

Állatorvostudományi Egyetem

Sebészeti Tanszék

Sejtregeneratív terápia a kisállatgyógyászatban
Cell regenerative therapy in small animal medicine

Németh Veronika

Témavezető: Dr. Ipolyi Tamás

Sebészeti Tanszék

2023

Absztrakt

Napjainkban a krónikus, fertőzött sebek, főként a nyílt törések kezelése nagy kihívást jelent, főleg az egyre szélesebb körben terjedő multirezisztens baktériumok elterjedése miatt. A gyógyuláshoz a szövetek megfelelő perfúziója, valamint immunsejtek, thrombocyták is szükségesek. A vérlemezkéknek nem csak a véralvadásban betöltött szerepe jelentős, hanem sokféle eddig ismeretlen funkciójukra derült fény a közelmúltban.

Számos tudományos kutatás foglalkozott már a vérlemezkék nagyobb koncentrációban történő alkalmazásával idült, elhúzódó folyamatok esetében. A thrombocytákból különböző anyagok szabadulnak fel, amelyek szabályozzák, elősegítik a sejtek, szövetek regenerációját, segítséget nyújtanak a fertőzésekkel szembeni küzdelemben, szinergizálnak különböző antibiotikus kezelésekkel. A szervezet immunrendszere számára nem jelentenek plusz terhelést, nem váltanak ki immunreakciókat mivel a betegek saját véréből, centrifugálással nyerhetőek. Összehangoltan működnek együtt a B és T sejtekkel, szabályozva ezáltal a gyulladási folyamatokat.

Abstract

Nowadays, the treatment of chronic, infected wounds, especially open fractures is a great challenge, mainly due to the increasingly spread of multiresistant bacteria. Beside adequate tissue perfusion, the presence of immune cells and platelets are also necessary for healing. The role of platelets is not only important in terms of blood coagulation, but many previously unknown functions have been revealed recently.

Several scientific studies have already dealt with the use of platelets in high concentrations in case of long time, protracted processes. Various substances are released from the platelets, which regulate and promote the regeneration of cells and tissues, help fighting against infections, and synergize with numerous antibiotic treatments. They do not mean extra burden for the body's immune system, and are not triggering immune reactions, since platelets could be obtained from the patients' own blood by centrifugation. They work in cooperation with B and T cells, regulating inflammatory processes this way.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítések jegyzéke	4
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	7
3.1. Csonttörések.....	7
3.2. A csontok vérellátása és gyógyulási folyamatok	7
3.3. A csont gyógyulása	8
3.4. Csontgyógyulási zavarok	9
3.5. A csontgyógyulás immunológiai háttere.....	11
3.6. A vérlemezkék keletkezése, funkciója.....	12
3.7. A vérlemezkék antimikrobiális hatása	13
3.8. Thrombocytában gazdag készítmények az állatorvoslásban	15
3.9. PRP alkalmazási lehetőségei az orvoslás különböző területein.....	17
3.11. A különböző készítmények előállítása.....	21
4. Anyag és módszer.....	23
4.1. Áttekintett betegek	23
4.2. Vérvétel, centrifugálás	23
5. Klinikai esetek	25
5.1. Tibia delayed union.....	25
5.2. Femur non union	28
5.3. Tibia malunion	29
5.4. Fractura ossis tibiae, non union.....	31
5.5. Tibia delayed union, sequester.....	34
6. Következtetés.....	37
7. Irodalomjegyzék	38

1. Rövidítések jegyzéke

BDNF	Brain-Derived Neurotrophic Factor
BMG	Bone Matrix Gelatin
CC	Cranio-caudalis
COX-1	Cyclooxygenase-1
COX-2	Cyclooxygenase-2
EGF	Epidermal Growth Factor
EPS	Extracellular Polymeric Substances
FG	Fibrin Glue
FGF	Fibroblast Growth Factor
GPIIb-IIIa	Glycoprotein IIb-IIIa
HGF	Hepatocyte Growth Factor
HIF	Hypoxia-Inducible Factors
IGF-1	Insulin-like Growth Factor-1
IL-10	Interleukin-10
IL-17	Interleukin-17
IL-6	Interleukin-6
i.v.	Intravénás
L-PRF	Leukocyte and Platelet Rich Fibrin
L-PRP	Leukocyte and Platelet Rich Plasma
ML	Mediolateralis
MRSA	Methicillin Resistant Staphylococcus Aureus
MRSP	Methicillin Resistant Staphylococcus Pseudintermedius
MSSA	Methicillin Sensitive Staphylococcus Aureus
PC	Platelet Concentrate
PDAF	Platelet-Derived Angiogenesis Factor

PDEGF	Platelet-Derived Endothelial cell Growth Factor
PDGF	Platelet-Derived Growth Factor
PDP	Platelet-Derived Product
PF-4	Platelet Factor-4
PGE2	Prostaglandin E2
PJI	Prosthetic Joint Infection
PPP	Platelet Poor Plasma
PRF	Platelet Rich Fibrin
PRP	Platelet Rich Plasma
TGF	Transforming Growth Factor
TGF- β	Tissue Growth Factor- β
TLR	Toll-Like Receptor
TNF- α	Tumor Necrosis Factor- α
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor

2. Bevezetés

A tudomány folyamatos fejlődésével a szervezet gyógyulási folyamataiban korábban még nem ismert tényezők is felfedezésre kerültek. Nagy szükség van ezekre a kutatásokra, mivel az egyre gyakoribbá váló, felelőtlen antibiotikumhasználat miatt előtérbe kerülnek a multirezisztens baktériumok, melyek a különböző gyógyulási folyamatokat visszavethetik.

A csonttöréseknek különböző gyógyulási szakaszai vannak, melyek szoros összefüggésben vannak az immunrendszerrel. Különböző sejtek által termelt cytokinek, növekedési faktorok mind hozzájárulnak a megfelelő ütemben történő gyógyuláshoz. Ebből kiindulva született számos tanulmány, amely a vérelemezékben gazdag, saját vér terápia előnyeit kutatja. A vérelemezékből ugyanis rengeteg olyan anyag szabadul fel, amely felgyorsíthatja a gyógyulási folyamatokat, különösen, ha bakteriális infekció is feltételezhető. Ezekben a biogén anyagokban a különböző effektormolekulák nagyobb koncentrációban találhatóak meg, ezáltal hatásuk is kifejezettebb.

Jelen dolgozatom elkészítésekor az volt a célunk, hogy ezeket az új kutatási eredményeket a gyakorlatba is átültessük, adjunk egy átfogó képet az új irányok klinikai alkalmazásáról. Olyan eseteket vizsgáltunk, ahol a hagyományos protokollokkal már nem tudtunk tovább lendíteni a gyógyulási folyamatokon, valamilyen hátráltató tényező akadályozta a normál ütemben zajló gyógyulást. Ilyen tényező lehet többek között a folyamatos fizikai irritáció, vagy egy nem megfelelően kiválasztott műtéti technika, illetve, ha az állat nem kerül megfelelő időben ellátásra.

3. Irodalmi áttekintés

3.1. Csonttörések

A traumás sérülések, ortopédiai elváltozások gyakran előfordulnak a kisállat praxisban. Csonttörés vagy fractura során a csontszövet folytonossága hiányt szenved. A csontszövet érintettségének mértékétől függően megkülönböztetünk komplett és inkomplett töréseket. A törésvonalak száma alapján beszélhetünk egyszerű vagy összetett (darabos vagy szegmentális) törésről[1].

A külvilággal való kapcsolata alapján lehet fedett és nyílt törés. Nyílt törések esetében gyakori a bakteriális fertőzés, mely septicus csontgyulladást (osteomyelitist) okozhat. A folyamat során a csontszövet jelentős károsodást és kóros átépülést szenved el a bakteriális proteolitikus enzimek, illetve a kialakuló vérkeringési zavarok következményeként. Elégtelen vérellátás következtében a csont elhalhat, sequesterek keletkezhetnek és csontgyógyulási zavarok alakulhatnak ki. Mindkét esetben műtéti körülmények szükségesek a probléma megoldására[1].

3.2 A csontok vérellátása és gyógyulási folyamatok

Ahhoz, hogy a csontok képesek legyenek az élettani funkcióik ellátására, a megfelelő vérellátás elengedhetetlen. Klinikailag a legtöbb vérellátási zavar a hosszú csöves csontok esetében jelentkezik. Ezeknél a csontoknál a vérellátás alapvetően három forrásból érkezik: afferens rendszerből, a tömör csontállomány intermediális rendszeréből és az efferens rendszerből. Az afferens rendszer artériás vért szállít, melyet az a. nutricialis, a. metaphysealis és periosteális arteriolák alkotnak[2]. Ezek az erek az endosteális részbe jutva a csontvelő sinusoidjaiba juttatják a vért, mielőtt azok kilépnének a cortexen keresztül a vénás rendszerbe[3].

A vérellátás zavara a trauma erejétől, a lágyszövetek sérülésétől, a törés típusától és a műtéti traumatizációtól függ. Trauma hatására a csontban lévő és az azt körülvevő erek is sérülnek, ami haematoma kialakulásához vezet, és gyulladós reakció indul meg. Sérülés során ér átépülés, vagyis angiogenesis történik, melynek irányítását számos molekula befolyásolja. Ezáltal új véregek alakulnak ki a csontot körül vevő lágyszövetekből, melyet a gyógyuló csont extraosseális vérellátásának nevezünk. Ez elkülönül az egészséges csontot ellátó

periosteális arterioláktól. Vérrel látja el a levált csontdarabokat, devitalizálja a cortexet és az újonnan fejlődő csontos callust. Amikor a törés stabilizálódik és a medulláris keringés is helyre áll, az extraosseális vérerek regresszálódnak[2].

Az angiogenezist számos tényező negatívan befolyásolja, például a sérüléshez kapcsolódó trauma (primer trauma) és a műtéti kezelés (szekunder trauma). Mivel a műtéti ellátás is szöveti traumatizáció, így vérkeringési zavart okoz, ezért törekedni kell azok kíméletére[2].

