

A sportoló térd – a térdízület korai kopásának diagnosztikája és a regeneráció lehetőségei

The athlete's knee - diagnosis of early wear and tear of the knee joint and possibilities for regeneration

Dr. Lacza Zsombor

Magyar Testnevelési és Sporttudományi Egyetem

1. Bevezetés

Az élethosszig tartó sportolás szinte minden megálló feltétele az, hogy a mozgás szerveink és ezen belül is különösen az ízületek működése teljeskörű és fájdalomtalan legyen - sajnos ez a legritkább esetben teljesül. Kevés olyan ember van akinek annyira szerencsés az alkata illetve ügyesen elkerülte az esetleges sérüléseket is, hogy még az előrehaladott életkorban is kiváló funkciójú ízületekkel rendelkezik. Nagy teherviselő ízületek, mint például a csípő és térd a leginkább érintettek a korai degeneratív elváltozás sokkal, köznapinévén a porckopással. A térdízület járás illetve futás esetén ugyan anatómiai mozgást végez mégis erősen igénybe van véve és ezért akár kicsi problémák is a sokszori terhelés alatti Repetíció miatt összegyűlt a sok problémát tudnak okozni. Ilyen jellegű probléma például terhelésre jelentkező szűrő fájdalom, terhelés után kialakuló ízületi üzenet, vagy akár a korai porckopás. A jelen dolgozat célja a sportolók jellemző térdízületi elváltozásainak vizsgálata, és a Regenerációs lehetőségek feltárása. Diagnosztikai nehézségek jelentkeznek akkor amikor nem elsősorban a műtéti indikáció felállítása a cél hanem a sport ártalmak korai felismerése és a funkcionális kezelések hatékonyságának követése. Munka csoportunk ezért több irányból indulva és kidolgozott olyan új és mélyreható diagnosztikai megoldásokat amelyek segítségével az általánosan ismert térd ízületi problémák jobb megértése és pontosabb orvosi diagnosztikája is elérhető. A diagnózis felállítása azonban nyilvánvalóan nem elegendő hiszen a beteg mihamarabb szeretne visszatérni a sportolásba és az aktív életmódba. Ezért munka csoportunk évek óta dolgozik azon hogy olyan regeneratív

eljárásokat fejlesszen ki amelyek segítik legalább a gyulladás és a fájdalom csökkentését bizonyos esetekben akár a porc felszínnek vissza épülését is. Ezek bemutatása a molekuláris szinttől egészen a klinikai bevezetéséig tartanak.

A térdízület anatómiája és a sérülékenység fő pontjai. A dinamikus instabilitás.

A térd sérülések kialakulásának körülményei eltérőek, viszont a predisponáló tényezők köre viszonylag jól körülhatárolható. Az indirekt sportsérülések kialakulása jelentős mértékben olyan jelenségre vezethető vissza, amely nem strukturális, hanem funkcionális, azaz lágyrész eredetű. A tudományos szakirodalom szerint az alsó végtag mechanikai és anatómiai tengelye közötti kapcsolat erőteljesen kihat a sérülések kialakulására. Az alsó végtag terhelés alatti mozgását erőteljesen meghatározza az egyes izmok ereje, leginkább a combfeszítő és a csípőtávolításért felelős izmoké. Izomgyengeség esetén a leggyakoribb jelenség a térd befelé dőlése, azaz a valgus helyzet fokozódása. A valgus helyzet mértékét a Q szög (quadriceps szög) írja le. A quadriceps szög a musculus quadriceps femoris húzási iránya és a lábszár hossztengelye által bezárt szög.

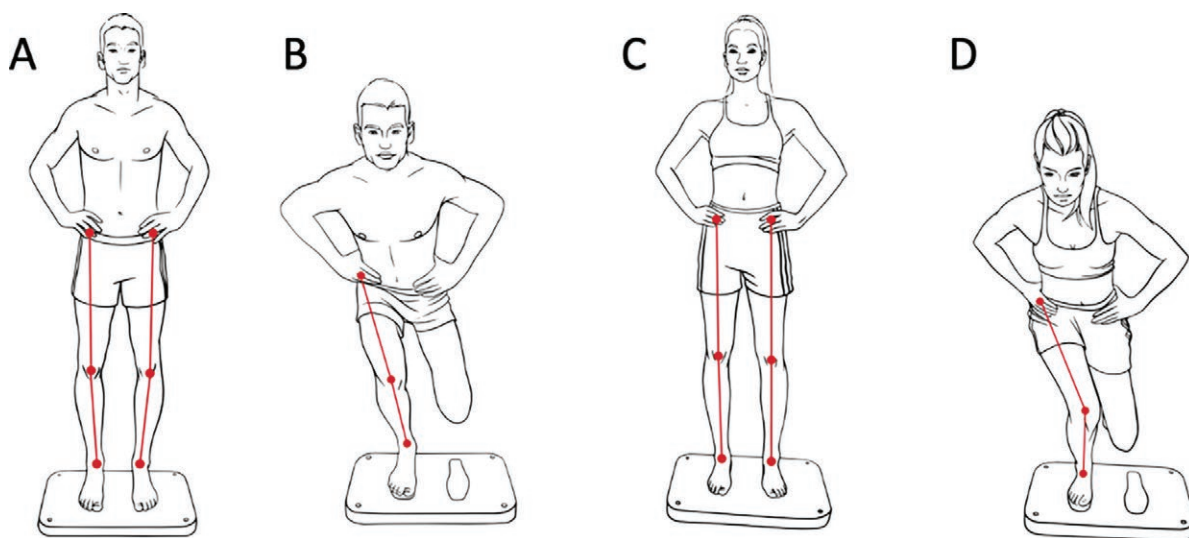
A fokozott mértékű Q szöget, vagyis a térdízület túlzott valgus állását a szakirodalomban kapcsolatba hozzák különböző térdízületi problémákkal, osteoarthritis, patellofemorális fájdalommal, keresztszalag szakadással. A pontosabb diagnózis érdekében, azonban különbséget kell tenni a statikus és a dinamikus Q szög között. Mivel a sportsérülések, nevezetesen a térdízületi sérülések pl: ACL szakadás, elülső térdfájdalom nem hanyatt fekvésben, statikus helyzetben alakul ki,

hanem fizikai aktivitás és sportolás közben, ezért a kutatók a statikus Q szög vizsgálata helyett, egyre többször a dinamikus Q szög vizsgálatához folyamodnak és azt találták, hogy a statikusan mért Q szög nagysága és a dinamikus Q szög -vagy térd valgus - között nincsen összefüggés. A dinamikus térd valgus sokkal inkább predisponáló tényező az ACL sérülések esetében, mint a statikusan mért Q érték.

A térdízület dinamikus valgus állásának a megfigyelésére a nemzetközi szakirodalomban digitális kamerákat, illetve mozgáselemző rendszereket alkalmaznak, melyek több kamera összekapcsolásával a tér minden irányában képes monitorozni és rögzíteni a térd elmozdulásait. Azt a megváltozott alsó végtagi láncolatot, amely a medence lebillenésével, vagyis a csípő addukciójával és befelé rotációjával, valamint a térd kirotációjával jár, együttesen dinamikus térd valgusnak nevezzük. Mozgás során a térd valgusba billenését gyakran vizsgálják egy lábás guggolás segítségével. A bokaízület és a térdízület befelé billenése a térd valgus nagyságát közösen növeli, mely hozzájárulhat az

elülső térdfájdalom fokozódásához. A dinamikus Q szög növekedésének elkerülése fontos tényező lehet a patellofemorális rehabilitációs programok során. Elülső térdfájdalommal rendelkező nők esetében megállapították, hogy az egy lábás guggolás során a térd medial irányba befelé billent, csípőízületben addukció alakult ki és a térdfájdalom nagysága is jelentős volt. Azonban a helytelen guggolást kijavítva, a guggolási technikára odafigyelve a medence helyzete normalizálódott, a térd neutrális irányban előre haladt és a fájdalomérzés mértéke is csökkent.

A fentebb közölt tanulmányok és összefüggések ismeretében azt mondhatjuk, hogy rendkívül fontos lenne egy olyan sportdiagnosztikai eszköznek a fejlesztése, amely egyszerűen, költséghatékonyan, gyorsan és pontosan képes megállapítani az alsó végtagi statikai és funkcionális eltéréseket, izomgyengeségeket és funkcióbeli hiányosságokat. A létrehozott eszközt sportorvosok, gyógytornászok, gyógytestnevelők és akár edzők is sikeresen bevonhatnák a saját praxisukba, gyakorlatukba.



1. ábra. A statikus és a dinamikus Q-szög eltérése.

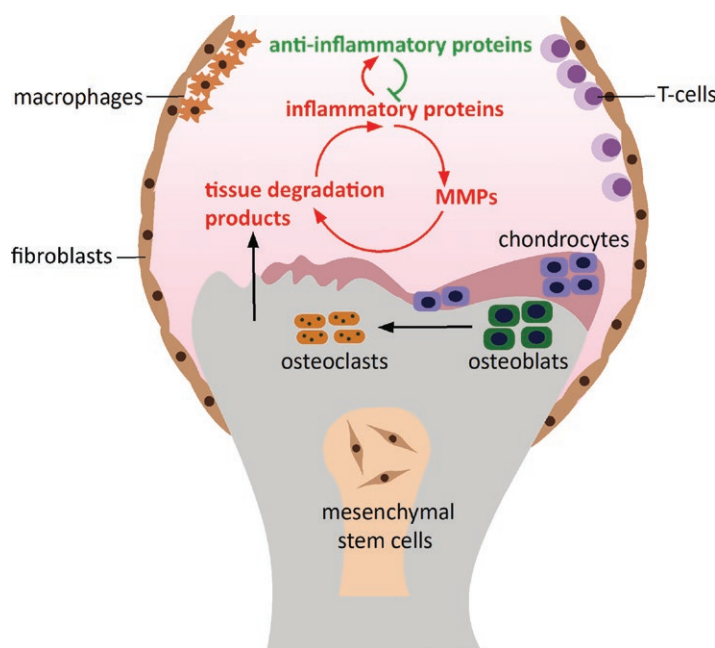
Az A és C paneleken két lábás normál álló pozícióban mindkét alany neutrális Q szöget mutat. Terhelés, azaz egylábás guggolás közben a B Panelen látható alany megtartja a semleges Q-szöveget, míg a D Panelen látható térde kifejezett valgusba fordul. A terhelés közben kialakuló jelentős különbségre az álló statikus helyzetben semmi sem utal.

