

Fogeredetű őssejtek életképességének, morfológiájának és differenciálódásának vizsgálata szövetámaszok jelenlétében

Doktori Tézisek

Dr. Hegedűs Orsolya

Semmelweis Egyetem
Klinikai orvostudományok Doktori Iskola
Fogorvostudományok program



Témavezető: Dr. Varga Gábor DSc., egyetemi tanár

Hivatalos bírálók: Dr. Buzás Krisztina Ph.D., tud. főmunkatárs
Dr. Hegyesi Hargita Ph.D., egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: †Dr. Fábián Tibor CSc., egyetemi tanár

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Rakonczay Zoltán DSc., egyetemi tanár

†Dr. Darvas Zsuzsanna Ph.D., egyetemi docens

Budapest
2020

1. BEVEZETÉS

Az elhalt vagy elvesztett szövetek pótlása korunk egyik legfontosabb kérdésköre az orvostudományban. Ahhoz, hogy az eredetivel pontosan megegyező szöveti struktúrát hozzunk létre, számos, meglehetősen sokrétű kémiai és biológiai szempontot kell figyelembe venni. Ezen szempontok feltárásával és kihasználásával foglalkozik az úgynevezett *tissue engineering* (szövetépítés) technika, amely korábban a bioanyag-fejlesztés részterülete volt, mára már azonban teljesen külön területté nőtte ki magát a regeneratív medicinán belül. A szövetépítés lényege, hogy sejtek, szövevények (*scaffold*-ok) és bioaktív molekulák olyan kombinációját hozzuk létre, amely által egészséges, funkcionáló szövet jöhet létre.

A szövetépítés alappillérei az őssejtek, amelyek korlátlan önmegújító képességgel rendelkeznek és képesek differenciált utódsejtek létrehozására. Őssejteket izolálhatunk felnőtt vagy embrionális szövetekből is, utóbbiak felhasználása azonban etikai és technikai problémákat vet fel. A regeneratív kutatások középpontjában ezért ma olyan mezenchimális őssejtek állnak, amelyek felnőtt szervezetben is megtalálhatóak. Ilyen multipotens (az ivarsejteken kívül bármilyen felnőtt szöveti sejt létrehozására képes) őssejt-csoportot elsőnek a csontvelőben fedeztek fel, azóta azonban több felnőtt szövetből, például fog-asszociált szövetekből is sikerült őket izolálni. Utóbbiak nagy előnye többek között, hogy viszonylag könnyen és nagy számban hozzáférhetőek, magas proliferációs aktivitással rendelkeznek és számos sejtípus differenciálható belőlük. Fog eredetű őssejt izolálható a fogpulpából, az apicalis papillából, a fogzacskóból vagy a periodontális ligamentumból is. Ezen sejtek tulajdonságainak, viselkedésének pontos feltárása, vagyis a sejtek karakterizálása nagyon fontos, hiszen ezen ismeretek határozzák meg, hogy a későbbiekben alkalmazhatóak lehetnek-e a regeneratív terápiában, például a fogorvoslás területén.

A szervezetben a sejtek között egy őket támogató hálózat, az extracelluláris mátrix (ECM) található, amely szénhidrátokból és fehérjékből épül fel. A szövetépítés egyik kritikus pontja olyan szövevények létrehozása, amelyek nagymértékű hasonlóságot mutatnak a természetes ECM-mel és ezáltal képesek támogatni a sejtek természetes működését. Az ideális szövevénynek számos kritériumnak kell megfelelnie: lehetővé kell tennie a sejtek kitapadását, migrációját, szaporodását, differenciálódását. Elő kell segítenie a növekedési faktorok megfelelő helyre való szállítását, valamint az optimális tápanyag- és oxigénellátást, ezen felül biokompatibilisnek, biodegradábilisnek kell lennie. Mivel a különböző sejtípusok

eltérő környezetet részesítenek előnyben szaporodásuk illetve differenciálódásuk során, ezért fontos a szövetámasz tulajdonságainak eszerint történő optimalizálása is.

Jelenleg az irodalomban található szövetámaszok alapvető összetevője valamilyen polimer molekula. Mivel a természetes ECM nagyrészt különböző polimerek (szénhidrátok, poliaminosavak, fehérjék stb.) háromdimenziós hálózatából épül fel, ezért a poli(aminosav) alapú hidrogélek ígéretesek lehetnek szövetámaszként. Mesterséges poliaminosav alapú gélek hátránya, hogy előállításuk nehézkes és drága lehet, emiatt szövetámaszként való alkalmazásukra kevés példát találunk az irodalomban. Kifejezetten fog eredetű őssejtekre fókuszálva poliaszparaginsav alapú hidrogélek részvételével pedig kizárólag munkacsoportunk végzett kísérleteket.

