

Vérszérum alapú regeneratív terápiás megoldások fejlesztése a térdízület degeneratív elváltozásainak kezelésében

Doktori tézisek

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
2020

1. Bevezetés

A regeneráció alapvető képessége az élő szervezetnek, mely során az élő szervezet pótolja, újránöveszti vagy kiegészíti az elvesztett, elhasznált vagy megsérült részeit. Az emberi test regenerációs képessége jóval korlátozottabb, mint az alsóbbrendű élőlényeké, az egyetlen biztos gyógymód a kiterjedt szöveti pusztulással, vagy akár teljes szerv elvesztésével járó betegségekre a szervtranszplantáció. A transzplantálható szervek azonban korlátozott számban állnak rendelkezésre, valamint, 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. A regeneratív terápián belül sejtes és sejtmentes terápiás csoportot különíthetünk el egymástól. Utóbbi csoportba tartoznak a vérszeparátumok, melyek a sebgyógyulás folyamatához hasonló módon indukálnak szöveti újjáépülést a sérülés helyén. A folyamat kiváltói az érrendszerben keringő és a szöveti sérülés során aktiválódó vérlemezkék, melyek előidézik a vér alvadását és aktivált állapotban a környezetbe bocsájtják az α -granulumjaikban tárolódó növekedési faktorokat. Az alvadási

kaszkád végeredményeképp kialakult fibrincsomó megfelelő vázat biztosít a felszabadult növekedési faktorok hatására a sérülés helyére érkező immunsejtek, majd szöveti sejtek számára. A szöveti sejtek proliferálnak és differenciálódnak, végül a szöveti átépüléssel fejeződik be a regeneráció folyamata. Az orvostudományban számos vészeparátumot használnak a regeneráció indukálására, melyek közül a legismertebb a vérlemezkében gazdag plazma (PRP) és a vérlemezkében gazdag fibrin (PRF). Előbbi előállítására véralvadásgátlót tartalmazó csőben történik, majd többszöri centrifugálással növelik az egységnyi térfogatú plazmában lévő vérlemezkeshámot, végül pedig külsőleg hozzáadott marha trombinnal és/vagy kalcium-kloriddal vagy fagyasztás/olvasztással aktiválják a vérlemezkéket. Végül a növekedési faktorokat tartalmazó vérplazmát a sérülés helyére juttatják. Bár a PRP-t számos klinikai területen alkalmazzák, használata az ortopédiában a legelterjedtebb. Hátránya a külsőleg hozzáadott alvadásgátlókból, vérlemezke aktivátorokból és az izolálási mód egységesítésének hiányából ered. A PRF előállításával szemben üvegfalú, véralvadásgátló mentes csőben történik, a vér azonnali centrifugálásával. A vérlemezkék az üveggel érintkezve aktiválódnak és az alvadás végeredményeként kialakul a

sejtmentes vázanyagként használható fibrin csomó. Legelterjedtebb felhasználási területe a szájsebészet és az ortopédia, fő hátránya pedig a PRF laza szerkezetéből adódó sebészeti varrásnál fellépő szakadás. Kutatócsoportunk a PRP előállításából adódó hátrányok kiküszöbölésének céljából hozta létre a hiperakut szérumot, melyet a PRF csomóból történő folyadék kinyerésével hoztunk létre, így semmilyen külsőleg hozzáadott anyagot nem tartalmaz. Korábbi eredményeink alapján oszteoartritiszes csontvelői mezenchimális őssejtek, porc és oszteoblaszt sejtek proliferációját hatékonyabban segíti elő, mint a PRP. Az oszteoarthritisz a leggyakrabban előforduló ízületeket érintő degeneratív betegség, mely kialakulásának okai máig nem pontosan ismertek. A betegség fő tünetének sokáig a degenerálódott porcfelszint tekintették, de mára jól ismert tény, hogy patomechanizmusa az egész ízületet érinti. A gyulladásos fehérjék fokozott termelődése gátolt mátrixfehérje szintézishez és emelkedett mátrix metalloproteináz expresszióhoz vezet, mely fokozott szöveti degradációt eredményez. Konzervatív terápiája csak a fájdalmat és gyulladást képes csökkenteni, míg műtéti eljárással a degradálódott porcfelszint pótolják. Regeneratív terápiája jelenleg leggyakrabban hialuronsav és/vagy PRP intraartikuláris

injekciójával próbálja a gyulladást csökkenteni és a csont-, valamint porcszövetet regenerálni.

2. Célkitűzések

Korábbi eredményeink alapján a hiperakut szérum a PRP-nél hatékonyabban segíti elő az oszteoartritiszes csontvelő eredetű mezenhimális őssejtek, oszteoblasztok és porcsejtek proliferációját, valamint hasonló előállítási módja ellenére Promteome Profiler méréseink alapján összetétele eltér a PRP-től.