A csontok vérellátása az életkor előrehaladtával fokozatosan csökken, valamint különböző metabolikus betegségekben (pl. cukorbetegségben, mellékpajzsmirigy működésének zavara) vérszegénységben, daganatok vagy mozgásképtelenség miatt is károsodhat. Ezekben az esetekben kialakuló hypoxia csökkenti az osteoblastok működését, valamint a csontképződést és növeli az osteoclast aktivitást és a csontresorptiót. A sejtek az oxigén parciális nyomásváltozásaira a hypoxia-indukálta transzkripciós faktorok segítségével reagálnak oxigén-függő lebomlásuk, hidroxilálódásuk révén. Oxigén hiányában a HIF-ek heterodimerizálódnak és a célgének promoter szekvenciáiban elindítják a hypoxia által szabályozott gének transzkripcióját, beleértve a vasculáris-endotheliális növekedési faktor termelődését is, mely kulcsfontosságú mediátor az erek képződése során. A revascularizáció kedvez az osteoblastok működésének. A hypoxia negatív hatását tovább fokozza az azt kísérő acidózis, mely során a csökkenő pH szintén az osteoclastok működését fokozza, gátolja a mineralizációt[3].

3.3. A csont gyógyulása

A csontszövet sérülését követően a törési felszíneken resorptio figyelhető meg, kb. 2 héttel a törés után. A törési rés eleinte növekszik. Ezt vérzés, véralvadás, gyulladás, ödéma követi. Aktiválódnak a pluripotens mesenchymalis sejtek, majd megjelenik a porc-és csontszövet, végül a képződött callus felveszi a normál csontra jellemző alakot. Ennek eredményeként a törési résben képződött szövet helyét átveszi egy merevebb, erősebb szövet. Kezdetben granulációs szövet képződik, melyet kötőszövet, rostos szövet, porcszövet, mineralizálódott porcszövet és végül a corticális csontszövet kialakulása követ[2]. Ez a folyamat különböző sejtek által termelt mediátorok irányítása alatt áll.

A callus képződést a helyeződés alapján feloszthatjuk medulláris, periosteális és intercorticális callusra. A képződés formáját nagy mértékben befolyásolják az eltérő körülmények és ingerek[2].

A különböző rögzítési technika, módszer más-más stabilitást biztosít, emiatt mikromozgások is jelen vannak. A fejlődő callus felelős a korai stabilizációért és a csontvégek korai klinikai egyesülésért is. Azonban, ha a mikromozgás túlzott fokú, főként, ha rotációs, akkor kialakulhat a késedelmes csontgyógyulás (delayed union), ahol a kialakult callus átalakulása porc- majd csontszövevé elhúzódik. A törött csontvégek nagyfokú mozgása miatt az angiofibroblast szövet nem képes növekedni, keringési elégtelenség alakul ki és ez vezet gyógyulási zavarokhoz.

3.4. Csontgyógyulási zavarok

A csonttörések gyógyulását nagyon sok tényező befolyásolhatja, mint például az állat életkora, faja, fajtája, neme, tápláltsági állapota, egyéb betegségek, korábban alkalmazott gyógyszerek és nem utolsósorban a rögzítési technika is[1]. Fontos megemlíteni, hogy egy törés kialakulhat nagy energiájú vagy kis energiájú trauma hatására is. Nagy erejű trauma során a lágyszövetek is nagy mértékben sérülnek, ez önmagában okozhat gyógyulási zavart. Ha a kezelés tervezésének korai szakaszában figyelembe vesszük a lágyszövetek állapotát és a trauma energia szintjét, azzal csökkenthetjük a non union kialakulásának esélyét[4].

Egy csontot klinikai értelemben akkor tekinthetünk gyógyultnak, ha az a normális végtaghasználatot lehetővé teszi. Szöveti vizsgálatokkal azonban a gyógyulási folyamat sokkal hosszabb ideig eltarthat. A csontok remodellációja körülbelül 18 hónapot, a teljes szilárdság elérése még ennél is több időt igényel. A csontgyógyulási folyamat a választott rögzítési technikától is függ. Velőűrszegzés biomechanikai szempontból különbözik a többi módszertől, mert a terhelés a csonton marad, a callus a kezdetektől a terhelési irányban megfelelően növekszik, szögstabil lemez esetében azonban a csontot tehermentesítjük, így a remodelláció csak az implantátum eltávolítását követően kezdődik[1].

Törésgyógyulási zavarok típusai:

a.) Nem megfelelő törésgyógyulás, malunion:

Ebben az esetben a gyógyulás során a csont alakbeli, rotációs, szögbeli vagy hosszirányú hibával gyógyul. Ide soroljuk az ízületbe terjedő töréseket is, melyek a helyreállítás hiánya vagy annak tökéletlen volta miatt callusképződéssel gyógyulnak. A növekedési zóna trauma hatására bekövetkező idő előtti záródása során a csont fejlődése zavart szenvedhet. Ennek következtében tengelyhiba alakulhat ki a gyógyulás során. Ez olyan műtéttechnikai hiba esetében is kialakulhat, ha a növekedési zónát áthidaló rögzítési módszert alkalmazunk, de

a töréskezelés elmaradása, korai implantátum eltávolítás, utókezelés be nem tartása, korai vagy túlzott végtaghasználat is vezethet ide[1].

A nem megfelelő csontgyógyulás következményei lehetnek lágyszöveti kontraturák, ízületek rendellenes terhelései, degeneratív elváltozásai, következményes fájdalom, sántaság[1].

b.) Késedelmes csontgyógyulás, delayed union:

A csontgyógyulás számos tényezőtől függ, ezért időtartama nehezen kalkulálható. Ennek közvetlen oka minden esetben az elégtelen perfúzió. Ennek kialakulásában számos tényező játszhat szerepet: nagy erejű trauma, kiterjedt lágyrész sérülések, avascularis csontdarabok, többszörös vagy nyílt törések, túlságosan nagy törési rés, septicus szövődmények, osteomyelitis, compartment szindróma, krónikus betegségek (pl. diabetes mellitus, Cushing-szindróma, veseelégtelenség, daganat stb.) és végül, de nem utolsósorban műtétechnikai problémák (invazív feltárás, nem megfelelően kiválasztott műtéti technika)[1].

Ezek az okok sokszor együttesen jelentkeznek és a csont vérellátását nagy mértékben rontják, és a törés közelében szöveti hypoxiát okoznak[1].

A csontgyógyulás folyamán nem a folyamatos kompresszió, hanem a ciklikus axiális mikromozgás a kedvező. Az 1 mm-nél nem nagyobb, tengelyirányú mikromozgás stimuláló hatású, ennél nagyobb, illetve a rotációs irányú elmozdulás a gyógyulás késedelméhez, elmaradásához, álízület kialakulásához vezethet. A kis lágyszöveti fedettséggel bíró területek (lábvégek, distalis tibia) vérellátása egyébként is rosszabb[1].

c.) A törés gyógyulás elmaradása, non union:

Kialakulása a törési rés és környezetének elégtelen vérellátásának következménye. Lényegében arról van szó, hogy a törtvégeket kötőszövet zárja le, a csontgyógyulás leáll. A hozzá vezető okok azonosak a késleltetett csontgyógyulásnál leírtakkal. Ez az állapot a kezeletlen delayed union következtében alakul ki, melyet konzervatív terápiával már nem lehet gyógyítani, műtéti beavatkozást igényel. A sebészi ellátás lényege a törési résben található kötőszövet eltávolítása, lezáródott velőüregek megnyitása, valamint megfelelő kontakt felület kialakítása a törtvégek között, végül a keringés helyreállítása és stabil rögzítés.

Szövetteni és radiológiai kép alapján további csoportokba sorolhatók:

- Hypertrophias non union: a vérellátás megfelelő, megfigyelhető gyógyulási hajlam, de a nem megfelelő rögzítés (elsősorban rotációs), instabilitás miatt a két oldal közötti növekvő angiofibroblast szövet nem tud kapcsolódni egymáshoz, így nem alakul ki csontos callus[1].
- Artrophias non union: az elégtelen vérellátás következtében biológiailag inaktív, nem figyelhető meg a vérerek sarjadzása, emiatt nincs gyógyulás[1].

3.5. A csontgyógyulás immunológiai háttere

A csonttörések gyógyulási folyamatában a gyulladásról sok kutató azt gondolja, hogy egy lényeges folyamat, amely megelőzi a csontképződést, átépülést. A sérülés helyére sokféle immunsejt is beszivárog és különféle molekulákat szabadítanak fel. Legújabb tanulmányokban már vizsgálták specifikusan immunsejt-alcsoportok szerepét is. Megfigyelték, hogy a macrophagok és az IL-17-et termelő $\gamma\delta$ T-sejtek fokozzák a csontgyógyulást, míg a $CD8^+$ T sejtek rontják azt. Ezenkívül az IL-10-et termelő B-sejtek hozzájárulhatnak a gyógyuláshoz azáltal, hogy elnyomják a túlzott és/vagy elhúzódó gyulladást[5].

A gyulladás minden esetben megelőzi a regenerációt, így az immunrendszer kulcsfontosságú a csonttörések gyógyulásában. Klinikai kutatások bizonyították, hogy immunszuppresszált betegeknél a csontgyógyulás késedelmes, legyen az gyógyszeres kezelés miatt, vagy esetleges fertőzés következtében[6].

A macrophagok a leggyorsabban reagáló immunsejtek közé tartoznak, hozzájárulnak a csontgyógyuláshoz azáltal, hogy a különböző sejttermelékeket és a lehetséges kórokozókat eltávolítják. A sérült szövetekből felszabaduló molekulák vonzzák a macrophagokat. Ezt a folyamatot a $TNF\alpha$ is stimulálja[7]. A macrophagok által kiválasztott $TNF\alpha$ érzékenyíti az osteoblast progenitor sejteket a növekedési faktorokra, és fokozzák az osteoblast differenciálódását az IL-6-tal együtt[5]. A gyulladással fázis vége felé az aktivált immunsejtek olyan molekulákat választanak ki, melyek stimulálják a mesenchymalis progenitor sejteket is [8], melyekből először porcszövet képződik, ami később mineralizálódik és felveszi a csontszövetre jellemző alakot.

Felnőtt egerekben végzett kísérletek során megállapították, hogy a macrophagok kimerülése késlelteti a csontgyógyulást, míg fejlődő egyedekben csonttrikuláshoz, növekedési rendellenességekhez is vezethet[9].