Az oszteoarthritisz a térdízületben – molekuláris diagnosztika

Az oszteoarthritisz (OA) a leggyakoribb degeneratív ízületi rendellenesség, amelyet porcokopás, szubkondrális csontszklerózis, oszteofiták képződése és szinoviális gyulladás jellemez. A csont, a porc és a synovium szolubilis mediátorokon keresztül kommunikál a szinoviális

folyadékkal, így a betegség az egész ízületet érinti, annak ellenére, hogy a hagyományos nézet szerint az OA csak porc rendellenesség. Egyelőre nem tudni, hogy a szinoviális gyulladás a betegség elsődleges szerepe, vagy a porc degradációjának és a subchondralis csontelváltozásnak az eredménye. Ennek ellenére a szinoviális folyadékban kimutatott gyulladásos mediátorok, proteolitikus enzimek, porc- és csontdegradációs fehérjék felhasználhatók az OA potenciális biomarkereként. Az OA két fő gyulladásos citokinje az IL-1 β és a TNF- α , amelyeket főként kondrociták, szinoviális fibroblasztok és makrofágok termelnek. Az IL-1 β és a TNF- α kondrocitákat, szinoviális és immunsejteket indukálva gyulladásos fehérjék, például IL-2, IL-6, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL széles spektrumát termeli. Ezen citokinek többsége

kemokinek és más gyulladásgátló fehérjék, például Resistin és Oncostatin M termelését váltja ki, fokozva a szinovitist és tovább indukálva több mátrix metalloproteáz (MMP) és más proteolitikus enzim termelését, és csökkentve a mátrix metalloproteázok (TIMP) gátló fehérjéinek expresszióját. A szövetbontás után a szinoviális sejtek fagocitálják a bomlástermékeket, és hatnak a szinoviális sejtekre és a kondrocitákra, kiváltva még több gyulladásgátló fehérje felszabadulását. Így pozitív visszacsatolási hurok alakul ki, amely magában foglalja az ízületi gyulladást és a szövetek lebomlását. Válaszként gyulladáscsökkentő citokinek, például IL-1 receptor antagonistá, IL-4, IL-10 és IL-13 szabadulnak fel, hogy megakadályozzák a szövetek lebomlását és a szinovitist (2. ábra).



2. ábra: Az osteoarthritis patogenezise.

Az OA progressziója során pozitív visszacsatolási hurok alakul ki, beleértve az ízületi gyulladást és a szövetek lebomlását. A főként kondrociták, a szinoviális fibroblasztok és a makrofágok által termelt gyulladásos fehérjék a szövetbontó enzimek, például a mátrix metalloproteázok felesleges termelését indukálják. A szövetek lebontása után a szinoviális sejtek fagocitálják a bomlástermékeket, és hatnak a szinoviális sejtekre és a porcokra, kiváltva a gyulladásos fehérjék felszabadulását.

Feltételezhetjük, hogy az ízület miliójének megváltoztatása új gyulladásgátló citokinek

hozzáadásával felboríthatja az egyensúlyt a regeneráció felé. Mivel a sérülés a vér regeneratív citokin reakcióját idézi elő, lehetséges ezt a mechanizmust kiaknázni az ízületek lebomlása ellen azáltal, hogy aktivált vérvérszámítványokat, például vértlemezkében gazdag plazmát (PRP) injektálunk a szinoviális térbe. Számos tanulmány kimutatta, hogy a PRP és más vérszármazékok jótékony hatással vannak a fájdalomra és a mobilitásra, amikor az osteoarthritis térdízületbe injektálják őket a lebomlás különböző szakaszaiban. Egyes orvosok most a PRP-t tartják az első választásnak a nem

operatív kezelésre, különösen a sportoló vagy aktív életmódot élő betegek esetén. Néhány nagy és jól kontrollált vizsgálat azonban nem tudta megerősíteni a kisebb kohorszokban tapasztalható pozitív hatásokat, és kétségeket ébresztett abban, hogy indokolt-e a PRP használatának kiterjesztése az általános OA populációra. Kulcsfontosságú kérdés, amely akadályozza a protokoll további optimalizálását, a nem egyértelműen ismert hatásmechanizmus. Ezért az osteoarthritis izület in vitro modelljei hasznosak annak megértésében, hogy pontosan mi várható a vérszármarék-kezelésekkel, ezért magunk is ennek fejlesztéséhez kezdünk.

A problémát részben kiküszöböli a hiperakut szérum kifejlesztése, amely egy PRP-hez hasonló vérből származó termék, amelyet a frissen vett vér üvegcsőben történő centrifugálásával hoztak létre, amely aktiválja a koagulációs kaskádát. A fibrin-szómozó megnyomásával a hiperakut szérumot extrahálják, amelynek során a vérvétel és szérum izolálás mindössze 8-10 percet vesz igénybe, mielőtt a gyulladásos folyamat megkezdődik. Korábbi vizsgálataink során alaposan megvizsgáltuk a PRP fajtákat, és megfigyeltük, hogy a hiperakut szérum megbízhatóbb: a hiperakut szérum sejtenyésző tápközeghez történő hozzáadása proliferatív hatással van a csont, a porc és a mezenhimális őssejtekre, és hasonló mértékben képes helyreállítani a csontvelő regeneratív potenciálját, mint a csont morfogén fehérjei. A hiperakut szérum regeneratív hatását nemcsak sejtszinten, hanem a teljes osteoarthritis izületben is megfigyelték.

A szinoviális folyadék egy könnyen gyűjthető minta, amelyet indikátorként lehet használni a betegség stádiumában, mivel korábbi vizsgálatok összefüggést mutattak a szinoviális folyadék citokinszintje és az OA súlyossága között. Kimutatták, hogy az OA során több citokin játszik szerepet, azonban egyikük sem fedezett fel elég erős összefüggést ahhoz, hogy a betegség egyedi markerként vagy a kezelés előrejelzéséhez használható legyen. Saját in vitro izületi modelleken végzett kutatásaink folytatásaként egy klinikai vizsgálatban az OA izületekben releváns 39 fehérje szintjeit elemeztük. Megvizsgáltuk azokat a klinikai változókat, amelyeket a hiperakut szérum terápia indukált OA betegeknél, ezenkívül a szinoviális folyadék citokin-környezetét elemeztük a szérum molekuláris hatásmódjának jobb megértése érdekében.

2. Kutatási kérdések

Hipotézis 1: A térdizület mikroinstabilitását egylábas guggolás során optikai eszközzel kielégítő pontossággal lehet mérni, amely alkalmas a dinamikus valgus mint sérülés- és oszteoarthritisz predisponáló tényező korai és pontos felismerésére

Hipotézis 2: Az IL-1 β indukció és a hiperakut szérum kezelés hatására egy komplex in vitro osteoarthritisz izületi modellben gyulladásgátló citokin profil és sejtproliferáció alakul ki.

Hipotézis 3: Hiperakut szérum alkalmazása humán térdizületben gyulladáscsökkentő és fájdalom csillapító hatást vált ki, amelyet a betegek szubjektív panaszain kívül a szinoviális folyadék citokin mintázatának változása is igazol.

3. Anyagok és módszerek

A tudományos vizsgálatot a Testnevelési Egyetem etikai bizottsága hagyta jóvá (etikai engedély száma: TE-KEB / No43 / 2019). Huszonkettő (nő = 9; életkor = 24,5 \pm 10) egészséges és fizikailag aktív résztvevő vett részt ebben a vizsgálatban. A vizsgálatba bevont résztvevők kisebb térdpanaszokat tapasztaltak, minden nyilvánvaló patológia vagy kóros állapot nélkül, amely orvosi beavatkozást igényelhet. A kisebb térdpanaszok enyhe patellofemorális fájdalmat jelentenek futás után vagy enyhe térdfájdalmat túrázás után. Az alanyok általános jólétét a standard SF-36 pontszám, a sport aktivitás szintjét a Tegner-pontszám, a szubjektív térdfunkciót pedig a Lysholm-pontszám.

A kinematikai paramétereket Microsoft Azure Kinect kamerarendszerrel értékeltük. Eredetileg a Kinect kamerát videojátékokhoz fejlesztették ki a játékelmény javítása érdekében. A Kinect Azure RGB (piros, zöld és kék) kamerát és háromdimenziós infravörös mélységérzékelőt tartalmaz; így képes mérni a teljes test kinematikáját. A Kinect Azure 3 síkban becsüli az emberi test minden nagyobb izületének 3 koordinátáját testfelszíni markerek nélkül. Az összes adatot egy egyedi szoftver (Dynaknee, OrthoSera Kft, Budapest, Magyarország) segítségével gyűjtöttük amely lehetővé tette az adatkezelést, a rögzítést és az elemzést. A Kinect Azure kamera pontosságát és megbízhatóságát összehasonlítottuk egy aranystandardnak számító mozgásrögzítő rendszerrel, az OptiTrac-kel és egy nagy pontosságú inerciális mérőegységgel, az MVN Xsens-szel.

