

# A szérum albumin regeneratív hatásai a támasztó és mozgó szervrendszerben

Doktori értekezés

**Dr. Horváthy Dénes Balázs**

Semmelweis Egyetem  
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



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

Hivatalos bírálók: Dr. Mester Sándor, Ph.D., főorvos

Dr. Holnapy Gergely, Ph.D., egyetemi tanársegéd

Szigorlati bizottság elnöke:

Dr. Szőke György, DSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai:

Dr. Bejek Zoltán, Ph.D., egyetemi adjunktus

Dr. Kádas István, Ph.D., főorvos

Budapest

2017

## Tartalomjegyzék

Rövidítések jegyzéke.....	5
1. Bevezetés.....	7
1.1. A regeneratív medicina alappillérei.....	9
1.2. A támasztó és mozgató szervrendszer szöveteinek regeneratív kezelési stratégiái.....	11
1.2.1. Harántcsíkolt izom.....	11
1.2.1.1. Szöveti degradáció.....	11
1.2.1.2. Gyulladásos válasz.....	11
1.2.1.3. Szöveti remodelláció.....	12
1.2.1.3.1. Növekedési faktorok.....	13
1.2.1.3.2. Sejtterápiás lehetőségek.....	14
1.2.1.4. Fibrózis-fibrózis gátlás.....	16
1.2.2. Inak és szalagok.....	17
1.2.2.1. Növekedési faktorok.....	18
1.2.2.2. Sejtterápiás lehetőségek.....	20
1.2.3. Porc.....	23
1.2.4. Csonthiányok, csontpótlás.....	25
1.2.4.1. Allograftok.....	27
1.2.4.2. Demineralizált csontmátrix (DBM).....	27
1.2.4.3. Biokerámiák.....	28
1.2.4.4. Egyéb csontpótlók, polimerek.....	29
1.2.4.5. Növekedési faktorok.....	30
1.2.4.6. Sejtterápiás lehetőségek.....	32
1.2.5. A mezenhimális őssejtek kiemelt szerepe a támasztó és mozgató szervrendszerben.....	34
1.3. Átmenet a sejtes terápiák felé - a vérfrakciók szerepe.....	36
1.3.1. Thrombocitában gazdag plazma (PRP).....	36
1.3.2. Autológ kondicionált szérum (ACS).....	38
1.4. Az albumin biotechnológiai felhasználási területei.....	40
1.4.1. Albumin a sejt kultúra gyakorlatban.....	40
1.4.2. Az albumin baktérium megtapadást gátló hatásai.....	41
1.4.3. Az albumin segíti az eukarióta sejtek megtapadását.....	42
1.4.4. Az albumin, mint alapanyag vázanyagok előállításában.....	44

1.4.5.	Az albumin, mint aktív molekula csontregenerációs folyamatokban	46
2.	Célkitűzések.....	49
3.	Módszerek.....	50
3.1.	A kísérletek során alkalmazott állatok.....	50
3.2.	Csontvelő eredetű mezenhimális sejtek gyűjtése, sejttenyészetek kezelése.....	50
3.3.	Statisztikai módszerek.....	51
3.4.	Mezenhimális őssejtek kitapadása sebészeti varróanyagok felületére...	51
3.4.1.	In vitro kitapadás vizsgálata.....	51
3.4.2.	Sejttranszplantációra előkészített fonalak változásai.....	52
3.4.2.1.	Felszívódás változása – <i>in vivo</i> .....	52
3.4.2.2.	Biomechanikai vizsgálat.....	52
3.5.	Lágyszöveti őssejttranszplantáció <i>in vivo</i> nyomonkövetése.....	52
3.6.	Mezenhimális őssejtek kitapadása demineralizált csontgraftok felületén.....	53
3.6.1.	A demineralizált csontmátrix előállítása.....	53
3.6.2.	<i>In vitro</i> kitapadás vizsgálata.....	54
3.7.	A csontregeneráció vizsgálata.....	55
3.7.1.	Csonthiány kialakítása <i>in vivo</i> – sebészeti technika.....	55
3.7.2.	<i>In vivo</i> kísérleti protokoll és vizsgálati csoportok.....	55
3.7.3.	A csontgyógyulás vizsgálata <i>in vivo</i> képalkotással.....	56
3.7.3.1.	Számítógépes rétegvizsgálat.....	56
3.7.3.2.	Visszamaradó csonthiány.....	57
3.7.3.3.	Denzitometria.....	57
3.7.4.	<i>Ex vivo</i> microCT.....	58
3.7.5.	Biomechanikai vizsgálat.....	59
4.	Eredmények.....	60
4.1.	Mezenhimális őssejtek kitapadása sebészeti varróanyagok felületére...	60
4.2.	Sejttranszplantációra előkészített fonalak változásai.....	63
4.2.1.	Felszívódás változása.....	63
4.2.2.	Biomechanikai vizsgálat.....	66
4.3.	Lágyszöveti őssejttranszplantáció <i>in vivo</i> nyomonkövetése.....	68
4.4.	Mezenhimális őssejtek kitapadása demineralizált csontgraftok felületén.....	70
4.5.	Az albumin hatása a csontregenerációs folyamatokra.....	72

4.5.1.	Visszamaradó csontiány területe – <i>in vivo</i> .....	72
4.5.2.	Denzitometria – <i>in vivo</i> .....	73
4.5.3.	<i>Ex vivo</i> microCT.....	75
4.5.4.	Biomechanikai vizsgálat.....	77
5.	Megbeszélés.....	79
6.	Következtetés.....	90
7.	Összefoglalás.....	91
8.	Summary.....	92
9.	Irodalomjegyzék.....	93
10.	Saját publikációk jegyzéke.....	115
11.	Köszönetnyilvánítás.....	117

## **Rövidítések jegyzéke**

3D - Három dimenzió

ACS - Autológ kondicionált szérum (Autologous Conditioned Serum)

AFP - alfa föto protein

ALP - Alkalikus foszfatáz

$\beta$ -TCP -  $\beta$ -Tricalcium foszfát

BFGF - Alap fibroblaszt növekedési faktor (Basic Fibroblast Growth Factor)

BMP - Csont morfogén protein (Bone Morphogenic Protein)

BrDU - Bróm-dezoxi-uridin

BSA - Borjú szérum eredetű albumin (Bovine Serum Albumin)

BV/TV - Csont térfogat/összes térfogat (Bone Volume/Total Volume)

DBM - Demineralizált csont mátrix

DID - Dialkil-amino-stiril típusú sejt festék

DMEM - Dulbecco módosított Eagle sejttenyésztő oldata

EGF - Epidermális növekedési faktor (Epidermal Growth Factor)

FBS - Fötális borjú szérum (Foetal Bovine Serum)

FGF-1 - Fibroblaszt növekedési faktor 1 (Fibroblast Growth Factor 1)

GDF-5 - Növekedési differenciációs faktor 5 (Growth Differentiation Factor 5)

HA - Humán albumin

HAP - hidroxí-apatit

HGF - Hepatocita növekedési faktor (Hepatocyte Growth Factor)

HSA - Humán szérum albumin

HU - Hounsfield unit

IGF 1 - Inzulinszerű növekedési faktor 1 (Insulin-like Growth Factor 1)

IFN - Interferon

IL - Interleukin

LIF - Leukémia gátló faktor (Leukaemia Inhibitory Factor)

MAP-kináz - Mitogén aktiválta protein kináz

MSC - Mezenhimális őssejt (Mesenchymal Stem Cell)

MTT - metil-tiazol-tetrazólium

NBF% - Új csont képződés % (New Bone Formation %)

NGF - Ideg növekedési faktor (Nerve Growth Factor)

NSAID - Nem szteroid típusú gyulladáscsökkentő gyógyszer

Pax7 - paired box 7 (nincs magyar megfelelője)

PDGF - Thrombocita eredetű növekedési faktor (Platelet Derived Growth Factor)  
PE - Poli-etilén  
PGF 2 - Thrombocita növekedési faktor 2 (Platelet Growth Factor 2)  
PGE 2 - Prostaglandin E 2  
PIC - Pw1 pozitív intersticiális sejt (Pw1-positive Interstitial Cell)  
PLGA - Poli-laktát-glikolát  
PLLA - Poli-L-laktát  
PMMA - Poli-metil-metakrilát  
PRP - Thrombocitában gazdag plazma (Platelet Rich Plasma)  
PTH - Parathormon  
RGD - arginin-glicin-aszpartát aminosav szekvencia  
rHA - Rekombináns humán albumin  
ROI - Vizsgálati terület (Region of Interest)  
Runx2 - Runt DNS kötő domainhez tartozó transzkripció faktor 2  
SDF - Felszíni ujjhajlító izom (Superficial Digital Flexor)  
SPECT - egy foton emissziós számítógépes tomográfia  
TGF - Transzformáló növekedési faktor (Transforming Growth Factor)  
TNF - Tumor nekrosis faktor  
VAS - Vizuális analóg skála  
VEGF - Vaszkuláris endothel növekedési faktor (Vascular Endothelial Growth Factor)

## 1. Bevezetés

Prométheusz mítosza révén a regenerációs medicina már a görög mitológiában is megjelenik. Zeusz büntetésből a Kaukázus hegyére vitte a halhatatlan Prométheuszt, és egy sziklához kötözte. Minden nap egy sas marcangolta a máját, ami másnapra visszánőtt. A mitológiai történet a regenerációs medicina két fontos aspektusát is megjeleníti, az egyik a halhatatlanság tulajdonsága, a másik pedig a szövet funkcionális gyógyulása. A halhatatlanság az őssejtpopulációk azon tulajdonságában nyilvánul meg, hogy azonos leánysejtek létrehozásával véget nem érően képesek megújítani önmagukat. A szövet funkcionális gyógyítása pedig a regeneratív medicina fő célja, és szintén őssejtfunkcióhoz köthető, hiszen a leánysejtek differenciálódásuk révén pótolhatják az elvesztett sejteket, szöveteket, szerveket, visszaállítva a hiányzó funkciókat is. A legtöbb emberi szövet azonban sérülésre hegesedéssel válaszol. A hegyszövet egy erős struktúra, mely visszaállítja a szövetfolytonosságot, de a szövet eredeti fiziológiai funkcionalitását elvesztheti. Ezzel szemben a beteg számára a legoptimálisabb az lenne, ha a sérült szövetet, vagy szervet funkcionálisan ekvivalens struktúrával pótolnánk. A regeneratív medicina térnyerését segíti az is, hogy növekvő igény mutatkozik a laboratóriumban kidolgozott technikák mielőbbi klinikai felhasználására (transzláció), valamint a személyre szabott terápiákra. Ennek eléréséhez pedig elengedhetetlen a szövetek normális gyógyulásának ismerete, a potenciális őssejt populációk, növekedési faktorok felderítése, valamint megfelelő háromdimenziós vázszerkezetek, bioanyagok létrehozása. A növekedési faktorok alkalmazása, érthető módon, megelőzi a sejtes terápiák használatát, és mind a mai napig jelentős részét képezi a regeneratív medicina klinikai alkalmazási területeinek. A klinikai gyakorlat kedvelt adjuvánsai a vérfrakciók is, melyek segítségével a szervezet saját növekedési faktorai juttathatók koncentráltan a sérülés helyére. A sejtttranszplantációs technikák fejlődése a széles körben alkalmazott csontvelőtranszplantáció miatt indult be. A technika sikerét a csontvelői multipotens sejtek kiváló proliferációs képességének köszönheti, valamint annak, hogy ezek a sejtek képesek a keringésbe kerülést követően újra belépni a csontvelői közegbe. A csontvelői multipotens sejtek *ex vivo* expansziójára és differenciációjára is lehetőség van, így terjedtek el például a keratinociták és kondrociták bejuttatása által kedvezőbb gyógyulás reményét hozó technikák. Az őssejtek pozitív terápiás hatásai a támasztó és mozgató szervrendszer területén is jelentős eredményeket mutatnak, ugyanakkor a klinikai gyakorlat jelenleg még inkább a növekedési faktorok, vérfrakciók adjuváns lehetőségeit alkalmazza. Ettől függetlenül a sejterápiás kérdések ígéretesek, aktualitásukat mutatja, hogy Evans 2007-ben, többek között, az embrionális őssejtek felfedezéséért, Gurdon és Yamanaka pedig 2012-ben az indukált

pluripotens sejtek ismertetéséért kapott orvosi Nobel-díjat. Habár a sejterápia széleskörű elterjedéséig még várni kell, a klinikai gyakorlatban, így a támasztó és mozgató szervrendszer sérüléseinél is, nap mint nap szükséges a szövetek funkcionális helyreállítása. Jelen munka erre alapszik. Egyfelől vizsgálja az őssejterápia izgalmas útvesztőit, másrészt biztonságos, áthidaló megoldást keres a szövetműködés helyreállítására.



## 1.1. A regeneratív medicina alappillérei

Sérülést követően a szövetekben egy komplex folyamat indul be, amit összességében gyógyulásnak nevezünk. A legtöbb szövet sérülésre először egy gyulladásos válasszal reagál, amit a progenitor sejtek lokális felszaporodása követ. Ezt követően indul meg a jelen lévő sejtek részvételével a remodeláció, vagyis szöveti átépülés fázisa. Utóbbi során igyekszik a szervezet a szöveti funkcionalitást helyreállítani, azonban ez korántsem tökéletes minden esetben. A szöveti funkcionalitás helyreállítása tesz különbséget a gyógyulás két lehetséges kimenetele között. Míg reparáció során a szöveti folytonosság és hiány hegyszövet kialakításával áll helyre, addig regenerációt követően funkcionálisan értékes szövet jön létre. A regenerációs medicina célja, hogy sérülés után a szövet funkciója minél tökéletesebben, és a lehető legrövidebb időn belül helyreálljon, amit a sérülésre adott fiziológias folyamatok támogatásával igyekszik elérni. A gyulladásos fázist követően számos növekedési faktor irányítja a gyógyulás további folyamatait. A regeneratív technikák egyik alappillére emiatt a növekedési faktorok használata, hiszen a megfelelő növekedési faktor lokális alkalmazása gyorsabb és teljesebb gyógyulást tehet lehetővé. A növekedési faktorok, természetesen, alkalmazhatóak kombinációkban is, ennek legközkedveltebb irányvonala a saját vérből nyert növekedési faktorokban rendkívül gazdag vérfrakciók használata, melyek részletezésére egy későbbi fejezetben kerül sor.

A regenerációs medicina másik alappillére az őssejtek alkalmazása, illetve a különféle sejterápiás lehetőségek. Az őssejtek alkalmazásával lehetőség nyílik nagyméretű szövethiányok funkcionális pótlására is, melyeket az in vitro szövetépítési módszerek segítenek. A szövetpótláshoz, és in vitro szövetépítéshez pedig elengedhetetlen, hogy megfelelő vázszerkezeteket és hordozóanyagokat alkalmazzunk, melyek ugyanakkor a regeneratív medicina harmadik alappillére képezik. Lee szerint a hordozó anyagnak három általános feltételt kell teljesítenie. Elsőként, a hordozónak biokompatibilisnek kell lennie és fontos, hogy ne legyen toxikus. Másodszor a hordozó felületét úgy kell kialakítani, hogy kedvezzen a sejtek kolonizációjának és elszaporodásának, hiszen ez teszi lehetővé, hogy funkcionálisan értékes szövet jöjjön létre. Harmadszor pedig, a beültetett anyag a keringő folyadékok által vagy enzimatikusan lebontható kell hogy legyen, mert ez által valósulhat meg a tökéletes szöveti be-, és átépülés. A hordozófelületekkel és vázszerkezetekkel szemben a különféle indikációk ezenkívül speciális igényeket is támaszthatnak: csontpótlás esetében például figyelembe kell venni a megfelelő mechanikai tulajdonságokat, és a sejtfunkciónak kedvező pórusméretet is. A regeneratív medicina alappillérei a támasztó és mozgató

szervrendszer esetében szintúgy fontosak. Ennek megfelelően taglalják a következő fejezetek ezen szövetek kurrens regeneratív terápiais lehetőségeit, részletesebben.

## **1.2. A támasztó és mozgató szervrendszer szöveteinek regeneratív kezelési stratégiái**

### **1.2.1. Harántcsíkolt izom**

A harántcsíkolt izmok sérülései közel 50%-ban sport eredetűek, csupán emiatt is jelentős kihívást jelentenek a sportorvoslás és traumatológia területén . Kezelési aspektusaikat jelentősen befolyásolja az a sajátos gyógyulási séma, mely kisebb sérüléseket követően többnyire funkcionális gyógyulást eredményez. Sérülést követően a degeneratív és gyulladásos válasz indul be leghamarabb, melyet a szöveti remodelláció, és - komolyabb sérülések, szövethiányok esetében - a funkcionalitást jelentősen korlátozó fibrózis fázisa követ . A regenerációs medicina célja, hogy a szöveti degradáció és gyulladásos folyamatok lezajlását támogassa, erősítse a szöveti remodelláció fázisát, és meggátolja a fibrotikus folyamatok kialakulását. Mivel a harántcsíkolt izomszövet gyógyulásában rendkívül fontos az egyes fázisok időbeni lefolyása, ezért a regeneratív lehetőségek is ezek alapján kerülnek bemutatásra.

#### **1.2.1.1. Szöveti degradáció**

A szöveti degradáció a sérülést követően azonnal beindul. Ebben a fázisban a proteáz enzimek megkezdik a nekrotikus részek degradációját, citokinek révén pedig megnövekszik az erek permeabilitása és a vérátáramlás, ami a gyulladásos válasz beindulását stimulálja . A toxikus szabadgyökök felszaporodása tovább károsítja a sérült izomzatot, valamint a környező ép izomzatot is . Ennek moderálására az anti-oxidáns terápia megoldás lehetne, de alkalmazása nem hozta meg a várt sikert, hiszen azonnali, lokális hatásra lenne szükség, ami ez idáig technikai nehézségekbe ütközött .

#### **1.2.1.2. Gyulladásos válasz**

A gyulladásos válasz kialakításában a neutrofilek invázióját a makrofágok megjelenése követi. A gyulladásos sejtek fontos funkciója a növekedési faktorok, citokinek és prosztaglandinok lokális koncentrációjának növelése . Ezek a molekulák a szöveti regeneráció beindításában és mediálásában játszanak fontos szerepet. A nem-szteroid típusú fájdalom-, és gyulladáscsökkentők (NSAID) a ciklo-oxigenáz enzimrendszert gátolva viszont csökkentik ezen reguláló molekulák koncentrációját, így például a PGF-2- $\alpha$ -t és PGE-2-t. Éppen ezért a fájdalom és a gyulladás csökkentésére használt NSAID-ok csupán rövid távú javulást hoznak,

valójában bizonyítottan gátolják a szöveti remodelláció beindulását, és elősegítik a fibrotikus folyamatok térnyerését, ezzel összességében a funkcionális gyógyulást károsítva .

### **1.2.1.3. Szöveti remodelláció**

A szöveti remodelláció fázisát meghatározza, hogy a harántcsíkolt izmok saját, speciális őssejtpopulációval rendelkeznek. A szatellita sejtek nyugvó prekursor sejtek, melyek a lamina basalis, és az érett izomrost sarcolemmája között helyezkednek el . Sérülést követően aktiválódnak, proliferációs aktivitásuk megnő, majd a leánysejtek részt vesznek a regenerálódó izomrostok felépítésében . A szatellita sejtek elsődlegesen hatékony populációt alkotnak, ennek ellenére a csontvelői közegből származó prekursor populáció részvétele is bizonyított. Utóbbit vizsgáló kísérletekben a szatellita sejtpopuláció irradiáció miatti pusztulása ellenére prekursorok jelennek meg a sérült izomban, majd hozzájárulnak a izomrostok regenerációjához . A csontvelői őssejtek részvétele általában nem túl magas, egyes esetekben azonban 5-12%-os részvételt is megfigyeltek . További érdekesség, hogy a csontvelői őssejtek harántcsíkolt izomba való vándorlása komoly sérülés nélkül, pl. terhelésre adott fiziológias válasz során is, megjelenik . Mindez arra enged következtetni, hogy, habár az izmoknak saját őssejtpopulációjuk van, ennek regeneratív kapacitása véges, és exogén támogatásra szorulhat komoly trauma, szakadás, égés esetében. A regeneratív terápiák szerepe itt jelentős lehet, hiszen szupportív hatásuk hiányában a fibrózis fázisa erőteljesebb lesz, mely az izmok funkcionális gyógyulásában jelentős kárt tesz.

#### **1.2.1.3.1. Növekedési faktorok**

A regeneratív terápiák leginkább a szöveti remodelláció fázisában jutnak szerephez. Ez a fázis a sérülést követő 3-5. napon indul be, intenzitásának maximumát a második hét végére éri el. Ez idő alatt van lehetőség a regenerálódó izomzat funkcionális gyógyulásának támogatására, melyben a növekedési faktorok élen járnak. Az ilyen terápiáknak a központjában a prekursor mioblasztok és szatellita sejtek állnak, melyek támogatása megfelelőbb funkcionalitással gyógyuló szövetet eredményez. A növekedési faktorok közül az IGF-1-nek van a legkedvezőbb hatásspektruma . Mioblaszt sejt kultúrán végzett kísérletek rámutattak arra, hogy az IGF-1 elsőként a proliferációt segíti, és csak azt követően erősíti fel az

izomspecifikus gének expresszióját . A IGF-1 jelentőségét mutatja az is, hogy annak megkötése csaknem teljesen megszünteti a mioblasztok differenciációját in vitro körülmények között. Szisztémás használata is kedvezőnek bizonyult disztrófiás egerekben, hatására fokozódik a fehérjeszintézis, csökken a fehérjék degradációja, csökken az izomrostok méretbeli variabilitása, valamint javul a hátsó végtag használata .

Az IGF-1 nem az egyedüli növekedési faktor harántcsíkolt izom regenerációjának támogatására. IGF-1 mellett  $\beta$ -FGF-et, NGF-et lokálisan bejuttatva az izomrostok számának és vastagságának növekedése, valamint az izomerő fokozódása volt megfigyelhető szakadást, kontúziót és húzódást követően is . A növekedési faktorok közül a HGF szerepe is érdekes. Hatására a nyugvó szatellita sejtek belépnek a sejtciklusba, ezenkívül a faktor facilitálja az izomsejtek migrációját is . A HGF ép izomzatban is kimutatható, sérülést követően tehát lehetőség van szekréciójára, ami a nyugvó sejtek aktivációját segítheti . Mindezeket in vivo eredmények is igazolják, melyek szerint a faktor lokálisan alkalmazva megemeli a mioblasztok számát, ugyanakkor érdekes, hogy ez mégsem javítja az izom gyógyulását, mert gátlődik a további szöveti remodeláció . A növekedési faktorok közül az FGF, LIF és PDGF is bír szatellita sejt aktivációs képességgel, a VEGF pedig az angiogenezis elősegítésével segítheti a regenerációt . Habár biztató eredmények születnek egyes növekedési faktorok használatát követően, a megoldás talán mégis egy kombinált terápiában rejlik majd, mely a megfelelő időben, a megfelelő koncentrációjú növekedési faktorokat, sejteket alkalmazza, és drasztikus intervenció helyett a szervezet saját, fiziológiásan is működő folyamatait erősíti meg.

#### **1.2.1.3.2. Sejtterápiás lehetőségek**

A sejtttranszplantáció alkalmazása izomszövet esetében nem új keletű. A szatellita sejtek biopsziával hozzáférhetőek, in vitro expansziójuk és mioblaszt irányú differenciáltatásuk lehetséges. A első mioblaszt transzplantációt 1979-ben végezték el, a sejtek radioizotópos követése alapján következtettek a transzplantált sejtek túlélésére, és regenerációban való részvételére . A mioblasztok hasznossága leginkább a disztrófiás izombetegségek kezelésében hasznosul jelenleg. Beültetésüket követően képesek meglévő, regenerálódó rostokba olvadni, önállóan is tudnak izomrostokat létrehozni, valamint a dedifferenciációt követően szatellita sejteket produkálni . A korai sikeres kísérletek nagyszámú klinikai vizsgálatot eredményeztek, ugyanakkor humán kipróbálások során igazán áttörő sikert nem sikerült elérni . Ennek okát három fő folyamattal magyarázták. Egyrészt a mioblasztok 75%-a elpusztul a transzplantációt követő harmadik napig , másrészt, a beültetett sejtek maximum 200 mikron

távolságba képesek eljutni a injekció helyétől . Harmadrészt pedig, ha nem megfelelő immunzupressziót használnak, akkor a sejtek 2 héten belül kilökődnek . Utóbbi persze autológ átültetésre nem érvényes, azonban ezek a terápiák disztrófiás betegek állapotjavítása céljából jönnek szóba, ahol a betegség jellegéből kifolyólag az autológ transzplantáció nem jelentene megoldást. Az említett problémákon nagy sejtszámmal, többszörös injekcióval és megfelelő immunzupresszióval terápiaival felülkerekedve a mioblaszt transzplantáció működő módszerévé válik a disztrófiás betegségek kezelésére, az eljárás pedig a betegek beszámolója alapján jól tolerálható . A beavatkozások javítanak ugyan a betegek állapotán, de a szatellita sejtek és mioblasztok in vitro expanziója nem kellően gyors, és transzplantációt követően az izomrostokkal történő fúzió sem kellő mértékű, amik összességében a technika sikerességét jelentősen befolyásolják . Így merült fel annak lehetősége, hogy más, esetleg kevésbé differenciált populáció alkalmasabb lehet izomsérülések kezelésére .

Az izomszövetben találhatóak ugyanis multipotens sejtek, melyek a szatellita sejtekkel szemben nem a lamina basalison belül helyezkednek el. Ezt a heterogén sejtcsoportot nevezzük "side population"-nek. Az itt található sejtek a szatellita sejteknél kevésbé differenciáltabb formák, amire bizonyíték például, hogy egyes sejtek (PIC) a Pw1/Peg3 gént, ami egy korai miogén marker, expresszálják, míg a Pax7-et, ami egy szatellita sejt marker, nem . A PIC sejtek ismert előnye, hogy parakrin növekedési és differenciációs faktorok termelésével is segítik a regenerációt . (Utóbbi folyamat, egyébként, minden sejtes terápia esetén szóba jön.) Hasonlóan ígéretes sejtek a II. típusú periciták és mezangioblasztok, melyek szintén az izom eredetű "side population" tagjai. Ezek a sejtek intraarteriális bejuttatást követően magasabb arányban élnek túl és fuzionálnak az izomrostokkal, mint a szatellita sejtek .

Az eddigieknél még kevésbé differenciáltabbak a mezenhimális őssejtek. Izomsérülést követően, lokálisan injektálva, növekvő izomerőről és rost-keresztmetszetről, valamint emelkedő számú érett izomrostokról számol be az irodalom . A mezenhimális őssejtek támasztó és mozgató szervrendszerben betöltött kiemelt, speciális szerepét az 1.2.4-ös fejezet részletesebben is taglalja.

A sejterápiás eljárások, mindezek alapján, biztatóak, hiszen elérhető, hogy a beültetett sejtek funkcionálisan aktív szöveté alakuljanak. Ugyanakkor az izmok sérülései esetenként nagy szövethiánnyal járnak, melynek gyógyulásának támogatására a sejtuszupenzió perkután vagy intraarteriális injektálása nem elegendő. A szövethiánnyal járó sérülések következtében kialakuló kontraktúra, mozgástartomány beszűkülés, és izomerő gyengülés a funkcionalitást jelentősen korlátozza, éppen ezért nagy igény mutatkozik a modern szövetépítési technikákra, melyek alkalmas sejtek, és megfelelő vázanyagok használatával segítik a regenerációt. A

vázanyagok feladata az extracelluláris mátrix rendszerének biztosítása, amibe a regeneratív folyamatok révén funkcionálisan gyógyult szövet nőhet bele. A vázanyagok egyik fajtája ép szövetből, decellularizációs eljárások során készül. Ez esetben a regenerálódó szövet számára ismerős struktúra biztosítja a térbeli orientációt, a decellularizációs eljárás pedig az esetleges immunreakciók kivédését szolgálja. Az efféle mátrixok aktivizálják a szervezet saját sejtjeit, támogatják az exogén sejtek beépülését, elősegítik új izomrostok kialakulását, valamint használatuk során a regenerálódó szövet innervációja is kialakulhat. Az extracelluláris mátrix pótlására egyéb természetes anyagok is használhatók. Ilyen az alginát, a kitozán, vagy a kollagén. Ezekből az anyagokból is jól működő vázanyagokat lehet készíteni. Alkalmask makromolekulák és növekedési faktorok megkötésére, valamint egyes kísérletek szerint a mioblaszt proliferációt és differenciációt is elősegítik. A vázanyagok megválasztásakor egyre nagyobb előnyt élveznek a szintetikus anyagok is. Erősségük, a természetes szcaffoldokkal szemben, hogy összetételük, lebomlásuk, mechanikai és strukturális tulajdonságaik igény szerint alakíthatók. Kedvelt alapanyagok a poli-L-laktát (PLLA) és poli-laktát-glikolát (PLGA), valamint ezek keveréke (PLLA/PLGA), melyekből, a megfelelő eljárásokkal, hidrogélek, habok, hálók hozhatók létre. A vázanyagok transzport funkciója kiemelendő, hiszen vehikulumként gyógyszerek, növekedési faktorok és sejtek bejuttatására is alkalmasak, azonban önmagukban nem elegendőek a szövet funkcionális regenerációjának elősegítésére. Habár nem nagy szövethiányok pótlására, de szintén ezekből az anyagokból készülnek a felszívódó sebészeti varróanyagok, melyek ilyenformán a szövet egyesítésén kívül, mint extracelluláris vázanyag is funkcionálhatnak, miközben az egyébként is sutura-val történő rekonstrukciót sem bonyolítják.

#### **1.2.1.4. Fibrózis - fibrózis gátlás**

A fibrózis két héttel a sérülést követően indul meg, túlzott térnyerése az izom funkcionális gyógyulását akadályozhatja. Habár ez utóbbi növekedési faktorokkal, és sejterápiával ellensúlyozható, a hegesedéssel járó folyamatok direkt gátlása is kedvező eredményt hozhat. A fibrózis hátterében a TGF- $\beta$ -1, valamint a vele összefüggésben álló miosztatin molekula áll. A miosztatin fontos mediátora az izomfejlődésnek és regenerációnak, feladata az izom túlnövekedésének megakadályozása. A TGF- $\beta$ -1 pedig többek között krónikus gyulladást, és az extracelluláris mátrix elemeinek felszaporodását okozza különböző szövetekben, így harántcsíkolt izomban is. A fibrotikus hatások kivédésében több molekula is szóba jön. A proteoglikán dekorin például direkt kapcsolódik a TGF- $\beta$ -1-hez, ezáltal befolyásolva annak hatásait. A dekorin molekula semlegesíti a miosztatin hatásait fibroblasztokban és

mioblasztokban, valamint elősegíti a follisztatin termelődését is, ami antagonizálja a miosztatin hatásait. Szintén a TGF- $\beta$ -1 útvonal gátlásával akadályozza meg a fibrózis kialakulását az IFN- $\gamma$ . Az IFN- $\gamma$  a TGF- $\beta$ -1 kollagén termelő hatásain keresztül gátolja meg a harántcsíkolt izomzat fibrotikus folyamatait, és segíti a funkcionális gyógyulást. Egy másik molekula, a szuramin a TGF- $\beta$ -1 receptorának kompetitív gátlószere, semlegesíti a miosztatin hatásait, ugyanakkor a mioblasztok proliferációját segíti elő. Ennek eredményeként hatékonyan gátolja a fibroblasztok proliferációját és a hegesevést elősegítő fehérjék termelődését. Az anti-fibrotikus kezelési stratégiák ezzel együtt csupán kísérleti fázisban mutatták meg hatékonyságukat.

Az izomszövet többfázisú regenerációja miatt a funkcionális gyógyulást feltehetően egy többlépcsős terápiás protokoll jelentheti majd, melyben sejtek, növekedési faktorok, vázanyagok és fibrózist gátló szerek egyaránt szerephez juthatnak.

### **1.2.2. Inak és szalagok**

Az inak és szalagok feladata a támasztó és mozgató szervrendszerben az erőátvitel és az ízületek stabilizálása. Az ín-, és szalagsérülések incidenciája igen magas, de a szövetek funkcionális gyógyulását elérni gyakran csak kompromisszumok árán lehetséges. Az inak és szalagok sérülésével kialakuló hematoma egy rövid gyulladós fázist indít be, majd a felszaporodó fibroblasztok segítségével megkezdődik a proliferatív fázis, melyet azonban csak jóval később követ a szöveti remodelláció. Az inak és szalagok gyógyulására jellemző, hogy már a proliferatív fázis is hónapokig húzódhat, majd a szöveti remodelláció, vagyis az extracelluláris elemek strukturális rendeződése csak ezután zajlik, és évekig eltarthat. A gyógyulás dinamikáját jelentősen meghatározza, hogy az inak és szalagok hipovaszkuarizált és hipocelluláris szövetek, így a regeneráció megindulásakor még nem áll rendelkezésre kiterjedt kapilláris hálózat és tettekreész progenitor populáció. Ennek köszönhetően hosszan fennmaradó hegyszövet alakul ki, mely azonban biológiailag eltér az ép struktúráktól, biomechanikailag pedig képtelen az ép szövettel felvenni a versenyt. Szövettanilag, jellemzően, csak kis átmérőjű kollagén fibrillumokat tartalmaz, míg az ép struktúrában nagy és kis átmérőjű fibrillumok is találhatóak. A gyógyuló szövetekre jellemző a magasabb proteoglikán és V. típusú kollagén tartalom, valamint a kollagén keresztkötések hiánya is. Klinikai szempontból a sérült inak és szalagok ízületi instabilitást eredményeznek, ami további traumát, illetve a környező szövetek degeneratív folyamatait idézheti elő. Az inak és szalagok sérülésénél gyakran a konzervatív kezelés is elégséges lehet. Ezekben az esetekben



azonban figyelembe kell venni, hogy a szalag biomechanikai regenerációja a keletkező hegyszövet miatt igen elhúzódó. Ezzel szemben műtéti úton kell például az elülső keresztszalag sérüléseit rekonstruálni, amit patella vagy hamstring ínból kialakított autografttal végeznek. Habár ezen esetekben az autograftoknak köszönhetően hamar, és jó minőségben lehet stabilizálni az ízületet, a patella ín esetében számolni kell a donor területi fájdalommal és arthrofibrozissal, míg a hamstring technika lassabban gyógyul, és hosszú távú stabilitása kevésbé meggyőző. A ín-, és szalagsérüléseknél a kurrens rehabilitációs stratégia a korai mobilizáció irányába fejlődik, mert ezáltal csökkenthető az összenövés, és javítható a post-operatív terhelhetőség is. A túl korai mobilizáció azonban a gyógyuló szöveteket nyújtva a sérült végéknél gyenge minőségű kötőszövet kialakulását eredményezi, mely ezáltal tovább csökkentheti a szakítószilárdságot, és elhúzódó felépülést eredményezhet. A modern, erősebb varróanyagok segítségével csökkenthető ugyan ez a folyamat, de teljesen nem szüntethető meg. A regeneratív terápiák a növekedési faktorok és őssejtek segítségével az ín-, és szalagsérülések gyógyulásának funkcionális támogatására és gyorsítására irányulnak, hogy általuk biológiailag kedvezőbb és biomechanikailag stabilabb szövet jöjjön létre, mely végeredményben agresszívabb rehabilitációt és gyorsabb felépülést eredményezhet.

#### **1.2.2.1. Növekedési faktorok**

A növekedési faktorok tehát a regeneratív medicina egyik alappillére képezik, ezért az inak és szalagok regenerációs folyamatainak feltérképezését követően kézenfekvő, hogy a kedvező hatású faktorok exogén bejuttatásával javítsunk a szövet gyógyulásán. A növekedési faktorok az inak és szalagok regenerációjában a következőképpen vesznek részt: az IGF-1 és TGF- $\beta$  főleg a gyulladáshoz kapcsolódó fázisban aktívak, feladatuk a fibroblasztok migrációjának, proliferációjának elősegítése, ezt követően részt vesznek a kollagén szintézis szabályozásában is. A növekedési faktorok közül a TGF- $\beta$  tűnik az extracelluláris mátrix termelés legerősebb facilitátorának. A FGF szintén angiogenetikus és részt vesz a sejtek migrációjának és proliferációjának szabályozásában. A PDGF szabályozó faktorként például az IGF-1 termelést irányítja, de önmagában is erős proliferációs ágens. Az *in vitro* hatásosnak bizonyuló növekedési faktorok *in vivo* környezetben is eredményesnek bizonyulnak. Woo kísérleteiben, PDGF hatására javuló strukturális változásokat figyelt meg, és megállapította, hogy a nagyobb dózisú növekedési faktor kedvezőbb eredményt hoz. Ezzel együtt konstatálta, hogy semmi javulást nem jelent, ha a PDGF-et TGF- $\beta$ -val egészíti ki. Lyras egy nyúl patella-ín defektus modellben ért el kedvező mechanikai javulást, miután TGF- $\beta$ -t és IGF-1-et egyszerre alkalmazott. Kondo nyulak elülső keresztszalagján végzett kísérleteket, és

megállapította, hogy túlnyújtásos sérülés esetén mechanikai javulást lehet elérni TGF- $\beta$ -1 használatával . A növekedési faktorok kiegészítő kezelésként is felmerülhetnek. Yasuda patella ín autograftot használt az elülső keresztszalag pótlására, amit beültetés előtt egy TGF- $\beta$ -1-et és EGF-et tartalmazó fibrin ragasztóval vont be, miáltal nagyobb szakítószilárdságot és merevséget ért el .

A növekedési faktorok bejuttatásának egyik módja lehet a varróanyagok használata. Az elképzelés antibakteriális hatóanyagok esetében jól működik, emiatt feltételezhető, hogy egyéb molekulák bevitelére is alkalmas . Dines in vivo vizsgálata szerint növelhető az inak szakítószilárdsága, ha GDF-5-tel bevont varrattal egyesítik a sérült végeket (growth differentiation factor 5) . A sejtfunkciós folyamatok elősegítésére mutat rá Rohrich hasonló kísérlete is, aki mersilene varróanyaghoz kovalensen kötött EGF-t jutatott sérült inakba, és mutatott ki emelkedett proliferációs aktivitást a varróanyag mentén, in vivo patkánymodellben . Hamada funkcionális vizsgálatai szerint BFGF bevonatú nylon varrattal jelentősen javíthatók a sérült inak biomechanikai tulajdonságai . Ugyancsak érdekes Mazzoca korábbi munkája, melyben I. típusú kollagén bevonatú fonalakat vizsgáltak, és megállapították, hogy az oszteoblasztok szívesen tapadnak és szaporodnak a kialakított felületen, in vitro . Ennek klinikai jelentősége a nehezen gyógyuló rotátor köpeny sérüléseknél lehet, ahol éppen az ín-csont átmenet intenzív sejtes regenerációjára lenne szükség az operatív beavatkozást követően . Ez alapján felmerül a fonalak használata sejtttranszplantációs eljárások kivitelezésére is, hiszen szakadásos sérülés esetén a reparáció egyébként is varrattal történik, a sejtszegény szövet gyógyulása viszont nem kellően gyors. Ezt a folyamatot gyorsíthatná, ha a varrattal egy időben támogató prekursor sejtek kerülnének a sérült területre.

### **1.2.2.2. Sejterápiás lehetőségek**

Az inak és szalagok kezelésének másik potenciális lehetősége a sejterápia. A növekedési faktorok önmagukban is hasznosnak bizonyulnak, azonban őssejtek bejuttatásával egy összetettebb rendszer segíti a regenerációt. A komplexebb rendszer ez esetben is a megfelelő arányban termelődő növekedési faktorokat, kemotaktikus molekulákat, valamint immunmodulációt, prekursor sejtek létrehozását, és esetleges transzdifferenciációt jelent. Az ortopédiai szöveteknél általában, így a inak és szalagok terápiájában is, a mezenhimális őssejtek, és azok differenciáltabb formái, például a szinoviális fibroblasztok jelentősek . Létezik ugyanakkor tudományos bizonyíték arra vonatkozólag, hogy a tenocitákkal a mezenhimális őssejteknel erősebb ín regeneráció érhető el . Pietschmann munkája ezenkívül

arra is rámutat, hogy ilyenformán a csont irányú differenciáció is könnyebben elkerülhető, ami mezenhimális sejtek használatánál jelentkezett, és gyengítette az ín mechanikai tulajdonságait.

