

Fogeredetű mesenchimális őssejtek  
alkalmazása az oszteogén differenciáció  
karakterizálására és szájöblítő szerek  
citotoxicitási vizsgálatára

Doktori tézisek

**Dr. Perczel-Kovács Katalin Erzsébet**

Semmelweis Egyetem  
Rácz Károly Klinikai orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Varga Gábor, DSc., egyetemi tanár  
Dr. S. Nagy Krisztina, Ph.D., tudományos munkatárs

Hivatalos bírálók: Dr. Lajkó Eszter, tudományos főmunkatárs  
Dr. Turzó Kinga, egyetemi docens

Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Sárdy Miklós, intézetvezető egy. tanár  
Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Vág János, egyetemi docens  
Dr. Folyovich András, egy. oszt. vez. főorvos

Budapest  
2022

## ***1. Bevezetés***

### *Fogeredetű mesenchimális őssejtek vizsgálata*

Őssejtnek nevezzük azon sejteket, melyek korlátlan önmegújító képességűek és differenciált utódsejtek létrehozására is képesek. A mesenchimális őssejtek (MSC-k) az embrionális kötőszövetből származnak, orsó vagy csillag alakúak és a sejtek laza hálózata jellemzi őket. Immunfenotípusukra CD105, CD73 és CD90 pozitivitás jellemző és negatívak a hemopoetikus őssejtekre jellemző markerekre. In vitro differenciálthatóak oszteoblaszt, kondroblaszt és adipocita irányba. A fogeredetű mesenchimális őssejtek ektomesenchimális eredetük miatt neurogén irányba is differenciálthatóak. A fogeredetű őssejtek öt különböző helyről izolálhatóak. A tejfogak pulpájából (stem cells from human exfoliated deciduous teeth, SHED), a fejlődő, még elő nem tört fogak fogzacskójából (dental follicle stem cell, DFSC), a maradó fogak pulpájából (dental pulp stem cell, DPSC), a maradó fogak gyökérhártyájából (periodontal ligament stem cell, PDLSC) és a maradó fogak gyökerének apikális csúcsáról (stem cells from the apical papilla, SCAP). A maradó fogak közül leggyakrabban a bölcsességfogakból izolálnak őssejteket, de a fogszabályozás során eltávolított első kisírlőkből is izolálható DPSC, PDLSC és SCAP.

Tanszékünkön korábban a DPSC és PDLSC sejteket vizsgálták. Az impaktált bölcsességfogak extrakciója során láttam meg a lehetőséget abban, hogy a foggal együtt kiemelt fogzacskóból is DFSC sejteket izoláljunk. Így kutatómunkám során lehetőség nyílt többféle fogeredetű primer sejtenyészet vizsgálatára.

## Oszteogén differenciálódás fogeredetű őssejtek esetében

A csontosodási folyamat során a sejtek mineralizált extracelluláris mátrixot hoznak létre. A mátrix képződését befolyásolja az aszkorbinsav-2-foszfát, mely hatására a sejtek I. típusú kollagént állítanak elő. A dexametazon serkenti az ALP aktivitást, ezzel segítve szintén a mátrix képződést, ám hogy mineralizált mátrix jöjjön létre szükség van egy foszfát forrásra is, például a  $\beta$ -glicerofoszfátra is.

Dolgozatom alapkutató részében egy átfogó összehasonlító vizsgálatot mutatok be a DF (dental follicle), PDL (periodontal ligament) és DP (dental pulp) primer őssejtekről, mely amellet, hogy bizonyítja, hogy mindhárom sejtípus differenciálható oszteogén irányba, ezzel egyidejűleg vizsgálja mind a fehérje, mind az mRNS szintű változásokat [1].

