

# **Porcvédelem és az ízületi porc pótlásának lehetőségei az ortopédiai gyakorlatban**

**Dr. Farkas Boglárka Anett**

**Doktori (PhD) értekezés tézisei**



**Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, Vezető: Dr. Bogár Lajos**  
**Mozgásszervi Klinikai Tudományok Doktori Program, Vezető: Dr. Than Péter**  
**Témavezető: Dr. Bárdos Tamás**

**Pécsi Tudományegyetem**  
**Általános Orvostudományi Kar**  
**Ortopédiai Klinika**

**2018.**

**Pécs**

# 1. Bevezetés

A felnőtt populáció ízületi porcsérülése rendkívül gyakran előforduló probléma a mozgásszervi sebészetben. Az érett ízületi porcszövet táplálása - mivel avascularis, bradytrop szövetről van szó - speciális, leginkább diffúzióval történik a synovialis folyadékból. Az ízületi porc elhelyezkedése, illetve a rá ható erőviszonyok mértéke és sokfélesége miatt fokozottan sérülékeny. Sérülékenységgel fordított arányban azonban a regenerációs képessége elenyésző. Ha az ízület teherviselő felszínén porcsérülés keletkezik, akkor várható annak kiterjedése mind méretben, mind mélységben, akár a subchondralis csontot is elérve, végül pedig az arthrosis kifejlődése. A porckárosodások nagyobb hányada az ízületek terhelő felszíneit érinti, melynek fokális, chondralis és osteochondralis defektusai gyakran okoznak megterhelést a mozgásszervi betegek számára. Az ízületi porcsérülések csoportján belül célszerű megkülönböztetni az osteoarthritis talaján kialakuló, gyakran idősebb populációban jelentkező porcdegenerációt, és a gyakran traumás behatásra, általában fiatalabb életkorban létrejövő körülírt porcdefektusokat. A porcdefektusok műtéti megoldására a porcszöveti rekonstrukciós eljárások egyre szélesedő tárháza jelenthet alternatív megoldást. A porcdefektusok műtéti kezelési lehetőségei, a porcfelszínképző eljárások a porcléziók megszüntetésére törekednek, mely során egyrészt csontvelő-stimulációs, másrészt rekonstrukciós irányvonalat követnek. Ilyen eljárások a teljesség igénye nélkül a periosteum-perichondrium lebenyek átültetése, abrasios arthroplastica, subchondralis felfúrás, microfractura, osteochondralis auto- és allograftok visszaültetése, vagy a mozaikplasztika.

A rekonstrukciós eljárások közé illeszkedik az autológ chondrocyta implantáció (ACI) is, amely a fokális porcdefektusok első, valódi biológiai, szövettenyésztésen alapuló megoldási lehetősége. Az ACI technika két műtéti beavatkozásból áll. Az első lépésben arthroscopos porcbiopszia történik az ízület nem teherviselő felszínéről, majd a porcminta laboratóriumba kerülésekor enzimatis, fragmentációs-porcsejtizolációs lépések következnek kollagenázok felhasználásával, majd a primer sejthalmaz szaporítása az expansziót elősegítő tenyésztőközegben, speciális fizikai körülmények mellett valósul meg. A hosszabb időtartamú sejtenyésztés során a

chondrocyták elveszíthetik a jellemző sejtes megjelenésüket, dedifferenciálódhatnak és fibroblastokra jellemző struktúrát alakíthatnak ki. Ezen változás elkerülése céljából van szükség a folyamatos sejtenyésztés-kontrollra, a chondrocyta sejtek morfológiájának vizsgálatára mikroszkópos módszerekkel, illetve a porcsejtekre specifikus molekulák, mint például a II. típusú kollagén (COL2A1), aggrecan, cartilage oligomeric matrix protein (COMP), illetve az ezeket kódoló mRNS-k kvantitatív analízisére. A megfelelő ideig tenyésztett, stabil minőséget mutató, és a beültetéshez szükséges sejtszámot elért porcsejtenyészteteket különféle rögzítési mechanizmusokkal, különböző technikákkal lehet visszajuttatni az eredeti porcdefektus helyére egy második operatív beavatkozás során. A II. generációs ACI technika esetében a kivett és tenyésztett chondrocytákat nem periosteum réteg, vagy kollagén membrán alá injektálják, mint az I. generációs ACI esetén, hanem egy biodegradábilis hordozó felületre viszik rá. Ez a technika háromdimenziós mátrixokat használ, amelyek karriereként és egyúttal aktív környezetként is funkcionálnak a chondrocyták számára. Az ACI technika alkalmazásának komoly kritériumrendszere van, és a beavatkozást követően is szigorú utánkövetés javasolt. A posztoperatív utánkövetés magában foglalja a klinikai funkcionális tesztek, az ízületi mágneses rezonanciás képalkotó (MRI) vizsgálatok elvégzését, a porcdefektus makroszkópos megítélését az ún. „second-look” arthroscopia során, illetve az arthroscopia során vett biopszia hisztológiai vizsgálatát.

Az ízületi porcban normál körülmények között pontos egyensúly áll fenn a porcszintézis és -degradáció között, hogy a porcszövet fenntarthassa fiziológiás egységét és eredeti funkcióját. Az apoptózis, mint programozott sejthalál fiziológiás körülmények között is fontos reguláló tényező a porcszövet-specifikus struktúra fenntartásában. Az ízületi porcsérülések regeneratív ellátása kapcsán a chondrocyta sejtenyésztésben, illetve magában az átültetett porcszövetben is különösen fontos a sejthalál megelőzése és minimalizálása, a viabilis porcsejtek jelenléte a beültetés határfokának megtartása érdekében.