Fontos kérdés a sejtek bejuttatása, melynek módját a sérülés jellege határozza meg elsősorban. Konzervatív kezelést igénylő esetekben az őssejtek perkután beültetése is lehetséges. Versenylovak esetében, például, a végtag sérülések 46%-ában alakul ki tendinitisz, legtöbbször a tendon flexoris digitalis superficialison (SDF, superficial digital flexor) . Ennek kezelése komoly nehézségekbe ütközik, és gyakran a lovak további versenyzését is megakadályozza, nem elhanyagolható "gazdasági" deficitet okozva. Mivel az új kezelési technikák jellemzően a jól finanszírozott ágazatokban, úgy mint a katonaság és a sport területén, jelennek meg először, nem meglepő, hogy a versenylovak őssejtes kezelésére is hamar sor került . Egyes szerzők kiemelik, hogy a versenylovakon végzett beavatkozások humán vizsgálatok számára is hasznosak, hiszen az állatok igénybevétele hasonlóan intenzív, mint számos élsportolóé . A vizsgálatok hatékonyságának egyértelmű mércéje a versenyképesség visszanyerése. Godwin autológ csontvelői MSC-t tenyésztett, majd juttatott vissza perkután, ultrahang vezérelve, az utánkövetést pedig három évig folytatta. Eredményeit két nem-sejterápiás eljárást alkalmazó, nagy elemszámú vizsgálathoz hasonlította . Utóbbi tanulmányok hialuronsav, glükózaminoglikán, vagy fumarát vegyület bejuttatásával próbálták javítani a sérült inak terhelhetőségét. Godwin megállapította, hogy a sejtekkel kezelt lovak nagyobb arányban térnek vissza a versenyzéshez, mind egy, mind három, mind pedig öt verseny erejéig követve. Vizsgálataiban 113 versenylóbból 111 újra versenyezni tudott legalább egy alkalommal (98%). Az ismételt sérülések aránya is kedvezően alakult, hiszen a sejterápián átesett lovak csupán 32%-a szenvedett újabb sérülést, míg az összehasonlítást képező tanulmányokban ez 52-57% volt . Renzi vizsgálataiban szintén autológ, csontvelői mezenhimális sejteket injektált in vitro tenyésztést követően. Eredményei alapján 18-ból 13 egyed nyerte vissza ezáltal a versenyképességét, míg a kontroll csoport hagyományosan, termokauterizációval (pin firing) kezelt egyedeiből egy sem (0/12) . Hasonlóan kedvező eredményekről számol be Pacini és Smith is . Lacitignola kísérleti modellben is próbára tette a sejterápia hatását. Kollagenázzal kialakított degeneratív inakba adott mezenhimális őssejteket, majd 21 hét elteltével vizsgálta a regenerációt, szövettani módszerekkel. Megállapította, hogy az I./III. típusú kollagén aránya és a rostok rendezettsége is hasonlít az ép inak szövetszerkezetéhez. A biztató eredmények miatt a versenyképesség visszatérését is vizsgálta egy másik populáción, melyben szintén kedvező eredményeket kapott sejterápiás alkalmazást követően .

Számos ínsérülés azonban szakadással, esetleg szövethiánnyal jár, melyek kezeléséhez nem elegendő a konzervatív, vagy perkután terápia. A műtéti úton történő rekonstrukció direkt terápiás lehetőséget biztosít, a szövethiányokat pedig a különböző szövetpótló szcaffoldok segítségével lehet megoldani. A szövetpótló vázanyagok kiváló felületet biztosítanak hatóanyagok, sejtek bejuttatására is. Habár klinikai beavatkozások terén ezek még nem használatosak, számos kísérlet mutat rá arra, hogy ilyen jellegű ín-, és szalagsérülések esetén is nagy segítség lehet a lokális progenitor populáció sokasítása. Selek, például, patkány Achillesen vizsgálta a szövet regenerációját az ín művi átvágását, és újraegyesítését követően. Eredményei szerint perkután bejuttatott őssejtek jelentősen csökkentették az újbóli sérülés megjelenési rátáját, miközben a kezelt inak magasabb szakítószilárdságot értek el. Zhang, vizsgálataiban, egy poli-glikolát polimert használt, amit I. típusú kollagénnel és csontvelői mezenhimális őssejtekkel töltött fel, majd nyulakon kialakított Achilles defektusban vizsgálta a hatékonyságát. Eredményei szerint az ilyenformán kezelt inak szakítószilárdsága 16 hét gyógyulást követően szignifikánsan magasabb volt az őssejtmentes vázanyagéhoz képest. Hasonlóan kedvező eredményeket értek el kollagén gélek alkalmazásával nyulak patella inán létrehozott defektusok gyógyításában is.

Young, egy korábbi munkájában, egy biokompatibilis kollagén-őssejt kompozitumot sebészeti varróanyagokkal rögzített Achilles defektusban. Ebben a vizsgálatban nem csupán a mechanikai mérések mutattak rá a kezelés kedvező hatásaira, hanem az is, hogy a sejtekkel kezelt csoportokban nagyobb volt az inak keresztmetszetének területe. A sebészeti varróanyagok használata felmerült növekedési faktorok esetében is, ugyanakkor kiválóan alkalmas lenne sejtek bejuttatására olyan esetekben, ahol nem alakul ki szövethiány, és a művi rekonstrukció kiegészítő vázanyagok nélkül is létrehozható. Ennek technikai megvalósíthatóságát csupán néhány tudományos közlemény vizsgálja. Tény, hogy a varróanyagok felülete jóval kisebb, mint egy háromdimenziós vázanyagé, és komoly kihívás a felületet őssejtek számára vonzóvá tenni. Nehézséget jelenthet a kellő sejtszám elérése is, amit sejtszuspenziós eljárásoknál könnyedén többmillió nagyságrendbe lehet emelni. Kecsegtető ugyanakkor a cél, miszerint a technika segítségével a standard műtéti eljárás nem bonyolódna, és nem lenne szükséges nagyobb kiterjedésű szcaffoldok lebontásával terhelni az egyébként regenerálódó szövetet.

Az állatkísérletes modellekből levonható tanulság, hogy a regeneratív terápiáknak és az őssejttranszplantációnak kiemelkedő szerepe lehet a humán ínsérülések kezelésében is. Használatukkal minden bizonnyal jobb szöveti funkció és gyorsabb rehabilitáció érhető el. A szerző szerint komoly gazdasági és élvezeti értékkel bírt volna, ha David Beckham is részt vehet a 2010-es dél-afrikai futball világbajnokságon, amit Achilles sérülés és az elhúzódo

rehabilitáció miatt volt kénytelen kihagyni. Kárpótolja a focit szerető réteget, hogy manapság már magyar csapatnak is szurkolhatunk világversenyen. Szubjektív szempontokat hátrahagyva, tény, hogy a kurrens regeneratív terápiák ismerete egyre fontosabb szerephez jut a sporttudományok iránt elkötelezett kutatók, orvosok, fizioterapeuták körében. A jól finanszírozott ágazatokban elért sikerek pedig idővel általánosan elérhetővé tehetik a hatékony kezelési stratégiákat.

### 1.2.3. Porc

Jelen dolgozat témáját illetően a lágyszöveti regenerációval, lehetséges sejtttranszplantációs lehetőségekkel, valamint a funkcionális csontgyógyulással foglalkozik, ezért ezen témák diverz tárgyalása elengedhetetlen. A porcszövet megbetegedése és regenerációja a kísérletes munkát nem érinti, ugyanakkor a szerző fontosnak tartja a támasztó és mozgató szervrendszer szöveteinek teljes reprezentációját. Éppen ezért a porcszövet regenerációs folyamataiban, és az oszteoarthritisz patofiziológiájában való elmerülés helyett a fejezet a regeneratív terápiaik kínálatra lehetőségekre kívánja felhívni a figyelmet.

A porc egyik legfontosabb tulajdonsága a mechanikai teherbírás, ugyanakkor a szövet felnőttkori regenerációs képessége gyenge. Ennek következménye, hogy az évtizedeken át tartó terhelés, vagy akut sérülés következtében kialakuló porchiányok klinikai problémát, az oszteoarthritisz betegséget eredményezik. A porcot ért inzultusok folyamánként fokozatosan porchiányok alakulnak ki, a szubkondrális csont felszínre kerülése gyulladást és oszteofiták kialakulását indukálja, ami folyamatos fájdalmat és ízületi funkcióvesztést eredményez. A gyenge gyógyhajlam miatt komoly tudományos és klinikai várakozás övezi a porcszöveti regenerációs terápiaik fejlődését. A panaszok kialakulása ugyanakkor hosszabb folyamat eredménye, ezért a preventív hozzáállás sokat javít a betegség kimenetelén. Az elülső keresztszalag pótlása például az ízületi lazaságot korrigálva hátráltatja az életminőséget befolyásoló panaszok kialakulását. Definitív, körülírt porchiányok kezelésére a Hangody Professor úr által kifejlesztett, világszerte elterjedt mozaik plasztika is megoldást jelent. A kiterjedt porcfelszín-károsodásra viszont a regenerációs medicina keresi a választ. A mozaik plasztika során alkalmazott autológ oszteokondrális dugó alkalmazásának nagy előnye, hogy felépített, élő porcszövetet használ, a fémekkel ellentétben nem alakul ki rajta bakteriális biofilm, és nincs szó immunológiai folyamatokról sem. A technika hátrányai közé sorolandó, hogy a beültetett graftok nehezen épülnek át a környező szövet határaival, ezért idővel lazulhatnak, illetve, hogy az oszteoarthritisz által produkált nagy porchiányok kezelésére sem alkalmas. A porchiányok pótlásánál is felmerül a különböző vázanyagok használata, melyek készítése bonyolult feladat, hiszen a legtökéletesebben kell másolniuk a porcszövet extracelluláris mátrixának biofizikai, biokémiai és strukturális tulajdonságait. Emellett az alkalmazott anyagnak bírnia kell a radiális és longitudinális mechanikai terhelést, a sejtaktivitást támogató, jól hidratált közeget kell hogy teremtsen, és össze kell tudjon épülni a környező porccal és szubkondrális csonttal. Számos alapanyag került már szóba porchiányok pótlására: hialuronsav, polilaktátok, alginát, agaróz, kitozán. A különböző vázanyagok kipróbálásakor számos fontos tényre derült fény. Nem kérdés a megfelelő porozitás

szükségessége, ugyanakkor, azok a vázszerkezetek, amik nem teszik lehetővé, hogy a differenciálódó sejtek kerek formát is ölthessenek, nem sikeresek, ugyanis a kerek forma szükséges a kondrociták érése során. Ennek hiányában a beültetett graft a rostos, vagy rugalmas porc kialakulását teszi lehetővé, nem pedig az ízfelszínen szükséges hialinporcét. Hasonló megfigyelés, hogy a poliészterek degradációs termékei apró steril abszcesszusok formálásával rontják az átépülést . A szkaffoldok hatékonyságát önmagában vizsgálni talán kevésbé fontos, hiszen egy rendkívül rossz gyógyhajlamú szövet hiányának pótlásáról van szó. Az oszteoarthritisz generalizáltan érinti a porcot és a szubkondrális csontot, ezért ettől a degeneratív, gyulladásos kompartmenttől kevésbé várható a regenerációban való produktív részvétel. Éppen ezért szükséges a növekedési faktorok és sejtek használata is. A porcszövet az egyetlen olyan humán szövet, ami csupán egyféle sejtet, a kondrocitát tartalmazza. A sejterápiás-szövetépítő eljárások is elsődlegesen ezt a sejtpopulációt célozzák meg, ugyanakkor ennek több aspektusa is van. Az egyik ilyen kérdés, hogy műtét közben nyert sejteket, vagy ex vivo expanszió utáni sejteket érdemes használni. A legelterjedtebb metódus a Brittberg által leírt autológ kondrocita implantáció . Az eljárás során mintát vesznek terhet nem viselő porcfelületekből, majd izolálják a sejteket és az in vitro megnövelt sejtszámot használják fel a beültetés során. A technika elterjedésének köszönhetően számos humán vizsgálat is született, melyek biztató hosszú távú eredményekről számolnak be . Eredményes iránynak tűnik porc-fragmentumok alkalmazása is, mely - hasonlóan a mozaik plasztikához - autológ porcot használ a léziók pótlására . A technika lényege, hogy az autológ, apróra munkált szövetet egy vázanyag segítségével juttatják be, és tartják a porchiányban. Ennek eredményességét, állatmodellekben vizsgálva, az mutatja, hogy rövid távon hialinporc jellegű szövet képződik. Hosszú távú eredmények azonban ezt a kedvező irányt alátámasztani még nem tudták. Az ex vivo szövettenyésztésre alapuló porcpótlás kétségtelenül bonyolultabb és drágább is, ugyanakkor előnye, hogy pontosan ismert, tetszőlegesen választható sejtpopulációk állnak rendelkezésre, valamint, hogy a tenyésztési eljárások miatt jóval magasabb sejtszám használható fel . További előny, hogy a kondrociták nem csupán az ízületi felszínből nyerhetők. Használható forrásnak bizonyul a fül rostos porca, a meniszkuszok, valamint az orr-, és bordaporcok is . Az ex vivo expansziós eljárások más sejtpopulációk használatát is lehetővé teszik. Ilyen a csontvelői mezenhimális őssejtek csoportja is. Mivel ezek a sejtek jóval kevésbé differenciáltak, ezért a regeneratív folyamatokba is feltehetően összetettebb módon képesek bekapcsolódni. Ennek egyik bizonyítéka, hogy a MSC-k kondrogén differenciációját követően magasabb glükózaminoglikán termelést produkálnak, mint primér kondrocita kultúrák . Mindez arra enged következtetni, hogy az őssejtek a

regeneratív folyamatokba az embrionális fejlődéshez hasonlóan lépnek be, miáltal a regeneráció is teljesebbé válhat .

A porcszöveti degeneratív betegségek problémája, a gyorsan fejlődő regeneratív terápiák ellenére, továbbra is széles körben érinti a társadalmat. Biztató, új eljárásokkal elért eredmények, vélhetően az elkövetkező években tovább bővítik a tudást, miáltal kedvezőbb vázanyagok, megfelelőbb sejtpopulációk, és eredményesebb technikák születnek majd.

#### **1.2.4. Csonthiányok, csontpótlás**

A csontszövet regenerációs hajlama alapvetően jó. A szöveti remodelláció az oszteoblaszt és oszteoklaszt működés miatt folyamatos. Csontsérülést követően megnyílnak a környező erek és a létrejött hematoma alapot ad a gyulladásos válasz kifejlődésére. A gyulladásos fázis bioaktív molekulákat (TNF, BMP, IL-6, IL-12) halmoz fel, melyek kemotaktikus ingert jelentenek az endogén progenitor sejtek lokális felszaporodásához. Az elsődleges csontheg még teherviselésre alkalmatlan ugyan, de a törtszékek egybentartásával megkezdődhet a remodelláció fázisa, és idővel funkcionális gyógyulás érhető el . Amennyiben azonban a csontheg nem képes kialakulni, elégtelen gyógyulás várható. A elégtelen reparáció összefüggést mutat a defektus méretével, ugyanis egy kritikus méretű csonthiány (critical size defect), vagy a törtszékek nem-egyesített (non-union) helyzete meggátolja a szervezet regeneratív folyamatainak sikerességét . A kritikus méretű defektusok miatt tartós csonthiányok maradnak vissza, míg a non-union sérülések állízület kialakulását eredményezik. Mindkét esetben a csont egyik fő funkciója, a mechanikai stabilitás szenved csorbát, ezért a csontszövet művi pótlására lehet szükség. Az Egyesült Államokban a törések 15%-ánál jelentkezik olyan csonthiány, melynek kezelése csontpótló anyagok alkalmazását igényli .

A csontpótló anyagokkal szemben támasztott minimális követelmény, hogy kedvező környezetet biztosítsanak a csontpótló csonthoz való kapcsolódásához (oszteointegráció), valamint, hogy elősegítsék a remodelláció folyamatának beindulását (oszteokonduktivitás). Az eredményes és dinamikus csontpótláshoz szükséges az oszteoinduktív ágensek jelenléte is, melyek a progenitor sejtek aktivációjának fokozásával segítik elő az oszteogenezis folyamatát, és eredményeznek gyorsabb funkcionális gyógyulást . A csontpótlás mércéjének a mai napig az autológ csont beültetése tekinthető, mert a mineralizált szövet oszteokonduktív és oszteointegratív tulajdonságú, a termelő faktorok (TGF- $\beta$ , BMP) oszteoinduktív folyamatokat indítanak be, valamint a graft jelentős számú oszteogén sejtet tartalmaz, melyek az átültetést követően azonnal megkezdik a szövet helyreállítását . A kedvező tulajdonságok ellenére az autograft alkalmazásának fő gátja, hogy mennyisége korlátozott, ezért kiterjedt



hiányok kezelésére már nem alkalmas . Autografthoz juthatunk a műtét során képződő spongiosa törmelék révén, de nagyobb mennyiséghez egy másik csont, leggyakrabban a csípőlapát szimultán opusa szükséges. Utóbbi esetben számolni kell a donor területi morbiditással (donor site morbidity), mely magába foglalhatja fájdalom és vérzés jelentkezését, vagy az illetett bőrfelület post-operatív érzékenységét, ezen felül paraesthesia is kialakulhat, de nem hagyhatjuk figyelmen kívül az esetleges mozgászavarokat sem (a lokalizációnak megfelelő funkciózavar, pl. járászavar), továbbá a beavatkozáshoz kapcsolódó fertőzésre, és annak kivédésére is fel kell készülnünk . Az autograft mennyiségi korlátai szükségessé teszik egyéb csontpótló anyagok fejlesztését. Az igény nagyságát jelzi, hogy 2004-ben 1.5 millió csontpótló beavatkozást végeztek különféle indikációkkal az Egyesült Államokban . Ezek között az indikációk között találjuk a gerincfúziós és csöves csont műtéteket, maxillofaciális rekonstrukciókat, és a trauma vagy ablatív beavatkozás miatti csonthiányokat. A csontpótló anyagok kiválasztásánál fontos figyelembe venni egyrészt, hogy eltérő lehet a defektusok mérete, elhelyezkedése, valamint azt, hogy azonnali teherviselő felületként kell-e megállják a helyüket . Ezek alapján dől el, hogy használható-e természetes anyag, vagy mindenképp szintetikusra lesz-e szükség. Továbbá, a gyorsabb átépülést megcélözva beültethető-e egy mechanikailag kevésbé erős anyag, vagy egy kemény csontpótló gyorsabb klinikai felépülést eredményezne. A klinikai gyógyulás szem előtt tartása miatt fontos a csontpótlók ismerete, melyek kategorikus beosztását Laurencin tette meg . Az alábbi bekezdések a regeneratív medicina és jelen dolgozat szempontjából fontosabb csontpótlókat emelik ki, a teljesség igénye nélkül.

#### **1.2.4.1. Allograftok**

Az allograftok használata az autograftok lehetséges alternatívájaként merül fel. Az allograftokat csontbankok állítják elő, tárolják, és, mint késztermék, forgalmazzák, ami jelentősen megkönnyíti alkalmazásukat és beillesztésüket a sebészeti protokollokba. Használatuk biztonságos, mert a csontbankok elvégzik az allogén szövet tisztítását és sterilizálását is. E folyamatok révén azonban eltávolításra kerülnek az oszteogén sejtek és oszteoinduktív faktorok is, és ezáltal a csontosodás dinamikája elmarad majd az autológ csontétól . Ismert az is, hogy a gamma-sugárzással végzett sterilizálási eljárások módosítják az allograft struktúráját, gyengítve annak mechanikai stabilitását . Az allograftok oszteokonduktivitása azonban megkérdőjelezhetetlen, elérhetőségüket széleskörben elterjedté tették a klinikai gyakorlatban. Eredményesen használhatók nemcsak kis csonthiányok pótlásában, hanem kiterjedt tumor rezekciót követően, vagy protézis támasztékként is .

#### 1.2.4.2. Demineralizált csontmátrix (DBM)

A csontpótlás további alternatívája a demineralizált csontmátrix. A DBM voltaképpen egy allograft-típus. Allogén szövetből készül, tisztítási eljárások során távolítják el róla a sejteket és egyéb immunológiailag aktív anyagokat. Fontos jellemzője, hogy savas hidrolízis következtében a csont szerves állományának nagy része is eltávolításra kerül, a reziduális kalcium tartalom 1-6% között változhat. A késztermékek különböző formában jelennek meg, így létezik por, őrlemény és paszta formájában is, mely a sebészeti megmunkálást könnyebbé teszi. A DBM nagy előnye, hogy a csont eredeti kollagén struktúrája megmarad, valamint, hogy a savas kezelés következtében oszteoinduktív anyagok (BMP) kerülhetnek felszínre, melyek kedvezően befolyásolják a csontosodást. Habár a DBM oszteoinduktivitása nem túl erős, számos klinikai indikációban használják. Kiválóan alkalmas csontciszta, és -üregek kitöltésére, hasonlóképp eredményesen járul hozzá hosszú csöves csont nem gyógyuló törésének konzolidációjához. Használata elterjedt gerincsebészeti arthrodezisek kezelésében is.

#### 1.2.4.3. Biokerámiák

Az autogén-allogén csontpótlók eredetüknél fogva variábilisak, és gyógyászati felhasználásuk is limitációkba ütközhet. Ilyen esetekben hasznosak a biokerámiák, melyek régóta használt csontpótlók. A biokerámiák előnye a szintetikus eredetből fakad, hiszen használatukkor nem kell tartani betegségek átvitelétől, immunológiai kilökődéstől, e mellett korlátlan mennyiségben hozzáférhetőek, valamint minőségi problémák sem léphetnek fel. A biokerámiák közé tartozik például a kalcium-szulfát, kalcium-foszfát, és a hidroxipapatit. A két utóbbi, struktúrában és kémiai összetételben, a szivacsos csonthoz hasonlít, biomimetikusak. A biokerámiák ebből fakadóan oszteokonduktívak, mert az eredeti szövethez való hasonlóság kedvez a progenitor sejtek megtapadásának, és a képződő oszteoid lerakódásnak. A porózus struktúra, illetve a kalcium-szulfát kristályos szerkezete támogatja az érújdonképződést is, ami szintén javítja az oszteokonduktivitást. A kalcium-szulfát és a kalcium-foszfát átmeneti csontpótlóknak tekinthetők, mivel idővel felszívódnak, helyüket újcsont tölti majd ki. A kalcium-foszfátot leggyakrabban  $\beta$  konformációban alkalmazzák ( $\beta$ -TCP), mert ez a szerkezet javítja az oszteointegritást, vagyis a csontpótló könnyebben kapcsolódik a környező csontszövethez. Ezzel a folyamattal párhuzamosan zajlik az anyag felszívódása, ami oldódás és oszteoklaszt funkció révén valósul meg. A hidroxipapatit ezzel

szemben 5 évnél tovább kimutatható a csontban, és feltehetően a csont saját átépülésével együtt alakul át . Ezt, és a kedvező mechanikai tulajdonságait kihasználva, a hidroxipapatitot gyakran használják ciszták, tumoros rezekciók után maradó üregek feltöltésére, esetleg kritikus méretű hiányok kezelésére. A legtöbbször  $\beta$ -TCP-vel együtt alkalmazzák, hogy kihasználják annak kedvező oszteointegratív tulajdonságait, és biztosítsák a hosszabb távon fennmaradó anyag stabil beépülését . A kalcium-szulfát, vagyis gipsz, nem sorolandó a legkorszerűbb csontpótlók közé, de nemrégiben újra keresett lett, mert kiválóan alkalmas gyógyszerek, így antibiotikumok lokális kibocsátására, így például krónikus oszteomyelitisz kezelésére . Az antibiotikum bejuttatása, és a megfelelő lokális koncentráció fenntartása egyébként intenzíven kutatott kérdés. A gipsz esetében a felszívódás dinamikája teszi lehetővé a folyamatos lokális gyógyszer-koncentrációt, de a gipsszel szemben feltehetően nagyobb előnyt fognak élvezni azok a bevonatok, amelyeket jobb csontosodási potenciált mutató csontpótlók felszínén is lehet majd alkalmazni .

#### **1.2.4.4. Egyéb csontpótlók - a polimerek**

A biokerámiák mellett a polimerek is helyet kapnak a csontpótló anyagok között. A gyógyászatban használatos polimerek többnyire poliészterek, mint a poli-laktát, poli-glikolát vagy a poli-kaprolakton, vagy ezek valamely kombinációjából alkotott ko-polimer. Nagy előnyük, hogy rendkívül biokompatibilisek, enzimatikusan gyorsan felszívódnak. Biokompatibilitásuk miatt rögzítő elemeket, lemezeket, csavarokat is gyártanak belőlük. A csontpótlásban, szerkezetük révén, alkalmasak regenerációs folyamatok vezetésére (guided bone formation), valamint kedvező hatással vannak a proliferáció beindítására, és a sejtek differenciációs folyamataira . A polimerek kombinációja valamely biokerámiával kedvező mechanikai tulajdonságú és porozitású, biokompatibilis, oszteokonduktív csontpótlót eredményez. In vitro vizsgálatok szerint az ilyen módon létrehozott kompozitok felületére jól tapadnak az oszteoblasztok, proliferációjuk beindul, majd a differenciációs folyamatok indukciójával megkezdődik az oszteoid lerakódása is . A csontpótlás ezen technikájának kétségtelen előnye a szintetikus eredet, ugyanakkor az anyagok lebontása és eliminációja többlet feladatot ró a gyógyuló szervezetre.

#### **1.2.4.5. Növekedési faktorok**

A polimereknek, kopolimereknek és biokerámiáknak hordozófelületként is jelentős szerep jut. A rekombináns növekedési faktorok fontos részét képezik a regeneratív medicinának, így a csontpótlásnak is, melyek bejuttatására a polimerek és biokerámiák széles választéka áll rendelkezésre .

A csontgyógyulás összetett folyamatát számos hormon, citokin és növekedési faktor szabályozza . Feladatuk a progenitor sejtek migrációjának és differenciációjának elősegítése, a sejtek szaporodásának szabályozása, valamint az extracelluláris mátrix termelésének irányítása . A rekombináns technikák fejlődése lehetővé tette, hogy ezek a molekulák nagyobb mennyiségben legyenek elérhetőek, ezáltal eredményesen vegyenek részt a regeneratív terápiákban.

A növekedési faktorok közül jelentős a VEGF, mely érképző progenitorok bevonásával jelentősen javítja az érújdonképződést, ami a csont esetében kifejezetten előnyös. Ezenkívül tudományos adatok támasztják alá, hogy direkt hatásai is vannak a csontot építő progenitorok aktivációjában, migrációjában és differenciációjában . Szerepe felmerül a többi oszteoinduktív fehérje mediátoraként is . A növekedési faktorok közül számottevő még az IGF, ami mediátorként szabályozza a növekedési faktorok, hormonok és citokinek funkcióját törésgyógyulás alatt . Intenzív kemotaktikus ingert jelent a sejtek migrációjához, és erős befolyással bír azok proliferációjára, valamint részt vesz a csont metabolizmusában is .

A legjelentősebb növekedési faktorok azonban kétségtelenül a TGF- $\beta$  szupercsalád tagjai. Ezek multifunkcionális fehérjék, melyek különböző sejt-, és szövettípusok, mint például csont, porc, szalagok, inak és idegszövet differenciálódását és növekedését szabályozzák. Csontsérülés esetében szerepük van a mezenhimális őssejtek aktivációjában, oszteoblaszt és kondroblaszt irányú differenciációjukban, és az extracelluláris mátrix kialakításában . Az oszteoinduktivitással kapcsolatban Urist 1965-ben tett megfigyelései kulcsfontosságúak voltak. Kísérletei során ektópiás csontképződést ért el demineralizált csontmátrix harántcsíktolt izomzatba ültetésével, ezáltal felvetette az oszteoinduktív molekulák létezését . Ezt követően a TGF- $\beta$ -1 számos állatmodellben bizonyította hatásosságát a csontosodás elősegítésében, mégis a tudományos figyelem mostanában a BMP-kre irányul. A bone morphogenic pretein-ek, az enkondrális csontosodástól a porcképződésig, széleskörű hatásokkal rendelkeznek. A BMP-2, BMP-4 és BMP-7 intenzív csontosodást indító hatásait számos ortopédiai és maxillofaciális területről származó tudományos adat támasztja alá . A BMP-2 meggyőző eredményeket mutat tibia sérülések kezelésében. Egy 122 beteg bevonásával járó vizsgálatban tibia csonthiányokat kezeltek vele, és hasonlították össze az autológ csonttal. A vizsgálatban olyan betegek kerültek bevonásra, akiknek intramedulláris szegelést követően legalább 3 hónapja nem gyógyuló csonthiányuk volt. A BMP-t egy

kollagén hordozó felületén juttatták a csonthiány területére, ami 9 hónap elteltével az esetek 81%-ában gyógyult meg. Az eredmény különösen jó, hiszen megközelíti az autológ csonttal elértet, ami jelen esetben 85%-volt . A BMP-k használata a gerincfúziós indikációkban is felmerül, és intenzíven vizsgált terület. Egy 98 beteg bevonásával járó klinikai tanulmány 88%-os fúziós rátát talált BMP alkalmazását követően, míg a csípőlapátból származó autológ csont csupán 73%-ban egyesítette a csontokat . Érdekes, hogy a technika segítségével a mércének számító autológ csontátültetésnél lényegesen kedvezőbb eredmény mutatkozott. Ez ugyanakkor biztonságossági kérdéseket vet fel. A BMP-k fő mellékhatása az ektópiás, vagy túlzott csontképződés, ami, főleg egy gerincsebészeti indikációban, komoly hosszú távú komplikációkat eredményezhet . Szövődmények rövid távon is felléphetnek, hiszen a BMP proinflammatorikus hatású anyag, ezért lágyszöveti duzzanatot és gyulladást okoz, mely szélsőséges esetben még ronthat is a gyöki tüneteket okozó gerincproblémákon . A nagy dózisú BMP-k használatával kapcsolatban karcinogenezis is felmerül, mely tovább rontja a szer biztonságosságát . Nehéz kérdés azonban a fehérjék koncentrációjának meghatározása, hiszen in vitro vizsgálatok nanogrammos koncentrációban (5-20 ng/ml) hatásosnak bizonyulnak, míg a forgalomba kerülő termékek ennél lényegesen magasabb koncentrációt érnek el (~40mg/ml), feltehetően az intenzív post-operatív proteolízis miatt . Az adekvát dózis a csonthiány méretétől, lokalizációjától, a beteg állapotától és korától függően is rendkívül különböző lehet. Egy szájszészeti indikációban például hatástalannak bizonyult az 50 µg/ml-es koncentráció, ezért ötszörösére emelték a vizsgálati dózist. A BMP-2 a 250 µg-mos koncentrációban viszont olyan durva fogínyduzzanatot okozott, hogy leállították a klinikai vizsgálatot . Ritting 2012-ben egy gyermekgyógyászati kázust mutatott be, mely során gyulladást és csontrezorpciót figyelt meg BMP-2 használatát követően . Ritting rávilágít arra, hogy a BMP nem tisztán oszteoinduktív faktor, fő hatásai közül a kemotaxis és a vaszkuláris invázió következtében monocita infiltrációt is eredményez. A monociták jelenléte miatt pedig a lokális gyulladással citokinek koncentrációja is megemelkedik, ami magyarázhatja a BMP használatával kialakuló mellékhatásokat . További érdekesség, hogy a BMP koncentráció dependens módon az oszteoklasztok funkcióját is erősíti. Toth munkájában bemutatta, hogy nagy dózisú BMP használata fokozza az implantátum körüli csontrezorpciót . Fontos kiemelni, hogy a növekedési faktorok koncentrációját a gyógyszerekhez hasonlóan próbálják meghatározni, feltehetően ezért alakulnak ki egyéb hatások is, amelyek, mivel növekedési faktorokról van szó, nem nevezhetőek valódi mellékhatásoknak. Sokkal inkább egy fiziológiai hatásspektrum generalizált megerősödése jelentkezik, ami feltehetően egyéb szabályzók koncentrációjának azonnali változását is igényelné, és nem csupán egy molekula lokális koncentrációjának drasztikus megemelését. Érthető tehát, hogy a mellékhatások sokasága és a

hiányzó vezérfonalak miatt a BMP-kel kapcsolatban az utóbbi időben csökkenő lelkesedés mutatkozik.

#### **1.2.4.6. Sejtterápiás lehetőségek**

Az intenzív ortopédiai fejlesztések ellenére a törések 5-20%-ában eredménytelen gyógyulás következik be . Az ilyen krónikusan nem gyógyuló csonthibák helyreállításának szempontjából felmerül, hogy érdemes lenne őssejteket juttatni a sérült területre, támogatva ezzel a szervezet saját regeneratív folyamatait. A sejtterápia hasonló mechanizmus révén lehet előnyös kritikus méretű csonthiányok gyógyulásának javításában. Csonthiányok pótlásánál a leggyakoribb sejtbeviteli forma, amikor a sejteket az adott csontpótlóval együtt juttatjuk a csonthiányba. A korábban említett csontpótló anyagokat ezért világszerte széles körben vizsgálják in vitro körülmények között, mely kapcsán fő kérdés, hogy miként viselkednek különböző ős-, és progenitor sejtek az adott anyag környezetében. A kedvező megtapadás, a proliferáció és a differenciáció elősegítése nagyban javítják a csontpótló alkalmazhatóságát, hiszen a kedvező környezetben a sejtek hamarabb lesznek képesek minőségében és mennyiségében megfelelő extracelluláris állományt termelni. Több dologban azonban nincs egyetértés. Nem egyértelmű, hogy elődifferenciált sejteket érdemes használni, vagy elegendő differenciálatlan sejtek beültetése is . Ugyanígy felmerül, hogy érdemes-e a bioanyaggal együtt hosszabb ideig növesztetni a sejteket, ezáltal szorosabb kontroll alatt tartani a rendszert, vagy kedvezőbb, ha a sejteket a bioanyagra történt tapadást követően rögtön beültetjük, hogy a gazdaszervezetben érjenek tovább . Ezek a kérdések a téma iránti nagyfokú érdeklődés bizonyítékai, ugyanakkor a sejtterápia hatásosságában, és a szövetépítés jövőjében nincs véleménykülönbség. Ennek számos tudományos bizonyítéka is van. A sejtátültetéssel erősített csontpótlás számos rágszáló modellben bizonyult hatásosnak mind teherviselő, mind nem teherviselő csontok pótlásának esetében . Eredményesen kezelnek kritikus méretű csonthiányokat még nagyobb testű állatoknál is . Habár számos szabályozási nehézség merül fel a humán felhasználás esetén, ennek ellenére egyre gyakrabban alkalmaznak őssejteket a regeneráció javítására. Nem gyógyuló törések esetében szép eredmények érhetőek el pusztán autológ csontvelő perkután transzplantációjával . Kritikus méretű csonthiányoknál azonban csontpótlók használata is indokolt. Ezekben az esetekben a magasabb sejtszám elérése érdekében a sejtek felszaporítása is fontos, ami jelentősen bonyolítja a beavatkozást. Quarto esettanulmányában három betegnél alkalmazott őssejteket. Vizsgálataiban fiatal betegek vettek részt, 4-7 cm-ig terjedő csonthiánnyal valamely csöves csontjukon. Minden esetben autológ csontvelőből nyertek sejteket, amiket az adott csontnak megfelelő struktúrájú és

porozitású hidroxipapatit felszínen juttattak vissza. Mindhárom esetben a sejtes csontpótlók beépültek, a betegek végtagjai pedig funkcionálisan gyógyultak. Hasonlóan kedvező eredményekről számolt be Marcacci is: az előző technikát alkalmazva 6-7 évig követte négy betegét, mialatt a csontpótlók beépültek, törést és egyéb komplikációt nem tapasztalt, habár a hidroxipapatit csontpótló ennyi idő után is kimutatható volt. A klinikai vizsgálatok összesítésével foglalkozó weblapon végzett keresés alapján jelenleg 9 klinikai vizsgálat foglalkozik az őssejtek potenciális terápiás alkalmazásával csonthiányok kapcsán, de számos egyéb indikációban is megjelennek, mint gerincfúziós beavatkozások, oszteopetrózis, osteogenesis imperfecta, oszteoporózis és femur fej nekrozis esetén. A tudományos adatok sokasága, valamint a klinikai vizsgálatok jelenléte arra utal, hogy a csont defektusok mindennapi terápiája is minden bizonnyal kiegészül majd az őssejtek nyújtotta regeneratív lehetőségekkel.

#### **1.2.5. A mezenhimális őssejtek kiemelt szerepe a támasztó és mozgató szervrendszerben**

Sejterápiák tervezésénél fontos szempont, hogy milyen típusú őssejt válik be leginkább. A támasztó és mozgató szervrendszerben kiemelt helyzete van a mezenhimális őssejteknek, melynek fő oka, hogy a mezenhimális őssejtek képesek mind izom, mind porc, ín, vagy csont irányú differenciációra is. Éppen ezért differenciálatlan formában is alkalmasak lehetnek sejterápiás beavatkozások kivitelezésére, ami azért fontos, mert az ortopédiai beavatkozások során könnyen hozzáférhetővé válik a csontvelő, ami a mezenhimális sejtek gazdag forrását jelenti, és azonnali átültetést tesz lehetővé. Kiterjedtebb szövethiányok esetében pedig az in vitro expanzió, differenciáció és szövetépítés lehetősége jelentheti a jövőbeni terápiás megoldást. A mezenhimális őssejtek azonban parakrin módon, növekedési és jelátviteli faktorok lokális termelésével is hozzájárulnak a szövet gyógyulásához. Az MSC-k képesek többek között TGF- $\beta$ , VEGF és FGF termelésére is, mellyel a lokális regeneratív folyamatok irányítóiként lépnek fel. Nem csoda, hogy a mezenhimális őssejtek hatékonyságának elemzésekor felmerül, hogy éppen a parakrin hatások teszik a leginkább hasznossá ezt a populációt. A sejterápiás eljárásoknak fontos aspektusa az immunológiai hatások vizsgálata is, amennyiben allogén sejtek használatára kerül sor. Az ortotóp szervátültetésnél egész életen át tartó immunszuppresszív kezelés szükséges, azonban ezt a sejterápiás lehetőségeknél érdemes lenne kikerülni. Erre az egyik megoldás természetesen az autogén sejtek nyérése és in vitro expanziója, amire azonban nem minden esetben van elegendő idő. A mezenhimális őssejtek ebből a szempontból is kiemelt helyet foglalnak el a választandó sejt populációk között, hiszen immunmoduláns hatással rendelkeznek, mely révén meggátolják az ellenük

irányuló immunfolyamatok kialakulását, és allogén alkalmazást is lehetővé tehetnek . Érhető, hogy az MSC-k ezen tulajdonsága intenzív vizsgálatok célpontja, hiszen fontos szerepe lehet beültetendő szervekkel, szövetekkel és anyagokkal szembeni immuntolerancia kialakításában, azon kívül, hogy önmagukban is hasznos regeneratív sejtek . A sejterápiás beavatkozások mindennapi elterjedéséig azonban hasznos regeneratív adjuvánsok lehetnek a vérfrakciók, melyek nagy előnye, hogy a páciens saját véréből nyerhetőek, hatékonyságuk pedig a saját növekedési faktorok feldúsulása miatt alakul ki.



### **1.3. Átmenet a sejtes terápiák felé – a vérfrakciók szerepe**

A vér jótékony hatásai nem napjainkban merültek fel először. Jól ismert Báthory Erzsébet és Drakula gróf legendája is. Habár utóbbi rémtörténetek minden tudományos háttér nélkül születtek, mára már nyilvánvaló, hogy a vérben található növekedési faktorok, fehérjék, hírvivő anyagok terápiás céllal is alkalmazhatók. Ennek elterjedése szintén egy jól finanszírozott ágazatban, a szépségiparban kiemelkedő. A bőrfiatalításra vágyók számára manapság széles körben elérhető az úgynevezett "saját vér terápia" . Az eljárás alapja a vérlemezkék magas növekedési faktor tartalma. A beteg saját véréből, centrifugálással nyerhetők a thrombocitában gazdag vérfrakciók, melyek visszajuttatása intra-, és szubkután módon történik. A thrombocitában gazdag vérfrakciók különböző növekedési faktorokat és citokineket tartalmaznak, mint például a thrombocita-eredetű növekedési faktor, a transzformáló növekedési faktor, a  $\beta$ -fibroblaszt növekedési faktor, az inzulin-szerű növekedési faktor-1, vagy a vaszkuláris endotheliális növekedési faktorok, melyek nagymértékben hozzájárulnak a sejtek differenciációjához és proliferációjához . Az exogén módon bejuttatott szintetikus növekedési faktorok esetében a koncentráció meghatározása is kihívást jelent, hiszen ezek a molekulák komplex folyamatokat szabályoznak. A vérfrakciók alkalmazásának előnye e téren is valószínű, hiszen a beteg saját növekedési faktorait fiziológiás arányban alkalmazza, kikerülve a növekedési faktor koktélok nem megfelelően definiált összetételét.

#### **1.3.1. Thrombocitában gazdag plazma (PRP)**

A thrombocitában gazdag vérfrakciók széleskörű tudományos érdeklődést váltottak ki a muszkuloszkeletális rendszer regenerációjával kapcsolatban is. A támasztó és mozgató szervrendszer magas incidenciájú sérüléseinél a szövetek minél tökéletesebb funkcionális gyógyulása a cél, azonban ez a konzervatív kezelésekkel nem mindig válik elérhetővé . A perkután bejuttatott vérfrakciók szemi-invazív technikája a szövetek teljesebb és gyorsabb funkcionális gyógyulásával, valamint a műtét elkerülhetőségével kecsegtet, nem csoda, hogy számlálhatatlan in vitro, állat-, és humán kísérletben vizsgálták a PRP hatásosságát. Sejtkultúrákkal végzett kísérletek alapján bebizonyosodott, hogy PRP alkalmazása sejtenyészítő médiumban javítja a csontvelői és zsíreredetű mezenhimális őssejtek, valamint oszteoblasztok proliferációs képességét, és segíti a mezenhimális őssejtek oszteogén differenciációját . In vivo tanulmányok rávilágítanak a PRP csontosodást befolyásoló szerepére oszteoporotikus és kritikus méretű defektus modellek esetében is. A thrombocitában

gazdag vérfrakciók hasznos adjuvánsai számos oszteokonduktív mátrixnak, hiszen a növekedési faktorok bevitele némileg pótolja a hiányzó oszteoinduktív tulajdonságokat . Még intenzívebb csontregeneráció érhető el, ha utóbbi rendszert exogén őssejtek bejuttatásával kombinálják .