Mindezek alapján jelenlegi kísérleteinkben a következő célokat tűztük ki:

1. PRP, hiperakut szérum, vérszérum és vérplazma összetételének kvantitatív összehasonlítása ionösszetétel és az alakos elemek, valamint gyulladásgátló fehérjék mennyiségének mérésével.

2. Komplex, háromdimenziós, oszteoartritiszes térd szövetmodell fejlesztése, mely tartalmazza a csont, porc és szinóvium szöveteket.

A kutatócsoportunk által kifejlesztett orvostechikai eszközzel (hypACT Inject) izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata oszteoartritiszes térd szövetmodellen, különös tekintettel a

szöveti felülúszó citokin összetételének változására és a szöveti sejtproliferáció mértékére.

3. A hypACT Inject orvostechnikai eszközzel előállított PRF membrán mechanikai és biológiai tulajdonságainak összehasonlítása a hagyományos vérvételi üvegcsővel előállított membránéval, hogy lehetővé tegyünk a szakadás mentes sebészeti alkalmazást. A fagyasztás/olvasztás és fagyasztva szárítás hatásának vizsgálata a PRF membránok mechanikai és biológiai tulajdonságait illetően.

3. Módszerek

3.1. Vérszérum, vérplazma, PRP és hiperakut szérum összetételének kvantitatív összehasonlítása

Vérszérum, vérplazma, PRP és hiperakut szérum izolálása

A PRP és vérplazma izolálása EDTA vagy citrát alvadásgátlót tartalmazó csővel történt, míg a hiperakut szérum és vérszérum izolálása vérvételi üvegcsővel történt.

Laboratóriumi paraméterek mérése

A kalcium-, magnézium-, kálium-, réz-, cink-, vas-, foszfát-, nátriumionok mennyiségének, alkalikus foszfatáz (ALP) enzim aktivitásának, valamint a fehérvérsejt, vörösvértest és vélemezke számának és az átlagos vélemezke térfogat (MPV) mennyiségének meghatározása automata laboratóriumi műszerekkel történt (n=4).

Fehérje-összetétel mérése

A gyulladással és gyulladásgátló fehérjék mennyiségi meghatározása ELISA és multiplex ELISA esszével történt (n=8).

3.2. HypACT Inject eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata oszteoartritiszes térd szövetmodellen

Hiperakut szérum izolálás hypACT Inject eszközzel

Hiperakut szérumot hypACT Inject eszközzel izoláltuk, (n=5, poolozott).

In vitro térd szövetmodell előállítás

Egy 12 lyukú lemez minden lyukának alján 5-5 darab szubkondrális csont és 4-4 darab hialin porc blokkot helyeztünk el, melyek alapterülete azonos volt. A lyukakba transwell inzertet helyeztünk, melynek permeábilis membránján 0,4 μm -es nagyságú pórusok voltak. Az inzertekbe 2-2 darab szinovális membránt helyeztünk, a szinovális folyadékot pedig a sejtenyészítő oldat helyettesítette. A kísérlet első két napján IL-1 β citokinnel stimuláltuk a szöveteket, majd humán szérum albumin és hiperakut szérum tartalmú tenyésztő oldatban növesztettük őket öt napon keresztül.

Szövetek életképességének mérése

A kísérletek 2., 5. és 7. napján meghatároztuk a szövetek életképességét XTT sejtproliferációs kittel.

Szinoviális folyadékminták gyűjtése

A Kellegren-Lawrence skála szerinti 2-es és 3-as osztályba sorolt OA betegektől (n=19) leszívott felesleges szinoviális folyadékot -80 °C-on fagyasztottuk.

Szövet tenyésztőoldat és szinoviális folyadék minták citokin összetételének mérése multiplex immunoesszével

A szakirodalom alapján 39 citokint választottunk ki a méréshez, mely megtalálható az oszteoartritiszes szinoviális folyadékban és szerepet játszhat a betegség patomechanizmusában. A szinoviális folyadékmintákat (n=19), valamint a kísérletek során összegyűjtött felülúszó mintákat az IL-1 β stimulálás után és a kezelés 3. és 5. napján (n=12) multiplex immunoesszével vizsgáltuk.

3.2. Vérvételi üvegcsővel izolált és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrin membrán tulajdonságainak összehasonlítása

Mintaelőszészítés

A PRF membránokat vérvételi üvegcsővel illetve hypACT Inject eszközzel izoláltuk. A fagyasztott/olvasztott PRF membránt az izolálás után -20°C-on fagyasztottuk egy éjszakán át, majd +4°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.

Szakítószilárdság vizsgálat

A PRF membránok szakítószilárdságát univerzális tesztelő géppel mértük meg. A műszer a minta maximális terhelését rögzítette, melynél a minták elszakadtak, és ebből került kiszámításra a szakítószilárdság.