A résztvevők négy jól végrehajtott egylábos guggolást végeztek mindkét oldalon. A kiinduló helyzet csípőre tett kézzel állás volt. A guggolás mélységét és a térdmozgás eredményeit centiméterben mérve, az alsó végtag hosszának százalékos arányává alakították át. Az adatok konvertálása után minden guggolást külön elemeztünk.

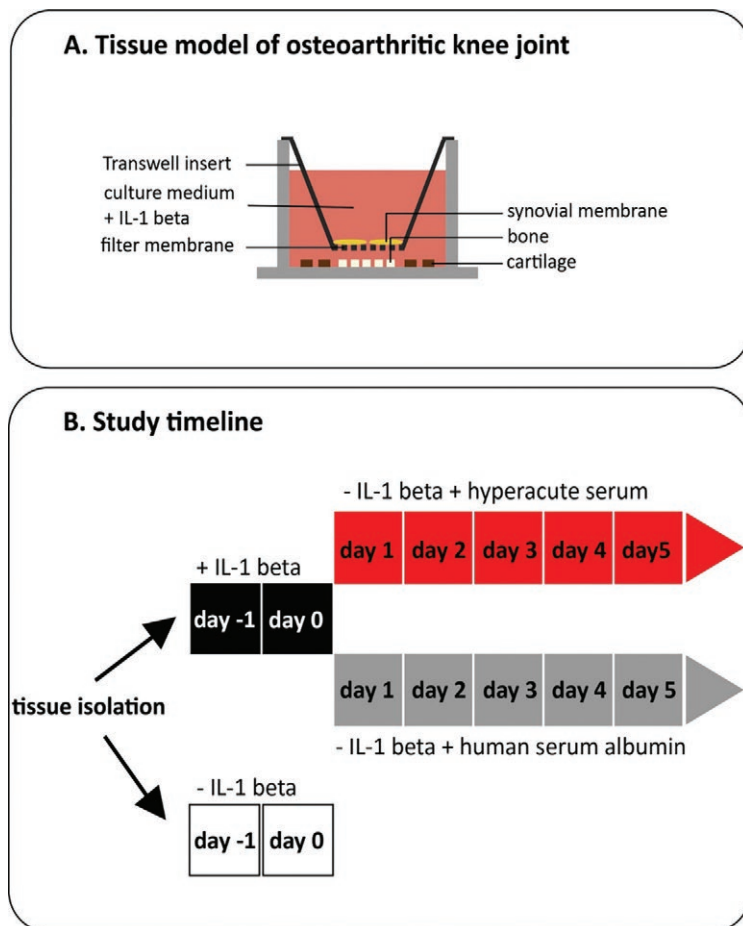
Hiperakut szérum izolálás

Vérmintákat nyertünk mindkét nemből származó, 24–45 éves egészséges donoroktól. Tizennyolc ml vénás vért vettük az önkéntesektől a hypACT Inject eszközzel (OrthoSera GmbH, Krems, Ausztria). Az eszközt azonnal 1710 g szögsebességen 8 percig centrifugáltuk. Centrifugálás után a vörösvértestet tartalmazó frakciót eltávolítottuk, és a vérlemezkében gazdag fibrinből

lamináris áramlású térben hiperakut szérumot nyomtunk ki.

Szövetkultúra

A subchondralis csontot, a hyalin porcot és az ízületi membránt a műtéti úton kivágott szövetekből gyűjtöttük be rutin térdprotézis műtét során. A szövetminták összegyűjtése után lyukanként 5 darab csontot és 4 darab porcot tettünk egy alacsony kötődésű 12 üregű lemez aljába. A lyukanként elhelyezett 2 darab szinoviális membránt 0,4 µm porúsú poliészter membránnal ellátott transwell mélyedésekbe helyeztük az ízület térbeli elrendezésének szimulálása céljából, és a szöveteket 7 napig együtt tenyésztettük. interleukin 1 béta (IL-1β) jelenlétében az osteoarthritis aktív fázisának fenntartása érdekében (3. ábra).



3. ábra Az in vitro térdízület kísérleti protokoll.

In vitro térdízület-tenyésztési modellünket a három fő szövettípusból (szinoviális membrán, szubkondralis csont és hyalin porc) építettük fel,

amelyek szerepet játszanak az OA patogenezisében. A modell felépítése hasonló kommunikációs utakat tesz lehetővé mint az in vivo körülmények (A.

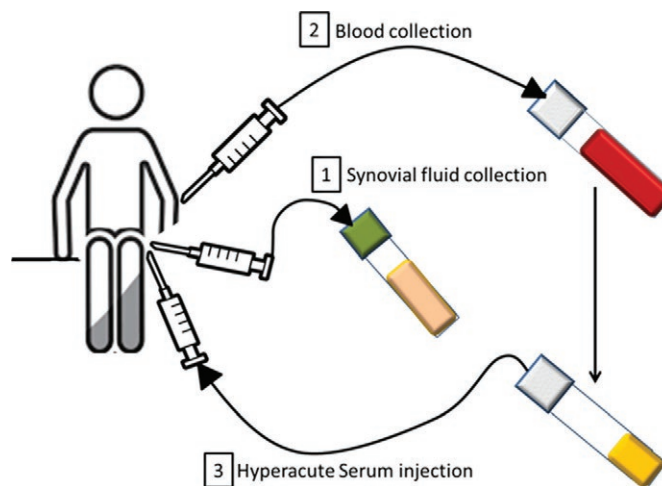
panel). A modell felépítése után a szöveteket IL-1 β -vel stimuláltuk 2 napig, vagy IL-1 β negatív kontrollként tenyésztettük. A táptalajt kicseréltük az IL-1 β -stimulált tenyészetekben, és a szöveteket 10% hiperakut szérummal kezeltük 5 napig, 5 napig negatív kontrollként humán szérumból albumint használunk egyező albumin tartalommal (B. panel). A szövetek életképességét IL-1 β stimuláció (0. nap) és hiperakut szérumból kezelés után (3. és 5. nap) határoztuk meg

Szakirodalmi áttekintést végeztünk a citokinekről az osteoarthritis szinoviális folyadékban és 39 faktort azonosítottunk, (Aggrecan, CCL-3, CX3CL1 / Fractalkine, IFN-gamma, IL-12, IL-17a, IL-2, IL-33, MMP-1, Resistin, RANKL, CCL-1, CD163, CXCL-10, IL-1 béta / IL-1 β , IL-13, IL-18, IL-23, IL-6 alfa receptor, MMP-2, oszteonektin, CCL-2, Collagen I alfa 1 / COL1A1, IL-10, IL-15, IL-1 receptor antagonist / IL-1Ra, IL-31, leukémia inhibitor faktor / LIF, Oncostatin M / OSM, TNF-alfa / TNF- α ,

MMP- 3, CXCL-8 / IL-8, IL-4 alfa receptor / IL-4R α , MMP-13, CCL-5, IL-5, VEGF-A, IL-22, IL-7, MMP-9) , amelyekről leírták, hogy szerepet játszanak az OA-ban. Megterveztünk egy egyedi Luminex vizsgálatot, és mind a 39 tényezőt a Magpix-el számszerűsítettük. Az in vitro tenyészet felülészójának citokin profiljait IL-1 β stimuláció után és az OA betegek szinoviális folyadékát hasonlítottuk össze OA szöveti modellünk validálásához.

Hiperakut szérumból kezelés

A térdízület osteoarthritisében szenvedő betegek (n = 24) 3 intraartikuláris injekciót kaptak 3 ml autológ hiperakut szérumból, hetente. Minden injekció előtt megkíséreltük a felgyűlt szinoviális folyadék leszívását, és amikor rendelkezésre állt, azonnal lefagyasztottuk, és -80 ° C-on a citokin analízisig. A fájdalmat (VAS) és a mobilitást (Lysholm-Tegner és KOOS) minden vizit során monitoroztuk, azaz 1 és 2 hét után, majd 3- és 6 hónappal az injekció beadása után (4. ábra).



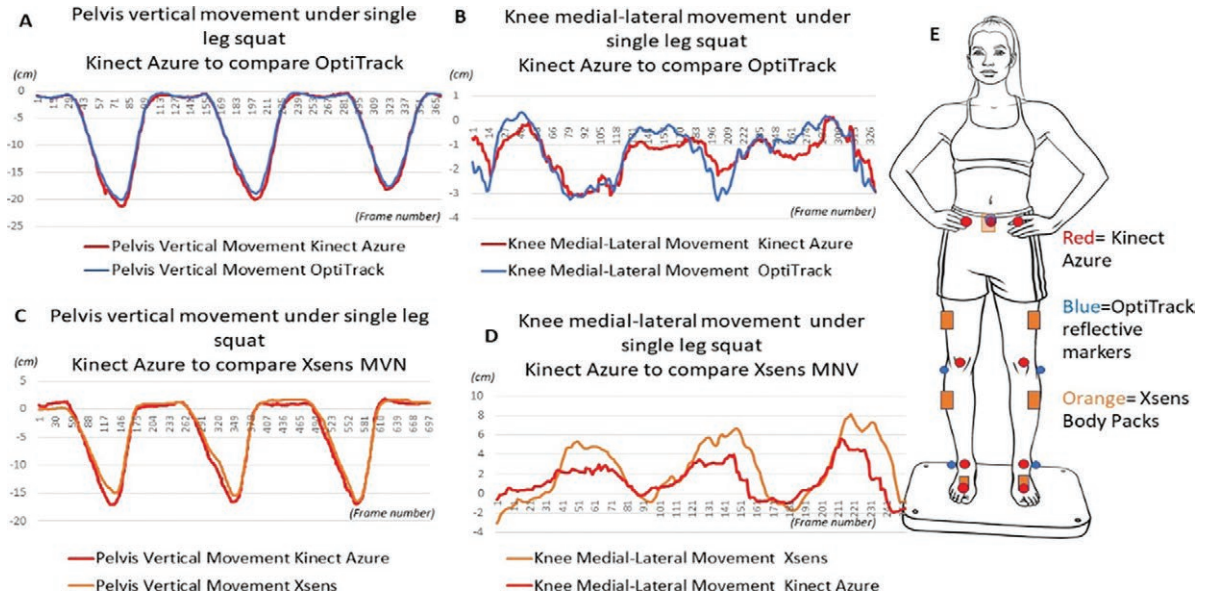
4. ábra. A szérumból kezelési protokoll.