## 2. Célkitűzések

- ACI technika alapjául szolgáló biotechnológiai sejtenyésztő labor felállítása; sertés és humán chondrocytákon végzett sejtenyésztési vizsgálatok és a chondrocyta tissue engineering technika megalapozása
- Porcsejtenyésztés minőségi kritériumainak követése: a tenyésztett chondrocyták mikroszkópos értékelése, génexpressziós változások feltérképezése PCR módszerrel
- Az ACI technika jogi hátterének, beültethetőségi viszonyainak összehasonlító vizsgálata különböző országok jogrendszerében
- Hazai viszonyokra adaptálható ortopédiai szakmai kollégiumi állásfoglalás kidolgozása az ACI technika alkalmazására
- Chondrocyta viabilitási vizsgálatok a klinikai gyakorlatban alkalmazott kortikoszteroidok és lokál anesztetikumok felhasználásával, in vitro és ex vivo módszerekkel
- Sertés és humán chondrocyták viselkedésének vizsgálata háromdimenziós mátrix rendszerekben
- I. és II. generációs ACI technikák vizsgálata állatkísérletes körülmények között, juh és sertés modellekben
- Lamellált, augmentált felszínű porc allograft beültetése sertés modellekben, új porcszöveti lamellológép kifejlesztése és vizsgálata
- Összehasonlító állatkísérletek különféle porc pótlási módszerek alkalmazásával
- Az ACI technika bevezetése humán beteganyagon

### 3. Anyagok és módszerek

#### 3.1. Biotechnológiai sejtenyésztő labor felállítása, chondrocyta tissue engineering, porcsejtenyésztés minőségi kontrollja

Az állatkísérletes porcszöveti mintáink mintavételi helye és az állatkísérleteink színhelye a Kaposvári Egyetem Agrár- és Környezettudományi Karának Takarmányozástani Tanszéke volt. Az ízületi porcszöveti mintákat a sejtenyésztéshez ivarérett, nőstény juhok, és hím sertések intakt femur condylusainak nem terhelő felszínéről nyertük. A humán eredetű chondrocytákat szövetbankból származó cadaverekből, illetve a PTE Ortopédiai Klinika betegeinek intraoperatív anyagaiból származó minták felhasználásával nyertük. Biotechnológiai sejtenyésztő laborunkat a PTE ÁOK Immunológiai és Biotechnológiai Intézetében állítottuk fel, ahol a kivett porcfragmentumokból speciális tenyésztőmedium felhasználásával sorozatos porcsejtenyésztéseket indítottunk. A tenyésztett chondrocyták morfológiájának megítélésére minden passzázs után fénymikroszkópos vizsgálatokat, míg a chondrocyták esetleges génexpressziós változásának feltérképezésre reverz transzkriptáz PCR módszert végeztünk COL2A1, aggrecan, valamint a COMP vonatkozásában, a béta-actin kontrollja mellett.

#### 3.2. Chondrocyta viabilitási tesztek lokál anesztetikumok és szteroidok felhasználásával

Viabilitási tesztheinkhez in vitro humán chondrocyta sejt kultúrákat, illetve ex vivo, humán osteochondralis blokkokat használtunk. Mind a chondrocyta sejt kultúrákat, mind az osteochondralis blokkokat random 10 különböző csoportra osztottuk, és az egyes sejtcsoportokat/blokkokat betamethason, prednisolon, lidocain, bupivacain, és ropivacain oldatokkal kezeltük önmagukban, illetve a következő kombinációkban: betamethason/lidocain, betamethason/bupivacain, betamethason/ropivacain, prednisolon/lidocain. Kontrollként PBS oldatot használtunk. A chondrocyta sejt kultúrákban észlelhető sejthalált flow cytometria segítségével értékeltük fluoreszcein-izotiocianát (FITC)-jelölt annexin-V, és propídiium-jodid (PI) festést követően, míg az osteochondralis mintákban kimutatható apoptosist és necrosist TdT-mediált dUTP nick-end labeling (TUNEL) - assay segítségével vizsgáltuk.

### 3.3. Chondrocyták viselkedése háromdimenziós mátrix rendszereken, I. és II. generációs ACI állatkísérletek

A megfelelő,  $1-2 \times 10^7$  sejtszámot elért, P4 passzált, expandált sertés és humán eredetű chondrocyta szuszpenziókat háromdimenziós, Soft PGA Felt matrix felületére vittük fel, és fibrinogén/thrombin segítségével fixáltuk. A mátrixra ültetett porcsejtek életképességének és térbeli elhelyezkedésének vizsgálatára mikroszkópos analízist végeztünk, míg a chondrocyták aktivitására jellemző COL2A1, aggrecan, COMP markereket, illetve az I. típusú kollagén génexpresszióját PCR módszerrel elemeztük.

ACI állatkísérleteink első felében ivarérett, nőivarú juh modelleket vizsgáltunk, majd kísérleteinket hímivarú sertések egyoldali térdízületeiben a medialis femurcondylus terhelő felszínén létrehozott porcdefektusok kezelésével folytattuk. Az I. generációs ACI módszer során a sertések tibiájáról vett periosteum lebenyt TissuCol fibrinragasztó biztosítása mellett varrtuk vissza a porcdefektus területére, és a periosteum lebeny alá injektáltuk a chondrocyta sejtsuszpenziót. A II. generációs ACI kísérleteinkben az expandált chondrocyta sejtsuszpenziót Soft PGA Felt mátrix felületére vittük fel, majd magát a mátrixot varrtuk vissza a porcdefektus helyére. A képződött szövetet 24 hét elteltével vizsgáltuk makroszkópos és mikroszkópos módszerekkel. Makroszkópos vizsgálataink során az International Cartilage Repair Society (ICRS) szerinti értékelő skálát használtuk, míg a hisztológiai analízis céljára a defektus helyéről kivett osteochondralis biopszia mintákat Haematoxylin-eosin (HE), illetve Perjódsav-Schiff (PAS) festés után az ICRS-I. szövettani vizuális értékelő skála segítségével elemeztük.

