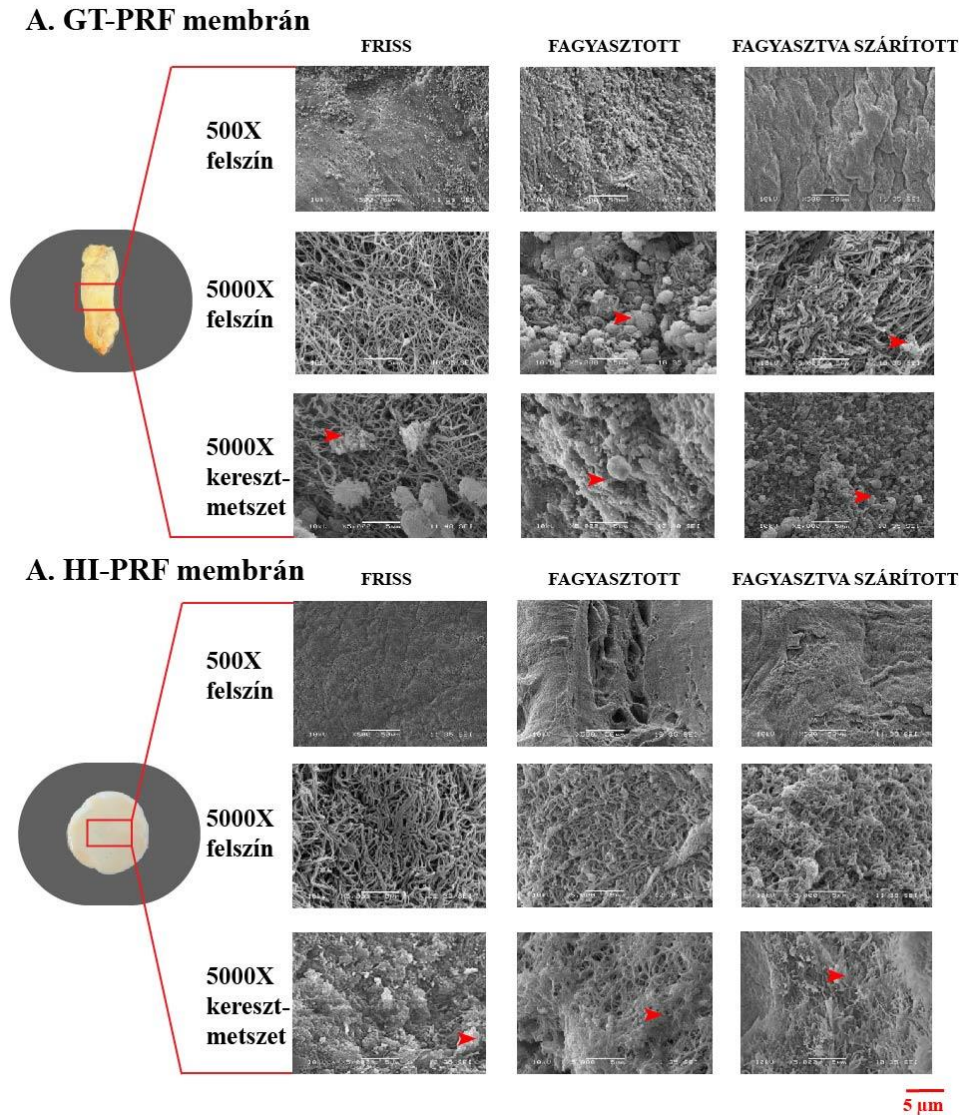


29. ábra PRF membránok szakítószilárdságának mérése. Az ábra A. Panelja GT B. Panelja a HI PRF membrán tipikus szakítási görbéjét ábrázolja, a C. Panel a mintákon mért maximális feszültség értékét mutatja, melynél a membránok elszakadtak. A D. Panel a hialin porc defektusba bevarrt fagyasztott HI PRF membránt mutatja. A mérés alapján a HI PRF anyaga homogénebb, mint a GT PRF-é, míg a szakítószilárdság értékei és a bevarrás alapján a fagyasztott HI PRF bizonyult a legerősebbnek. ($n=4$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hibaként ábrázoltuk.

4.3.1.2. Felületi és szerkezeti tulajdonságok vizsgálata pásztázó elektronmikroszkóppal (SEM)

A membránok szerkezeti analizését szkennig elektronmikroszkóppal végeztük el. Ennek során a membránok felszínét, a fibrin szálak elhelyezkedését, és a vérelemek előfordulását vizsgáltuk a membránokban. A képek kiértékelése és összevetése alapján a

fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránok felszíne egyenetlen, míg szerkezetük kompaktabb volt, továbbá a szálak között kisebb pórusokat figyeltünk meg, mint a friss membránoknál. Vérlemezkek a GT PRF membrán felszínén és belsejében egyaránt megfigyelhetők voltak, viszont a HI PRF membrán esetében a vérlemezkek elsősorban a membrán belsejében voltak jelen (30. ábra).



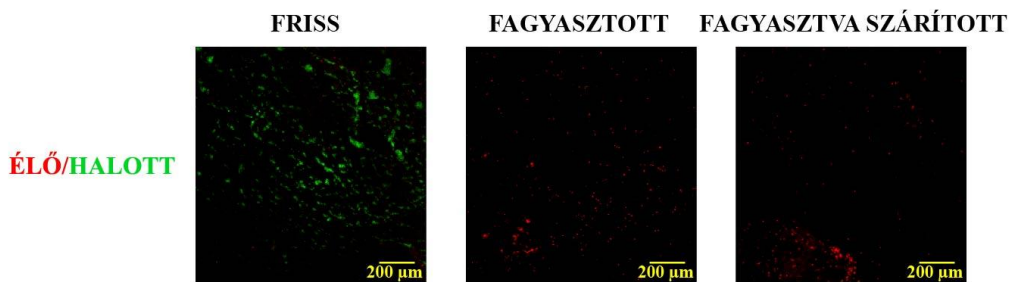
30. ábra A PRF membránok pásztázó elektronmikroszkópos képe. Az A. Panel a GT membrán, míg a B. Panel a HI membrán mikroszerkezetét ábrázolja. A membránok felszínének középső régióját 500X és 5000X nagyításban vizsgáltuk, míg a keresztmetszetét 5000X nagyításban. A fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránok szerkezete kompaktabb volt és kisebb pórusokat figyeltünk meg a fibrinszálak között, mint a friss membránoknál. A piros nyilak a vérlemezkek elhelyezkedését mutatják az ábrákon.

4.2.3. Biológiai tulajdonságai

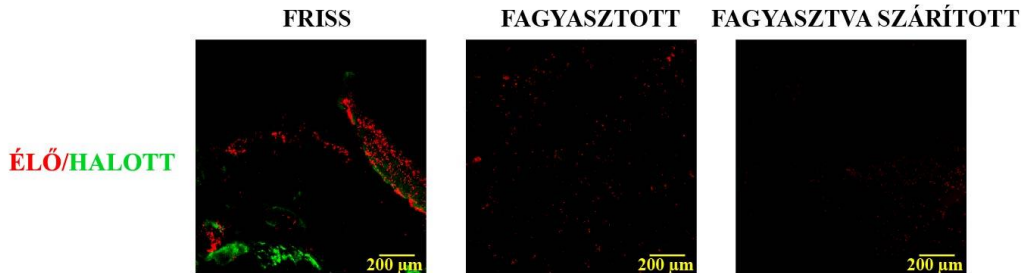
4.2.3.1. Élő/halott festés

Élő-halott festéssel ellenőriztük, hogy a fehérvérsejtek élnek-e a friss, fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított PRF membránokon. Élő sejteket a vártaknak megfelelően csak a friss membránokon találtunk. A fagyasztás/olvasztás és fagyasztást követő fagyasztva szárítás folyamatának hatására szétestek a membránokba ágyazott fehérvérsejtek. Ahogyan azt a **31. ábra** is mutatja, a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított mintákon csak halott sejtek voltak láthatóak.

A. GT PRF membrán



B. HI PRF membrán

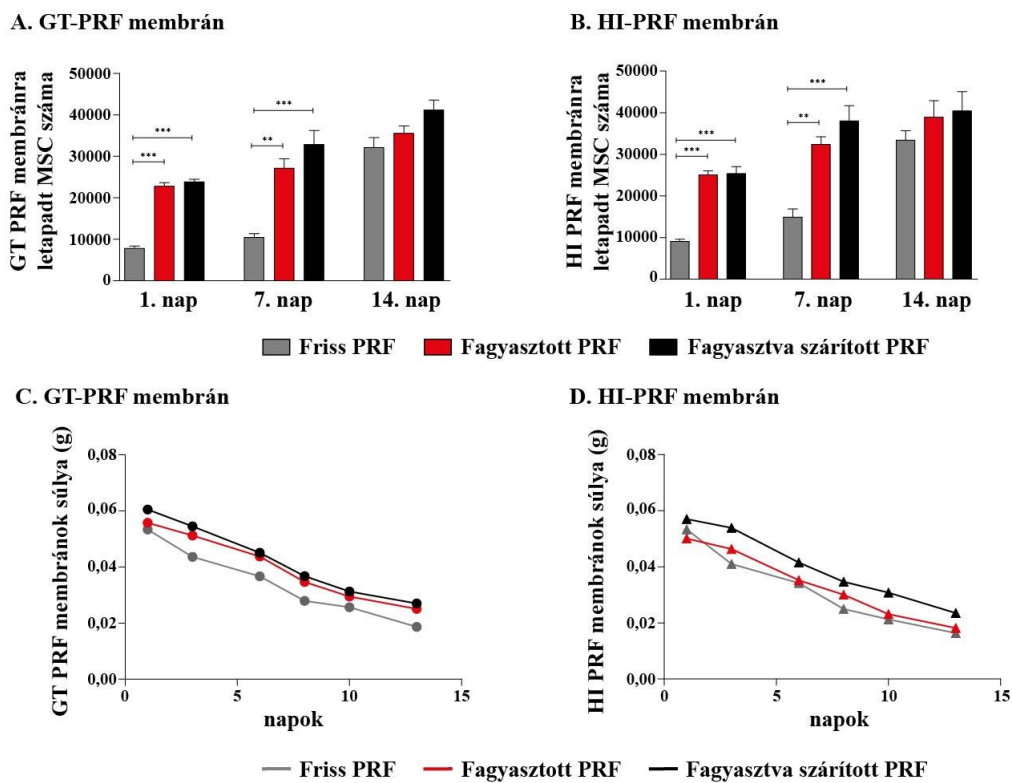


31. ábra PRF membránok élő/halott festést követő konfokális mikroszkóppal történő vizsgálata. A GT membránba ágyazott fehérvérsejtek mikroszkópos képeit az A. Panel tartalmazza, míg a HI membránok vizsgálatát a B. Panelen látjuk. Élő sejteket csak a friss membránokon láttunk.

4.2.3.2. Mezenchimális őssejtek életképességének mérése

A szövetpótlás, regeneráció területén történő alkalmazás miatt rendkívül fontos a külsőleg a membránra juttatott sejtek adhézión és proliferációs képességét vizsgálni. A támasztó és mozgató szervrendszer regenerációjának során az egyik leggyakrabban használt sejtípus a BM-MSC, így elsőként ezzel a sejtípussal végeztünk adhézión és proliferációs kísérletet.

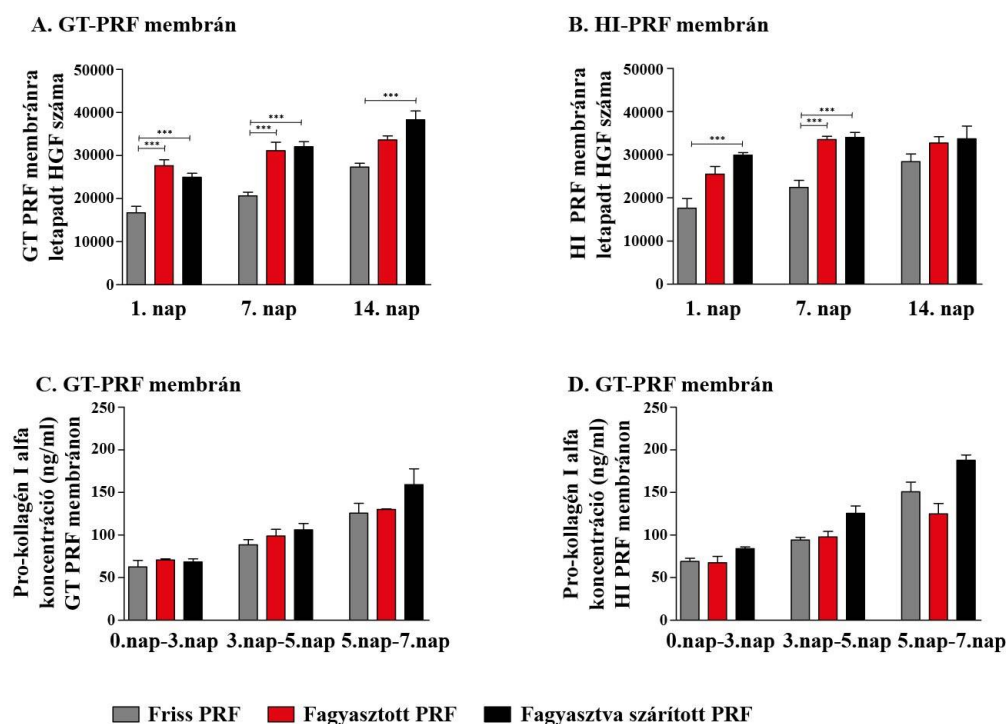
A sejtek letapadását 24 óra után mértük, míg a proliferációt egy és két hét inkubációt követően. A sejtek letapadása az első napon, és proliferációja egy hetet követően szignifikánsan magasabb volt a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított GT és HI membránok esetében a friss membránnal összevetve. 14 nap tenyésztés után nem volt szignifikáns különbség a minták között, melynek oka valószínűleg a sejtek 7. és 14. nap közötti konfluációja volt (**32. ábra A. és B. Panel**). A membránok nedves tömegének változását szintén mértük a tenyésztés alatt, mivel a letapadt sejtek és a plazmin enzim működése bontja a PRF membrán anyagát. Annak ellenére, hogy a sejtletapadás és proliferáció mértéke eltért a sejtek között, a tömegváltozásukban nem találtunk szignifikáns eltérést (**32. ábra C. és D. Panel**). A GT és HI membránok között nem találtunk szignifikáns különbséget.