Doktori kutatómunkám során ezért különböző mechanikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező poliaszparaginsav alapú hidrogél szövetámaszok biokompatibilitását vizsgáltam, foggyökérhártya eredetű őssejtek használatával. Megfigyeltem különböző keresztkötők (cisztamin, diaminobután, lizin) és a merevség módosulásának hatását a sejtek morfológiájára, életképességére valamint differenciációs potenciáljára *in vitro*. Megvizsgáltam ezen kívül a tiol-csoportok, valamint a dopamin tartalom változtatásának hatását is a sejtek proliferációjára, migrációjára, illetve differenciációjára. Munkám során célom volt a poliaminosav alapú gélek azon kritikus paramétereinek feltárása és optimalizálása, melyek ismeretében egy, a regeneratív medicinában is alkalmazható szövetámasz hozható létre.

2. CÉLKITŰZÉS

Kutatómunkám során különböző fizikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező, poliaszparaginsav alapú hidrogélek biokompatibilitását vizsgáltam *in vitro*, foggyökérhártya eredetű őssejtek használatával. A munkám során célul tűztem ki:

1. Humán foggyökérhártya eredetű mezenchimális őssejtek tenyésztését, morfológiájának és életképességének vizsgálatát **cisztamin és diaminobután** keresztkötőket tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken.
2. Foggyökérhártya eredetű őssejtek tenyésztését, morfológiájának és életképességének vizsgálatát **különböző tiol-csoport mennyiséget** tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken.

3. Foggyökérhártya eredetű őssejtek **oszteogén differenciációs** potenciáljának vizsgálatát különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken
4. Foggyökérhártya eredetű őssejtek tenyésztését, morfológiájának, életképességének vizsgálatát **lizin és cisztamin** keresztkötőket tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken.
5. Foggyökérhártya eredetű őssejtek tenyésztését, morfológiájának, életképességének vizsgálatát **dopamint tartalmazó** poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken.

Munkám során a végső cél egy olyan hidrogél létrehozása, amely ideális fizikai-kémiai tulajdonságokkal bír a foggyökérhártya eredetű őssejtek számára, és a későbbiekben potenciálisan alkalmazható lehet szövettámaszként a regeneratív terápiában

3. MÓDSZEREK

3.1. Alkalmazott hidrogélek

A kísérletek során különböző fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező, poli(aszparaginsav) (PASP) alapú hidrogéleket alkalmaztunk, amelyeket a Prof. Dr. Zrínyi Miklós által vezetett Nanokémiai Kutatócsoport (Semmelweis Egyetem, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet) biztosított számunkra.

Kísérletünkben a keresztkötőként alkalmazott anyagok a diaminobután (DAB), a cisztamin (CYS), a lizin (LYS) voltak, ezen felül dopamint (DOPA) tartalmazó géleket is szintetizáltunk. A cisztamin diszulfid hídjainak felszakításával ciszteamin (CYSE) keletkezik, így szabad tiolcsoportok jönnek létre a polimer gélben. A keresztkötés foka, ami a keresztkötő és a monomerek molarányát adja meg, számszerűen (vagy pedig, a lizin tartalmú gélek esetében százalékosan) jelenik meg a gélek elnevezésében. Az 1/20-as szám például minden huszadik monomeren jelent egy keresztkötőt. Minél kisebb ez a szám, annál kevesebb keresztkötőt tartalmaz a gél, ez pedig a fizikai tulajdonságokra is kihat: több keresztkötővel merevebb, kevesebb keresztkötővel lágyabb géleket kaptunk. A térhálósító molekulák kémiai szerkezetének, valamint mennyiségének változtatásával elősegíthető a sejtek bejutása a polimer mátrixba, így háromdimenziós sejtenyésztés valósítható meg. Célunk olyan kémiai szerkezet kialakítása volt, amely ezt a legnagyobb mértékben segíti elő.

A felhasznált gélek listája:

CYS és DAB keresztkötött gélek: DAB 1/20, CYS 1/20, CYS-DAB 1/20, CYSE-DAB 1/20, DAB 1/40, CYS 1/40, CYS-DAB 1/40, CYSE-DAB 1/40

DAB és tiol csoport tartalmú gélek: CYSE 1/2, CYSE 1/5, CYSE 1/10, CYSE 1/20, CYSE 1/40, CYSE 1/80

CYS és LYS keresztkötött gélek: CYS 0% -LYS, CYS 20% -LYS, CYS 40% -LYS, CYS 60% -LYS, CYS 80% -LYS, CYS 100% -LYS, CYSE 20% -LYS

Dopamin tartalmú gélek : DOPA 1/10 - CYSE-DAB, DOPA 1/20 - CYSE-DAB

A korábban kidolgozott protokoll alapján a kísérletek megkezdése előtt minden esetben előkezeltük a géleket: 3 órán keresztül tenyésztő tápoldatban történt áztatás, amelyet 10 perc szárítás majd egy óra sterilizálás követett UV-fény alatt. Egy kísérlet során 7-8 különböző fizikai vagy kémiai tulajdonsággal rendelkező gélmintát vizsgáltunk. Egy mintával 5 párhuzamos kísérletet végeztünk.