## Szájöblítő szerek vizsgálata

A hagyományos fogászati ellátásban rendszeresen használnak fertőtlenítőszereket, például endodonciai kezelések, parodontológiai és szájhygiéniai kezelések, valamint kariológiai kezelések során. A szájüreg különböző felületein található biofilm többféle kórokozót tartalmaz, amelyek eltávolításához antibakteriális antiszeptikumok széles spektrumára van szükség. Az antiszeptikumok kiválasztásakor fontos, hogy a szájüregi kórokozók kevésbé, vagy egyáltalán ne legyenek rezisztensek velük szemben. Ezeknek követelményeknek megfelel a hidrogén-peroxid ( $H_2O_2$ ) és a klórhexidin (CHX), amelyeket a fogászatban igen gyakran használnak. Nem szabad azonban elfelejtenünk, hogy az

antiszeptikumok nemcsak a baktériumokra, hanem a szájüregi sejtekre is toxikusak, emiatt terápiás alkalmazásuk korlátozott. Ezért a tudományos kutatás további lehetőségeket keres az ideális fertőtlenítőszer megvalósítására.

A  $\text{H}_2\text{O}_2$  redukálja a RANK ligand expresszióját a sejtekben, így a szabadgyök képződés nő, ami indukálja a sejtek pusztulását. A CHX biguanid típusú antiszeptikus és antimikrobiális szer, mely a lipideket károsítva fejt ki hatását. A  $\text{ClO}_2$  antibakteriális és antivirális hatású, gyorsan reagál a tirozin, triptofán és cisztein aminosavakkal, ezáltal roncsolva a vírusok burkát és a baktériumok sejtfalát. A humán sejtekben lévő glutation nagy sebességgel lekötí az aktív  $\text{ClO}_2$ -t, így annak oxidáló hatása megszűnik, sejtroncsoló hatása elenyésző lesz. A  $\text{ClO}_2$  korábbi felhasználását akadályozta, hogy tiszta vizes oldatát nem tudták előállítani. Noszticzius Professzor Úr kutatócsoportja egy új eljárás kifejlesztésével stabil hipertiszta  $\text{ClO}_2$  (Solumium)-ot állított elő.

Kutatásunk során a fent említett három szájfertőtlenítő hatását vizsgáltam az általam izolált primer PDL őssejt-tenyészeteken, hisz egy parodontológiai kezelés során ezen őssejtek közvetlen kapcsolatba kerülnek a szájfertőtlenítőkkel [2].

## 2. Célkitűzés

0. **PDL** és **DP** primer fogeredetű őssejtkultúrák izolálása és tenyésztése, **DF** primer sejtkultúrák izolálási és tenyésztési protokolljainak beállítása.

**DF**, **PDL** és **DP** primer fogeredetű őssejtkultúrák összehasonlítása 21 napos oszteogén differenciálódás során 0., 7., 14. és 21. napokon:

1. a sejtszámban és az alkalikus foszfatáz enzimaktivitásban bekövetkező változások követése [1],
  2. a mineralizáció vizsgálata [1],
  3. az MSC sejtekre jellemző markerek fehérjeszintű változásainak követése immuncitokémia módszerével [1],
  4. az oszteogén differenciálódás lépéseit szabályozó gének expressziójának vizsgálata [1].
5. A  $H_2O_2$ , **CHX** és a hipertiszta  $ClO_2$  szájöblítő szerek hatásának vizsgálata a sejtmorfológiára, az életképességre és az őssejtmakerek jelenlétére **PDL** primer őssejtkultúrákban [2].

### 3. *Módszerek*

A sejtek izolálását a DP, PDL őssejtek mellett DF őssejtek esetében is az SE Orális Diagnosztikai Tanszékén sebészi feltárásban eltávolított impaktált bölcsességfogakból az SE Orálbiológiai Tanszéken korábban kidolgozott protokollal végeztem. A sejttenyésztést 10% FBS-t tartalmazó  $\alpha$ MEM alapú tápoldatban végeztem. Morfológiai vizsgálatnál inverz fáziskontraszt-mikroszkópot, CCD kamerát és Scion képfeldolgozó szoftvert használtam [1, 2].