32. ábra A mezenchimális őssejtek adhéziós és proliferációs képességét vizsgáltuk a PRF membránon (A. és B. Panel), valamint a membránok tömegvesztését mértük a tenyésztés alatt (C. és D. Panel). A fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránokra szignifikánsan több sejt volt képes letapadni, mint a friss membránokra. A membránok tömegének változása között nem tapasztaltunk szignifikáns változást. ($n=4$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, ** jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és *** jelöli, ahol a $p < 0,001$, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hiba.

4.3.2.3. Íny fibroblaszt sejtek életképességének mérése

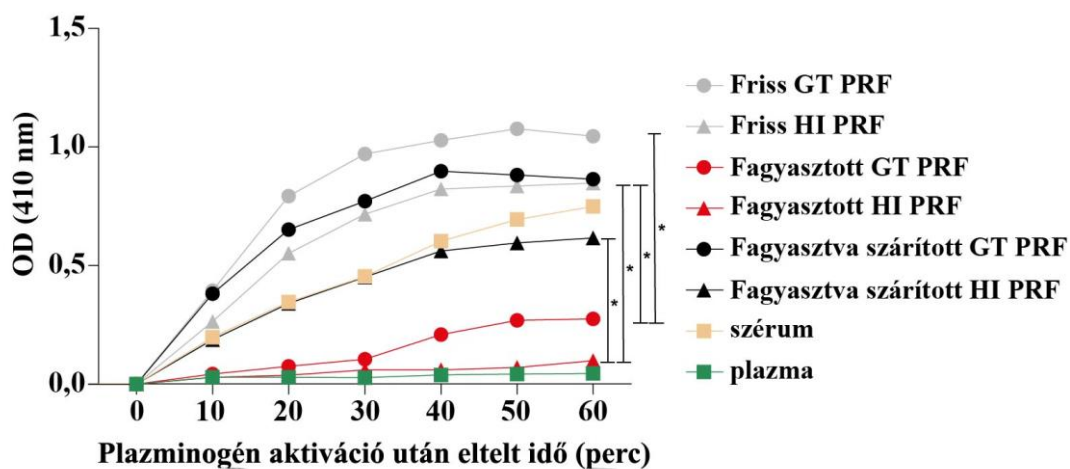
A PRF membrán használata az ortopédia mellett a fogászat és szájbélszét területén terjedt el leginkább, mint autológ íny regeneráló készítmény. Fontosnak tartottuk, hogy összehasonlítsuk a vérvételi üvegsővel előállított és hypACT eszközzel előállított PRF membránon a hGF sejtek adhézis és proliferációs képességét. A mezenchimális őssejtekhez hasonlóan a letapadás és a 7. napi sejtszám érték szignifikánsan magasabb volt a fagyasztott és fagyasztva szárított mintákon, mint a friss mintán, míg a 14. napon csak a fagyasztva szárított GT PRF membránban volt szignifikánsan magasabb a sejtszám érték a másik két mintához képest (**33. ábra A. és B. Panel**). A tenyésztési idő 3., 5. és 7. napján megmértük a sejtek által termelt pro-kollagén I alfa szintjét a sejtek felülúszójában, melyben nem találtunk a minták között szignifikáns eltérést. A GT és HI membránok között nem találtunk szignifikáns különbséget. (**33. ábra C. és D. Panel**).



33. ábra Íny fibroblaszt sejtek adhézis és proliferációs képességét vizsgáltuk a PRF membránokon (A. és B. Panel), valamint a sejtek által termelt pro-kollagén I alfa koncentrációját az 3., 5. és 7. napon (C. és D. Panel). A fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránokra szignifikánsan több sejt volt képes letapadni, mint a friss membránokra. ($n=4^*$ jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, $**$ jelöli, ahol $0,001 < p < 0,01$, és $***$ jelöli, ahol $p < 0,001$, egyutas ANOVA). Az eredményeket átlag \pm standard hiba.

4.2.3.3. Plazmin enzim aktivitásának mérése

A fibrin lebomlási sebességének fő meghatározója a plazmin enzim aktivitásának mértéke. Szövetpótló anyagként használva elengedhetetlen fontosságú, hogy a bomlási sebesség és a sejtek proliferációjának mértéke ne térjen el nagyban egymástól. Mivel a fibrin bomlását a sejtek is képesek végrehajtani fontos, hogy a plazmin enzim működéséből adódó bomlást minimalizáljuk. A plazmin enzim aktivitását vizsgálva a fagyasztott/olvasztott minták esetén szignifikánsan alacsonyabb enzimaktivitást találtunk, mint a friss és fagyasztva szárított mintákban (**34. ábra**)



34. ábra A friss, fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított GT és HI PRF membránok plazmin aktivitásának mérése. Negatív kontrollként vérplazmát, pozitív kontrollként vérszérumot használtunk. A fagyasztott/olvasztott membránokban a plazminaktivitás szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a friss és fagyasztva szárítottakban. $n=4$, * jelöli, ahol $0,01 < p < 0,05$, egyutas ANOVA. Az eredmények átlagként ábrázoltuk.

5. Megbeszélés

Az emberi szervezet regenerációs képességét számos módszerrel próbálja az orvostudomány fokozni, elősegíteni. A különböző módszerek során számos technikai, anyagi, etikai probléma felmerülésével kell számolni, melyek megoldása a regenerációs orvostudomány területén kutató tudósokra, orvosokra vár ¹⁸⁹. A regeneráció fokozásának céljából a szervezetbe juttatott anyagokkal szembeni legfőbb elvárás a biokompatibilitás, melynek hiánya immunológiai szövődmények képében nyilvánul meg, ezzel több kárt, mint hasznot okozva. Emellett a biodegradabilitás, regenerációban kifejtett hatékonyság, az előállítás és beültetés költséghatékonysága és az etikai elvek szem előtt tartása szintén fontos követelmény ³⁴. Az említett módszereket két nagyobb csoportba sorolhatjuk, melyek a sejtes és sejtmentes regenerációs technikák. A sejtes módszereknél a sérülés helyére allogén sejteket, vagy autológ embrionális, felnőttkori vagy indukált pluripotens őssejteket, vagy szomatikus sejteket juttatnak és igyekeznek a sejtek megtapadását, szaporodását, differenciációját elősegíteni ¹⁹⁰. A sejtmentes módszereknél az imént említett hatásokat a szervezet saját sejtkészletét aktiválva, a sérülés helyére migráltatva próbálják elérni ^{191,192}. Utóbbi módszerek közé tartozik az autológ vérszeparációs termékek használata, melyek legelterjedtebb tagja a PRP. A különböző vérszeparációs termékeknek az aktivált vérlemezkék által kibocsátott növekedési faktorok, citokinek regeneratív hatását használják ki az orvosok. A sebgyógyulás folyamatához hasonlóan a sérülés helyére juttatott vérlemezkékből származó növekedési faktorok elősegítik a környező sejtek migrációját és megtapadását, majd proliferációját a helyszínen, továbbá gátolják a sejtek apoptózisát ¹⁹³. A PRP használata széles körben elterjedt a klinikumban és számos pozitív hatásról számoltak már be ortopédiában, fogászatban, szájsebészetben, nőgyógyászati területen, bőrgyógyászatban ^{43,75,79,194-197}. Azonban kiváló regenerációs képessége ellenére jó pár hátrányos tulajdonsággal rendelkezik, melyek főként az előállításából adódnak, mint a véralvadásgátlók és trombin használata, valamint a sterilitás hiánya ⁸².

A fenti problémák kiküszöbölésének céljából látott neki kutatócsoportunk a hiperakut szérum fejlesztésének, melynek előállításához nincs szükség véralvadásgátlóra, sem aktiváló szerre. A hiperakut szérum a PRF csomóból kiperéselhető folyadék halmazállapotú szérum termék, mely akár injekcióként is beadható ¹²¹. Korábbi kísérletekben bizonyítottuk, hogy a hiperakut szérum a PRP-nél hatékonyabb a zsír és

csontvelő eredetű mezenchimális őssejtek, valamint OA-es porcsejtek proliferációjában, adhéziójában, és az új csontképződés elősegítésében^{117,118,120}. Korábban Proteome Profiler mérésekkel hasonlítottuk össze a hiperakut szérum és PRP összetételét, melynek alapján a PRP jobb angiogenikus képességgel és erősebb gyulladáskeltő hatással rendelkezik, mint a hiperakut szérum, valamint összeségében jelentősen több fehérjét tartalmaz¹²¹.

Mivel korábbi méréseink nem voltak kvantitatív összehasonlításra alkalmasak, sőt számos további kérdést vetettek fel, a PRP, hiperakut szérum, valamint vérplazma és vérszérum összetételét általános labor paraméterek mérésével, multiplex immunoesszével és ELISA esszével hasonlítottuk össze. Fő kérdéseink az ionösszetétel, ALP enzim aktivitása, vérlemezke szám, és a gyulladáshoz, angiogenikus, valamint gyulladásgátló molekulák mennyisége voltak. Az általános laborparaméterek mérésénél elsőként a négy minta ionösszetételét hasonlítottuk össze. Az EDTA kelátképző képessége által befolyásolt vas, réz és cink ionok mennyisége szignifikánsan alacsonyabb, míg a kálium szintje szignifikánsan magasabb volt azokban a plazma és PRP mintákban, ahol K₃EDTA volt az antikoaguláns. Mivel az EDTA a magnézium és cink ionokkal kelátot képez, melyek elengedhetetlen fontosságúak az ALP enzim aktivitásához, ezekben a mintákban az ALP enzim aktivitása is szignifikánsan alacsonyabb volt. Az ALP enzim fontos szerepet játszik a csontregeneráció során, így az EDTA PRP csontregenerációs alkalmazása hátrányos lehet a hiperakut szérumhoz képest¹⁹⁸. A citrátos PRP ionösszetétele kedvezőbbnek bizonyult az EDTA PRP-nél, kivéve a kalcium ion és nátrium ion összetételt, melynek egyértelmű oka a nátrium-citrát, mint alvadásgátló, és a kalcium-klorid, mint vérlemezke aktivátor használata volt. A citrátos PRP legfőbb hátránya a jóval alacsonyabb vérlemezkeszám volt a EDTA PRP-vel szemben. Ennek fő oka, hogy citrátot használva a centrifugálás során nem válnak el a frakciók elég élesen, és kevesebb vérlemezke szedhető le vörösvértest és fehérvérsejt szennyezettség nélkül. A citrátos PRP-ben a fehérvérsejtszám szintén jóval magasabbnak bizonyult, mint az EDTA PRP-ben. A hiperakut szérum esetében a PRF csomó teljes mértékben szeparálható a vörösvértest-frakciótól és fehérvérsejtektől. Az MPV értéke, mely fontos mérőszáma a vérlemezke funkciónak, nem tért el szignifikánsan az EDTA és citrátos PRP esetében, ahogy azt a szakirodalmi adatok alapján feltételeztük¹⁹⁹. Bár a citrátos PRP ionösszetétele kedvezőbb volt, hátrányára jóval kevesebb vérlemezket

tartalmazott, valamint az egyéb sejtes szennyezettség igen magas volt, emiatt a továbbiakban az EDTA PRP-t használtuk. Ezt a döntést továbbá az is indokolta, hogy korábbi sejtes, szövetes kísérleteinkben kizárólag EDTA PRP-vel dolgoztunk, így számunkra az EDTA PRP hiperakut szérummal történő összehasonlítása volt releváns.

Korábbi Proteome Profiler eredményeink alapján választottuk ki azt a 23 különböző angiogenikus, gyulladáscsökkentő és gyulladásgátló fehérjét, melyek mennyiségét multiplex immunoesszé segítségével hasonlítottuk össze a PRP, hiperakut szérum, vérszérum és vérplazma mintákban²⁰⁰. A szisztémás gyulladáskeltő fehérjék, melyeket nem befolyásol a vérszeparátumok izolálási módja, hasonló mennyiségben fordultak elő PRP-ben és hiperakut szérumban. A komplement fehérjék közül a C5a szintje plazmában magasabb koncentrációban volt jelen, viszont a C1qR1 szintje minden mintában azonos volt, miszerint utóbbit nem befolyásolja az izolálás módja. A vérlemezke eredetű gyulladáskeltő fehérjék mennyisége szignifikánsan magasabb volt PRP-ben, mint a többi vérszeparátumban, kivéve a fibrinogént, mely plazmában szintén magas koncentrációban volt jelen. A fibrinogén alacsony mennyiségét a vérszérumban és hiperakut szérumban az alvadás gátlás hiánya, és a fibrin eltávolítása okozta. A gyulladásgátló molekulák közül a IL-1RA szintje hiperakut szérumban és PRP-ben is magasabb volt a másik két mintánál, míg az angiopoetin vérszérumban volt magasabb a többinél. Érdekes módon a vérlemezke eredetű fehérjék száma nem volt emelkedett a szérumtermékek esetében, annak ellenére, hogy előállításuk során aktivált állapotba kerültek a vérlemezkek és fehérjéiket a környezetbe juttatták. Ez feltehetően azzal magyarázható, hogy a szérumokban a vérlemezkek természetes számban és módon aktiválódnak, míg a PRP-ben a vérlemezkek feldúsított mennyiségben voltak jelen, és trombinnal, valamint kalcium-kloriddal aktiváltuk őket²⁰¹. Eredményeink alapján a hiperakut szérum és PRP összetétele jelentősen eltér mind az ionok összetételét, mind az angiogenikus és gyulladáscsökkentő fehérjék mennyiségét illetően. Ezzel a PRP számos hátrányos tulajdonságát sikerült kiküszöbölünk a hiperakut szérummal, kivéve a sterilitás kérdését.