### 3.4. Felületnövelt, lamellált porc allograft vizsgálata, porcszöveti lamellológép kifejlesztése

A porcmináinkat egy speciális, erre a célra általunk kifejlesztett, és szabadalmi folyamatban védelem alá helyezett eszközzel nyertük, amely a porcfelszín domborulatának pontosabb követését tette lehetővé. A porcgraftokat több irányban,  $200 \mu\text{m}$ -ként szintén egy speciálisan kifejlesztett vágóeszközzel, parallel futó vágásokkal lamelláltuk. A csontos felszín felőli bevágások a mélyebb rétegeken áthaladtak, de nem kompromittálták a porc felszíni rétegét, így egy deformálható alapot kaptunk, amely nagymértékben augmentált felszínnel rendelkezett. A lamellált porc allograftokat a primer porcdefektus helyén rögzítettük, majd 6 és 24 hét elteltével

vizsgáltuk az újonnan képződött regenerációs szövetet ICRS klasszifikáció szerinti makroszkópos értékelő skála segítségével, illetve fénymikroszkópos vizsgálatokkal, HE és PAS festéssel.

### 3.5. Összehasonlító állatkísérletek többféle porcpótlási módszer alkalmazásával

Sertés modelljeinkben a következő négy porcpótlási technika összehasonlító eredményeit vizsgáltuk: microfractura, I. és II. generációs ACI módszerek, illetve a lamellált chondrograft. A kontrollként szolgáló csoportban a fokális porcdefektust kezeletlenül hagytuk. A beavatkozások után 24 hét elteltével makroszkóposan értékeltük a porcdefektus helyén képződött szöveteket ICRS beosztás szerint. A hisztológiai analízis céljára az érintett területről vett osteochondralis biopszia minták értékelésére az ICRS-I. szövettani vizuális értékelő skálát használtuk.

### 3.6. Autológ chondrocyta implantáció humán bevezetése

A humán porcpótlás elvégzésére egy 33 éves sportoló férfi beteg esetében került sor, akinek térdízületében a mediális femurcondylus jelentős méretű chondralis defektusát pótoltuk két ülésben, saját porcfragmentumból tenyésztett chondrocytákkal, melyeket a II. típusú ACI technikát alkalmazva, hordozó PGA mátrix felszínére vittünk fel, majd varróanyaggal és szövetragasztóval fixáltunk. A beavatkozást követő 6, 12 és 24 hónap elteltével vizsgáltuk a térdízületi funkciókat a klinikai Lysholm beosztás használatával, illetve ezen túl MRI képalkotással is elemeztük a porcdefektus helyén képződött szövet integrációját 6 és 12 hónap elteltével.

## **4. Eredmények**

### 4.1. Chondrocyta tissue engineering, porcsejtenyésztés minőségi kontrollja

Kísérleteink kezdetén juh, majd sertés és humán chondrocyta sejt kultúrákat indítottunk. A juh, és sertés eredetű chondrocyták rövidebb idő alatt érték el a megfelelő sejtsűrűséget, míg a humán porcsejtek egyenletesebb, megbízhatóbb sejt szaporodási karakterisztikát mutattak az idő függvényében. A chondrocyta sejttenyésztések minden passzázs után elvégzett morfológiai ellenőrzés során a

tenyésztés előrehaladtával egyre inkább fibrocytákra jellemző karaktert figyeltünk meg. A hyalin porcsejtekre jellemző fő marker, a COL2A1 relatív génexpressziója PCR vizsgálatainkban fokozatosan és szignifikánsan csökkenő tendenciát mutatott, különösen a negyedik sejtpasszázst elérve. Ezzel párhuzamosan a COMP és az aggrecan génexpressziós szintje is csökkent, míg a béta-actin expressziója housekeeping funkciót betöltve viszonylag állandó szintet mutatott.

## 4.2. Chondrocyták viabilitása lokál anesztetikumok és szteroidok hatására

### 4.2.1. In vitro eredmények chondrocyta sejtenyészeteken

A lidocainnal történő 24 órás kezelés közel 20%-os apoptosist mutatott, a ropivacain-kezelés önmagában hozzávetőlegesen 40%-os sejtnecrosist idézett elő, azonban a háromféle vizsgált lokál anesztetikum közül a bupivacain bizonyult a leginkább cytotoxikusnak, tekintve, hogy közel 100%-os sejtnecrosist okozott a 24 órás kezelés. A betamethason és a prednisolon hatása hasonló karakterisztikát mutatott a sejthalál indukciójában, körülbelül 20%-os sejthalált idézve elő. A betamethason-lidocain kombináció már 6 órás kezelés után is jelentősebb mértékű apoptosist okozott, a két anyag által külön-külön előidézett hatásokhoz képest. E kombináció a necrotikus sejtek arányát is szignifikánsan emelte, tekintve, hogy a 24 órás expozíció során a sejtek 83%-a bizonyult necrotikusnak. A prednisolon-lidocain kombináció 2, illetve 6 órás expozíciója nem okozott jelentős változást az apoptosist- és necrosis-rátában, ám az apoptotikus sejtek százalékos aránya a 24 órás kezelést követően elérte a 65%-ot, míg a necrotikus sejtek aránya a 25%-ot. A betamethason-bupivacain illetve a betamethason-ropivacain kombinációk által okozott necrosis-ráta bizonyult a legmagasabbnak, mivel majdnem elérték a 100%-os sejthalált.