A DF, PDL és DP őssejteket a háromhetes oszteogén differenciáltatáshoz  $10^4$  sejt/cm<sup>2</sup> arányban, ültettem ki. A kiültetést követően 24 órával a tenyésztő tápoldatot lecseréltem 1% FBS-t tartalmazó  $\alpha$ MEM alapú kontroll vagy 1% FBS-t tartalmazó  $\alpha$ MEM alapú oszteogén differenciációt indukáló tápoldatra, ami aszkorbinsav-2-foszfátot,  $\beta$ -glicerofoszfátot és dexametazont tartalmazott. A méréseket a differenciáltatás kezdetekor (0. nap) és 7, 14, valamint 21 nap elteltével végeztem [1].

Az oszteogén differenciáció során a DNS mennyiségi meghatározásához a méréseket Takácsi (96 lyukú) lemezre kiültetett DF, PDL és DP őssejteken végeztem. A sejtekből a DNS-t Nucleospin Tissue kit segítségével izoláltam a gyári protokollnak megfelelően. A sejttenyészet DNS koncentrációja arányos a sejtszámmal [1].

Az ALP enzim aktivitásának mérését, Galler KM. munkacsoportja által leírt protokoll kisebb módosításával, kolorimetriás

módszerrel, Takácsi lemezre kiültetett DF, PDL és DP őssejteken végeztem. A kapott ALP-aktivitási értékeket az adott sejtenyészet DNS-tartalmára normalizáltuk és mM pNP/h/ $\mu$ g DNS-ben fejeztük ki [1].

A Ca-koncentráció mérése során a Takácsi lemezre kiültetett DF, PDL és DP őssejtek által kiválasztott kalcium sókat 0,5 M-os HCl-oldattal oldottuk fel és a lyukankénti Ca koncentrációt Abcam calcium detection kit segítségével határoztuk meg Ultrospec III spektrofotométerrel [1].

A Kőssa festéshez 24 lyukú lemezre kiültetett, differenciáltatott DF, PDL és DP őssejteket 70%-os ethanollal való fixálást követően 5%-os ezüst-nitráttal kezeltem erős fényforrás alatt, majd 5%-os nátrium-tioszulfáttal fixáltam a festést [1].

Az RNS szintű változásokat a DF, PDL és DP őssejtek esetén az oszteogén csoportok 0., 7., és 14. napján mértem qPCR alkalmazásával. Az RNS izolálást követően cDNS-t szintetizáltunk. A mérést StepOne® Real-Time PCR készülékkel végeztem. A vizsgált génszakaszok: Runx2, osterix, alkalikus foszfatáz (ALPL), oszteokalcin (BGLAP), bone sialoprotein (IBSP) és az endogén kontroll a gliceraldehid-3-foszfát (GAPDH) [1].

Az immuncitokémiai vizsgálatok során a mérési időpontokban 4%-os PFA-val fixáltam a 8 kamrás lemezre kiültetett DF, PDL és DP őssejteket, és 4°C-on tároltuk őket az egyidejű immuncitokémiai festésig. A vizsgált antigének a következők voltak: CD105, CD90, vimentin, nestin, STRO-1, ON és BSP. A másodlagos antitestek Alexa Fluor 488 festékkel konjugált kecske

anti-nyúl IgG, anti-egér IgG és IgM típusúak voltak. A lemezeket ProLong Gold antifade reagent with DAPI-val fedtem. Az oszteogén differenciáltatás esetén a STRO-1 pozitív sejtek arányát kvantifikáltuk is [1, 2].

A citotoxicitási vizsgálatokban fogászati kezelést imitálva 10 perces behatási idővel hasonlítottuk össze a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és CHX hatását a hipertiszta ClO<sub>2</sub> (Solomium™) hatásával. Két különböző passzázsszámú (P3, P7) PDL összejt tenyészetet vizsgáltunk. Összehasonlítottuk egyrészt a koncentrációfüggő toxicitását, másrészt a fogászati gyakorlatban alkalmazott koncentrációk (0,3%-os H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0,02%-os CHX, 0,0025%-os és 0,00025%-os hipertiszta ClO<sub>2</sub>) hatását [2].