Először, amikor lehetséges volt, a páciens térdéből szinoviális folyadékot gyűjtöttünk. Ezután vért vettünk és hiperakut szérumot nyertünk belőle. A hiperakut szérumot végül intraartikulárisan injektáltuk.

4. Eredmények

Kinect Azure vs. marker-alapú rendszerek validálása. A medence függőleges követése nagyon szoros volt a három különböző rendszer között, és csak a legalacsonyabb pontok mutattak eltérést, valószínűleg a csípő ebben a helyzetben történő

dőlése miatt (5. ábra). A térd oldalirányú mozgása kevésbé volt egyforma, de számszerűen közelebb volt a különböző rendszerek között (5. ábra). A medence függőleges mozgásának abszolút átlagos különbsége a Kinect Azure és az OptiTrack között $1,3 \pm 0,7$ cm, a térd oldalirányú és mediális mozgása közötti különbség $0,7 \pm 0,3$ cm volt. Eközben az átlagos medence-különbség $1,5 \pm 0,7$ cm, a térd laterális-mediális átlagos eltérése $1,5 \pm 0,9$ cm volt a Kinect Azure és az Xsens MVN között (5. ábra).



5. ábra. A Kinect Azure és a Dynaknee rendszer validálása.

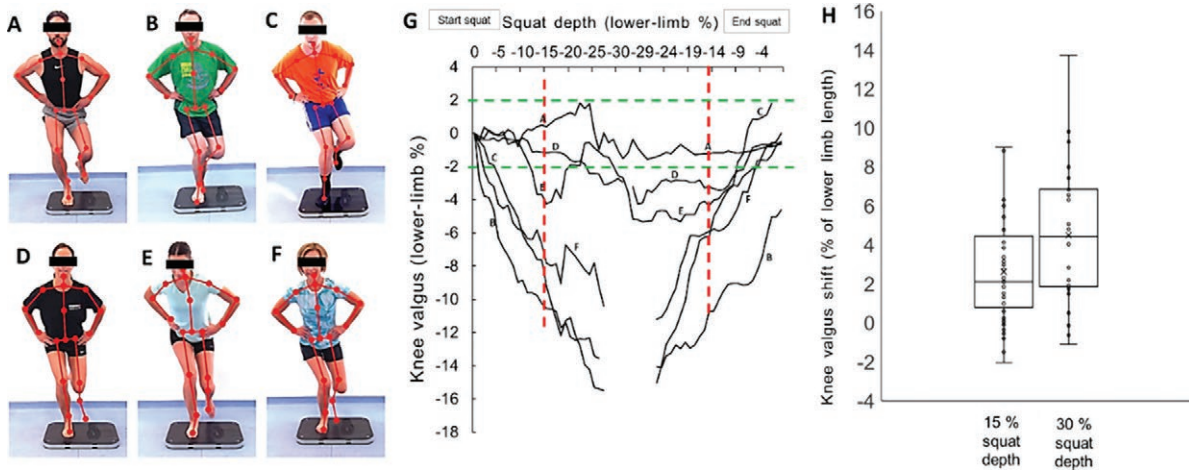
A kék vonalak és jelölők az OptiTrack érzékelőket és felvételeket, a piros szín a Kinect Azure-t, a narancssárga pedig az Xsens-t mutatja. A paneleken (A – D) három egymást követő egy lábás guggolásfelvételt mutat be egy reprezentatív alany. Vegye figyelembe, hogy a medence függőleges mozgása (A és C panel) szorosan kapcsolódik a különálló rendszerekben; a guggolás legalsó pontja körül csak apró eltérések vannak. A térd medio-laterális mozgásai számszerűen még közelebb vannak egymáshoz (B és D panel); ezek a felvételek azonban „zajosabbak”, valószínűleg a guggolás közbeni mikro-mozgások kiegyensúlyozása miatt. Az (E) panel mutatja a jelölők helyét az emberi testen (piros pont = Kinect Azure; kék pont = OptiTrack; narancssárga téglalap = Xsens MNV).

Az egy lábás guggolás során 22 résztvevő bal és jobb térdé nyomásának középpontjánál mértük a térd oldalirányú elmozdulását, hogy betekintést nyerjünk a guggolás mélység és a dinamikus valgus kölcsönhatásába. Nyilvánvalóvá vált, hogy az alanyok között meglehetősen nagy eltérések tapasztalhatók a lehető legmélyebb guggolásnak érezhető módon: egyesek alig hajlították meg a térdüket, míg mások egészen a padlóhoz érésig ereszkedtek le. A mélység és az oldalirányú eltolódás görbék elemzésével egyértelmű volt, hogy a valgus mérete nagyon függ a guggolás mélységétől, amit a korábbi vizsgálatok nem vettek figyelembe. A 8. ábra hat reprezentatív alanyt mutat be: három viszonylag stabil maradt, három pedig egyértelmű

valgus eltolódást mutatott (6. ábra). Megfigyeltük azt is, hogy minden alany 15% -os guggolási mélységet tudott demonstrálni, az alsó végtag hosszának százalékában mérve; azonban csak egy kis részhalmaz tudta elérni a 30% -ot, ami megfelel annak, ami szubjektív értékeléssel elegendőnek tekinthető. Mindazonáltal, bár a valgus nagysága 15% -os guggolási mélységnél kisebb, mint 30%-nál, a tendenciák ugyanazok; azaz azok, akiknek kiemelkedő valgusa 30% -nál van, már 15% -nál is ezt mutatják, és fordítva, akik stabilak 15% -nál, azok 30% -nál is stabilak maradnak (6. ábra). Az átlagos valgus érték 15% -os guggolási mélységnél $2,63 \pm 2,63\%$ volt; az átlagos valgusérték 30% -os guggolási mélységnél szignifikánsan nagyobb, $4,5 \pm 3,59\%$ volt ($t(27) = 2,77, p = 0,01$); lásd a 6. ábrát.

A panelek (A – F) három férfi és három nőt mutatnak pontosan 15% -os guggolási mélységben; vegye figyelembe, hogy bár a térd csak kissé hajlított, a valgus evidens azoknál, akik hajlamosak erre az eltérésre (B, C, F). A (G) panel ezeknek az egyéneknek a valgus eltolódás és a guggolás mélység összefüggését ábrázolja; a görbéken lévő betűk megfelelnek a bemutatott képnek. A guggolás mélységét a vízszintes tengelyen, a térd eltérését a függőlegesen mérik; a nem folytonos vonalak azt jelzik, hogy az alany nem érte el a maximális guggolási mélységet 30%-nál. A függőleges pontozott vonalak mutatják a 15% -os mélységi jelet, ahol a valgus vagy a stabil tendenciák már láthatóvá

válnak. A (H) panel mutatja a valgus eltolódás eloszlását 15% -os és 30 guggolási mélységben 44 térdnél. A vonal a mediánt jelenti.



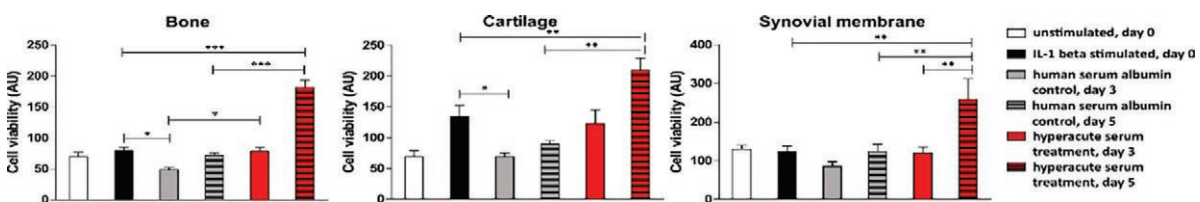
6. ábra. Reprezentatív felvételek az egylábás guggolásokról és a guggolás mélysége között.

Térdízületi molekuláris diagnosztika

A 39 különböző citokin koncentrációját megmértük mind a tenyésztet felülúszójában IL-1 β kezelés után, mind az OA-betegek szinoviális folyadékában. A modell validációja érdekében összehasonlítottuk az OA szinoviális folyadék citokin összetételét azokkal, amelyeket az explantok a tenyésztet felülúszójába juttattak. A citokinek szintjét %-ban fejezték ki a mért koncentrációk összesített adataihoz képest, amelyeket 100% -nak tekintettek. A leggyakoribb fehérje a CD163 volt, majd az osteonectin és az MMP-2 következett. A többi molekula szintén kimutatható volt mindkét típusú mintában, de alacsonyabb koncentrációban. Az in vitro és az in vivo minták citokin koncentrációinak összefüggését Pearson-korrelációs teszttel vizsgáltuk, miután az adatállományt logaritmusra transformáltuk a kiugró értékek (CD-163, MMP-2, Osteonectin) miatt. Erős összefüggést ($r = 0,770$) találtunk az in vitro és az in vivo minták között, ami azt jelzi, hogy az in vitro ízületi modell az in vivo osteoarthritis ízületi megfelelő közelítése a

citokintermelés szempontjából.