A sterilitás problematikáját, valamint a bonyolult, több lépésben történő előállítás hátrányait a hypACT Inject orvostechikai eszköz fejlesztésével oldotta meg kutatócsoportunk, mely alkalmas a vérvételre, centrifugálásra és a hiperakut szérum előállítására egyetlen zárt eszközben. A magas fokú sterilitásra nem csak a sejt- és

szövettenyészetek fenntartása miatt volt szükség, hanem végső célunk elérése érdekében, mely a szérum injekcióban történő bejuttatása az OA-es térdízületbe.

A különböző vérszeparátumokat, mint a PRP-t és ACS-t előszeretettel használják OA-es térdben regeneráció indukálása céljából, melynek oka, hogy az OA-ra máig nincs konkrét gyógymód, mi több a betegség konkrét kiváltó okát/okait sem ismerik az orvosok és kutatók ^{202,203}. Az egyetlen megoldást a részleges vagy teljes térdízületi protézis beültetése jelenti, ez azonban korántsem tekinthető gyógymódnak, inkább végső megoldásnak, mely biztosítja, hogy a beteg megfelelő rehabilitáció után fájdalom nélkül használhassa az érintett ízületet. A műtét nagy mértékű szöveteltávolítással jár, és a rehabilitáció ideje igen hosszú, továbbá a beteg a műtét után élete hátralévő részében csak korlátozott igénybevételnek teheti ki az ízületet. A protézis beültetés számos hátránya miatt, valamint a potenciális revíziós műtétek elkerülésének érdekében az ortopédusok igyekeznek minél inkább kitolni a beültetés időpontját ²⁰⁴. Megoldást csak az jelenthet, ha sikerül a betegséget még időben megállítani, amikor a szöveti degradáció mértéke minimális és visszafordítható. A hiányzó, valamint sérült szövet helyreállítására számos minimálinvazív szövetpótló megoldás áll rendelkezésre, azonban a betegség patomechanizmusába ezek kevésbé képesek beavatkozni. Alternatív, nem invazív megoldásként használhatók az aktivált vérlemezke eredetű növekedési faktorokat tartalmazó vérszeparátumok. Számos szakirodalmi adat támasztja alá, hogy hatékonyan használhatóak az OA szöveti regenerációjának fokozásában, sőt, néhány adat szerint gyulladáscsökkentő hatással is rendelkeznek. Azonban a PRP gyulladáscsökkentő hatását illetően ellentmondásosak a szakirodalmi adatok, egyes kutatások szerint a PRP nem több egy placebónál. ^{205,206}

Eddigi eredményeinket összegezve, a hiperakut szérum jóval proliferatívabbnak bizonyult a PRP-nél oszteoblaszt, MSC, OA-es porcsejt, valamint csontvelő explant kultúrákban, továbbá szignifikánsan alacsonyabb koncentrációban tartalmaz gyulladáskeltő molekulákat. Ezek alapján azt feltételezzük, hogy OA-es térdízületben is hatékonyabban segítené elő a degenerált porc- és csontszövet regenerációját, valamint a főként szinoviális membrán eredetű gyulladás csökkentését ^{117,119}.

A vérszeparátumok in vitro hatásának vizsgálatára főleg porcsejtek, oszteoblaszt sejtek, szinoviociták és MSC-k monokultúráját, vagy két sejtípust tartalmazó kokultúráját használják, illetve néhány esetben szövet monokultúrával modellezik a betegséget ²⁰⁷. Az

in vitro sejtes kísérletek és az in vivo humán klinikai tesztelés közötti szakadékot legtöbbször állatkísérlettel hidalják át a kutatók. Itt azonban felmerül a probléma, hogy kisállatok véréből nem lehet megfelelően előállítani a vérszeparátum termékeket, ezért humán vérből izolált termékeket ültetnek be az állatokba, mely félrevezető adatokat eredményezhet. Megoldásként létrehozunk egy három dimenziós, OA-es térd szövetmodellt, mely tartalmazza a betegségben érintett mindhárom ízületi alkotóelemet, beleértve a csontot, a porcot és a szinoviális membránt. Az együtt tenyésztett három szövetben az OA fő gyulladáshoz vezető citokinjével, az IL-1 β -val tartottuk fenn a gyulladást. Ezután hiperakut szérummal kezeltük 5 napon át a szöveteket, és 39 OA biomarker fehérje koncentrációjának méréséből következtettünk a humán szérum albumin és hiperakut szérum kezelés hatására, különös tekintettel a gyulladás mértékére és a szöveti újjáépülés megindulására. Modellünk validálásának érdekében összehasonlítottuk az OA-es szinoviális folyadék és az IL-1 β indukált szöveti felülúszó fehérje-összetételét a korábban felsorolt 39 OA biomarker alapján (39-40 oldal). Eszerint mind a 39 fehérje jelen volt mind az ízületi folyadékban, mind pedig a felülúszóban, ráadásul hasonló koncentrációkban. További érdekesség, hogy mindkét mintában a CD-163 volt jelen a legnagyobb koncentrációban, melyet sorban az oszteonektin és MMP-2 követett, a többi 36 fehérje jóval alacsonyabb mennyiségben volt jelen. Eredményeinkből arra a következtetésre jutottunk, hogy in vitro OA-es modellünk megfelelően képes utánozni az OA-es in vivo térdízületet az általunk vizsgálat szempontok alapján, így alkalmas lehet a hiperakut szérum kezelés hatásának vizsgálatára. A vártak megfelelően, az IL-1 β fenntartotta a gyulladás mértékét a szövetekben, és az általunk tapasztalt patológias folyamatok teljes mértékben megfeleltek a szakirodalom alapján elvártaknak^{208,209}.

Az IL-1 β tartalmú tápoldatot a második napon 10% hiperakut szérumot, illetve 5% humán szérum albumint tartalmazó médiumra cseréltük, majd a 3. és 5. napon megvizsgáltuk a felülúszó összetételét és a szövetek életképességét. A porc-, csont- és szinoviális szövetekben lévő sejtek proliferációja szignifikánsan nőtt a szérum hatására a negatív kontrollként használt humán szérum albuminos mintákhoz képest, valamint a 0. naphoz képest. Az intenzív sejtproliferációt növelő hatást számos korábbi eredményünk is alátámasztotta. Az OA fő gyulladáshoz vezető citokinjei közül a TNF- α , IL-2, IL-6 α , IL-8, IL-12, IL-15, IL-17 és IL-18 koncentrációja is csökkent a hiperakut szérum kezelés 5. napjára a 0. naphoz képest, valamint a TNF- α , IL-2, IL-6 α , IL-8, IL-12, IL-15 és IL-17

szintje a kezelés utolsó napjára szignifikánsan alacsonyabb volt a hiperakut szérumban kezelt mintákban, mint a humán szérumban albumin kezelt mintákban. A gyulladásgátló fehérjék közül a legjelentősebb változás nem meglepő módon az IL-1RA koncentrációjában következett be, mivel ez válaszol legérzékenyebben és gyorsabban az IL-1 β jelenlétére. Az IL-1RA szintje a 3. napig nőtt, viszont az 5. napra csökkenő tendenciát mutatott a hiperakut szérumban kezelt szövetek felülszójában, mely a gyulladást lecsökkentésére enged következtetni. A kezelés végére csak az IL-4R α koncentrációjában volt a kétféle kezelés között szignifikáns eltérés, itt szintén a hiperakut szérumban bizonyult hatékonyabbnak. A kemokinek közül a CCL-5 koncentrációja nőtt tovább a hiperakut szérumban hozzáadása után, viszont a kezelés utolsó, 5. napjára minden vizsgált kemokin mennyisége lecsökkent, és a CCL-1, CCL-3, CCL-5 és CX3CL/fraktalkin szintje is szignifikánsan alacsonyabb szinten volt jelen a szérumban kezelés hatására, mint az albuminos kezelés után. Bár a gyulladásgátló fehérjék szintje a humán szérumban albumin kezelés 5. napjára is csökkent a felülszóban, a kezdeti 0. napi szint alá csak a hiperakut szérumban kezelés tudta csökkenteni a gyulladás mértékét.

Az OA-ban bekövetkező szövetdegradációért az MMP-k és egyéb proteolitikus enzimek felelősek, elsősorban az MMP-1, 2, 3, 9, és 13. Normál körülmények között az MMP-k nagy része fontos szerepet játszik az embrió fejlődésében és az egészséges szövetek átépülése során a lebontó folyamatokban^{210,211}. Azonban OA-ban, a gyulladást citokinek fokozott termelésének hatására, megnő az MMP koncentrációja és aktivációja, lecsökken az őket gátló TIMP fehérjék szintje, valamint az új szövet keletkezéséhez szükséges mátrix fehérjék termelődése is alacsonyabb szinten zajlik^{212,213}. Méréseink alapján a hiperakut szérumban kezelés 3. napjára ugyan eltérő mértékben, de nőtt az MMP-k szintje, viszont a kezelés 5. napjára minden esetben szignifikánsan alacsonyabb koncentrációban voltak jelen az MMP fehérjék, mint a 3. napon. Ennek oka az lehet, hogy az MMP-k szintjének változására hatással van a gyulladást lecsökkentésére, így ugyanazt a hatást késleltetve látjuk, amit a gyulladást lecsökkentésére tapaszaltunk. Az MMP-3 és MMP-13 szintje szignifikánsan alacsonyabb szinten volt jelen a hiperakut szérumban kezelés utolsó napjára, mint az albuminos kezelés esetén.

A szöveti átépülést jelző markerek közül az oszteonektin és COL1A1 szintje nőtt a hiperakut szérumban kezelés hatására, míg a csontreszorpciót fokozó RANKL szintje szignifikánsan csökkent. A COL1A1 koncentrációjának hiperakut szérumban hatására

bekövetkező növekedését már korábbi kísérleteink során is leírtuk ¹¹⁸. Ezzel szemben az albuminos kezelés hatására a COL1A1 és oszteonektin koncentrációja szignifikánsan nem változott, a kezelés végére pedig csökkenő tendenciát mutatott, míg a RANKL szintje szignifikánsan nőtt az albuminos kezelés alatt. Eredményeinket összegezve a hiperakut szérum csökkentette az OA és az IL-1 β által előidézett gyulladást, valamint pozitívan hatott a szöveti regenerációra, melyet a megnövekedett sejtéletképesség és szöveti átépülést jelző fehérjék megnövekedett koncentrációja jelzett. A humán szérum albuminos kontrollkezeléssel összevetve elmondhatjuk, hogy a hiperakut szérum hatékonyabbnak bizonyult az OA kezelésére in vitro körülmények között.

A hiperakut szérumon és PRP-n kívül az ortopédia területén használt regeneratív terápiának fontos résztvevője a PRF membrán, mely a PRF csomóból hozható létre a hiperakut szérum eltávolításával ^{95,214}. A hypACT Inject eszköz felépítéséből és működéséből adódóan a hiperakut szérum kifecskedezése után az eszközben visszamaradt PRF membrán formája, vastagsága különbözik a vérvételi üvegcsővel előállított membránétól. A szérum kinyomása során az eszközben közel egyenletes erővel nyomja a dugattyú a PRF csomó minden pontját, mely egy homogénebb anyagot eredményez, mint az üvegcsővel előállított PRF membrán spatulával történő összelapítása. A hagyományos, üvegcsővel előállított membránt előszeretettel használják a fogászatban íny regenerálásra, valamint ortopédiai területen számos kutatás irányul a PRF membránnal történő csont- és porcpótlásra ^{215,216}. A szövetpótlásra használt bioanyagok szakadási tulajdonságainak ismerete nagyon fontos a sebészetben, ezért elengedhetetlen a membrán mechanikai tűrőképességének maximalizálása ¹¹⁰. Ez okból hasonlítottuk össze a GT és HI PRF membrán mechanikai és biológiai tulajdonságait, feltételezve, hogy a hypACT Injecttel előállított termék előnyösebbnek bizonyul legalább mechanikai szempontból, mint az üvegcsővel előállított. Az izolált membránok biológiai és mechanikai tulajdonságait frissen, fagyasztás/olvasztás, valamint fagyasztva szárítás után is összevetettük egymással. Eredményeink szerint a szakításhoz szükséges erő nagysága hasonló a GT és HI membránok esetében, viszont a HI membrán anyaga homogénnek bizonyult a GT membránnal ellentétben, melyre abból következtettünk, hogy az anyag egyetlen, a húzás irányára merőleges egyenes mentén szakadt végig. A GT PRF membránnál az anyag egyes pontjainak szakítószilárdsága eltérő volt, mely esetleges sebészeti varrás esetén kiszámíthatatlanná teszi azt. A különböző minták közül a