A SE Orálbiológiai Tanszéken rutinszerűen alkalmazott WST-1 teszttel végeztük a sejtek életképességének vizsgálatát a Takácsi lemezre kiültetett PDL összejteken. A vizsgálat a mitokondriális dehidrogenáz enzim aktivitásának mérésén alapul, a színreakciót mikrolemez leolvasóval mértük [2].

Az adatokat számtani átlag ± standard hiba (SEM) formában ábrázoltuk, és a statisztikai értékelést Kruskal-Wallis nem-paraméteres ANOVA teszttel végeztünk, ahol a p<0,05 különbséget vettünk szignifikánsnak [1, 2].



## 4. Eredmények

### DPSC, PDLSC és DPSC primer fogeredetű sejt kultúrák

Az impaktált bölcsességfogakból származó primer sejtek fibroblasztszerű morfológiát mutattak és két héten belül elérték a 70-80%-os konfluencia szintet. A sejtek P10 passzázs szám fölött egyes primer tenyészetekben a szeneszcencia jeleit mutatták a passzázs-számok növekedésével párhuzamosan nőtt az ellaposodott, szétterült sejtek száma. A vizsgált három különböző eredetű primer őssejt tenyészet immunfenotípusa nagyon hasonló volt. A sejtek szinte mind pozitívak voltak CD90, vimentin, nestin, oszteonectin (ON), bonesialoprotein (BSP) immunmarkerekre és a sejtek 10-20%-a pozitív volt STRO-1 őssejtmarkerre.

### Három primer őssejt kultúra oszteogén differenciáltatása

Vizsgálva a sejtszám változását az oszteogén differenciáltatás alatt, mind az oszteogén mind a kontroll csoportokban nőtt a sejtszám a DF, PDL és DP őssejtek esetén is. Mindeközben a 0. naptól a 7. napra szignifikáns emelkedést mértünk az ALP aktivitásban mindkét csoportban DF, PDL és DP őssejteknél, majd a 14. és 21. napon csak a kontroll csoportokban nőtt tovább szignifikánsan az aktivitási érték, míg az oszteogén csoportokban csökkent a 7. naphoz képest [1].

A mineralizáció meglétét Kóssa festéssel igazoltuk. Az oszteogén csoport 14. napján jelentek meg először a detektálható Ca

depozitok, majd a 21. napra jelentősen növekedett a mennyiségük [1].

Kalcium koncentráció mérésével összehasonlítva a három primer sejttípust, azt tapasztaltuk, hogy a 21. napon szignifikánsan magasabb a Ca koncentráció a DF őssejtekben, mint a DP őssejtekben, a PDL őssejtek esetében köztes értéket mértünk [1].

DF, PDL és DP őssejtek immunfenotípusa, az általunk vizsgált vimentin, nestin, ON és BSP immunfehérjék tekintetében, a 21 napos differenciáltatás alatt nem változott sem az oszteogén sem a kontroll csoportokban. A STRO-1 + sejtek aránya jelentős változásokon ment át. A kiindulási STRO-1 + sejtek aránya: 10% DFSC, 15% PDLSC és 20% DPSC volt, a 21. napos kezelést követően kontroll csoportokban csökkent ez a sejtarány, míg az oszteogén csoportokban megnőtt: 42% DFSC, 43% PDLSC és 30% DPSC arányt határoztuk meg [1].

A DP, PDL és DP őssejtek oszteogén differenciáltatása során az oszteogén csoportban a Runx2 mRNS szintje mindhárom őssejttípus esetében szignifikánsan nőtt a 0. naphoz képest a 7. napra, majd a második héten kissé csökkent. A qPCR vizsgálatokban az osterix (Osx), bone-szialoprotein (BSP), oszteokalcin (OC) és ALP génexpressziók mindegyike hasonló mintázatot mutat a DF és PDL őssejtekénél, míg a DP őssejtek esetén eltérőt. A BSP és az OC szintje DP őssejtekénél szignifikánsan nőtt, míg ezt a változást DF, és PDL őssejtekénél nem tapasztaltuk. Az ALP mRNS szintje minden esetben megemelkedett, a DF és PDL őssejtekénél

százszoros emelkedést, a DP őssejteknel ezerszeres emelkedést mértünk [1].