### 4.2.2. Ex vivo eredmények osteochondralis mintákon

Az osteochondralis minták esetében az önmagukban alkalmazott glükokortikoidok, és lokál anesztetikumok hatása csupán a porcszövet felszínebb rétegét érintette. A 24 órás lidocain-kezelés során a TUNEL-assay az összes sejt 16%-át kitevő mértékű sejtelhalást mutatott a minták felszíni porcrétegében, míg a mélyebb rétegekben a chondrocyták viabilitást mutattak. A betamethason-kezelés önmagában csak minor cytotoxikus hatást (sejtek 3%-a) mutatott, míg a prednisolon-expozíció után a TUNEL-pozitív sejtek (22%) a porcréteg felszíni harmadában voltak észlelhetők, a mélyebb



zónákban nem. A prednisolon-lidocain kombinált expozíció számtalan, random módon elhelyezkedő elhalt sejtet mutatott, melyek a minta egész mélységében észlelhetők voltak (36%). A nem viabilis chondrocyták aránya a betamethason-lidocain kombinációs kezelést követően hasonló karakterisztikát mutatott (32%), azzal a különbséggel, hogy a sejthalál inkább a porc felszíni rétegére korlátozódott. A glükokortikoid-lokál anesztetikum alkotta kombinációk szignifikánsan magasabb sejthalalozási rátát mutattak az osteochondralis mintákban, mint a glükokortikoidok vagy a lokál anesztetikumok önmagukban adva.

#### 4.3. Chondrocyták viselkedése mátrix rendszereken, I. és II. generációs ACI állatkísérletek

Az expandált sertés és humán eredetű chondrocyta szuszpenziókat Soft PGA Felt sejthordozó mátrixokra ültettük vissza, és az így létrehozott egységek mikroszkópos vizsgálata során a mátrix szálaihoz nagymértékben asszociálódott chondrocytákat találtunk. A porcsejtek térbeli elhelyezkedése - kihasználva a mátrix térbeli viszonyait - mindinkább háromdimenziós szerkezetet mutatott. A PCR vizsgálatok tanúsága szerint a mátrixra ültetés előtt a chondrocyták COL2A1, aggrecan, és COMP relatív génexpressziója egyértelműen csökkenő relatív értékeket mutatott az idő, illetve a sejtpasszázások előrehaladtával. A porcsejtek mátrixra ültetését követően a markerek relatív génexpressziós értékeinek újbóli emelkedő tendenciáját észleltük. A mátrixra ültetett chondrocyták COL2A1 génexpressziója több, mint egyharmadával nőtt, a COMP expressziója majdnem kétszerese lett, míg az aggrecan-expressziója szintén több, mint egyharmadával lett magasabb a mátrixra ültetés előtti állapottal összehasonlítva. Ezzel szemben az I. típusú kollagén génexpressziós értékei drámaian, majdnem felére csökkentek.

Az I. és II. generációs ACI kísérleteinket elsőként juh modelleken végeztük, azonban úgy találtuk, hogy a juh modellek nem kielégítő ízületi porcvastagsága és szűk ízületi térvizonyai műtéttechnikailag jelentősen megnehezítik és lehetetlenné teszik az ACI módszer alkalmazását. A sertéseken végzett ACI kísérleteinket követő 24 hét elteltével, a porcdefektusok ICRS beosztás szerinti makroszkópos értékelése során az I. generációs ACI eseteinkben a defektusok 80-85%-a volt reparátummal kitöltött, a regenerátumok integrációja kevesebb, mint 1 mm-es demarkációs határral valósult meg, de a regenerátumok területe számos kisméretű repedést mutatott. A II.

generációs ACI eseteinkben a porcdefektusok kitöltöttsége 90-95%-osnak mutatkozott, az integráció 1 mm-nél kisebb demarkációs határral, vagy komplett módon megvalósult, a regenerátumok felszíne pedig csupán elszórt fissurákat tartalmazott.

#### 4.4. Augmentált felszínű, lamellált porc allograft visszaültetése

Az új fejlesztésű, speciális eszközzel nyert, és a lamellálással felületnövelt porc allograftokat a visszaültetés utáni 6. és 24. héten vizsgáltuk makroszkópos és mikroszkópos módszerekkel. Az implantátumok a 6. héten már makroszkóposan stabil osteochondralis integritást mutattak, a delamináció jelei nélkül, azonban hiányzott még a komplett széli integráció. A 24 hetes utánkövetés alkalmával az implantátumok stabilnak mutatkoztak, az ICRS makroszkópos értékelő skála használatával „Grade II: szinte normál” minősítést kaptak (9-11 pont), de a körkörös széli integráció továbbra is inkomplett maradt. A mikroszkópos analízisünk a 6. posztoperatív héten a porcgraftok területén kezdődő osteochondralis integrációt igazolt, a subchondralis csontszövet kisfokú irregularitása mellett. A porcgraftok mély zónájában kalcifikáció, a korábbi lamellálások helyén sejtinvázió jelei voltak észlelhetők.

#### 4.5. Összehasonlító állatkísérletek különféle porcpótlási módszerekkel

Sertés modelljeinkben négy különböző porcpótlási technika eredményeit hasonlítottuk össze egy kontrollcsoport mellett, 24 héttel a porcpótló eljárások elvégzése után. A makroszkópos értékeléskor úgy találtuk, hogy a pótlás nélkül hagyott defektusok esetében gyenge minőségű regenerátum képződött, a microfractura alkalmazásával is csupán a defektus széli területein volt megfigyelhető gyenge minőségű, újonnan képződött regenerátum. Az I. generációs ACI csoportban a regenerátumok makroszkópos megjelenése nagyobb fokban hasonlított a hyalinporc eredeti szerkezetére, illetve a regenerátum vastagsága, és a környező porcterületekhez való integrációja elfogadhatónak bizonyult, kisfokú szerkezeti irregularitás mellett. A II. generációs ACI módszerrel kezelt porcdefektusok egyenletesebb felszínűt mutattak, pontosabb széli integrációval, ám a felszínen néhány repedés, fissura volt megfigyelhető. A lamellált chondrografttal kezelt állatok defektusainak helyén a graftok kifejezetten jó minőségűnek bizonyultak, delaminációs jeleket nem mutattak, ám a marginális integráció inkomplett volt. A makroszkópos értékelés statisztikailag