3.2. Sejtek izolálása és tenyésztése

A foggyökérhártya eredetű őssejteket humán bölcsességfogakból izoláltuk, melyekből tenyészeteket hoztunk létre és tartottunk fent kutatócsoportunk korábban publikált protokollja szerint. A humán impaktált bölcsességfogakat a Semmelweis Egyetem klinikai részlegei (Orális Diagnosztikai Tanszék, Parodontológiai Klinika) biztosították számunkra. A mintagyűjtés a betegek írásos beleegyezésével, az Egyetem etikai bizottsága által jóváhagyott protokoll szerint történt. A fogeltávolítást követően a fogakat tenyésztő tápoldatba helyeztük, majd az átszállítás után azonnal megkezdjük a szövetek izolálását. A sejteket standard körülmények között (100% páratartalom, 37 °C, 5% CO₂-dal dúsított levegőn) tartottuk α MEM alapú tápoldatban (2 mM glutamin, 100 U/ml penicillin, 100 μ g/ml sztreptomycin és 10% főtális borjú szérum).

3.3. A sejtek vizsgálata a hidrogéleken

A fáziskontraszt mikroszkóppal készített képeken megfigyeltük a sejtek morfológiáját, valamint növekedésük mértékét. A képek 20x objektív segítségével készültek CCD kamera és Scion image szoftver segítségével.

A sejtek életképességét WST-1 reagens segítségével határoztuk meg, amely a mitokondriális dehidrogenáz enzim aktivitásából adódó színreakción alapuló módszer. 2 óra inkubációs időt követően megfigyeltük az oldatok színváltozását, amelyet *microplate reader* segítségével kvantifikáltunk. Az abszorbancia mérés 450 nm-en történt, míg a referencia hullámhossz 655 nm volt.

A kétfoton mikroszkóp segítségével láthatóvá tehető a sejtek vertikális irányú növekedése, vagyis, hogy képesek-e belenőni a gélek belsejébe, ehhez Vybrant DiD fluoreszcens festéket használtunk.

Az osztogén differenciációt ALP (alkalikus foszfatáz) aktivitás-mérés segítségével mutattuk ki a harmadik, a hetedik és a tizennegyedik napon. Az osztogén α MEM alapú médium 1% főtális borjú szérumot, 100 U/ml penicillint, 100 mg/ml sztreptomicint, 2 mM L-glutamint, 10^{-8} M dexametazont, 50 mg/ml L-aszorbinsav-2-foszfátot és 10 mmol/l β -glicerofoszfátot tartalmazott. Az inkubációs idő leteltével a p-nitrofenilfoszfát (pNPP) \rightarrow p-nitrofenol (pNP) reakció sárga színű végtermékének abszorbanciáját *microplate reader* segítségével mértük, 405 nm hullámhosszon.

Az életképességi vizsgálat és az ALP aktivitás mérések során kapott adatok átlagértékét számítottuk ki. A statisztikai értékelés STATISTICA 10 szoftver segítségével történt, Kruskal-Wallis nem-parametrikus ANOVA alkalmazásával, amelyet median teszt követett. A különbségeket $p < 0.05$ esetén vettük szignifikánsnak.

4. EREDMÉNYEK

4.1. Cisztamin és diaminobután keresztkötésű gélek

A PDLSC-k kiültetését követő 1. és 3. nap után fáziskontraszt mikroszkóp segítségével figyeltük meg a kiültetett sejtek morfológiáját és növekedését 8-féle, különböző fizikai és kémiai tulajdonsággal rendelkező PASP-alapú hidrogélen.

Egy és három nap tenyésztés után is a merevebb (1/20-as keresztkötési fokkal rendelkező), DAB keresztkötésű géleken, valamint a tiol-csoportokat tartalmazó (CYSE jelű) géleken figyelhettünk meg egészséges, fibroblaszt morfológiájú sejteket, számuk a merevebb, tiol tartalmú géleken látszódot a legmagasabbnak. Látható volt egy enyhe, csoport-formálási tendencia is.

A gélek által teremtett környezet letapadást és szaporodást elősegítő tulajdonságát kvantitatív vizsgálat segítségével is alátámasztottuk, a kiültetett sejtek életképességének mérésével. Egy nap és három nap inkubáció után a merevebb, tiol tartalmú gélen (CYSE-DAB 1/20) mértük a legmagasabb életképességeket. Kiemelkedőbb életképességi mutatót mértünk továbbá a merevebb, DAB keresztkötésű, valamint a lágyabb, tiol-csoport tartalmú géleken is. Az összes többi gélen alacsonyabb volt a kiültetett sejtek életképességi mutatója, amely összecseng a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat során megfigyelt eredményekkel.