### PDL primer őssejt kultúrákon vizsgált szájöblítő szerek hatása

A szájöblítő szerek vizsgálatokor 10 perces kezelési időket alkalmaztunk. A 0,0025%-os és 0,00025%-os hipertiszta  $\text{ClO}_2$  alkalmazásakor a sejtek a kontrollhoz hasonló morfológiát és konfluencia szintet mutattak. A 0,02%-os CHX alkalmazásakor a PDL őssejtek között lekerekedett, elhalt sejteket detektáltunk. A 0,3%-os  $\text{H}_2\text{O}_2$ -vel kezelt sejtek esetén zömében elhalt sejtet, sejttermelékot láttunk a fénymikroszkópos vizsgálatkor [2].

Az alkalmazott behatási idővel és koncentrációkkal sem a CHX, sem a  $\text{ClO}_2$  hatására nem változott a sejtek immunfenotípusa a kontrollhoz képest. Mind a kontroll, mind a kezelt sejttenyészetek CD90 és CD105 őssejtmarkerekre pozitívak, a STRO-1 őssejtmarkerre részben pozitívak voltak. A klinikumban alkalmazott koncentrációban a  $\text{H}_2\text{O}_2$  nagymértékű toxikus hatása miatt nem maradt életképes fixálható sejt, melyen az immuncitokémiai vizsgálatokat elvégezhetjük volna [2].

A WST-1 életképességi tesztel egyrészt vizsgáltuk  $\text{H}_2\text{O}_2$ , CHX és hipertiszta  $\text{ClO}_2$  koncentrációfüggő hatását a PDL őssejtekre. Azonos koncentrációban a CHX bizonyult a legtoxikusabbnak, majd ezt követte a  $\text{H}_2\text{O}_2$ . Ellenben a hipertiszta  $\text{ClO}_2$  csak a legtöményebb koncentrációban volt toxikus a PDL őssejtekre, mely töménységben a  $\text{ClO}_2$  kereskedelmi forgalomban sohasem volt kapható.

Másrészt WST-1 teszttel vizsgáltuk a fogorvosi kezelést imitálva 10 perces behatási idővel a fogászati gyakorlatban alkalmazott koncentrációban a szájöblítő szerek hatását a két különböző passzázsszámú PDL primer sejt kultúrájára. A 0,3%-os  $H_2O_2$  a sejtek 100%-ára letális volt mindkét passzázsszám esetén, a 0,02%-os CHX hatására P3-ban a sejtek 75%-a, míg P7-ben a sejtek 17%-a maradt életben a kontrollhoz képest. A 0,0025%-os és 0,00025%-os  $ClO_2$  hatására a kontroll csoporthoz képest több mint 100%-a maradt életben a PDL össejteknek, azaz ezen sejtek életképessége a kezelés hatására nőtt [2].

Ezen kísérletekkel bizonyítottuk hogy az alkalmazott koncentrációban a hipertiszta  $ClO_2$  nem toxikus a PDL ősejtekre, míg a vizsgálatban szereplő másik két szájfertőtlenítő ezen behatási idő és koncentráció alkalmazásával sejtpusztulást indukált. Következésképpen a hiper-tiszta  $ClO_2$ -oldat új, hatékony és csökkentett mellékhatású fertőtlenítőszerként javasolható a parodontális kezelések alkalmazásakor [2].

## 5. Következtetések

### Disszertációm új eredményei a következők:

0. SE Orálbiológiai Tanszéken kidolgozott izolálási, tenyésztési protokollal elsőként izololtam DF primer őssejtkultúrát, amelyet alkalmasnak találtam oszteogén differenciálódásra.

1. A sejtszám változását vizsgálva kimutattam, hogy a DF, PDL és DP primer őssejtkultúrák 1% FBS-t tartalmazó tápoldatban is folyamatosan növekednek. Az oszteogén differenciálódás során az ALP aktivitás nagyobb mértékben növekedett a kontroll csoportban, mint az oszteogén csoportban [1].