A csonttörések gyulladásos természete miatt régóta nyilvánvaló, hogy az immunrendszer összetevői létfontosságúak a gyógyulás során. Az elmúlt időszakban végzett tanulmányok rengeteg új tényezőt, résztvevő sejtet azonosítottak, fény derült jó néhány intracellularis együttműködésre is, azonban nagy részük még felfedezésre vár[10].

3.6. A vérlemezkék keletkezése, funkciója

A thrombocyták a véralvadásban és thrombogenezisben fő szerepet játszanak, azonban nagy jelentőségük van a sebgyógyulásban is. Részt vesznek a gyulladásos kaszkád szabályozásában, az angiogenesis folyamatában, a veleszületett és a szerzett immunrendszer részét képezik[11].

Csontvelőben keletkeznek, megakaryocyták cytoplazmatikus fragmentumaiból válnak le. Csökkenő számuk hatására thrombopoetin szintje nő a vérben, mely stimulálja a csontvelőben lévő óriássejtek keletkezését, érését, thrombocytá produkcióját. Átlagos élettartamuk 7-10 nap, majd a máj Kuppfer sejtjeiben és a lépben bomlanak le[12]. Sejtmagjuk nincs, azonban különböző sejtorganellumokkal rendelkeznek. Ezek közül legfontosabbak a lizoszómális granulomok, denz testek és alpha granulomok. Vérlemezkéknként 3-8 denz test található meg, melyekben főként a thrombocyták aktiválásához szükséges anyagok tárolódnak, mint például nukleotidok, kationok és olyan biokativ anyagok, mint a szerotonin. A lizoszómális granulomokban különböző enzimek tárolódnak, például foszfataz, proteáz, glükozidáz, melyek a képződött mátrix lebomlásáért felelősek. Az alpha granulomok tartalmazzák a legtöbb és legsokoldalúbb molekulákat, például antimikrobiális fehérjéket, koagulációs fehérjéket, proinflammatorikus anyagokat, mint citokineket, interleukinokat, kemokineket és nem utolsó sorban különböző növekedési faktorokat [11], például vasculáris endotheliális növekedési faktor (VEGF), vérlemezke eredetű növekedési faktorok (PDGF), fibroblast növekedési faktor (FGF), epidermális növekedési faktor (EGF), agyból származó neurotroph faktor (BDNF), hepatocytá növekedési faktor (HGF), és inzulinszerű növekedési faktor-1 (IGF-1), amelyek aktiváláskor felszabadulnak és a szövetek gyógyulásához, regenerációjához szükségesek[13].

Érsérülés során a vérlemezkék aktiválódva kitapadnak és alakváltozást szenvednek el, mely során granulumaik tartalma felszabadul és egymás mellett több folyamat játszódik le. Egyes membránhoz kötött molekulák, például a P-selectin a thrombocyták felületére transzlokálódik, elősegítve azok aggregációját és interakcióját immunsejtekkel és endothel sejtekkel is[14].

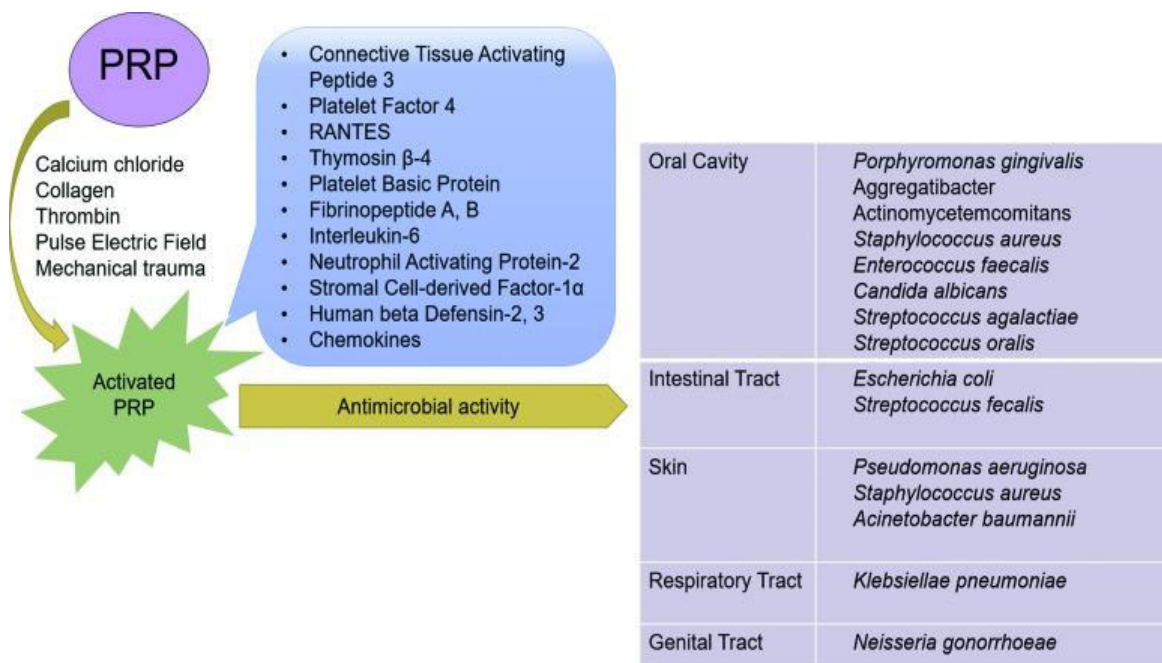
A sérülés során az erekből kilépő vérlemezkék aggregálódva fibrinrögöt képeznek, melynek nem csak a vérzéscsillapítás a célja, hanem egy ideiglenes extracelluláris mátrix létrehozása, amely támogatja a gyógyulási folyamatokban részt vevő sejteket, cytokineket, növekedési faktorokat. A természetes vérrög összetétele eltér a PRP-vel képzett vérrög összetételétől. A természetes vérrög kb. 95% vörösvértestet, a fennmaradó 5% leukocytát és vérlemezkét tartalmaz. Ezzel szemben a PRP-ből származó vérrög 95%-a thrombocyta, ez a százalék azonban az eljárás módjától függően változhat. Ehhez a mátrixhoz kapcsolódó növekedési faktorok felezési ideje lényegesen hosszabb, mint a plazmában lévő szabad növekedési faktoroké[15]; a sebkörnyezetben lokalizálva maradnak, aktivitásuk szükség szerint fokozható vagy gátolható[16].

3.7. A vérlemezkék antimikrobiális hatása

Azt a tényt, hogy a vérlemezkék kulcsszerepet játszanak a gazdaszervezet kórokozók elleni védekezésében, a következő megfigyelések bizonyítják. A vérlemezkék vándorolnak legkorábban a sérülés helyére, reagálnak a mikrobiális kolonizációval kapcsolatos chemotacticus ingerekre és ezek a legkorábbi és legdominánsabb sejtek a vasculáris endothelium mikrobiális kolonizációjának helyén. A thrombocyták felszíni receptorokkal és cytoplasmikus szemcsékkel rendelkeznek, amelyek szerkezetükben és működésükben hasonlóak a neutrophylek, monocyták vagy makrophágok funkciójához. A vérlemezkék közvetlenül hozzá is tapadnak a mikrobiális kórokozókhoz, internalizálják azokat, fokozzák kiürülésüket a véráramból, korlátozzák haematogén terjedésüket is. Aktiválva in vitro károsítják vagy elpusztítják a baktériumokat, gombákat, protozoonokat. Képesek a komplementkötés aktiválására, felerősítésére. Oxigén metabolitok termelésével szintén jelentős szerepet töltenek be a védekezésben. Leukocytákkal szinergista hatást fejtenek ki. Megfigyelték azt is, hogy thrombocytopeniában szenvedő betegeknél nő a hajlam bizonyos fertőzésekre[17].

Többféle felületi receptorokkal érzékelik a kórokozókat (Fc, TLR, GPIIb-IIIa), hozzájuk tapadva aktiválódnak, ezáltal felszabadítják a szemcséik tartalmát[11]. A vérlemezkék

aktiválódásuk során számos antimikrobiális fehérjét szabadítanak fel, többek között a kötőszövetet aktiváló peptidet, T-sejtek által expresszált és szekretált kemokineket (RANTES), timozin β -4-et, thrombocytá bázikus fehérjét, fibrinopeptideket stb (1. ábra). Ezek a molekulák kölcsönhatásba lépnek a baktériumok külső sejtmembránjával, növelik a membrán permeabilitását, ami gátolja a fehérjeszintézist. A sejtmembránon kívül ezek a molekulák képesek intracelluláris fehérjéket is megcélozni, befolyásolva ezáltal a DNS-szintézist, vagy gátolhatják az enzimaktivitást is[18].



1. ábra A PRP antimikrobiális tulajdonságai [18]

Ezen funkciójuk támogatja a kórokozók elleni védelmet, mivel a csontok rögzítéséhez használt implantátumok felületén egyes multirezisztens baktériumok képesek biofilm képzésére, ami a gyógyulási folyamatokat visszavetheti. Ugyanakkor káros következményei is lehetnek, mint például thrombosis vagy a túlzott gyulladásos reakció[11].

Fontos, hogy a PRP csak aktiválás során fejt ki antibakteriális hatását, így mind a Gram-negatív és Gram- pozitív baktériumok ellen is hatásos lehet[19].

A *Staphylococcus aureus* gyakori kórokozó a fertőzött sebekben. A meticillin rezisztencia megszerzésétől függően a baktérium meticillin-érzékeny és meticillin-rezisztens kategóriába sorolható. A meticillin rezisztencia együtt jár több más antibiotikummal való rezisztenciával is (multirezisztencia). Napjainkban a multirezisztencia az egyik legnagyobb probléma a humán medicina, és az állatorvoslás területén is. In vitro vizsgálatok igazolták, hogy a PRP gátolja mind az MRSA és MSSA növekedését, az antimikrobiális aktivitás azonban csak a

kezelés első néhány órájában volt megfigyelhető[18]. Kisállat praxisban a *Staphylococcus aureus* nem olyan gyakori kórokozó, inkább a *Staphylococcus pseudintermedius* okoz problémát. A rezisztencia tekintetében ez a törzs hasonlóságot mutat a *Staphylococcus aureus*hoz.