A kétfoton mikroszkópos vizsgálat eredménye korrelált a korábban kapott eredményekkel. A legtöbb sejtet ebben az esetben is a tiol tartalmú géleken figyelhettük meg. Az őssejtek a géleken különböző méretű szigetekbe rendeződve voltak láthatóak, a sejteket nem lehetett egymástól elkülöníteni. A sejtcsoportok között helyenként nyúlványok is látszottak, ami sejtközi kommunikációra utal. Jól megfigyelhető volt ezen kívül a gélek zöld autofluoreszcenciája, amely bizonyítja, hogy a gép a gél belsejében készült, tehát a sejtek képesek voltak behatolni a gélekbe. Ezen kísérletek alapján a tiol tartalmú, valamint a merevebb DAB keresztkötésű gélek támogatják legjobban a sejtek megtapadását, valamint túlélését és szaporodását is.

Mivel a két mérési időpont között szignifikáns életképesség-növekedés nem volt megfigyelhető, illetve csökkenést is tapasztaltunk, ezért a tendencia felderítésére hosszabb távú kísérletek elvégzése mellett döntöttünk. A három legjobb eredményt elérő, tehát a sejtek túlélését és szaporodását leginkább támogató géltípussal dolgoztunk tovább (DAB 1/20, CYSE DAB 1/20 és CYSE-DAB 1/40), ennek során 1, 3, 7 és 14 nap után vizsgáltuk a sejtek életképességét és morfológiáját.

Az első három nap folyamán tapasztaltak megegyeztek a korábbi kísérleteink eredményeivel: a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat során a sejtek egészséges, fibroblaszt morfológiát mutattak mindhárom gél esetében. 7 nap után az összes gél esetében meglehetősen nagy számú egészséges, orsó alakú PDLSC került a látótérbe. A tiol tartalmú géleken ezen kísérlet során is csoportalakítási tendenciát mutattak a sejtek. 14 nap után hasonlóan nagyszámú, szoros csoportokba rendeződött sejtet figyeltünk meg a merevebb géleken, míg lágyabb géleken továbbra is különálló, orsó alakú sejtek voltak láthatóak.

Az életképesség-vizsgálat során az első napon a merevebb, tiol tartalmú gélen szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a másik két gélhez képest. A 3. napon ismét megfigyeltük a mutatók csökkenését, azonban az eredmények a hetedik napra újra növekvő tendenciát kezdtek mutatni, így kimondhatjuk, hogy a csökkenés átmeneti volt. A PDL tenyészetek heterogén populációt alkotnak, s a gélek mechanikai tulajdonságai csak egy bizonyos szubpopuláció proliferációját támogatják: az életképesség átmeneti csökkenése, majd hosszabb távú növekedése ezen populáció szelektív felszaporodására utalhat.

A 14. napra további életképesség növekedést figyelhettünk meg a merevebb gélek esetében, amely a DAB-keresztkötött gélnél volt statisztikailag is szignifikáns. Ekkorra már a merevebb géleken tenyésztett sejtek mutatták a magasabb életképességi mutatót, a különbség azonban nem volt szignifikáns a három gél esetében.

A kétfoton mikroszkóppal készített képeken 7 és 14 nap után is megfigyelhetőek voltak a gélek belseje felé növekvő sejtek. A megfelelő magasságokban készített fotók integrálásával háromdimenziós ún. z-stack képek készültek, amellyel sokkal pontosabban mutathattuk ki a sejtek vertikális irányú növekedését. A sejtek nem csak a gél felszínén szaporodtak, hanem (feltehetően enzimatisz folyamatok révén) vertikálisan, a gélek belseje felé is növekedtek.

A kísérletek alapján úgy tűnik, hogy merevebb és lágyab gél-változatok közül mindkét nap a merevebb gélek, illetve a tiol-csoportokat tartalmazó gélek támogatták jobban a sejtek kitapadását és proliferációját. Az irodalomban számos kísérlet elsősorban a gélek mechanikai tulajdonságait vizsgálja, ugyanis a letapadás során a sejtek mechanikus visszajelzést kapnak a környezetükből mechanotranszdukció útján, amire a citoszkeleton és a morfológia megfelelő változásával reagálnak. Bizonyos kutatások szerint a szövettámasz merevsége meghatározhatja az őssejtvonal-specifikációt. Amikor a neurogén differenciálódás a cél, a lágyabb gélek használata javasolt (0,1-1 kPa), a myogén irányú differenciáltatáskor a közepes merevség (8 és 17 kPa) az optimális, míg az oszteogén irányú differenciáltatásra a merev mátrixok (25-40 kPa) az igazán alkalmasak. Ezzel összhangban az általunk használt gélek paraméterei a következők: lágyabb gélek (1/40 keresztükötő arány) rugalmassági modulusa 7,2-10,5 kPa, míg a merevebb géleké (1/20 keresztükötő arány) 55,3 és 66 kPa közötti értéket vett fel.