fagyasztott/olvaszott HI PRF membrán szignifikánsan magasabb szakítószilárdsággal rendelkezett, mint a többi minta, így mechanikai szempontból ez lehet a legelőnyösebb sebészeti felhasználásra. A szakirodalomban az általunk mért adatokkal megegyező értékeket találtunk, kivéve a fagyasztott/olvaszott HI PRF membrán esetében, melynek szakítószilárdsága magasabb volt a szakirodalomban fellelhető adatoknál ^{110,217}. A SEM vizsgálat során a friss, fagyasztott/olvaszott és fagyasztva szárított HI és GT minták szerkezeti tulajdonságait vetettük össze, melynek során a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított mintáknál jóval kompaktabb szerkezetet találtunk kisebb pórusokkal, mint a friss minták esetében, mely összefüggésbe hozható a szakítószilárdság különbségeivel. A HI PRF membránban a vérlemezkék eloszlása sokkal egyenletesebb volt, mint a GT membránban, mely a membrán minden területén egyenletesebb növekedési faktor felszabaduláshoz vezethet. A SEM megfigyelésünkkel ellentétben Li és munkatársai azt figyelték meg, hogy a liofilizált PRF membrán pórusai jóval nagyobbak, mint a friss membránban ¹⁰⁸. Az ellentétes eredményt valószínűleg az okozta, hogy Li és csapata száraz formában, közvetlenül a liofilizálás után fixálták a mintákat, míg mi visszanedvesítettük őket előtte PBS-sel. A vérlemezkékből felszabaduló növekedési faktorok serkentik a sejtproliferációt, melynek sebessége fontos tényező, mivel ha a membrán gyorsabban bomlik, mint ahogy a sejtek szaporodnak rajta, a regeneráció nem tud befejeződni megfelelően. A membránok sejtproliferációra gyakorolt hatásának összehasonlításához MSC-eket és hGF-eket használtunk. A GT és HI membránok között nem találtunk szignifikáns különbséget, mely nem meglepő, mivel mindkét membrán ugyanazon anyagból áll. A friss membránokra azonban kevesebb sejt tudott letapadni, mint a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárítottakra. A friss membránra letapadt alacsonyabb sejtszámra magyarázatot adhat az élő-halott festés eredménye, melynek során szemléltettük hogy a friss membránba ágyazva élő fehérvérsejteket találtunk, míg a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított mintákon csak halott sejteket találtunk. A friss membránokban lévő élő sejtek helyet foglalhatnak el a membrán pórusokban, melynek szerepe lehet az alacsonyabb MSC és hGF adhézióban. A hGF sejtek esetében nem találtunk szignifikáns eltérést a pro-kollagén I termelésben. Mint azt korábban említettem, a sejt szaporodás sebességén kívül a biomembránok lebomlási sebessége is fontos szempont. A PRF membránok degradációs sebességét nem csupán a benne és rajta tenyésztett sejtek száma határozza meg, hanem a

plazmin enzim is, mely a fibrinhez kötve bontja azt. A mintákban összehasonlítottuk a plazmin enzim aktivitását és a fagyasztott/olvasztott minták esetén szignifikánsan alacsonyabb enzimaktivitást találtunk, melynek oka a fagyasztás és olvasztás enzimszerkezetre gyakorolt károsító hatása lehet ²¹⁸. Eredményeink alapján sebészeti, szövetpótló alkalmazásra leginkább a fagyasztott HI PRF membrán lehet alkalmas, melynek mind mechanikai, mind biológiai tulajdonságai kedvezőbbek a friss és fagyasztva szárított PRF membránoknál.

6. Következtetés

Kísérletes munkám során a következő eredményekre jutottam:

1. A hiperakut szérum összetételét illetően bebizonyosodott, hogy ionösszetétele kiegyensúlyozottabb és a fiziológiához közelebb áll, mint a plazmatermékeké, továbbá az EDTA PRP-nél szignifikánsan alacsonyabb koncentrációban tartalmaz vérlemezke eredetű gyulladáscsökkentő fehérjéket.
2. Kísérleteink során sikerült egy komplett OA-es térdízületi szövetmodellt létrehozni, mely hiánypótló az in vitro kutatások terén. Bebizonyosodott, hogy a szövetmodell citokinösszetétele nagyban hasonlít az OA-es ízületi folyadék összetételéhez, így alkalmas lehet a sejtes és in vivo kutatások közötti szakadék áthidalására.
3. Bebizonyosodott az is, hogy a hiperakut szérum erős sejtproliferatív hatást fejt ki az oszteoartritiszes csont, porc és szinoviális membrán sejtejre, továbbá csökkenti az OA-re jellemző gyulladást, és képes az IL-1 β citokin által okozott gyulladást gátolni, a szövetátépülést pedig serkenteni in vitro.
4. A hypACT Inject orvostechikai eszköz alkalmas egy a tradicionális vérvételi üvegcsővel előállított PRF membránhoz hasonló membrán előállítására, melynek sejtheadhéziós, sejtproliferációs tulajdonságai, továbbá szerkezete és bomlási sebessége hasonlóak. Az anyaga viszont homogénebb, és alakja kedvezőbb, mely tulajdonságok sebészeti használatra alkalmasabbá teszik az üvegcsővel előállított membránnál.
5. A PRF membránokat fagyasztás/olvasztásnak és fagyasztva szárításnak alávetve megállapítottuk, hogy a fagyasztás/olvasztás kedvezően befolyásolja a membránok mechanikai és biológiai tulajdonságait. Az MSC letapadás a fagyasztott membránokon volt a legnagyobb mértékű, továbbá a plazmin enzim aktivitása ezekben volt a legalacsonyabb, mely lassabb bomlási sebességre utal. Ezenkívül a fagyasztott/olvasztott membránok szakítószilárdsága magasabb volt, mint a többi membráné, különösen az orvostechikai eszközzel előállított minták esetében. A minták közül így a fagyasztás/olvasztásnak alávetett, orvostechikai eszközzel előállított PRF membránt találtuk a leginkább alkalmasnak sebészeti, szövetpótló alkalmazásra, melyet alátámasztja a tény, hogy a minták közül csak ezt tudtuk szakadás és sérülés nélkül hialinporc defektusba bevarrni.

7. Összefoglalás

Munkám során új vérszérum alapú terápiás megoldásokat fejlesztettünk a degradált, oszteoartritiszes térszövet regenerációjának elősegítésére. Az autológ véralapú termékek, mint a vérlemezében gazdag plazma (PRP) és a vérlemezében gazdag fibrin (PRF) számos, főleg előállítási módjukból adódó hátrányuk ellenére széles körben elterjedtek a regeneratív ortopédiában. A PRP használatának legfőbb hátránya az előállítási mód standardizálásának hiánya és a marha trombin, valamint az antikoagulánsok hozzáadása. Míg a PRF előállítási módjánál elsősorban a membrán nem steril kezelése, a gyors degradáció és a gyenge szakítószilárdság az, mely alkalmatlanná teszi sebészeti alkalmazásra. A PRF csomóból kiperéselt szérumot, melyet hiperakut szérumnak hívunk, azzal a céllal hoztuk létre, hogy kiküszöböljük a PRP előállítási módjából adódó problémákat. Korábbi eredményeink alapján a hiperakut szérum a PRP-nél erősebb sejtproliferatív hatással rendelkezik oszteoartritiszes csontvelő- és porcsejtek esetében, továbbá jobban képes fenntartani a csontvelő eredeti szerkezetét, mint a PRP. Jelenlegi munkám során a hiperakut szérum és PRP összetételét hasonlítottuk össze és a hiperakut szérum oszteoartritiszes csont, porc és szinoviális membránra kifejtett regeneratív hatását vizsgáltuk egy saját fejlesztésű, in vitro oszteoartritiszes térd szövetmodellben. Ezen kívül összehasonlítottuk a vérvételi üvegcsővel és egy fecskendő alapú zárt rendszerben izolált, friss, fagyasztott/olvasztott, valamint fagyasztva szárított PRF membránok biológiai és mechanikai tulajdonságait. Eredményeink alapján a hiperakut szérum kiegyensúlyozottabb ion- és kevésbé gyulladásozó fehérje-összetétellel rendelkezik, mint a PRP továbbá képes az oszteoartritisz főbb gyulladásozó citokinjeinek koncentrációját csökkenteni, valamint a szöveti átépülést és a csontban, porcban, szinoviális membránban a sejtproliferációt növelni. A fagyasztott/olvasztott fecskendőrendszerrel előállított PRF membrán nagyobb szakítószilárdsággal, magasabb sejtproliferációval és alacsonyabb degradációval jellemezhető, mint a friss és fagyasztva szárított üvegcsővel és fecskendőrendszerrel előállított membránok. Eredményeink alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy a hiperakut szérum alkalmas lehet az oszteoartritiszes szövetek regenerációjának elősegítésére, miközben mellőzi a PRP előállítási módjából adódó hátrányokat. A PRF membránok közül a fagyasztott/olvasztott, fecskendő rendszerrel izolált membrán lehet leginkább alkalmas szövetpótlás során történő sebészeti használatra.

8. Summary

In the present study we have developed new blood derived applications enhancing regenerative processes in the degraded, osteoarthritic knee joint. Autologous blood derived products, such as platelet rich plasma (PRP) and platelet-rich fibrin (PRF) are widely applied in regenerative orthopedics, inspite of the drawbacks in their application, mainly deriving from the preparation method used. The main problems of PRP preparation are the lack of uniformity in the isolation methods, and the addition of bovine thrombin and anticoagulants during the isolation procedure. While PRF isolation needs open handling of the membrane, it degrades easily and it has a low tensile strength, which does not hold a suture blocking wider clinical applications. The serum squeezed out from the PRF clot, named hyperacute serum was developed to avoid the limitations of PRP. Based on our previous results, hyperacute serum has better cell proliferative effect on osteoarthritic bone marrow cells and chondrocytes and resulted in a better preserved bone marrow structure than PRP. In the present work we investigated the composition of hyperacute serum compared to PRP and the regenerative effect of hyperacute serum on osteoarthritic bone, cartilage and synovial membrane in a self designed, in vitro osteoarthritic knee tissue model. The mechanical and biological properties of fresh, freeze-thawed and freeze-dried PRF membranes isolated by glass blood drawing tube and a closed single syringe system were also compared. On the basis of our present results hyperacute serum has a more balanced ionic content with a less inflammatory protein composition than PRP and it is capable of decreasing the concentration of the main osteoarthritic inflammatory cytokines, while increasing the level of tissue remodelling markers and cell proliferation in bone, cartilage and synovial membrane. Frozen/thawed PRF membrane isolated by a single syringe closed system has better tensile strength, cell proliferation and degradation properties than fresh and freeze-dried membranes prepared by glass blood drawing tube or the syringe system. We concluded that hyperacute serum is a promising blood separation product for enhancing osteoarthritic tissue remodelling, while avoiding the drawbacks of PRP. Among PRF membrane products the frozen/thawed, syringe isolated membrane can be the most suitable for tissue repair in clinical applications.

9. Irodalomjegyzék

1. Bode, H.R. (2003) Head regeneration in Hydra. *Dev. Dyn.*, 226: 225-236.
2. LoCascio, S.A.; Lapan, S.W.; Reddien, P.W. (2017) Eye Absence Does Not Regulate Planarian Stem Cells during Eye Regeneration. *Dev. Cell*, 40: 381-391.e383.
3. Bonfanti, L. (2011) From hydra regeneration to human brain structural plasticity: a long trip through narrowing roads. *Sci. World. J.*, 11: 1270-1299.
4. Brockes, J.P. (1997) Amphibian Limb Regeneration: Rebuilding a Complex Structure. *Science*, 276: 81.
5. Wang, M.H.; Wu, C.H.; Huang, T.Y.; Sung, H.W.; Chiou, L.L.; Lin, S.P.; Lee, H.S. (2019) Nerve-mediated expression of histone deacetylases regulates limb regeneration in axolotls. *Dev. Biol.*, 449: 122-131.
6. Dawson, L.A.; Schanes, P.P.; Kim, P.; Imholt, F.M.; Qureshi, O.; Dolan, C.P.; Yu, L.; Yan, M.; Zimmer, K.N.; Falck, A.R.; Muneoka, K. (2018) Blastema formation and periosteal ossification in the regenerating adult mouse digit. *Wound Repair Regen.*, 26: 263-273.
7. Miller, T.J.; Deptula, P.L.; Buncke, G.M.; Maan, Z.N. (2019) Digit Tip Injuries: Current Treatment and Future Regenerative Paradigms. *Stem Cells Int*, 2019: 9619080.
8. Lanthier, N.; Spahr, L. (2019) Resident liver progenitor cells: Proofs of their contribution to human liver regeneration. *Clin Res Hepatol Gastroenterol*, 43: 646-648.
9. Robert, A.W.; Azevedo Gomes, F.; Rode, M.P.; Marques da Silva, M.; Veleirinho, M.; Maraschin, M.; Hayashi, L.; Wosgrau Calloni, G.; Stimamiglio, M.A. (2019) The skin regeneration potential of a pro-angiogenic secretome from human skin-derived multipotent stromal cells. *J Tissue Eng*, 10: 2041731419833391.
10. Ebrahimi, B. (2018) Cardiac progenitor reprogramming for heart regeneration. *Cell Regen (Lond)*, 7: 1-6.
11. Rohban, R.; Pieber, T.R. (2017) Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*, 2017: 5173732-5173732.