A PRP kedvező hatását ín sérülésekben is kimutatták, ahol pozitív biomechanikai és metabolikus választ, valamint csökkent gyulladási reakciót és vaszkularizációt váltott ki . Szövettanilag a PRP injekciót követően a kollagén fibrillumok kedvező orientációja is megfigyelhető, mely a szövet funkcionális gyógyulására utal. In vitro tanulmányok szerint a PRP kedvezően befolyásolja a tenociták proliferációját és kollagén termelését is .

A növekedési faktorokban gazdag trombocita koncentrátumok ízületi betegségek terén is széles körben vizsgáltak. Wang-Saegusa 808 beteget involváló vizsgálatában oszteoarthritiszes térdeket kezelt háromszori intra-artikuláris PRP injekcióval . A kezeléseket 2 hét alatt hajtotta végre, a térdfunkciót jól definiált specifikus pontozási rendszerek (Western Ontario and McMaster Universities Osteoarthritis Index, Lequesne Index), a fájdalmat vizuális analóg skála (VAS), a betegek általános állapotát SP-36 (The Short Form Health Survey) kérdőívvel értékelte. Vizsgálatában kedvező funkcionális eredményeket és életminőség javulást ért el, mialatt nem tapasztalt mellékhatást a PRP adásával kapcsolatban. Kon hasonló, előzetes, 115 beteget érintő tanulmánya szintén fájdalom csökkenésről, stabilabb térdfunkcióról és javuló életminőségről számol be. Kiemeli, hogy a kezelés a betegség kezdeti szakaszán tűnik hatásosnak igazán (Kellgren 0-III) . Ezt erősít meg Chang összefoglaló közleménye, ugyanakkor több szinten felhívja a figyelmet arra, hogy a terápia nem megfelelően standardizált. Eredményei szerint a hatásosság kimenetele kérdéses, ha kettőnél kevesebb injekció történik, ha csupán egy centrifugálási lépést alkalmaznak az izolálás során, vagy ha mellőzik a hozzáadott trombocita aktivátorokat . Hasonlóan kritikus hangvételű Dold nemrégiben megjelent összefoglaló közleménye is, mely rámutat, hogy a klinikai vizsgálatok ezen a téren továbbra is szűkösek, nem megfelelően dokumentáltak, és elfogultak .

A vérfrakciók használata ezzel együtt messze nem zsákutca. Számos kutatócsoport foglalkozik egyéb izolátumokkal is, bízván a letisztult előállítási protokollok és a klinikai indikációk összhangjában.

### **1.3.2. Autológ kondicionált szérum (ACS)**

Az autológ kondicionált szérum (ACS) szintén vér eredetű terápiás lehetőséget kínál oszteoarthritiszben szenvedőknek. Elméleti alapját az képezi, hogy az IL-1 szerepet játszik az

oszteoarthritis patomechanizmusában és a porckorongok degenerációjában. Az ACS terápiás hatását a monociták által egyébként is termelt IL-1 receptor antagonist (IL-1Ra) hatásainak tulajdonítják. A kondicionálás során a monociták IL-1Ra termelése fokozódik, majd egy szeparációs eljárással ezt feldúsítják az oldatban, ami ebben a formában injektálható. Az eljárás eredményeképpen az IL-1Ra koncentrációja 140-szeresére növekszik, szignifikáns gyulladáscsökkentő, fájdalomcsillapító, és porcvédő funkciót eredményezve. Az ACS eredményesnek bizonyul térd, csípő és temporomandibuláris oszteoartrózis kezelésében. Az ACS terápia sikerességét feltehetően az okozza, hogy az adott klinikai problémára konkrét hatásmechanizmussal képes terápiás opciót kínálni. Nem véletlen, hogy Kobe Bryant, az utóbbi évek kiemelkedő amerikai kosárlabdázója is, térdpanaszainak csökkentésére, ezt a terápiás módszert választotta.

A vérfrakciók tehát fontos szerepet játszanak a regenerációs medicina minden területén, ugyanakkor több tanulmányt összefoglaló analízisek egyelőre nem tartják elegendőnek a tudományos adatokat. Még a legtöbbet vizsgált PRP-vel kapcsolatban is jellemző, hogy a különböző módon előállított frakciók nem teszik lehetővé a biztonságos összehasonlítást, ezért szükséges lenne az izolálási és aktivációs protokollok standardizációja. Ebből fakadhat a vérfrakciókkal végzett kísérletek esetlegessége, ugyanakkor nem szabad elfelejteni, hogy a számos hatóanyag között biztosan léteznek olyanok is, amelyek gátló, esetleg káros hatással vannak a regenerációs folyamatokra. A potenciális gátló faktorok ismerete is feltétlenül szükséges, ugyanakkor a kutatások fókuszában ez idáig a hatásosság alátámasztása állt. Kutatócsoportunk is a vérfrakciók kedvező hatásai miatt indult el ezen az úton. Feltételezésünk szerint előnyös lehet, ha a trombocitában gazdag plazmánál kevésbé heterogén, könnyebben analizálható, egyszerűbb vérfrakciót használnak. Tekintettel arra, hogy a vérkészítmények legnagyobb arányban előforduló fehérjéje az albumin, érdekesnek tartottuk vizsgálatát biotechnológiai szempontból. Habár az általunk alkalmazott albumin tisztított oldat, mégis fontos, hogy előállításához vérellátók humán plazmát használnak, és így minden bizonnyal számtalan ismert és nem ismert aktív molekulát tartalmaz a molekula transzport funkciójából kifolyólag. Kérdéses az is, hogy az albuminnak önmagában van-e aktív befolyása a regeneratív folyamatokra. Ennek vizsgálatához kívánnak a következő fejezetek, valamint a dolgozat többi részében taglalt tudományos eredmények hozzájárulni.

## **1.4. Az albumin biotechnológiai felhasználási területei**

### **1.4.1. Albumin a sejt kultúra gyakorlatban**

A sejt kultúrák használata az 50-es évektől kezdve bevett modellje különböző sejt funkció vizsgálatoknak. A gyakorlati alkalmazás során a fiziológiai kondíciók megteremtése rendkívül fontos szempont, így az ozmolaritás, pH, légzési gázok ideális koncentrációja elengedhetetlen. Szintén fontos a sejtek megfelelő tápanyaghoz juttatása, melyet a sejtenyésző oldatok alkalmazásával lehet biztosítani. A szintetikus tenyésztő oldatok használata mellett régóta ismert tény, hogy biológiai oldatok hozzáadásával javítható a sejtek túlélése és proliferációs kapacitása. Ilyen kiegészítő oldatok többnyire állati szérumból nyerhetők, általánosan elterjedt a borjúsavó különböző formáinak használata (Fetal bovine serum, FBS, Bovine serum albumin, BSA). Ezek az oldatok számos komplex biológiailag aktív molekulát, növekedési faktort, hormont, nyomelemet, kis molekulású tápanyagot juttatnak a sejtenyésző oldatba, ezáltal javítva a sejt kultúra hatékonyságát. Habár a szérumból kivontak összetétele évek óta tanulmányozott terület, az ideális összetétel a donorok variabilitása miatt pontosan nem meghatározható. Tény azonban, hogy az albumin a legnagyobb koncentrációban jelen levő fehérje (~23 mg/ml), számos fontos funkcióval, melyek közül sejtenyészési szempontból a proliferáció serkentése kiemelendő. Az albumin számtalan specifikus és aspecifikus kötőhellyel rendelkezik, melyek elősegítik a kultúra kedvező fenntarthatóságát. Tápanyagok, növekedési faktorok és hormonok megkötésével stabilizálja azokat és pufferként működik. Hasznos funkciója a toxinok és szabad gyökök megkötése is, miáltal a sejtek túlélését is segíti. A regenerációs medicina térnyerésével ugyanakkor egyre fontosabbá válik, hogy a lehető legkevesebb állati eredetű anyag kerüljön kapcsolatba a humán kultúrákkal, ezért a laboratóriumi technikák inkább a humán eredetű oldatok (human serum albumin, HSA), rekombináns formák (rekombináns humán albumin, rHA), valamint a szérumból mentes tenyésztési eljárások irányába mozdultak el. A tisztított formában alkalmazott albumin jótékony hatásai ilyen formában is érvényesülnek, továbbra is kérdéses azonban, hogy csupán az ismert funkciók felelősek-e az albumin egyértelmű proliferatív hatásaiért, vagy a molekula aktívan is részt vállal a kedvező hatások kifejtésében.

### **1.4.2. Az albumin baktérium megtapadást gátló hatásai**

Az albumin baktérium ellenes tulajdonságaira számos tudományos közlemény mutat rá. A legtöbb közlemény arról számol be, hogy az albuminnal bevont biokompatibilis anyagok

felületére kevésbé tapadnak a baktériumok, illetve biofilm kialakulása is jelentősen csökken. Némely közlemény szerint az albuminnal bevont felület növeli az egyébként negatív felületi feszültséget, és az anyag hidrofilitását is, emiatt válik kedvezőtlené a baktériumok számára. Hermann vizsgálatai arra mutattak rá, hogy míg számos fehérje, mint a laminin, fibronectin vagy fibrinogén fokozza a *S. aureus* és más koaguláz negatív törzs megtelepedését PMMA (poli-metil-metakrilát) felületén, addig az albuminnal bevont felület szinte teljesen gátat szab a folyamatnak. Hasonlóképpen, a humán albumin csökkentette a bakteriális kolonizációt PE (poli-etilén) intravaszkuláris katéterek felületén is. Kinnari és munkatársai szintén albumint használtak timpanoplasztikai csövek bevonataként, ezzel csökkentve a járat korai befertőződését és elzáródását. A munkacsoport vizsgálatai szerint az albuminnal bevont felület csökkentette a fibronectin megtapadását, ezáltal csökkentette a reaktív granulációs szövet kialakulását, következésképpen a cső elzáródását is. A timpanoplasztikai csövek egyik anyaga a titán lehet. A munkacsoport vizsgálatai kimutatták, hogy amennyiben albumin bevonat kerül a titán felületre, csökken a *S. aureus* és *P. aeruginosa* kitapadásának aránya is. Több ehhez hasonló közlemény létezik, melyben keresztkötött albumint használtak titán felületeken, a célból, hogy csökkentsék a bakteriális kontaminációt. Az egyik ilyen munkacsoport állatkísérletben is próbára tette ezt a hatást. Bakteriális kolonizációnak kitett titán implantátumokat ültettek nyulak combcsontjába, és tályog kialakulását vizsgálták. A kísérlet eredménye szerint, amennyiben a titán implantátumok albumin bevonattal rendelkeztek, a tályog kialakulás csupán 27% volt, míg bevonat nélkül 62%-ban jelentkeztek tünetek. Az albumin bevonat alkalmazása ugyancsak mérlegelendő húgyúti katéterek és kohleáris implantátumok esetében is. Naves, del Prado és Ruiz nemrégiben megjelent munkái szerint az albumin bevonat jelentősen csökkenti a biofilm kialakulását poli-sztirén felületen *E. coli* és *S. pneumoniae* esetében. A fenti vizsgálatok szerint az albumin bevonat számos anyag felületén csökkenti a bakteriális jelenlétet. Mivel ezek az anyagok ortopédiai, szájsebészeti implantátumok, húgyúti katéterek, timpanoplasztikai csövek, valamint kohleáris implantátumok alapanyagai, a bakteriális fertőzések okozta szövődmények elkerülése végett hasznos lehet ezeket albumin bevonattal használni.

#### **1.4.3. Az albumin segíti az eukarióta sejtek megtapadását**

Az albumin előző fejezetben ismertetett anti-bakteriális hatásának hátterében a baktériumok csökkent kitapadási képessége állt. Ezzel szemben számos tudományos közlemény bizonyítja, hogy az albumin a sejtek megtapadását fokozhatja is. Fontos különbség azonban, hogy utóbbi jelenséget eukarióta sejtek viselkedésénél írták le. Ebben az esetben is számtalan, különféle

biokompatibilis anyag vizsgálatára került sor, melyek által főleg a csontosodás javítását tűzték ki célul. Bernards, kísérleteiben, a csontmátrix fő elemét, a hidroxipapatitot (HAP) vizsgálta *in vitro* körülmények között. A hidroxipapatitot a klinikai orvoslás jelenleg is fontos csontpótlóként tartja számon, azonban számtalan kérdés merül fel az átépülésével kapcsolatban. Bernards csont eredetű fehérjéket, szialoproteint és oszteopontint kötött a HAP felületére, azt remélve, hogy a fehérjék javítják az oszteoblasztok kitapadását. Annak érdekében, hogy csupán a sejtkitapadást vizsgálhassa, a kezelt anyagokat borjú szérum albuminnal (BSA) kezelte, így gátolva a nem specifikus sejtkitapadást. Kontrollként természetesen BSA-t is kötött a HAP felületre, melynél szintén alkalmazta a nem specifikus kötődés gátlását. A vizsgálata meglepő eredményt hozott, miszerint a HAP-hoz kötött borjú szérum javította leginkább az oszteoblasztok kitapadását és szaporodását. Ezt követően a nem specifikus blokkolás nélkül is elvégezte a kísérletet, melynek eredménye még inkább igazolta a borjú szérum sejtkitapadást és proliferációt segítő tulajdonságait. Kísérleteiben kimutatta azt is, hogy az albumin ezen hatása koncentráció függő, hiszen 250 µg/ml koncentrációjú albumin oldatra volt szükség, hogy jelentős kitapadást észlelhessen. Ez tisztázza azt az ellentétet, melyet a Webster korábbi publikációja jelentett, ugyanis utóbbi szerző szerint az albumin nem javítja az oszteoblaszt kitapadást. Ebben a vizsgálatban azonban 5 µg/ml albumin oldatot használtak, ami messze elmarad Bernards által szignifikánsnak ítélt koncentrációtól. Bernards feltételezései szerint két magyarázat lehet a jelenség hátterében. Az egyik, hogy az albumin oldat előállításánál fogva nem tisztán a fehérjét tartalmazza, és a járulékos "szennyeződések" felelősek a jobb sejtfunkcióért. Ezt az elméletet azonban elveti, mivel több kereskedelmi forgalomban elérhető albumint is kipróbált, hasonló eredménnyel. A másik elmélete szerint az albumin felelős a sejtek megnövekedett kitapadásáért és proliferációjáért. Utóbbit tartja valószínűnek, ugyanakkor meglepőnek is, hiszen az albumin molekulának nincs ismert sejt kitapadást segítő RGD szekvenciája. Vizsgálata konklúziójaként felveti, hogy az albumint a fent említett hatásai miatt a csontpótló szerek adalékaként lenne érdemes használni. Bernards vizsgálataihoz hasonló eredményt talált munkacsoportunk is liofilizált allograft vizsgálatok során. Weszl mezenhimális őssejtek kitapadását vizsgálta különböző csontpótló anyagok felületén 3 és 18 napos intervallumban. *In vitro* kísérleteiben fibronektint, I. típusú kollagént és humán szérum albumint használt, és vizsgálta a mezenhimális őssejtek kitapadását. Az albumin kedvező hatásai már 3 nap elteltével is megmutatkoztak a sejtszámban, de csak abban az esetben, ha a fehérje fagyasztva-szárítással került az allograft felületére. Fontos, hogy a liofilizálással jelentősen nagyobb mennyiségű fehérje kerül az allograftokra, ami alátámasztja Bernards koncentráció függő teóriáját is. Weszl 18 napos vizsgálatai még jelentősebb különbséget hoztak az

albuminnal bevont allograftok javára . Ez utóbbi rávilágít arra, hogy a fehérje nem csupán a kitapadást, hanem a proliferációt is segíti, mely komoly előnyt jelenthet a főként kitapadást segítő fehérjékkel szemben. Weszl in vivo kísérleteket is végzett. Patkány femuron létrehozott jelentős méretű csonthiányok pótlására használta a serum albuminnal bevont allograftot. Ebben a kísérletben azt találta, hogy az albuminnal bevont csontgraft képes beépülni és összeköttetéseket kialakítani a törvégek között . Ugyanebben a modellben az albumin nélküli graftok leginkább szekvesztrálódtak, vagy felszívódtak. A kísérlet fontosságát jelzi, hogy az allograft típusú csontpótlók a szigorú tisztítási és demineralizációs eljárás során számos oszteogén és oszteoinduktív anyagot elvesztenek, emiatt lassulhat az átépülésük, valamint alkalmatlanná válhatnak nagyméretű csonthiányok kezelésére. Az albumin bevonat a hiányzó faktorok pótlására tesz kísérletet, hiszen in vivo körülmények között javuló csontgyógyulást eredményezett.

Az albumin sejtkitapadást segítő hatásait vizsgálta Liu is . Kísérleteiben borjú szérum albuminnal kezelt titán nanocsöveket használt és humán gingivális fibroblasztok kitapadását, terjeszkedését és szaporodását vizsgálta. Vizsgálatai szerint az albumin bevonat jelentősen emeli a felületi egyenetlenségeket, ami kedvezőbb környezetet biztosít a sejtek kitapadásához az inert titán felülethez képest . Megvizsgálta azt is, hogy az albumin bevonat megemeli az egyébként negatív felületi feszültséget és növeli a hidrofilitást, ami javítja a makromolekulák megtapadását, így kedvező környezetet biztosít a fibroblasztok megtapadásához. Érdekes módon, ugyanez a mechanizmus felelős azért, hogy az albuminnal bevont anyagok csökkentik a baktériumok kitapadását. Liu szerint a szájüregi implantátumoknál roppant fontos, hogy a szervezet sejtei képesek-e rövid időn belül kitapadni a beültetett anyaghoz, mivel ellenkező esetben a bakteriális kolonizáció következtében lazává válhat a beültetett anyag. Liu arra a következtetésre jutott, hogy mivel az albumin javítja a gingivális fibroblasztok kitapadását, és csökkenti a baktériumok kolonizációját jelentősen segítheti a titán implantátumok szövődéymenyes használatát a szájüregi csontsebészeti beavatkozások során .

#### **1.4.4. Az albumin, mint alapanyag vázanyagok előállításában**

Az albumin molekula használata biokompatibilitásának köszönhetően, vázanyagok (szkaffoldok) alapanyagaként is felmerül. Ennek egyik módszere az albumin molekula fibrilláris formában történő felépítése elektroszpinning technikával. Tekintettel arra, hogy a molekula természetes formájában globuláris fehérje, a módszer kivitelezéséhez szükségesek olyan anyagok melyek a rostos forma kialakulását segítik, mint például a poli-etilén-oxid vagy a merkaptó-ethanol . Az elektroszpinning segítségével az adott igénynek megfelelő

formában hozhatók létre a vázanyagok, így hálós vagy akár vaszkuláris formára emlékeztető tubuláris jelleg is kialakítható. Habár az albumin molekula természetes formájának biokompatibilitása megkérdőjelezhetetlen, mégis az így létrehozott anyagoknál fontos aspektus, hogy változik-e ez a tulajdonság. Ennek része a lebonthatóság kérdése, ezért ezeket részletesen vizsgálták az ezzel foglalkozó csoportok. Nseir arra a következtetésre jutott, hogy albumin-szcaffold csupán enyhe gyulladási reakciót okoz, könnyen lebomlik, és különböző sejtek megtapadását teszi lehetővé. Ez egybehangzik Noszczyk eredményeivel, aki enyhe gyulladási reakciót véleményezett in vivo alkalmazást követően, illetve az általuk előállított hálós struktúra 6 nap alatt könnyen felszívódik. In vitro vizsgálatai pedig az albumin antiadhezív tulajdonságaira hívják fel a figyelmet. Ez utóbbi eredmény valamelyest ellentmond az előző fejezetben, illetve Nseir által taglaltaknak, miszerint az albuminos felület kedvező környezetet biztosít eukarióta sejtek megtapadásához, ugyanakkor felhívja a figyelmet arra az ismert tényre, hogy a vázanyagok struktúrája jelentősen befolyásolja a sejtkitapadás folyamatát. Noszczyk fel is veti utóbbi eredmény klinikai hasznosságát például epidermolysis bullosa betegségben, ahol már enyhe sérülések következtében is komoly összenövések és kontraktúrák alakulnak ki. Az összenövések hasi műtétek, például sérvhálók beültetésénél is okozhatnak problémát, így egy antiadhezív struktúra használata ilyen problémák kiküszöbölésére is alkalmas lehet.

Az albumin molekula keresztkött formában is alkalmazható vázszerkezetek kialakítására. Polimerizációs segédanyagként Li transzglutaminázt, Gallego pedig glutáraldehidet használt. Li in vitro vizsgálatai szerint az így létrehozott struktúra a kollagén alapú vázszerkezetekhez hasonlítható mechanikai és fizikai tulajdonságaiban, valamint 28 napon keresztül nem bomlik le. Oszteogén sejtenyésztő tápoldatot használva pedig a sejtek proliferációs hajlandósága sem marad el a kollagén alapú vázszerkezeteknél látottaktól. Gallego vizsgálataiban nem tapasztalt gyulladási reakciót az albuminos vázanyaggal szemben, ami megerősíti az így kialakított struktúra biokompatibilitását.

Az albumin az előbb említett módosításokon kívül csontpótló kerámiák alkotórészeként is szóba jön. Az elsődleges szempont ezekben az esetekben a kerámia strukturális módosítása, vagyis a fehérje inkorporáció segítségével irányíthatóbbá válik a vázanyag számos tulajdonsága, mint például a mikrostruktúra, porozitás, felszívódás, vagy mechanikai szilárdság. Az így kialakított vázszerkezetek aktív molekulák, hatóanyagok kontrollált bejuttatására is alkalmassá válnak. Mueller kísérleteiben hidroxipapatitot kevert albuminnal vagy lizozimmal, és az így kapott anyagot az emberi szivacsos csont tulajdonságaihoz hasonlította, mellyel a kerámia összemérhető eredményeket produkált. Az albuminos kerámia 8 hét elteltével 65 %-os felszívódást mutatott, mely különösen fontos a csont teljes átépülése



szempontjából, hiszen ez idő alatt a szöveti remodelláció is intenzíven zajlik. Hess hasonló céllal alkalmazott BSA-t és fibrinogént hidroxipapatit csontpótló kialakításához, valamint vizsgálta az oszteomielitisz terápiájában használatos vancomycin és gentamycin kioldódási dinamikáját. Kísérleteiben 18 napon keresztül mutatott ki kedvező kioldódási paramétereket, alátámasztva a más szerzők által is optimálisnak tartott lokális antibiotikum terápia technikai megvalósításának lehetőségét. A lokális antibiotikum terápia kézenfekvő alkalmazása mellett egyéb hatóanyagok bevitele is megoldható, tekintettel a nem specifikus kötődési és kioldódási folyamatokra. Az említett szerzők tehát elsődlegesen a struktúra kialakítására, valamint a kedvező kioldódási paraméterek miatt gyógyszer bevitelre használtak albumint. Ezzel együtt ismét felmerül, hogy a lokálisan bejuttatott albumin önmagában is hasznos segítője lehet a regenerációs folyamatoknak.

#### **1.4.5. Az albumin, mint aktív molekula csontregenerációs folyamatokban**

Az előző fejezetekben tárgyaltak szerint az albumin biotechnológiai felhasználásban szóba jöhet mint bakteriosztatikus molekula, sejtadhezív bevonó, vagy kedvező biokompatibilitása miatt, mint szkaffold alapanyag. Csont regenerációt vizsgálva azonban található olyan publikációk is, amelyek felvetik az albumin aktív részvételét a gyógyulásban. Fontosak ebben azok az *in vitro* vizsgálatok, amelyek progenitor sejtek megtapadását vizsgálják. Feltételezhetően az albumin *in vivo* környezetben is hasonlóan viselkedik, miáltal a lokális progenitor sejtek számát jelentősen fokozhatja, ezáltal gyorsítva a szöveti regenerációt. Gallego tovább gondolja ezt, és úgy vélekedik, hogy ha már jelen vannak a sejtek, az albuminos felület kedvező környezetet biztosít és támogatja az oszteoblaszt funkciót is. Fontos eredmény az is, hogy alveoláris oszteoblasztok segítségével ektópiás csontosodást figyelt meg *in vivo* alkalmazást követően. Tekintettel arra, hogy Gallego a sejtmentes albumin-szkaffoldot önállóan nem vizsgálta, joggal feltételezheti az olvasó, hogy az ektópiás csontképződés a differenciáltabb alveoláris oszteoblasztok jelenléte miatt alakult ki. Következtetésként azonban talán levonható, hogy az albuminos szkaffold nem gátolta a mineralizációs folyamatokat. Ezt közvetlenül is alátámasztja Gallego másik publikációja, mely szerint az exogén sejtekkel támogatott szkaffold kritikus méretű csonthiányban teljes regenerációt segített elő 8 hét alatt. Mueller az albumint a hidroxipapatit kerámia strukturális változtatására használta, azonban az albuminnal dúsított anyag fokozott csontosodást produkált a lizozimmel kezelt szkaffoldhoz képest. Habár ez csupán melléklet, mégis felveti annak lehetőségét, hogy az albumin aktív részese a csontregenerációs folyamatoknak. Ezek az eredmények szorosan kapcsolódnak Klára munkájához is, aki humán vizsgálataiban

SPECT felvételek segítségével intenzív oszteoblaszt funkciót mutatott ki 12 hónappal revíziós arthroplastikát követően, amelyre feltételezhetően kedvezően hatott az albumin progenitor rekrutáló hatása is . A vizsgálatban szereplő egyik beteg később traumát szenvedett, mely során eltört az operált lábszára, valamint a protézis szára is. Ez a tény közvetve utal a regeneráció sikerére, hiszen a locus minoris resistencieae nem az albuminos allografttal pótoltszakaszon jelentkezett, hanem a térdízülettől distalisan, ép csontterületen. Mivel a trauma miatt operáció vált szükségessé, lehetőség nyílt a korábban pótoltszakaszon mintát venni, mely újjáépülő csontállományról tanúskodott . Ez a klinikai vizsgálat bizonyította, hogy az albuminnal bevont nagy, strukturált allograftok nemcsak biztonságosan használhatóak, hanem feltételezhetően előnyös csontreparatív funkciók támogatásával intenzív csontképződést tesznek lehetővé. Annak ellenére, hogy több tudományos közlemény felveti, hogy az albumin aktív részese a csontregenerációnak, a hatásmechanizmus nem ismert pontosan. Yamaguchi és munkatársai egy érdekes kísérletsorozatban keresik a választ a csontregeneráció és az albumin kapcsolatára. Elsőnek kimutatták, hogy csonttörést követően megemelkedik a lokális albumin koncentráció . Majd megvizsgálták az albumin hatásait sejtenyészítő oldat adalékként csont explantátumokon és arra a megállapításra jutottak, hogy az albumin fokozza a csont explantátumok DNS és kalcium tartalmát . Monolayer kultúrák vizsgálatával kimutatták azt is, hogy mind a mezenhimális őssejtek, mind az oszteoblasztok képesek albumint szintetizálni, míg korábban ezt csak a hepatociták jellemzőjének tartották . Ismert, hogy az oszteoblasztok PTH és IGF-1 receptorokkal rendelkeznek, melyek fontos faktorai az oszteoblaszt funkciónak. Yamaguchi kísérletei szerint, az oszteoblasztok albumin termelése fokozható PTH és IGF-1 hozzáadásával, ami ismét az albumin és az oszteoblaszt funkció kapcsolatára enged következtetni . További kísérleteik bizonyították, hogy albumin hatására fokozódik az oszteoblasztok proliferációja, ami magyarázat lehet a csontexplantátumok növekvő DNS tartalmára is . Érdekes, hogy az albumin sejtenyészítő oldathoz adása csökkentette az oszteoblasztok ALP aktivitását, mely feltételezhetően a Runx2 út gátlása következtében valósul meg . A Runx2 útvonal gátlása csökkenti az oszteoblasztok differenciációját, miáltal indirekt módon a proliferáció kerül előtérbe. A munkacsoport megállapította azt is, hogy az albumin hatásai megszüntethetők MAP-kináz inhibitorokkal, vagy ha gátoljuk a sejtek transzkripció és transzláció tevékenységét . Munkájukban arra a konklúzióra jutottak, hogy az albumin extracelluláris hírvivő molekulaként viselkedik, azonban konkrét receptort, vagy hatásmechanizmust ez idáig nem sikerült felelőssé tenni. Specifikus albumin receptor létezését már 1981-ben felvetette Weisiger, de ezt egy időre el is vetették . Fanali szerint az albumin receptor létének valószínűségét erősíti, hogy az albumin jellegű AFP molekula rendelkezik saját receptorral , valamint, hogy az albumin a receptor-

mediált endocitózist beindítva juttatja ligandjait az intracelluláris térbe . Összességében érdekes, hogy a csontregenerációban megemelkedik a lokális albumin koncentráció, ami az oszteoblasztok szaporodását elősegítve pozitív feedback jelleggel további albumin termeléshez vezet. Ezek alapján egyre erősebben feltételezhető, hogy terápiásan albumint juttatva a regenerálódó csontszövethez, fokozhatjuk az endogén sejtek aktivációját, proliferációját. Az albumin hatás lecsengése után pedig a differenciációs folyamatok veszik át a vezető szerepet, azonban - a rekrutáló hatás miatt - jelentősen magasabb sejtszám áll rendelkezésre ehhez, ezáltal gyorsabb szöveti regeneráció érhető el.

## 2. Célkitűzések

Az előző fejezetek rávilágítottak, hogy az albumin molekula számos ismert, kedvező tulajdonsága mellett a biotechnológiában és regeneratív medicinában is szerephez juthat. A molekula őssejtek proliferációját és kitapadását elősegítő tulajdonsága rendkívül hasznos, amit in vitro szövetépítési stratégiák, vagy sejtranszplantációs technikák kialakítására használhatunk fel. Ezenkívül az albuminnak csontregenerációt elősegítő, aktív szerepe is felmerül, azonban ennek terápiás alkalmazhatóságát ezidáig csak kutatócsoportunk vizsgálta. Munkám során a következő kérdésekre kerestem a választ:

1. Képes-e a szérum albumin fokozni a mezenhimális őssejtek kitapadását olyan különböző, eddig még nem vizsgált anyagok felületén, mint a demineralizált csontmátrix, illetve a poliglikolsav alapú felszívódó varróanyagok?
2. Alkalmas-e az őssejtekkel bevont albuminos varróanyag arra, hogy átmeneti hordozóként sejteket juttasson a sérült szövetekbe?
3. Javítja-e a szérum albumin bevonatú demineralizált csontmátrix kritikus méretű csontdefektusok gyógyulását, az újcsontképződés és a mechanikai funkció terén?

### **3. Módszerek**

#### **3.1. A kísérletek során alkalmazott állatok**

A kísérletek során 250-300 gramm tömegű hím Wistar patkányokat használtunk. Az állatok a Semmelweis Egyetem Elméleti Orvostudományi Tömb állatházában tartózkodtak, ahol 12 órás nap/éj váltakozást biztosító rendszer, ad libitum tápanyag és víz állt a rendelkezésükre. A kísérletekhez szükséges engedélyek beszerzése is megtörtént (Dátum:2009.10.07., Regisztrációs szám: 22.1/2960/003/2009.).

#### **3.2. Csontvelő eredetű mezenhimális sejtek gyűjtése, sejtenyésztetek kezelése**

A patkányok feláldozása uretánnal (5mg/ml, 1ml/ állat, i.p.) vagy nagy koncentrációjú szén-dioxid gáz beléjeztetésével történt. Ezt követően eltávolítottuk mindkét femurt és tibiát, és a csontok fiziológiás sóoldatba kerültek a szállítás idejére. Rövid fertőtlenítést követően (ethanol 70%) a csontok steril elszívó fülkébe kerültek. A lágyszövetek eltávolítását követően, a csontok mindkét végét megnyitottuk. A csontvelő lassú mosás segítségével jutott egy 15 ml térfogatú centrifuga-csőbe. Centrifugálást követően (8 perc, 274 g) a csontvelő sejtenyésztő oldattal (DMEM, 1g/L glutamin, 1 g/L glükóz, 10 % FBS, 100 U/mL penicillin, 100 µg/mL streptomycin) Petri csészékbe és inkubátorba került, ahol 37°C és 5% szén-dioxid koncentráció biztosította a kultúra fejlődését. Két nap elteltével pufferoldatos (Dulbecco's phosphate-buffered saline) mosási lépés, és a tápoldat cseréje történ. A Petri csésze aljára tapadt mezenhimális sejtkultúra fenntartását kétnaponta adott friss tenyésztőoldattal biztosítottuk.

Humán csontvelő eredetű sejtek tenyésztéséhez a csontvelőt a Semmelweis Egyetem Ortopédiai Klinikáról kaptuk. A csontvelőhöz olyan műtétéknél juthattunk, ahol a technika egyébként is megkövetelte a velőúr megnyitását. Az érintett betegeket a beavatkozás előtt tájékoztattuk és beleegyezés esetén végeztük el a mintavételt. A csontvelőt összejtmediummal hígítottuk, majd Petri csészékbe osztottuk szét és tovább tenyésztettük az előbb részletezett módon.

### **3.3. Statisztikai módszerek**

A kísérletek során mért és számolt értékek átlag  $\pm$  standard hibaként (means  $\pm$  SEM) kerültek megjelenítésre. A statisztikai vizsgálatokhoz Graphpad Prism programot használtunk, amivel t-test-et, egyutas és kétutas ANOVA vizsgálatokat, valamint Bonferroni és Dunett post hoc tesztekét hajtottunk végre. A szignifikancia szinteket  $p < 0.05$ ,  $p < 0.01$ , és  $p < 0.001$  értékeken határoztuk meg.

### **3.4. Mezenhimális őssejtek kitapadása sebészeti varróanyagok felületére**

#### **3.4.1. In vitro kitapadás vizsgálata**

In vitro vizsgálatainkhoz 5-0 méretű felszívódó sodrott fonalakat használtunk (Vycril, Ethicon). A fonalakat szérum albuminnal (Biotest Hungary Kft.), fibronektinnel (Sigma #F0895) és poli-L-lizinnel (Sigma #P4832) vontuk be fagyasztva-szárítás technikával, a következőképpen: a fonalakat gyári oldatokba helyeztük, majd fél órán keresztül szobahőmérsékleten tartottuk, ezt követően 6 órán keresztül  $-80^{\circ}\text{C}$ -on fagyasztottuk. A mintákat ezután egy éjszakán keresztül fagyasztva szárítottuk. A bevont fonalaktól és bevonat nélküli mintákból 2 cm-es darabokat készítettünk, amit 24 lyukú kitapadásmentes tenyésztőedényekbe (Costar, ultra-low attachment plate) helyeztünk. A patkány és humán mezenhimális őssejtkultúrákhoz  $1\mu\text{g/ml}$  Hoechst 33342 (excitáció 350 nm, emisszió 461 nm) sejtmagfestéket adtunk, és 30 percig inkubáltuk. Ezt követően minden fonálra 100000 darab sejtet tettünk, a sejtszuszpenzió térfogata 1ml volt. Ezt követően a mintákat inkubátorba helyeztük, ahol  $37^{\circ}\text{C}$  és 5% szén-dioxid koncentráció volt. 24 és 48 óra elteltével fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk a fonalakat (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany). 48 óra elteltével lecseréltük a tápoldatot, majd tovább inkubáltuk a mintákat, összesen 168 órán keresztül. Mindegyik vizsgálati időpontban az összes mintáról 7 random kiválasztott felvételsorozat készült. A képanalízishez egy korábban leírt módszert követtünk : a felvételsorozatokról készített háromdimenziós képben a sejtmagok térfogat frakcióját mértük, majd ebből következtettünk a kitapadt sejtek számára (Image J, National Institutes of Health, USA).

#### **3.4.2. Sejttranszplantációra előkészített fonalak változásai**

A fonalak a sejtes bevonat létrehozása közben különböző hatásoknak lettek kitéve. Sebészeti szempontból fontos, hogy a fonalak gyári minősége ne szenvedjen csorbát, ezért megvizsgáltuk, hogy változik-e a fonalak felszívódása in vivo körülmények között, valamint megváltozik-e a szakítószilárdságuk az előkészítést követően.

#### **3.4.2.1. Felszívódás változása - in vivo**

A felszívódás vizsgálathoz hím Wistar patkányokat használtunk. Ketamin-xylazin altatás mellett kipreparáltuk a m. gluteust és m. triceps surae-t, majd kezeletlen, 48 és 168 óráig sejtenyészeti körülmények között inkubált fonalakat varrtunk az izmokba. Az állatokat 3, 5 és 7 hét elteltével feláldoztuk, a makroszkópos inspekción követően az izmokat eltávolítottuk, és paraffinba ágyazott blokkokat készítettünk. A blokkokból készített metszeteket hematoxilín-eozinnal festettük. Ezt követően mértük a fonalak keresztmetszeti átmérőjét és számoltuk a visszamaradó fonalrostok számát. A vizsgálatban csak a tisztán keresztmetszeti képeket analizáltuk.

#### **3.4.2.2. Biomechanikai vizsgálat**

Az in vitro kezeléseken átesett fonalak szakítószilárdságát is megmértük egy Instron 5566 mechanikai vizsgáló berendezéssel (Instron, Norwood, MA, USA). A fonalak végeit hengerekre tekertük fel, hogy megakadályozzuk az esetleges megcsúszásukat. A mérést 10mm/perc sebességgel végeztük szobahőmérsékleten, 50 % körüli páratartalom mellett.

### **3.5. Lágyszöveti őssejttranszplantáció in vivo nyomonkövetése**

A sejtes fonál célja, hogy őssejteket juttasson a varróanyaggal egyesített lágyszövetbe. Felmerül, hogy kibírják-e a sejtek a varratkészítésből fakadó mechanikai igénybevételt, valamint, hogy képesek-e a fonál felületét elhagyva a sérült szövet rétegeibe vándorolni. A kísérlethez 17 cm hosszúságú fonalakat készítettünk elő, melyekre 1700000 patkány mezenhimális sejtet tettünk, és 1 héten át tenyésztettünk. A sejtek jelölésére két metódust alkalmaztunk. A hosszú távú jelölés céljából már az őssejtkultúra tenyésztése során bróm-deoxi-uridint (BrDU) adtunk a tápoldathoz, ami a sejtek DNS-ébe épült, és jelölte az utód sejteket is. Rövid távú jelölés céljára (48 és 168 óra) pedig egy lipofil karbocianid membránfestéket adtunk az oldathoz a fonálon történt inkubációt követően (Vybrant DID, excitáció 644 nm, emisszió 665 nm). Ketamin-xylazin anaesztéziában részesített állatok m.

triceps surae izomzatán egy 10 mm-es metszést ejtettünk, amit az előkészített fonalakkal egyesítettünk. Tekintettel a varróanyagok felszívódó jellegére, a sértés helyét fel nem szívódó varrattal jelöltük. Az izomzataból 48 és 168 óra után, valamint 5 hét elteltével vettünk mintát. A 48 és 168 óra elteltével vett mintákat kezelés nélkül lézer konfokális mikroszkópiának vetettük alá (Zeiss LSM 510 META, Carl Zeiss, Jena, Germany). Az 5 hét elteltével eltávolított mintákból paraffinba ágyazott blokkokat készítettünk. Ezt követően - kihasználva a BrDU antigenitását - a blokkokat immunhisztokémiai festéssel, fluoreszcens festékekkel jelöltük és mikroszkóp alatt vizsgáltuk.

### **3.6. Mezenhimális őssejtek kitapadása demineralizált csontgraftok felületén**

#### **3.6.1. A demineralizált csontmátrix előállítása**

A demineralizált csontmátrixokkal szemben állított irodalmi kritérium, hogy a kalcium tartalma nem haladhatja meg a 2%-ot. Ezt szem előtt tartva végeztük a demineralizált csontmátrix előállítását - kisebb módosításokkal - Urist eredeti módszerét alkalmazva. A 3.2 alfejezetben részletezett módszerrel patkányokat áldoztunk fel. A koponya parietális boltozatát mindkét oldalon feltártuk, és egy körfúróval 4 mm-es csontdarabokat távolítottunk el, összesen 4-et minden állatból. Ezt követően a következő lépéseket végeztük: 1. A csontdarabkák zsírmentesítés céljából metanolba kerültek 24 órára. 2. Öt perces foszfátpufferes mosás. 3. Antigen mentesítés céljából a csontdarabkák 10 mmol/L nátrium-azid és 10 mmol/L jód-acetát tartalmú 0.1M koncentráció foszfát-pufferbe kerültek 48 órára, 37°C-on. 4. Dekalcinálás 0.6N HCL oldattal, szobahőmérsékleten, 24 órán keresztül. 5. Öt perces foszfátpufferes mosás. 6. Fehérités 3%-os hidrogén-peroxiddal szobahőmérsékleten 36 órán át. 7. Öt perces mosás desztillált vízben. 8a. Fagyasztva szárítás I.: a csontgraftok -80°C-on 2 órán keresztül fagyasztásra kerültek, a fagyasztva szárítást -50°C-on, 12 órán keresztül végeztük. 8b. Fagyasztva szárítás II.: a fagyasztva-szárított csontgraftokat 20%-os humán szérum albuminba áztattuk, majd -80°C-on 2 órán keresztül fagyasztásra kerültek, a fagyasztva szárítást -50°C-on, 12 órán keresztül végeztük.

