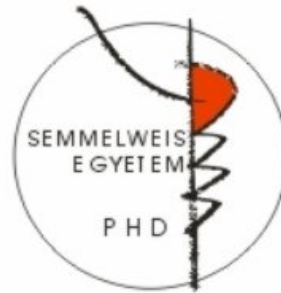


# Fog eredetű őssejtek életképességének, morfológiájának és differenciálódásának vizsgálata szövettámaszok jelenlétében

Doktori értekezés

**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

**TARTALOMJEGYZÉK**

<b>RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE .....</b>	<b>4</b>
<b>1. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR).....</b>	<b>7</b>
<b>1.1. Bevezetés .....</b>	<b>7</b>
<b>1.2. Szöveti regeneráció a fogorvoslásban.....</b>	<b>8</b>
<b>1.3. Fog eredetű őssejtek és potenciális szerepük a regenerációban .....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Az őssejtekről általában .....	10
1.3.2. Multipotens mezenchimális őssejtek és tulajdonságaik.....	11
1.3.3. Fog eredetű őssejtek típusai és tulajdonságai .....	12
1.3.4. Fog eredetű őssejtek alkalmazási lehetőségei a regeneratív terápiában .	16
<b>1.4. Szövetátmaszok .....</b>	<b>18</b>
1.4.1. Hidrogélek szövetátmaszként történő alkalmazása .....	20
1.4.2. Poliaszparaginsav (PASP) alapú hidrogélek.....	24
1.4.3. Poliaszparaginsav alapú gélek módosítási lehetőségei .....	26
<b>2. CÉLKITŰZÉS .....</b>	<b>29</b>
<b>3. MÓDSZEREK .....</b>	<b>30</b>
<b>3.1. Alkalmazott anyagok és eszközök .....</b>	<b>30</b>
<b>3.2. Fog eredetű őssejtek tenyésztése aminosav alapú hidrogéleken.....</b>	<b>30</b>
3.2.1. Alkalmazott hidrogélek.....	30
3.2.2. Sejtek izolálása és tenyésztése .....	32
3.2.3. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok.....	34
3.2.4. Életképesség vizsgálata.....	34
3.2.5. Vybrant DiD vitális festés.....	34
3.2.6. Oszteogén differenciáció vizsgálata .....	35
<b>3.3. Statisztikai értékelés .....</b>	<b>35</b>
<b>4. EREDMÉNYEK .....</b>	<b>36</b>
<b>4.1. Fog eredetű őssejtek tenyésztése cisztamin és diaminobután keresztkötésű géleken.....</b>	<b>37</b>
4.1.1. Cisztamin és diaminobután keresztkötésű gélek 3 napos vizsgálata .....	37
4.1.2. Cisztamin és diaminobután keresztkötésű gélek hosszú távú vizsgálata	40

4.2.	Fog eredetű őssejtek tenyésztése különböző tiol-csoport mennyiségeket tartalmazó géleken .....	43
4.3.	Fog eredetű őssejtek oszteogén differenciációjának vizsgálata .....	46
4.4.	Fog eredetű őssejtek tenyésztése cisztamin és lizin keresztkötésű géleken.....	50
4.5.	Fog eredetű őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú géleken.....	52
5.	MEGBESZÉLÉS .....	57
5.1.	Cisztamin és diamino-bután tartalmú gélek vizsgálata .....	57
5.2.	Különböző tiol-csoport tartalmú gélek vizsgálata .....	59
5.3.	Oszteogén differenciáció vizsgálata.....	60
5.4.	Cisztamin és lizin tartalmú gélek vizsgálata.....	61
5.5.	Dopamin tartalmú gélek vizsgálata.....	63
6.	KÖVETKEZTETÉSEK.....	65
7.	ÖSSZEFOGLALÁS.....	66
8.	SUMMARY .....	67
9.	IRODALOMJEGYZÉK .....	68
10.	SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE .....	82
10.1.	Az értekezés alapját képező saját közlemények.....	82
10.2.	Egyéb saját közlemények .....	83
11.	KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS .....	84

**RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE**

ALP	<i>alkaline-phosphatase</i> , alkalikus foszfatáz
AMP	2-amino-2-metil-1-propanol
ATP	adenozin-trifoszfát
BDNF	<i>brain-derived nerve factor</i> , agyi növekedési faktor
bFGF	<i>basic fibroblast growth factor</i> , bázikus fibroblaszt növekedési faktor
BHA	butil-hidroxi-anizol
BME	$\beta$ -merkaptoetanol
BMSC	<i>bone marrow stromal cell</i> , csontvelői stromális őssejt
BMPs	<i>bone morphogeninc proteins</i> , csont morfogénikus fehérjék
BSP	<i>bone-sialoprotein</i> , csont szialoprotein
cAMP	ciklikus adenzin-monofoszfát
c-Myc	madár <i>myelocytomatosis</i> vírus onkogén homológ
CYS	cisztamin
CYSE	ciszteamin
DAB	diaminobután
DAPI	<i>4,6-diamidino-2-phenylindole</i> , 4,6-diamidino-2-fenilindol
dbcAMP	dibutiril ciklikus adenzin-monofoszfát
DFSC	<i>dental follicule stem cell</i> , fogzacskó eredetű őssejt
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMF	dimetil-formamid
DMSO	dimetil szulfoxid
DOPA	dopamin
DPSC	<i>dental pulp stem cell</i> , fogbél eredetű őssejt
DSP	dentin szialoprotein
ECM	extracelluláris mátrix
EDTA	etilén-diamino-tetraacetát
EGF	<i>epidermal growth factor</i> , epidermális növekedési faktor
FACS	<i>fluorescence activated cell sorting</i> , fluoreszcencia aktivált sejtválogatás

FCS	<i>fetal calf serum</i> , főtális borjúsérum
FGF-8	<i>fibroblast growth factor 8</i> , fibroblaszt növekedési faktor 8
GAG	glükózaminoglikán
GFAP	<i>glial fibrillaric acidic protein</i> , gliális fibrilláris savas protein
HSC	<i>haematopoietic stem cells</i> , vértképző őssejtek
IBMX	3-izobutil-1-metilxantin
ITS	<i>Insulin-Transferrin-Selenium A</i>
Klf4	<i>Kruppel-Like faktor 4</i>
LYS	lizin
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i> , minimális esszenciális médium
MEM $\alpha$	<i>Minimal Essential Medium Alpha modification</i>
MEPE	mátrix extracelluláris foszfoglikoprotein
MSC	mezenchimális őssejt, <i>mesenchymal stem cell</i>
NES	nesztin
NFM	neurofilamentum M
NGF	<i>nerve growth factor</i> , idegi növekedési faktor
NT-3	neurotrofin-3
Oct-4	oktamer-kötő transzkripciós faktor
PASP	<i>polyaspartic acid</i> , poliaszparaginsav
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , foszfát pufferelt sóoldat
PCL	polikaprolakton
PDL	<i>periodontal ligament</i> , foggyökérhártya
PDLSC	<i>periodontal ligament stem cell</i> , foggyökérhártya eredetű őssejt
PDT	<i>population doubling time</i> , duplázódási idő
PFA	paraformaldehid
PGA	propilén-glikol alginát
PGA	poliglikolsav
PKA	protein kináz A
PKC	protein kináz C
PLA	politejsav
PPAR $\gamma$	peroxiszóma-proilferátor aktivációs receptor
PSI	poliszukcinimid

RGD	arginin-glicin-aszpartát
SCPL	<i>solvent casting &amp; particulate leaching</i> , oldószeres öntés és részecskekioldódás
SEM	<i>standard error of means</i> , standard hiba
SHH	<i>sonic hedgehog protein</i>
SHED	<i>stem cells from human exfoliated deciduous teeth</i> , tejfog őssejt
Sox-2	<i>sex determining region Y-box 2</i>
TIPS	<i>thermally induced phase separation</i> , hőindukált fázisszétválasztás
VCAM-1	vaszkuláris sejtadhéziós molekula
VIM	vimentin
WST-1	<i>water-soluble tetrazolium salt</i> , vízoldható tetrazólium só

## 1. BEVEZETÉS (IRODALMI HÁTTÉR)

### 1.1. 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 (1). A szövetépítés lényege, hogy sejtek, szövettámaszok (*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 (2). A regeneratív kutatások középpontjában ezért ma olyan mezenchimális őssejtek állnak, amelyek felnőtt szervezetben is megtalálhatóak (3). 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 (4). 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 (5). 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 (6, 7).