12. Kode, J.A.; Mukherjee, S.; Joglekar, M.V.; Hardikar, A.A. (2009) Mesenchymal stem cells: immunobiology and role in immunomodulation and tissue regeneration. *Cytotherapy*, 11: 377-391.
13. Mao, A.S.; Mooney, D.J. (2015) Regenerative medicine: Current therapies and future directions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 112: 14452-14459.
14. Nadig, R.R. (2009) Stem cell therapy - Hype or hope? A review. *JCD*, 12: 131-138.
15. Si, Z.; Wang, X.; Sun, C.; Kang, Y.; Xu, J.; Wang, X.; Hui, Y. (2019) Adipose-derived stem cells: Sources, potency, and implications for regenerative therapies. *Biomed. Pharmacother.*, 114: 108765.
16. Rohban, R.; Pieber, T.R. (2017) Mesenchymal Stem and Progenitor Cells in Regeneration: Tissue Specificity and Regenerative Potential. *Stem Cells Int*, 2017: 5173732.
17. Iwamoto, M.; Ohta, Y.; Larmour, C.; Enomoto-Iwamoto, M. (2013) Toward regeneration of articular cartilage. *Birth Defects Res C Embryo Today Rev*, 99: 192-202.
18. Duarte Campos, D.F.; Drescher, W.; Rath, B.; Tingart, M.; Fischer, H. (2012) Supporting Biomaterials for Articular Cartilage Repair. *Cartilage*, 3: 205-221.
19. Chen, F.-M.; Liu, X. (2016) Advancing biomaterials of human origin for tissue engineering. *Prog. Polym. Sci.*, 53: 86-168.
20. Thottappillil, N.; Nair, P.D. (2015) Scaffolds in vascular regeneration: current status. *Vasc. Health Risk Manag.*, 11: 79-91.
21. Turnbull, G.; Clarke, J.; Picard, F.; Riches, P.; Jia, L.; Han, F.; Li, B.; Shu, W. (2017) 3D bioactive composite scaffolds for bone tissue engineering. *Bioact. Mater.*, 3: 278-314.
22. Yannas, I.V.; Tzeranis, D.; So, P.T. (2015) Surface biology of collagen scaffold explains blocking of wound contraction and regeneration of skin and peripheral nerves. *Biomed. Mater.*, 11: 014106.
23. Serrano-Aroca, Á.; Vera-Donoso, C.D.; Moreno-Manzano, V. (2018) Bioengineering Approaches for Bladder Regeneration. *Int. J. Mol. Sci.*, 19: 1796.

24. Hanker, J.S.; Giammara, B.L. (1988) Biomaterials and biomedical devices. *Science*, 242: 885-892.
25. Langer, R.; Vacanti, J.P. (1993) Tissue engineering. *Science*, 260: 920-926.
26. Place, E.S.; Evans, N.D.; Stevens, M.M. (2009) Complexity in biomaterials for tissue engineering. *Nature materials*, 8: 457-470.
27. Williams, D.F. (2014) The biomaterials conundrum in tissue engineering. *Tissue Eng Part A*, 20: 1129-1131.
28. Bružauskaitė, I.; Bironaitė, D.; Bagdonas, E.; Bernotienė, E. (2016) Scaffolds and cells for tissue regeneration: different scaffold pore sizes-different cell effects. *Cytotechnology*, 68: 355-369.
29. Tatara, A.M.; Koons, G.L.; Watson, E.; Piepergerdes, T.C.; Shah, S.R.; Smith, B.T.; Shum, J.; Melville, J.C.; Hanna, I.A.; Demian, N.; Ho, T.; Ratcliffe, A.; van den Beucken, J.; Jansen, J.A.; Wong, M.E.; Mikos, A.G. (2019) Biomaterials-aided mandibular reconstruction using in vivo bioreactors. *Proc Natl Acad Sci*, 116: 6954-6963.
30. Burova, I.; Wall, I.; Shipley, R.J. (2019) Mathematical and computational models for bone tissue engineering in bioreactor systems. *J Tissue Eng*, 10: 2041731419827922.
31. Panek, M.; Antunovic, M.; Pribolsan, L.; Ivkovic, A.; Gotic, M.; Vukasovic, A.; Caput Mihalic, K.; Pusic, M.; Jurkin, T.; Marijanovic, I. (2019) Bone Tissue Engineering in a Perfusion Bioreactor Using Dexamethasone-Loaded Peptide Hydrogel. *Materials (Basel, Switzerland)*, 12: 919.
32. Blose, K.J.; Krawiec, J.T.; Weinbaum, J.S.; Vorp, D.A. Chapter 13 - Bioreactors for Tissue Engineering Purposes. In *Regenerative Medicine Applications in Organ Transplantation*, Orlando, G., Lerut, J., Soker, S., Stratta, R.J., Eds. Academic Press: Boston, 2014; pp. 177-185.
33. Jain, A.; Bansal, R. (2015) Applications of regenerative medicine in organ transplantation. *J. Pharm. Bioallied Sci.*, 7: 188-194.
34. O'Brien, F.J. (2011) Biomaterials & scaffolds for tissue engineering. *Mater. Today*, 14: 88-95.
35. Karantalis, V.; Schulman, I.H.; Balkan, W.; Hare, J.M. (2015) Allogeneic cell therapy: a new paradigm in therapeutics. *Circ. Res.*, 116: 12-15.

36. Hosseinkhani, M.; Mehrabani, D.; Karimfar, M.H.; Bakhtiyari, S.; Manafi, A.; Shirazi, R. (2014) Tissue engineered scaffolds in regenerative medicine. *World J Plast Surg*, 3: 3-7.
37. Horvathy, D.B.; Simon, M.; Schwarz, C.M.; Masteling, M.; Vacz, G.; Hornyak, I.; Lacza, Z. (2017) Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering. *Biofactors*, 43: 315-330.
38. Horvathy, D.B.; Vacz, G.; Cselenyak, A.; Weszl, M.; Kiss, L.; Lacza, Z. (2013) Albumin-coated bioactive suture for cell transplantation. *Surg. Innov.*, 20: 249-255.
39. Horvathy, D.B.; Vacz, G.; Szabo, T.; Szigyarto, I.C.; Toro, I.; Vamos, B.; Hornyak, I.; Renner, K.; Klara, T.; Szabo, B.T.; 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.
40. Fijnheer, R.; Pietersz, R.N.; de Korte, D.; Gouwerok, C.W.; Dekker, W.J.; Reesink, H.W.; Roos, D. (1990) Platelet activation during preparation of platelet concentrates: a comparison of the platelet-rich plasma and the buffy coat methods. *Transfusion (Paris)*, 30: 634-638.
41. Rinder, H.M.; Snyder, E.L. (1992) Activation of platelet concentrate during preparation and storage. *Blood Cells*, 18: 445-456.
42. McCarrel, T.M.; Mall, N.A.; Lee, A.S.; Cole, B.J.; Butty, D.C.; Fortier, L.A. (2014) Considerations for the use of platelet-rich plasma in orthopedics. *Sports Med.*, 44: 1025-1036.
43. Mlynarek, R.A.; Kuhn, A.W.; Bedi, A. (2016) Platelet-Rich Plasma (PRP) in Orthopedic Sports Medicine. *Am. J. Orthop. (Belle Mead NJ)*, 45: 290-326.
44. Patel, S.R.; Hartwig, J.H.; Italiano, J.E., Jr. (2005) The biogenesis of platelets from megakaryocyte proplatelets. *J. Clin. Investig.*, 115: 3348-3354.
45. Blair, P.; Flaumenhaft, R. (2009) Platelet alpha-granules: basic biology and clinical correlates. *Blood Rev.*, 23: 177-189.
46. Dhurat, R.; Sukesh, M. (2014) Principles and Methods of Preparation of Platelet-Rich Plasma: A Review and Author's Perspective. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, 7: 189-197.

47. Holinstat, M. (2017) Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev.*, 36: 195-198.
48. Gerrard, J.M.; White, J.G.; Peterson, D.A. (1978) The platelet dense tubular system: its relationship to prostaglandin synthesis and calcium flux. *Thromb. Haemost.*, 40: 224-231.
49. Palta, S.; Saroa, R.; Palta, A. (2014) Overview of the coagulation system. *Indian J. Anaesth.*, 58: 515-523.
50. Tomaiuolo, M.; Brass, L.F.; Stalker, T.J. (2017) Regulation of Platelet Activation and Coagulation and Its Role in Vascular Injury and Arterial Thrombosis. *Interv. Cardiol. Clin.*, 6: 1-12.
51. Gonzalez, A.C.d.O.; Costa, T.F.; Andrade, Z.d.A.; Medrado, A.R.A.P. (2016) Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.*, 91: 614-620.
52. Arroyo, A.G.; Iruela-Arispe, M.L. (2010) Extracellular matrix, inflammation, and the angiogenic response. *Cardiovasc. Res.*, 86: 226-235.
53. Khalil, N. (1999) TGF-beta: from latent to active. *Microbes Infect*, 1: 1255-1263.
54. Koh, T.J.; DiPietro, L.A. (2011) Inflammation and wound healing: the role of the macrophage. *Expert Rev. Mol. Med.*, 13: e23-e23.
55. Kryczka, J.; Boncela, J. (2015) Leukocytes: The Double-Edged Sword in Fibrosis. *Mediators Inflamm.*, 2015: 652035-652035.
56. Landén, N.X.; Li, D.; Ståhle, M. (2016) Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. *Cell. Mol. Life Sci.*, 73: 3861-3885.
57. Golebiewska, E.M.; Poole, A.W. (2015) Platelet secretion: From haemostasis to wound healing and beyond. *Blood Rev.*, 29: 153-162.
58. Wiley, H.S.; Woolf, M.F.; Opresko, L.K.; Burke, P.M.; Will, B.; Morgan, J.R.; Lauffenburger, D.A. (1998) Removal of the membrane-anchoring domain of epidermal growth factor leads to intracrine signaling and disruption of mammary epithelial cell organization. *J. Cell Biol.*, 143: 1317-1328.
59. Sundy, J.S.; Haynes, B.F. (2000) Cytokines and adhesion molecules in the pathogenesis of vasculitis. *Curr. Rheumatol. Rep.*, 2: 402-410.

60. Singer, A.J.; Clark, R.A. (1999) Cutaneous wound healing. *N. Engl. J. Med.*, 341: 738-746.
61. Liekens, S.; De Clercq, E.; Neyts, J. (2001) Angiogenesis: regulators and clinical applications. *Biochem. Pharmacol.*, 61: 253-270.
62. Etulain, J. (2018) Platelets in wound healing and regenerative medicine. *Platelets*, 29: 556-568.
63. Gonzalez, A.C.d.O.; Costa, T.F.; Andrade, Z.d.A.; Medrado, A.R.A.P. (2016) Wound healing - A literature review. *An. Bras. Dermatol.*, 91: 614-620.
64. Prakash, S.; Thakur, A. (2011) Platelet concentrates: past, present and future. *J. Maxillofac. Oral Surg.*, 10: 45-49.
65. Shahid, M.; Kundra, R. (2017) Platelet-rich plasma (PRP) for knee disorders. *EFORT open reviews*, 2: 28-34.
66. Woodell-May, J.E.; Ridderman, D.N.; Swift, M.J.; Higgins, J. (2005) Producing accurate platelet counts for platelet rich plasma: validation of a hematology analyzer and preparation techniques for counting. *J Craniofac Surg*, 16: 749-756; discussion 757-749.
67. Zhuang, Y.W.; Zeng, Y.M.; Chen, Y.F.; Zhang, H.P.; Chen, X.Y.; Yang, D.Y.; Wu, W.J. (2018) The effects of different activators on the release curve of human platelet-rich plasma. *Zhonghua jie he he hu xi za zhi = Zhonghua jiehe he huxi zazhi = Chinese journal of tuberculosis and respiratory diseases*, 41: 868-872.
68. Cole, B.J.; Seroyer, S.T.; Filardo, G.; Bajaj, S.; Fortier, L.A. (2010) Platelet-rich plasma: where are we now and where are we going? *Sports health*, 2: 203-210.
69. Pavlovic, V.; Ciric, M.; Jovanovic, V.; Stojanovic, P. (2016) Platelet Rich Plasma: a short overview of certain bioactive components. *Open Med.*, 11: 242-247.
70. Foster, T.E.; Puskas, B.L.; Mandelbaum, B.R.; Gerhardt, M.B.; Rodeo, S.A. (2009) Platelet-rich plasma: from basic science to clinical applications. *Am J Sports Med*, 37: 2259-2272.
71. Badis, D.; Omar, B. (2018) The effectiveness of platelet-rich plasma on the skin wound healing process: A comparative experimental study in sheep. *Vet. World*, 11: 800-808.

72. Lee, K.S.; Wilson, J.J.; Rabago, D.P.; Baer, G.S.; Jacobson, J.A.; Borrero, C.G. (2011) Musculoskeletal applications of platelet-rich plasma: fad or future? *AJR Am J Roentgenol*, 196: 628-636.
73. Gentile, P.; Cole, J.P.; Cole, M.A.; Garcovich, S.; Bielli, A.; Scioli, M.G.; Orlandi, A.; Insalaco, C.; Cervelli, V. (2017) Evaluation of Not-Activated and Activated PRP in Hair Loss Treatment: Role of Growth Factor and Cytokine Concentrations Obtained by Different Collection Systems. *Int. J. Mol. Sci.*, 18: 408.
74. Taniguchi, Y.; Yoshioka, T.; Kanamori, A.; Aoto, K.; Sugaya, H.; Yamazaki, M. (2018) Intra-articular platelet-rich plasma (PRP) injections for treating knee pain associated with osteoarthritis of the knee in the Japanese population: a phase I and IIa clinical trial. *Nagoya J Med Sci.*, 80: 39-51.
75. Andia, I.; Martin, J.I.; Maffulli, N. (2018) Advances with platelet rich plasma therapies for tendon regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, 18: 389-398.
76. Suthar, M.; Gupta, S.; Bukhari, S.; Ponemone, V. (2017) Treatment of chronic non-healing ulcers using autologous platelet rich plasma: a case series. *J. Biomed. Sci.*, 24: 16-16.
77. Pinto, J.M.N.; Pizani, N.S.; Kang, H.C.; Silva, L.A.K. (2014) Application of platelet-rich plasma in the treatment of chronic skin ulcer - case report. *An. Bras. Dermatol.*, 89: 638-640.
78. Shih, S. (2019) Platelet-rich plasma: Potential role in combined therapy for vitiligo. *Dermatol Ther*, 32: e12773.
79. Zadehmodarres, S.; Salehpour, S.; Saharkhiz, N.; Nazari, L. (2017) Treatment of thin endometrium with autologous platelet-rich plasma: a pilot study. *JBRA Assist Reprod*, 21: 54-56.
80. Jang, H.Y.; Myoung, S.M.; Choe, J.M.; Kim, T.; Cheon, Y.P.; Kim, Y.M.; Park, H. (2017) Effects of Autologous Platelet-Rich Plasma on Regeneration of Damaged Endometrium in Female Rats. *Yonsei Med. J.*, 58: 1195-1203.
81. Sabarish, R.; Lavu, V.; Rao, S.R. (2015) A Comparison of Platelet Count and Enrichment Percentages in the Platelet Rich Plasma (PRP) Obtained Following Preparation by Three Different Methods. *JCDR*, 9: ZC10-ZC12.