4.2. Különbözö tiol-csoport mennyiségeket tartalmazó gélek vizsgálata

Az előző kísérletekből látható volt, hogy a tiol-csoportok mennyiségének változtatása hatással van a sejtek letapadására és növekedésére, ezért a következő kísérletsorozatban 6-féle, eltérö tiol-csoport mennyiséggel rendelkező gélt vizsgáltam. A legalacsonyabb tiol tartalmú gélnek (CYSE 1/80) csak minden nyolevanadik monomerje tartalmazott tiol-csoportot, a legmagasabb tiol tartalmú gél (CYSE 1/2) esetében minden második monomeren volt található ilyen csoport.

Az első napon készített fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok során kimutattuk, hogy mindegyik tiol tartalmú gélen képesek voltak megtapadni és szaporodni a sejtek. A PDLSC-k nyúlványos, orsó alakot vettek fel, elenyészö mennyiségben kerültek csak a látótérbe kerek sejtek vagy sejtmardványok. A harmadik napra a sejtek száma növekedett, és úgy tűnt, a magasabb tiol tartalmú gélek jobban támogatják a sejtek proliferációját, ezeken ugyanis több sejtet figyelhattunk meg, mint az alacsonyabb tiol tartalmú géleken. A hetedik napra a legmagasabb tiol tartalmú gélen a sejtek konfluens *monolayer*-t alkottak, vagyis egy rétegben teljesen benöttek a gélt és elnyúltabb alakot vettek fel. A második legmagasabb tiol tartalmú gélen szubkonfluens lett a tenyészet. A 14. napra a két legmagasabb tiol tartalmú gélen

konfluens monolayert alkottak a sejtek. A többi gélen is nagy mennyiségű, egészséges sejtet figyelhettünk meg, a tiol-mennyiség csökkenésével csökkenő mértékben.

Az életképesség-vizsgálat során, a mikroszkópos vizsgálatokkal összhangban a legnagyobb tiol-csoport tartalmú gélek mutatták a legmagasabb értékeket, míg a tiol-csoportok számának csökkentésével az életképesség is csökkenő tendenciát mutatott. Referencia-gélként a korábbi kísérletekben használt CYSE-DAB 1/20-at használtuk. Ehhez a gélhez képest szignifikánsan magasabb életképességet mutattak a két legmagasabb (1/2 és 1/5) tiol tartalmú gélen tenyésztett sejtek. A harmadik napon ezen kísérlet esetében is megfigyelhető volt egy degresszió, ami azonban ezúttal is csak ideiglenesen állt fent. A hetedik napra mindegyik gélen magasabb életképességet mértünk a harmadik naphoz képest, ez különösen látványos növekedés volt a CYSE 1/2 esetében. A 7. és 14. nap közti növekedés majdnem minden gél esetében szignifikáns volt az előző mérési időponthoz képest. A 14. napra csak a legmagasabb tiol tartalmú gél mutatott szignifikánsan magasabb értéket a referenciagélhez képest.

A kétfoton mikroszkópos vizsgálat során nagy mennyiségű sejtet figyeltünk meg a magas tiol tartalmú géleken, mindhárom mérési időpontban. A z-stack képek segítségével láthatóvá tettük a sejtek vertikális irányú migrációját a gélek belsejébe a 14. napon.

Ebből az eredményből világosan látszik, hogy a szabad tiol-csoportok mennyisége, amennyiben meghaladja a gélekben az 1/10 arányt, nem csak átmeneti, hanem hosszabb távú pozitív hatással is bír a sejtek proliferációjára és migrációs képességére. A fent említett megfigyelések oka lehet, hogy a polimer mátrix szabad tiol-csoportjai képesek kapcsolódni sejtmembránban található L-cisztein szabad tiol-csoportjaihoz. A sejtmembrán tiol tartalmú L-ciszteinjén keresztül számos biológiai folyamat befolyásolható, például a gén transzkripció, transláció valamint a sejtanyagcsere is. A gélek tioltartalmának növekedése valószínűleg ilyen módon képesek pozitívan befolyásolni a sejtek adhézióját és proliferációját.

4.3. Oszteogén differenciáció vizsgálata

Számos vizsgálat bizonyította, hogy a PDL sejtek képesek oszteogén irányú differenciációra, és korábbi kísérletek kapcsán felmerült annak a lehetősége, hogy bizonyos géltípusok támogathatják ezt a hajlamot. Emiatt 4 géllal, amik kiemelkedő eredményt produkáltak az előző vizsgálatok során (a DAB 1/20, és 3 tiol tartalmú gél (a CYSE 1/2, 1/5 és 1/20 gél), további kísérleteket végeztünk az oszteogén hajlam felderítésére.