szignifikáns különbséget mutatott az első két csoport eredményei, illetve a további három csoport esetében kapott porcszöveti kép között. A hisztológiai értékelés során az első két csoportban vizsgált osteochondralis minták inkább a rostos porcra emlékeztettek, dezorganizált mátrixszerkezetet és sejteloszlást mutattak. A microfractura alkalmazása esetén az osteochondralis blokkok helyenként mutatták az eredeti felfúrás nyomait. Az ACI technikákkal kezelt csoportokban a mikroszkópos vizsgálat során hyalinszerű karakterisztikát mutató porcszövetet találtunk, de a porcsejtek eloszlása eltért a környező, normál porcszerkezettől, illetve a makroszkóposan jó integrációt mutató esetekben is észleltünk minor réseket az intakt porc és a graft szövete között. A lamellált chondrografttal kezelt esetekben hyalin porcszövetet találtunk, teljes osteochondralis integráció mellett. A korábbi lamellálás rései nem voltak észlelhetők, azonban a széli integráció inkomplettnek bizonyult, illetve a legtöbb esetben a subchondralis csont kistokú irregularitást mutatott, csökkent trabecularis szerkezettel. Statisztikailag jelentős eltérések mutatkoztak az összehasonlítás során két kategóriában is: a mátrixszerkezet, illetve a sejteloszlás tekintetében szignifikánsan jobb eredményeket kaptunk az ACI technikákkal kezelt, illetve a lamellált chondrografttal fedett defektusok esetében, szemben a kezeletlenül hagyott, vagy microfracturán átesett esetekkel.

#### 4.6. Autológ chondrocyta implantáció humán bevezetése

A II. típusú ACI technika alkalmazása után térdízületi, Lysholm-score szerinti funkcióvizsgálatot végeztünk. A posztoperatív 6. hónapban a score értékei javulást mutattak a preoperatív képhez képest; a térdízületi hydrops megszűnt, a ROM (range of motion) értéke csaknem teljes volt, lépcsőzésekor csak alkalmanként jelentkezett fájdalom, illetve kisebb terhelésre panasz nem jelentkezett. 12 hónap elteltével az érintett térdízület a klinikai kép minden aspektusában további határozott javulást mutatott. A 24 hónapos utánkövetés során a térdízület terhelhetőségének hiányosságai részben visszatértek, így a Lysholm-score összegzésekor a posztoperatív 12. hónap értékeinél alacsonyabb értékeket kaptunk, de a javulás így is szignifikáns maradt a műtét előtti állapothoz viszonyítva. A beteg másfél évvel a műtét után visszatért az aktív labdarúgáshoz, korábbi térdduzzanatai teljesen megszűntek. A beavatkozás után MRI vizsgálattal is értékeltük a mátrix integrációját, a posztoperatív 6. és 12. hónapban. A preoperatív felvételeken kitűnt az elvékonyodott,

irreguláris porcréteg a mediális femurcondylus területén, illetve az érintett területen a subchondralis csontszerkezet ödémája, felpuhulása, míg a posztoperatív felvételek normál vastagságú ízületi porcréteget, illetve normális denzitású subchondralis csontállományt mutattak a korábbi defektus helyén.

## 5. Megbeszélés

### 5.1. Chondrocyta tissue engineering monolayer és matrix környezetben

A porcsejtek tenyésztés során monolayer formát felvéve egy idő után elvesztik fenotípusukat, morfológiai és funkcionális-biokémiai jellegzetességeiket, egyre inkább fibrocyta-jellegű fenotípust vesznek fel, majd fokozatosan fibroblasztokká dedifferenciálódnak. E jelenség fontos limitációs tényező a porcsejtek hosszú távú laboratóriumi tenyésztésén alapuló tissue engineering technikák alkalmazásakor. A dedifferenciáció kiküszöbölésére és/vagy minimalizálására többféle lehetőség kínálkozik, például az alacsony oxigén-tenzió melletti tenyésztés; indukciós hatású, háromdimenziós hydrogel tenyésztőközegek (agaróz, kollagén, alginát, fibrin); szupplementált tenyésztő médiumok alkalmazása; vagy a porcsejtek háromdimenziós mátrixokra való felvitele.

Saját kísérleteinkben speciális, növekedési faktorokkal, illetve autológ szérummal kiegészített tenyésztő médiumot használtunk, amely megbízható körülményeket teremtett a chondrocyták expandálására, és melynek alkalmazása reprodukálható módon beültethető számú porcsejtet eredményezett. Vizsgálatainkban úgy találtuk, hogy az idő előrehaladtával, a sejtpasszázsok számának növekedésével a monolayer formátumú chondrocyták mikroszkópos megjelenése mindinkább a fibrocyták felépítéséhez vált hasonlatossá, és ez a megfigyelésünk az irodalmi adatokkal teljes mértékben korrelál.

A jellegzetes porcsejt markerek tekintetében is jelentős változások állnak be a chondrocyta-dedifferenciációs folyamatok következtében. A kultivált chondrocyták a normál porcszövetre jellemző COL2A1 termelése helyett I. (COL1A1) és III. típusú kollagént kezdenek termelni, a nagy molekulatömegű aggrecan helyett kisebb méretű proteoglikánok (pl. versican) fokozottabb termelése figyelhető meg. Saját PCR

vizsgálatainkban a sejtpasszázatok számának növekedésével a COL2A1, a COMP, és az aggrecan markerek tekintetében fokozatos és szignifikáns csökkenést tapasztaltunk, amely elsősorban a chondrocyta-tenyészet negyedik passzáza után volt kifejezett, és amely megfeleltethető a párhuzamos irodalmi adatoknak.