#### **3.6.2. In vitro kitapadás vizsgálata**

Szérum albumin bevonatú és bevonat nélküli demineralizált csontgraftok 96 lyukú speciális sejtenyészítő edényekbe kerültek (Costar, Corning Inc.). A sejtenyészítő edények kialakítása biztosítja, hogy a belehelyezett sejtszuspenzióból ne tudjanak letapadni a sejtek az edény



aljára. Ez teszi lehetővé, hogy a demineralizált csontgraftokat az edénybe helyezve csupán a sejt-csontmátrix kitapadási tendenciát vizsgáljuk. Az edénybe helyezett graftokra 200 µl 50000 őssejtet tartalmazó tápoldat került. A kitapadt sejtszámot 6, 12 és 24 óra elteltével metil-tiazol-tetrazólium (MTT) teszttel vizsgáltuk. Az élő sejtek a sárga MTT molekulát felveszik, és mitokondriális enzimek segítségével sötétkék, vízben nem oldódó formazán kristályokká alakítják, melynek oldása lehetővé teszi az átalakítás mértékének spektrofotometriás vizsgálatát. Az MTT tesztet következőképpen végeztük: az inkubációs idő lejártával 200 µl 5mg/ml MTT (1:9) tartalmú friss tápoldatot adtunk, majd az inkubációt tovább folytattuk 1 órán keresztül. Ezt követően a tápoldatot 200 µl propanolra cseréltük és 1 órán keresztül gyengéden mozgásban tartottuk. Az oldat abszorbanciáját 570 nm-en vizsgáltuk, melyet a 690 nm-en mért értékkel korrigáltunk. Az oldat abszorbanicája a kitapadt sejtszámnak feleltethető meg. Megvizsgáltuk a sejtek morfológiai megjelenését is. MTT kezeléssel át nem esett graftokra friss tápoldatot tettünk, melybe kalcein fluoreszcens festéket kevertünk (1:1000). A mintákat lézer konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk (LSM 510), ahol a kalcein egyértelműen jelölte az élő sejteket.

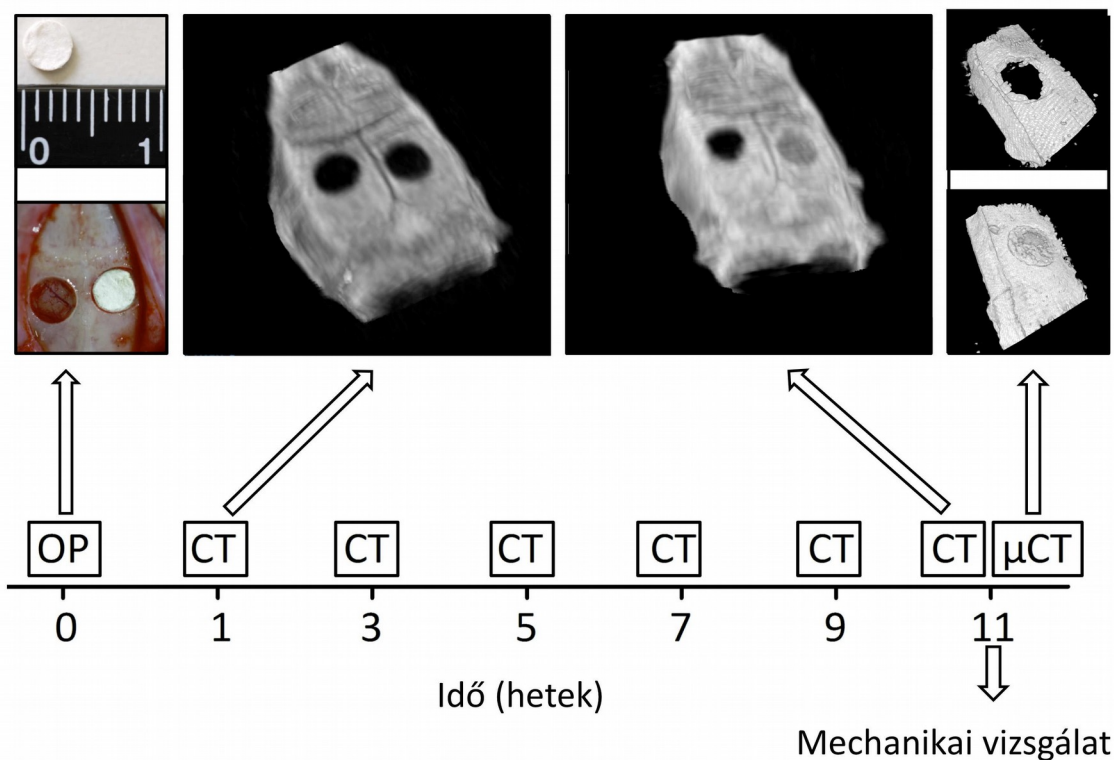
### **3.7. A csontregeneráció vizsgálata**

#### **3.7.1. Csonthiány kialakítása in vivo - sebészeti technika**

A sebészeti beavatkozást a Spicer és munkatársai által részletesen összefoglalt Nature Protocols közlemény alapján végeztük. Az állatokat i.p. ketamin-xylazin (100-10 mg/kg, Richter Gedeon Plc., Budapest - Sigma Aldrich Co., Budapest) injekcióban részesítettük. Néhány perc elteltével, az altatás mélységéről megbizonyosodva, az állatokat az erre kialakított padra helyeztük, mely a külső hallójáratokba vezetett atraumatikus eszköz és a maxilla segítségével rögzítette az állat fejét. Ezután az állatok fejét megborotváltuk, Betadine-nal fertőtlenítettük, és izoláló lepedővel takartuk le. A patkány fejbőrét a sutura sagittalisnak megfelelően bemetsztük. Ezt követően a periosteumon is az előbbinek megfelelő metszést ejtettünk, majd, operáló mikroszkóp segítségével, tompán alápreparáltunk. A periosteum megtartása létfontosságú a későbbi csontgyógyulás szempontjából. A sutura sagittalis és a sutura coronalis jelezte a parietalis koponyacsont határait. Ennek megfelelően egy 4 mm külső átmérőjű trepánnal lassan lyukat fúrtunk a koponyába, ügyelve a dura mater és a sinus sagittalis superior épségére. A fúrást a másik oldali parietalis csonton is elvégeztük, majd a vizsgálati csoportoknak megfelelően töltöttük ki, vagy hagytuk üresen a keletkezett csonthiányt. Ezt követően a periosteumot 6-0 felszívódó varrattal, tova futó technikával egyesítettük a középvonalban. A bőrt csomós varrattal egyesítettük, a sebet fertőtlenítettük, és az állatok visszakerültek a ketrecükbe.

#### **3.7.2. In vivo kísérleti protokoll és vizsgálati csoportok**

Vizsgálataink során azkövetkező kísérleti protokollt követtünk. A csonthiányokat albuminnal bevont demineralizált csontmátrix-szal, vagy bevonat nélküli grafftal pótoltuk. Egyes csonthiányokat üresen hagytunk, ezek szolgáltatták a negatív kontroll csoportot. A sebészeti beavatkozást követően 1, 3, 5, 7, 9, majd 11 héttel in vivo számítógépes rétegvizsgálatot (CT) végeztünk. A 11. hét elteltével az állatokat feláldoztuk és eltávolítottuk a parietalis csontlebenyeket. Ezeket a csontdarabokon microCT vizsgálatot, majd biomechanikai töréstesztet végeztünk (1.ábra)



**1. ábra.** Csontregeneráció vizsgálata - in vivo kísérleti protokoll. Az ábra reprezentatív képeket mutat be, a beültetendő grafról, a műtéti területről, az első és 11. posztoperatív héten készített CT rekonstrukciókról, illetve az ex vivo miroCT-ről.

### 3.7.3. A csontgyógyulás vizsgálata in vivo képalkotással

#### 3.7.3.1. Számítógépes rétegvizsgálat

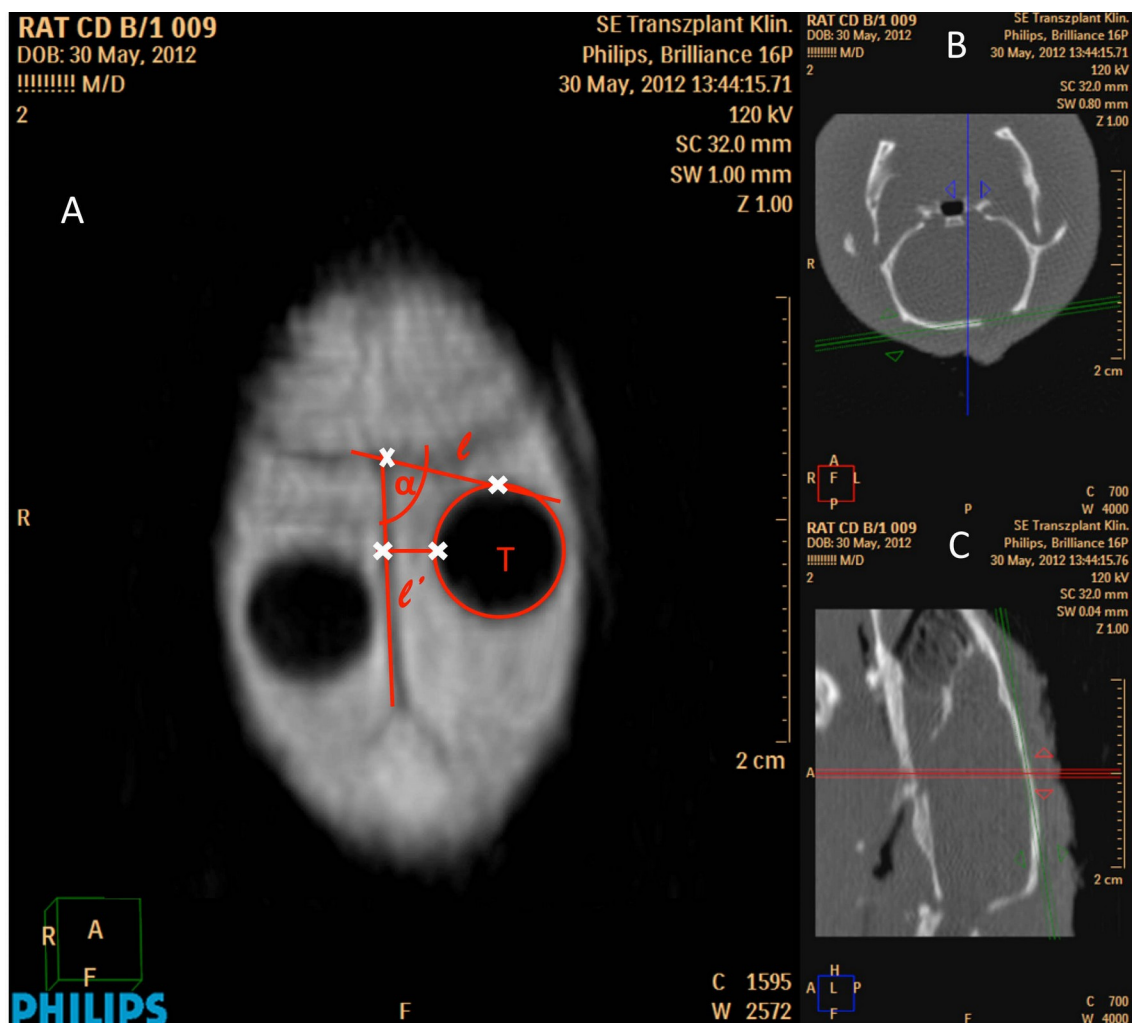
Számítógépes rétegvizsgálat (CT) segítségével lehetőség nyílt a csontgyógyulás in vivo nyomonkövetésére. CT vizsgálatot egy 16 szeletes Philips Brilliance CT-n (Philips International B.V. Amsterdam, Netherlands) végeztük, és a humán vizsgálatoknál használatos belső fül protokollt alkalmaztunk. A vizsgálathoz ketamin-xylazin narkózist indítottunk. A felvételeket 120 kV-tal és 300 mA-rel készítettük. A szeletvastagság 0.8 mm, az inkrementum 0.4 mm, a kollimáció 16x0.75 mm, a rotációs idő 0.75 secundum, a pitch 0.4 volt.

#### 3.7.3.2 Visszamaradó csonthiány

A felvételekből coronalis irányú rekonstrukciót készítettünk, mely során jól láthatóvá vált a mindkét oldali parietalis csonton létrehozott csonthiány. A sagittalis és coronalis rekonstrukciós képeken a tengelyt úgy állítottuk be, hogy az a defektus síkjában legyen. A visszamaradó csonthiány meghatározását nagyított képen, szabad kezes technika segítségével végeztük. A mérés megbízhatóságát mutatja, hogy az újra megmért területek elhanyagolható mértékben tértek el az első mérés értékétől. A visszamaradó csonthiány területe (mm<sup>2</sup>), illetve az eredeti csonthiány méretéhez viszonyított értéke (%) szolgált összehasonlítási alapul. A területmérés során speciális ablakolást használtunk (2572/1595 centrum/szélesség), mely segítségével a lágyszövetek nélkül jelenítettük meg a regenerálódó csontot.

### **3.7.3.3. Denzitometria**

A csontosodás egyik jele a gyógyuló szövetbe épülő szervesen állomány mennyiségének, következésképpen denzitásának növekedése. A gyógyuló csont denzitását 1 mm vastag szeleteken mértük, mértékegysége Hounsfield egység (HU). A sagittalis és coronalis rekonstrukciós képeken a tengelyt úgy állítottuk be, hogy az a defektus síkjában legyen. Fontos szempont volt, hogy minden mérésnél pontosan ugyanazt a területet (Region of Interest, ROI) vizsgáljuk. Referenciapontként meghatároztuk a sutura coronalis és sutura sagittalis találkozását (Bregma pont). Az első mérés alkalmával elhelyezett kör alakú, ismert területű ROI (T) frontalis pontját összekötöttük a Bregma ponttal (l), és meghatároztuk a sutura sagittalissal bezárt szöveget ( $\alpha$ ). Majd a kör sutura sagittalishoz eső legközelebbi pontjából merőlegest állítottunk a sutura sagittalisra, az így kapott szakaszt is regisztráltuk (l'). Az említett mértani paraméterek segítségével minden mérés alkalmával pontosan helyezhettük el a ROI-t, és pontos denzitás mérést végezhattünk (2.ábra).



2.ábra. CT felvételek az első posztoperatív héten. Az A panel az axiális rekonstrukciót mutatja, a B és C panelek a coronalis és sagittalis rekonstrukciót. Az A panelen ábrázolódó mértani eszközök segítségével, a T terület minden esetben meghatározható volt.

### 3.7.4. Ex vivo microCT

Az in vivo kísérlet végén az állatokat feláldoztuk, és eltávolítottuk a parietalis csontlebenyeket, majd microCT vizsgálatnak vetettük alá. A microCT felvételeket 59 kV-tal, 167  $\mu$ A-rel és 23  $\mu$ m<sup>3</sup> méretű izovolumetriás térfogati elemekkel készítettük. A képanalízist CTAn program segítségével végeztük a következő képpen: meghatároztuk a defektus közepét horizontális és coronális síkban egyaránt. Ebbe a pontba 80 pixel sugarú kört rajzoltunk (ROI), majd kiterjesztettünk a defektus közepétől 100-100 szeletre cranialis és caudalis irányba. A defektus eredeti nagysága 400 szelet volt. A CTAn program ezt követően

kiszámolta a csont térfogati arányát (Bone Volume/Tissue Volume, BV/TV, %). A kapott százalékos értéket a sértetlen koponyán mért értékekhez viszonyítottuk.

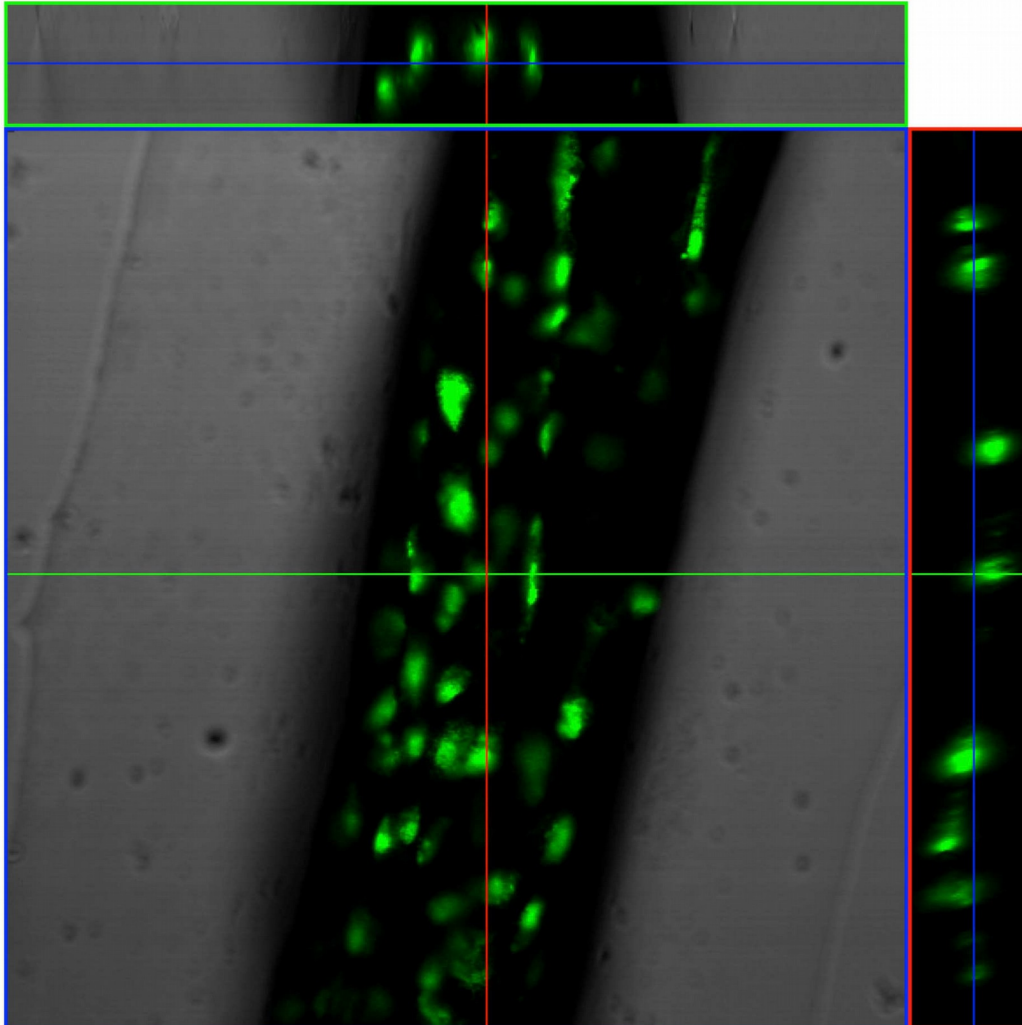
### **3.7.5. Biomechanikai vizsgálat**

A csont egyik alapfunkciója a mechanikai stabilitás, emiatt elvégeztük a gyógyuló csontok töréstesztjét és meghatároztuk a minták keménységét is. A mérést Instron 5566-os készülékkel (Instron, Norwood, MA, USA) végeztük. Az microCT-t követően a parietalis csontdarabok egy erre a célra kialakított rögzítőbe kerültek. A csontot két, lyukas centrumú korong rögzítette alulról és felülről, ezáltal csökkentve a deformálódás lehetőségét, mely mérési pontatlanságot eredményezett volna. A kitöltött csonthiányt a rögzítő közepére igazítottuk, majd egy 2.5 mm átmérőjű kör alakú, tompa szélű rúddal 10 mm/perc sebességű terhelést végeztünk. A nyomás-elmozdulás változásokat 100 millisecundumonként regisztráltuk. A terhelés a minta töréséig tartott, ami meghatározta a graft kitöréséhez szükséges maximális erőt (N). A nyomás-elmozdulás görbék meredeksége pedig a minták keménységét adta meg (N/mm<sup>2</sup>).

## 4. Eredmények

### 4.1. Mezenhimális őssejtek kitapadása sebészeti varróanyagok felületére

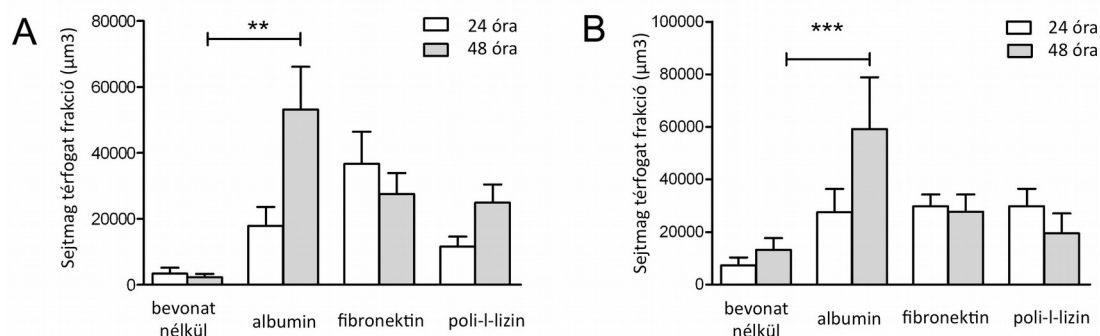
A sejtek kitapadását először 3D, úgynevezett "z-stack" technikával igazoltuk. A 3. ábra járulékos paneljei a térbeli elhelyezkedést mutatják, melyek igazolják, hogy a sejtek valóban a fonál felületén találhatóak.



**3. ábra.** 3D fluoreszcens mikroszkópiával vizsgált fonál részlet. Zöld szín jelöli a sejtmagokat. A felső és jobb oldali járulékos panel igazolja, hogy a kiválasztott sejtmag a fonál felületén helyezkedik el.

A sejtek kitapadását vizsgálva megállapítottuk, hogy 24 óra elteltével mindegyik fonálon található kitapadt sejt (4. ábra). A bevonó fehérjék között nem volt szignifikáns különbség sem a patkány, sem a humán mezenhimális sejtek esetében. 48 óra elteltével a sejtek száma mindegyik fonálon növekedett, de az albuminnal bevont fonálra szignifikánsan több humán mezenhimális sejt tapadt, mint a bevonat nélküli (sejtmag térfogat frakció: bevonat nélküli

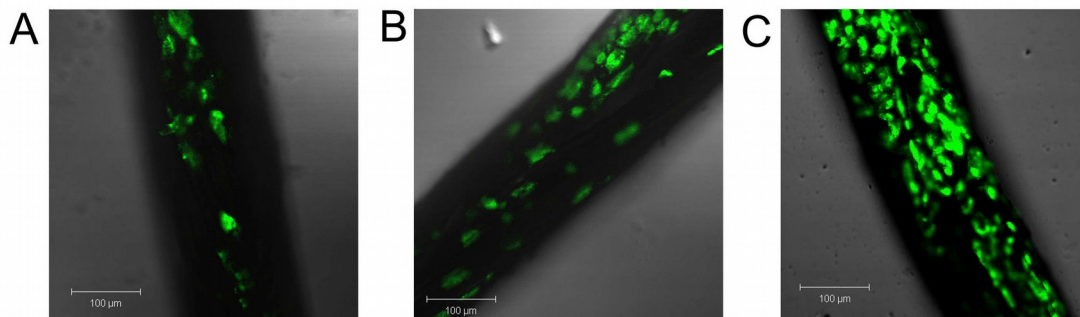
fonál:  $2253 \pm 1066 \mu\text{m}^3$ , albumin bevonat:  $53204 \pm 12949 \mu\text{m}^3$ ). Ezzel szemben a fibronektin és poli-l-lizin bevonat nem tudott jelentősen nagyobb sejtszámot produkálni a bevonat nélküli fonalakhoz képest. A patkány mezenhimális sejtek esetén hasonló eredményeket kaptunk, ugyanis az albuminnal bevont fonalak 48 óra elteltével ez esetben is szignifikánsan magasabb sejtmag térfogat frakciós értéket értek el (sejtmag térfogat frakció: bevonat nélküli fonál:  $13215 \pm 4479 \mu\text{m}^3$ , albumin bevonat:  $59182 \pm 19722 \mu\text{m}^3$ ).



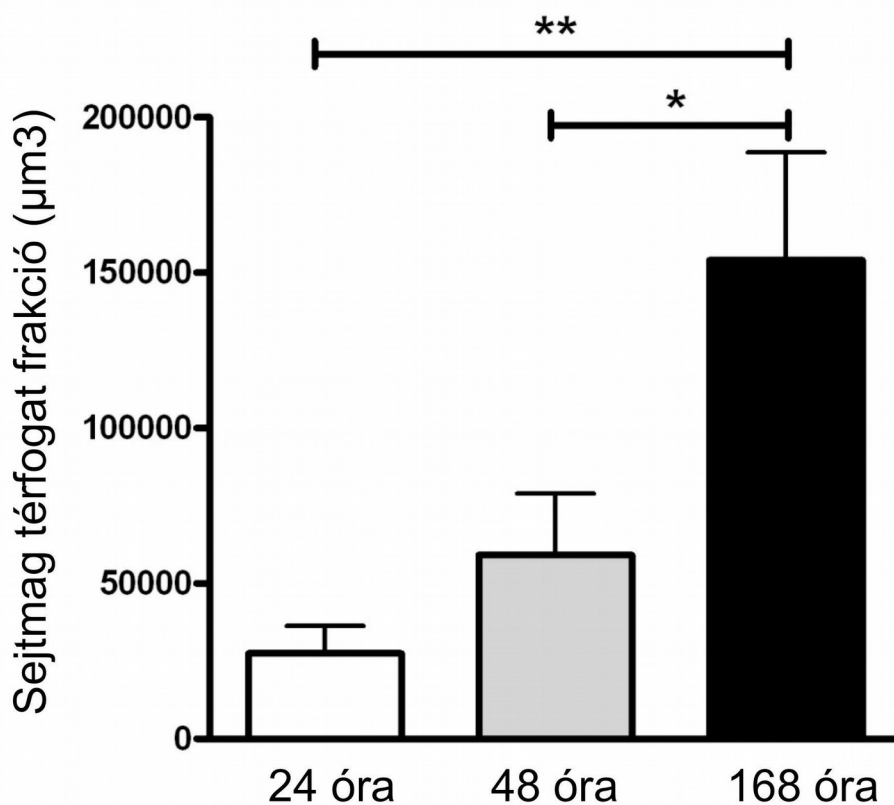
**4. ábra.** A fonál felületére tapadt mezenhimális sejtek számát a festett sejtmagok térfogat frakciójából állapítottuk meg. Az A panel a humán sejtek, a B panel a patkány sejtek számát mutatja 24 és 48 órával a kitapadást követően. Az albumin bevonat szignifikánsan magasabb sejtszámot produkált mindkét sejttípus esetén. (n= 6, kétutas ANOVA, Bonferroni post test, \*\*: p < 0.1, \*\*\*: p < 0.01)

Annak érdekében, hogy információt nyerjünk az albuminos felületre megtapadt sejtek további viselkedéséről, az inkubációs időt 168 órára toltuk ki (5. és 6. ábra). Fontos, hogy 48 óra elteltével friss össejtmédiúmot tettünk a fonalakra, és a régít az esetlegesen még ki nem tapadt sejtekkel együtt eltávolítottuk. Ennek következtében alkalmunk nyílt csupán a kitapadt sejtek viselkedését vizsgálni. Az 1 hét tenyésztés következtében a sejtek száma tovább emelkedett az albuminnal bevont fonalakon, és nagyrészt beborították a rendelkezésre álló felületet. Statisztikailag az 1 hetes inkubáció mindkét korábbi időponthoz képest szignifikánsan magasabb sejtszámot ért el (sejtmag térfogat frakció: 24 óra:  $27531 \pm 8822 \mu\text{m}^3$ , 48 óra:  $59182 \pm 19722 \mu\text{m}^3$ , 168 óra:  $153974 \pm 34738 \mu\text{m}^3$ ).





5. ábra. Fluoreszcens mikroszkópos kép az albuminnal bevont fonalakra tapadt sejtekről. Zöld szín jelöli a sejtmagokat. Az A panel a 24 órás, a B a 48 órás, a C a 168 órás állapotot tükrözi.

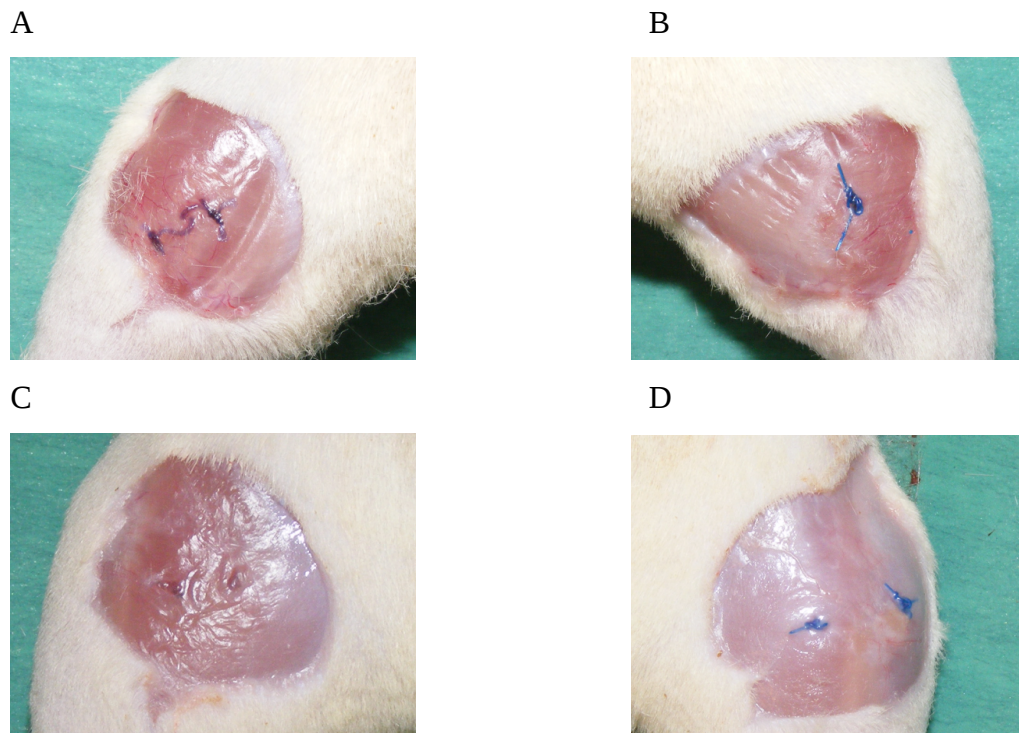


6. ábra. Az albumin bevonattal kezelt fonalakra tapadt patkány sejtek száma 168 órával a kitapadást követően. (n=6, egyutas ANOVA, Bonferroni post test, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

## 4.2. Sejtranszplantációra előkészített fonalak változásai

### 4.2.1. Felszívódás változása

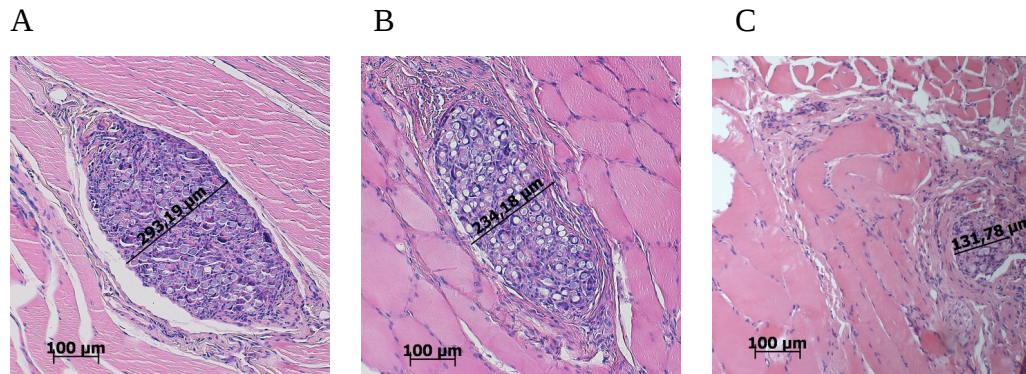
A felszívódás változásának vizsgálatát az izmokban található fonalmaradványok makroszkópos inspeksiójával kezdtük. Világossá vált, hogy míg a kezeletlen és 48 óráig kezelt fonalak még 5 hét után is egyértelműen felismerhetők az izomban, addig a 168 órán át sejtenyészítő médiumban tartott fonalak alig láthatóak. Maradványaikat a jelölőfonalak segítségével lehetett csupán azonosítani (7. ábra).



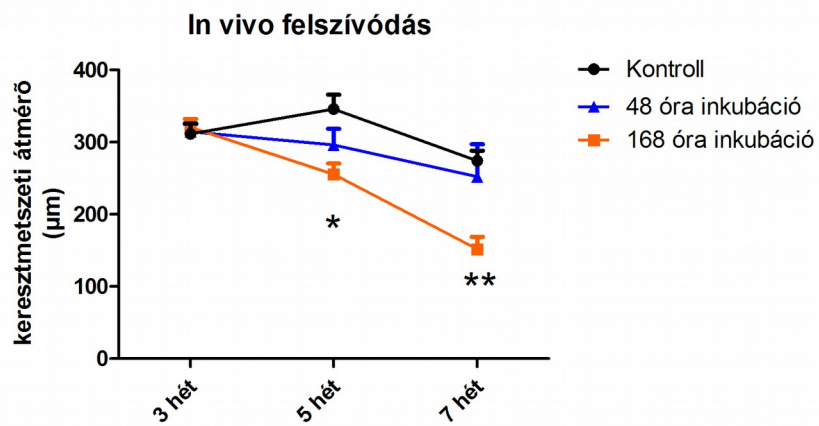
**7. ábra.** A fonalak felszívódásának makroszkópos képe. Az A és B panel az 5 hét, a C és D panel a 7 hét utáni állapotot mutatja. Az A és C kép az inkubáció nélküli, kontroll fonalakat, a B és D kép a beültetést megelőzően 168 óráig inkubált fonalmaradványokat mutatja. (a kék fonál a B és D képen fel nem szívódó jelölő fonál)

A metszetek elkészültével mikroszkóposan is megvizsgáltuk a visszamaradó fonalak rostszámát és keresztmetszeti átmérőjét (8., 9., 10. ábra). Három héttel a fonalak bevarrását követően nem tapasztaltunk szignifikáns eltérést egyik paraméterben sem a 48 órás, 168 órás és kezeletlen csoport között. 5 hét elteltével azonban a 168 óráig kezelt fonalak jelentősen alacsonyabb keresztmetszeti átmérővel és rostszámmal mutatkoztak. A kontroll fonál keresztmetszeti átmérője  $345.9 \pm 20.0 \mu\text{m}$  volt, míg a 168 órásé  $255.5 \pm 14.9 \mu\text{m}$ -re csökkent (9. ábra). A visszamaradó rostszám a kontroll fonál esetében  $104.6 \pm 5.1$  volt, míg a 168 órásnál  $82.4 \pm 7.5$  (10. ábra). Ezek az értékek a hetedik hétre még kifejezettebbek lettek, míg

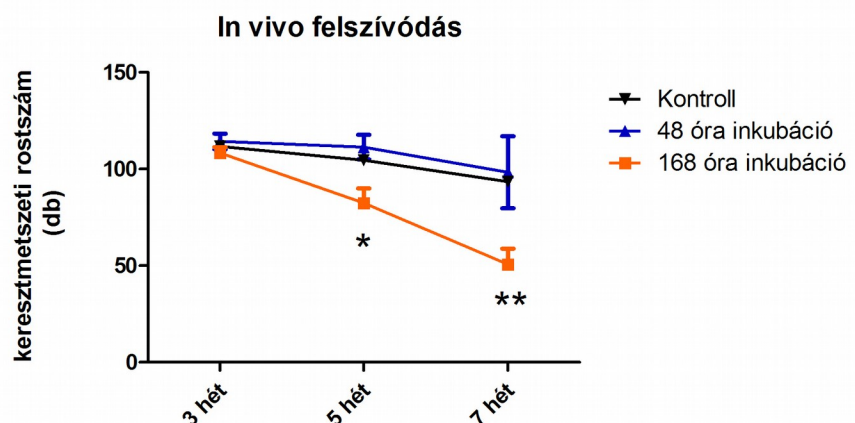
a 48 órás fonalak nem különböztek szignifikánsan egyik időpontban sem a kontroll fonaltól. Az albumin kezelés egyik időpontban sem befolyásolta a felszívódás dinamikáját.



**8. ábra.** Fonalkeresztmetszetek szövettani képe a hetedik hétnél. Az A panel a kezeltlen kontroll, a B panel a 48 órás inkubáción, a C panel a 168 órás inkubáción átesett fonalak metszeti képét mutatja.



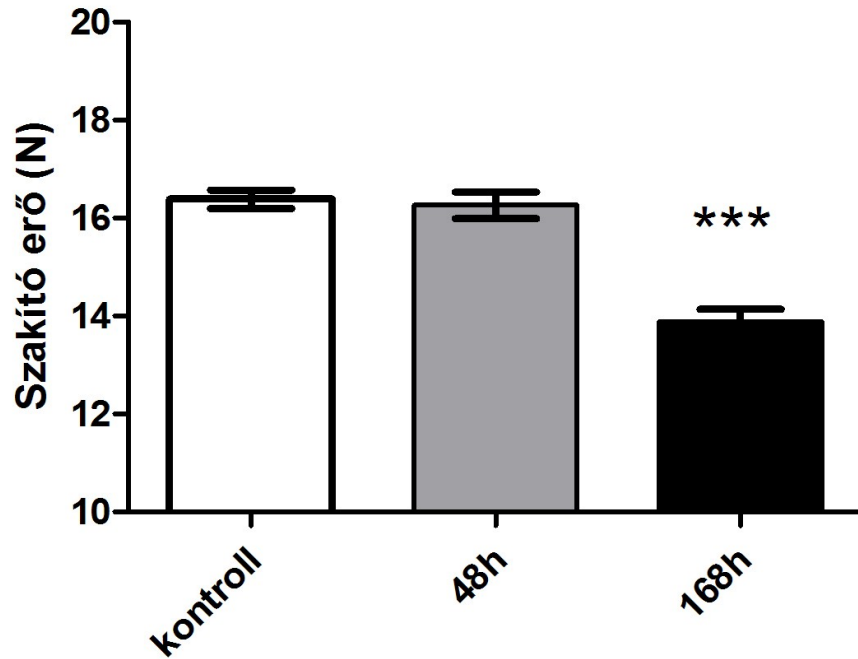
**9. ábra.** Fonalak keresztmetszeti átmérő változása az inkubációs idő függvényében (n=10, két utas ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01)



**10. ábra.** Fonalak keresztmetszeti rostszámának változása az idő függvényében (n=10, két utas ANOVA, \*p<0.05, \*\*p<0.01)

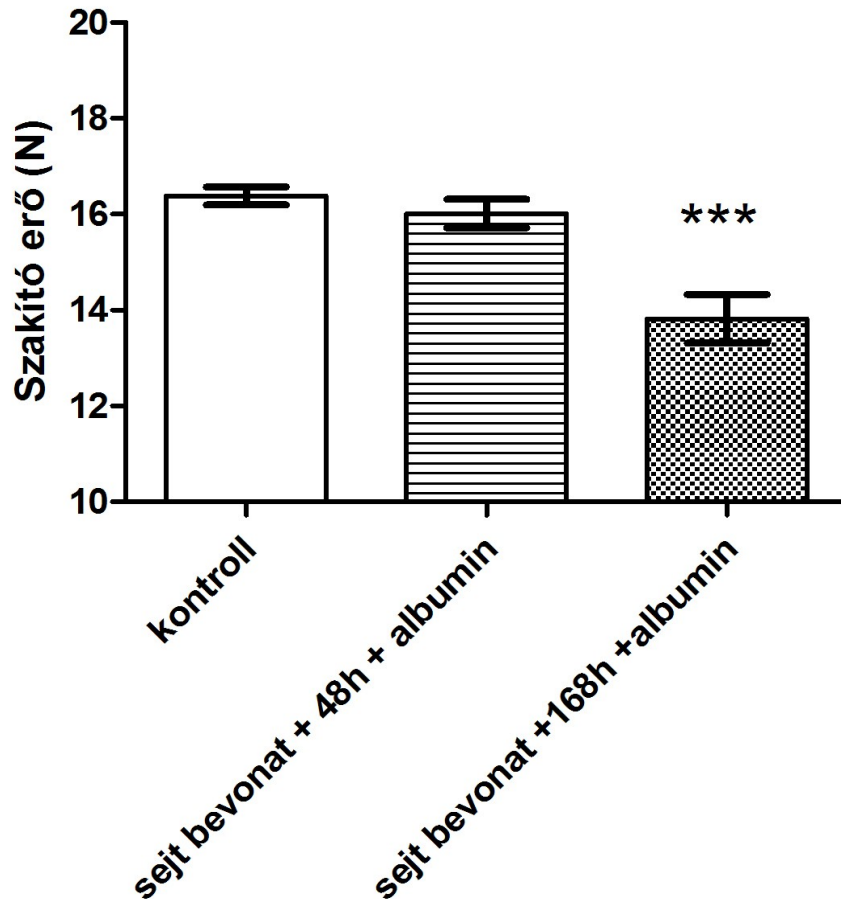
#### 4.2.2. Biomechanikai vizsgálat

A kezeletlen fonál szakítószilárdsága  $16.38 \pm 0.2$  N volt, ehhez hasonlítva vizsgáltuk az albuminos fagyasztva szárítás és sejtenyészítő oldatban történő inkubáció hatásait. 48 órás inkubációt követően sem albuminnal, sem bevonat nélkül nem találtunk szignifikáns különbséget a kontroll fonalakhoz képest (albuminnal:  $15.31 \pm 0.3$  N; albumin nélkül:  $16.26 \text{ N} \pm 0.3$ ). Ezzel szemben a 168 órás inkubáció 16-19%-kal csökkentette a fonalak szakítószilárdságát (albuminnal:  $13.34 \pm 0.3$  N; albumin nélkül:  $13.88 \pm 0.3$  N) (11. ábra).