A hetedik napon mindkét magas tiol tartalmú gél esetében nagy mennyiségű, egészséges, orsó morfológiát mutató sejtet figyeltünk meg, számos nyúlvánnyal. A kontroll és

az oszteogén tápoldatot kapott csoport között ezen a napon még nem tudunk jelentős különbséget kimutatni. 14. napon azonban a kontroll csoport sejteji elnyújtottabb orsó morfológiát mutattak, a sejtek egymástól elkülönülve helyezkedtek el. Ezzel szemben az oszteogén csoportban megfigyelhető volt egy csoportalakítási tendencia, ezekben a csomókban a sejtek sűrűn helyezkedtek el, és tömörebb morfológiát mutattak.

A kétfoton-mikroszkópos vizsgálat során már a harmadik napon láthattuk, hogy mindkét gél esetében nagyon nagy mennyiségű sejt volt képes megtapadni, illetve szaporodni a gélek felszínén. Hasonlóan nagy mennyiségű sejtet figyelhettünk meg a további napokon is, releváns különbséget azonban nem tapasztaltunk a csoportok között. A z-stack fotókon továbbá láthatóvá tettük a 14. napon a sejtek migrációját gélekbe.

Az oszteogén differenciáció folyamatának kvantifikálása céljából alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérést is végeztünk. Ennek során már az első két mérési időpontban (vagyis 3 és 7 nap után) különbséget tapasztaltunk a gélek között. DAB 1/20 gélen tenyésztett sejtek minden csoportban minimális oszteogén hajlamot mutattak, míg a tiol tartalmú gélek mindegyike esetében mérhető volt az ALP aktivitás az oszteogén csoportban. A CYSE 1/2 gél érdekessége volt, hogy esetében mind a kontroll, mind az oszteogén csoportban magasabb értékeket kaptunk, vagyis nemcsak indukált, hanem spontán aktivitás is kimutatásra került ezen a napon.

A 14. napon a DAB 1/20 esetében egyik kísérleti csoportban sem mértünk oszteogén aktivitást. A tiol tartalmú gélek esetében azonban a hetedik naphoz képest további értéknövekedést figyelhettünk meg az oszteogén csoportokban. A legmagasabb ALP aktivitás értéket ismét a CYSE 1/2 gél mutatta, míg a másik két gél típus között nem találtunk szignifikáns különbséget. Úgy tűnik tehát, hogy a gélek tiol-csoport tartalom a sejtek életképességén és letapadásán kívül hatással bír az oszteogén differenciációra is.

A gélek tiol tartalmának oszteogén differenciációt elősegítő hatása a szabad tiol-csoportok sejtmembrán-proteinekkal való kapcsolódásán alapul. Mint említettem, a sejtmembránban számos olyan protein található, amely L-ciszteint tartalmaz. A L-ciszteinen keresztül – mivel képes diszulfid kötések kialakítására – redox-vezérelt konformációs változás indul el a membránproteinekben, befolyásolva a sejt proliferációjához, differenciálódásához vezető jelkaskádókat. Hogy PDL őssejtek esetében pontosan melyik jelátviteli útvonal vezet oszteogén differenciációhoz, arról több tanulmány is született. Ezek alapján feltételezhető, hogy a folyamatban szerepet kap a cisztationin-g-liáz enzim által létrehozott endogén hidrogén-szulfid, a Wnt/ β -katenin, valamint a p38-MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonalon keresztül.

4.4. Cisztamin és lizin keresztkötésű gélek

A DAB keresztkötés helyett ebben a kísérletsorozatban lizint alkalmaztunk, mivel utóbbi – mint természetes aminosav - jobb tulajdonságokkal rendelkezik biodegradabilitás szempontjából. A gélek ebben a kísérletsorozatban minden esetben annyi keresztkötőt tartalmaztak összesen, mint az előző kísérletek merevebb géljei, csak különböző arányban keveredett bennünk a lizin és a cisztamin. A gélek nevében a lizin keresztkötés fokát százalékosan jelöltük.

A legtöbb gél esetében mindhárom napon hasonló morfológiát mutattak a sejtek: gömb alakú, a letapadási folyamat elejére jellemző alakot vettek fel, csak kisebb mennyiségben lehetett észrevenni az orsó alak felé törekvő, kisebb nyúlványokat növesztő sejteket. Az utóbbi alakot mutató legtöbb sejt a kevesebb lizint tartalmazó géleken volt felfedezhető.