82. Middleton, K.K.; Barro, V.; Muller, B.; Terada, S.; Fu, F.H. (2012) Evaluation of the effects of platelet-rich plasma (PRP) therapy involved in the healing of sports-related soft tissue injuries. *The Iowa orthopaedic journal*, 32: 150-163.
83. do Amaral, R.J.F.C.; da Silva, N.P.; Haddad, N.F.; Lopes, L.S.; Ferreira, F.D.; Filho, R.B.; Cappelletti, P.A.; 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: 7414036-7414036.
84. Giraldo, C.E.; Alvarez, M.E.; Carmona, J.U. (2015) Effects of sodium citrate and acid citrate dextrose solutions on cell counts and growth factor release from equine pure-platelet rich plasma and pure-platelet rich gel. *BMC Vet. Res.*, 11: 60.
85. 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*, 18: 176-185.
86. Zhang, N.; Wang, K.; Li, Z. (2019) Comparative study of different anticoagulants and coagulants in the evaluation of clinical application of platelet-rich plasma (PRP) standardization. *Cell and tissue banking*, 20: 61-75.
87. Fukaya, M.; Ito, A. (2014) A New Economic Method for Preparing Platelet-rich Plasma. *Plastic and reconstructive surgery. Global open*, 2: e162-e162.
88. Lei, H.; Gui, L.; Xiao, R. (2009) The effect of anticoagulants on the quality and biological efficacy of platelet-rich plasma. *Clin. Biochem.*, 42: 1452-1460.
89. Du, L.; Miao, Y.; Li, X.; Shi, P.; Hu, Z. (2018) A Novel and Convenient Method for the Preparation and Activation of PRP without Any Additives: Temperature Controlled PRP. *Biomed Res Int*, 2018: 12.
90. King, W.; Toler, K.; Woodell-May, J. (2018) Role of White Blood Cells in Blood- and Bone Marrow-Based Autologous Therapies. *Biomed Res Int*, 2018: 6510842.
91. Yerlikaya, M.; Talay Çalış, H.; Tomruk Sütbeyaz, S.; Sayan, H.; Ibiş, N.; Koç, A.; Karakükçü, Ç. (2017) Comparison of Effects of Leukocyte-Rich and

- Leukocyte-Poor Platelet-Rich Plasma on Pain and Functionality in Patients With Lateral Epicondylitis. *Arch Rheumatol*, 33: 73-79.
92. Le, A.D.K.; Enweze, L.; DeBaun, M.R.; Dragoo, J.L. (2018) Current Clinical Recommendations for Use of Platelet-Rich Plasma. *Curr. Rev. Musculoskelet. Med.*, 11: 624-634.
 93. Kobayashi, Y.; Saita, Y.; Nishio, H.; Ikeda, H.; Takazawa, Y.; Nagao, M.; Takaku, T.; Komatsu, N.; Kaneko, K. (2016) Leukocyte concentration and composition in platelet-rich plasma (PRP) influences the growth factor and protease concentrations. *J Orthop Sci*, 21: 683-689.
 94. Zhou, Y.; Zhang, J.; Wu, H.; Hogan, M.V.; Wang, J.H.C. (2015) The differential effects of leukocyte-containing and pure platelet-rich plasma (PRP) on tendon stem/progenitor cells - implications of PRP application for the clinical treatment of tendon injuries. *Stem Cell Res Ther*, 6: 173-173.
 95. Saluja, H.; Dehane, V.; Mahindra, U. (2011) Platelet-Rich fibrin: A second generation platelet concentrate and a new friend of oral and maxillofacial surgeons. *Ann Maxillofac Surg.*, 1: 53-57.
 96. Naik, B.; Karunakar, P.; Jayadev, M.; Marshal, V.R. (2013) Role of Platelet rich fibrin in wound healing: A critical review. *JCD*, 16: 284-293.
 97. Kawase, T.; Tanaka, T. (2017) An updated proposal for terminology and classification of platelet-rich fibrin. *Regen Ther.*, 7: 80-81.
 98. Abd El Raouf, M.; Wang, X.; Miusi, S.; Chai, J.; Mohamed AbdEl-Aal, A.B.; Nefissa Helmy, M.M.; Ghanaati, S.; Choukroun, J.; Choukroun, E.; Zhang, Y.; Miron, R.J. (2019) Injectable-platelet rich fibrin using the low speed centrifugation concept improves cartilage regeneration when compared to platelet-rich plasma. *Platelets*, 30: 213-221.
 99. Fan, W.J.; Yang, M.; Zhang, C.; Xue, R.; Zhang, W.; Qin, H.X. (2013) Effects of Choukroun's platelet-rich fibrin on human gingival fibroblasts proliferation, migration and type I collagen secretion. *Zhonghua kou qiang yi xue za zhi = Zhonghua kouqiang yixue zazhi = Chinese journal of stomatology*, 48: 72-76.
 100. Wang, X.; Zhang, Y.; Choukroun, J.; Ghanaati, S.; Miron, R.J. (2017) Behavior of Gingival Fibroblasts on Titanium Implant Surfaces in Combination with either Injectable-PRF or PRP. *Int. J. Mol. Sci.*, 18: 331.

101. Kumar, M.; Chopra, S.; Das, D.; Gupta, M.; Memoalia, J.; Verma, G. (2018) Direct Maxillary Sinus Floor Augmentation for Simultaneous Dental Implant Placement. *Ann Maxillofac Surg.*, 8: 188-192.
102. Cano-Durán, J.A.; Peña-Cardelles, J.-F.; Ortega-Concepción, D.; Paredes-Rodríguez, V.M.; García-Riart, M.; López-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.
103. Zhang, Y.; Ruan, Z.; Shen, M.; Tan, L.; Huang, W.; Wang, L.; Huang, Y. (2018) Clinical effect of platelet-rich fibrin on the preservation of the alveolar ridge following tooth extraction. *Exp Ther Med*, 15: 2277-2286.
104. Kokdere, N.N.; Baykul, T.; Findik, Y. (2015) The use of platelet-rich fibrin (PRF) and PRF-mixed particulated autogenous bone graft in the treatment of bone defects: An experimental and histomorphometrical study. *Dent Res J (Isfahan)*, 12: 418-424.
105. Ritto, F.G.; Pimentel, T.; Canellas, J.V.S.; Junger, B.; Cruz, M.; Medeiros, P.J. (2019) Randomized double-blind clinical trial evaluation of bone healing after third molar surgery with the use of leukocyte- and platelet-rich fibrin. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 48: 1088-1093.
106. Wong, C.-C.; Kuo, T.-F.; Yang, T.-L.; Tsuang, Y.-H.; Lin, M.-F.; Chang, C.-H.; Lin, Y.-H.; Chan, W.P. (2017) Platelet-Rich Fibrin Facilitates Rabbit Meniscal Repair by Promoting Meniscocytes Proliferation, Migration, and Extracellular Matrix Synthesis. *Int. J. Mol. Sci.*, 18: 1722.
107. Desai, C.B.; Mahindra, U.R.; Kini, Y.K.; Bakshi, M.K. (2013) Use of Platelet-Rich Fibrin over Skin Wounds: Modified Secondary Intention Healing. *J. Cutan. Aesthet. Surg.*, 6: 35-37.
108. Li, Q.; Reed, D.A.; Min, L.; Gopinathan, G.; Li, S.; Dangaria, S.J.; Li, L.; Geng, Y.; Galang, M.-T.; Gajendrareddy, P.; Zhou, Y.; Luan, X.; Diekwisch, T.G.H. (2014) Lyophilized platelet-rich fibrin (PRF) promotes craniofacial bone regeneration through Runx2. *Int. J. Mol. Sci.*, 15: 8509-8525.

109. Akbari Saeed, T.; Ahmadi ZeydAbadi, M.; Fatemi, A.; Farsinejad, A. (2018) In vitro evaluation of decontamination effects on mechanical properties of fibrin membrane. *Medical journal of the Islamic Republic of Iran*, 32: 2-2.
110. Isobe, K.; Watanebe, T.; Kawabata, H.; Kitamura, Y.; Okudera, T.; Okudera, H.; Uematsu, K.; Okuda, K.; Nakata, K.; Tanaka, T.; Kawase, T. (2017) Mechanical and degradation properties of advanced platelet-rich fibrin (A-PRF), concentrated growth factors (CGF), and platelet-poor plasma-derived fibrin (PPTF). *Int J Implant Dent.*, 3: 17-17.
111. Sam, G.; Vadakkekuttical, R.J.; Amol, N.V. (2015) In vitro evaluation of mechanical properties of platelet-rich fibrin membrane and scanning electron microscopic examination of its surface characteristics. *J Indian Soc Periodontol.*, 19: 32-36.
112. Baltzer, A.W.A.; Ostapczuk, M.S.; Stosch, D.; Seidel, F.; Granrath, M. (2013) A new treatment for hip osteoarthritis: clinical evidence for the efficacy of autologous conditioned serum. *Orthop. Rev.*, 5: 59-64.
113. Damjanov, N.; Barac, B.; Colic, J.; Stevanovic, V.; Zekovic, A.; Tulic, G. (2018) The efficacy and safety of autologous conditioned serum (ACS) injections compared with betamethasone and placebo injections in the treatment of chronic shoulder joint pain due to supraspinatus tendinopathy: a prospective, randomized, double-blind, controlled study. *Med Ultrason*, 20: 335-341.
114. Rutgers, M.; Saris, D.B.F.; Dhert, W.J.A.; Creemers, L.B. (2010) Cytokine profile of autologous conditioned serum for treatment of osteoarthritis, in vitro effects on cartilage metabolism and intra-articular levels after injection. *Arthritis Res Ther*, 12: R114-R114.
115. Rutgers, M.; Creemers, L.B.; Auw Yang, K.G.; Raijmakers, N.J.; Dhert, W.J.; Saris, D.B. (2015) Osteoarthritis treatment using autologous conditioned serum after placebo. *Acta Orthop*, 86: 114-118.
116. Zarringam, D.; Bekkers, J.E.J.; Saris, D.B.F. (2018) Long-term Effect of Injection Treatment for Osteoarthritis in the Knee by Orthokin Autologous Conditioned Serum. *Cartilage*, 9: 140-145.
117. Simon, M.; Major, B.; Vác, G.; Kuten, O.; Hornyák, I.; Hinsenkamp, A.; Kardos, D.; Bagó, M.; Cseh, D.; Sárközi, 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: 4854619-4854619.
118. Jeyakumar, V.; Niculescu-Morzsa, 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: 75-75.
 119. Jeyakumar, V.; Niculescu-Morzsa, E.; Bauer, C.; Lacza, Z.; Nehrer, S. (2019) Redifferentiation of Articular Chondrocytes by Hyperacute Serum and Platelet Rich Plasma in Collagen Type I Hydrogels. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 316.
 120. 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.
 121. Vacz, G.; Major, B.; Gaal, D.; Petrik, L.; Horvathy, D.B.; Han, W.; Holczer, T.; Simon, M.; Muir, J.M.; 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.
 122. Zhang, Y.; Jordan, J.M. (2010) Epidemiology of osteoarthritis. *Clin Geriatr Med*, 26: 355-369.
 123. Mobasheri, A.; Batt, M. (2016) An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Annals of Physical and Rehabilitation Medicine*, 59: 333-339.
 124. Man, G.S.; Mologhianu, G. (2014) Osteoarthritis pathogenesis - a complex process that involves the entire joint. *J. Med. Life*, 7: 37-41.
 125. Malemud, C.J. (2015) Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol*, 27: 289-294.
 126. Xia, B.; Di, C.; Zhang, J.; Hu, S.; Jin, H.; Tong, P. (2014) Osteoarthritis pathogenesis: a review of molecular mechanisms. *Calcif. Tissue Int.*, 95: 495-505.
 127. Sellam, J.; Berenbaum, F. (2010) The role of synovitis in pathophysiology and clinical symptoms of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol*, 6: 625-635.
 128. Yuan, G.H.; Tanaka, M.; Masuko-Hongo, K.; Shibakawa, A.; Kato, T.; Nishioka, K.; Nakamura, H. (2004) Characterization of cells from pannus-like tissue over articular cartilage of advanced osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 12: 38-45.