2. A DF, PDL és DP primer őssejtkultúrák mineralizáltságának mértékét összehasonlítva: a DF szignifikánsan magasabb Ca-koncentrációt tartalmazott, mint a DP őssejt [1].

3. A DF, PDL és DP primer őssejtkultúrák magas vimentin expressziós szintet mutattak az oszteogén differenciáltatás közben. Az STRO-1-pozitív sejtek aránya mindhárom sejt kultúra esetében szignifikánsan megnőtt az differenciáltatás hatására [1].

4. Összehasonlítva az oszteogén differenciálódás különböző lépéseit szabályozó gének expresszióját: a BSP, OC és ALP gének tekintetében hasonló mintázatot mutattak a DF és PDL primer őssejtkultúrák, míg a DP őssejtkultúráknál szignifikánsan magasabb génextpressziós szintet mutattak [1].

5. Kimutattam, hogy a hipertizta ClO<sub>2</sub>-vel kezelt PDL primer őssejtkultúrák morfológiája, életképessége és immunfenotípusa nem változott a kontrollhoz képest, míg a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> és a CHX a klinikumban alkalmazott koncentrációban toxikus volt ezekre a sejtekre [2].

## 6. Saját publikációk jegyzéke

### A doktori értekezés alapját képező publikált cikkek:

1. Perczel-Kovách K, Hegedűs O, Földes A, Sangngoen T, Kálló K, Steward MC, Varga G, S Nagy K. (2021) STRO-1 positive cell expansion during osteogenic differentiation: A comparative study of three mesenchymal stem cell types of dental origin. *Archives of Oral Biology*, 122: 104995.  
SJR Scopus – Dentistry Q1; IF(2020): 2.633
2. Láng O, S Nagy K, Láng J, Perczel-Kovách K, Herczegh A, Lohinai Z, Varga G, Kőhidai L. (2021) Comparative study of hyperpure chlorine dioxide with two other irrigants regarding the viability of periodontal ligament stem cells.  
*Clinical Oral Investigations*, 25(5): 2981-2992  
SJR Scopus – Dentistry (miscellaneous) Q1; IF (2020): 3.573

Publikációk más témákban:

Perczel-Kovách K E, Farkasdi S, Kálló K, Hegedűs O, Kerémi B, Cuisinier F, Blazsek J, Varga G: (2017) Fogbél eredetű őssejtek hatása a titánimplantátumok összeintegrálására patkány farokcsigolyamodellben.

*Fogorvosi Szemle*, 110: 1 pp. 7-14, 8 p Q4;

Racz GZ, Kadar K, Foldes A, Kallo K, Perczel-Kovach K, Keremi B, Nagy A, Varga G. (2014) Immunomodulatory and potential therapeutic role of mesenchymal stem cells in periodontitis. *Journal of Physiology and Pharmacology*, 65: 3 pp. 327-339., 13p. Q2; IF: (2014) 2.386

Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdú A, Perczel-Kovách K, Chen YM, Varga G, Zrínyi M. (2016) Biodegradation and osteosarcoma cell cultivation on poly(aspartic acid) based hydrogels. *Acs Applied Materials & Interfaces* 8:(36) pp. 23463-23476 D1; IF: (2016) 7.504

Nagy K, Láng O, Láng J, Perczel-Kovách K, Gyulai-Gaál Sz, Kristóf K, Köhidai L, Varga G. (2018) A novel hydrogel scaffold for periodontal ligament stem cells. *International Medicine & Applied Science*, Vol 10(3), pp. 162-170 Q3;

Foldes A, Reider H, Varga A, Nagy KS, Perczel-Kovach K, Kis-Petik K, DenBesten P, Ballagi A, Varga G. (2021) Culturing and Scaling up Stem Cells of Dental Pulp Origin Using Microcarriers. *Polymers (Basel)* 13(22).Q1; IF: (2020/21) 4,329