Staphylococcus pseudintermedius gyakori opportunist, kommenzalista kórokozó kutyában és macskában, gyakran megtalálható a bőrön, fülekben is. Ezen fertőzések kezelése korábban nem okozott problémát, mivel az engedélyezett antimikrobiális gyógyszerek széles skálája megfelelő hatékonyságot mutatott egészen mostanáig. A meticillin-rezisztens *Staphylococcus pseudintermedius* megjelenése jelentős klinikai kihívásokat jelent az állatorvosok számára. Ezenkívül az MRSP hatással van a közegészségügyre is, közvetlen érintkezés útján terjedhet emberek és állatok között egyaránt[20].

Az ortopédiai sebészeti protokollok folyamatos fejlődése ellenére a protézis körüli ízületi fertőzés továbbra is az implantátumok korai lazulásának és elvesztésének vezető oka. A *Staphylococcus aureus* nazális kolonizációja a PJI ismert kockázati tényezője[21]. Állatkísérletekben vancomycint PRP-vel együtt alkalmazva kutatók arra jutottak, hogy a PRP szinergizál az egyes készítményekkel, de önmagában alacsony az antibakteriális hatása[22]. Antimikrobiális hatás fokozható, ha leukocytában gazdag plazmát alkalmazunk, bár egyes tanulmányokból eltérő eredmények születtek, hogy a PRP önmagában is elegendő hatással bírhat[18].

Összefoglalva a PRP antimikrobiális, antibiotikumokkal való szinergista hatása kiemelendő, azonban további vizsgálatok szükségesek annak megértésére, hogy a leukocyták miként befolyásolják, javítják a PRP hatásait[18].

3.8. Thrombocytában gazdag készítmények az állatorvoslásban

A folyamatosan fejlődő tudomány lehetőséget teremtett arra, hogy új szemszögből közelítsük meg az elhúzódó gyógyulási folyamatok orvoslását, legyen szó csontgyógyulási zavarról vagy akár elhúzódó sebgyógyulásról. Az elmúlt néhány évben a vérlemezkéből nyert biológiai anyagok nagy szerepet játszottak a regeneratív terápia elterjedésében nem csak a humán, de az állatorvosi gyógyászatban is. Ezek a PDP-k nagy koncentrációban tartalmaznak bioaktív anyagokat, mint például citokineket és különböző növekedési faktorokat (EGF, VEGF, TGF), szerkezeti fehérjéket, melyek nagy mértékben elősegítik a sejtek regenerációs képességeit[13].

Minimálisan invazív eljárással nyerhetők és széles körben alkalmazhatók a gyógyászat számos területén, például fogászatban, sebgyógyulási és csontgyógyulási zavarok esetében is. A beavatkozás során autológ sejteket használunk, így a szervezet számára nem idegen anyagot alkalmazunk, nem alakul ki kóros immunreakció[13].

A humán- és állatgyógyászatban is alkalmazott autológ hemoderivátumokat vérlemezkében gazdag és vérlemezkében szegény csoportokra különíthetjük el. Ennek alapján megkülönböztetünk vérlemezkében gazdag plazmát (PRP), vérlemezkében szegény plazmát (PPP), fibrinragasztót (FG). A kisállatgyógyászatban elsősorban a PRP-t alkalmazzuk. A leukocita és fibrin tartalom alapján is különböző kategóriákba sorolhatók: leukocita és vérlemezke gazdag plazma (L-PRP), vérlemezkében gazdag fibrin (PRF), leukocita és vérlemezke fibrin (L-PRF)[13].

PRF-et először 2001-ben fejlesztettek ki humán száj-és állcsontsebészeti beavatkozásokhoz, a csontregeneráció elősegítésére. Az alvadásban nem gátolt teljes vérben egyetlen centrifugálási folyamat során a thrombocyták aktiválódnak a véralvadás endogén útján keresztül. Mivel a vérben az alvadási faktorokat nem inaktiváltuk, létrejön a fibrinogén-fibrin átalakulás, létrehozva így egy fibrinhálót, melybe fehérvérsejtek, vérlemezkék tapadnak. A kialakult alvadékban három réteg különül el: a legfelső réteg egy acelluláris szérum, középen egy vékony ún. buffy coat réteg, mely tartalmazza a leukocytákat és thrombocytákat, a legalsó réteg pedig a vörösvérsejteket tartalmazza. Az így létrejött fibrinhálót kinyerve sokoldalúan felhasználhatjuk pl. sebgyógyulási zavaroknál, csontpótló anyagként szintetikus osteogén anyagokkal együtt (hidroxiapatit, csontgraft stb.)[13].

Állatgyógyászat területén először sportlovaknál alkalmazták PRP kezelést a különböző tendinopathiák és ízületi sérülések gyógykezelésére, mivel ezek a területek rendkívül nehezen regenerálódnak. Autológ szérumot gyakran alkalmaznak lágyuló szaruhártyafekélyek kiegészítő kezelésekként, mivel tartalmaz növekedési faktorokat, antiproteázt és antikollagenázt is, melyek meggátolják a fekély további mélyülését[13].

A PRP egyik fontos előnye, hogy kiküszöböli a különböző immunológiai reakciókat és egyes betegségek átvitelét is. A thrombocyták az alvadást követő tíz percben elkezdik aktívan kiválasztani a granulumaikban tárolt növekedési faktorokat, cytokineket, kemokineket.

A granulumokból kiváló faktoroknak összetett hatásuk is van egymásra, illetve eltérő lehet a különböző szövetekben. A plazmában a megfelelő thrombocytaszám kb. ötszöröse a

vérben megtalálható mennyiségnek, amely 150 000-350 000 db/ μ l között mozog[23]. Amerikai kutatók által végzett állatkísérletekkel bizonyították, hogy a csontregenerációhoz szükséges thrombocytákon koncentráció szűk határok között mozog. Előnyös biológiai hatások 1 000 000 db/ μ l vérelemzésre szám esetén következnek be, ennél magasabb koncentráció paradox módon gátló hatást fejthet ki a gyulladás során[24].

A PRP olyan fehérjéket is tartalmaz, mint a fibrin, fibronectin, vitronektin, thrombospondin, melyek sejtadhéziós molekulákként működnek és fontosak a fibroblastok, osteoblastok és hámsejtek migrációjában[25]. Mesenchymális őssejtek, osteoblastok, fibroblastok, endotheliális sejtek és epidermális sejtek expresszálják azokat a sejtmembránreceptorokat, amelyek specifikusak a PRP-ben előforduló növekedési faktorokra[26].

3.9. PRP alkalmazási lehetőségei az orvoslás különböző területein

A krónikus seb, illetve csontfertőzések kezelése nagy kihívást jelent az orvostudomány számára. A vérelemezékben gazdag plazma alkalmazása nagyon ígéretes kiegészítő terápiaként jelent meg az utóbbi időben. A thrombocytákból felszabaduló bioaktív molekulák képesek elpusztítani a patogéneket, körülhatárolni a necrotikus szöveteket és promótni a sebgyógyulást. Rendkívül nagy előnye, hogy szinergista hatást fejt ki az antibiotikumokkal, így megkönnyíti az antibiotikum-rezisztens baktériumok elleni védekezést is. Számos kutatás született már a PRP jótékony hatásairól, azonban a különböző vizsgálatok eredményei eltérőek lettek. Ennek egyik lehetséges oka, hogy nincs megfelelő konszenzus a thrombocytában gazdag plazma klinikai gyakorlatban történő előállítását illetően. A különböző technikák különböző thrombocytá- illetve cytokinkoncentrációt eredményeznek[18].

Jelenleg a PRP-t legszélesebb körben traumák vagy sérülések során történő regeneráció elősegítésére alkalmazzák. A krónikus csontfertőzések kezelésére szolgáló hagyományos terápiák magukban foglalják a sérült szövetek eltávolítását, nyílt törés esetén a csontvégek ép szövetrel történő fedését, valamint antibiotikumok alkalmazását. Ezen terápiák általában nem bizonyulnak elegendőnek a fertőzés időben történő megfékezésére, amely jelentős morbiditáshoz, végtagvesztéshez vezethet. Ezt kiküszöbölve a hagyományos terápiát kombinálhatjuk PRP kezelésekkel, kihasználva annak antimikrobiális és sejtregeneratív hatását[18].

Osteomyelitis általában haematogén baktérium terjedés vagy nyílt törés során alakul ki. Ehhez leggyakrabban társuló baktériumok a *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus* spp, *Pseudomonas aeruginosa* és *Escherichia coli*[27]. Kisállat gyógyászatban leggyakrabban a bőr felületén, illetve a tápcsatornában élő kórokozók kolonizációja okozza a fertőzést.

A kórokozók az inert felülethez tapadva védettek a vérellátástól, immunfolyamatoktól, antibiotikumoktól. Az olyan kórokozók, mint a *Staphylococcus* spp. képesek extracelluláris polimer anyag termelésére. Az EPS-be ágyazott baktériumok biofilmet hoznak létre, amelyben képesek egymással kommunikálva szabályozni a génexpressziót, lehetővé téve a növekedés szabályozását, valamint a környezethez való alkalmazkodást. Ez a mechanizmus nagyon fontos a bakteriális túlélés szempontjából, amely a krónikus csont-és ízületi fertőzés fenntartásában kulcsfontosságú[27].

Az antibiotikum-rezisztens baktériumok terjedése miatt szükség van új stratégiák kifejlesztésére. Ennek egyik eredménye a PRP-vel kiegészített antibiotikum terápia krónikus osteomyelitis esetében[18].

Csontvelőgyulladás során elégtelen vérellátás, necrotikus csont-és lágyszövet, valamint elégtelen mennyiségű növekedési faktor jellemző. A makrophagokat számos PRP-eredetű fehérje képes aktiválni, ideértve az alpha-1-mikroglobulint és alpha-2- makroglobulint, valamint a D-vitamin-kötő fehérjét, ami proinflammatorikus citokintermeléshez vezet (TNF α , IL-1 β és IL-6). Ezen anyagok fokozzák az antimikrobiális választ a szervezetben. A válasz tovább fokozható, ha L-PRP-t alkalmazunk, mivel a leukocyták olyan jelátvitelt indukálnak, amely az osteoblastokban, fibroblastokban tovább erősíti a proinflammatorikus környezetet. Ezen gyulladásos válaszok segítenek a necrotikus szövetek feloldásában, valamint elősegítik a kórokozók elpusztítását is. Ezen kívül a PRP-ben koncentráltan található növekedési faktorok fokozzák a revascularizációt, elősegítik a mesenchymalis őssejtek és osteoblastok osteocytákká történő fejlődését, valamint a granulációs szövet kialakulását a szövethiány pótlására[18].