Két napos tenyésztés után az IL-1 β -vel kezelt szövetek életképessége a kezetlen mintákhoz képest változatlan volt, a porc kivételével, amely tendenciát mutatott a megnövekedett sejtszám felé. Az IL-1 β visszavonása után a 0. napon a szöveteket hiperakut szérummal vagy humán szérum albumin tartalmú táptalajjal egészítettük ki, és az életképességet tovább mértük a 3. és az 5. napon. Az 5. napon a hiperakut szérummal kezelt explantok teljes életképessége megduplázódott mindegyik szövettípusban a 0. naphoz és az albuminnal kezelt kontrollhoz képest, tükrözve a sejtek folyamatos szaporodását (7. ábra). Az albumin tartalmú kontrollcsoportban a sejtszám nem nőtt az IL-1 β -hoz képest, és a fehérje szintje sem változott. Az albuminnal kezelt és a hiperakut szérummal kezelt minták szöveti életképessége közötti különbség szignifikáns volt, ezért a fehérje-koncentrációk megbízható összehasonlítását a kezelt és a kontroll csoportban a sejtproliferációs változások figyelembevétele nélkül nehéz értelmezni.



7. ábra: A sejt életképessége a csontban, a porcban és az ízületi membránban.

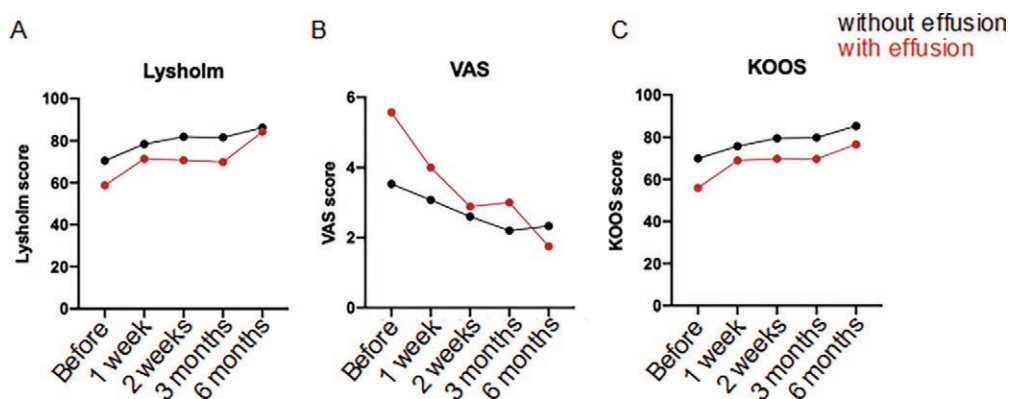
A hiperakut szérumszűrés pozitív hatást gyakorol a porc, a csont és az ízületi membrán szövetének sejteléképességére egy 5 napos tenyésztési periódus alatt, $n = 12$. A szignifikancia szint $p < 0,05$ volt, ahol * azt jelenti, hogy p 0,05 és 0,01 között van, * * azt jelenti, hogy p értéke 0,01 és 0,001 között van, és *** azt jelenti, hogy p értéke 0,001 alatt van.

A fő gyulladásos citokinek és növekedési faktorok, az IL-1 β , az IL-6R α , a TNF-a, az IL-8 és az IL-15 koncentrációja jelentősen megnőtt az IL-1 β stimulációra adott válaszként. Jelentős csökkenést figyeltünk meg az IL-1 β , a TNF-a és az IL-6R α koncentrációjában hiperakut szérumszűrés hatására. Az IL-2, 12, 17, 18 trendje hasonló volt, azonban a változások nem érték el a szignifikancia szintjét. A gyulladásos kemokinek közül a CCL-1, a CCL-2 és a CXCL-10 szignifikánsan növekedett az IL-1 β stimuláció után. A gyulladáscsökkentő citokinek mintázata hasonló folyamatot követett, vagyis az IL-1 β gyulladáscsökkentő választ váltott ki, amelyet az emelkedett IL-1Ra, IL-4R α és IL-13 szintek bizonyítanak. A legfontosabb gyulladáscsökkentő citokin IL-1Ra jelentősen megemelkedett a 3. napig a hiperakut szérumszűrés hatására, amelyet később az 5. napig csökkentek. A citokinváltozások közötti összefüggés vizsgálata során mind a három gyulladáscsökkentő citokin között nagyon erős korrelációt találtunk. Az MMP-k közül az IL-1 β növelte az MMP-3 és 13 értéket, míg az MMP 1, 2, 9 koncentrációja mind jelentősen növekedett a hiperakut szűrésre adott válaszként a 0. és a 3. nap között, azonban az MMP-k koncentrációja hasonló volt a 3. és az 5. napon. Az Aggrecan koncentrációja, amely a fő proteoglikán, amely teherhordó tulajdonságokat kölcsönöz a porcnak, a tenyészidőszak alatt nem változott jelentősen. Főként a regeneráló kondrociták, az oszteoblasztok és a csontvelő progenitor sejtek

által elválasztott osteonektin szignifikánsan megemelkedett a hiperakut szérumszűrés hatására. Hasonló változásokat figyeltünk meg az I. típusú kollagén alfa I (COL1A1) szekréciójában, amelyet főként oszteoblasztok szekretálnak, és a csont extracelluláris mátrixának 90% -át képezi. Ugyanakkor az oszteoklasztogenezist és a csontreszorpciót kiváltó RANKL koncentrációja folyamatosan csökkent a hiperakut szérumszűrés hatására.

A szérumszűrés hatása a térdizület citokin miliójére

Annak megvizsgálása érdekében, hogy a hiperakut szérumszűrés indukálta-e közvetlenül az OA térdekben jelentkező előnyöket, a betegeket legfeljebb 6 hónapig követtük nyomon, és a hatásokat a beteg által jelentett eredményekkel értékeltük, a fájdalomcsökkentésre és a mindennapi feladatok és a sportolási aktivitás javítására összpontosítva. A betegek közötti fiziológiai különbségek miatt két alcsoportba soroltuk őket: „folyadék nélküli térdek” (más néven „száraz térd”) és „effúziós azaz folyadék felszaporodással járó térdek”. Mindkét csoport esetében a hiperakut szérumszűrés egyenletes javulást mutatott a páciens térd instabilitásának, fájdalmának, duzzadásának, és guggolásának vizsgálatakor, amint azt az idő múlásával növekvő Lysholm-Tegner pontszám mutatja ($P < 0,001$). A „folyadékgyülem nélküli betegek” alcsoportnál a terápia kezdetén alacsonyabb volt a fájdalom és jobb a mobilitás, mint a duzzadt térdű betegeknél. Ennek ellenére a 6 hónapos hiperakut szérumszűrés után a fájdalom és a mozgékonyág mindkét alcsoportban közel azonos volt. Ugyanazt a pozitív eredményt idővel megerősítették a Visual Analog Scale (VAS), valamint a térdpanaszok (KOOS-skála) mérései ($P = 0,026$, illetve $P = 0,006$) (8. ábra).

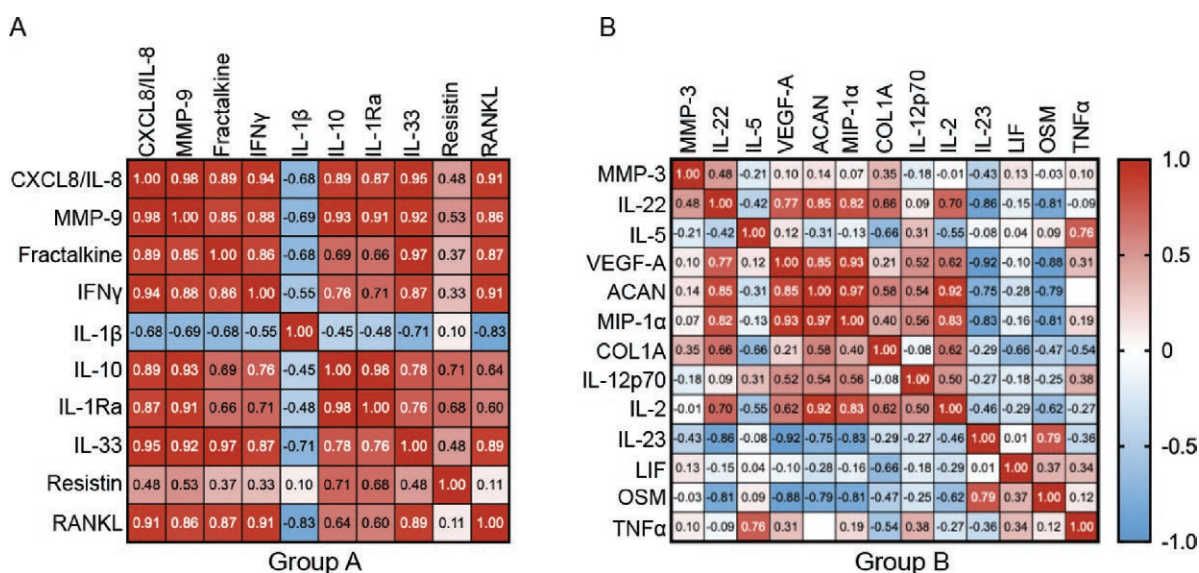


8. ábra. Lysholm-Tegner (A), VAS (B) és KOOS (C) pontszámokat bemutató grafikonok.