Felületi és szerkezeti vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal

A membránok felületének mikrostruktúráját glutáraldehides fixálást és felszálló alkohol sorral történő dehidratálást követően pásztázó elektronmikroszkóppal vizsgáltuk.

Élő/halott sejtfestés

A PRF membránba fiziológiásan beágyazódott vérésejteket élő/halott sejtfestéssel vizsgáltuk, melyhez Calcein-AM és ethidium-homodimer festékeket használtunk. A mintákról konfokális mikroszkóppal Z-stack képeket készítettünk.

Mezenchimális őssejtek életképességének mérése

A csontvelő mezenchimális őssejteket 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 XTT

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

Fogíny fibroblasztok sejtek életképesség mérése

Az fogíny fibroblaszt sejtekkel megismételtük a mezenchimális őssejtekkel elvégzett kísérletet, valamint a kísérletek 3., 5. és 7. napján felülúszó mintákat gyűjtöttünk, melyekben meghatároztuk az I. típusú pro-kollagén koncentrációját.

Plazmin enzim aktivitásának mérése

A membránok endogén bomlási képességének meghatározására plazmin enzim aktivitás esszét végeztünk N-(p-Tosyl)-Gly-Pro-Lys 4-nitroanilid acetát sóval.

Statisztikai analízis

Adatsorunkon 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. A korrelációanalízist Pearson-féle korrelációs teszttel végeztük. A korrelációt $0,75 \leq r$, $p < 0,05$ esetén nagyon szorosnak vettük. A statisztikai analízishez Prism 7 szoftvert használtunk. Az eredményeket pedig átlag \pm SEM ábráztuk.

4. Eredmények

4.1. Vérszérum, vérplazma, PRP és hiperakut szérum összetételének kvantitatív összehasonlítása

Laboratóriumi paraméterek mérése

AZ EDTA felborította a PRP ionegyensúlyát, különös tekintettel a kalciumion és a kelátképző ionok koncentrációjára, valamint gátolta az ALP enzim aktivitását. A citrát is okozott kisebb eltéréseket az ionösszetételben, míg a szérum és hiperakut szérum ionegyensúlya és az ALP enzim aktivitása a fiziológiás szinten maradt. A fehérvérsejtszám a citrát PRP-ben volt a legmagasabb. A vérlemezkék száma szignifikánsan magasabb volt EDTA PRP-ben, mint citrát PRP-ben, míg a többi szérum és plazma mintában rendkívül alacsony számban fordult csak elő. Az MPV értéke értelemszerűen a szérum és hiperakut szérum mintákban nulla volt, mivel itt aktivált állapotban voltak a vérlemezkék- tehát membránjuk szétesett. Az EDTA és citrát PRP között nem találtunk különbséget a vérlemezke funkcióban.

Fehérje-összetétel mérése

A szisztémás gyulladáskeltő fehérjék közel azonos koncentrációban fordultak elő EDTA PRP-ben és hiperakut szérumban, míg Az EDTA PRP szignifikánsan több vérlemezke

eredetű gyulladáscsökkentő és angiogénikus fehérjét tartalmazott, mint a hiperakut szérum.

4.2. HypACT Inject eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata oszteoartritiszes térd szövetmodellen

Az in vitro térd szövetmodell és az in vivo szinoviális folyadék fehérje-összetételének összehasonlítása

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 felülúszó és szinoviális folyadék fehérje-összetételének hasonlóságát természetes alapú logaritmikus transzformáció után korrelációanalízissel vizsgáltuk. A mért 39 fehérje koncentrációja in vitro és in vivo nagyon erősen korrelált egymással ($r=0,77$; $p<0,05$)

Szövetek életképességének mérése

A hiperakut szérummal kezelt csont, porc és szinoviális membrán életképessége szignifikánsan megnőtt az 5. napra a 0. napi és a humán albuminos kontroll mintához képest.

Fehérjék koncentrációjának mérése a szöveti felülúszóban

A szakirodalom alapján kiválasztott és vizsgált 39 fehérjét az oszteoartritiszben betöltött funkciójuk szerint öt csoportba soroltuk:

Az oszteoarthritisz fő gyulladásoos citokinjeinek koncentrációja:

Az IL-8 koncentrációja szignifikánsan emelkedett az IL-1 β stimuláció hatására, míg a hiperakut szérum kezelés utolsó napjára szignifikánsan csökkent az IL-2, TNF- α , IL-8, IL-12, IL-15, IL-17 és IL-18 koncentrációja, a 0. naphoz képest.

Az oszteoarthritisz gyulladásoos kemokinjeinek koncentrációja:

A hiperakut szérum kezelés utolsó, 5. napjára szignifikánsan csökkent a CCL-1, CCL-3, CXCL-10 és CX3CL1/fraktalkin koncentrációja a 0. naphoz képest.