MRSA-val mesterségesen fertőzött, osteomyelitisben szenvedő nyulakon végzett kísérletekben arra a következtetésre jutottak, hogy a leghatékonyabb kezelés a vankomycin L-PRP-vel történő kombinációja volt. Ezt radiológiai, mikrobiológiai és szövettani vizsgálatokkal is alátámasztották[28]. Napjaink egyik legnagyobb kihívása az antibiotikum használat csökkentése, illetve elhagyása a szeptikus szövődmények kezelése során. Ez a legnagyobb lehetőség a PRP kezelések terjedésében.

Profilaktikus alkalmazásra is született tudományos kutatás, mely az állcsontban a harmadik moláris fog eltávolítása utáni osteitis megelőzésére irányult. Ennek eredménye alapján elmondható, hogy a műtét helyén, lokálisan, intravénás antibiotikummal együtt alkalmazva elkerülhetjük a beavatkozás utáni csontgyulladás kialakulását[29].

A PRP gyulladáscsökkentő tulajdonságokkal is rendelkezik számos sejttípusban, mint például a synoviocytákban, chondrocytákban, makrophágokban. A PRP több száz molekulát tartalmaz, amely az ízületen belül a sejtekhez eljutva még több aktív molekulát választ ki, elősegítve ezáltal az angiogenezist és a porcsejtek regenerációját[30].

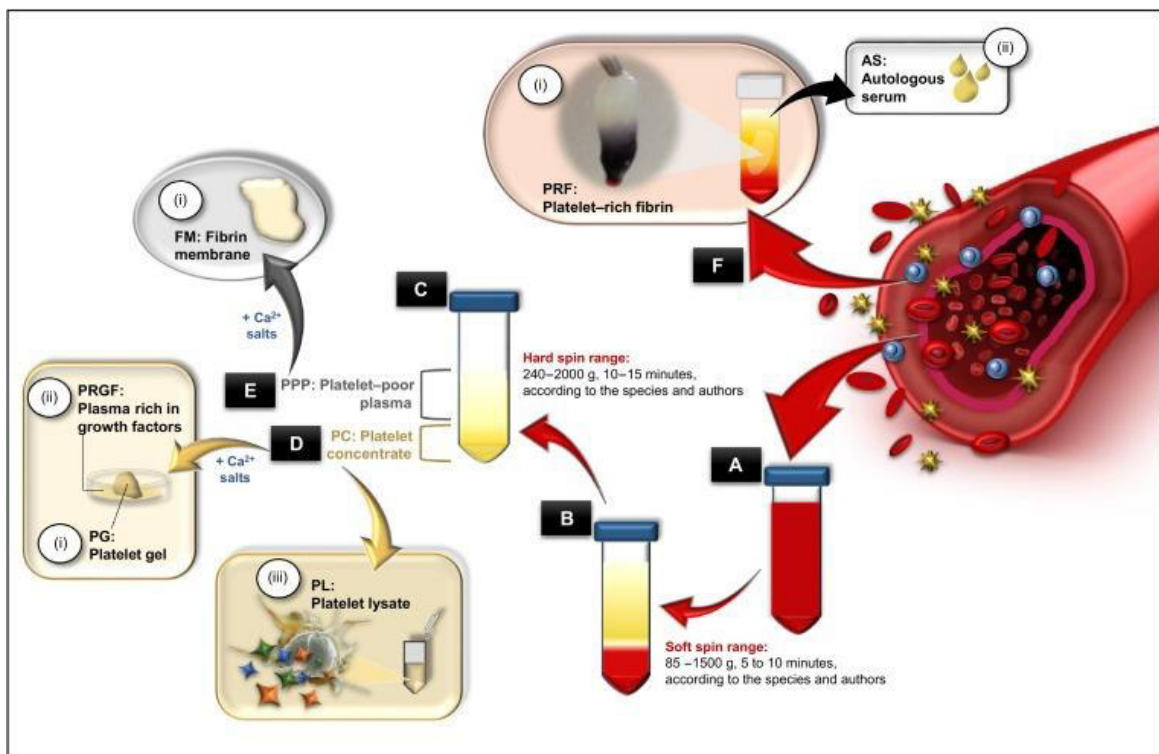
In vitro és in vivo állatkísérletekkel igazolták, hogy a PRP-ben található HGF csökkentette az ínszövetek COX-1 és COX-2 génexpresszióját, valamint szinte teljesen gátolta a PGE2 termelését. Ezek az eredmények azt bizonyítják, hogy a PRP csökkenti az ínszövetekben kialakult gyulladást is[31].

3.10. A PRP biológiai hatása, célsejtek

Növekedési faktorok	Hatás
PDGF	Angiogenezis, makrophag aktiváció Fibroblast chemotaxis és proliferációs aktivitás Kollagénszintézis fokozása Csontsejtek proliferációs képességének fokozása
TGF- β	Fibroblastok proliferációs képességének fokozása I-típusú kollagén- és fibronectin szintézis stimulálása Csontmátrix lerakódását indukálja
IGF-I	Fibroblast chemotaxis és fehérjeszintézis stimulálása Osteoblastok proliferációjának és differenciációjának fokozása
PDEGF	Elősegíti a sebgyógyulást a keratinocyták és fibroblastok proliferációjának stimulálásával
PDAF	Vascularizatio indukálása az endothelsejtek stimulálásával
PF-4	Stimulálja a neutrophilok kezdeti áramlását a sérülések helyére Chemoattraktív a fibroblastok számára Heparinszerű molekulák mérséklésével elősegíti a véralvadást
EGF	Sejtproliferáció Epithel sejtek differenciációja
VEGF	Angiogenezis Endothel sejtek migrációja és mitózisa Vérerek lumenének kialakítása Erek közötti kapcsolatok létrehozása Macrophagok és neutrophilok chemotaxisának irányítása Vasodilatatio (indirekten, nitrogén-monoxid felszabadulásával)

[23]

3.11. A különböző készítmények előállítása



Trends in Biotechnology

2. ábra [13]

A vérvételhez használt cső típusa attól függ, hogy mit szeretnénk előállítani. Ennek alapján alkalmazhatunk véralvadást gátló, illetve natív vérvételi csövet is. Véralvadásgátlóval történő begyűjtés után (A) először alacsonyabb fordulaton centrifugáljuk a vért (B). Az ekkor keletkezett plazmát kinyerjük, majd újra centrifugáljuk, ezúttal magasabb fordulattal (C). A második centrifugálást követően kapunk egy vérlemezkében szegény (PPP) és egy koncentrált, nagy mennyiségű thrombocytát tartalmazó plazmát (PC). A PPP-ben és a PC-ben indukálhatjuk az alvadást például kalcium hozzáadásával, így kaphatunk egy fibrin membránt (E, i) és egy thrombocytá gélt (D, i). A thrombocytá-koncentrátumban lizálhatjuk a vérlemezkéket, ekkor egy acelluláris plazmaoldatot kapunk (D, iii), melyben a thrombocytákból kinyert különböző növekedési faktorok nagy mennyiségben vannak jelen. A vért alvadásban nem gátolva, egyetlen centrifugálással kaphatjuk meg a thrombocytában gazdag fibrint (F), spontán alvadás után pedig az autológ szérumot (ii). Jelenleg nincs egy nemzetközileg elfogadott irányelv a különböző technikák alkalmazására. Számos protokoll sikeresnek bizonyult az eddigi publikációk alapján[13].

Érdemes azonban figyelmet fordítani a megfelelő hőmérsékletre, centrifugálási sebességre, hogy megfelelő koncentrációt érjünk el. A legtöbb esetben PRP-t 37°C-on vagy

szobahőmérsékleten állítanak elő, köztudott azonban, hogy az alacsonyabb hőmérséklet fokozza a vérlemezke aktivációt, segíti a granulomok ürülését[32]. Egyes kutatások igazolták, hogy a PRP 4°C-on történő előinkubálása maximalizálja a vérlemezkékből származó proangiogén molekulák felszabadulását[33].

A PRP hatékonyságát befolyásoló másik tényező a centrifugálási erő, idő, sebesség. A leggyakoribb a kettős centrifugálásos módszer, amely 160 g-vel 10 percig, majd 250 g-vel 15 percig centrifugál. Ez a módszer megnövekedett vérlemezke-, cytokin- és növekedési faktorkoncentrációt eredményez, valamint felgyorsítja a sejt vándorlást és -proliferációt[34].

Kutyáknál a következő centrifugálási protokoll ajánlott: először a teljes vért 1000 g-vel 5 percig, majd a kinyert plazmát 1500 g-vel 15 percig szükséges centrifugálni. Ez a protokoll a vérlemezkék 80%-át visszanyerte a teljes vérből, hatszorosára növelte a vérlemezkekoncentrációt és a legmagasabb PDGF-et eredményezte az aktivált frakcióban[35].

A thrombocyta-aktiváció egy döntő lépés a cytokinek felszabadulása előtt, amelyet számos tényező kiválthat, például kalcium-klorid, kollagén, thrombin, és mechanikai stressz is. A vérlemezkék aktiválásával a növekedési faktorok 10 percen belül felszabadulnak (1 órán belül a 95%-uk). Az aktiválással együtt járó gyors felszabadulás miatt fontos a megfelelő időzítés az alkalmazás során, hogy biztosítsuk a rövid élettartamú faktorok maximális expozícióját a sejtek számára. A szekréción faktorok kezdeti kitörését követően a vérlemezkék folytatják ezen faktorok szintetizálását és szekretálását életük hátralevő részében[36].

4. Anyag és módszer

4.1. Áttekintett betegek

Jelen tanulmányban olyan esetek kerültek feldolgozásra, amelyeknél a hagyományosan alkalmazott terápiák hatására nem a várt ütemben zajlott a betegek gyógyulása.