**11. ábra.** Fonalak szakítóerő változása az inkubációs idő függvényében (n=10, egyutas ANOVA, Dunette's multiple comparison, \*\*\* p<0.001)

Megvizsgáltuk azt is, hogy változtat-e a szakítószilárdságon, ha sejtes tapasztunk az albuminos fonalakra. Hasonló eredményeket kaptunk, mint sejtes kezelés nélkül, vagyis a sejtes kezelés 48 óra elteltével nem befolyásolja a szakítószilárdságot, míg a 168 órás tenyésztés szignifikánsan csökkenti a fonalak teherbírását (sejtes fonalak, 48 óra:  $16.02 \pm 0.3$  N, sejtes fonalak, 168 óra:  $13.82 \pm 0.5$  N) (12. ábra).

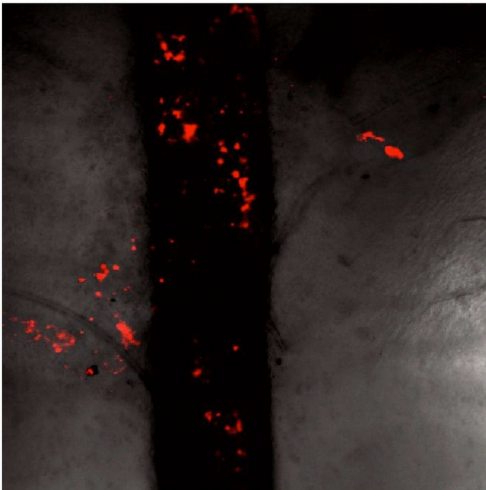


12. ábra. Sejttel bevont fonalak szakítóerő változása az idő függvényében.  
(n=10, egyutas ANOVA, Dunette's multiple comparison, \*\*\* p<0.001)

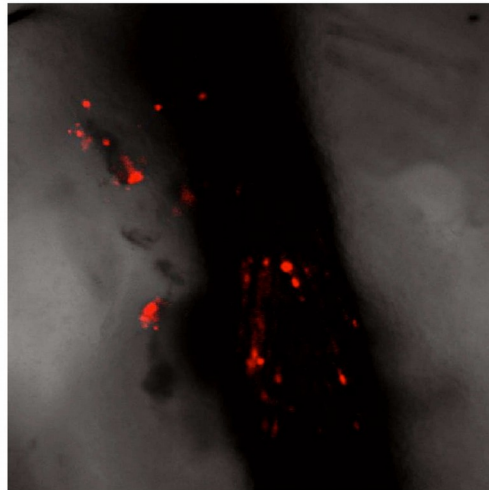
#### 4.3. Lágyszöveti őssejttranszplantáció in vivo nyomonkövetése

Kíváncsiak voltunk a transzplantált sejtek in vivo viselkedésére is. 48 órával a beültetést követően azt tapasztaltuk, hogy a sejtek ugyan még nagy számban találhatóak a fonalakon illetve közvetlen környezetükben, de jelentős számban vándoroltak mélyebb szöveti rétegekbe. A 168 órás vizsgálat hasonló eredményt hozott. A sértett izomban láthatóak a fluoreszcens festékkel jelölt sejtek (13. ábra).

A

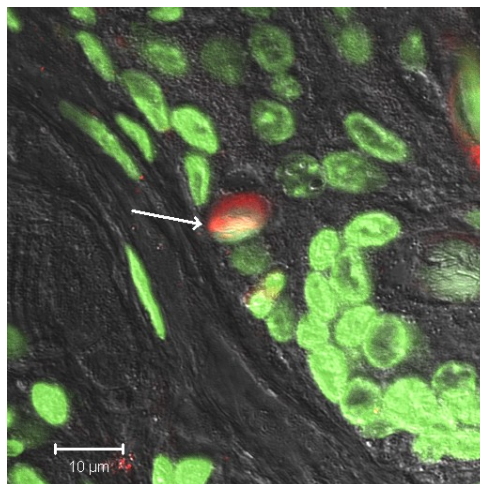


B



**13. ábra.** Fonal részletet tartalmazó izombióptátumok 48 (A panel), és 168 órát követően (B panel). Piros szín a fluoreszcens festékekkel jelölt sejteket mutatja.

A karbocianid membránfestékek jellemzője, hogy vizes oldatban csekély fluoreszcens jelet adnak, ugyanakkor az élő sejtek membránjához kötve az egész sejtet erős fluoreszcens jelöléssel látják el. Fontos, azonban, hogy csupán néhány napig marad stabilan az adott sejtben, ezt követően előfordulhat az sejtek közötti festékátvitel. Ennek okán, a hosszú távú jelölésre a festék alkalmatlannak bizonyulhat, hiszen néhány hetes intervallumban a gazda sejteket is jelölheti, ami téves eredményt adna. Emiatt alkalmaztunk BrDU jelölést a hosszú távú vizsgálatra, hiszen a DNS-be épülve sokáig kimutatható a sejtek exogén eredete. A vizsgálat rámutatott arra, hogy 5 hét elteltével még mindig fellelhetőek a transzplantált sejtek a sértett terület rétegeiben, habár számuk jelentősen megfogyatkozott (14. ábra).



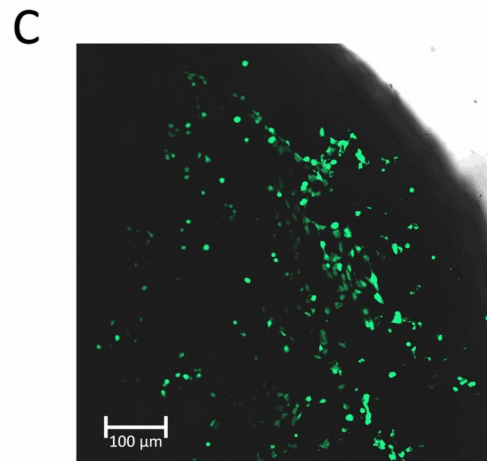
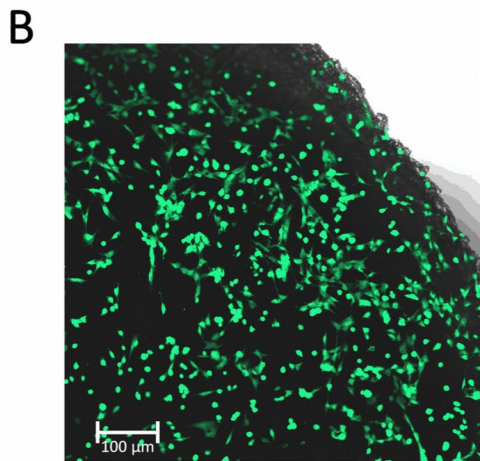
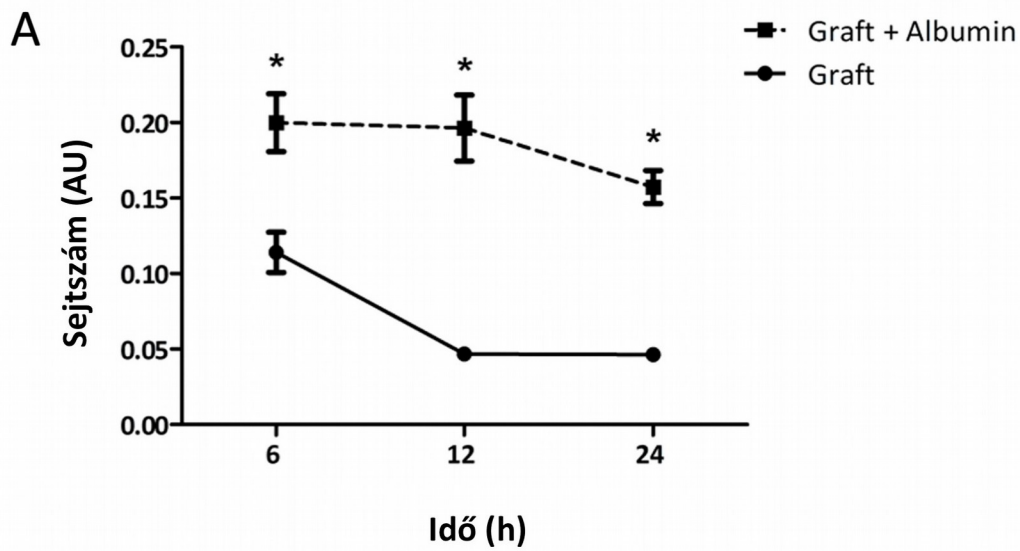
**14. ábra.** Immunhisztokémia festés vékony szeletes izom mintán. Zöld szín a sejtmagokat, piros szín a BrDU jelét mutatja. A sárga szín, a zöld és piros ko-loklizációjából, vagyis BrDU pozitív sejtmagok jelenlétéből fakad (fehér nyíl).

#### **4.4. Mezenhimális őssejtek kitapadása demineralizált csontgraftok felületén**

Ebben a kísérletünkben azt vizsgáltuk, hogy képes-e módosítani a szérum albumin bevonat a mezenhimális őssejtek kitapadási és túlélési tendenciáján. A felületre kapcsolódott sejtek számát 6, 12 és 24 óra inkubációt követően vizsgáltuk. Azt tapasztaltuk, hogy 6 óra inkubációt követően a sejtek száma az albuminnal bevont demineralizált csontmátrix felületén duplája a bevonat nélküli felülethez képest. A különbség 12 óra elteltével fokozódott, hiszen a bevonat nélküli csontmátrix felületén sejtszám csökkenést tapasztaltunk, míg az albuminnal bevont felületen változatlan volt a kitapadt sejtek száma. 24 óra elteltével a bevonat nélküli csoportban további csökkenést nem tapasztaltunk, és az albuminnal bevont felületen sem csökkent szignifikánsan a sejtszám. A bevonatos és bevonat nélküli csontmátrixokon minden időpillanatban szignifikáns sejtszám különbséget tapasztaltunk (15. ábra).

A graftokat mikroszkóp alatt vizsgálva is egyértelmű sejtszám különbséget találtunk. A sejtek morfológiai megjelenését vizsgálva megállapítottuk, hogy míg az albuminnal bevont felületen a sejtek nyúlványos megjelenésűek voltak, addig a bevonat nélküli csontmátrixon zömében kerekded sejteket találtunk, valamint jellemző volt a kitapadáshoz szükséges nyúlványok rendkívül alacsony száma is (15. ábra).



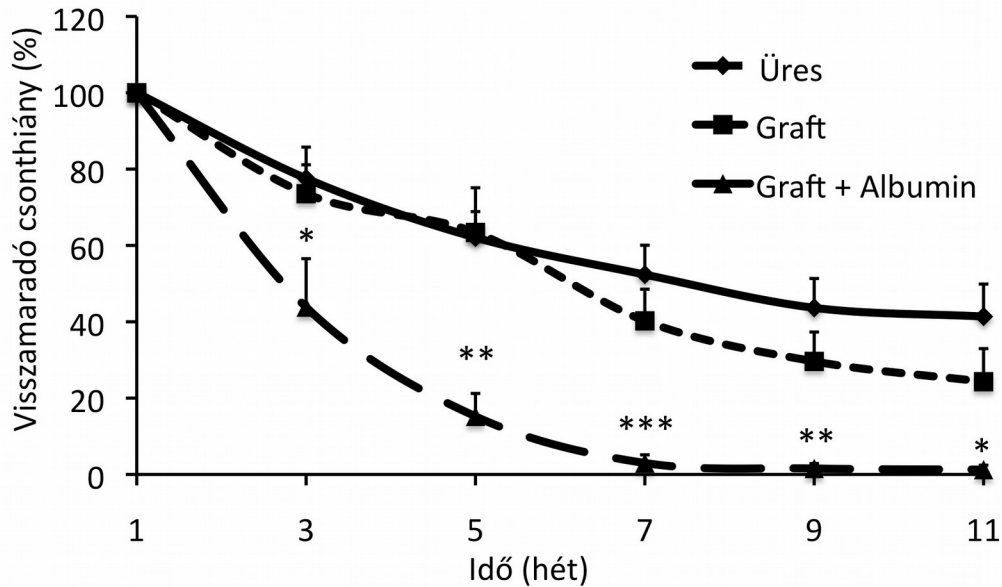


**15. ábra.** Mezenhimális őssejtek kitapadása demineralizált csontgraftok felületén. Az A panel a kitapadt sejtszámot szemlélteti 6, 12, és 24 óra elteltével albuminnal bevont (graft +albumin) és bevonat nélkül graft (graft) esetében (n=12, kétutas ANOVA, Bonferroni post test, \*:  $p < 0.01$ ). A B és C panel fluoreszcens mikroszkópiával készült felvételeket mutatja 12 óra elteltével. Zöld szín jelöli a kitapadt sejteket. A B panel az albuminos, a C a bevonat nélküli felületet ábrázolja.

## 4.5. Az albumin hatása a csontregenerációs folyamatokra

### 4.5.1. Visszamaradó csonthiány területe - in vivo

A csontgyógyulás folyamatát kéthetente végzett CT-vel vizsgáltuk először. Az első CT felvételek az első post-operatív héten készültek, mert előzetes vizsgálataink szerint a műtét után rövid idővel alkalmazott ismételt narkózis rontotta a kísérleti állatok túlélését. Az első héten készített felvételekből meghatároztuk a visszamaradó csonthiány területét, amit tehát - a műtét viszonylagos közelsége miatt - 100%-osnak tekintettünk. Az ekkor készített felvételeken nem találtunk szignifikáns különbséget a csoportok között. Az üresen hagyott csonthiányok  $9.7 \pm 0.1 \text{ mm}^2$ , a bevonat nélküli grafftal kezelt (DBM)  $11.2 \pm 0.5 \text{ mm}^2$ , az albumin bevonattal (DBM+albumin) kezelt csonthiányok pedig  $10.6 \pm 0.5 \text{ mm}^2$  méretű csonthiányt mutattak. A harmadik post-operatív héten készített felvételek tanúsága szerint minden kísérleti csoportban megkezdődött a csontosodás, hiszen a csonthiányok mérete csökkent. Az üresen hagyott csontdefekusok az eredeti méret  $77.5 \pm 4 \%$ -ára, a bevonat nélkül kezelt csoport pedig a  $73.5 \pm 13.4 \%$ -ára csökkentek. Ezzel szemben az albumin bevonattal kezelt defektusok már ekkor is szignifikánsan kisebb csonthiányt mutattak, a visszamaradó csonthiány az eredeti  $43.8 \pm 14.0\%$ -a volt. Az ötödik post-operatív hétre az albuminnal kezelt csoport további csökkenést mutatott, míg a másik két csoport még mindig 60% fölötti értéken állt. A hetedik hétre az albuminnal kezelt csoport csaknem teljesen csonttal fedetté vált, a visszamaradó csonthiány  $3.0 \pm 2.3\%$ -os értékével. Ugyanakkor, a másik két vizsgálati csoport jelentős csonthiánnyal rendelkezett. A bevonat nélküli csontmátrixszal kezelt  $40.2 \pm 9.1\%$ -ra csökkentek, míg az üresen hagyott csonthiányok  $52.4 \pm 8.9\%$ -os értéket mutattak. Megfigyeltük azt is, hogy a bevonat nélküli grafftal kezelt hiányok csökkenése folyamatos volt és statisztikailag szignifikáns csökkenést tapasztaltunk két vizsgálat között. Ezzel szemben az üresen hagyott csonthiányok csökkenése a harmadik héttől kezdődően nem volt jelentős (16. ábra)

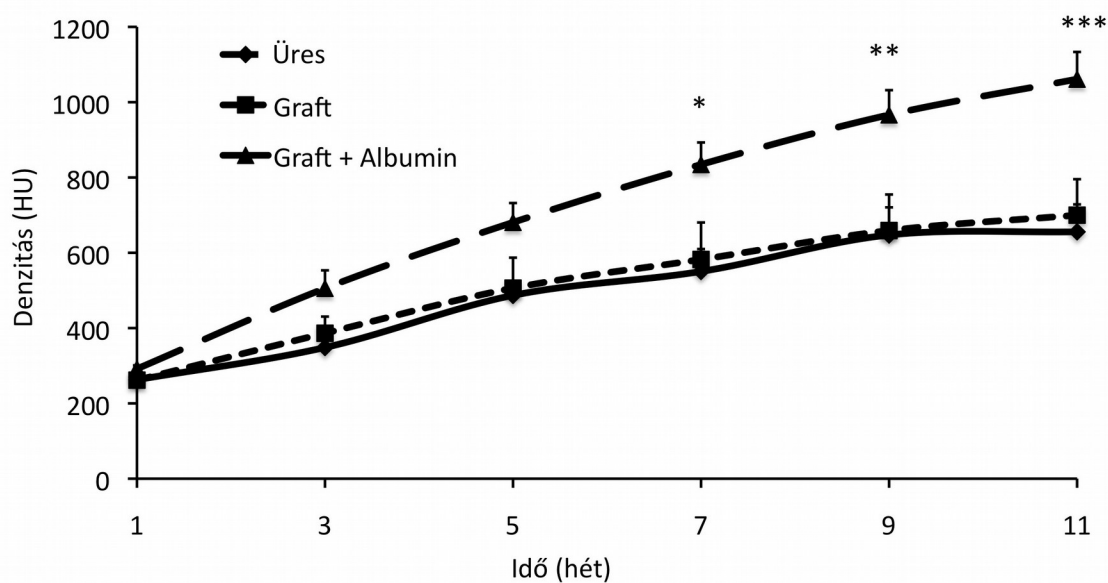


**16. ábra.** Újcsont képződés vizsgálata a visszamaradó csonttömeg időbeni csökkenésével. Az albumin bevonat (DBM + albumin) szignifikánsan gyorsabb újcsont képződést eredményez, a csonttömeg a 7. hétre begyógyulnak. (n=6, kétutas ANOVA, Bonferroni post test, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.1$ , \*\*\*:  $p < 0.01$ )

#### 4.5.2. Denzitometria - in vivo

A rekonstrukciós CT felvételekből mérhető volt a csonttömeg denzitása is. Az első héten végzett mérés során egyértelmű csontdefektusokat találtunk. A kísérleti csoportok között nem volt jelentős különbség. Az üresen hagyott defektusok  $262.8 \pm 12$  HU, a bevonat nélküli csoport  $261.7 \pm 13$  HU míg az albuminnal kezelt csoport  $291.7 \pm 10$  HU értéket mutattak. Megjegyzendő, hogy az első héten mért denzitás értékek magasabbak, mint a lágy szöveti denzitás. Ennek oka, hogy kör alakú ROI-t használtunk, és törekedtünk arra, hogy a csonttömeg minden területe belekerüljön a mérésbe. A csontszélek egyenetlenségei miatt szükséges volt az ép csontszélek minimális bevonása is, ami összességében a várt csonttömeget kitöltő lágy szövet denzitása helyett kissé magasabb értéket eredményezett. A harmadik és ötödik héten végzett CT vizsgálat szerint a csontosodás minden kísérleti csoportban megindult, a denzitás értékek növekedtek. Az albumin bevonatú graftokkal kezelt csoport magasabb denzitás értéket produkált, azonban szignifikáns eltérés nem volt kimutatható. A hetedik hétre az albuminnal kezelt csoport és a másik két csoport között szignifikánssá vált a különbség: míg az üresen hagyott csonttömeg  $550 \pm 69$  HU, a bevonat nélküli csonttömeg  $582 \pm 108$  HU értéket vettek fel, addig az albuminnal kezelt csoport  $835 \pm 64$  HU-t mutatott.

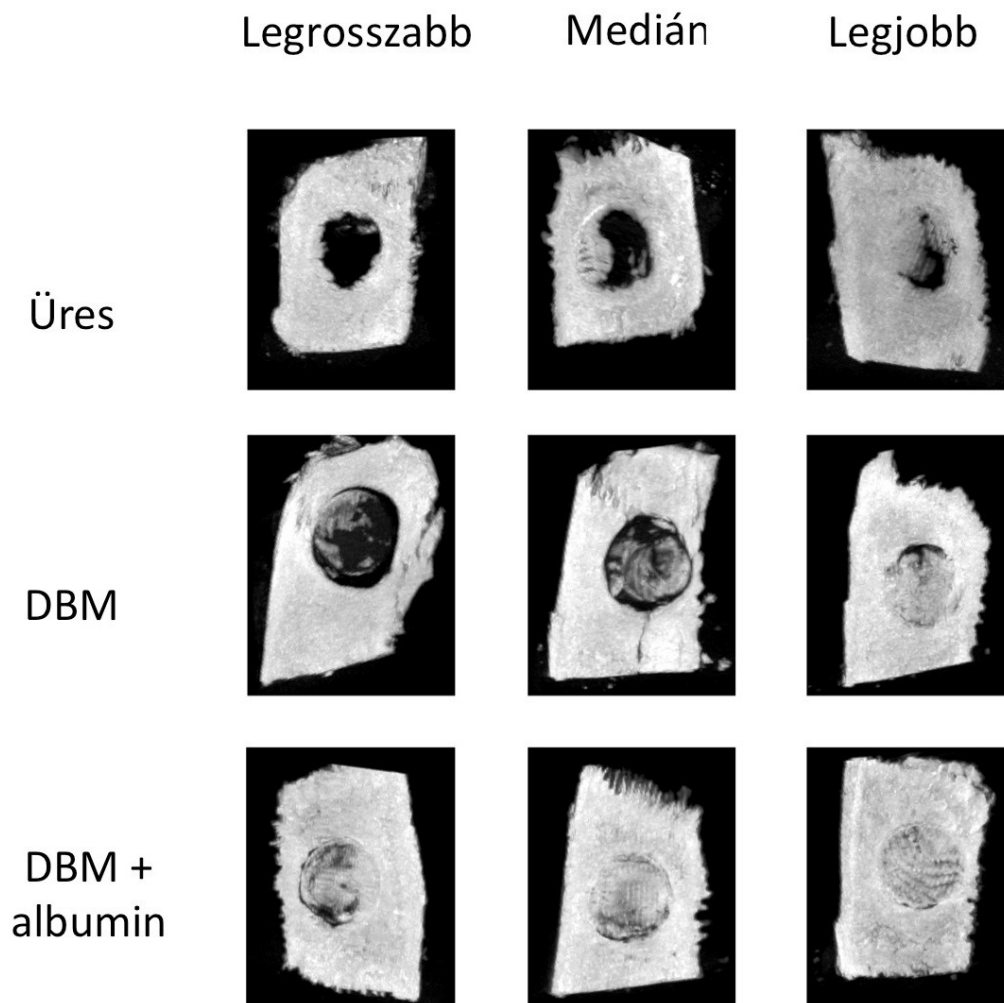
Ez a folyamat a kísérlet tizenegyedik heti terminációjáig tovább folytatódott. A tizenegyedik hétre az albuminnal kezelt csoport  $1061 \pm 79$  HU-t ért el, míg a bevonat nélküli csoport denzitása csupán  $700 \pm 105$  HU, az üresen hagyott hiányok értéke  $656 \pm 84$  HU volt. Noha az albuminnal kezelt csoport csonthiánya erre az időpontra teljes területében csonttal fedetté vált, és a csontgyógyulás feltehetően a kísérlet terminációja miatt nem folytatódhatott, a denzitás értékek még elmaradtak a sértetlen koponyán mért értékektől (sértetlen koponya:  $1620 \pm 16$  HU) (17. ábra).



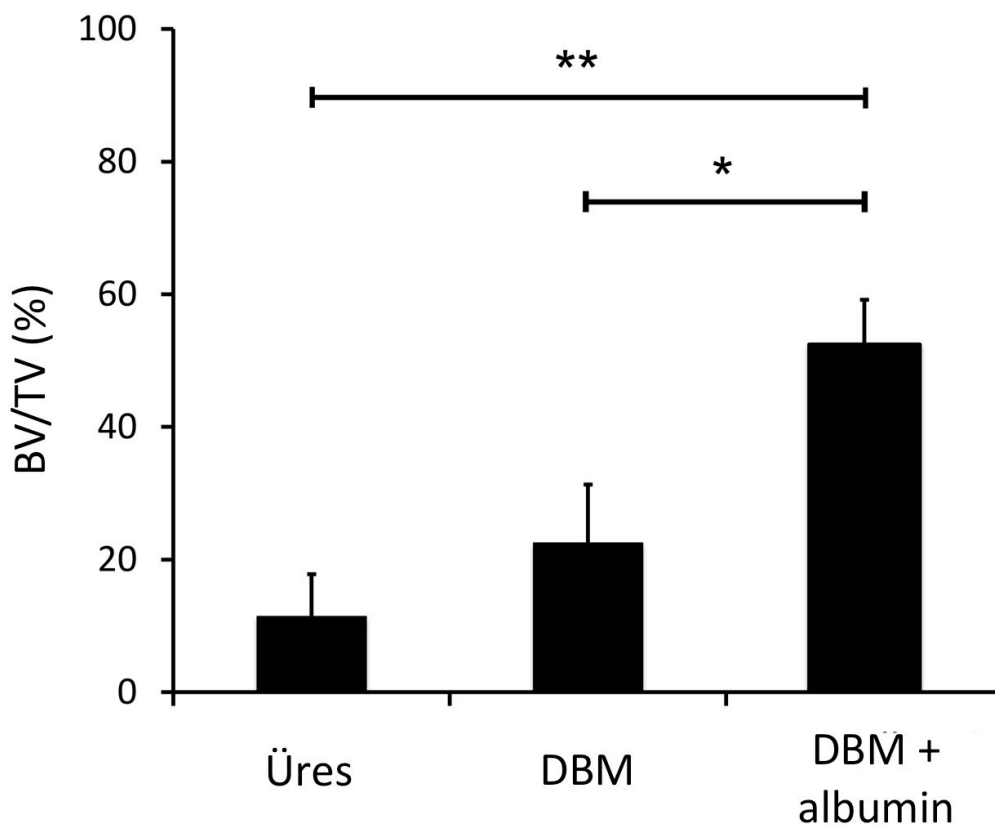
**17. ábra.** Újcsont képződés vizsgálata a sértült terület denzitásának időbeni emelkedésével. Az albumin bevonat (DBM + albumin) szignifikánsan magasabb denzitás értékeket produkál, a 7. héttől kezdődően. (n=6, kétutas ANOVA, Bonferroni post test, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.1$ , \*\*\*:  $p < 0.01$ )

### 4.5.3. Ex vivo microCT

A microCT vizsgálatokat a csontgyógyulás remineralizációs aspektusának jobb felbontású felderítéséért végeztük. A módszer segítségével az in vivo mérések során diagnosztizált csontgyógyulással szorosan összefüggő, támogató adatokat nyertünk (18. ábra). A mérések során a csontszövet arányát hasonlítottuk a teljes vizsgált térfogatban (BV/TV %). Megmértük az ép koponyacsont BV/TV értékét, ahol  $36.1 \pm 1.7$  %-ot kaptunk. A tizenegy hetes csontregenerációs folyamatot követően az üresen hagyott defektusok  $4.2 \pm 2.7$ %-ot, míg a bevonat nélküli grafftal kezelt defektusok  $8.2 \pm 3.2$ %-ot értek el. Ezek az értékek jelentősen elmaradnak az albuminnal bevont grafftal kezelt hiányok csontképződésétől, hiszen a csontszövet aránya ez utóbbi csoportban  $24.1 \pm 2.4$  % volt. Habár ez az érték nem éri el az ép csonthoz tartozó BV/TV értéket, a többi vizsgálati csoporthoz képest szignifikáns javulást mutat (19. ábra).



**18. ábra.** Ex vivo MicroCT felvételek 11 hét elteltével. Az ábra reprezentatív képeket mutat be mindegyik vizsgálati csoportból. A legrosszabban, legjobban gyógyuló defektusok mellett, a csoportok medián elemeit is ábrázolja. Az albuminnal bevont csontpótló látványosan kedvezőbb újcsont képződést ért el.

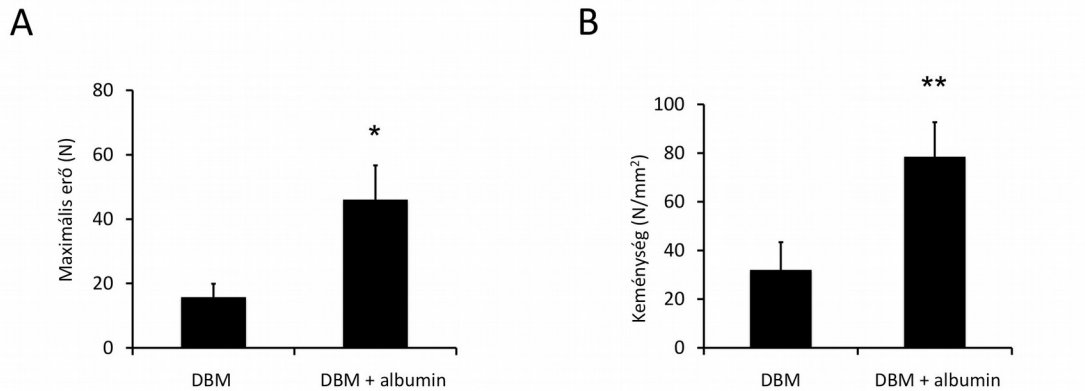


**19. ábra.** Újcsont képződés (BV/TV %) aránya a különböző vizsgálati csoportokban. Az y tengelyen a 100% az ép csont BV/TV% értékeit reprezentálja. Az albuminnal bevont csontpótló szignifikánsan magasabb újcsont képződés ért el mind a bevonat nélküli grafttal pótolta, mind az üresen hagyott defektusokat illetően. (n=6, egyutas ANOVA, Bonferroni post test, \*:  $p < 0.05$ , \*\*:  $p < 0.01$ )

#### 4.5.4. Biomechanikai vizsgálat

A biomechanikai vizsgálat során arra voltunk kíváncsiak, hogy az újcsont képződés hatására mennyire képes a beültetett csontmátrix az eredeti ép csonttal összekapcsolódni, és mechanikai stabilitást nyújtani. A bevonat nélküli csoportban  $15.7 \pm 4$  N erő kellett ahhoz, hogy a graftot az eredeti csonttal való összeköttetéseiből kimozdítsuk. Az albuminos csontgraftokkal kezelt csoportban azonban jelentősen nagyobb erőre,  $46.1 \pm 11$  N-ra volt szükség. A vizsgálatok során a törés minden esetben a graft és eredeti csont határán történt. A csont töréséig tartó lineáris terhelés következtében a csontok keménységéről is adatokat nyerhettünk. Ezek szerint a bevonat nélküli csontok keménysége  $32 \pm 11$  N/mm<sup>2</sup> volt, míg az albuminnal kezelt csoport az előzőnél szignifikánsan keményebbnek bizonyult ( $78.6 \pm 14$

N/mm<sup>2</sup>) (20. ábra). Fontos megjegyezni, hogy a vizsgálat során a minta adottságaiból kifolyólag kizárólag a különböző anyagokkal kitöltött, regenerálódott szöveteket vizsgáltuk, mert elsődleges kérdésünk a graft beépülésének hatékonysága volt, és nem pedig a csont ereje az ép szövethez viszonyítva. (Vizsgáltuk az üresen hagyott csonthiányokat is, de abból kifolyólag, hogy ebben a csoportban az újcsontképződés limitált, valamint a regeneráció a defektus széli részén történt csupán, a mechanikai tesztelés során elhanyagolható mértékű ellenállást tanúsítottak.)



**20. ábra.** Ex vivo mechanikai vizsgálat 11 hét elteltével. Az A panel a maximális törő erőt mutatja be, a B panel a beépült graftok keménységét vizsgálja. Mindkét esetben az albuminos bevonat szignifikánsan magasabb értékeket eredményezett. (n=6, párosítatlan t-próba, \*:  $p < 0.05$ )



## 5. Megbeszélés

Lágyszöveti sérülések ellátásában az elsődleges szempont a szövetfolytonosság helyreállítása. A varratkészítés ebből a szempontból még mindig mércének számít, hiszen egyszerűen alkalmazható, jó mechanikai eredményt hoz, és számos különböző varróanyag érhető el, ami lehetővé teszi a körültekintő varratkészítést. Ennek ellenére ismert, hogy a varratkészítés során, például inak esetében egy jól jelzett sejtmentes zóna alakul ki, és akár 14 napig is eltarthat, amíg ez a terület újra egészséges sejtekkel telik meg. A sejterápiás lehetőségek már megjelentek a lehetséges terápiás útvonalak között, alkalmazásuk hatékony lehet például izmok, inak vagy perifériás idegek gyógyulásának segítségével is. Ezekre a szövetekre, csakúgy, mint az ínszövetre, alacsony proliferációs képesség és sejtkecserelődés (turn over) jellemző, emiatt jelentős számú progenitor sejt bejuttatása segítheti a funkcionális szövet létrehozását.

Számos tudományos kutatás számol be arról, hogy parakrin faktorok, vagy a direkt sejt-sejt kapcsolat hasznos lehet a sérülést elszenvedett sejtpopuláció megsegítésére. A legfontosabb klinikai érv a sejterápiák mellett a szöveti funkcionalitás minél tökéletesebb helyreállítása. A sejterápiás módszerek alkalmazása ugyanakkor számos új kérdést vet fel. Az egyik ilyen kérdés a sejtek bejuttatásának módja. Szívsebészeti sejt-transzplantációs vizsgálatok arra mutatnak rá, hogy a sejtek bejuttatásának mikéntje sokkal fontosabb, mint azt korábban feltételeztük, hiszen minimális hipoxiás vagy mechanikai manipuláció esetleg a 3D struktúra hiánya károsíthatja a transzplantálandó sejteket és csökkentheti azok túlélését. A sejtek befecskendezése szuszpenzióként hasznos segítség lehet például izom disztrófiákban, végstádiumú végtag iszkémiában, ugyanakkor alkalmatlan szakadt ín, szalag vagy nagy izom esetében, hiszen ezekben az esetekben jól körülírt lókusyra kellene a sejteket bejuttatni, továbbá elérni, hogy a sérült régióban maradjanak. Előkísérleteink során ebbe a problémába ütköztünk bele, amikor összejteket próbáltunk lokális izomsérülést követően a sérülés környezetébe injektálni, de a módszer alkalmatlannak tűnt a pontos bejuttatásra. Sejtek bejuttatására számos esetben alkalmaznak háromdimenziós biokompatibilis mátrixokat, szcaffoldokat. A szcaffoldok alkalmazásából kiindulva merült fel, hogy sebészeti varróanyagokat használjunk sejtranszplantációs célra, így a mechanikai szövetegyesítéssel egy időben végezhetnénk sejterápiás beavatkozást is.

Annak ellenére, hogy ez az elképzelés egyszerű és kézenfekvő módszernek tűnik, alig néhány kutatócsoport foglalkozott vele ez idáig. Mazzoca, kísérleteiben, I. típusú kollagént kötött fonalak felszínére és azt vizsgálta, hogy javul-e ezáltal az oszteoblasztok és tenociták adhézíója, proliferációja és fehérje szintézise. Úgy találta, hogy mindezen funkciók javulnak

a kollagénnel bevont fonalak jelenlétében, ezért a kollagén bevonatú fonál javíthatja a gyógyulást a rotátor köpeny sérülését követően. Yao több különböző fehérjét is kipróbált, hogy növelje a kitapadó sejtek számát a fonalak felszínén. Kísérleteiben azt találta, hogy a fibronectin és a poli-l-lizin bevonat képes 8 nap inkubációt követően a legtöbb embrionális őssejtet magához kötni. További vizsgálataikat in explantátumokon végezték. Ezekben a kísérletekben megállapították, hogy a fonálra tapadó sejtek elviselik a varratkészítés során fellépő mechanikai stresszt, majd ezt követően még 96 órán keresztül metabolikusan aktívak maradnak. Yao további munkájában in vivo körülmények között vizsgálta módszerének hatékonyságát. Patkány Achilles ín átvágását követően azt találta, hogy a hetedik és tizedik napon szignifikánsan magasabb szakítószilárdsággal rendelkeznek azok az inak, melyek regenerációját exogén őssejtek is támogatták. A kísérlet egyébként 28 napig zajlott, és habár a későbbi időpontokban további funkcionális javulás nem volt észlelhető, a sejtek kimutathatóak maradtak. In vivo sejtes fonalakkal Pascual is végzett kísérleteket, azonban ő nem találta eredményesnek a metódust vastagbél varratok esetében. Fontos kiemelni, hogy a vastagbél saját regeneratív kapacitása, így a sejtek proliferációs képessége és cserélődése nagyon magas, ezért feltételezhető, hogy nincs szükség exogén sejtek bevitelére a funkcionális gyógyulás eléréséhez. Viszont ez a vizsgálat is rámutat arra, hogy a sejtsegregény szövetek esetében az exogén sejtek bevitele megteremtheti a funkcionális gyógyulás lehetőségét.

A mi vizsgálatunk célja az volt, hogy létrehozzunk egy olyan varróanyagot, melynek felületén néhány nap alatt számottevő sejtszámot tudunk elérni, illetve megvizsgáljuk a beültetett sejtek rövid és hosszú távú túlélését. Elsőként in vitro körülmények között vizsgáltuk, hogy alkalmas vehikulumok-e a sebészeti varróanyagok sejttanszplatációs célra. Kísérleteinkben sodrott fonalakat használtunk, tekintve, hogy ezáltal nagyobb és egyenetlenebb kitapadási felületet biztosítunk az őssejtek számára. Megfigyeléseink szerint a sejtek szívesen tapadnak a filamentumok alkotta árkokba, ami különösen előnyös, hiszen ily módon a varrás során fellépő mechanikai terheléstől védve helyezkednek el. Tekintve, hogy a fonalak alapvetően kisebb felületet képeznek, mint egy hasonló térfogatú porózus szkaffold, a kitapadó sejtszám érdekében szükségszerű, hogy törekedjünk a felület maximális kihasználására. Korábbi vizsgálatokat figyelembe véve megállapítottuk, hogy a kitapadó sejtszám növelhető, ha különböző fehérjékkel vonjuk be a fonalak felületét. Kísérleteinkben a szérum albumin kitapadást befolyásoló hatásait vizsgáltuk, és hasonlítottuk az irodalomban fellelhető adhéziós fehérjékkel elért eredményekhez. A fibronectint és a poli-l-lizint számos kísérletben alkalmazzák sejtheadhéziós molekulaként, az albumint azonban jóval kevesebbet. Ez érthető is, hiszen az albumin nem adhéziós fehérjeként létezik a köztudatban, köszönhetően számos

különböző funkciójának. Az albumin előnye, hogy nagy mennyiségben található a vérben, ezért tisztítási eljárásokkal az előző fehérjékhez képest lényegesen olcsóbban elérhető. Megjegyzendő, hogy jelen vizsgálatainkat megelőzően az albumint nem használták sebészeti varróanyagok bevonataként, a kitapadást fokozó hatásait is inkább nagyobb felületű, egyenetlenebb anyagokon vizsgálták. Megfigyeléseink szerint a sejtszám 24 óra elteltével nem különbözött szignifikánsan a csoportok között, azonban 48 óra elteltével az albumin bevonatú fonalakon jelentősen magasabb sejtszámot értünk el mind patkány mind humán sejtek esetében. Első méréseinket 24 és 48 óra elteltével végeztük, mert a sejterápiás technikáknál rendkívül fontos az időfaktor minimalizálása, hogy a módszer szabályozási szempontból megfeleljen a minimális manipuláció elvének. A hosszabb in vitro inkubáció következtében megkezdődhet a sejtek differenciációja is, ami újabb nem kívánt szabályozási problémákat vetne fel. A rövid inkubációs idő klinikai szempontból is sokkal jobban illeszthető a betegellátásba. Ezzel együtt fontos kérdés, hogy mi történik a sejtekkel hosszabb inkubációs idő alatt. A 48 órás inkubációt követően tehát új tápoldatot tettünk a fonalakra, és ezzel eltávolítottuk az összes sejtet, sejtörmelékét, melyek nem tapadtak a fonalakhoz. További öt napig tartó inkubáció során szignifikánsan magasabb sejtszámot figyelhettünk meg az albuminos fonalakon. Ez azt mutatja, hogy a korábbi vizsgálati időpontokban élő sejteket vizsgáltunk, melyek további osztódásra voltak képesek. Yao és munkatársai hasonló proliferációs aktivitást figyeltek meg különböző fehérjékkel. A fonalakra kitapadt sejtek metabolikus aktivitásából megállapították, hogy annak maximuma az ötödik napon van, majd némileg csökken. Ez a csökkenés feltételezhetően abból fakad, hogy a proliferációs aktivitás miatt elfogy a kitapadáshoz szükséges felület. Erre saját vizsgálataink is rámutatnak, hiszen 168 óra inkubációt követően a sejtek gyakorlatilag teljesen benövik a fonalakat, nem hagyva helyet a további osztódásnak.