Klinikai adatok 6 hónapos utánkövetés után hiperakut szérums kezelés után OA térdben, különböző időpontokban: a kezelés előtt, majd azt követően az 1., 2., 3., 3. és 6. hónapban. A vörös a térdben és feketében, folyadékfűvás nélküli betegek klinikai adatait jelenti

Többváltozós faktoranalízist alkalmaztunk olyan citokinek klasztereinek vizsgálatára, amelyek hasonlóan reagálhatnak egy közös faktorhoz. Az Eigenvalue pontszám alapján 2 fő csoportot azonosítottunk, amelyek a teljes 39 mért citokin közül 24-et tartalmaztak. A két csoportban azonosított citokinek közötti lehetséges összefüggés további megértése érdekében kiszámoltuk a hiperakut szérums által kiváltott változások

Pearson-korrelációjának hőterképét (9. ábra). Az A csoport erős és szignifikáns korrelációs mintázatot mutatott az összes citokin között, a rezisztin kivételével (a legtöbb $r^2 > 0,75$). Meglepő módon csak az IL-1 β korrelált negatívan. Másrészt a B csoportban a legtöbb összefüggés gyenge volt. Azonban a VEGF-A, ACAN, MIP-1 α , IL-22, IL-2, IL-23 és OSM alkategóriák szoros összefüggést mutattak egymással (a legtöbb $r^2 > 0,85$), ami arra utal, hogy nem minden B, de ez a 7 fehérje hasonlóan viselkedik a hiperakut szérums kezelés után (9. ábra). Ez az erős összefüggés azt sugallja, hogy az azonos csoportba vagy klaszterbe tartozó citokinek együtt mozoghatnak.



9. ábra. A két azonosított fehérjeprogram Pearson-féle korrelációs hőterképei a többváltozós faktor-elemzés után.

Az A csoportba tartozó citokinek (bal oldali panel) erős vagy nagyon erős korrelációt mutatnak ($p < 0,05$), az ellenállás (A) kivételével. Általában a B csoport (jobb oldali panel) gyengébb összefüggéseket mutatott be; azonban a VEGF-A, ACAN, CCL3 / MIP-1 α , IL-22, IL-2, IL-23 és OSM klaszter erősen és szignifikánsan korrelált ($p < 0,05$) (B). A színek pozitív vagy negatív lineáris kapcsolatot képvisel a fehérjék, a vörös és a kék között. A fehér értékek nem mutatják a fehérjék közötti közös trendet.

A vizsgált 24 páciens közül csak 9 adott szinoviális folyadékmintát kezelés előtt és után. Ez részben annak tudható be, hogy az OA korai

szakaszában az ízület még nem duzzadt („száraz, fájdalmas térd”), vagy hogy egyes mintákat a leszívás közben kevés vér festenyezte. Ezenkívül 6 hónappal a kezelés után a minta elérhetősége 7 volt, mivel 2 beteg jelentősen eddigre javult, és már nem lehetett tőlük szinoviális folyadékot szerezni. Megvizsgáltuk, hogy a kezelés előtt és után nem történt-e jelentős változás a betegek citokinszintjében. Bár a betegek átlagos citokinszintjében az idők folyamán nem voltak egyéni különbségek a Roy's Largest Root többváltozós általános lineáris modell szerint a szérumszint eredményeként a citokinszintben jelentős változás következett be ($p = 0,023$).

5. Megbeszélés

Kinect-Azure alapú mozgásanalízis validálása

A tanulmány fő célja egy új Kinect Azure-alapú módszer létrehozása volt a térd mediális-laterális mozgásának értékelésére egylábas guggolás (SLS) teszt alatt, egy egyszerű és megbízható módszer létrehozása érdekében a túlzott térd valgus értékelésére, hajlamosító tényező az ACL szakadásra és az osteoarthritisre. Megállapítottuk, hogy a térd laterális eltolódása a láb felett megbízhatóbban mérhető a Kinect segítségével, mint a Q-szög. A jelen tanulmány egyik legfontosabb új megállapítása, hogy a guggolás mélysége nagy hatással van a dinamikus valgusra, és ezért ezt figyelembe kell venni a dinamikus valgus értékelés során. Javasoljuk, hogy a valgus eltolódás megbízhatóan mérhető 15% -os guggolási mélységben, relatív és alsó végtaghosszúsággal meghatározott. A Kinect validálását, ennek a vizsgálatnak a részfeladatát azért hajtottuk végre, hogy megbizonyosodhassunk arról, hogy a Kinect rendszer megfelelő és megbízható eszköz orvosi vizsgálati célra, ortopédiai vagy fizioterápiás gyakorlatokra vagy akár edzőtermekben. Vizsgálatunk egy új módszert, a mesterséges intelligencián alapuló Kinect Azure kamerát alkalmaz, amely markerek nélkül képes figyelni és követni a fő emberi ízületeket edzés közben.

Korábbi tanulmányok a frontális sík vetítési szögét alkalmazták, és videoelemzési módszereikben a frontális sík térd valgusára hivatkoztak. Ezekben a vizsgálatokban a betegek egylábas guggolókat hajtottak végre, amelyeket a laboratóriumban videó segítségével rögzítettek. A vizsgálat után az operátor visszajátszotta a filmet és leállította a videót, amikor a beteg guggolása elérte a legmélyebb pontot; aztán az operátor kivett egy képet a filmből. Ezen a képen a térd mediális / laterális eltérését határozta meg. Ez az eljárás csak a térd pillanatnyi állapotát méri. Ennek az eljárásnak számos gyengesége van, amelyeket több mint 500 térden végzett előzetes vizsgálatokban is tapasztaltunk (*publikálatlan megfigyelések*). Először is, nem lehet nyomon követni a teljes guggolás folyamatát és a térd mediális / laterális eltérését a gyakorlat elejétől a végéig, mivel csak egy kimerevített képkocka elemezhető. Ebben az esetben hatalmas mennyiségű információ veszik el. A guggolás mélysége fontos információkat tartalmaz a beteg alsó végtagjának funkcionalitásáról, mobilitásáról és erejéről is; ezért fontos

paraméter a vizsgáló számára. Továbbá a páciens alsó végtag oldal-oldal aszimmetriája is jelentős adat az értékeléshez. Mindazonáltal, ha csak egy pillanatképet használunk mindkét oldalon, nem lehet ismételtén meghatározni a két testoldal közötti különbségeket. Mivel a sportmozgások dinamikus tevékenységek, dinamikus helyzetben mérni kell a térd valgusát. Eddig egyetlen tanulmány sem tárta fel a térd valgus helyzetét a guggolás mélységének függvényében. A Dynaknee rendszer egy újszerű Kinect Azure-alapú eszköz, amely képes rögzíteni, elemezni, megjeleníteni és értékelni az alsó végtag funkcióit egylábas guggolás során, amely tovább bővíthető ugrásból egylábra érkezésre. A pontosabb adatok és visszajelentés érdekében gyors, egyszerű, praktikus és költséghatékony eszközre van szükség a térd mediális / laterális irányú mozgásának és a guggolás mélységének monitorozásához a vizsgálat teljes időtartama alatt.

A Kinect Azure lehetőséget kínál a marker nélküli mozgáselemzés terén, bár számos korlátja van a klasszikus marker-alapú mozgásrögzítő rendszerekhez képest, amelyek szélesebb körű és pontosabb adatokat nyújthatnak az emberi mozgással kapcsolatban a test kiválasztott markerpontjain keresztül. A marker alapú rendszerek vitathatatlan előnye, hogy a szakértők pontosan követhetik a végtagok és szegmensek mozgását a bőrre tapadt markerek vagy érzékelők segítségével, jól meghatározott anatómiai helyeken. A Kinect Azure kamera hátránya, hogy csak az emberi test külső formáját képes mérni, és ebből a nagy adatkészletből kiszámítja a fő ízületeket. A Kinect által generált „ízületi középpont” nem pontos anatómiai hely; ugyanakkor megbízhatóan használható az egyetlen tengely mentén bekövetkező ízületi mozgások kérdéseinek megválaszolásában, mint például az SLS teszt.

A normál vagy patológiás dinamikus térd valgus eltolódás határértéke a kutatás jelenlegi szakaszában nem állapítható meg. A jövőbeni tanulmányoknak referenciaértékeket kell megállapítaniuk az egészséges lakosság számára mindkét nemnél, valamint a specifikus kórképeknél is; a mostani tanulmány megalkotta azokat a mutatókat, amelyek megfelelően leírják a dinamikus valgus jelenséget, és hogy mit lehet megbízhatóan mérni marker nélküli rendszerrel.

Összefoglalva, a jelenlegi tanulmány azt mutatja, hogy a térd dinamikus valgusának megbízható monitorozása érdekében a térd medio-laterális

elmozdulása a láb felett rögzített guggolási mélységben sokkal alkalmasabb, mint a korábban javasolt Q-szög a guggolás. Ez a változó automatikusan rögzíthető marker nélküli optikai kamerával és szoftveres rendszerrel, amely új diagnosztikai eszközt jelent az osteoarthritis kockázati tényezőinek értékelésére a rutin ortopédiai gyakorlatban. A jövőbeni tanulmányok kiterjeszthetik a hardver – szoftver kombináció alkalmazását más ízületek követésére; azonban minden egyes ízülethez különféle kontroll mérésekre és más betegségcsoportokra is szükség lesz.