Minden beavatkozást alapos klinikai vizsgálat előzött meg, melyet követően röntgenfelvételek is készültek egy adott beteg elváltozott végtagjáról. Ezután a kezelő állatorvos döntött a szükséges beavatkozásról, rögzítések típusáról, alkalmazott kiegészítő terápiákról. A műtéti beavatkozásokra az Állatorvostudományi Egyetem Kisállatklinikájának sebészeti részlegén, illetve a Chiru-Vet Állatorvosi Szakrendelőben került sor. A műtéteket premedikációt követően (midazolam, propofol) inhalációs narkózisban hajtottuk végre (isofluran), fájdalomcsillapítóként ketamin (0,5 mg/kg iv.) és fentanyl (0,005 mg/kg iv.) kombinációját alkalmaztuk cseppinfúzióban. Peri- és intraoperatív alkalmaztunk antibiotikumot cefazolin formájában, 10 mg/ttkg adagban intravénásan.

4.2. Vérvétel, centrifugálás

PRP előállítására minden esetben a műtét közben került sor, miután a törött csontvégeket stabilizáltuk, de a lágszövetek egyesítése még nem történt meg.

A vért zárt vérvételi eszközzel nyertük ki a betegekből, melyhez natív csövet (1. kép), harangot és szárnyas tűt (2. kép) alkalmaztunk. Ezután szobahőmérsékleten, a kettős centrifugálás elvét alkalmazva kinyertük a thrombocytában gazdag plazmát. A csontszerkezet állapotától függően használtuk fel a plazmát, vagy készítettünk belőle és corticális csontpótlóból (3. kép) egy speciális graftot (4. kép).

Csontgraft készítésekor metronidazole alkalmazása is javasolt, (10 mg, 0,5%-os oldatból 2 ml) amely korlátozza a beültetett implantátum bakteriális fertőződését és megvédi a csontépítés korai fázisát a gyulladással szemben. Ezzel elősegíthetjük a graft megfelelő beépülését, valamint csökkenthetjük a fertőzés és végső soron a necrosis kialakulásának esélyét. Metronidazole azonban soha nem helyettesíti a megfelelő aseptikus környezetet a műtét során[37]. Az általunk használt csontgraft liofilizált, sterilizált ló csont mátrix zselatin (BMG), maximum 300 mikrométeres szemcsemérettel, melyet a Nyugat-magyarországi Regionális Szövetbanktól szerzünk be.



1. kép Natív vérvételi cső



2. kép Szárnyas tű



2. kép Fagyasztva szárított csontpótló



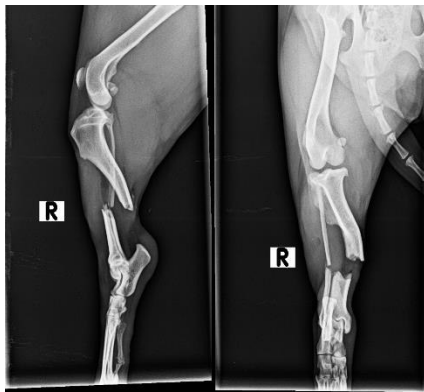
1. kép PRF

5. Klinikai esetek

5.1. Tibia delayed union

Első betegünk 2019.03.07-én született, keverék kutya, harapott sérülésből származó nyílt tibia töréssel került szakvizsgálatra 2021.09.07-én. Operatív töréskezelés során velőürszeget és szögstabil lemezt alkalmaztunk, drain csővel zártuk a sebet a fertőzésveszély miatt. Otthonában amoxicillin-klavulánsav tartalmú antibiotikumot, meloxicamot és tramadol-hidroklorid tartalmú fájdalomcsillapítót szedett.

A 2021.11.15-én végzett kontrollvizsgálat során végtagját már terhelte, de callusképződés még nem volt megfelelő mértékű.



5. kép Friss törésről készült felvétel (ML) 2021.09.07.



6. kép 2022.02.08-i felvétel a végtagról (CC)

A 2022.02.08-án a kutya végtagját már kevésbé terhelte, boka felett váladékozás volt észlelhető. Röntgenfelvételen elégtelen csontgyógyulás látszott, lezárult velőürrel, a distalis és proximális csontvég közötti csonthíddal. Ekkor a terápia részeként PRF-et és csontpótlót alkalmaztunk.

2022.03.16-án készített kontroll röntgenen még mindig nem volt teljes a csontgyógyulás, a distalis csavarok körül azonban már osteolysis jelei látszódtak, dinamizálás céljából a lemez eltávolításra került.



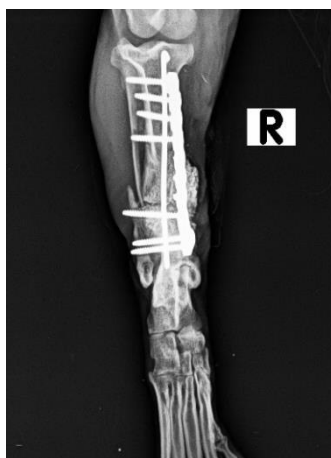
7. kép A lemez eltávolítása után (ML) 2022.03.16.

2022.04.26-án az állat ismét eltörte az érintett végtagot a velőúrszeggel együtt. Ekkor osteotomiával a törött csontvégeket lefürészeltük, és az előzővel megegyező módon rögzítésre került a tibia. A műtét során az implantátum köré PRF-fel átitatott spongiót helyeztünk el.

2023.01.09-én a csontpótló továbbra sem integrálódott, bódításban PRP került injektálásra. 2023.05.04-én készített felvételeken látható, hogy a csontpótló reakciómentesen, fuzionálás nélkül rajzolódik. Mivel a csontgyógyulás leállt, koncepciót váltottunk. A következő 4 hétben heti rendszerességgel PRP kezelést alkalmaztunk, aminek következtében a csont meggyógyult és többszörös dinamizációt követően az implantátumokat eltávolítottuk 2023.08.31-én, 2 évvel a trauma bekövetkezése után.



8. kép A lemez eltávolítása után (ML) 2022.04.26.



9. kép Lemezes osteosynthesis PRF-fel és csontpótlóval (CC) 2022.04.26.



10. kép A csontpótló nem integrálódott (CC) 2023.01.09.



11. kép 2023.05.04-i
felvétel (CC)



12. kép Többszörös
dinamizáció (CC)
2023.07.13.



13. kép Többszörös
dinamizáció (CC)
2023.08.17.



14. kép A gyógyult végtag
(CC) 2023.08.31.

5.2. Femur non union

A második eset egy 2020-as születésű keverék, kan kutya, ismeretlen kórelőzménnyel, menhelyről fogadták örökbe. Körülbelül 2 hónap után a gazdáknak feltűnt, hogy hosszabb futások után bal hátsó lábát nem terheli. A röntgen alapján régebbi keletű femur supracondylaris törést szenvedett el az állat, mely a műtéti ellátás hiánya következtében nem gyógyult meg. A radiológiai diagnózist (non union) követően a beteget sebészi körülmények között láttuk el. A műtéti feltárás során a törési résben kötőszövetes kapcsolat, a térdízületben pedig fibrines felrakódások voltak láthatóak. A beavatkozás során a csonthiányos területet kikürettáltuk, majd PRF-fel átítatott csontpótló anyaggal kitöltöttük a rést, és keresztűzéssel stabilizáltuk. A műtét és a gyógyulás is komplikációmentesen zajlott, kb. 4 hónappal a rögzítést követően megtörtént az implantátum eltávolítása, a beteg végtagja megfelelően funkcionál.



13. kép Femur supracondylaris törés (CC) 2021.11.06.



16. kép Postoperatív RTG felvétel (CC) 2021.11.06.



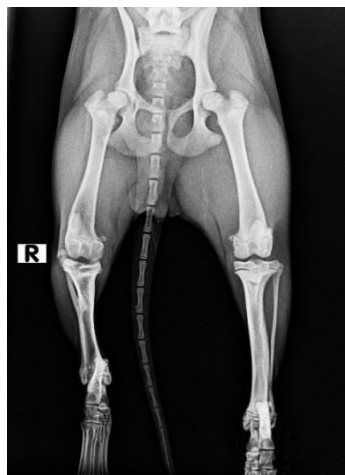
17. kép A tűződrót eltávolítása előtt (CC)



18. kép A gyógyult végtag (ML) 2022.02.02.

5.3. Tibia malunion

Harmadik betegünk egy 7 hónapos növekedési zavarban szenvedő keverék kutya, amely az elsődleges radiológiai vizsgálat szerint felső-középső harmadi tibia törést szenvedett el. Ezt a kezelőorvos konzervatív úton kezelte. A beteg utókövetése után derült ki, hogy valószínűleg a tibia proximalis növekedési zónájának SH. 5-ös kompressziós sérülése is bekövetkezhetett, mert ott a csont hosszirányú növekedése leállt. A tibia 3 cm-rel rövidebb volt az ellenoldalihoz képest. A fibula feje is a tibia platótól proximálisabban helyeződött. A tuberositas tibiae növekedési zónája nyitott volt, az a növekedés során a térdízület cranialis oldalán volt látható, caudalis irányú deviációval. A terápia során a tibiát és a fibulát elfűrészeltük, majd amennyire a lágyszövetek engedték, megnyújtottuk körülbelül 8-9 mm-rel. Ezzel a fibula növekedését akartuk függetleníteni a tibiától, másrészt a két oldal közötti különbséget szeretnénk volna csökkenteni. Az operációra 2021.10.25-én került sor.



19. kép Első rtg felvétel (CC)



20. kép Postoperatív felvétel (CC)

2021.12.20-án megtörtént a dinamizáció. További két hónap eltelte után sem lehetett látni a tibia gyógyulását, a csontpótló nem integrálódott. A reoperáció során PRF-fel átítatott csontgraftot és metronidazolt tettünk az osteotomia részébe. A compactát mindkét oldalon hosszanti irányú fűrészeléssel megnyitottuk, lehetővé téve ezzel, hogy az angiofibroblast szövet megfelelően tudjon sarjadni. A gyógyulás során folyamatos fizikai irritáció (nyalogatás) hatására a seb szeptikussá vált, így a terápiás protokoll változtatása vált szükségessé. Hetente bódításban a csont köré injektáltuk a PRP-t és Aquacell Ag habkötszert varrtunk a sebre. Ezzel a módszerrel az állat végtagja sikeresen meggyógyult. Az implantátumot 2023.02.27-én, 16 hónappal a kezelés elkezdését követően tudtuk eltávolítani.



21. kép Dinamizáció után
(CC) 2021.12.27



22. kép A gyógyult
végtag (CC)
2023.02.27.