Az életképességi vizsgálat eredményei szerint az első napon a CYS 100% -LYS gélen tenyésztett sejtek esetében mértük a legmagasabb életképességi mutatót, amely összhangban van a fáziskontraszt mikroszkópos analízis eredményeivel: ez a gél lizint nem tartalmaz, csak redox érzékeny cisztamint. A géltípusok többségénél az első és a harmadik nap között enyhe életképesség-növekedést figyeltünk meg. Az életképességi értékek alapján valószínűnek tűnik, hogy a 60-80% LYS arány vezet a legnagyobb proliferációs aktivitáshoz PDL sejtek esetében.

A kétfoton mikroszkóppal a harmadik napon készített fotókon láthattuk, hogy habár kevés, specifikus morfológiájú sejt volt csak a látótérben, ezek – mivel látható volt körülöttük a gél zöld autofluoreszcenciája – képesek voltak penetrálni a gélmátrixba. Az egészséges morfológiát mutató sejtek mennyisége a CYS/LYS aránnyal együtt változott, minél magasabb a CYS aránya, annál több sejtet láttunk 3 nap után a géleken. A legnagyobb mennyiségű sejtet a CYS 100%-LYS gélen figyeltünk meg, ami korrelál a korábbi eredményeinkkel.

Habár az irodalomban találunk példát lizin tartalmú szövettámaszok sikeres in vitro alkalmazására, összességében megállapítottuk, hogy sejtek tehát csak korlátozott mértékben tudnak megtapadni és szaporodni a lizin tartalmú hidrogéleken, így további vizsgálatot nem végeztünk velük. Ennek az oka valószínűleg a gélek gyengébb mechanikai tulajdonságaiban és kisebb stabilitásában keresendő, amely nagy hatással van a sejtek letapadási képességére, mint azt az előző fejezetekben már részletesen kifejtettem.

4.5. Dopamin tartalmú gélek

Ebben a kísérletsorozatban 2-féle, eltérő mennyiségű dopamint tartalmazó gélt vizsgáltunk 14 napon keresztül, amelyek CYSE-t és DAB-ot tartalmaztak keresztkötként. Kontrollként a CYSE-DAB 1/20 gélt alkalmaztuk, amely nem tartalmaz dopamint.

A sejtek egy nap után gyakorlatilag teljesen benőtték a gélfelszint az alacsonyabb dopamin tartalmú gél esetében. A sejtek egészséges, fibroblaszt morfológiát mutattak, proliferációjuk nagyon felgyorsult. A magasabb dopamin tartalmú gél hátrányos mechanikai tulajdonságokkal rendelkezett, rigidsége és törekenysége nehezítette a kezelését, és a sejtek sem tapadtak meg rajta egy nap alatt. 3 nap után az alacsonyabb dopamin tartalmú gél (DOPA 1/20) esetében konfluenssé vált a tenyészet, míg a magas dopamin tartalmú gélen (DOPA 1/10) továbbra is csak nagyon kevés sejt volt megfigyelhető. 7 és 14 nap után a fent leírt tendencia folytatódott: a legmagasabb sejtszámot az alacsonyabb dopamin tartalmú gélen figyelhettük meg, amely enyhén jobb eredményeket mutatott a kontroll, dopamint nem tartalmazó gélnél is.

Az életképesség-vizsgálat során az első napon a legmagasabb életképességi mutatót az alacsonyabb dopamin tartalmú gél esetében mértük, amely szignifikánsan magasabb volt mind a kontroll, mint a DOPA 1/10 gélhez képest. A harmadik napon mindhárom gél esetében csökkent az érték. Ezen a napon is a DOPA 1/20 mutatta a legmagasabb életképességi mutatót. Hasonló tendenciát láttunk a hetedik és 14. napon is, az utolsó mérési időpontban azonban már nem volt szignifikáns a különböző géleken mért életképességek közötti különbség.

Mind a fáziskontraszt mikroszkóppal készült képek alapján, mind pedig az életképességi vizsgálat alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a dopamin koncentrációfüggően támogatja a sejtek túlélését: míg az alacsonyabb koncentráció kifejezetten pozitív hatást mutat a sejtek letapadására és proliferációjára, addig a magasabb koncentráció gátló hatással bír, mely eredmény egyezést mutat az irodalomban megtalálható adatokkal.

A kétfoton mikroszkóppal készített képek hasonló eredményt hoztak, mint az előző két vizsgálat. A harmadik napon nagy mennyiségű sejtet láttunk az alacsonyabb dopamin tartalmú gélen, valamint a kontrollon, penetrálva a gél mátrixába, míg a magasabb dopamin tartalmú gélen jóval kevesebb sejtet figyelhettünk meg. A DOPA 1/20 gél esetében a sejtek körülbelül 170 μm mélységig voltak képesek penetrálni a gél mátrixába (amely körülbelül 4 sejtrétegnek felel meg), míg a kontroll gélekbe mindössze 60 μm mélységig tudtak behatolni a sejtek.