A varróanyag kiválasztását a klinikai gyakorlatban a szakítószilárdság, a felszívódás és a célszövet tulajdonságai határozzák meg. Nem megfelelő választás esetén varratelégtség léphet fel, ami hátráltathatja a gyógyulást. Freudenberg in vitro kísérletei rámutattak arra, hogy jelentősen csökkenhet a felszívódó varróanyagok szakítószilárdsága különböző testnedvek hatására. Ezeket az eredményeket támasztja alá a Karabulut által végzett in vivo vizsgálat sorozat, amelyben hét különböző varróanyagot vizsgált szakítószilárdság és felszívódás szempontjából. Megállapította, hogy rendkívül fontos a varratválasztásnál a varróanyag jellemzőit és az egyesítendő szövet tulajdonságait is figyelembe venni. A sejtes fonalak előállításánál alkalmazunk extrém hideget, vákuumot, tápoldatos inkubációt. Szükségszerű tehát megvizsgálni, hogy változnak-e a fonalak gyári tulajdonságai, hiszen

hiába juttatunk progenitor sejteket a sérült területre, ha a varrat elsődleges célja, a mechanikai egyesítés nem, vagy csak részben teljesül.

Ebben a kísérletsorozatban megfigyeltük, hogy az egy hétig tartó tápoldatos inkubáció szignifikánsan, 16-19%-kal csökkenti a poliglaktin alapanyagú varróanyagok szakítószilárdságát. Ezek a fonalak jelentősen rövidebb idő alatt szívódnak fel in vivo környezetben. Ezzel szemben, ha csupán két napig tart az in vitro inkubáció, a fent említett tulajdonságok nem változnak jelentősen. Mivel a fonalak in vivo körülmények között főleg enzimatikusan szívódnak fel, fontos megállapítani, hogy a kitapadó csontvelői őssejtek befolyásolják-e az anyag tulajdonságait. Vizsgálataink szerint a felületen tapadó sejtek nincsenek hatással a szakítószilárdságra és felszívódásra egyik inkubációs intervallum esetében sem. Ezek alapján megállapítható, hogy az inkubációs idő, vagyis, hogy mennyi ideig tartózkodnak a fonalak 37°C-on tápoldatban, befolyásolja leginkább a fonalak szakítószilárdságát és felszívódását. A jelenség hátterében pedig a poliészter alapanyag spontán hidrolízisét állapítottuk meg, mely a tápoldat enzimmentessége miatt alapvetően lassú folyamat. Úgy tűnhet, hogy a gyorsabb felszívódás nem kedvezőtlen tulajdonság, hiszen javítja a fonál biokompatibilitását. Valójában a gyorsabb felszívódás is a spontán hidrolízis miatti anyagvesztés miatt alakul ki, tehát nem az anyag vált biokompatibilisabbá, hanem csupán a mennyisége csökkent. A fonalak biokompatibilitása a hordozott őssejtek miatt egyébként javulhat, hiszen az őssejtek kedvező immunmoduláns hatásai is érvényre juthatnak. Az előző kísérlet szerint 48 órás inkubáció elég, hogy számottevő mennyiségű sejtet tapasszunk a fonalakra, a jelen kísérlet pedig rávilágít, hogy a rövid inkubációs idővel sem a fonalak szakítószilárdságát, nem felszívódását sem módosítjuk. Ha figyelembe vesszük, hogy a sejtes fonalak főleg sejtzegény struktúrák egyesítésénél lehetnek hasznosak, ahol egy kisebb sejtpopuláció is elegendő lehet, érdemes a mechanikai funkciók megtartása miatt a rövidebb inkubációt választani.

A sejtes fonalak alkalmazása előtt jogosan merül fel a kérdés, hogy képesek-e élő sejtek bejuttatására. A módszer szempontjából fontos tényező a sejtek kitapadása, de a hatékonyság szempontjából a túlélés és proliferációs képesség ugyancsak lényeges. Biztató eredményeket mutatott Yao munkája. Kísérleteiben a sejtek jelentős számban túléltek az ínvarrat készítés okozta mechanikus irritációt, illetve több héten keresztül kimutathatóak maradtak. In vivo vizsgálatainkat patkány harántcsíkolt izomzaton, három időpontban végeztük: a beültetést követő második és hetedik napon, valamint öt hét elteltével. A beavatkozást követő második napon sejtek fellelhetőek voltak a varrat közvetlen környezetében, valamint a környező szövetben is. Hasonló képet kaptunk a hetedik napon is. Fontos lelet, hogy a sejtek nem csupán a varrat környezetében voltak, hanem a szövet mélyebb rétegeibe is vándoroltak.

Ismert, hogy sérülést követően a szövet először egy gyulladással választ generál, mely néhány napig tart, majd ennek lecsengésével indul meg a szöveti remodelláció. Éppen ezért lényeges, hogy az albumin bevonatú sejtes fonal segítségével bejuttatott sejtek életben maradtak 1 héttel a beültetést követően is, így részt vehetnek a regeneráció mindkét első fázisában. A kedvező immunmodulatív hatások a regeneráció gyulladással fázisában míg a parakrin és transzdzifferenciációs hatások ezt követően, a remodellációs fázisban érvényesülhetnek. Mindez csupán irodalmi adatokra alapuló feltételezés, hiszen jelen dolgozat témája nem terjed ki a légyszöveti őssejtterápia funkcionális hasznosságára, csupán egy beviteli módszert kínál. Emiatt az sem mérlegelhető, hogy az őssejtek szerepe melyik regeneratív fázisban fontosabb. Az elsődleges célunk viszont, hogy élő sejteket pontosan juttassunk a sérülés helyére, megvalósult. Nem elhanyagolható lelet az öt hetes vizsgálat eredménye sem. Eszerint a transzplantált sejtek kimutathatóak voltak a sértett területen, habár számuk jelentősen csökkent. A gyógyulási folyamatok lezárultával természetes azonban, hogy csökken harántcsíkolt izomban az aktív őssejtek száma. Ezek a sejtek ilyenkor nyugvó állapotba kerülnek, hiszen az intenzív osztódási aktivitásra nincsen már szükség .

A szérumban albumin tehát alkalmasnak bizonyult, hogy fokozza a sejtek kitapadását poliglaktin anyagú varróanyagok felületén, illetve hogy élő sejteket juttasson olyan szövetekbe, ahol a varratkészítés lenne az első választandó beavatkozás. Tudván, hogy az albumin kedvező környezetet biztosított a kitapadó őssejtek túléléséhez és proliferációjához, feltételezhető, hogy ez a hatás in situ körülmények között is segíti a regenerációt.

A szérumban albumin nem az egyetlen vérfrakció, amit intenzív kutatási érdeklődés övez. A vérfrakciók kedvelt adjuvánsai a csontpótló beavatkozásoknak, bár a csontpótlás mércéje továbbra is az autológ csont átültetése. A módszer többlet műtéti terhelést jelent, donor területi komplikációkat eredményezhet, mindazonáltal sokszor a donor csont mennyisége sem elegendő . Ebből kifolyólag használnak széleskörben a csontpótló szakmák csontbankból származó különféle tisztított csont készítményeket is. Ezek friss fagyasztott, fagyasztva-szárított, vagy demineralizált formában érhetők el . Csontkészítmények alkalmazásakor természetesen elegendő mennyiségben áll rendelkezésre a pótló anyag, használatuk biztonságos, mert erős fizikai-kémiai tisztítási eljárásokat alkalmaznak, hogy az antigéneket eltávolítsák, és csökkentsék a fertőzés átvitel veszélyét. Ebből fakad a csontkészítmények hátránya is, hiszen a tisztítási folyamatok miatt elveszítik a csontosodást elősegítő faktorokat is . Ezek pótlására jönnek szóba a különböző vérfrakciók, mint például a trombocitában gazdag plazma, kiegészítő használata. A trombocita dúsítást követően a trombociták aktivációja is megtörténik, ezáltal nagy mennyiségű növekedési faktor áll rendelkezésre a regeneratív folyamatokhoz. Habár kétség nem fér ahhoz, hogy számos oszteogén faktor is

jelen van ezekben a koncentrátumokban, a klinikai eredmények mégsem egyértelműek . Ennek magyarázata a különböző előállítási technológiákban is keresendő. A fibrin jelenléte például jelentősen befolyásolja a hasznos molekulák koncentrációját . Ezenkívül a fehérvérsejtek jelenléte kapcsán vérfrakciókban egyéb csontosodást gátló faktorok is jelen lehetnek. Ilyenek például a proinflammatorikus citokinek, melyek jelenlétükkel hátráltatják a szöveti remodelláció intenzív beindulását . A csontosodás beindítására nem csupán vérkészítmények jöhetnek szóba. Számos vizsgálatban használnak például rekombináns csont morfogén fehérjéket (BMP 2-7) csontpótlókkal együtt, és érnek el gyorsabb gyógyulást . A BMP-k hatásmechanizmusa precízen vizsgált , és semmi kétség, hogy erős csontosodást képesek indukálni, ugyanakkor a megfelelő dózisparaméterek nem ismertek. Nem meglepő, hogy túlzott gyakorisággal fordul elő klinikai vizsgálatok során az ektópiás csonttermelés, ami a regeneráció során nem kívánt mellékhatásként jelentkezik . A klinikai vizsgálatok egy része ezért biztonsági kérdésekre hivatkozva megkérdőjelezi a BMP-k használatát . Az is igaz, hogy ezeket a fehérjéket általában önmagukban alkalmazzák, holott az optimális proliferációhoz és szöveti regenerációhoz számos egyéb különböző koncentrációjú csontosodási faktorra lenne szükség. Látszólag a BMP-k az egyik, míg a thrombocitával dúsított vérkészítmények a másik végletet képviselik.

A szérum albumin alkalmazásával kutatócsoportunk a középutat választotta. Figyelembe vettük az albumin molekula ismert, önálló hatásait, mint például a sejt kultúra gyakorlatból jól ismert proliferatív hatást , ugyanakkor előállításából fakadóan vérkészítmény jellege is megmarad, és mint transzport molekula több különböző hatóanyag forrása lehet. Fontos tapasztalatnak számítanak továbbá az albumin fonalakon mutatott adhezív tulajdonságai, valamint Weszl munkája, ahol allograft típusú csontpótló szerek felületén találta hatékonynak az albumint a sejtek proliferációjának elősegítésében . Hasonló kísérletben az albuminos allograft sikeresen egyesített nem gyógyuló törvégeket patkány combcsont modellben, míg az albumint nem tartalmazó csontpótló elégtelennek bizonyult . Később, egy 10 esetből álló humán vizsgálatban albuminnal bevont allograftot használtunk aszeptikus arthroplastikában, ahol a graftok feladata a fém protézis megtámasztása volt . Az albuminos graft használhatónak és biztonságosnak tűnt a műtét során, a beültetett graftnak megfelelően pedig aktív csontosodási folyamatok zajlottak még 12 hónappal a beültetést követően is.

Az allograft típusú csontpótlók jellemzője, hogy ásványi anyag tartalmuk megtartott, ezért használják őket olyan terápiákban, ahol rögtön a műtétet követően fontos a beültetett graft jó mechanikai stabilitása. Kedvező esetben a graft idővel teljesen átépülhet, ami azonban nem tekinthető gyorsnak, hiszen az ásványi anyag tartalmat először lebontja a szervezet, majd újra felépíti a funkcionális csontot. Azokban az esetekben viszont, ahol nem teherviselő régió

csontpótlására kerül sor, széleskörben elterjedtek a demineralizált csontmátrixok is. Használatuk biztonságos, hiszen az immunogén komponenseket hatékonyan távolítják el. A DBM fő hátránya, hogy jelentősen csökkent az ásványi anyag tartalma, ezért mechanikailag gyengébb az allograftokhoz képest. Ebből a hátrányból fakad ugyanakkor a fő előnye is, mert a tisztítási eljárások miatt felszínre kerülnek olyan extracelluláris mátrix alkotók, mint az oszteokonduktív kollagén és az oszteoinduktív BMP, valamint a reziduális szeretlen állományt sem kell lebontani. Az oszteoinduktív hatása azonban sokszor nem elég erős. Állatkísérletek mutatják, hogy habár képes csontszövet képződését indukálni, a keletkező csont mennyisége és minősége jelentősen elmarad az autológ csontétól, vagy attól, amit supra-fiziológiás BMP adásával el lehet érni. Alae és munkatársai egy egér modell segítségével vizsgáltak oszteogén reporter géneket, de csupán csekély oszteoinduktív hatást mértek. Még rosszabb a helyzet, ha a DBM-et kritikus méretű csonthiányok pótlására használják, például patkányoknál 8 hét alatt csupán csekély csontosodást produkált. Ennek ellenére, humán gerincsebészeti eljárásokban előszeretettel használják, mert autograftal kiegészítve szép eredményeket mutat, önmagában azonban itt sem állja meg a helyét. Azoknál a műtéti beavatkozásoknál tehát, ahol autograft (pl. spongiosa darabkák) egyébként is képződik, a DBM hasznos térfogatnövelőként válhat be. Felmerül a kérdés, hogy autograft hiányában javítható-e a DBM csontregeneratív tulajdonsága. A hiányzó oszteogenitást őssejtekkel meg lehetne oldani, de jelenleg még regulációs és financiális gátak akadályozzák az őssejttranszplantáció ez irányú elterjedését. Láthattuk, hogy az őssejtek jelenléte sejtsegregény struktúrák esetében jelentős eredményeket hoz, de elgondolkodtató, hogy csont esetében valóban szükséges-e exogén sejtek használata, hiszen a csontvelő és a periosteum tettekreész őssejtpopulációval rendelkezik. A csontvelői sejtek szívesen tapadtak a szérumban albumin felszínhez fonalak esetében, és ezt követően jelentős proliferációra képesek. A proliferáció támogatása Weszl allograftos kísérletében is megmutatkozott. Nem meglepő, hogy a csontvelői sejtek albuminnal bevont demineralizált csontmátrix felületére is szívesen tapadnak. Kísérletünkben 6, 12 és 24 óra elteltével vizsgáltuk a kitapadó sejtszámot és mindegyik időpontban szignifikánsan magasabb sejtszámot figyelhettünk meg bevonat nélküli DBM-mel szemben. Ez a kísérlet is rávilágít arra, hogy a szérumban albumin kedvező környezetet biztosít az őssejtek kitapadásához, függetlenül a hordozó struktúra alapanyagától. Elképzeléseink szerint az endogén prekursor sejtek in vivo körülmények között is hasonlóan viselkednek, éppen ezért az albumin graft hatására megnövekedhet a lokális őssejt populáció. Az emelkedett lokális sejtszám csontregenerációban betöltött hasznára számtalan tudományos közlemény rávilágít, nem meglepő tehát, hogy különféle sejttranszplantációs eszközök, háromdimenziós hordozófelületek és in vitro előállított élő szövetek iránt megnőtt a

tudományos érdeklődés. Külön érdekes Gallego munkája, hiszen ő albumint használt alapanyagként, és úgy találta, hogy az előállított hordozóra szívesen tapadnak az oszteoblasztok, és ezáltal gyorsabb gyógyulás érhető el nyulak mandibula defektusán 11 hét elteltével. Gallego másik publikációja pedig arra világít rá, hogy az albuminos vázon bejuttatott sejtek ektópiás lokalizációban is képesek a csontregeneráció és a mineralizációs folyamatok beindítására. A szerző sajnos nem említi, hogy sejtmentes, azaz csupán albuminból előállított graftot kipróbált volna, pedig az jó összehasonlítási alap lenne a mi munkánkkal. Ez az eredmény ugyanakkor biztató is, hiszen az általunk alkalmazott albuminos csont sejtadhezív tulajdonságai miatt exogén sejtek bejuttatására is alkalmas lehet, erre azonban a sejterápiás eljárások széleskörű elterjedéséig még várni kell. In vivo kísérletünkben fagyasztva-szárított, sejtmentes, humán szérumból albuminnal bevont demineralizált csontmátrix gyógyulását vizsgáltuk. A kéthetente végzett CT vizsgálattal lehetőségünk nyílt a gyógyulás dinamikájának nyomonkövetésére. Megállapítottuk, hogy a kritikus méretű csonthiányok patkányok parietális koponya-csontján szérumból albumin segítségével már a hetedik hétre záródtak. A csontosodás további előrehaladását pedig a denzitás paraméterek növekedése támasztotta alá. Az albumin nélküli csoport esetében ez a kedvező dinamikájú csontosodás nem volt megfigyelhető. In vivo méréseink validálása érdekében a 11 hét lejárta után microCT felvételeket is készítettünk a parietális csontdarabokról. A vizsgálat igazolta az in vivo képalkotásnál tapasztaltakat, hiszen az albuminos csoportban az újcsontképződés szignifikánsan magasabb volt. Elvégeztük a regenerálódott csontszövet funkcionális vizsgálatát is: a biomechanikai tesztelés egybeesett a képalkotó technikák eredményeivel. A törésteszt során az albuminnal bevont graft kitöréséhez szignifikánsan magasabb erőre volt szükség, valamint a graft kedvezőbb szilárdsági mutatókat produkált. A mérésnél nem az ép terület tulajdonságait hasonlítottuk a pótolthoz, hanem a különböző grafttal pótolta területeket egymáshoz, különös tekintettel az épcsont-graft határra. Ameddig ugyanis a csontosodás tökéletesen be nem fejeződik, addig ez a terület mindig gyenge pont marad. A vizsgálat eredményeit azért is rendkívül fontos kiemelni, mert a csont egyik fő feladata, a csontvelőhöz köthető funkciók mellett, a biomechanikai tulajdonságaiból adódik. Ezek alapján megállapítható, hogy az albuminos grafttal a szövet funkcionális gyógyulását segítettük elő.

Az állatmodell megválasztása minden tudományos kísérletben rendkívül fontos. A csontgyógyulás vizsgálatánál ezen belül is a defektusok mérete meghatározó. A különbség a nem-egyesített és kritikus méretű között az, hogy a kritikus méretű csonthiányoktól teljes spontán gyógyulást nem várhatunk, ezért használhatóak különböző csontpótlók adekvát összehasonlítására. A kritikus méret azonban, fajoként, kortól és csont típusától függően



változhat, ezért fontos ezek pontos ismerete . Nem érdemes túl nagy defektust sem létrehozni, hiszen a százalékos gyógyulás eltörpülhet a létrehozott hiány eredeti nagysága mellett, ezért kevésbé releváns eredményt kapunk. A százalékos gyógyulás (new bone formation%, NBF%) egyébként általánosan használt mércéje a csontregenerációnak , amit saját vizsgálatainkban is használtunk, azzal a különbséggel, hogy mi a visszamaradó hiány százalékos értékét tüntettük fel. A kezdeti defektus mérete a kísérleteinkben 4 mm-es volt, melyek spontán záródása eredményeink alapján nem teljesül a 11. hétre. A gyógyulás dinamikájára jellemző, hogy míg a vizsgálat elején intenzívebb csontosodás zajlott, szignifikánsan csökkenő csonthiánnyal, addig a vizsgálat végére a csonthiány mérete a későbbi vizsgálati időpontokban alig változik. Ebből arra következtetünk, hogy az üresen hagyott hiányok záródása a későbbiekben sem fog bekövetkezni. A kritikus méretű csonthiányok méretével foglalkozó munkák patkányok esetében 5 mm-esnek határozza meg az egyoldali kerek defektust . Ez az összefoglaló kiemeli azt is, hogy kisebb méretű csonthiányok is megfelelhetnek, de nem áll rendelkezésre elég adat ahhoz, hogy ez megállapítható legyen. A kísérleteink tervezésénél fontos volt, hogy kétoldali, tehát parietalis csontonként egy hiányt tudjunk létrehozni, ezzel felére csökkentettük a kísérlet állatigényét . A műtéti technikánál pedig szem előtt tartottuk, hogy a koponyavarratok érintetlenek maradjanak. Erre azért van szükség, mert a koponyavarratok csontosodása, elhúzódozó jellege miatt, eltérhet a normál csontszövetétől. Mérlegelendő továbbá, hogy a varratok épen hagyásával a vénás sinusok megnyílásának veszélyét is csökkentjük. Az 5 mm-es hiány létrehozása az anatómiai és technikai felszereltség miatt azonban kissé veszélyeztette volna a kísérlet kimenetelét, ezért 4 mm-es defektus létrehozása mellett döntöttünk, melynek elhelyezése már kivitelezhetőnek tűnt. Habár korábban megállapítottuk, hogy 11 hét alatt ez a defektus nem gyógyul, a pontos besorolás elengedhetetlen volt. Hosszú távú megfigyeléseink azt mutatták, hogy a 4 mm-es üresen hagyott csonthiányok fél évvel a műtétet követően sem záródnak, emiatt kritikus méretűnek tekinthetőek . Ebben a kísérletsorozatban lehetőség nyílt annak vizsgálatára is, hogy alkalmas-e a DBM hosszabb távon a teljes csontgyógyulás elősegítéséhez, hiszen a demineralizációs eljárások nemcsak az oszteoinduktív és oszteogén faktorokat, hanem az ásványi anyagok nagy részét is eltávolítják. A DBM-mel töltött defektusok a vizsgálat végére a képalkotó vizsgálatok szerint gyakorlatilag teljes gyógyulást mutattak. Ezt igazolta az is, hogy a gyógyult csontszövetben a kalcium 80%-a, és a csontot alkotó többi elem nagy része közel teljesen visszaépült . Habár az elhúzódozó gyógyulás miatt a DBM ettől függetlenül kombinációs terápiaként jön majd szóba, fontos ismeret, hogy önmagában is képes minőségében és mennyiségében megfelelő csontosodást elérni, még kritikus méretű defektusokban is.

## 6. Következtetés

A kísérletes munkám során a következő eredményekre jutottam:

1. Bebizonyosodott, hogy a mezenhimális őssejtek nagy számban képesek kitapadni különböző szérum albuminnal bevont biokompatibilis anyagokra, így poli-észter sebészeti varróanyagokra és demineralizált csontmátrixra. Az albumin molekula vélhetően fizikokémiai és biológiai hatások által egyaránt kedvező környezetet biztosít a mezenhimális őssejtek kitapadásához, túléléséhez és szaporodásához.
2. Bebizonyosodott az is, hogy az albuminos felület jól funkcionál átmeneti hordozóként, vagyis a szövetbe ültetést követően a sejtek a felületet elhagyva mélyebb rétegekbe vándorolnak, így jelen vannak a regenerálódó szövetben. A sebészeti varróanyagok tehát alkalmasnak bizonyultak arra, hogy koncentráltan, meghatározott lókuszcsoportra jutassunk sejteket.
3. Az albumin molekula ezenkívül, feltehetően aktív komponensként, részt vesz a csontregenerációs folyamatokban, hiszen jelentősen javította a demineralizált csontmátrix beépülését, és a csontiány regenerációját kritikus méretű csontdefektusok esetében. Az albumin molekula minden bizonnyal az endogén progenitorok rekrutálásával éri el a szignifikánsan magasabb mértékű újcsont képződést. A funkcionalitás javulását a mechanikai vizsgálat igazolta, melyben az albuminnal kezelt csontdefektusok szignifikánsan magasabb teherbírást és keménységet értek el.

## 7. Összefoglalás

Munkám során a szérumban albumin csont-, és lágyszövet regenerációt befolyásoló hatásaival foglalkoztam. Az ortopédiai lágyszövetek regenerációs jellegéből kifolyólag hasznos adjuváns lehet az őssejtterápia, mely kivitelezésére a szérumban albuminnal bevont felszívódó varróanyag alkalmas lehet, hiszen a fehérje kedvező környezetet biztosít a sejtek kitapadásához, túléléséhez és proliferációjához. Technikailag kiemelő, hogy nem bonyolítja a sebészeti technikát sem, mert olyan esetekben lenne használható, ahol egyébként is varrattal történik a sebészeti rekonstrukció. A csontszövet esetében megkérdőjelezhető azonban az őssejttranszplantáció szükségessége, mert mind a csontvelő, mind a periosteum könnyen aktivizálja a progenitor sejteket. Kritikus méretű csonthiányoknál ez mégsem elegendő, ezért szükséges különböző csontpótlók és csontosodást elősegítő anyagok használata. A szérumban albumin (exogén sejtek bejuttatása nélkül) sikeresen javította az oszteokonduktív DBM csontpótló gyógyulását, mely mind radiológiailag, mind mechanikailag megfelelőnek bizonyult. A szérumban albumin feltehetően rekrutáló és proliferatív hatást gyakorol az endogén progenitor sejtekre, ezért a gyógyulás gyulladáshoz vezető fázisát követően magasabb számú sejt áll rendelkezésre a szöveti remodelláció beindítására. A molekula erős oszteoinduktivitása miatt így endogén őssejtek bevonásával végezhető őssejtterápia. A szérumban albumin, hasznossága mellett, könnyen elérhető, tisztított jellegéből kifolyólag kiszámítható hatásokat eredményez. Nem kétséges, hogy létezik olyan hatóanyag, vagy szövetépítési stratégia, mely jelen munkában leírtakat gyorsabban vagy eredményesebben képes megvalósítani, de azok széleskörű elterjedéséig a szérumban albumin elérhetősége és megkérdőjelezhetetlen biokompatibilitása miatt fontos adjuvánsa lehet számos klinikai indikációnak.

## 8. Summary

In the present work we investigated the role of serum albumin in the regeneration of the musculoskeletal system. Stem cell therapy is a promising adjuvant supporting the remodelling of musculoskeletal soft tissues, and since serum albumin provides a convenient milieu for stem cell attachment, survival and proliferation, application of coated sutures seems to be an ideal tool for this purpose. From a clinical point of view, this new cell transplantation technique can be used in the everyday surgical practice without complicating the surgical procedure itself. Exogenous stem cell delivery regarding bone tissue, on the other hand, is questionable, since both bone marrow and periosteum possess a large number of progenitors, ready to act after bone injury. In critical size bone defects this activation is still not enough, therefore various bone substitutes and osteoinductive agents are used to repair the damaged tissue. In the present work, serum albumin coated demineralized bone matrix successfully enhanced the healing of critical size bone defects without exogenous stem cell delivery. The regenerated bone tissue showed significantly better results both radiographically and mechanically, compared to uncoated demineralized bone matrix. Our conclusion was that serum albumin recruits endogenous progenitors and supports their proliferation, as a result a higher cell number is present at the defect site initiating the tissue remodelling phase. Considering the strong osteoinductive capacity of serum albumin, stem cell therapy can be achieved without exogenous stem cell transplantation. Serum albumin is also easily accessible and, due to its purified nature and well investigated properties, it is safe to use. There is no question that highly developed tissue engineering techniques will provide better or maybe perfect solution in the future, but until then, serum albumin based products could be important adjuvants in musculoskeletal tissue regeneration.

## 9. Irodalomjegyzék

1. Wislet-Gendebien S, *Advances in Regenerative Medicine*, in *Advances in Regenerative Medicine*, S. Wislet-Gendebien, Editor. 2011, InTech.
2. Ioannidou E. (2006) Therapeutic modulation of growth factors and cytokines in regenerative medicine. *Curr Pharm Des*, 12: 2397-408.
3. Thomas ED. (1999) Bone marrow transplantation: a review. *Semin Hematol*, 36: 95-103.
4. Johnson PC. (2000) The role of tissue engineering. *Adv Skin Wound Care*, 13: 12-4.
5. Lavik E, Langer R. (2004) Tissue engineering: current state and perspectives. *Appl Microbiol Biotechnol*, 65: 1-8.
6. Lee JY, Choi YS, Lee SJ, Chung CP, Park YJ. (2011) Bioactive peptide-modified biomaterials for bone regeneration. *Curr Pharm Des*, 17: 2663-76.
7. Kaariainen M, Jarvinen T, Jarvinen M, Rantanen J, Kalimo H. (2000) Relation between myofibers and connective tissue during muscle injury repair. *Scand J Med Sci Sports*, 10: 332-7.
8. Shen Wei JH, *Tissue Therapy: Implications of Regenerative Medicine for Skeletal Muscle*, in *Principles of Regenerative Medicine*, R.L. Anthony Atala, Robert Nerem, James Thomson, Editor. 2008, Elsevier Inc. p. 1232-1247.
9. Ebisui C, Tsujinaka T, Morimoto T, Kan K, Iijima S, Yano M, Kominami E, Tanaka K, Monden M. (1995) Interleukin-6 induces proteolysis by activating intracellular proteases (cathepsins B and L, proteasome) in C2C12 myotubes. *Clin Sci (Lond)*, 89: 431-9.
10. Mbebi C, Hantai D, Jandrot-Perrus M, Doyennette MA, Verdier-Sahuque M. (1999) Protease nexin I expression is up-regulated in human skeletal muscle by injury-related factors. *J Cell Physiol*, 179: 305-14.
11. Clanton TL, Zuo L, Klawitter P. (1999) Oxidants and skeletal muscle function: physiologic and pathophysiologic implications. *Proc Soc Exp Biol Med*, 222: 253-62.
12. Beaton LJ, Allan DA, Tarnopolsky MA, Tiidus PM, Phillips SM. (2002) Contraction-induced muscle damage is unaffected by vitamin E supplementation. *Med Sci Sports Exerc*, 34: 798-805.
13. Childs A, Jacobs C, Kaminski T, Halliwell B, Leeuwenburgh C. (2001) Supplementation with vitamin C and N-acetyl-cysteine increases oxidative stress in humans after an acute muscle injury induced by eccentric exercise. *Free Radic Biol Med*, 31: 745-53.
14. McLennan IS. (1993) Resident macrophages (ED2- and ED3-positive) do not phagocytose degenerating rat skeletal muscle fibres. *Cell Tissue Res*, 272: 193-6.
15. St Pierre BA, Tidball JG. (1994) Differential response of macrophage subpopulations to soleus muscle reloading after rat hindlimb suspension. *J Appl Physiol* (1985), 77: 290-7.
16. Shen W, Li Y, Tang Y, Cummins J, Huard J. (2005) NS-398, a cyclooxygenase-2-specific inhibitor, delays skeletal muscle healing by decreasing regeneration and promoting fibrosis. *Am J Pathol*, 167: 1105-17.
17. Mauro A. (1961) Satellite cell of skeletal muscle fibers. *J Biophys Biochem Cytol*, 9: 493-5.
18. Hurme T, Kalimo H. (1992) Activation of myogenic precursor cells after muscle injury. *Med Sci Sports Exerc*, 24: 197-205.
19. Charge SB, Rudnicki MA. (2004) Cellular and molecular regulation of muscle regeneration. *Physiol Rev*, 84: 209-38.

20. Collins CA, Olsen I, Zammit PS, Heslop L, Petrie A, Partridge TA, Morgan JE. (2005) Stem cell function, self-renewal, and behavioral heterogeneity of cells from the adult muscle satellite cell niche. *Cell*, 122: 289-301.
21. Zammit P, Beauchamp J. (2001) The skeletal muscle satellite cell: stem cell or son of stem cell? *Differentiation*, 68: 193-204.
22. Doyonnas R, LaBarge MA, Sacco A, Charlton C, Blau HM. (2004) Hematopoietic contribution to skeletal muscle regeneration by myelomonocytic precursors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101: 13507-12.
23. Camargo FD, Green R, Capetanaki Y, Jackson KA, Goodell MA. (2003) Single hematopoietic stem cells generate skeletal muscle through myeloid intermediates. *Nat Med*, 9: 1520-7.
24. LaBarge MA, Blau HM. (2002) Biological progression from adult bone marrow to mononucleate muscle stem cell to multinucleate muscle fiber in response to injury. *Cell*, 111: 589-601.
25. Palermo AT, Labarge MA, Doyonnas R, Pomerantz J, Blau HM. (2005) Bone marrow contribution to skeletal muscle: a physiological response to stress. *Dev Biol*, 279: 336-44.
26. Florini JR, Ewton DZ, Coolican SA. (1996) Growth hormone and the insulin-like growth factor system in myogenesis. *Endocr Rev*, 17: 481-517.
27. Engert JC, Berglund EB, Rosenthal N. (1996) Proliferation precedes differentiation in IGF-I-stimulated myogenesis. *J Cell Biol*, 135: 431-40.
28. Zdanowicz MM, Moyse J, Wingertzahn MA, O'Connor M, Teichberg S, Slonim AE. (1995) Effect of insulin-like growth factor I in murine muscular dystrophy. *Endocrinology*, 136: 4880-6.
29. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SC, Huard J. (1998) Development of approaches to improve the healing following muscle contusion. *Cell Transplant*, 7: 585-98.
30. Kasemkijwattana C, Menetrey J, Bosch P, Somogyi G, Moreland MS, Fu FH, Buranapanitkit B, Watkins SS, Huard J. (2000) Use of growth factors to improve muscle healing after strain injury. *Clin Orthop Relat Res*, 272-85.
31. Menetrey J, Kasemkijwattana C, Day CS, Bosch P, Vogt M, Fu FH, Moreland MS, Huard J. (2000) Growth factors improve muscle healing in vivo. *J Bone Joint Surg Br*, 82: 131-7.
32. Allen RE, Sheehan SM, Taylor RG, Kendall TL, Rice GM. (1995) Hepatocyte growth factor activates quiescent skeletal muscle satellite cells in vitro. *J Cell Physiol*, 165: 307-12.
33. Bischoff R. (1997) Chemotaxis of skeletal muscle satellite cells. *Dev Dyn*, 208: 505-15.
34. Tatsumi R, Anderson JE, Nevoret CJ, Halevy O, Allen RE. (1998) HGF/SF is present in normal adult skeletal muscle and is capable of activating satellite cells. *Dev Biol*, 194: 114-28.
35. Miller KJ, Thaloor D, Matteson S, Pavlath GK. (2000) Hepatocyte growth factor affects satellite cell activation and differentiation in regenerating skeletal muscle. *Am J Physiol Cell Physiol*, 278: C174-81.
36. Allen RE, Boxhorn LK. (1989) Regulation of skeletal muscle satellite cell proliferation and differentiation by transforming growth factor-beta, insulin-like growth factor I, and fibroblast growth factor. *J Cell Physiol*, 138: 311-5.
37. Doumit ME, Cook DR, Merkel RA. (1993) Fibroblast growth factor, epidermal growth factor, insulin-like growth factors, and platelet-derived growth factor-BB stimulate proliferation of clonally derived porcine myogenic satellite cells. *J Cell Physiol*, 157: 326-32.

38. Barnard W, Bower J, Brown MA, Murphy M, Austin L. (1994) Leukemia inhibitory factor (LIF) infusion stimulates skeletal muscle regeneration after injury: injured muscle expresses lif mRNA. *J Neurol Sci*, 123: 108-13.
39. Takeshita S, Pu LQ, Stein LA, Sniderman AD, Bunting S, Ferrara N, Isner JM, Symes JF. (1994) Intramuscular administration of vascular endothelial growth factor induces dose-dependent collateral artery augmentation in a rabbit model of chronic limb ischemia. *Circulation*, 90: II228-34.
40. Takeshita S, Zheng LP, Brogi E, Kearney M, Pu LQ, Bunting S, Ferrara N, Symes JF, Isner JM. (1994) Therapeutic angiogenesis. A single intraarterial bolus of vascular endothelial growth factor augments revascularization in a rabbit ischemic hind limb model. *J Clin Invest*, 93: 662-70.
41. Huard J, Li Y, Fu FH. (2002) Muscle injuries and repair: current trends in research. *J Bone Joint Surg Am*, 84-A: 822-32.
42. Lipton BH, Schultz E. (1979) Developmental fate of skeletal muscle satellite cells. *Science*, 205: 1292-4.
43. Heslop L, Beauchamp JR, Tajbakhsh S, Buckingham ME, Partridge TA, Zammit PS. (2001) Transplanted primary neonatal myoblasts can give rise to functional satellite cells as identified using the Myf5nlacZl<sup>+</sup> mouse. *Gene Ther*, 8: 778-83.
44. Daniel Skuk JPT, *Myoblast Transplantation in Skeletal Muscles*, in *Principles of Regenerative Medicine* R.L. Anthony Atala, James A. Thomson, Robert M. Nerem Editor. 2011, Elsevier Inc. p. 779-793.
45. Law PK, Bertorini TE, Goodwin TG, Chen M, Fang QW, Li HJ, Kirby DS, Florendo JA, Herrod HG, Golden GS. (1990) Dystrophin production induced by myoblast transfer therapy in Duchenne muscular dystrophy. *Lancet*, 336: 114-5.
46. Mendell JR, Kissel JT, Amato AA, King W, Signore L, Prior TW, Sahenk Z, Benson S, McAndrew PE, Rice R, et al. (1995) Myoblast transfer in the treatment of Duchenne's muscular dystrophy. *N Engl J Med*, 333: 832-8.
47. Fan Y, Maley M, Beilharz M, Grounds M. (1996) Rapid death of injected myoblasts in myoblast transfer therapy. *Muscle Nerve*, 19: 853-60.
48. Skuk D, Roy B, Goulet M, Tremblay JP. (1999) Successful myoblast transplantation in primates depends on appropriate cell delivery and induction of regeneration in the host muscle. *Exp Neurol*, 155: 22-30.
49. Guerette B, Asselin I, Vilquin JT, Roy R, Tremblay JP. (1994) Lymphocyte infiltration following allo- and xenomyoblast transplantation in mice. *Transplant Proc*, 26: 3461-2.
50. Peault B, Rudnicki M, Torrente Y, Cossu G, Tremblay JP, Partridge T, Gussoni E, Kunkel LM, Huard J. (2007) Stem and progenitor cells in skeletal muscle development, maintenance, and therapy. *Mol Ther*, 15: 867-77.
51. Shadrin IY, Khodabukus A, Bursac N. (2016) Striated muscle function, regeneration, and repair. *Cell Mol Life Sci*,
52. Laumonier T, Menetrey J. (2016) Muscle injuries and strategies for improving their repair. *J Exp Orthop*, 3: 15.
53. Relaix F, Weng X, Marazzi G, Yang E, Copeland N, Jenkins N, Spence SE, Sassoon D. (1996) Pw1, a novel zinc finger gene implicated in the myogenic and neuronal lineages. *Dev Biol*, 177: 383-96.
54. Mitchell KJ, Pannerec A, Cadot B, Parlakian A, Besson V, Gomes ER, Marazzi G, Sassoon DA. (2010) Identification and characterization of a non-satellite cell muscle resident progenitor during postnatal development. *Nat Cell Biol*, 12: 257-66.
55. Joe AW, Yi L, Natarajan A, Le Grand F, So L, Wang J, Rudnicki MA, Rossi FM. (2010) Muscle injury activates resident fibro/adipogenic progenitors that facilitate myogenesis. *Nat Cell Biol*, 12: 153-63.