23. kép A gyógyult végtag
(ML) 2023.02.27

5.4. Fractura ossis tibiae, non union

Az alábbi eset gyógyulása több, mint egy évig tartott, és nem a várt eredményeket hozta, a tibia olyan mértékben károsodott volt, hogy sajnos csak a fibula megvastagodása tette lehetővé, hogy a láb satbil maradjon, funkcióját ellássa.

A sérült állat egy 3 év körüli tacskozó, gázolás következtében fedett, ferde középső-alsó harmadi tibia törést, illetve fibula középső harmadbeli haránttörést szenvedett el. Két héttel a szakrendelésre érkezés előtt volt az operáció, egy másik állatkórházban. A kezelésről dokumentációt nem kaptunk. A műtét során először lemezes osteosynthesissel próbálkozott az operáló kolléga, majd miután ez a stabilizálás nem járt sikerrel, cerclage drót és külső rögzítő keret (fixatuer externa) kombinációja mellett döntött.

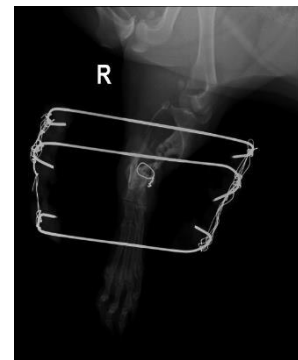
A műtétet követően a seb szivárogni kezdett, melyet újra összevarrtak és per os antibiotikumos kúrát írtak elő a betegnek (amoxicillin+klavulánav és ciprofloxacín kombináció). A klinikára 2021.10.20-án érkezett. A fizikális vizsgálat során nyílt seb látszott a tibia felett, valamint a csont és a ráhelyezett cerclage drót is szabad szemmel látható volt. A röntgenfelvételeken a lábszárcsont középső és alsó harmadában jelentős csontoldódást, elégtelen rögzítést láttunk. Az egyik tűzodrót a törési résben helyeződött, a cerclage drót funkcióját veszítette. A proximális törtvégeken több nagyobb méretű furat látszódott.



24. kép Az első fizikális vizsgálat 2021.10.20.



25. kép Az első fizikális vizsgálat 2021.10.20.



26. kép Klinikán készített első röntgenfelvétel (ML) 2021.10.20.



27. kép A fixatuer eltávolítása után

2021.10.28-án a műtéti ellátás során az implantátumokat kivettük, az elhalt csontdarabokat eltávolítottuk, majd ismét egy külső rögzítő keretet helyeztünk fel.

Négy hét múlva végzett kontrollvizsgálaton a tibia középső harmada felszívódott, a fibula meggyógyult. Ezután műtéti úton 2022.01.06-án a csontvégeket felfrissítettük, a tibiotarsalis ízületben arthrodesist végeztünk tűződrót és lemez segítségével. Az anyaghiányt csontpótló blokkal pótoltuk a bőrt rácsplasztikával zártuk. Néhány nap múlva azonban a műtéti seb a medialis oldalon szétnyílt. Ekkor 3 alkalommal, heti egyszer megkezdtük a PRP kezelést a váladékozó seb körül.



28. kép A tibia felszívódott középső harmada (CC)



29. kép Arthrodesis után (CC) 2022.01.06.

2022.04.29-én készült röntgenfelvételeken a beépített csontblokk nem integrálódott, illetve a lemez egy része is exponálódott. A végtag a fibula megvastagodásával gyógyult meg, 2022.07.01-jén, fél évvel az arthrodesis után az implantátum eltávolításra került. Mivel ennél az esetről az arthrodesis során nem alkalmaztunk PRF-et, ezáltal kontroll csoportnak is tekinthető.

2022.11.02-án a seb medialis oldalán váladékozást észleltek, kikürettáltuk az ott található csontpótló maradványokat, majd ismét bezártuk, és a seb meggyógyult.



30. kép A megvastagodott fibula (CC) 2022.07.01.



31. kép A megvastagodott fibula (ML) 2022.07.01.

5.5. Tibia delayed union, sequester

A következő esetünk szintén hosszú gyógyulási folyamaton esett át, rengeteg antibiotikumot kapott, mire a szakrendelésre került. 1,5 éves európai rövidszőrű macska jobb oldali tibia nyílt, középső harmadbeli romtöréssel. A bőr egy része elhalt. A törést velőúrszeggel és fixateur externa-vel rögzítették 2020.09.20-án, a bőrsérülés egy részét megvarrták, lokálisan gentamicinnel kezelték. Két héttel a műtétet követően az állat a sebet szétnyalta, a tibia egy része látható volt. Ekkor az állatorvos kolléga a sebet műtéti úton bezárta, 10 napos amoxicillin-klavulánsav tartalmú antibiotikum kúrát írt elő, kb. 1 hét alatt a seb szépen összehúzódott, viszont minimális váladékozás volt megfigyelhető.

2020.11.09-én készített röntgenen látható volt, hogy a gyógyulási folyamat nem indult meg. A törési résben sequesterek sejthetőek. A keret eltávolítása után a lábszár instabil volt, ezért azt visszahelyezték, két sequestert eltávolítottak.



32. kép Közvetlenül a műtét után készített felvétel (CC), 2020.09.20.



33. kép A fixateur eltávolítása után (CC) 2020.11.09.

2020.12.08-án végzett kontrollvizsgálaton a csont gyógyulási folyamata nem indult meg, ezért további vizsgálatok céljából vért vettek az állattól. Az eredmények negatívnak bizonyultak (FeLV, FIV, T4, TSH).

2021.02.26-án került hozzánk a beteg, ekkor lemezes osteosynthesist végeztünk PRF-fel átitatott csontpótlóval, metronidazollal. Cefovecin hatóanyagtartalmú antibiotikus kezelést is előírtunk a betegnek, mely kéthetes időszakot fedett le. Három hét múlva a seb ismét szétnyílt, váladékozott és az implantátum kilátszott. Ekkor újabb 2 hetes hatóidejű cefovecin injekcióval kezeltük, valamint a seb folyamatos kötözését írtuk elő.



34. kép Lemezes osteosynthesis előtt (ML)



35. kép Osteosynthesis, csontpótlás (ML) 2021.02.26.

2021.04.26-án, a lemezes osteosynthesist követően végtagját újra terhelte, azonban a seb továbbra is váladékozott, ezért amikacin injekciós kúrát javasolt a korábbi kezelő állatorvos, a seb folyamatos váladékozása azonban csak az implantátum eltávolítása után szűnt meg teljesen.

Az implantátumot 2022.05.30-án, a behelyezést követően 15 hónappal eltávolítottuk, a csont meggyógyult a folyamatos fertőzésveszély ellenére. Ez az eset is tükrözi a PRP jelentőségét, mivel ez egy nyílt, szeptikus sérülés volt, ennek ellenére sikeresen meggyógyult.



36. kép Implantátum eltávolítása előtt (CC)



37. kép A gyógyult végtag (CC)
2022.05.30.

6. Következtetés

Klinikai vizsgálatok és számos kutatás is igazolta a thrombocytában gazdag készítmények jótékony hatásait a gyógyulási folyamatok során.

Csonttörések során a törött csontvégek egyesítése csak az egyik részét képezi a gyógyulásnak. Abban az esetben, ha nem tudunk megfelelő keringést, perfúziót biztosítani a szervezet számára, akkor a regeneráció ideje elhúzódhat, vagy el is maradhat. Különösen igaz ez nyílt törések, septikus sebek esetében, amikor a szervezetnek nem csak az implantátummal, mint idegen anyaggal kell megküzdenie, de a fertőző kórokozók is hátráltató, súlyosbító tényezőként hathatnak. Amikor a szervezet egy idegen anyagot észlel, igyekszik azt mielőbb körül határolni és kilökní. Ez a lépés negatív hatású is lehet, ha például egy beültetett implantátum körül indul meg.

A thrombocytában gazdag készítmények alkalmazásával indukálhatjuk a szervezet regenerációs képességeit. Egyszerűen kivitelezhető, költséghatékony és biztonságos. A vérlemezkék granulumaiból felszabaduló cytokinek szabályozzák a gyulladás optimális szintjét, a növekedési faktorok pedig indukálják a különböző sejteket, elősegítve ezáltal a gyógyulási folyamatokat. Nem utolsó sorban a baktériumok elleni küzdelemben is nagy szerepük van. A fehérvérsejtek számára könnyebbé teszik, granulumaikból felszabaduló molekulák pedig közvetlenül is képesek a kórokozó sejtmembránjának permeabilitását fokozni, illetve fehérjeszintézisüket befolyásolni.

7. Irodalomjegyzék

1. Diószegi Zoltán. (2007) *Kisállat-ortopédia*. Melania, Budapest
2. Brinker WO, Piermattei DL, Flo GL (2016) *Handbook of small animal orthopedics and fracture repair*, 5th ed. Elsevier, St. Louis (Mo.)
3. Marenzana M, Arnett TR (2013) The Key Role of the Blood Supply to Bone. *Bone Res* 1:203–215. <https://doi.org/10.4248/BR201303001>
4. Karladani AH, Granhed H, Kärrholm J, Styf J (2001) The influence of fracture etiology and type on fracture healing: a review of 104 consecutive tibial shaft fractures. *Arch Orthop Trauma Surg* 121:325–328. <https://doi.org/10.1007/s004020000252>
5. Ono T, Takayanagi H (2017) Osteoimmunology in Bone Fracture Healing. *Curr Osteoporos Rep* 15:367–375. <https://doi.org/10.1007/s11914-017-0381-0>
6. Bissinger O, Kreutzer K, Götz C, Hapfelmeier A, Pautke C, Vogt S, Wexel G, Wolff K-D, Tischer T, Prodingler PM (2016) A biomechanical, micro-computertomographic and histological analysis of the influence of diclofenac and prednisolone on fracture healing in vivo. *BMC Musculoskelet Disord* 17:383. <https://doi.org/10.1186/s12891-016-1241-2>
7. Wu AC, Raggatt LJ, Alexander KA, Pettit AR (2013) Unraveling macrophage contributions to bone repair. *BoneKEY Rep* 2:373. <https://doi.org/10.1038/bonekey.2013.107>
8. Einhorn TA (1998) *The Cell and Molecular Biology of Fracture Healing*. *Clin Orthop Relat Res* 355:S7
9. Vi L, Baht GS, Whetstone H, Ng A, Wei Q, Poon R, Mylvaganam S, Grynepas M, Alman BA (2015) Macrophages Promote Osteoblastic Differentiation In Vivo: Implications in Fracture Repair and Bone Homeostasis. *J Bone Miner Res* 30:1090–1102. <https://doi.org/10.1002/jbmr.2422>
10. Guder C, Gravius S, Burger C, Wirtz DC, Schildberg FA (2020) Osteoimmunology: A Current Update of the Interplay Between Bone and the Immune System. *Front Immunol* 11:
11. Speth C, Löffler J, Krappmann S, Lass-Flörl C, Rambach G (2013) Platelets as immune cells in infectious diseases. *Future Microbiol* 8:1431–1451. <https://doi.org/10.2217/fmb.13.104>
12. Harker LA, Finch CA (1969) Thrombokinetics in man. *J Clin Invest* 48:963–974. <https://doi.org/10.1172/JCI106077>