Az oszteoarthritiszben fontos szerepet játszó gyulladásgátló citokinek koncentrációja:

A hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan alacsonyabb volt az IL-4 receptor α és IL-13 koncentrációja, mint a kezelés előtt.

Az oszteoarthritisz fő mátrix metalloproteináz fehérjeinek és az aggregán koncentrációja:

A hiperakut szérum kezelés 5. napjára szignifikánsan csökkent az MMP-3, MMP-13 és aggregán koncentrációja a kezdeti szinthez képest.

A szöveti átépülés biomarkerjei:

A kollagén 1 alfa 1 és oszteonektin szintje szignifikánsan nőtt a hiperakut szérum hatására az 3. naphoz, míg a RANKL szintje

szignifikánsan csökkent a kezelés 5. napjára, a kezdeti szintet képest.

4.3. Vérvételi üvegcsővel izolált és hypACT Inject orvostechikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrin membrán tulajdonságainak összehasonlítása

Szakítószilárdság vizsgálat

A mérés alapján a HypACT PRF anyaga homogénebb, mint az üvegcsővel izolált PRF anyaga, míg a szakítószilárdság értékei alapján a fagyasztott HypACT PRF bizonyult a legerősebbnek, (n=4).

Felületi és szerkezeti vizsgálat pásztázó elektronmikroszkóppal

A fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránok szerkezete kompaktabb volt és kisebb pórusokat figyeltünk meg a fibrin szálak között, mint a friss membránoknál. Az izolálás módja nem okozott eltérést a membránok szerkezetében.

Élő/halott sejtfestés

Élő sejteket csak a friss membránokon láttunk, míg a fagyasztott/olvasztott és fagyasztva szárított membránokon halott sejteket figyeltünk meg.

Mezenchimális őssejtek életképességének mérése

A fagyaszott/olvasztott és fagyasztva szárított membránokra szignifikánsan több sejt tapadt le, valamint az egy hét után mért proliferációs érték is magasabb volt. A membránok tömegének változása között nem tapasztaltunk szignifikáns változást, (n=4).

Fogíny fibroblasztok sejtek életképesség mérése

A fagyaszott/olvasztott és fagyasztva szárított membránokra szignifikánsan több sejt tapadt le, valamint az egy hét után mért proliferációs érték is magasabb volt. A sejtek pro-kollagén termelésében nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést (n=4.).

Plazmin enzim aktivitásának mérése

A fagyasztott/olvasztott membránokban a plazmin enzim aktivitása szignifikánsan alacsonyabb volt, mint a friss és fagyasztva szárított membránokban (n=4).

5. Következtetések

5.1. Vérszérum, vérplazma, PRP és hiperakut szérum összetételének kvantitatív összehasonlítása

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.

5.2. HypACT Inject eszközzel izolált hiperakut szérum hatásának vizsgálata oszteoartritiszes térd szövetmodellen

Kísérleteink során sikerült egy komplett oszteoartritiszes térdízületi szövetmodellt létrehozni, mely hiánypótló az in vitro kutatások terén. Bebizonyosodott, hogy a szövetmodell citokinösszetétele nagyban hasonlít az oszteoartritiszes ízületi folyadék-összetételéhez, így alkalmas lehet a sejtes és in vivo kutatások közötti szakadék áthidalására. Bebizonyosodott az is, hogy a hiperakut szérum erős sejtproliferatív hatást fejt ki mind az oszteoartritiszes csont, porc és szinoviális membrán sejteire, továbbá csökkenti az oszteoartritiszre jellemző gyulladást, és képes az IL-1 β citokin által okozott gyulladást és szövetdegradációt csökkenteni in vitro.

5.3. Vérvételi üvegcsővel izolált és hypACT Inject orvostechnikai eszközzel izolált vérlemezkében gazdag fibrin membrán tulajdonságainak összehasonlítása

A hypACT PRF membrán sejtadhéziós, sejtproliferációs tulajdonságai, továbbá szerkezete és bomlási sebessége hasonlóak az üvegcsővel előállított membránéhoz. Az anyaga viszont homogénebb, és alakja kedvezőbb, mely tulajdonságok sebészeti használatra alkalmasabbá teszik az üvegcsővel előállított membránál. A fagyasztás/olvasztás kedvezően befolyásolja a membránok mechanikai és biológiai tulajdonságait. Az mezenchimális őssejtek és fogíny fibroblasztok letapadása 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 orvostechnikai eszközzel előállított minták esetében. A minták közül így a fagyasztás/olvasztásnak alávetett, orvostechnikai eszközzel előállított PRF membránt találtuk a leginkább alkalmasnak sebészeti, szövetpótló alkalmazásra.

6. Saját publikációk jegyzéke

Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:

Kardos, D.; Simon, M.; Vác, 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

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

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