Saját kísérleteinkben PGA-alapú háromdimenziós mátrixot használtunk a porcsejtek hordozójaként. Mikroszkópos vizsgálataink tanúsága szerint a chondrocyták jó asszociációs készséget mutattak a mátrix szálaihoz, a tér három dimenziójában elszórtan helyezkedtek el, mindinkább felvették a natív elrendeződést.

A génexpressziós analízisünk a mátrixra helyezés után növekedést mutatott a COL2A1, COMP, és aggrecan markerek tekintetében, illetve csökkenést a dedifferenciációs markerként értelmezhető, és fibrocytákra jellemző I. típusú kollagén esetében. Az általunk használt mátrix mechanikai stabilitása megfelelő volt, és könnyen fixálhatónak bizonyult a defektus peremterületének intakt porcszövetéhez.

## 5.2. Chondrocyták viabilitása lokál anesztetikumokkal és szteroidokkal szemben

Az osteoarthritis farmakológiai kezelésében az intraarticularisan alkalmazott kortikoszteroidok és a lokál anesztetikumok fontos szerepet töltenek be. A kortikoszteroidok relatíve lassú hatáskezdetű, hatékony antiinflammatorikus szerek, a lokál anesztetikumok viszont gyors fájdalomcsillapító hatásúak. A kombinált alkalmazásuk célja, hogy a lokál anesztetikum a beadás utáni gyors hatásával csökkentse a fájdalmat addig a pontig, míg a szteroid komponens kifejti a hatását. Mindkét szer esetében felmerült a chondrocytákra kifejtett esetleges cytotoxikus tulajdonságuk. Következésképpen, az osteoarthritis kezelésében alkalmazott, és potenciálisan cytotoxikus hatású intraarticularis szerek paradox módon felgyorsíthatják az osteoarthritis folyamatát.

Saját in vitro eredményeink azt mutatták, hogy a betamethason bupivacainnal, illetve ropivacainnal alkotott kombinációja majdnem 100%-os sejthalált idézett elő sejtenyészeteinkben. Az osteochondralis minták esetében a betamethason-lidocain, és főként a prednisolon-lidocain kombinációk fejtettek ki magas százalékos arányú sejthalált a chondrocyták körében, a minták teljes mélységében. A vizsgált kombinált formák esetében az additív hatásnál szignifikánsan kiterjedtebb sejthalált detektáltunk, mint az egyes anyagok külön-külön történő adásakor.

A megfigyeléseink a szteroidok és a lokál anesztetikumok cytotoxikus hatása között fennálló szinergizmusra hívja fel a figyelmet, amely jelenség felveti az osteoarthritis terápiájában betöltött szerepük megkérdőjelezhetőségét.

### 5.3. Fokális porcdefektusok pótlásának lehetőségei

Saját eredményeink azt mutatták, hogy microfractura után csupán a porcdefektusok szélein volt megfigyelhető gyenge szerkezetű regenerátum képződése. Szövetteni elemzésünk rostos porcra emlékeztető, szabálytalan struktúrát mutatott, amely indokolta a gyenge mechanikai stabilitást.

Az I. illetve II. generációs ACI állatkísérleteinkben 80-85% (elfogadható), illetve 90-95%-os (jó) fedéssel valósult meg a porcdefektus pótlása. A regenerátumok azonban számos (I. generációs ACI), illetve elszórtan elhelyezkedő (II. generációs ACI) fissurát tartalmaztak, de összességében jobban hordozták a hyalinporcra jellemző szerkezetet. Emellett azonban minor réseket találtunk az intakt porc és a graft terület találkozási vonalában, illetve kifejezett volt a chondrocyták grafton belüli atipikus előfordulási mintázata.

Mivel a porc pótlási módszerek során képződött regenerátumok számára az leglényegesebb momentum a csontos alaphoz történő megfelelő rögzülés, így kézenfekvő lehetőségnek tűnhet a tiszta porcszövet beültetése a porcdefektus helyére.

A porcgraft osteochondralis integrációja alapvető jelentőségű a reparátum túlélése szempontjából. Ennek alapján feltételeztük, hogy a beültetendő porcszövet csontos alaphoz történő fúziója könnyebben megvalósul a porcgraft lamellálásával. A bevágások nagymértékben megnövelik az integrációs felszínt, így stabilabb rögzülést eredményezhetnek. A lamellálás további előnye, hogy fokozza a chondrocyták motilitását, így a porcszövet újdonszövetképződését is a defektus helyén.

Kísérleteinkben úgy találtuk, hogy a lamellált porcgraft hajlandóságot mutatott a subchondralis csontfelülettel történő fúzióra, melynek létrejötte után jó minőségű porcszövet volt jelen a defektus helyén. A sertéseken végzett kísérleteink során a lamellálást technikailag nem bonyolult, biztonságos, és jó hatásfokú módszernek találtuk, illetve annak biztató eredményei a humán felhasználás lehetőségét vetették fel.

#### 5.4. Autológ chondrocyta implantáció humán bevezetése

Állatkísérleteink során egy bonyolult szövettenyésztési eljárást sikerült minőség kontrollált módszerekkel meghonosítanunk intézetünkben külső vállalati hozzájárulás nélkül, és ezáltal megteremtettük a porcsejt beültetéshez szükséges alapfeltételeket a Pécsi Tudományegyetem Ortopédiai Klinikája és az Immunológiai és Biotechnológiai Intézet együttműködésével.