A dopamin tartalmú gélekbe tehát a korábban tapasztaltaknál mélyebbre penetráltak a sejtek, így ezen géltípus rendkívül ígéretes fog eredetű őssejtek tenyésztése szempontjából. Ez korrelál az irodalmi adatokkal: a dopamin elősegíti az MSC-k migrációját, D2 receptoron és alternatív foszfoinozítid-3-kináz / Akt útvonalon keresztül.

A kísérlet tehát felveti, hogy a dopamin esetében kiemelkedően fontos a megfelelő koncentráció alkalmazása, amely összecseng az irodalomban található adatokkal is (144, 145). Megfelelő mennyiségben a dopamin kiemelkedően pozitív hatással van a sejtek életképességére és szaporodására, így ez a géltípus rendkívül ígéretes őssejtek tenyésztése szempontjából. A dopamin tartalom optimalizálására, valamint a sejtek a géleken való proliferációs és differenciációs potenciáljának feltérképezésére azonban még további vizsgálatokra van szükség.

5. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatómunkám új tudományos eredményei a következő pontokba foglalhatók össze:

1. Kimutattam, hogy humán foggyökérhártya eredetű mezenchimális képesek megtapadni és szaporodni cisztamin és diamino-bután keresztkötőket tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken. Legnagyobb mértékben a merevebb diamino-butánt, valamint a tiol-csoportokat is tartalmazó géleken mutatkoztak életképesnek a sejtek, illetve a gélek belseje felé való penetráció is ezen gélek esetében volt kiemelkedő. A cisztamin és diamino-bután keresztkötésű gélek tehát biokompatibilisek és biodegradábilisek.
2. Kimutattam továbbá, hogy foggyökérhártya eredetű őssejtek megtapadnak és szaporodnak különböző tiol-csoport mennyiséget poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken. A tiol tartalom növekedése a sejtek életképességének és proliferációjának növekedését vonja magával, így a magas tiol tartalmú gélek kiemelten alkalmasak a sejtek tenyésztésére.
3. Megállapítottam, hogy a magas tiol tartalmú hidrogélek támogatják a foggyökérhártya eredetű őssejtek csont irányú differenciációs potenciálját. Ezen gélek képesek spontán oszteogén aktivitást is indukálni a sejtekben *in vitro*.
4. Kimutattam, hogy a fogeredetű őssejtek csak korlátozottan képesek megtapadni és szaporodni lizin és cisztamin keresztkötőket tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken, amelynek mértéke erősen függ a lizin koncentrációjától.

5. Megállapítottam, hogy dopamin tartalmú hidrogélek alkalmasak lehetnek fog eredetű őssejtek tenyésztésére. Megfelelő dopamin-koncentráció alkalmazása mellett a PDL sejtek kiemelkedő proliferációs és penetrációs aktivitást mutatnak.

Munkacsoportunk kifejlesztett és *in vitro* megvizsgált több olyan teljesen új, poli(aszparaginsav)-alapú hidrogélt, amelyek biokompatibilisnek bizonyultak, és PDL-eredetű mezenchimális őssejtkultúra tenyésztésére alkalmasak. A későbbiekben ezek a gélek - csontirányú differenciációt támogató tulajdonságuk miatt – alkalmasak lehetnek a regeneratív terápiában való alkalmazásra, elsősorban csontdefektusok esetében.

6. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

6.1. Az értekezés alapját képező saját közlemények

1. **Orsolya Hegedűs**, Dávid Juriga, Evelin Sipos, Constantinos Voniatis, Ákos Juhász, Abdenaccer Idrissi, Miklós Zrínyi, Gábor Varga, Angéla Jedlovszky-Hajdú, Krisztina S. Nagy: Free thiol groups on poly(aspartamide) based hydrogels facilitate tooth-derived progenitor cell proliferation and differentiation. *PLoS One*. 2019;14(12):e0226363. **IF 2,776**
2. Dávid Juriga, Evelin Sipos, **Orsolya Hegedűs**, Gábor Varga, Miklós Zrínyi, Krisztina S. Nagy, Angéla Jedlovszky-Hajdú: Fully amino acid-based hydrogel as potential scaffold for cell culturing and drug delivery. *Beilstein J Nanotechnol*. 2019;10:2579-93. **IF 2.269**

6.2. Egyéb saját közlemények

1. Perczel-Kovács Katalin, Farkasdi Sándor, Kálló Karola, **Hegedűs Orsolya**, Kerémi Beáta, Cuisinier Frederic, Blazsek József, Varga Gábor: Fogbél eredetű őssejtek hatása a titánimplantátumok összeintegrálódására patkány farokcsigolya-modellben *Fogorvosi Szemle 110:(1) pp. 7-14. (2017)*