In vitro térdízületi citokin diagnosztika

Jelen vizsgálatunkban megmutattuk, hogy in vitro explant tenyésztési modellben lehetséges utánózni az osteoarthritis térdízület citokinmiliójét. IL-1 β -val stimulálva a csont-porc-szinovium szöveteket, a gyulladásos mediátorok termelésének éles növekedését figyeltük meg. Amikor azonban hiperakut szérumot adtunk hozzá, az egyensúly a gyulladás gátlása felé fordult. Az OA patomechanizmusának vizsgálata kihívást jelent a kísérleti és klinikai ortopédia kutatói számára. Annak ellenére, hogy az OA-t teljes ízületi betegségnek tekintik, a publikált tanulmányok többsége egyetlen sejttípust vagy legfeljebb két fő szövetet vizsgált in vitro a klasszikus tenyésztési módszerek technikai korlátai miatt. A csontban, a porcban és a szinoviális membránban lévő sejtek azonban oldható mediátorokon keresztül kommunikálnak egymással a szinoviális folyadékba szekretálva, amelyek detektálhatók és felhasználhatók biomarkerként az OA progressiójához. A végstádiumú osteoarthritis emberi térdektől összegyűjtött ízület mindhárom fő szövetének együttes tenyésztése lehetővé tette, hogy in vitro modellben egy lépéssel közelebb kerüljünk a klinikai helyzetekhez. Figyelemre méltó, hogy mind a 39 citokint, amelyeket a szinoviális folyadékban OA markerként írtak le, ez az együtt tenyésztés azonnal létrehozott, hasonló koncentrációban, mint in vivo. Az IL-1 β gyulladásos kiváltóként való hozzáadása tovább növelte a downstream mediátorokat, igazolva, hogy a módszer ésszerűen hasonló az in vivo helyzethez. Az IL-1 β stimulációra adott válaszkoncentráció-változások azt mutatták, hogy több, de az összes gyulladásgátló fehérje szintje emelkedett, beleértve az IL-1 β , TNF- α , IL-6R α és CXCL-8 / IL-8 szintet, amelyek a legfontosabbak

gyulladásos citokinek az OA-ban. Válaszként az anti-gyulladásos fehérjék, mint például az IL-1Ra, az IL-4R α és az IL-13 is megnöttek az IL-1 β stimuláció után. Az interleukinek mellett az extracelluláris mátrixforgalom enzimek, az MMP-3 és az MMP-13 is megemelkednek, és az I. típusú kollagén alfa I és az oszteonectin szekréció gátlásával együtt hozzájárulnak az IL-1 β porcra és csontok átalakítására gyakorolt negatív hatásához. Összességében a háromszövetes osteoarthritis eggyütt-tenyésztési rendszerre vonatkozó jelenlegi adataink összhangban vannak az ízület várható kóros citokin-összetételével, megfelelő modellt biztosítva az OA lehetséges terápiás modelljeinek vizsgálatához.

A hiperakut szérum alapvetően megegyezik a friss sebben képződő fiziológiásan aktivált plazmával. Korábbi tanulmányaink rámutattak, hogy a hiperakut szérum az alacsonyabb növekedési faktor koncentráció ellenére proliferatívabb, mint a PRP. Ésszerű feltételezni, hogy a hiperakut szérumban található fiziológiás szintek és arányok jobban megfelelnek a sejteknek, mint a túlkonzentrált és lizált PRP készítmények. Ezeket a méréseket azonban tipikusan sejtenyészteteken végzik, és a klinikai vizsgálatok megkezdése előtt ajánlatos a vizsgálatokat kiterjeszteni egy olyan modellre, amely nagyon hasonlít az in vivo helyzetre.

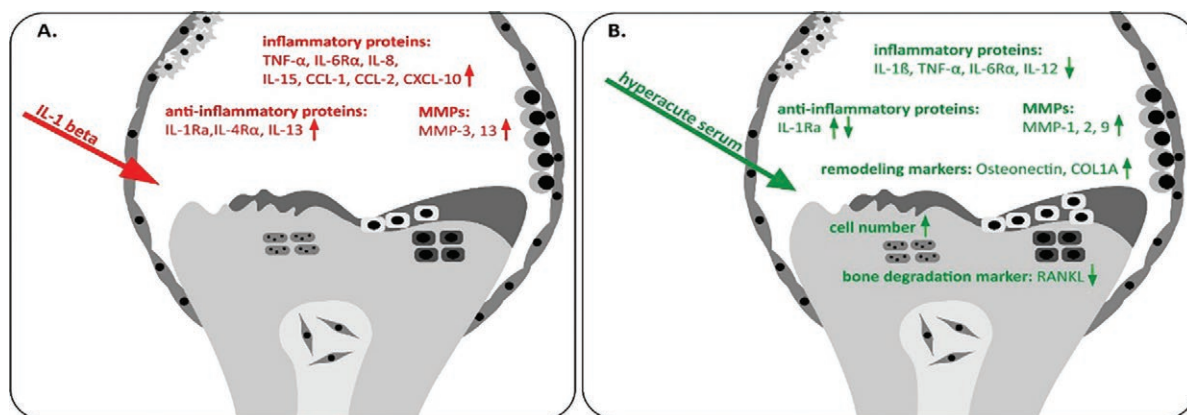
Jelen vizsgálatunk a hiperakut szérum ex vivo osteoarthritis ízület citokin-környezetére gyakorolt hatásáról azt mutatta, hogy a szérumkezelés csökkentette a gyulladást és növelte a szövetek életképességét. Számos osteoarthritis gyulladásos fehérjét és szöveti markert számszerűsítettünk annak feltárása érdekében, hogy a hiperakut szérum hogyan befolyásolja a betegséget. Korábbi vizsgálatok jellemzően 2-5 kiválasztott citokint alkalmaztak, és csak e néhány molekula változásából vontak le következtetéseket, vagy feltérképezték a teljes citokintartalmat, de nem adtak választ a kezelésre. Ezért létrehoztunk egy egyedi multiplex fehérje analízis kitet, amely 39 kiválasztott citokint, kemokint, enzimet, extracelluláris mátrixfehérjét és még szövetbontási termékeket is tartalmaz, hogy kiegyensúlyozottabb képet kapjunk a szinoviális milió változásairól. Ezen felül a szövetek proliferációs sebességét is mértük, mivel ez a paraméter nem értékelhető megbízhatóan in vivo.

A csont, a porc és az ízületi membrán sejtproliferációja szignifikánsan megemelkedett

a hiperakut szérum kezelésre adott válaszként az emberi szérum albuminnal kezelt csoporthoz képest, ami azt jelzi, hogy a sejtszaporodás mértéke a hiperakut szérum növekedési faktor tartalma miatt megnövekedett. Az OA patomechanizmusában szerepet játszó fő gyulladáscsökkentő citokinek, mint például az IL-1 β , IL-6R α , TNF- α , IL-12 és IL-17 csökkentek a hiperakut szérum kezelés hatására, ami a RANKL szekréció csökkenését eredményezte. Erős összefüggést találtunk a fő gyulladáscsökkentő citokinek csökkenő tendenciája között a hiperakut szérum kezelésre adott válaszként, miközben a sejtproliferáció mindhárom szövettípusban erőteljesen növekedett. A kemokinek többsége hasonló szinten marad, erősen növelve a szövetek életképességét a hiperakut szérum kezelés alatt. A kísérlet végén egymással korreláló gyulladáscsökkentő citokinek koncentrációjának csökkenése azt mutatta, hogy a hiperakut szérum hatására a gyulladás az 5. napra csökkent.

Az osteoarthritisben a porc és a csont lebontásáért felelős elsődleges enzimek az MMP-k, főleg az MMP-1, 2, 3, 9 és 13. Normál körülmények között a csont és a porc átalakulását az MMP-k és más proteolitikus enzimek, a TIMP-k és a kiegyensúlyozott termelés közvetíti újonnan szintetizált mátrixfehérjék által. Jelen eredményeink alapján az együtt tenyésztett emberi csont, porc és

szinovium IL-1 β stimulációja növelte az MMP-3 és 13 szintjét, míg a hiperakut szérum az MMP-1, 2, 9 szintet növelte az első 3 nap során, ugyanakkor az idő csökkentette a gyulladáscsökkentő fehérjék szintjét. Ezenkívül az MMP 1, 2, 3, 9 és 13 szintje nem emelkedett tovább a hiperakut szérumkezelést követő 3. és 5. nap között, jelezve, hogy ezek a változások valószínűleg az alkalmazás utáni első napokra korlátozódnak. Ugyanakkor a hiperakut szérum fokozta az Osteonectin és a COL1A1 szöveti átalakító markerek termelését, miközben a tenyésztési periódus alatt folyamatosan csökkentette a RANKL szekrécióját. Jelenlegi, osteoarthritis izületi explantációs modellben elért eredményeink alátámasztják az izolált sejtekben végzett korábbi megfigyeléseket, amelyek szerint a szérumaddíció fokozta a csontvelő-explantánsok szekrécióját a COL1A1-ben és gátolta az apoptózist. A hiperakut szérum ígéretes vérszármazék lehet degeneratív izületi betegségek esetén, amely fokozza a sejtek proliferációját, a COL1A1 és az oszteonektin termelését, miközben csökkenti a RANKL, IL-1 β , IL-6R α , IL-12 és TNF- α szintjét. Ezek a változások a sejtproliferációs aktivitásban és a gyulladáscsökkentő citokin milióben azt jelzik, hogy a hiperakut szérum jótékony hatással lehet az OA térdízületére (19. ábra).



10. ábra: Az IL-1 β stimuláció és a hiperakut szérum kezelés hatása az osteoarthritis térdízületi szövetekre.

Az IL-1 β stimuláció fokozta a gyulladáscsökkentő citokinek, például a TNF- α , az IL-6R α , az IL-8, az IL-15, a CCL-1, a CCL-2 és a CXCL-10 szintjét az osteoarthritis szövettenyésztési modellben, míg a szint az MMP-3 és az MMP-13 szintje is növekedett. A hiperakut szérumkezelés csökkentette az

IL-1 β , a TNF- α , az IL-6R α , az IL-12 és a RANKL értéket, miközben mind a három szövettípusban, az MMP-1, 2, 9, az oszteonektin és a COL1A1 sejteinek száma megnőtt. A hiperakut szérum hozzáadása után az IL-1Ra koncentrációja megnőtt, de a tenyésztési periódus végén is csökkent.