56. Tedesco FS, Cossu G. (2012) Stem cell therapies for muscle disorders. *Curr Opin Neurol*, 25: 597-603.
57. Natsu K, Ochi M, Mochizuki Y, Hachisuka H, Yanada S, Yasunaga Y. (2004) Allogeneic bone marrow-derived mesenchymal stromal cells promote the regeneration of injured skeletal muscle without differentiation into myofibers. *Tissue Eng*, 10: 1093-112.
58. Andrade BM, Baldanza MR, Ribeiro KC, Porto A, Pecanha R, Fortes FS, Zapata-Sudo G, Campos-de-Carvalho AC, Goldenberg RC, Werneck-de-Castro JP. (2015) Bone marrow mesenchymal cells improve muscle function in a skeletal muscle re-injury model. *PLoS One*, 10: e0127561.
59. Matziolis G, Winkler T, Schaser K, Wiemann M, Krockner D, Tuischer J, Perka C, Duda GN. (2006) Autologous bone marrow-derived cells enhance muscle strength following skeletal muscle crush injury in rats. *Tissue Eng*, 12: 361-7.
60. Wolf MT, Daly KA, Reing JE, Badylak SF. (2012) Biologic scaffold composed of skeletal muscle extracellular matrix. *Biomaterials*, 33: 2916-25.
61. Perniconi B, Costa A, Aulino P, Teodori L, Adamo S, Coletti D. (2011) The pro-myogenic environment provided by whole organ scale acellular scaffolds from skeletal muscle. *Biomaterials*, 32: 7870-82.
62. De Coppi P, Bellini S, Conconi MT, Sabatti M, Simonato E, Gamba PG, Nussdorfer GG, Parnigotto PP. (2006) Myoblast-acellular skeletal muscle matrix constructs guarantee a long-term repair of experimental full-thickness abdominal wall defects. *Tissue Eng*, 12: 1929-36.
63. Murakami K, Aoki H, Nakamura S, Takikawa M, Hanzawa M, Kishimoto S, Hattori H, Tanaka Y, Kiyosawa T, Sato Y, Ishihara M. (2010) Hydrogel blends of chitin/chitosan, fucoidan and alginate as healing-impaired wound dressings. *Biomaterials*, 31: 83-90.
64. Bidarra SJ, Barrias CC, Granja PL. (2014) Injectable alginate hydrogels for cell delivery in tissue engineering. *Acta Biomater*, 10: 1646-62.
65. Walters BD, Stegemann JP. (2014) Strategies for directing the structure and function of three-dimensional collagen biomaterials across length scales. *Acta Biomater*, 10: 1488-501.
66. Boontheekul T, Hill EE, Kong HJ, Mooney DJ. (2007) Regulating myoblast phenotype through controlled gel stiffness and degradation. *Tissue Eng*, 13: 1431-42.
67. Hill E, Boontheekul T, Mooney DJ. (2006) Designing scaffolds to enhance transplanted myoblast survival and migration. *Tissue Eng*, 12: 1295-304.
68. Hill E, Boontheekul T, Mooney DJ. (2006) Regulating activation of transplanted cells controls tissue regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103: 2494-9.
69. Fuoco C, Petrilli LL, Cannata S, Gargioli C. (2016) Matrix scaffolding for stem cell guidance toward skeletal muscle tissue engineering. *J Orthop Surg Res*, 11: 86.
70. Shandalov Y, Egozi D, Koffler J, Dado-Rosenfeld D, Ben-Shimol D, Freiman A, Shor E, Kabala A, Levenberg S. (2014) An engineered muscle flap for reconstruction of large soft tissue defects. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 111: 6010-5.
71. Boldrin L, Elvassore N, Malerba A, Flaibani M, Cimetta E, Piccoli M, Baroni MD, Gazzola MV, Messina C, Gamba P, Vitiello L, De Coppi P. (2007) Satellite cells delivered by micro-patterned scaffolds: a new strategy for cell transplantation in muscle diseases. *Tissue Eng*, 13: 253-62.
72. Zhu J, Li Y, Shen W, Qiao C, Ambrosio F, Lavasani M, Nozaki M, Branca MF, Huard J. (2007) Relationships between transforming growth factor-beta1, myostatin, and decorin: implications for skeletal muscle fibrosis. *J Biol Chem*, 282: 25852-63.
73. McPherron AC, Lawler AM, Lee SJ. (1997) Regulation of skeletal muscle mass in mice by a new TGF-beta superfamily member. *Nature*, 387: 83-90.



74. Ihn H. (2002) Pathogenesis of fibrosis: role of TGF-beta and CTGF. *Curr Opin Rheumatol*, 14: 681-5.
75. Gosselin LE, Williams JE, Deering M, Brazeau D, Koury S, Martinez DA. (2004) Localization and early time course of TGF-beta 1 mRNA expression in dystrophic muscle. *Muscle Nerve*, 30: 645-53.
76. Yamaguchi Y, Mann DM, Ruoslahti E. (1990) Negative regulation of transforming growth factor-beta by the proteoglycan decorin. *Nature*, 346: 281-4.
77. Foster W, Li Y, Usas A, Somogyi G, Huard J. (2003) Gamma interferon as an antifibrosis agent in skeletal muscle. *J Orthop Res*, 21: 798-804.
78. Nozaki M, Li Y, Zhu J, Ambrosio F, Uehara K, Fu FH, Huard J. (2008) Improved muscle healing after contusion injury by the inhibitory effect of suramin on myostatin, a negative regulator of muscle growth. *Am J Sports Med*, 36: 2354-62.
79. Zanotti S, Gibertini S, Savadori P, Mantegazza R, Mora M. (2013) Duchenne muscular dystrophy fibroblast nodules: a cell-based assay for screening anti-fibrotic agents. *Cell Tissue Res*, 352: 659-70.
80. Savio L.-Y. Woo AJA, Sinan Karaoglu, Steven D. Abramowitch, *Functional Tissue Engineering of Ligament and Tendon Injuries*, in *Principles of Regenerative Medicine*, M. Anthony Atala, Robert Lanza, MD, James A. Thomson, PhD, and Robert M. Nerem, PhD Editor. 2008, Elsevier. p. 1206-1231.
81. Lo IK, Ou Y, Rattner JP, Hart DA, Marchuk LL, Frank CB, Rattner JB. (2002) The cellular networks of normal ovine medial collateral and anterior cruciate ligaments are not accurately recapitulated in scar tissue. *J Anat*, 200: 283-96.
82. Nakamura N, Hart DA, Boorman RS, Kaneda Y, Shrive NG, Marchuk LL, Shino K, Ochi T, Frank CB. (2000) Decorin antisense gene therapy improves functional healing of early rabbit ligament scar with enhanced collagen fibrillogenesis in vivo. *J Orthop Res*, 18: 517-23.
83. Weiss JA, Woo SL, Ohland KJ, Horibe S, Newton PO. (1991) Evaluation of a new injury model to study medial collateral ligament healing: primary repair versus nonoperative treatment. *J Orthop Res*, 9: 516-28.
84. Frank C, McDonald D, Shrive N. (1997) Collagen fibril diameters in the rabbit medial collateral ligament scar: a longer term assessment. *Connect Tissue Res*, 36: 261-9.
85. Hart DA, Nakamura N, Marchuk L, Hiraoka H, Boorman R, Kaneda Y, Shrive NG, Frank CB. (2000) Complexity of determining cause and effect in vivo after antisense gene therapy. *Clin Orthop Relat Res*, S242-51.
86. Niyibizi C, Kavalkovich K, Yamaji T, Woo SL. (2000) Type V collagen is increased during rabbit medial collateral ligament healing. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 8: 281-5.
87. Kraeutler MJ, Bravman JT, McCarty EC. (2013) Bone-patellar tendon-bone autograft versus allograft in outcomes of anterior cruciate ligament reconstruction: a meta-analysis of 5182 patients. *Am J Sports Med*, 41: 2439-48.
88. Freedman KB, D'Amato MJ, Nedeff DD, Kaz A, Bach BR, Jr. (2003) Arthroscopic anterior cruciate ligament reconstruction: a metaanalysis comparing patellar tendon and hamstring tendon autografts. *Am J Sports Med*, 31: 2-11.
89. Aune AK, Holm I, Risberg MA, Jensen HK, Steen H. (2001) Four-strand hamstring tendon autograft compared with patellar tendon-bone autograft for anterior cruciate ligament reconstruction. A randomized study with two-year follow-up. *Am J Sports Med*, 29: 722-8.
90. Yao J, Woon CY, Behn A, Korotkova T, Park DY, Gajendran V, Smith RL. (2012) The effect of suture coated with mesenchymal stem cells and bioactive substrate on tendon repair strength in a rat model. *J Hand Surg Am*, 37: 1639-45.
91. Gelberman RH, Boyer MI, Brodt MD, Winters SC, Silva MJ. (1999) The effect of gap formation at the repair site on the strength and excursion of intrasynovial flexor

- tendons. An experimental study on the early stages of tendon-healing in dogs. *J Bone Joint Surg Am*, 81: 975-82.
92. Dinopoulos HT, Boyer MI, Burns ME, Gelberman RH, Silva MJ. (2000) The resistance of a four- and eight-strand suture technique to gap formation during tensile testing: an experimental study of repaired canine flexor tendons after 10 days of in vivo healing. *J Hand Surg Am*, 25: 489-98.
  93. Marui T, Niyibizi C, Georgescu HI, Cao M, Kavalkovich KW, Levine RE, Woo SL. (1997) Effect of growth factors on matrix synthesis by ligament fibroblasts. *J Orthop Res*, 15: 18-23.
  94. Molloy T, Wang Y, Murrell G. (2003) The roles of growth factors in tendon and ligament healing. *Sports Med*, 33: 381-94.
  95. Woo SL, Smith DW, Hildebrand KA, Zeminski JA, Johnson LA. (1998) Engineering the healing of the rabbit medial collateral ligament. *Med Biol Eng Comput*, 36: 359-64.
  96. Scherping SC, Jr., Schmidt CC, Georgescu HI, Kwok CK, Evans CH, Woo SL. (1997) Effect of growth factors on the proliferation of ligament fibroblasts from skeletally mature rabbits. *Connect Tissue Res*, 36: 1-8.
  97. Lyras DN, Kazakos K, Verettas D, Chronopoulos E, Folaranmi S, Agrogiannis G. (2010) Effect of combined administration of transforming growth factor- $\beta$ 1 and insulin-like growth factor I on the mechanical properties of a patellar tendon defect model in rabbits. *Acta Orthop Belg*, 76: 380-6.
  98. Kondo E, Yasuda K, Yamanaka M, Minami A, Tohyama H. (2005) Effects of administration of exogenous growth factors on biomechanical properties of the elongation-type anterior cruciate ligament injury with partial laceration. *Am J Sports Med*, 33: 188-96.
  99. Yasuda K, Tomita F, Yamazaki S, Minami A, Tohyama H. (2004) The effect of growth factors on biomechanical properties of the bone-patellar tendon-bone graft after anterior cruciate ligament reconstruction: a canine model study. *Am J Sports Med*, 32: 870-80.
  100. Health CAfDaTi, *Antibacterial Sutures for Wound Closure After Surgery: A Review of Clinical and Cost-Effectiveness and Guidelines for Use*. 2014, CADTH Rapid Response Reports: Ottawa (ON).
  101. Dines JS, Weber L, Razzano P, Prajapati R, Timmer M, Bowman S, Bonasser L, Dines DM, Grande DP. (2007) The effect of growth differentiation factor-5-coated sutures on tendon repair in a rat model. *J Shoulder Elbow Surg*, 16: S215-21.
  102. Rohrich RJ, Trott SA, Love M, Beran SJ, Orenstein HH. (1999) Mersilene suture as a vehicle for delivery of growth factors in tendon repair. *Plast Reconstr Surg*, 104: 1713-7.
  103. Hamada Y, Katoh S, Hibino N, Kosaka H, Hamada D, Yasui N. (2006) Effects of monofilament nylon coated with basic fibroblast growth factor on endogenous intrasynovial flexor tendon healing. *J Hand Surg Am*, 31: 530-40.
  104. Mazzocca AD, McCarthy MB, Arciero C, Jhaveri A, Obopilwe E, Rincon L, Wyman J, Gronowicz GA, Arciero RA. (2007) Tendon and bone responses to a collagen-coated suture material. *J Shoulder Elbow Surg*, 16: S222-30.
  105. Valencia Mora M, Ruiz Iban MA, Diaz Heredia J, Barco Laakso R, Cuellar R, Garcia Arranz M. (2015) Stem cell therapy in the management of shoulder rotator cuff disorders. *World J Stem Cells*, 7: 691-9.
  106. Lui PP, Wong OT, Lee YW. (2016) Transplantation of tendon-derived stem cells pretreated with connective tissue growth factor and ascorbic acid in vitro promoted better tendon repair in a patellar tendon window injury rat model. *Cytotherapy*, 18: 99-112.

107. Young RG, Butler DL, Weber W, Caplan AI, Gordon SL, Fink DJ. (1998) Use of mesenchymal stem cells in a collagen matrix for Achilles tendon repair. *J Orthop Res*, 16: 406-13.
108. Watanabe N, Woo SL, Papageorgiou C, Celechovsky C, Takai S. (2002) Fate of donor bone marrow cells in medial collateral ligament after simulated autologous transplantation. *Microsc Res Tech*, 58: 39-44.
109. Pietschmann MF, Frankewycz B, Schmitz P, Docheva D, Sievers B, Jansson V, Schieker M, Muller PE. (2013) Comparison of tenocytes and mesenchymal stem cells seeded on biodegradable scaffolds in a full-size tendon defect model. *J Mater Sci Mater Med*, 24: 211-20.
110. Williams RB, Harkins LS, Hammond CJ, Wood JL. (2001) Racehorse injuries, clinical problems and fatalities recorded on British racecourses from flat racing and National Hunt racing during 1996, 1997 and 1998. *Equine Vet J*, 33: 478-86.
111. Renzi S, Ricco S, Dotti S, Sesso L, Grolli S, Cornali M, Carlin S, Patruno M, Cinotti S, Ferrari M. (2013) Autologous bone marrow mesenchymal stromal cells for regeneration of injured equine ligaments and tendons: a clinical report. *Res Vet Sci*, 95: 272-7.
112. Godwin EE, Young NJ, Dudhia J, Beamish IC, Smith RK. (2012) Implantation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells demonstrates improved outcome in horses with overstrain injury of the superficial digital flexor tendon. *Equine Vet J*, 44: 25-32.
113. Nixon AJ, Dahlgren LA, Haupt JL, Yeager AE, Ward DL. (2008) Effect of adipose-derived nucleated cell fractions on tendon repair in horses with collagenase-induced tendinitis. *Am J Vet Res*, 69: 928-37.
114. Smith RK. (2008) Mesenchymal stem cell therapy for equine tendinopathy. *Disabil Rehabil*, 30: 1752-8.
115. Denoix JM. (2008) [The horse as an athlete: an animal model of choice for sports medicine: sonographic studies of joint disorders]. *Bull Acad Natl Med*, 192: 521-36; discussion 536-40.
116. Dyson SJ. (2004) Medical management of superficial digital flexor tendonitis: a comparative study in 219 horses (1992-2000). *Equine Vet J*, 36: 415-9.
117. O'Meara B, Bladon B, Parkin TD, Fraser B, Lischer CJ. (2010) An investigation of the relationship between race performance and superficial digital flexor tendonitis in the Thoroughbred racehorse. *Equine Vet J*, 42: 322-6.
118. Pacini S, Spinabella S, Trombi L, Fazzi R, Galimberti S, Dini F, Carlucci F, Petrini M. (2007) Suspension of bone marrow-derived undifferentiated mesenchymal stromal cells for repair of superficial digital flexor tendon in race horses. *Tissue Eng*, 13: 2949-55.
119. Lacitignola L, Crovace A, Rossi G, Francioso E. (2008) Cell therapy for tendinitis, experimental and clinical report. *Vet Res Commun*, 32 Suppl 1: S33-8.
120. Selek O, Buluc L, Muezzinoglu B, Ergun RE, Ayhan S, Karaoz E. (2014) Mesenchymal stem cell application improves tendon healing via anti-apoptotic effect (Animal study). *Acta Orthop Traumatol Turc*, 48: 187-95.
121. Zhang W, Yang Y, Zhang K, Li Y, Fang G. (2015) Weft-knitted silk-poly(lactide-co-glycolide) mesh scaffold combined with collagen matrix and seeded with mesenchymal stem cells for rabbit Achilles tendon repair. *Connect Tissue Res*, 56: 25-34.
122. Awad HA, Boivin GP, Dressler MR, Smith FN, Young RG, Butler DL. (2003) Repair of patellar tendon injuries using a cell-collagen composite. *J Orthop Res*, 21: 420-31.
123. Juncosa-Melvin N, Boivin GP, Galloway MT, Gooch C, West JR, Sklenka AM, Butler DL. (2005) Effects of cell-to-collagen ratio in mesenchymal stem cell-seeded implants on tendon repair biomechanics and histology. *Tissue Eng*, 11: 448-57.

124. Lietman SA, Miyamoto S, Brown PR, Inoue N, Reddi AH. (2002) The temporal sequence of spontaneous repair of osteochondral defects in the knees of rabbits is dependent on the geometry of the defect. *J Bone Joint Surg Br*, 84: 600-6.
125. Correa D, Lietman SA. (2016) Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol*,
126. Alazzawi S, Sukeik M, Ibrahim M, Haddad FS. (2016) Surgical treatment of anterior cruciate ligament injury in adults. *Br J Hosp Med (Lond)*, 77: 227-31.
127. Bartha L, Vajda A, Duska Z, Rahmeh H, Hangody L. (2006) Autologous osteochondral mosaicplasty grafting. *J Orthop Sports Phys Ther*, 36: 739-50.
128. Inkinen SI, Liukkonen J, Malo MK, Viren T, Jurvelin JS, Toyras J. (2016) Finite difference time domain model of ultrasound propagation in agarose scaffold containing collagen or chondrocytes. *J Acoust Soc Am*, 140: 1.
129. Vishwanath V, Pramanik K, Biswas A. (2016) Optimization and evaluation of silk fibroin-chitosan freeze-dried porous scaffolds for cartilage tissue engineering application. *J Biomater Sci Polym Ed*, 27: 657-74.
130. Pan Z, Duan P, Liu X, Wang H, Cao L, He Y, Dong J, Ding J. (2015) Effect of porosities of bilayered porous scaffolds on spontaneous osteochondral repair in cartilage tissue engineering. *Regen Biomater*, 2: 9-19.
131. Reed S, Wu BM. (2015) Biological and mechanical characterization of chitosan-alginate scaffolds for growth factor delivery and chondrogenesis. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,
132. Tognana E, Borrione A, De Luca C, Pavesio A. (2007) Hyalograft C: hyaluronan-based scaffolds in tissue-engineered cartilage. *Cells Tissues Organs*, 186: 97-103.
133. Brittberg M, Lindahl A, Nilsson A, Ohlsson C, Isaksson O, Peterson L. (1994) Treatment of deep cartilage defects in the knee with autologous chondrocyte transplantation. *N Engl J Med*, 331: 889-95.
134. Pascual-Garrido C, Slabaugh MA, L'Heureux DR, Friel NA, Cole BJ. (2009) Recommendations and treatment outcomes for patellofemoral articular cartilage defects with autologous chondrocyte implantation: prospective evaluation at average 4-year follow-up. *Am J Sports Med*, 37 Suppl 1: 33S-41S.
135. Zaslav K, Cole B, Brewster R, DeBerardino T, Farr J, Fowler P, Nissen C. (2009) A prospective study of autologous chondrocyte implantation in patients with failed prior treatment for articular cartilage defect of the knee: results of the Study of the Treatment of Articular Repair (STAR) clinical trial. *Am J Sports Med*, 37: 42-55.
136. Kon E, Gobbi A, Filardo G, Delcogliano M, Zaffagnini S, Marcacci M. (2009) Arthroscopic second-generation autologous chondrocyte implantation compared with microfracture for chondral lesions of the knee: prospective nonrandomized study at 5 years. *Am J Sports Med*, 37: 33-41.
137. Lu Y, Dhanaraj S, Wang Z, Bradley DM, Bowman SM, Cole BJ, Binette F. (2006) Minced cartilage without cell culture serves as an effective intraoperative cell source for cartilage repair. *J Orthop Res*, 24: 1261-70.
138. Frisbie DD, Lu Y, Kawcak CE, DiCarlo EF, Binette F, McIlwraith CW. (2009) In vivo evaluation of autologous cartilage fragment-loaded scaffolds implanted into equine articular defects and compared with autologous chondrocyte implantation. *Am J Sports Med*, 37 Suppl 1: 71S-80S.
139. McCormick F, Yanke A, Provencher MT, Cole BJ. (2008) Minced articular cartilage--basic science, surgical technique, and clinical application. *Sports Med Arthrosc*, 16: 217-20.
140. Lily Jeng FNkK, Myron Spector, *Articular Cartilage*, in *Principles of Regenerative Medicine*, R.L. Anthony Atala, James A. Thomson, Robert M. Nerem Editor. 2011, Elsevier. p. 761-777.

141. Panossian A, Ashiku S, Kirchoff CH, Randolph MA, Yaremchuk MJ. (2001) Effects of cell concentration and growth period on articular and ear chondrocyte transplants for tissue engineering. *Plast Reconstr Surg*, 108: 392-402.
142. Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, Ohtani H, Jacquet R, Hillyer J, Lowder E, Landis WJ. (2006) Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures. *Tissue Eng*, 12: 691-703.
143. Chung C, Erickson IE, Mauck RL, Burdick JA. (2008) Differential behavior of auricular and articular chondrocytes in hyaluronic acid hydrogels. *Tissue Eng Part A*, 14: 1121-31.
144. Kavalkovich KW, Boynton RE, Murphy JM, Barry F. (2002) Chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells within an alginate layer culture system. *In Vitro Cell Dev Biol Anim*, 38: 457-66.
145. Perren SM, *Stability and Bone Healing*, in *Biomechanics in Orthopedics*, S. Niwa, Perren, Stephan M., Hattori, Tomokazu, Editor. 1992, Springer Japan. p. 3-12.
146. Jeffrey O. Hollinger JPS, Gary E. Friedlaender, Chris R. Brown, Scott D. Boden, Samuel Lynch, *Therapeutic Opportunities for Bone Grafting*, in *Principles of Regenerative Medicine*, A. Atala, Editor. 2008, Elsevier: Burlington, MA. p. 1164–1175.
147. Rehan N. Khanzada CEH, F. Jerry Volenec, Scott P. Bruder, *Cell Therapies for Bone Regeneration*, in *Principles of Regenerative Medicine*, R.L. Anthony Atala, Robert Nerem, James Thomson, Editor. 2008, Elsevier Inc. p. 868–887.
148. Albrektsson T, Johansson C. (2001) Osteoinduction, osteoconduction and osseointegration. *Eur Spine J*, 10 Suppl 2: S96-101.
149. Bauer TW, Muschler GF. (2000) Bone graft materials. An overview of the basic science. *Clin Orthop Relat Res*, 10-27.
150. Nkenke E, Neukam FW. (2014) Autogenous bone harvesting and grafting in advanced jaw resorption: morbidity, resorption and implant survival. *Eur J Oral Implantol*, 7 Suppl 2: S203-17.
151. Misch CM. (1997) Comparison of intraoral donor sites for onlay grafting prior to implant placement. *Int J Oral Maxillofac Implants*, 12: 767-76.
152. Cricchio G, Lundgren S. (2003) Donor site morbidity in two different approaches to anterior iliac crest bone harvesting. *Clin Implant Dent Relat Res*, 5: 161-9.
153. Giannoudis PV, Dinopoulos H, Tsiridis E. (2005) Bone substitutes: an update. *Injury*, 36 Suppl 3: S20-7.
154. Seiler JG, 3rd, Johnson J. (2000) Iliac crest autogenous bone grafting: donor site complications. *J South Orthop Assoc*, 9: 91-7.
155. Gamradt SC, Lieberman JR. (2003) Bone graft for revision hip arthroplasty: biology and future applications. *Clin Orthop Relat Res*, 183-94.
156. Laurencin C, Khan Y, El-Amin SF. (2006) Bone graft substitutes. *Expert Rev Med Devices*, 3: 49-57.
157. Arnaldo Rodrigues Santos jr. CBL, Selma Candelária Genari, *Technologies Applied to Stimulate Bone Regeneration*, in *Tissue Regeneration - From Basic Biology to Clinical Application*, J. Davies, Editor. 2012, InTech. p. 339-366.
158. Pelker RR, Friedlaender GE. (1987) Biomechanical aspects of bone autografts and allografts. *Orthop Clin North Am*, 18: 235-9.
159. Henman P, Finlayson D. (2000) Ordering allograft by weight: suggestions for the efficient use of frozen bone-graft for impaction grafting. *J Arthroplasty*, 15: 368-71.
160. Nandi SK, Roy S, Mukherjee P, Kundu B, De DK, Basu D. (2010) Orthopaedic applications of bone graft & graft substitutes: a review. *Indian J Med Res*, 132: 15-30.
161. Li J, Wang Z, Pei GX, Guo Z. (2011) Biological reconstruction using massive bone allograft with intramedullary vascularized fibular flap after intercalary resection of humeral malignancy. *J Surg Oncol*, 104: 244-9.

162. Virolainen P, Mokka J, Seppanen M, Makela K. (2010) Up to 10 years follow up of the use of 71 cortical allografts (strut-grafts) for the treatment of periprosthetic fractures. *Scand J Surg*, 99: 240-3.
163. Gruskin E, Doll BA, Futrell FW, Schmitz JP, Hollinger JO. (2012) Demineralized bone matrix in bone repair: history and use. *Adv Drug Deliv Rev*, 64: 1063-77.
164. Einhorn TA, Lane JM, Burstein AH, Kopman CR, Vigorita VJ. (1984) The healing of segmental bone defects induced by demineralized bone matrix. A radiographic and biomechanical study. *J Bone Joint Surg Am*, 66: 274-9.
165. Drosos GI, Kazakos KI, Kouzoumpasis P, Verettas DA. (2007) Safety and efficacy of commercially available demineralised bone matrix preparations: a critical review of clinical studies. *Injury*, 38 Suppl 4: S13-21.
166. Docquier PL, Delloye C. (2005) Treatment of aneurysmal bone cysts by introduction of demineralized bone and autogenous bone marrow. *J Bone Joint Surg Am*, 87: 2253-8.
167. Pietrzak WS, Perns SV, Keyes J, Woodell-May J, McDonald NM. (2005) Demineralized bone matrix graft: a scientific and clinical case study assessment. *J Foot Ankle Surg*, 44: 345-53.
168. Tiedeman JJ, Garvin KL, Kile TA, Connolly JF. (1995) The role of a composite, demineralized bone matrix and bone marrow in the treatment of osseous defects. *Orthopedics*, 18: 1153-8.
169. Keating JF, McQueen MM. (2001) Substitutes for autologous bone graft in orthopaedic trauma. *J Bone Joint Surg Br*, 83: 3-8.
170. Morone MA, Boden SD. (1998) Experimental posterolateral lumbar spinal fusion with a demineralized bone matrix gel. *Spine (Phila Pa 1976)*, 23: 159-67.
171. Park HW, Lee JK, Moon SJ, Seo SK, Lee JH, Kim SH. (2009) The efficacy of the synthetic interbody cage and Grafton for anterior cervical fusion. *Spine (Phila Pa 1976)*, 34: E591-5.
172. Tormala P, Pohjonen T, Rokkanen P. (1998) Bioabsorbable polymers: materials technology and surgical applications. *Proc Inst Mech Eng H*, 212: 101-11.
173. Dong J, Uemura T, Shirasaki Y, Tateishi T. (2002) Promotion of bone formation using highly pure porous beta-TCP combined with bone marrow-derived osteoprogenitor cells. *Biomaterials*, 23: 4493-502.
174. Balcik C, Tokdemir T, Senkoylu A, Koc N, Timucin M, Akin S, Korkusuz P, Korkusuz F. (2007) Early weight bearing of porous HA/TCP (60/40) ceramics in vivo: a longitudinal study in a segmental bone defect model of rabbit. *Acta Biomater*, 3: 985-96.
175. Gogia JS, Meehan JP, Di Cesare PE, Jamali AA. (2009) Local antibiotic therapy in osteomyelitis. *Semin Plast Surg*, 23: 100-7.
176. Bibbo C, Patel DV. (2006) The effect of demineralized bone matrix-calcium sulfate with vancomycin on calcaneal fracture healing and infection rates: a prospective study. *Foot Ankle Int*, 27: 487-93.
177. Chang W, Colangeli M, Colangeli S, Di Bella C, Gozzi E, Donati D. (2007) Adult osteomyelitis: debridement versus debridement plus Osteoset T pellets. *Acta Orthop Belg*, 73: 238-43.
178. McKee MD, Li-Bland EA, Wild LM, Schemitsch EH. (2010) A prospective, randomized clinical trial comparing an antibiotic-impregnated bioabsorbable bone substitute with standard antibiotic-impregnated cement beads in the treatment of chronic osteomyelitis and infected nonunion. *J Orthop Trauma*, 24: 483-90.
179. Hornyak I, Madacsi E, Kalugyer P, Vacz G, Horvathy DB, Szendroi M, Han W, Lacza Z. (2014) Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating. *Biomed Res Int*, 2014: 459867.

180. Ishaug-Riley SL, Crane-Kruger GM, Yaszemski MJ, Mikos AG. (1998) Three-dimensional culture of rat calvarial osteoblasts in porous biodegradable polymers. *Biomaterials*, 19: 1405-12.
181. Santos AR, Jr., Ferreira BM, Duek EA, Dolder H, Wada RS, Wada ML. (2004) Differentiation pattern of Vero cells cultured on poly(L-lactic acid)/poly(hydroxybutyrate-co-hydroxyvalerate) blends. *Artif Organs*, 28: 381-9.
182. Rizzi SC, Heath DJ, Coombes AG, Bock N, Textor M, Downes S. (2001) Biodegradable polymer/hydroxyapatite composites: surface analysis and initial attachment of human osteoblasts. *J Biomed Mater Res*, 55: 475-86.
183. Lee SH, Shin H. (2007) Matrices and scaffolds for delivery of bioactive molecules in bone and cartilage tissue engineering. *Adv Drug Deliv Rev*, 59: 339-59.
184. Carano RA, Filvaroff EH. (2003) Angiogenesis and bone repair. *Drug Discov Today*, 8: 980-9.
185. El-Ghannam A. (2005) Bone reconstruction: from bioceramics to tissue engineering. *Expert Rev Med Devices*, 2: 87-101.
186. Hsiong SX, Mooney DJ. (2006) Regeneration of vascularized bone. *Periodontol 2000*, 41: 109-22.
187. Street J, Bao M, deGuzman L, Bunting S, Peale FV, Jr., Ferrara N, Steinmetz H, Hoeffel J, Cleland JL, Daugherty A, van Bruggen N, Redmond HP, Carano RA, Filvaroff EH. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates bone repair by promoting angiogenesis and bone turnover. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99: 9656-61.
188. Mayr-Wohlfart U, Waltenberger J, Hausser H, Kessler S, Gunther KP, Dehio C, Puhl W, Brenner RE. (2002) Vascular endothelial growth factor stimulates chemotactic migration of primary human osteoblasts. *Bone*, 30: 472-7.
189. Orlandini M, Spreafico A, Bardelli M, Rocchigiani M, Salameh A, Nucciotti S, Capperucci C, Frediani B, Oliviero S. (2006) Vascular endothelial growth factor-D activates VEGFR-3 expressed in osteoblasts inducing their differentiation. *J Biol Chem*, 281: 17961-7.
190. Chen FM, Zhao YM, Wu H, Deng ZH, Wang QT, Zhou W, Liu Q, Dong GY, Li K, Wu ZF, Jin Y. (2006) Enhancement of periodontal tissue regeneration by locally controlled delivery of insulin-like growth factor-I from dextran-co-gelatin microspheres. *J Control Release*, 114: 209-22.
191. Matsuda N, Lin WL, Kumar NM, Cho MI, Genco RJ. (1992) Mitogenic, chemotactic, and synthetic responses of rat periodontal ligament fibroblastic cells to polypeptide growth factors in vitro. *J Periodontol*, 63: 515-25.
192. Wozney JM, Rosen V, Celeste AJ, Mitsock LM, Whitters MJ, Kriz RW, Hewick RM, Wang EA. (1988) Novel regulators of bone formation: molecular clones and activities. *Science*, 242: 1528-34.
193. Celeste AJ, Iannazzi JA, Taylor RC, Hewick RM, Rosen V, Wang EA, Wozney JM. (1990) Identification of transforming growth factor beta family members present in bone-inductive protein purified from bovine bone. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87: 9843-7.
194. Erlebacher A, Filvaroff EH, Ye JQ, Derynck R. (1998) Osteoblastic responses to TGF-beta during bone remodeling. *Mol Biol Cell*, 9: 1903-18.
195. Urist MR, Strates BS. (1971) Bone morphogenetic protein. *J Dent Res*, 50: 1392-406.
196. Van de Putte KA, Urist MR. (1965) Osteogenesis in the interior of intramuscular implants of decalcified bone matrix. *Clin Orthop Relat Res*, 43: 257-70.
197. Geiger M, Li RH, Friess W. (2003) Collagen sponges for bone regeneration with rhBMP-2. *Adv Drug Deliv Rev*, 55: 1613-29.
198. Yoon BS, Lyons KM. (2004) Multiple functions of BMPs in chondrogenesis. *J Cell Biochem*, 93: 93-103.

199. Holland TA, Mikos AG. (2006) Biodegradable polymeric scaffolds. Improvements in bone tissue engineering through controlled drug delivery. *Adv Biochem Eng Biotechnol*, 102: 161-85.
200. Papakostidis C, Kontakis G, Bhandari M, Giannoudis PV. (2008) Efficacy of autologous iliac crest bone graft and bone morphogenetic proteins for posterolateral fusion of lumbar spine: a meta-analysis of the results. *Spine (Phila Pa 1976)*, 33: E680-92.
201. Hussein KA, Zakhary IE, Hailat D, Elrefai R, Sharawy M, Elsalanty ME. (2013) Delayed versus immediate reconstruction of mandibular segmental defects using recombinant human bone morphogenetic protein 2/absorbable collagen sponge. *J Oral Maxillofac Surg*, 71: 1107-18.
202. Giannoudis PV, Tzioupis C. (2005) Clinical applications of BMP-7: the UK perspective. *Injury*, 36 Suppl 3: S47-50.
203. Friedlaender GE, Perry CR, Cole JD, Cook SD, Cierny G, Muschler GF, Zych GA, Calhoun JH, LaForte AJ, Yin S. (2001) Osteogenic protein-1 (bone morphogenetic protein-7) in the treatment of tibial nonunions. *J Bone Joint Surg Am*, 83-A Suppl 1: S151-8.
204. Dimar JR, Glassman SD, Burkus KJ, Carreon LY. (2006) Clinical outcomes and fusion success at 2 years of single-level instrumented posterolateral fusions with recombinant human bone morphogenetic protein-2/compression resistant matrix versus iliac crest bone graft. *Spine (Phila Pa 1976)*, 31: 2534-9; discussion 2540.
205. Cahill KS, Chi JH, Day A, Claus EB. (2009) Prevalence, complications, and hospital charges associated with use of bone-morphogenetic proteins in spinal fusion procedures. *Jama*, 302: 58-66.
206. Williams BJ, Smith JS, Fu KM, Hamilton DK, Polly DW, Jr., Ames CP, Berven SH, Perra JH, Knapp DR, Jr., McCarthy RE, Shaffrey CI. (2011) Does bone morphogenetic protein increase the incidence of perioperative complications in spinal fusion? A comparison of 55,862 cases of spinal fusion with and without bone morphogenetic protein. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36: 1685-91.
207. Lee KB, Taghavi CE, Song KJ, Sintuu C, Yoo JH, Keorochana G, Tzeng ST, Fei Z, Liao JC, Wang JC. (2011) Inflammatory characteristics of rhBMP-2 in vitro and in an in vivo rodent model. *Spine (Phila Pa 1976)*, 36: E149-54.
208. Muchow RD, Hsu WK, Anderson PA. (2010) Histopathologic inflammatory response induced by recombinant bone morphogenetic protein-2 causing radiculopathy after transforaminal lumbar interbody fusion. *Spine J*, 10: e1-6.
209. Devine JG, Dettori JR, France JC, Brodt E, McGuire RA. (2012) The use of rhBMP in spine surgery: is there a cancer risk? *Evid Based Spine Care J*, 3: 35-41.
210. Carreira AC, Lojudice FH, Halcsik E, Navarro RD, Sogayar MC, Granjeiro JM. (2014) Bone morphogenetic proteins: facts, challenges, and future perspectives. *J Dent Res*, 93: 335-45.
211. Neovius E, Lemberger M, Docherty Skogh AC, Hilborn J, Engstrand T. (2013) Alveolar bone healing accompanied by severe swelling in cleft children treated with bone morphogenetic protein-2 delivered by hydrogel. *J Plast Reconstr Aesthet Surg*, 66: 37-42.
212. Ritting AW, Weber EW, Lee MC. (2012) Exaggerated inflammatory response and bony resorption from BMP-2 use in a pediatric forearm nonunion. *J Hand Surg Am*, 37: 316-21.
213. Paralkar VM, Weeks BS, Yu YM, Kleinman HK, Reddi AH. (1992) Recombinant human bone morphogenetic protein 2B stimulates PC12 cell differentiation: potentiation and binding to type IV collagen. *J Cell Biol*, 119: 1721-8.



214. Termaat MF, Den Boer FC, Bakker FC, Patka P, Haarman HJ. (2005) Bone morphogenetic proteins. Development and clinical efficacy in the treatment of fractures and bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 87: 1367-78.
215. Marusic A, Katavic V, Grcevic D, Lukic IK. (1999) Genetic variability of new bone induction in mice. *Bone*, 25: 25-32.
216. Marusic A, Grcevic D, Katavic V, Kovacic N, Lukic IK, Kalajzic I, Lorenzo JA. (2000) Role of B lymphocytes in new bone formation. *Lab Invest*, 80: 1761-74.
217. Toth JM, Boden SD, Burkus JK, Badura JM, Peckham SM, McKay WF. (2009) Short-term osteoclastic activity induced by locally high concentrations of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in a cancellous bone environment. *Spine (Phila Pa 1976)*, 34: 539-50.
218. Kimelman N, Pelled G, Helm GA, Huard J, Schwarz EM, Gazit D. (2007) Review: gene- and stem cell-based therapeutics for bone regeneration and repair. *Tissue Eng*, 13: 1135-50.
219. Undale AH, Westendorf JJ, Yaszemski MJ, Khosla S. (2009) Mesenchymal stem cells for bone repair and metabolic bone diseases. *Mayo Clin Proc*, 84: 893-902.
220. Cowan CM, Soo C, Ting K, Wu B. (2005) Evolving concepts in bone tissue engineering. *Curr Top Dev Biol*, 66: 239-85.
221. Conejero JA, Lee JA, Parrett BM, Terry M, Wear-Maggitti K, Grant RT, Breitbart AS. (2006) Repair of palatal bone defects using osteogenically differentiated fat-derived stem cells. *Plast Reconstr Surg*, 117: 857-63.
222. Lauren Vernon LKaC-YCH, *Stem Cell Based Bone Tissue Engineering*, in *Bone Regeneration*, H. Tal, Editor. 2012, InTech. p. 11-32.
223. Meinel L, Hofmann S, Karageorgiou V, Zichner L, Langer R, Kaplan D, Vunjak-Novakovic G. (2004) Engineering cartilage-like tissue using human mesenchymal stem cells and silk protein scaffolds. *Biotechnol Bioeng*, 88: 379-91.
224. Meinel L, Karageorgiou V, Hofmann S, Fajardo R, Snyder B, Li C, Zichner L, Langer R, Vunjak-Novakovic G, Kaplan DL. (2004) Engineering bone-like tissue in vitro using human bone marrow stem cells and silk scaffolds. *J Biomed Mater Res A*, 71: 25-34.
225. Frohlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. (2008) Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther*, 3: 254-64.
226. Ohgushi H, Goldberg VM, Caplan AI. (1989) Repair of bone defects with marrow cells and porous ceramic. Experiments in rats. *Acta Orthop Scand*, 60: 334-9.
227. Puelacher WC, Vacanti JP, Ferraro NF, Schloo B, Vacanti CA. (1996) Femoral shaft reconstruction using tissue-engineered growth of bone. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 25: 223-8.
228. Bruder SP, Kraus KH, Goldberg VM, Kadiyala S. (1998) The effect of implants loaded with autologous mesenchymal stem cells on the healing of canine segmental bone defects. *J Bone Joint Surg Am*, 80: 985-96.
229. Bruder SP, Kurth AA, Shea M, Hayes WC, Jaiswal N, Kadiyala S. (1998) Bone regeneration by implantation of purified, culture-expanded human mesenchymal stem cells. *J Orthop Res*, 16: 155-62.
230. Arinzech TL, Peter SJ, Archambault MP, van den Bos C, Gordon S, Kraus K, Smith A, Kadiyala S. (2003) Allogeneic mesenchymal stem cells regenerate bone in a critical-sized canine segmental defect. *J Bone Joint Surg Am*, 85-A: 1927-35.
231. Kon E, Muraglia A, Corsi A, Bianco P, Marcacci M, Martin I, Boyde A, Ruspantini I, Chistolini P, Rocca M, Giardino R, Cancedda R, Quarto R. (2000) Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *J Biomed Mater Res*, 49: 328-37.