129. Haseeb, A.; Haqqi, T.M. (2013) Immunopathogenesis of osteoarthritis. *Clin Immunol*, 146: 185-196.
130. Barr, A.J.; Campbell, T.M.; Hopkinson, D.; Kingsbury, S.R.; Bowes, M.A.; Conaghan, P.G. (2015) A systematic review of the relationship between subchondral bone features, pain and structural pathology in peripheral joint osteoarthritis. *Arthritis Res Ther*, 17: 228-228.
131. Madry, H.; van Dijk, C.N.; Mueller-Gerbl, M. (2010) The basic science of the subchondral bone. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18: 419-433.
132. Saidenberg Kermanac'h, N.; Bessis, N.; Cohen-Solal, M.; De Vernejoul, M.C.; Boissier, M.C. (2002) Osteoprotegerin and inflammation. *Eur Cytokine Netw*, 13: 144-153.
133. Braun, H.J.; Gold, G.E. (2012) Diagnosis of osteoarthritis: imaging. *Bone*, 51: 278-288.
134. Kohn, M.D.; Sassoon, A.A.; Fernando, N.D. (2016) Classifications in Brief: Kellgren-Lawrence Classification of Osteoarthritis. *Clin. Orthop. Relat. Res.*, 474: 1886-1893.
135. Roos, E.M.; Lohmander, L.S. (2003) The Knee injury and Osteoarthritis Outcome Score (KOOS): from joint injury to osteoarthritis. *Health Qual Life Outcomes.*, 1: 64-64.
136. Hawker, G.A.; Mian, S.; Kendzerska, T.; French, M. (2011) Measures of adult pain: Visual Analog Scale for Pain (VAS Pain), Numeric Rating Scale for Pain (NRS Pain), McGill Pain Questionnaire (MPQ), Short-Form McGill Pain Questionnaire (SF-MPQ), Chronic Pain Grade Scale (CPGS), Short Form-36 Bodily Pain Scale (SF-36 BPS), and Measure of Intermittent and Constant Osteoarthritis Pain (ICOAP). *Arthritis Care Res.*, 63: S240-S252.
137. Briggs, K.K.; Steadman, J.R.; Hay, C.J.; Hines, S.L. (2009) Lysholm score and Tegner activity level in individuals with normal knees. *Am J Sports Med*, 37: 898-901.
138. Briggs, K.K.; Lysholm, J.; Tegner, Y.; Rodkey, W.G.; Kocher, M.S.; Steadman, J.R. (2009) The Reliability, Validity, and Responsiveness of the Lysholm Score and Tegner Activity Scale for Anterior Cruciate Ligament Injuries of the Knee: 25 Years Later. *Am J Sports Med*, 37: 890-897.

139. Madry, H.; Grün, U.W.; Knutsen, G. (2011) Cartilage repair and joint preservation: medical and surgical treatment options. *Dtsch Arztebl Int*, 108: 669-677.
140. Bowman, E.N.; Hallock, J.; Azar, F.M.; Throckmorton, T. (2017) Hyaluronic Acid Injections of the Knee: Predictors of Successful Treatment. *Orthop J Sports Med*, 5: 2325967117S2325900447.
141. Altman, R.; Hackel, J.; Niazi, F.; Shaw, P.; Nicholls, M. (2018) Efficacy and safety of repeated courses of hyaluronic acid injections for knee osteoarthritis: A systematic review. *Semin Arthritis Rheum*, 48: 168-175.
142. Quilliot, J.; Couderc, M.; Giraud, C.; Soubrier, M.; Mathieu, S. (2019) Efficacy of intra-articular hyaluronic acid injection in knee osteoarthritis in everyday life. *Semin Arthritis Rheum*, 49: e10-e11.
143. Akeda, K.; An, H.S.; Okuma, M.; Attawia, M.; Miyamoto, K.; Thonar, E.J.; Lenz, M.E.; Sah, R.L.; Masuda, K. (2006) Platelet-rich plasma stimulates porcine articular chondrocyte proliferation and matrix biosynthesis. *Osteoarthritis Cartilage*, 14: 1272-1280.
144. Park, S.I.; Lee, H.R.; Kim, S.; Ahn, M.W.; Do, S.H. (2012) Time-sequential modulation in expression of growth factors from platelet-rich plasma (PRP) on the chondrocyte cultures. *Mol Cell Biochem*, 361: 9-17.
145. Gaissmaier, C.; Fritz, J.; Krackhardt, T.; Flesch, I.; Aicher, W.K.; Ashammakhi, N. (2005) Effect of human platelet supernatant on proliferation and matrix synthesis of human articular chondrocytes in monolayer and three-dimensional alginate cultures. *Biomaterials*, 26: 1953-1960.
146. Yin, Z.; Yang, X.; Jiang, Y.; Xing, L.; Xu, Y.; Lu, Y.; Ding, P.; Ma, J.; Xu, Y.; Gui, J. (2014) Platelet-rich plasma combined with agarose as a bioactive scaffold to enhance cartilage repair: an in vitro study. *J Biomater Appl*, 28: 1039-1050.
147. Kabiri, A.; Esfandiari, E.; Esmaeili, A.; Hashemibeni, B.; Pourazar, A.; Mardani, M. (2014) Platelet-rich plasma application in chondrogenesis. *Adv. Biomed. Res.*, 3: 138-138.
148. Anitua, E.; Sanchez, M.; Nurden, A.T.; Zalduendo, M.M.; de la Fuente, M.; Azofra, J.; Andia, I. (2007) Platelet-released growth factors enhance the

- secretion of hyaluronic acid and induce hepatocyte growth factor production by synovial fibroblasts from arthritic patients. *Rheumatology* (Oxford, England), 46: 1769-1772.
149. Sundman, E.A.; Cole, B.J.; Karas, V.; Della Valle, C.; Tetreault, M.W.; Mohammed, H.O.; Fortier, L.A. (2014) The anti-inflammatory and matrix restorative mechanisms of platelet-rich plasma in osteoarthritis. *Am J Sports Med*, 42: 35-41.
 150. Wu, C.C.; Chen, W.H.; Zao, B.; Lai, P.L.; Lin, T.C.; Lo, H.Y.; Shieh, Y.H.; Wu, C.H.; Deng, W.P. (2011) Regenerative potentials of platelet-rich plasma enhanced by collagen in retrieving pro-inflammatory cytokine-inhibited chondrogenesis. *Biomaterials*, 32: 5847-5854.
 151. Kütük, N.; Baş, B.; Soylu, E.; Gönen, Z.B.; Yilmaz, C.; Balcioglu, E.; Özdamar, S.; Alkan, A. (2014) Effect of Platelet-Rich Plasma on Fibrocartilage, Cartilage, and Bone Repair in Temporomandibular Joint. *J Oral Maxillofac Surg*, 72: 277-284.
 152. Kanno, T.; Takahashi, T.; Tsujisawa, T.; Ariyoshi, W.; Nishihara, T. (2005) Platelet-rich plasma enhances human osteoblast-like cell proliferation and differentiation. *J Oral Maxillofac Surg*, 63: 362-369.
 153. Mishra, A.; Tummala, P.; King, A.; Lee, B.; Kraus, M.; Tse, V.; Jacobs, C.R. (2009) Buffered platelet-rich plasma enhances mesenchymal stem cell proliferation and chondrogenic differentiation. *Tissue Eng. Part C*, 15: 431-435.
 154. Filardo, G.; Kon, E. (2016) PRP: Product Rich in Placebo? *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 24: 3702-3703.
 155. Filardo, G.; Di Matteo, B.; Di Martino, A.; Merli, M.L.; Cenacchi, A.; Fornasari, P.; Marcacci, M.; Kon, E. (2015) Platelet-Rich Plasma Intra-articular Knee Injections Show No Superiority Versus Viscosupplementation: A Randomized Controlled Trial. *Am J Sports Med*, 43: 1575-1582.
 156. Mariani, E.; Canella, V.; Cattini, L.; Kon, E.; Marcacci, M.; Di Matteo, B.; Pulsatelli, L.; Filardo, G. (2016) Leukocyte-Rich Platelet-Rich Plasma Injections Do Not Up-Modulate Intra-Articular Pro-Inflammatory Cytokines in the Osteoarthritic Knee. *PloS one*, 11: e0156137.

157. Say, F.; Gurler, D.; Yener, K.; Bulbul, M.; Malkoc, M. (2013) Platelet-rich plasma injection is more effective than hyaluronic acid in the treatment of knee osteoarthritis. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 80: 278-283.
158. Kon, E.; Mandelbaum, B.; Buda, R.; Filardo, G.; Delcogliano, M.; Timoncini, A.; Fornasari, P.M.; Giannini, S.; Marcacci, M. (2011) Platelet-rich plasma intra-articular injection versus hyaluronic acid viscosupplementation as treatments for cartilage pathology: from early degeneration to osteoarthritis. *Arthroscopy*, 27: 1490-1501.
159. Duymus, T.M.; Mutlu, S.; Dernek, B.; Komur, B.; Aydogmus, S.; Kesiktas, F.N. (2017) Choice of intra-articular injection in treatment of knee osteoarthritis: platelet-rich plasma, hyaluronic acid or ozone options. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 25: 485-492.
160. Su, K.; Bai, Y.; Wang, J.; Zhang, H.; Liu, H.; Ma, S. (2018) Comparison of hyaluronic acid and PRP intra-articular injection with combined intra-articular and intraosseous PRP injections to treat patients with knee osteoarthritis. *Clin Rheumatol*, 37: 1341-1350.
161. Lana, J.F.; Weglein, A.; Sampson, S.E.; Vicente, E.F.; Huber, S.C.; Souza, C.V.; Ambach, M.A.; Vincent, H.; Urban-Paffaro, A.; Onodera, C.M.; Annichino-Bizzacchi, J.M.; Santana, M.H.; Belangero, W.D. (2016) Randomized controlled trial comparing hyaluronic acid, platelet-rich plasma and the combination of both in the treatment of mild and moderate osteoarthritis of the knee. *J Stem Cells Regen Med*, 12: 69-78.
162. Laver, L.; Marom, N.; Dnyanesh, L.; Mei-Dan, O.; Espregueira-Mendes, J.; Gobbi, A. (2017) PRP for Degenerative Cartilage Disease: A Systematic Review of Clinical Studies. *Cartilage*, 8: 341-364.
163. Erggelet, C.; Vavken, P. (2016) Microfracture for the treatment of cartilage defects in the knee joint - A golden standard? *J Clin Orthop Trauma.*, 7: 145-152.
164. Weber, A.E.; Locker, P.H.; Mayer, E.N.; Cvetanovich, G.L.; Tilton, A.K.; Erickson, B.J.; Yanke, A.B.; Cole, B.J. (2018) Clinical Outcomes After Microfracture of the Knee: Midterm Follow-up. *Orthop J Sports Med*, 6: 2325967117753572-2325967117753572.

165. Kreuz, P.C.; Steinwachs, M.R.; Erggelet, C.; Krause, S.J.; Konrad, G.; Uhl, M.; Südkamp, N. (2006) Results after microfracture of full-thickness chondral defects in different compartments in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 14: 1119-1125.
166. De Almeida Lira Neto, O.; Da Silveira Franciozi, C.E.; De Mello Granata Júnior, G.S.; De Queiroz, A.A.B.; Filho, M.C.; Navarro, R.D. (2015) Surgical treatment of osteochondral lesions of the knee by means of mosaicplasty. *Rev Bras Ortop.*, 45: 166-173.
167. Mistry, H.; Connock, M.; Pink, J.; Shyangdan, D.; Clar, C.; Royle, P.; Court, R.; Biant, L.C.; Metcalfe, A.; Waugh, N. (2017) Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, 21: 1-294.
168. Jungmann, P.M.; Salzmann, G.M.; Schmal, H.; Pestka, J.M.; Südkamp, N.P.; Niemeyer, P. (2012) Autologous chondrocyte implantation for treatment of cartilage defects of the knee: what predicts the need for reintervention? *Am J Sports Med*, 40: 58-67.
169. Mistry, H.; Connock, M.; Pink, J.; Shyangdan, D.; Clar, C.; Royle, P.; Court, R.; Biant, L.C.; Metcalfe, A.; Waugh, N. (2017) Autologous chondrocyte implantation in the knee: systematic review and economic evaluation. *Health Technol. Assess.*, 21: 1-294.
170. Gille, J.; Behrens, P.; Schulz, A.P.; Oheim, R.; Kienast, B. (2016) Matrix-Associated Autologous Chondrocyte Implantation: A Clinical Follow-Up at 15 Years. *Cartilage*, 7: 309-315.
171. Nehrer, S.; Domayer, S.E.; Hirschfeld, C.; Stelzeneder, D.; Trattinig, S.; Dorotka, R. (2011) Matrix-Associated and Autologous Chondrocyte Transplantation in the Ankle: Clinical and MRI Follow-up after 2 to 11 Years. *Cartilage*, 2: 81-91.
172. Brix, M.; Chiari, C.; Nehrer, S.; Windhager, R.; Domayer, S. (2012) Five to ten year follow up of matrix associated autologous chondrocyte transplantation (MACT) in the knee. *Osteoarthritis Cartilage*, 20: S27.