Humán beültetésünk során egy fiatal sportoló térdízületében talált nagy kiterjedésű porchiányt pótolunk II. generációs ACI technikával. Az utánkövetési vizsgálatok jó eredményeket mutattak, a beteg ízületi fájdalmai, térdduzzanatai megszűntek, és a beteg a későbbiekben visszatért az aktív labdarúgáshoz is. A biztató klinikai eredmények ellenére az ACI eljárás széleskörű magyarországi elterjedése egyelőre nem várható, a módszer jelentős anyagi vonzata, magas bekerülési költségei miatt, bár maguk a porcsejtbeültetési módszerek jelenleg is elérhetőek önköltséges finanszírozással néhány biotechnológiai vállalatnál. Az egy intézeten belüli porcsejttenyésztés és -beültetés ugyanakkor mind hatásosságában, mind pedig gazdaságosságában felvehetné a harcot más, olcsóbb porcpótlási eljárással is.

## 6. Konklúzió, az új eredmények jelentősége

- sejtenyésztő biotechnológiai laborunkban reprodukálható, standardizálható körülményeket hoztunk létre, az általunk használt PCR módszer megbízhatónak bizonyult a tenyésztett chondrocyták génexpressziós aktivitásának vizsgálatára
- feltérképeztük az ACI módszer jogi hátterét, beültethetőségi körülményeit különböző országok jogrendszerében
- porcsejtenyésztés jogi hátterére irányuló kutatás eredményeképpen jelen dolgozat szerzője megvédte szakdolgozatát a „Jogi Szakokleveles Orvos” egyetemi szakirányú másoddiplomás továbbképzés keretén belül „A sejt- és szövettenyésztés (tissue engineering) jogi vonatkozásai” címmel
- elsőként dolgoztuk ki az ACI technika humán bevezetéséhez elengedhetetlen hazai ortopédiai szakmai kollégiumi állásfoglalást
- chondrocyta viabilitási kísérleteink a kortikoszteroidokból és lokál anesztetikumokból álló kombinációk határozott, szinergizmuson alapuló cytotoxikus hatását mutatták ki, amely megfigyelésünk elővigyázatosságra ad okot a fenti kombinációk rutinszerű, klinikai, intraartikularis alkalmazása során
- általunk használt mátrix megfelelően szimulálta a chondrocyták porcszövetben elfoglalt helyét, támogatta a differenciációjukat, extracelluláris állományuk termelését, így megbízható alapnak bizonyult a chondrocyták hordozására
- sertés modelljeink ízületi porcszerkezete stabil vizsgálati alapot biztosított a különböző porc pótlási módszerek tanulmányozására
- állatkísérleteinkben az általunk alkalmazott ACI módszerek biztató eredményeket mutattak a fokális porcdefektusok pótlására
- kifejlesztettünk és szabadalmaztattunk egy speciális, ízületi porc mintavételi és lamelláló eszközt a felületnövelt, lamellált porcgraftok létrehozásának céljára
- augmentált felszínű, lamellált porcgraftok makroszkópos és mikroszkópos állatkísérletes eredményei ígéretesnek bizonyultak a porcdefektusok fedésében
- összehasonlító állatkísérleteink szignifikáns különbségeket mutattak főként a II. generációs ACI módszer és a lamellált porcgraft visszaültetésének tekintetében
- hazánkban elsőként végeztünk humán porc pótló beavatkozást II. generációs ACI módszerrel, mely reményt keltő eredményeket mutatott az utánkövetés során a porcdefektusok kezelésében



## Az értekezés alapjául szolgáló közlemények és publikált absztraktok

- Bárdos T, **Farkas B**. Szakmai állásfoglalás az autológ chondrocyta implantáció és egyéb szöveti tenyésztések tekintetében az orthopaediában – *Magyar Ortopéd Szakmai Kollégium módszertani ajánlásának kidolgozása 2007. április*
- **Farkas B**, Bárdos T, Bellyei Á, Illés T. A sejt-és szövettenyésztés jogi vonatkozásai. Hazai és külföldi tapasztalatok. *Orvosi Hetilap*. 2008;22(149):1023-28.
- Bardos T, **Farkas B**, Mezes B, Vancsodi J, Kvell K, Czompoly T, Nemeth P, Bellyei A, Illes T. Osteochondral integration of multiply incised pure cartilage allograft: repair method of focal chondral defects in a porcine model. *Am J Sports Med*. 2009 Nov;37 Suppl 1:50S-57S.  
**IF: 3.605**      **független idézetek száma: 12.**
- **Farkas B**, Kvell K, Czömpöly T, Illés T, Bárdos T. Increased chondrocyte death after steroid and local anesthetic combination. *Clin Orthop Relat Res*. 2010;468(11):3112-20.  
**IF: 2.116**      **független idézetek száma: 75.**
- Bardos T, Vancsodi J, **Farkas B**, Fazekas A, Nagy SA, Bogner P, Vermes Cs, Than P. Pilot study of cartilage repair in the knee joint with multiply incised chondral allograft. *Cartilage*. 2015;6(2):73-81.  
**IF: 1.127**      **független idézetek száma: 2.**
- Bardos T, **Farkas B**, Vancsodi J, Boda O, Mezes B, Bellyei A, Illes T - Processed ChondroGraft - pure cartilage allograft-based repair of focal chondral defects in porcine model. *Trans ORS* 2010;35:p.
- Bárdos T, **Farkas B**, Mézes B, Bellyei Á, Illés T. Saját laboratóriumi eljárással végzett mátrixra ültetett autológ chondrocyta implantatio (ACI) humán alkalmazása térdízületi porcdefektusban, esetismertetés *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb*. 2008;51:S.
- **Farkas B**, Mézes B, Bellyei Á, Illés T, Bárdos T. Eredményeink az autológ chondrocyta implantációs állatkísérleteinkben. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb*. 2008;51:S.
- **Farkas B**, Kvell K, Czömpöly T, Bellyei Á, Illés T, Bárdos T. Glucocorticoid – lokál anesztetikum kémiai stressz okozta chondrocyta apoptosis/ necrosis vizsgálata in

vitro és ex vivo körülmények között. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2008;51:S.