232. Petite H, Viateau V, Bensaid W, Meunier A, de Pollak C, Bourguignon M, Oudina K, Sedel L, Guillemin G. (2000) Tissue-engineered bone regeneration. *Nat Biotechnol*, 18: 959-63.
233. He Y, Zhang ZY, Zhu HG, Qiu W, Jiang X, Guo W. (2007) Experimental study on reconstruction of segmental mandible defects using tissue engineered bone combined bone marrow stromal cells with three-dimensional tricalcium phosphate. *J Craniofac Surg*, 18: 800-5.
234. Shang Q, Wang Z, Liu W, Shi Y, Cui L, Cao Y. (2001) Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *J Craniofac Surg*, 12: 586-93; discussion 594-5.
235. Viateau V, Guillemin G, Bousson V, Oudina K, Hannouche D, Sedel L, Logeart-Avramoglou D, Petite H. (2007) Long-bone critical-size defects treated with tissue-engineered grafts: a study on sheep. *J Orthop Res*, 25: 741-9.
236. Braly HL, O'Connor DP, Brinker MR. (2013) Percutaneous autologous bone marrow injection in the treatment of distal meta-diaphyseal tibial nonunions and delayed unions. *J Orthop Trauma*, 27: 527-33.
237. Kassem MS. (2013) Percutaneous autogenous bone marrow injection for delayed union or non union of fractures after internal fixation. *Acta Orthop Belg*, 79: 711-7.
238. Hernigou P, Mathieu G, Pognard A, Manicom O, Beaujean F, Rouard H. (2006) Percutaneous autologous bone-marrow grafting for nonunions. *Surgical technique. J Bone Joint Surg Am*, 88 Suppl 1 Pt 2: 322-7.
239. Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R, Kutepov SM, Mukhachev V, Lavroukov A, Kon E, Marcacci M. (2001) Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *N Engl J Med*, 344: 385-6.
240. Marcacci M, Kon E, Moukhachev V, Lavroukov A, Kutepov S, Quarto R, Mastrogiacomo M, Cancedda R. (2007) Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6- to 7-year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Eng*, 13: 947-55.
241. Health USNIo. *ClinicalTrials.gov*. Available from: <https://clinicaltrials.gov/ct2/results?term=%22bone+defect%22+%22stem+cell%22&Search=Search>.
242. Health USNIo. *ClinicalTrials.gov*.
243. Christopher J. Centeno SJF, *Regenerative Orthopedics*, in *Advances in Regenerative Medicine*, S. Wislet-Gendebien, Editor. 2011, InTech. p. 351-362.
244. Gross JB, Diligent J, Bensoussan D, Galois L, Stoltz JF, Mainard D. (2015) Percutaneous autologous bone marrow injection for treatment of delayed and non-union of long bone: a retrospective study of 45 cases. *Biomed Mater Eng*, 25: 187-97.
245. Le Nail LR, Stanovici J, Fournier J, Splingard M, Domenech J, Rosset P. (2014) Percutaneous grafting with bone marrow autologous concentrate for open tibia fractures: analysis of forty three cases and literature review. *Int Orthop*, 38: 1845-53.
246. Ladage D, Brixius K, Steingen C, Mehlhorn U, Schwinger RH, Bloch W, Schmidt A. (2007) Mesenchymal stem cells induce endothelial activation via paracrine mechanisms. *Endothelium*, 14: 53-63.
247. De Kok IJ, Peter SJ, Archambault M, van den Bos C, Kadiyala S, Aukhil I, Cooper LF. (2003) Investigation of allogeneic mesenchymal stem cell-based alveolar bone formation: preliminary findings. *Clin Oral Implants Res*, 14: 481-9.
248. Plumas J, Chaperot L, Richard MJ, Molens JP, Bensa JC, Favrot MC. (2005) Mesenchymal stem cells induce apoptosis of activated T cells. *Leukemia*, 19: 1597-604.
249. Krampera M, Pasini A, Pizzolo G, Cosmi L, Romagnani S, Annunziato F. (2006) Regenerative and immunomodulatory potential of mesenchymal stem cells. *Curr Opin Pharmacol*, 6: 435-41.

250. Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevanis CN, Papamichail M. (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells*, 24: 74-85.
251. Leo MS, Kumar AS, Kirit R, Konathan R, Sivamani RK. (2015) Systematic review of the use of platelet-rich plasma in aesthetic dermatology. *J Cosmet Dermatol*, 14: 315-23.
252. Yuksel EP, Sahin G, Aydin F, Senturk N, Turanli AY. (2014) Evaluation of effects of platelet-rich plasma on human facial skin. *J Cosmet Laser Ther*, 16: 206-8.
253. Shin MK, Lee JH, Lee SJ, Kim NI. (2012) Platelet-rich plasma combined with fractional laser therapy for skin rejuvenation. *Dermatol Surg*, 38: 623-30.
254. Redaelli A, Romano D, Marciano A. (2010) Face and neck revitalization with platelet-rich plasma (PRP): clinical outcome in a series of 23 consecutively treated patients. *J Drugs Dermatol*, 9: 466-72.
255. Salamanna F, Veronesi F, Maglio M, Della Bella E, Sartori M, Fini M. (2015) New and emerging strategies in platelet-rich plasma application in musculoskeletal regenerative procedures: general overview on still open questions and outlook. *Biomed Res Int*, 2015: 846045.
256. Bitton R. (2009) The economic burden of osteoarthritis. *Am J Manag Care*, 15: S230-5.
257. Clayton RA, Court-Brown CM. (2008) The epidemiology of musculoskeletal tendinous and ligamentous injuries. *Injury*, 39: 1338-44.
258. Frobell RB, Lohmander LS, Roos HP. (2007) Acute rotational trauma to the knee: poor agreement between clinical assessment and magnetic resonance imaging findings. *Scand J Med Sci Sports*, 17: 109-14.
259. Burge R, Dawson-Hughes B, Solomon DH, Wong JB, King A, Tosteson A. (2007) Incidence and economic burden of osteoporosis-related fractures in the United States, 2005-2025. *J Bone Miner Res*, 22: 465-75.
260. Agacayak S, Gulsun B, Ucan MC, Karaoz E, Nergiz Y. (2012) Effects of mesenchymal stem cells in critical size bone defect. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 16: 679-86.
261. Niemeyer P, Fechner K, Milz S, Richter W, Suedkamp NP, Mehlhorn AT, Pearce S, Kasten P. (2010) Comparison of mesenchymal stem cells from bone marrow and adipose tissue for bone regeneration in a critical size defect of the sheep tibia and the influence of platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 31: 3572-9.
262. Liu Y, Zhou Y, Feng H, Ma GE, Ni Y. (2008) Injectable tissue-engineered bone composed of human adipose-derived stromal cells and platelet-rich plasma. *Biomaterials*, 29: 3338-45.
263. Fernandez-Sarmiento JA, Dominguez JM, Granados MM, Morgaz J, Navarrete R, Carrillo JM, Gomez-Villamandos RJ, Munoz-Rascon P, Martin de Las Mulas J, Millan Y, Garcia-Balletbo M, Cugat R. (2013) Histological study of the influence of plasma rich in growth factors (PRGF) on the healing of divided Achilles tendons in sheep. *J Bone Joint Surg Am*, 95: 246-55.
264. Jo CH, Kim JE, Yoon KS, Shin S. (2012) Platelet-rich plasma stimulates cell proliferation and enhances matrix gene expression and synthesis in tenocytes from human rotator cuff tendons with degenerative tears. *Am J Sports Med*, 40: 1035-45.
265. Wang X, Qiu Y, Triffitt J, Carr A, Xia Z, Sabokbar A. (2012) Proliferation and differentiation of human tenocytes in response to platelet rich plasma: an in vitro and in vivo study. *J Orthop Res*, 30: 982-90.
266. de Mos M, van der Windt AE, Jahr H, van Schie HT, Weinans H, Verhaar JA, van Osch GJ. (2008) Can platelet-rich plasma enhance tendon repair? A cell culture study. *Am J Sports Med*, 36: 1171-8.

267. Wang-Saegusa A, Cugat R, Ares O, Seijas R, Cusco X, Garcia-Balletbo M. (2011) Infiltration of plasma rich in growth factors for osteoarthritis of the knee short-term effects on function and quality of life. *Arch Orthop Trauma Surg*, 131: 311-7.
268. Kon E, Buda R, Filardo G, Di Martino A, Timoncini A, Cenacchi A, Fornasari PM, Giannini S, Marcacci M. (2010) Platelet-rich plasma: intra-articular knee injections produced favorable results on degenerative cartilage lesions. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc*, 18: 472-9.
269. Chang KV, Hung CY, Aliwarga F, Wang TG, Han DS, Chen WS. (2014) Comparative effectiveness of platelet-rich plasma injections for treating knee joint cartilage degenerative pathology: a systematic review and meta-analysis. *Arch Phys Med Rehabil*, 95: 562-75.
270. Dold AP, Zywiell MG, Taylor DW, Dwyer T, Theodoropoulos J. (2014) Platelet-rich plasma in the management of articular cartilage pathology: a systematic review. *Clin J Sport Med*, 24: 31-43.
271. Baltzer AW, Ostapczuk MS, Stosch D, Seidel F, Granrath M. (2013) A new treatment for hip osteoarthritis: clinical evidence for the efficacy of autologous conditioned serum. *Orthop Rev (Pavia)*, 5: 59-64.
272. Alvarez-Camino JC, Vazquez-Delgado E, Gay-Escoda C. (2013) Use of autologous conditioned serum (Orthokine) for the treatment of the degenerative osteoarthritis of the temporomandibular joint. Review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*, 18: e433-8.
273. Baltzer AW, Moser C, Jansen SA, Krauspe R. (2009) Autologous conditioned serum (Orthokine) is an effective treatment for knee osteoarthritis. *Osteoarthritis Cartilage*, 17: 152-60.
274. Sandrey MA. (2014) Autologous growth factor injections in chronic tendinopathy. *J Athl Train*, 49: 428-30.
275. Moraes VY, Lenza M, Tamaoki MJ, Faloppa F, Belloti JC. (2014) Platelet-rich therapies for musculoskeletal soft tissue injuries. *Cochrane Database Syst Rev*, CD010071.
276. M. Butler HJ. (1989) Nutritional aspects of the growth of animal cells in culture. *Journal of Biotechnology*, 12: 97-110.
277. Francis GL. (2010) Albumin and mammalian cell culture: implications for biotechnology applications. *Cytotechnology*, 62: 1-16.
278. Price PJ, Gregory EA. (1982) Relationship between in vitro growth promotion and biophysical and biochemical properties of the serum supplement. *In Vitro*, 18: 576-84.
279. Elsadek B, Kratz F. (2012) Impact of albumin on drug delivery--new applications on the horizon. *J Control Release*, 157: 4-28.
280. Bertucci C, Domenici E. (2002) Reversible and covalent binding of drugs to human serum albumin: methodological approaches and physiological relevance. *Curr Med Chem*, 9: 1463-81.
281. Spector AA, John K, Fletcher JE. (1969) Binding of long-chain fatty acids to bovine serum albumin. *J Lipid Res*, 10: 56-67.
282. Yang F, Zhang Y, Liang H. (2014) Interactive association of drugs binding to human serum albumin. *Int J Mol Sci*, 15: 3580-95.
283. Evans TW. (2002) Review article: albumin as a drug--biological effects of albumin unrelated to oncotic pressure. *Aliment Pharmacol Ther*, 16 Suppl 5: 6-11.
284. Ribeiro M, Monteiro FJ, Ferraz MP. (2012) Infection of orthopedic implants with emphasis on bacterial adhesion process and techniques used in studying bacterial-material interactions. *Biomater*, 2: 176-94.
285. Ruiz V, Rodriguez-Cerrato V, Huelves L, Del Prado G, Naves P, Ponte C, Soriano F. (2011) Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to polystyrene plates and epithelial cells and the antiadhesive potential of albumin and xylitol. *Pediatr Res*, 69: 23-7.

286. Herrmann M, Vaudaux PE, Pittet D, Auckenthaler R, Lew PD, Schumacher-Perdreau F, Peters G, Waldvogel FA. (1988) Fibronectin, fibrinogen, and laminin act as mediators of adherence of clinical staphylococcal isolates to foreign material. *J Infect Dis*, 158: 693-701.
287. Brokke P, Dankert J, Carballo J, Feijen J. (1991) Adherence of coagulase-negative staphylococci onto polyethylene catheters in vitro and in vivo: a study on the influence of various plasma proteins. *J Biomater Appl*, 5: 204-26.
288. Kinnari TJ, Salonen EM, Jero J. (2001) New method for coating tympanostomy tubes to prevent tube occlusions. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol*, 58: 107-11.
289. Kinnari TJ, Peltonen LI, Kuusela P, Kivilahti J, Kononen M, Jero J. (2005) Bacterial adherence to titanium surface coated with human serum albumin. *Otol Neurotol*, 26: 380-4.
290. McDowell SG, An YH, Draughn RA, Friedman RJ. (1995) Application of a fluorescent redox dye for enumeration of metabolically active bacteria on albumin-coated titanium surfaces. *Lett Appl Microbiol*, 21: 1-4.
291. An YH, Stuart GW, McDowell SJ, McDaniel SE, Kang Q, Friedman RJ. (1996) Prevention of bacterial adherence to implant surfaces with a crosslinked albumin coating in vitro. *J Orthop Res*, 14: 846-9.
292. An YH, Bradley J, Powers DL, Friedman RJ. (1997) The prevention of prosthetic infection using a cross-linked albumin coating in a rabbit model. *J Bone Joint Surg Br*, 79: 816-9.
293. Naves P, del Prado G, Huelves L, Rodriguez-Cerrato V, Ruiz V, Ponte MC, Soriano F. (2010) Effects of human serum albumin, ibuprofen and N-acetyl-L-cysteine against biofilm formation by pathogenic *Escherichia coli* strains. *J Hosp Infect*, 76: 165-70.
294. del Prado G, Ruiz V, Naves P, Rodriguez-Cerrato V, Soriano F, del Carmen Ponte M. (2010) Biofilm formation by *Streptococcus pneumoniae* strains and effects of human serum albumin, ibuprofen, N-acetyl-L-cysteine, amoxicillin, erythromycin, and levofloxacin. *Diagn Microbiol Infect Dis*, 67: 311-8.
295. Bernards MT, Qin C, Jiang S. (2008) MC3T3-E1 cell adhesion to hydroxyapatite with adsorbed bone sialoprotein, bone osteopontin, and bovine serum albumin. *Colloids Surf B Biointerfaces*, 64: 236-47.
296. Webster TJ, Ergun C, Doremus RH, Bizios R. (2002) Hydroxylapatite with substituted magnesium, zinc, cadmium, and yttrium. II. Mechanisms of osteoblast adhesion. *J Biomed Mater Res*, 59: 312-7.
297. Weszl M, Skaliczki G, Cselenyak A, Kiss L, Major T, Schandl K, Bogner E, Stadler G, Peterbauer A, Csonge L, Lacza Z. (2012) Freeze-dried human serum albumin improves the adherence and proliferation of mesenchymal stem cells on mineralized human bone allografts. *J Orthop Res*, 30: 489-96.
298. Liu X, Zhou X, Li S, Lai R, Zhou Z, Zhang Y, Zhou L. (2014) Effects of titania nanotubes with or without bovine serum albumin loaded on human gingival fibroblasts. *Int J Nanomedicine*, 9: 1185-98.
299. Noszczyk BH, Kowalczyk T, Lyzniak M, Zembrzycki K, Mikulowski G, Wysocki J, Kawiak J, Pojda Z. (2015) Biocompatibility of electrospun human albumin: a pilot study. *Biofabrication*, 7: 015011.
300. Nseir N, Regev O, Kaully T, Blumenthal J, Levenberg S, Zussman E. (2013) Biodegradable scaffold fabricated of electrospun albumin fibers: mechanical and biological characterization. *Tissue Eng Part C Methods*, 19: 257-64.
301. Balique JG, Benchetrit S, Bouillot JL, Flament JB, Gouillat C, Jarsaillon P, Lepere M, Manton G, Arnaud JP, Magne E, Brunetti F. (2005) Intraperitoneal treatment of incisional and umbilical hernias using an innovative composite mesh: four-year results of a prospective multicenter clinical trial. *Hernia*, 9: 68-74.

302. Li PS, Lee IL, Yu WL, Sun JS, Jane WN, Shen HH. (2014) A novel albumin-based tissue scaffold for autogenic tissue engineering applications. *Sci Rep*, 4: 5600.
303. Gallego L, Junquera L, Garcia E, Garcia V, Alvarez-Viejo M, Costilla S, Fresno MF, Meana A. (2010) Repair of rat mandibular bone defects by alveolar osteoblasts in a novel plasma-derived albumin scaffold. *Tissue Eng Part A*, 16: 1179-87.
304. Mueller B, Koch D, Lutz R, Schlegel KA, Treccani L, Rezwani K. (2014) A novel one-pot process for near-net-shape fabrication of open-porous resorbable hydroxyapatite/protein composites and in vivo assessment. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*, 42: 137-45.
305. Hess U, Hill S, Treccani L, Streckbein P, Heiss C, Rezwani K. (2015) A mild one-pot process for synthesising hydroxyapatite/biomolecule bone scaffolds for sustained and controlled antibiotic release. *Biomed Mater*, 10: 015013.
306. Gallego L, Junquera L, Meana A, Alvarez-Viejo M, Fresno M. (2010) Ectopic bone formation from mandibular osteoblasts cultured in a novel human serum-derived albumin scaffold. *J Biomater Appl*, 25: 367-81.
307. Klara T, Csonge L, Janositz G, Csernatony Z, Lacza Z. (2014) Albumin-coated structural lyophilized bone allografts: a clinical report of 10 cases. *Cell Tissue Bank*, 15: 89-97.
308. Yamaguchi M, Igarashi A, Misawa H, Tsurusaki Y. (2003) Enhancement of albumin expression in bone tissues with healing rat fractures. *J Cell Biochem*, 89: 356-63.
309. Ishida K, Sawada N, Yamaguchi M. (2004) Expression of albumin in bone tissues and osteoblastic cells: involvement of hormonal regulation. *Int J Mol Med*, 14: 891-5.
310. Ishida K, Yamaguchi M. (2004) Role of albumin in osteoblastic cells: enhancement of cell proliferation and suppression of alkaline phosphatase activity. *Int J Mol Med*, 14: 1077-81.
311. Ishida K, Yamaguchi M. (2005) Albumin regulates Runx2 and alpha1 (I) collagen mRNA expression in osteoblastic cells: comparison with insulin-like growth factor-I. *Int J Mol Med*, 16: 689-94.
312. Weisiger R, Gollan J, Ockner R. (1981) Receptor for albumin on the liver cell surface may mediate uptake of fatty acids and other albumin-bound substances. *Science*, 211: 1048-51.
313. Fanali G, di Masi A, Trezza V, Marino M, Fasano M, Ascenzi P. (2012) Human serum albumin: from bench to bedside. *Mol Aspects Med*, 33: 209-90.
314. Fasano M, Fanali G, Leboffe L, Ascenzi P. (2007) Heme binding to albuminoid proteins is the result of recent evolution. *IUBMB Life*, 59: 436-40.
315. van der Vusse GJ. (2009) Albumin as fatty acid transporter. *Drug Metab Pharmacokinet*, 24: 300-7.
316. Sole A, Mas J, Esteve I. (2007) A new method based on image analysis for determining cyanobacterial biomass by CLSM in stratified benthic sediments. *Ultramicroscopy*, 107: 669-73.
317. Aghdasi B, Montgomery SR, Daubs MD, Wang JC. (2013) A review of demineralized bone matrices for spinal fusion: the evidence for efficacy. *Surgeon*, 11: 39-48.
318. Spicer PP, Kretlow JD, Young S, Jansen JA, Kasper FK, Mikos AG. (2012) Evaluation of bone regeneration using the rat critical size calvarial defect. *Nat Protoc*, 7: 1918-29.
319. Wong JK, Cerovac S, Ferguson MW, McGrouther DA. (2006) The cellular effect of a single interrupted suture on tendon. *J Hand Surg Br*, 31: 358-67.
320. Horvathy DB, Nardai PP, Major T, Schandl K, Cselenyak A, Vacz G, Kiss L, Szendroi M, Lacza Z. (2011) Muscle regeneration is undisturbed by repeated polytraumatic injury. *Eur J Trauma Emerg Surg*, 37: 161-7.
321. Walsh SK, Gordon T, Addas BM, Kemp SW, Midha R. (2010) Skin-derived precursor cells enhance peripheral nerve regeneration following chronic denervation. *Exp Neurol*, 223: 221-8.

322. Walsh S, Midha R. (2009) Practical considerations concerning the use of stem cells for peripheral nerve repair. *Neurosurg Focus*, 26: E2.
323. Wu T, Liu Y, Wang B, Sun Y, Xu J, Yuk-Wai LW, Xu L, Zhang J, Li G. (2016) The Use of Cocultured Mesenchymal Stem Cells with Tendon-Derived Stem Cells as a Better Cell Source for Tendon Repair. *Tissue Eng Part A*, 22: 1229-1240.
324. Leong DJ, Sun HB. (2016) Mesenchymal stem cells in tendon repair and regeneration: basic understanding and translational challenges. *Ann N Y Acad Sci*,
325. Kinnaird T, Stabile E, Burnett MS, Lee CW, Barr S, Fuchs S, Epstein SE. (2004) Marrow-derived stromal cells express genes encoding a broad spectrum of arteriogenic cytokines and promote in vitro and in vivo arteriogenesis through paracrine mechanisms. *Circ Res*, 94: 678-85.
326. Jackson KA, Majka SM, Wang H, Pocius J, Hartley CJ, Majesky MW, Entman ML, Michael LH, Hirschi KK, Goodell MA. (2001) Regeneration of ischemic cardiac muscle and vascular endothelium by adult stem cells. *J Clin Invest*, 107: 1395-402.
327. Cselenyak A, Pankotai E, Horvath EM, Kiss L, Lacza Z. (2010) Mesenchymal stem cells rescue cardiomyoblasts from cell death in an in vitro ischemia model via direct cell-to-cell connections. *BMC Cell Biol*, 11: 29.
328. Sadat S, Gehmert S, Song YH, Yen Y, Bai X, Gaiser S, Klein H, Alt E. (2007) The cardioprotective effect of mesenchymal stem cells is mediated by IGF-I and VEGF. *Biochem Biophys Res Commun*, 363: 674-9.
329. Deb A, Wang S, Skelding KA, Miller D, Simper D, Caplice NM. (2003) Bone marrow-derived cardiomyocytes are present in adult human heart: A study of gender-mismatched bone marrow transplantation patients. *Circulation*, 107: 1247-9.
330. Emmert MY, Wolint P, Winklhofer S, Stolzmann P, Cesarovic N, Fleischmann T, Nguyen TD, Frauenfelder T, Boni R, Scherman J, Bettex D, Grunenfelder J, Schwartlander R, Vogel V, Gyongyosi M, Alkadhi H, Falk V, Hoerstrup SP. (2013) Transcatheter based electromechanical mapping guided intramyocardial transplantation and in vivo tracking of human stem cell based three dimensional microtissues in the porcine heart. *Biomaterials*, 34: 2428-41.
331. Tateishi-Yuyama E, Matsubara H, Murohara T, Ikeda U, Shintani S, Masaki H, Amano K, Kishimoto Y, Yoshimoto K, Akashi H, Shimada K, Iwasaka T, Imaizumi T. (2002) Therapeutic angiogenesis for patients with limb ischaemia by autologous transplantation of bone-marrow cells: a pilot study and a randomised controlled trial. *Lancet*, 360: 427-35.
332. Mazzocca AD, McCarthy MB, Arciero C, Jhaveri A, Obopilwe E, Rincon L, Wyman J, Gronowicz GA, Arciero RA. (2007) Tendon and bone responses to a collagen-coated suture material. *Journal of shoulder and elbow surgery*, 16: S222-30.
333. Yao J, Korotkova T, Riboh J, Chong A, Chang J, Smith RL. (2008) Bioactive sutures for tendon repair: assessment of a method of delivering pluripotential embryonic cells. *J Hand Surg Am*, 33: 1558-64.
334. Yao J, Korotkova T, Smith RL. (2011) Viability and proliferation of pluripotential cells delivered to tendon repair sites using bioactive sutures--an in vitro study. *J Hand Surg Am*, 36: 252-8.
335. Pascual I, de Miguel GF, Gomez-Pinedo UA, de Miguel F, Arranz MG, Garcia-Olmo D. (2008) Adipose-derived mesenchymal stem cells in biosutures do not improve healing of experimental colonic anastomoses. *Br J Surg*, 95: 1180-4.
336. Hammad M, Rao W, Smith JG, Anderson DG, Langer R, Young LE, Barrett DA, Davies MC, Denning C, Alexander MR. (2016) Identification of polymer surface adsorbed proteins implicated in pluripotent human embryonic stem cell expansion. *Biomater Sci*, 4: 1381-91.

337. Abay N, Gurel Pekozer G, Ramazanoglu M, Kose GT. (2016) Bone Formation from Porcine Dental Germ Stem Cells on Surface Modified Polybutylene Succinate Scaffolds. *Stem Cells Int*, 2016: 8792191.
338. Torre ML, Lucarelli E, Guidi S, Ferrari M, Alessandri G, De Girolamo L, Pessina A, Ferrero I. (2015) Ex vivo expanded mesenchymal stromal cell minimal quality requirements for clinical application. *Stem Cells Dev*, 24: 677-85.
339. Majd H, Quinn TM, Wipff PJ, Hinz B. (2011) Dynamic expansion culture for mesenchymal stem cells. *Methods Mol Biol*, 698: 175-88.
340. Freudenberg S, Rewerk S, Kaess M, Weiss C, Dorn-Beinecke A, Post S. (2004) Biodegradation of absorbable sutures in body fluids and pH buffers. *Eur Surg Res*, 36: 376-85.
341. Karabulut R, Sonmez K, Turkyilmaz Z, Bagbanci B, Basaklar AC, Kale N. (2010) An In Vitro and In Vivo Evaluation of Tensile Strength and Durability of Seven Suture Materials in Various pH and Different Conditions: An Experimental Study in Rats. *Indian J Surg*, 72: 386-90.
342. Fontaine MJ, Shih H, Schafer R, Pittenger MF. (2016) Unraveling the Mesenchymal Stromal Cells' Paracrine Immunomodulatory Effects. *Transfus Med Rev*, 30: 37-43.
343. de Witte SF, Franquesa M, Baan CC, Hoogduijn MJ. (2015) Toward Development of iMesenchymal Stem Cells for Immunomodulatory Therapy. *Front Immunol*, 6: 648.
344. Pocaterra A, Caruso S, Bernardi S, Scagnoli L, Continenza MA, Gatto R. (2016) Effectiveness of platelet-rich plasma as an adjunctive material to bone graft: a systematic review and meta-analysis of randomized controlled clinical trials. *Int J Oral Maxillofac Surg*, 45: 1027-34.
345. Drosos GI, Touzopoulos P, Ververidis A, Tilkeridis K, Kazakos K. (2015) Use of demineralized bone matrix in the extremities. *World J Orthop*, 6: 269-77.
346. Bormann N, Pruss A, Schmidmaier G, Wildemann B. (2010) In vitro testing of the osteoinductive potential of different bony allograft preparations. *Arch Orthop Trauma Surg*, 130: 143-9.
347. Holzmann P, Niculescu-Morzsza E, Zwickl H, Halbwirth F, Pichler M, Matzner M, Gottsauner-Wolf F, Nehrer S. (2010) Investigation of bone allografts representing different steps of the bone bank procedure using the CAM-model. *Altex*, 27: 97-103.
348. Malhotra A, Pelletier MH, Yu Y, Walsh WR. (2013) Can platelet-rich plasma (PRP) improve bone healing? A comparison between the theory and experimental outcomes. *Arch Orthop Trauma Surg*, 133: 153-65.
349. Anitua E, Zalduendo MM, Prado R, Alkhraisat MH, Orive G. (2015) Morphogen and proinflammatory cytokine release kinetics from PRGF-Endoret fibrin scaffolds: evaluation of the effect of leukocyte inclusion. *J Biomed Mater Res A*, 103: 1011-20.
350. Dohan Ehrenfest DM, Bielecki T, Jimbo R, Barbe G, Del Corso M, Inchingolo F, Sammartino G. (2012) Do the fibrin architecture and leukocyte content influence the growth factor release of platelet concentrates? An evidence-based answer comparing a pure platelet-rich plasma (P-PRP) gel and a leukocyte- and platelet-rich fibrin (L-PRF). *Curr Pharm Biotechnol*, 13: 1145-52.
351. Braun HJ, Kim HJ, Chu CR, Drago J. (2014) The effect of platelet-rich plasma formulations and blood products on human synoviocytes: implications for intra-articular injury and therapy. *Am J Sports Med*, 42: 1204-10.
352. Hudgens JL, Sugg KB, Grekin JA, Gumucio JP, Bedi A, Mendias CL. (2016) Platelet-Rich Plasma Activates Proinflammatory Signaling Pathways and Induces Oxidative Stress in Tendon Fibroblasts. *Am J Sports Med*, 44: 1931-40.
353. Anitua E, Zalduendo M, Troya M, Padilla S, Orive G. (2015) Leukocyte inclusion within a platelet rich plasma-derived fibrin scaffold stimulates a more pro-inflammatory environment and alters fibrin properties. *PLoS One*, 10: e0121713.



354. Alaei F, Hong SH, Dukas AG, Pensak MJ, Rowe DW, Lieberman JR. (2014) Evaluation of osteogenic cell differentiation in response to bone morphogenetic protein or demineralized bone matrix in a critical sized defect model using GFP reporter mice. *J Orthop Res*, 32: 1120-8.
355. Hussain A, Takahashi K, Sonobe J, Tabata Y, Bessho K. (2014) Bone Regeneration of Rat Calvarial Defect by Magnesium Calcium Phosphate Gelatin Scaffolds with or without Bone Morphogenetic Protein-2. *J Maxillofac Oral Surg*, 13: 29-35.
356. Liu T, Wu G, Wismeijer D, Gu Z, Liu Y. (2013) Deproteinized bovine bone functionalized with the slow delivery of BMP-2 for the repair of critical-sized bone defects in sheep. *Bone*, 56: 110-8.
357. Wu M, Chen G, Li YP. (2016) TGF-beta and BMP signaling in osteoblast, skeletal development, and bone formation, homeostasis and disease. *Bone Res*, 4: 16009.
358. Kaiser MG, Groff MW, Watters WC, 3rd, Ghogawala Z, Mummaneni PV, Dailey AT, Choudhri TF, Eck JC, Sharan A, Wang JC, Dhall SS, Resnick DK. (2014) Guideline update for the performance of fusion procedures for degenerative disease of the lumbar spine. Part 16: bone graft extenders and substitutes as an adjunct for lumbar fusion. *J Neurosurg Spine*, 21: 106-32.
359. Even J, Eskander M, Kang J. (2012) Bone morphogenetic protein in spine surgery: current and future uses. *J Am Acad Orthop Surg*, 20: 547-52.
360. Fu R, Selph S, McDonagh M, Peterson K, Tiwari A, Chou R, Helfand M. (2013) Effectiveness and harms of recombinant human bone morphogenetic protein-2 in spine fusion: a systematic review and meta-analysis. *Ann Intern Med*, 158: 890-902.
361. Skaliczki G, Schandl K, Weszl M, Major T, Kovacs M, Skaliczki J, Szendroi M, Dobo-Nagy C, Lacza Z. (2013) Serum albumin enhances bone healing in a nonunion femoral defect model in rats: a computer tomography micromorphometry study. *Int Orthop*, 37: 741-5.
362. Soicher MA, Christiansen BA, Stover SM, Leach JK, Fyhrie DP. (2013) Remineralization of demineralized bone matrix (DBM) via alternating solution immersion (ASI). *J Mech Behav Biomed Mater*, 26: 109-18.
363. Stancoven BW, Lee J, Dixon DR, McPherson JC, 3rd, Bisch FC, Wikesjo UM, Susin C. (2013) Effect of bone morphogenetic protein-2, demineralized bone matrix and systemic parathyroid hormone (1-34) on local bone formation in a rat calvaria critical-size defect model. *J Periodontol Res*, 48: 243-51.
364. Kim HP, Ji YH, Rhee SC, Dhong ES, Park SH, Yoon ES. (2012) Enhancement of bone regeneration using osteogenic-induced adipose-derived stem cells combined with demineralized bone matrix in a rat critically-sized calvarial defect model. *Curr Stem Cell Res Ther*, 7: 165-72.
365. Intini G, Andreana S, Buhite RJ, Bobek LA. (2008) A comparative analysis of bone formation induced by human demineralized freeze-dried bone and enamel matrix derivative in rat calvaria critical-size bone defects. *J Periodontol*, 79: 1217-24.
366. Tilkeridis K, Touzopoulos P, Ververidis A, Christodoulou S, Kazakos K, Drosos GI. (2014) Use of demineralized bone matrix in spinal fusion. *World J Orthop*, 5: 30-7.
367. Lee KJ, Roper JG, Wang JC. (2005) Demineralized bone matrix and spinal arthrodesis. *Spine J*, 5: 217S-223S.
368. Wang T, Zhang X, Bikle DD. (2016) Osteogenic Differentiation of Periosteal Cells during Fracture Healing. *J Cell Physiol*,
369. Crowley C, Wong JM, Fisher DM, Khan WS. (2013) A systematic review on preclinical and clinical studies on the use of scaffolds for bone repair in skeletal defects. *Curr Stem Cell Res Ther*, 8: 243-52.
370. Keramaris NC, Kaptanis S, Moss HL, Loppini M, Pneumaticos S, Maffulli N. (2012) Endothelial progenitor cells (EPCs) and mesenchymal stem cells (MSCs) in bone healing. *Curr Stem Cell Res Ther*, 7: 293-301.

371. Panetta NJ, Gupta DM, Longaker MT. (2010) Bone regeneration and repair. *Curr Stem Cell Res Ther*, 5: 122-8.
372. Garcia P, Histing T, Holstein JH, Klein M, Laschke MW, Matthys R, Ignatius A, Wildemann B, Lienau J, Peters A, Willie B, Duda G, Claes L, Pohlemann T, Menger MD. (2013) Rodent animal models of delayed bone healing and non-union formation: a comprehensive review. *Eur Cell Mater*, 26: 1-12; discussion 12-4.
373. Muschler GF, Raut VP, Patterson TE, Wenke JC, Hollinger JO. (2010) The design and use of animal models for translational research in bone tissue engineering and regenerative medicine. *Tissue Eng Part B Rev*, 16: 123-45.
374. Gomes PS, Fernandes MH. (2011) Rodent models in bone-related research: the relevance of calvarial defects in the assessment of bone regeneration strategies. *Lab Anim*, 45: 14-24.
375. Bosch C, Melsen B, Vargervik K. (1998) Importance of the critical-size bone defect in testing bone-regenerating materials. *J Craniofac Surg*, 9: 310-6.
376. Horvathy DB, Vacz G, Toro I, Szabo T, May Z, Duarte M, Hornyak I, Szabo BT, Dobo-Nagy C, Doros A, Lacza Z. (2015) Remineralization of demineralized bone matrix in critical size cranial defects in rats: A 6-month follow-up study. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater*,

## 10. Saját publikációk jegyzéke

### I. Az értekezés témájában megjelent eredeti közlemények listája:

**Denes B. Horvathy**, Gabriella Vacz, Tamas Szabo, Imola C. Szigyarto, Ildiko Toro, Boglarka Vamos, Istvan Hornyak, Karoly Renner, Tamas Klara, Bence T. Szabo, Csaba Dobo-Nagy, Attila Doros, Zsombor Lacza **2015**. Serum albumin coating of demineralized bone matrix results in stronger new bone formation. *J Biomed Mater Res Part B* 2016 Jan;104(1):126-32. doi: 10.1002/jbm.b.33359. **IF: 2.881**

**Horvathy, D.B.**, Vacz, G., Cselenyak, A., Weszl, M., Kiss, L., Lacza, Z., Albumin-Coated Bioactive Suture for Cell Transplantation. *Surg Innov.* 2013 Jun;20(3):249-55. doi: 10.1177/1553350612451353. **IF: 1.338**

**Dénes B. Horváthy**, Gabriella Vác, Tamás Szabó, Károly Renner, Kinga Vajda, Balázs Sándor and Zsombor Lacza *Communication: Absorption and Tensility of Bioactive Sutures Prepared for Cell Transplantation* *Materials* **2013**, 6(2), 544-550; doi:10.3390/ma6020544 **IF: 1.879**

**Horváthy DB**, Simon M, Schwarz CM, Masteling M, Vác G, Hornyák I, Lacza Z. Serum albumin as a local therapeutic agent in cell therapy and tissue engineering. *Biofactors*. 2016 Nov 11. doi: 10.1002/biof.1337. **IF:4.504**

Schandl K, **Horváthy DB**, Doros A, Majzik E, Schwarz CM, Csöngé L, Abkarovits G, Bucsi L, Lacza Z. Bone-Albumin filling decreases donor site morbidity and enhances bone formation after anterior cruciate ligament reconstruction with bone-patellar tendon-bone autografts. *Int Orthop*. 2016 Jun 29. DOI:10.1007/s00264-016-3246-8 **IF: 2.387**

**Horvathy DB**, Vacz G, Toro I, Szabo T, May Z, Duarte M, Hornyak I, Szabo BT, Dobo-Nagy C, Doros A, Lacza Z. **2015**. Remineralization of demineralized bone matrix in critical size cranial defects in rats: A 6-month follow-up study. *J Biomed Mater Res Part B* 2015;00B:000–000 **IF: 2.881**

Hornyák I, Madácsi E, Kalugyer P, Vác G, **Horváthy DB**, Szendrői M, Han W, Lacza Z. Increased release time of antibiotics from bone allografts through a novel biodegradable coating. *Biomed Res Int*. 2014;2014:459867. doi: 10.1155/2014/459867. **IF: 1.579**

**D. B. Horvathy**, P. P. Nardai, T. Major, K. Schandl, A. Cselenyak, G. Vacz, L. Kiss, M. Szendroi, Z. Lacza: Muscle regeneration is undisturbed by repeated polytraumatic injury, Accepted for publication in *Eur J Trauma Emerg Surg* on May 31, 2010 **IF: 0.328**

### II. Egyéb - nem az értekezés témájában megjelent - eredeti közlemények listája:

Vác G, Cselenyák A, Cserép Z, Benkő R, Kovács E, Pankotai E, Lindenmair A, Wolbank S, Schwarz CM, **Horváthy DB**, Kiss L, Hornyák I, Lacza Z. Effects of amniotic epithelial cell transplantation in endothelial injury. *Interv Med Appl Sci*. 2016 Dec;8(4):164-171. doi: 10.1556/1646.8.2016.4.6. **IF: 0**

Marianna Király, Kristóf Kádár, **Dénes B. Horváthy**, Péter Nardai, Gábor Z. Rácz, Zsombor Lacza, Gábor Varga, Gábor Gerber: Integration of neuronally predifferentiated human dental pulp stem cells into rat brain in vivo. *Neurochem Int.* 2011 Sep;59(3):371-81. doi: 10.1016/j.neuint.2011.01.006. **IF: 2.857**

**Horvathy DB**, Hauck EF, Ogilvy CS, Hopkins LN , Levy EI, Siddiqui AH: Complete Preoperative Embolization of Hemangioblastoma Vessels with Onyx: Technical Note. Accepted for publication in *J Clin Neurosci* on June 14, 2010. **IF: 1.247**

Hauck EF, Natarajan SK, **Horvathy DB**, Hopkins LN , Siddiqui AH, Levy EI: Stent- assisted Basilar Reconstruction for a Traumatic Vertebral Dissection with a Large Basilar Artery Thrombosis. Accepted for publication in *J NeuroIntervent Surg 2010* **IF: 0.923**

## 11. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt témavezetőmnek, Dr. Lacza Zsombornak köszönöm, hogy iránymutatásával diákkörös hallgató koromtól kezdve segítette tudományos fejlődésemet. Köszönöm neki, hogy teret engedett önálló elképzeléseim megvalósításának is. Az ő támogató segítsége nélkül ez a disszertáció nem készülhetett volna el.

Köszönöm Dr. Kollai Márk és Dr. Benyó Zoltán Professzor Uraknak, akik lehetővé tették számomra, hogy a Klinikai Kísérleti Kutató- és Humán Élettani Intézet magas szintű szakmai felkészültségét, fiatalokat támogató családias légkörét már tudományos diákkörösként megszerethessem. Köszönöm nekik, hogy a dolgozatom anyagát képző kísérletek elvégzéséhez támogatásukat adták.

Köszönöm Dr. Szendrői Miklós Professzor Úrnak, hogy a Klinikai Doktori Iskolában vezetett programjába történő felvételemet támogatta, ezáltal segítvén a tudományos fejlődésemet.

Köszönöm a Szövetéptítő Munkacsoport tagjainak, hogy támogató szakmai tanácsaikkal mellettem voltak.

Köszönöm Dr. Doros Attilának, hogy felbecsülhetetlen tanácsaival és a képalkotó vonatkozásokban nyújtott szakértelmével segítette a munkámat.

Köszönöm a Transzplatációs és Sebészeti Klinika CT labor tagjainak, Vincze Erikának, Schwarz Ágotának és Jánosi Máriának a képalkotásban nyújtott önzetlen segítségét.

Köszönöm Dr. Szabó Tamásnak az anyagvizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Renner Károlynak a mechanikai vizsgálatokban nyújtott segítségét.

Köszönöm Dr. Szabó Bencének és Dr. Dobó-Nagy Csabának a microCT elkészítésében nyújtott segítségét.

Köszönöm a Klinikai Kísérleti Kutató Intézet valamennyi dolgozójának a segítséget és a baráti hangulatot, amivel mindig fogadtak.

Köszönöm Vác Gabriellának, Dr. Hornyák Istvánnak, Dr. Balázs Bernadettnek, Balog Ibolyának, Dr. Schandl Károlynak, Dr. Major Tibornak és Dr. Szócs Annának, hogy barátságukkal, szünni nem tudó vidámságukkal elősegítették, hogy dolgozatom megszülethessen.

Végül, köszönettel tartozom családomnak és barátaimnak támogatásukért, szeretetükért és segítségükért, akik nélkül nem juthattam volna el idáig.