Más vér-eredetű termékek vizsgálatokor a klinikai vizsgálatok kimutatták, hogy a PRP jelentősen javítja a fájdalmat a térd injekciói után. Mint korábban említettük, a különböző PRP-előkészítési technikák a termék nagy változatosságát eredményezik, ami kiszámíthatatlan és ezért kevésbé meggyőző eredményhez vezet. A hiperakut szérumban legyőzi ezt a hátrányt, és közel azonos összetételt biztosít a növekedési faktorokból és az in vitro szövetregenerációban nagy potenciállal rendelkező citokinekből, ígéretes terápiává válva az OA-ban.

A szinoviális folyadék könnyen kinyerhető, ezért OA markerekre irányuló kutatásban gyakran használják. Amint azt fentebb az in vitro vizsgálatokban bemutattuk, a szinoviális folyadék fehérje mintázata lehetővé teszi különálló patológiák azonosítását, amelyek lehetővé teszik a betegek szelekcióját és célzott terápiákat a jövőben. A 39 ismert OA-val kapcsolatos fehérjét elemeztük az idő múlásával, többváltozós faktoranalízissel, amely megmutatta, hogy 24 közülük 2 meghatározott csoportba csoportosult, jelezve, hogy ezek a fehérjék befolyásolhatják egymást. További statisztikai tesztek magas korrelációt mutattak ezeken a csoportokon belül, ami arra utal, hogy ezeknek a citokineknek a válasza diagnosztikai értéket képviselhet. Ez az érdekes megállapítás lehetővé teszi számunkra, hogy a jövőbeni vizsgálatokban csökkentse a vizsgált citokinek számát, extrapolálva a csoport többi tagjára. Fel lehet használni az OA-betegek kezelésre adott válaszainak nyomon követésére a klinikai vizsgálatok során is, optimalizálva a biológiai mintákat és a kísérleti erőforrásokat. Ezt az innovatív megközelítést más betegségek, például emlőrák esetén is kimutatták.

Az A csoport, a rezisztin kivételével, kiemelkedően erős és szignifikáns összefüggést mutatott ki a hiperakut szérumban alatti ingadozások összehasonlításakor. E citokinek közötti korábbi összefüggésekről már beszámoltak a szakirodalomban. Például az oszteoklaszt downregulációjában szerepet játszó IFN γ , IL-10 és IL-33 aktivációs mintázatát már korábban leírták. Továbbá az IL-8 növeli az MMP-9 szintjét az Epidermolysis Bullosa Simplex autoimmun betegség összefüggésében. Érdekes módon ebben a csoportban az egyetlen citokin, amely negatívan korrelált, az IL-1 β volt, amely az OA-ban jól ismert citokin. Bár a metalloproteinázok aktiválásával képes a porc lebomlását kiváltani, több klinikai vizsgálat során

kimutatták, hogy ez nem optimális célpont az OA kezelésében. Másrészt a B csoport esetében a legtöbb összefüggés túl gyenge és ezért diagnosztikai fejlesztések számára irreleváns. Fontos kiemelni azonban azt a hét fehérjét, ahol a korreláció erős és szignifikáns volt: VEGF-A, ACAN, MIP-1 α , IL-22, IL-2, IL-23 és OSM; ez utóbbi kettő negatívan korrelál. Ismeretes, hogy a VEGF-A döntő szerepet játszik az OA kialakulásában, porc degenerációt eredményez az ACAN szintézisének gátlása miatt. Érdekes módon ismert, hogy mind az OSM, mind az IL-23 az OA ízületekben emelkedett és közvetlen hatással vannak a GAG termelés gátlására, illetve a fájdalomra; tudomásunk szerint azonban nincs bizonyított összefüggés e két fehérje között annak ellenére, hogy a hiperakut szérumban kezelés után hasonlóan viselkedtek.

A jelen vizsgálatban a kontrollcsoport hiánya miatt a kezelés hatékonyságát nem volt célunk bizonyítani. Mindazonáltal a betegek által jelentett eredményeket 6 hónapos követésig gyűjtöttük, amely azt mutatta, hogy a kezelt betegek életminősége idővel jelentősen javult. Az OA első szakaszaiban gyakori, hogy az ízületekben felesleges mennyiségű szinoviális folyadék található. Megfigyeltük, hogy az ilyen állapotú betegek jobban veszeléztettek. Mindazonáltal az OA-betegek két csoportjának („folyadékkal” és „folyadék nélkül”) egyaránt pozitív tendenciája volt, és a betegek kimenetele kecsgetető volt mind rövid, mind hosszú távon. A hiperakut szérumban terápia segítségével csökkent a fájdalom, javult a mobilitás.

Arra a következtetésre jutunk, hogy a hiperakut szérumban pozitív hatással van a tünetek enyhítésére és az osteoarthritis térd javulására a fájdalom és a funkcionális összefüggésében, valószínűleg a regeneratív folyamatok indukálásával. Ebben a tanulmányban két olyan fehérjecsoportot azonosítottunk, amelyek hiperakut szérumban kezelés után erősen korreláltak, új lehetőségeket nyitva a kezelés nyomon követése és objektívizálása során.

6. A tézisek összefoglalása

Hipotézis 1: A Kinect-Azure optikai eszközzel a térdízület mikroinstabilitását egylábas guggolás során megfelelő pontossággal lehet mérni, amely alkalmas a dinamikus valgus mint sérülés- és osteoarthritisz predisponáló tényező korai és pontos felismerésére. Kimutattuk, hogy a korábbi publikációkkal ellentétben a guggolás legmélyebb

pontja nem ad reprodukálható és alanyok között összehasonlítható dinamikus valgus adatot, ezért célszerű a mérést egy adott guggolási mélységen, javaslatunk szerint az alsó végtag hossz 15%-ban elvégezni.

Hipotézis 2: Az oszteoarthritis in vitro térdízületi explantokban jól modellezhető volt IL-1 β indukcióval, amely a betegekből nyert szinoviális mintákhoz hasonló citokin termelést és mintázatot adott. A hiperakut szérumszint kezelés hatására az ízület szöveteiben gyulladásgátló citokin profil és sejtproliferáció alakul ki, amely felveti az ízületi regeneráció lehetőségét.

Hipotézis 3: Hiperakut szérumszint alkalmazása humán térdízületben gyulladáscsökkentő és fájdalomcsillapító hatást váltott ki, amelyet a betegek szubjektív panaszain kívül a szinoviális folyadék citokin mintázatának változása is igazolt.

7. Konklúzió

Összefoglalásul megállapíthatjuk hogy a térdízületi porckopás, amely a sportolói populációt különösen rosszul érinti, máig megoldatlan orvosi feladat. Az elmúlt évtizedek kutatásai azonban rávilágítottak arra, hogy az instabilitások korai felismerése nagyban segít abban, hogy a sport illetve fizikai munka által okozott túlzott és egyoldalú terhelés ne okozzon korai porckopást. Azonban ezen instabilitások vizsgálata egy átlagos orvosi vagy gyógytornászi de akár sport-diagnosztikai rendelésben sem egyszerű, ezért szükség volt egy megfelelően használható és jelölőket nem alkalmazó módszer kifejlesztésére. Ez a törekvésünk sikeres volt: a Dynaknee eszközzel ma már több sportágban, így röplabdában, labdarúgásban, síben, és balettben egyaránt használják különösen fiatal sportolók vizsgálatára. A dinamikus valgus mérése azonban csak az első feladat, mert ezen diagnosztikai paraméter megállapítása után terápiára is szükség van. A kezelés egyik eleme a mozgás és a gyógytorna, amely képes lehet tudatos vezetéssel visszaállítani az egyensúlyi állapotot. A másik elem, amely továbbiakban is szükséges, a porc felszín egészségének visszaállítása. Ennek egyik nagyon ígéretes eleme a regeneratív szérumszint terápia. Ezen eljárás alkalmazásához azonban további diagnosztikai vizsgálatokra is szükség van hiszen nagyon sok különböző patomechanizmus vezet porckopáshoz és ezek nem mindegyike regenerálható. Ezért kutatásainkkal arra törekedtünk hogy

megállapítsuk mely citokinek azok amelyek mérésével a szinoviális folyadékban akár előre is lehetne jelezni a regeneráció mértékét. Optimális esetben a citokin mérés a beteg kiválasztásban tud segíteni és ezzel meg tudja állapítani hogy melyik betegnek, a betegség melyik fázisában célszerű szérumszint terápia alkalmazni. Ezen kutatási elem a vártnál jelentősen bonyolultabb eredményeket hozott, mivel nem volt olyan kitüntetett molekula vagy akár molekula csoport sem amelynek egyszerű koncentráció változása megfelelő előrejelzést biztosított volna. Ezért a hálózat kutatás eszközeit kellett segítségül hívni, amelynek révén sikerült két olyan citokin csoportot azonosítani amelyek jól korrelálnak egymással, vélhetően egy-egy pontosabban még nem feltárt gyulladási mechanizmus elemeiként. Ez a megfigyelés már lehetőséget ad célzott diagnosztikai eljárások későbbi kifejlesztésére. A klinikai tapasztalat azt mutatja, hogy megfelelő időben alkalmazva a szérumszint terápia kifejezetten jótékony hatású az ízületi gyulladás csökkentésére és további kísérletekben mozgásterápiával együtt alkalmazva vizsgálni fogjuk hogy a sport által erősen igénybe vett és ezért korán kopásnak indul térdízületet minél hamarabb és minél teljesebb körben regenerálni tudjuk.