13. Soares CS, Babo PS, Reis RL, Carvalho PP, Gomes ME (2021) Platelet-Derived Products in Veterinary Medicine: A New Trend or an Effective Therapy? *Trends Biotechnol* 39:225–243. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2020.07.011>
14. Liu Z, Miner JJ, Yago T, Yao L, Lupu F, Xia L, McEver RP (2010) Differential regulation of human and murine P-selectin expression and function in vivo. *J Exp Med* 207:2975–2987. <https://doi.org/10.1084/jem.20101545>
15. Mehta S, Watson JT (2008) Platelet rich concentrate: basic science and current clinical applications. *J Orthop Trauma* 22:432–438. <https://doi.org/10.1097/BOT.0b013e31817e793f>
16. Schultz GS, Wysocki A (2009) Interactions between extracellular matrix and growth factors in wound healing. *Wound Repair Regen Off Publ Wound Heal Soc Eur Tissue Repair Soc* 17:153–162. <https://doi.org/10.1111/j.1524-475X.2009.00466.x>
17. Yeaman MR, Bayer AS (1999) Antimicrobial peptides from platelets. *Drug Resist Updat Rev Comment Antimicrob Anticancer Chemother* 2:116–126. <https://doi.org/10.1054/drup.1999.0069>
18. Zhang W, Guo Y, Kuss M, Shi W, Aldrich AL, Untrauer J, Kielian T, Duan B (2019) Platelet-Rich Plasma for the Treatment of Tissue Infection: Preparation and Clinical Evaluation. *Tissue Eng Part B Rev* 25:225–236. <https://doi.org/10.1089/ten.teb.2018.0309>
19. Tohidnezhad M, Varoga D, Podschun R, Wruck CJ, Seekamp A, Brandenburg L-O, Pufe T, Lippross S (2011) Thrombocytes are effectors of the innate immune system releasing human beta defensin-3. *Injury* 42:682–686. <https://doi.org/10.1016/j.injury.2010.12.010>
20. Lehner G, Linek M, Bond R, Lloyd DH, Prenger-Berninghoff E, Thom N, Straube I, Verheyen K, Loeffler A (2014) Case–control risk factor study of methicillin-resistant *Staphylococcus pseudintermedius* (MRSP) infection in dogs and cats in Germany. *Vet Microbiol* 168:154–160. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2013.10.023>
21. Morris J, Kelly N, Elliott L, Grant A, Wilkinson M, Hazratwala K, McEwen P (2019) Evaluation of Bacteriophage Anti-Biofilm Activity for Potential Control of Orthopedic Implant-Related Infections Caused by *Staphylococcus aureus*. *Surg Infect* 20:16–24. <https://doi.org/10.1089/sur.2018.135>
22. Edelblute CM, Donate AL, Hargrave BY, Heller LC (2015) Human platelet gel supernatant inactivates opportunistic wound pathogens on skin. *Platelets* 26:13–16. <https://doi.org/10.3109/09537104.2013.863859>

23. Alsousou J, Thompson M, Hulley P, Noble A, Willett K (2009) The biology of platelet-rich plasma and its application in trauma and orthopaedic surgery: A REVIEW OF THE LITERATURE. *J Bone Joint Surg Br* 91-B:987–996. <https://doi.org/10.1302/0301-620x.91b8.22546>
24. Weibrich G, Hansen T, Kleis W, Buch R, Hitzler WE (2004) Effect of platelet concentration in platelet-rich plasma on peri-implant bone regeneration. *Bone* 34:665–671. <https://doi.org/10.1016/j.bone.2003.12.010>
25. Schliephake H (2002) Bone growth factors in maxillofacial skeletal reconstruction. *Int J Oral Maxillofac Surg* 31:469–484. <https://doi.org/10.1054/ijom.2002.0244>
26. Anitua E, Andia I, Ardanza B, Nurden P, Nurden AT (2004) Autologous platelets as a source of proteins for healing and tissue regeneration. *Thromb Haemost* 91:4–15. <https://doi.org/10.1160/TH03-07-0440>
27. Colston J, Atkins B (2018) Bone and joint infection. *Clin Med* 18:150–154. <https://doi.org/10.7861/clinmedicine.18-2-150>
28. Li G-Y, Yin J-M, Ding H, Jia W-T, Zhang C-Q (2013) Efficacy of leukocyte- and platelet-rich plasma gel (L-PRP gel) in treating osteomyelitis in a rabbit model. *J Orthop Res* 31:949–956. <https://doi.org/10.1002/jor.22299>
29. Hoaglin DR, Lines GK (2013) Prevention of Localized Osteitis in Mandibular Third-Molar Sites Using Platelet-Rich Fibrin. *Int J Dent* 2013:e875380. <https://doi.org/10.1155/2013/875380>
30. Andia I, Maffulli N (2013) Platelet-rich plasma for managing pain and inflammation in osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* 9:721–730. <https://doi.org/10.1038/nrrheum.2013.141>
31. Zhang J, Middleton KK, Fu FH, Im H-J, Wang JH-C (2013) HGF mediates the anti-inflammatory effects of PRP on injured tendons. *PloS One* 8:e67303. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0067303>
32. Egidi MG, D’Alessandro A, Mandarello G, Zolla L (2010) Troubleshooting in platelet storage temperature and new perspectives through proteomics. *Blood Transfus Trasfus Sangue* 8 Suppl 3:s73-81. <https://doi.org/10.2450/2010.012S>
33. Etulain J, Mena HA, Meiss RP, Frechtel G, Gutt S, Negrotto S, Schattner M (2018) An optimised protocol for platelet-rich plasma preparation to improve its angiogenic and regenerative properties. *Sci Rep* 8:1513. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-19419-6>
34. Yin W, Xu H, Sheng J, Zhu Z, Jin D, Hsu P, Xie X, Zhang C (2017) Optimization of pure platelet-rich plasma preparation: A comparative study of pure platelet-rich plasma

- obtained using different centrifugal conditions in a single-donor model. *Exp Ther Med* 14:2060–2070. <https://doi.org/10.3892/etm.2017.4726>
35. Shin H-S, Woo H-M, Kang B-J (2017) Optimisation of a double-centrifugation method for preparation of canine platelet-rich plasma. *BMC Vet Res* 13:198. <https://doi.org/10.1186/s12917-017-1123-3>
 36. Davis VL, Abukabda AB, Radio NM, Witt-Enderby PA, Clafshenkel WP, Cairone JV, Rutkowski JL (2014) Platelet-rich preparations to improve healing. Part II: platelet activation and enrichment, leukocyte inclusion, and other selection criteria. *J Oral Implantol* 40:511–521. <https://doi.org/10.1563/AAID-JOI-D-12-00106>
 37. Simonpieri A, Del Corso M, Sammartino G, Dohan Ehrenfest DM (2009) The Relevance of Choukroun's Platelet-Rich Fibrin and Metronidazole During Complex Maxillary Rehabilitations Using Bone Allograft. Part I: A New Grafting Protocol. *Implant Dent* 18:102. <https://doi.org/10.1097/ID.0b013e318198cf00>



Diplomamunka konzultációs lap állatorvostan hallgatók részére

A hallgató neve: NEHETH VERONIKA
 Neptun-kódja: GMSJQS
 A témavezető neve és beosztása: DR. IPOLYI TAMÁS ... KLINIKAI ÁLLATORVOS
 Tanszék: SEBÉSZETI TANSZÉK
 A diplomadolgozat címe: SEJTDEGENERATÍV TERÁPIA A KISÁLLAT-
 GYÓGYÁSZATBAN

Konzultáció - 1. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	02.	15.	adatok	
2.	2023	02.	24.	Radikológiai konz.	
3.	2023	03.	08.	Radikológiai konz.	
4.	2023	04.	06.	Radikológiai konz.	
5.	2023	04.	28.	Radikológiai konz.	



Diplomamunka konzultáció érdemjegy az első félév végén: felos 5

Konzultáció - 2. félév

	Időpont			Téma/Témavezető megjegyzése	Témavezető aláírása
	Év	Hó	Nap		
1.	2023	09.	06.	Radikológiai konz.	
2.	2023	09.	20.	Radikológiai konz.	
3.	2023	10.	04.	Radikológiai konz.	
4.	2023	10.	12.	Radikológiai konz.	
5.	2023	10.	31.	Radikológiai konz.	



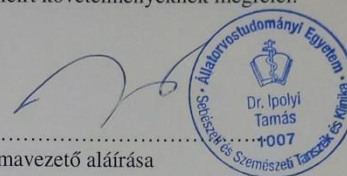
Diplomamunka védés érdemjegy a második félév (11. szemeszter) végén: felos 5

A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!



A diplomamunka - a szakra vonatkozóan - a Tanulmányi- és Vizsgaszabályzatban, valamint az Útmutató a szakdolgozatok/diplomamunkák készítéséhez című mellékletében leírt követelményeknek megfelel.

A diplomamunka befogadható, védésre alkalmasnak találtam.



témavezető aláírása

Hallgató aláírása: *Németh Veronika*

Tanszéki előadó aláírása: *Erdős* Átvétel dátuma: *2023.11.03.*



A nyomtatvány a hallgatói és a tanszéki ügyintézői aláírás, valamint az átvétel dátuma nélkül nem érvényes. A konzultációs lap a diplomamunka mellékletét képezi!