173. Behrens, P.; Bitter, T.; Kurz, B.; Russlies, M. (2006) Matrix-associated autologous chondrocyte transplantation/implantation (MACHT/MACI)—5-year follow-up. *Cartilage*, 13: 194-202.
174. Kristjánsson, B.; Honsawek, S. (2017) Mesenchymal stem cells for cartilage regeneration in osteoarthritis. *World J Orthop.*, 8: 674-680.
175. D. Green, J.; Tollemar, V.; Dougherty, M.; Yan, Z.; Yin, L.; Ye, J.; Collier, Z.; K. Mohammed, M.; C. Haydon, R.; H. Luu, H.; Kang, R.; J. Lee, M.; H. Ho, S.; He, T.-C.; L. Shi, L.; Athiviraham, A. (2015) Multifaceted signaling regulators of chondrogenesis: Implications in cartilage regeneration and tissue engineering. *Genes & Diseases*, 2: 307-327.
176. Kazemi, D.; Shams Asenjan, K.; Dehdilani, N.; Parsa, H. (2017) Canine articular cartilage regeneration using mesenchymal stem cells seeded on platelet rich fibrin: Macroscopic and histological assessments. *Bone Joint Res.*, 6: 98-107.
177. Kazemi, D.; Fakhrjou, A.; Dizaji, V.M.; Alishahi, M.K. (2014) Effect of autologous platelet rich fibrin on the healing of experimental articular cartilage defects of the knee in an animal model. *Biomed Res Int*, 2014: 486436-486436.
178. Henrotin, Y.E.; De Groote, D.D.; Labasse, A.H.; Gaspar, S.E.; Zheng, S.X.; Geenen, V.G.; Reginster, J.Y. (1996) Effects of exogenous IL-1 beta, TNF alpha, IL-6, IL-8 and LIF on cytokine production by human articular chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 4: 163-173.
179. Osta, B.; Roux, J.-P.; Lavocat, F.; Pierre, M.; Ndongo-Thiam, N.; Boivin, G.; Miossec, P. (2015) Differential Effects of IL-17A and TNF- α on Osteoblastic Differentiation of Isolated Synoviocytes and on Bone Explants from Arthritis Patients. *Front. Immunol.*, 6: 151-151.
180. Assirelli, E.; Pulsatelli, L.; Dolzani, P.; Platano, D.; Olivotto, E.; Filardo, G.; Trisolino, G.; Facchini, A.; Borzi, R.M.; Meliconi, R. (2014) Human osteoarthritic cartilage shows reduced in vivo expression of IL-4, a chondroprotective cytokine that differentially modulates IL-1beta-stimulated production of chemokines and matrix-degrading enzymes in vitro. *PloS one*, 9: e96925.

181. Sanchez, C.; Deberg, M.A.; Piccardi, N.; Msika, P.; Reginster, J.Y.; Henrotin, Y.E. (2005) Subchondral bone osteoblasts induce phenotypic changes in human osteoarthritic chondrocytes. *Osteoarthritis Cartilage*, 13: 988-997.
182. Kjelgaard-Petersen, C.; Bay-Jensen, A.C.; Christiansen, T.; Karsdal, M.A.; Hägglund, P.; Siebuhr, A.; Thudium, C.S. (2017) Establishment of a Human Synovium and Cartilage Co-Culture. *Osteoarthritis Cartilage*, 25: S276-S277.
183. Samavedi, S.; Diaz-Rodriguez, P.; Erndt-Marino, J.D.; Hahn, M.S. (2017) A Three-Dimensional Chondrocyte-Macrophage Coculture System to Probe Inflammation in Experimental Osteoarthritis. *Tissue Eng Part A*, 23: 101-114.
184. Sun, L.; Wang, X.; Kaplan, D.L. (2011) A 3D cartilage - inflammatory cell culture system for the modeling of human osteoarthritis. *Biomaterials*, 32: 5581-5589.
185. Grenier, S.; Bhargava, M.M.; Torzilli, P.A. (2014) An in vitro model for the pathological degradation of articular cartilage in osteoarthritis. *J Biomech*, 47: 645-652.
186. Blasioli, D.J.; Matthews, G.L.; Kaplan, D.L. (2014) The degradation of chondrogenic pellets using cocultures of synovial fibroblasts and U937 cells. *Biomaterials*, 35: 1185-1191.
187. Cope, P.J.; Ourradi, K.; Li, Y.; Sharif, M. (2019) Models of osteoarthritis: the good, the bad and the promising. *Osteoarthritis Cartilage*, 27: 230-239.
188. Mabey, T.; Honsawek, S. (2015) Cytokines as biochemical markers for knee osteoarthritis. *World J Orthop*, 6: 95-105.
189. de Vries, R.B.; Oerlemans, A.; Trommelmans, L.; Dierickx, K.; Gordijn, B. (2008) Ethical aspects of tissue engineering: a review. *Tissue Eng Part B Rev*, 14: 367-375.
190. Fodor, W.L. (2003) Tissue engineering and cell based therapies, from the bench to the clinic: the potential to replace, repair and regenerate. *Reprod Biol Endocrinol.*, 1: 102-102.
191. Ahadian, S.; Khademhosseini, A. (2018) Smart scaffolds in tissue regeneration. *Regen Biomater*, 5: 125-128.
192. Tada, S.; Kitajima, T.; Ito, Y. (2012) Design and Synthesis of Binding Growth Factors. *Int. J. Mol. Sci.*, 13: 6053-6072.

193. Gawaz, M.; Vogel, S. (2013) Platelets in tissue repair: control of apoptosis and interactions with regenerative cells. *Blood*, 122: 2550.
194. Oryan, A.; Alidadi, S.; Moshiri, A. (2016) Platelet-rich plasma for bone healing and regeneration. *Expert Opin Biol Ther*, 16: 213-232.
195. Xie, X.; Zhang, C.; Tuan, R. (2014) Biology of platelet-rich plasma and its clinical application in cartilage repair. *Arthritis Res Ther*, 16: 204.
196. Lacci, K.M.; Dardik, A. (2010) Platelet-rich plasma: support for its use in wound healing. *Yale J. Biol. Med.*, 83: 1-9.
197. Albanese, A.; Licata, M.E.; Polizzi, B.; Campisi, G. (2013) Platelet-rich plasma (PRP) in dental and oral surgery: from the wound healing to bone regeneration. *Immun Ageing.*, 10: 23-23.
198. Piattelli, A.; Scarano, A.; Corigliano, M.; Piattelli, M. (1996) Effects of alkaline phosphatase on bone healing around plasma-sprayed titanium implants: a pilot study in rabbits. *Biomaterials*, 17: 1443-1449.
199. Dastjerdi, M.S.; Emami, T.; Najafian, A.; Amini, M. (2006) Mean platelet volume measurement, EDTA or citrate? *Hematology (Amsterdam, Netherlands)*, 11: 317-319.
200. Kardos, D.; Simon, M.; Vacz, G.; Hinsenkamp, A.; Holczer, T.; Cseh, D.; Sarkozi, A.; Szenthe, K.; Banati, F.; Szathmary, S.; Nehrer, S.; Kuten, O. (2019) The Composition of Hyperacute Serum and Platelet-Rich Plasma Is Markedly Different despite the Similar Production Method. *Int J Mol Sci*, 20:
201. Bansal, S.; Garg, A.; Khurana, R.; Chhabra, P. (2017) Platelet-rich fibrin or platelet-rich plasma; which one is better? an opinion. *Indian J Dent Sci*, 9: 49-52.
202. Tassara, M.; De Ponti, A.; Barzizza, L.; Zambelli, M.; Parisi, C.; Milani, R.; Santoleri, L. (2018) Autologous conditioned serum (ACS) for intra-articular treatment in Osteoarthritis: Retrospective report of 28 cases. *Transfus. Apher. Sci.*, 57: 573-577.
203. Southworth, T.M.; Naveen, N.B.; Tauro, T.M.; Leong, N.L.; Cole, B.J. (2019) The Use of Platelet-Rich Plasma in Symptomatic Knee Osteoarthritis. *J. Knee Surg.*, 32: 37-45.

204. Medical Advisory, S. (2005) Total knee replacement: an evidence-based analysis. *Ont Health Technol Assess Ser*, 5: 1-51.
205. Osterman, C.; McCarthy, M.B.; Cote, M.P.; Beitzel, K.; Bradley, J.; Polkowski, G.; Mazzocca, A.D. (2015) Platelet-Rich Plasma Increases Anti-inflammatory Markers in a Human Coculture Model for Osteoarthritis. *Am J Sports Med*, 43: 1474-1484.
206. Hall, M.P.; Ward, J.P.; Cardone, D.A. (2013) Platelet rich placebo? Evidence for platelet rich plasma in the treatment of tendinopathy and augmentation of tendon repair. *Bull Hosp Jt Dis* (2013), 71: 54-59.
207. Thysen, S.; Luyten, F.P.; Lories, R.J.U. (2015) Targets, models and challenges in osteoarthritis research. *Dis Model Mech.*, 8: 17.
208. David, F.; Farley, J.; Huang, H.; Lavoie, J.P.; Laverty, S. (2007) Cytokine and chemokine gene expression of IL-1beta stimulated equine articular chondrocytes. *Vet Surg*, 36: 221-227.
209. Vincenti, M.P.; Brinckerhoff, C.E. (2001) Early response genes induced in chondrocytes stimulated with the inflammatory cytokine interleukin-1beta. *Arthritis Res*, 3: 381-388.
210. Page-McCaw, A.; Ewald, A.J.; Werb, Z. (2007) Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 8: 221-233.
211. Streuli, C. (1999) Extracellular matrix remodelling and cellular differentiation. *Curr. Opin. Cell Biol.*, 11: 634-640.
212. Burrage, P.S.; Mix, K.S.; Brinckerhoff, C.E. (2006) Matrix metalloproteinases: role in arthritis. *Front. Biosci.*, 11: 529-543.
213. Malemud, C.J. (2015) Biologic basis of osteoarthritis: state of the evidence. *Curr Opin Rheumatol*, 27: 289-294.
214. Kobayashi, M.; Kawase, T.; Horimizu, M.; Okuda, K.; Wolff, L.F.; Yoshie, H. (2012) A proposed protocol for the standardized preparation of PRF membranes for clinical use. *Biologicals*, 40: 323-329.
215. Barbon, S.; Stocco, E.; Macchi, V.; Contran, M.; Grandi, F.; Borean, A.; Parnigotto, P.P.; Porzionato, A.; De Caro, R. (2019) Platelet-Rich Fibrin Scaffolds for Cartilage and Tendon Regenerative Medicine: From Bench to Bedside. *Int. J. Mol. Sci.*, 20: 1701.

216. Borie, E.; Oliví, D.G.; Orsi, I.A.; Garlet, K.; Weber, B.; Beltrán, V.; Fuentes, R. (2015) Platelet-rich fibrin application in dentistry: a literature review. *Int. J. Clin. Exp. Med.*, 8: 7922-7929.
217. Khorshidi, H.; Raoofi, S.; Bagheri, R.; Banihashemi, H. (2016) Comparison of the Mechanical Properties of Early Leukocyte- and Platelet-Rich Fibrin versus PRGF/Endoret Membranes. *Int J Dent*, 2016: 1849207-1849207.
218. Cao, E.; Chen, Y.; Cui, Z.; Foster, P.R. (2003) Effect of freezing and thawing rates on denaturation of proteins in aqueous solutions. *Biotechnol. Bioeng.*, 82: 684-690.

10.Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:

1. **Kardos, D.**; Simon, M.; Váczi, G.; Hinsenkamp, A.; Holczer, T.; Cseh, D.; Sárközi, A.; Szenthe, K.; Bánáti, F.; Szathmary, S.; Nehrer, S.; Kuten, O.; Masteling, M.; Lacza, Z.; Hornyák, 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: 4,183**
2. **Kardos, D.**; Hornyák, I.; Simon, M.; Hinsenkamp, A.; Marschall, B.; Várdai, R.; Kállay-Menyhárd, A.; Pinke, B.; Mészáros, 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 **IF: 4,183**
3. **Kardos, D.**; Marschall, B.; Simon, M.; Hornyák, I.; Hinsenkamp, A.; Kuten, O.; Gyevnár, Z.; Erdélyi, G.; Bárdos, T.; Paukovits, T.M.; Magos, K.; Béres, G.; Szenthe, K.; Bánáti, F.; Szathmary, S.; Nehrer, S.; Lacza, Z. (2019) Investigation of Cytokine Changes in Osteoarthritic Knee Joint Tissues in Response to Hyperacute Serum Treatment. *Cells* 8: 824. **IF: 5,656**

Egyéb, nem az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:

Simon, M.; Major, B.; Váczi, G.; Kuten, O.; Hornyák, I.; Hinsenkamp, A.; **Kardos, D.**; Bagó, M.; Cseh, D.; Sárközi, 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: 4854619-4854619 **IF: 3,902**

11. Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Lacza Zsombornak, hogy lehetőséget adott a munkacsoportjában történő munkára, önállóságot adott a kutatás tervezésben, kivitelezésben, kiértékelésben, és segítette munkámat, melyhez az általa létrehozott Orthosera Kft. biztosított anyagi támogatást.

Köszönöm Prof. Dr. Benyó Zoltánnak, a Transzlációs Medicina Intézet igazgatójának, hogy lehetőséget biztosított munkám elvégzésére az Intézetben.

Köszönöm Dr. Hornyák Istvánnak, hogy munkám során végig segített és támogatott, valamint Dr. Orbánné Simon Melindának a munkatársi és baráti segítséget és támogatást melyet a munkám során nyújtott. További köszönettel tartozom Dr. Marschall Bencének, Hinsenkamp Adélnak akik szintén segítettek a kísérletek elvégzésében, és a publikációk minőségének javításában.

Köszönöm a Transzlációs Medicina Intézet valamint az Orthosera Kft. és GmbH valamennyi munkatársának, különös tekintettel Czeglédi Csillának a támogatást és segítséget.

Köszönöm a mérésekben nyújtott segítséget Várdai Róbertnek, Pinke Balázsnak és Dr. Kállay-Menyhárd Alfrédnek a Budapesti Műszaki Egyetem munkatársainak, továbbá Vác Gabriellának, Mariana Mastelingnek, Szenthe Kálmánnak, Bánáti Ferencnek és Holczer Tündének és Pongor Csabának.

Köszönöm Tóth Benjámint grafikusnak, akinek hála sikerült a grafikus programok használatát elsajátítanom, hogy saját grafikákkal és ábrákkal gazdagíthassam publikációimat és dolgozatomat.

Külön köszönettel tartozom a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinika valamennyi orvosának és műtőben dolgozó kollégájának, hogy lehetővé tették a szövet minták elhozatalát a műtőből.

Hálás vagyok valamennyi családtagomnak, kiknek kemény munkája, áldozathozatala és támogatása nélkül ez a munka nem készülhetett volna el.