- Bárdos T, **Farkas B**, Mézes B, Bellyei Á, Illés T. Új, saját fejlesztésű, allograft alapú mátrix használata porc pótláshoz *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2008;51:S.
- **Farkas B**, Bellyei Á, Illés T, Mézes B, Németh P, Bárdos T. Az autológ chondrocyta implantáció (ACI) bevezetése Magyarországon; eredményeink az ACI állatkísérletekben. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2007; 50:S.
- **Farkas B**, Illés T, Bellyei Á, Bárdos T. A tissue engineering technika jogi szabályozásának alapjai a külföldi jogrendszerben és Magyarországon. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2007;50:S.
- **Farkas B**, Illés T, Bellyei Á, Bárdos T. Szövet- illetve sejtátültetéssel kapcsolatos jogi szabályozások a magyarországi ortopéd gyakorlatban (az autológ chondrocyta implantáció tükrében). *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2006;49:S32.
- **Farkas B**, Mézes B, Németh P, Bellyei Á, Illés T, Bárdos T. Kezdeti tapasztalataink az autológ chondrocyta implantáció során alkalmazott in vitro porcsejtenyésztésekkel kapcsolatban. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2006;49:S32.

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összesített impakt factora: 6.308.**

**Az értekezés alapjául szolgáló közlemények összes független citációja: 89.**

## **Az értekezés témájában elnyert díjak**

- **EFORT Jacques Duparc Award 2008.**  
9th European Federation of National Associations of Orthopaedics and Traumatology Congress, Nice, France, 2008.  
**Farkas B.**, Mezes B, Nemeth P, Bellyei A, Illes T, Bardos T. Preliminary results with matrix associated autologous chondrocyte implantation (ACI); results with the porcine model.
- **Magyar Ortopéd Társaság Zinner Nándor – díja, I. helyezés. 2012.**  
**Farkas B.**: Chondrocyták viabilitása szteroidok és lokál anesztetikumok adása után, in vitro és ex vivo körülmények között.

## **Egyéb közlemények és publikált absztraktok**

- Bálint L, **Farkas B.**, Koós Z, Bárdos T, Szabó Gy. Gyárilag összeállított és a csontcementekhez manuális technikával hozzáadott gentamicin kioldódási tulajdonságának összehasonlítása. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb* 2007;50(1):59-62.
- Bárdos T, Mihucz Sz, **Farkas B.**, Kránicz J. Hosszútávú tapasztalatok a Calcaneo-stop módszer alkalmazásával a gyermekkori lúdtalp műtéti kezelésében. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2007;50:S.
- **Farkas B.**, Bálint L, Bárdos T, Szabó Gy. Gyárilag összeállított és a csontcementekhez manuális technikával hozzáadott gentamicin kioldódási tulajdonságának összehasonlítása. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2006;49:S31.
- Bárdos T, **Farkas B.**, Szabó Z, Tunyogi CSM, Glant TT. Vizsgálatok a spondylitis ankylopoetica autoimmun állatmodelljén. *Magy. Traumatol. Ortop. Kezseb. Plasztikai Seb.* 2006;49:S30.
- Bálint L, Koós Z, Liszt F, Kocsis B, **Farkas B.**, Szabó Gy. Gentamicin csontcementből történő in vivo és in vitro emissziójának összehasonlítása. (The comparison of in vivo and in vitro elution of gentamycin from bone cement.) *Orvosi Hetilap.* 2004;28(145):1467-71. független idézetek száma: 3.

## Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, **Dr. Bárdos Tamásnak** a PhD éveim alatt nyújtott felbecsülhetetlen segítségéért, támogatásáért, bizalmáért, szakmai útmutatásáért. Szeretnék köszönetet mondani a GVOP projekt tagjainak, **Dr. Bellyei Árpád** Professor Úrnak, **Dr. Illés Tamás** Professor Úrnak, **Dr. Németh Péter** Professor Úrnak, **Dr. Berki Tímea** Professor Asszonynak, hogy az akkoriban kibontakozó porcpótlási projektben helyet kaphattam és a projektben a kezdetektől fogva dolgozhattam. Külön köszönet illeti **Dr. Than Péter** Professor Urat, aki konstruktív szakmai tanácsaival mindvégig segítette a munkám megszületését. Köszönetemet szeretném kifejezni **Dr. Mézes Beátának** a nélkülözhetetlen segítségéért, amelyet a szövetenyésztések kivitelezésében végzett. Köszönöm a PTE ÁOK Immunológiai Intézet munkatársainak, **Dr. Czömpöly Tamásnak** és **Dr. Kvell Krisztiánnak** a minták feldolgozásában nyújtott segítségüket. Továbbá köszönöm a Kaposvári Egyetem Takarmányozástani Tanszék részéről **Dr. Babinszky László** Professor Úr, **Dr. Szabó Csaba**, és **Dr. Pósa Roland** segítségét az állatkísérleteink kivitelezésében. Köszönettel tartozom a **PTE Ortopédiai Klinika korábbi és jelenlegi dolgozóinak** a munkámhoz nyújtott segítségükért.

Nem utolsó sorban pedig köszönöm **Édesanyámnak** azt a támogatást, mely mindvégig végigkísért a PhD munkám során, és amely nélkül nem jöhetett volna létre a jelen doktori értekezés. Köszönöm gyermekeimnek, **Ádámnak** és **Lillának**, hogy türelemmel viseltettek az értekezésem végleges összeállítása során. Végül szeretném jelen értekezést Ádám és Lilla gyermekeimnek ajánlani.