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 szövettámaszok létrehozása, amelyek nagymértékű hasonlóságot mutatnak a természetes ECM-mel és ezáltal képesek támogatni a sejtek természetes

működését. Az ideális szövettámasznak 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 (8). Mivel a különböző sejtípusok eltérő környezetet részesítenek előnyben szaporodásuk illetve differenciálódásuk során, ezért fontos a szövettámasz tulajdonságainak eszerint történő optimalizálása is (9).

Jelenleg az irodalomban található szövettámaszok 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 szövettámaszként. Mesterséges poliaminosav alapú gélek hátránya, hogy előállításuk nehézkes és drága lehet, emiatt szövettámaszként való alkalmazásukra kevés példát találunk az irodalomban. Kifejezetten fog eredetű őssejtekre fókuszálva poliaszparaginsav alapú hidrogélek részvételével pedig kizárólag munkacsoportunk végzett kísérleteket (10, 11).

Doktori kutatómunkám során ezért különböző mechanikai és kémiai tulajdonságokkal rendelkező poliaszparaginsav alapú hidrogél szövettámaszok biokompatibilitását vizsgáltam, foggyökérhártya eredetű őssejtek használatával. Megfigyeltem különböző keresztkötők (cisztamin, diamino-bután, 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 szövettámasz hozható létre.

## 1.2. Szöveti regeneráció a fogorvoslásban

Regenerációról akkor beszélhetünk, ha az elpusztult vagy sérült szövetek, struktúrák helyét az eredetivel mind típusában, mind funkciójában teljesen megegyező szövet veszi át. Ettől el kell különítenünk azt a lehetőséget, amikor a fentiek nem teljesülnek, vagyis nem teljes egészében az eredeti struktúra áll helyre: ilyenkor reparációról beszélünk, amire jó példa a hegyszövet kialakulása (12).



A regeneratív eljárások elsődleges célja, hogy a károsodott szövetek helyén az eredeti állapot jöjjön létre, ez azonban összetettebb szövetekben gyakran nehézségekbe ütközik. Jó példa erre a parodontium, vagyis a fogágy struktúrája, amely az ínyből, valamint a rögzítő apparátusból (alveoláris csont, gyökérhártyarostok, gyökércement) áll. A fiziológiás tapadás barrierfunkciót lát el a fogágy további részeinek védelmére. Két fő része különíthető el: íny junkcionális hámsejtjei (hámtapadás) valamint a gyökérhártyarostok, vagyis Sharpey rostok (kötőszövetes tapadás). A hámtapadás könnyen és gyorsan regenerálódhat oki kezelést követően, a kötőszövetes tapadás helyreállítása azonban komoly nehézségekbe ütközik, gyakran éppen a hámtapadás túlburjánzása miatt (12).

A lágyszövetek helyreállításán kívül a keményszövetek, a csont regenerációja is fontos, leginkább a fogorvoslás és a traumatológia területén. Ma már számos technika áll rendelkezésre, például csontpótló vagy csontnövekedést serkentő anyagok használata (13-15), olyan módszer azonban nem került még kifejlesztésre, ami százszázalékos biztonsággal garantálja a regenerációt olyan komplex szövetekben, mint amilyen a fogágy is. Azonban a szövetek pontos mikrostruktúrájának megismerése, az őket felépítő sejtek karakterizálása az elmúlt években lehetővé tette olyan összejt alapú terápia kifejlesztését, amelyek által elérhetővé válhat a teljes regeneráció, és hosszabb távon is jó eredményeket érhetünk el akár komplex szövetekben is (16, 17).

A szövetépítés néven ismertté vált technika a fentebb említett ismereteket felhasználva, komplex módon vizsgálja a gyógyulás folyamatát, figyelembe véve mind a biokémiai, mind a fizikai, mind a mérnöki alapelveket, tökéletes gyógyulást, vagyis regenerációt segítve elő. A technikát eredetileg a szövettranszplantációt követő kilökődések számának lecsökkentése céljából fejlesztették ki 1980 tájékán Amerikában. Azóta azonban az orvoslás számos területén kutatják és alkalmazzák, így napjainkban például a fogászatban, azon belül is az implantológiában, az endodoncia területén és a parodontológiában is nagy szerephez jut (1, 18, 19). A fogorvoslás területén való térhódítás egyik fontos mérföldköve volt a felfedezés, hogy fog-asszociált szövetekben is, például fogpulpában és foggyökérhártyában is találhatóak összejtek (20-23).

### 1.3. Fog eredetű őssejtek és potenciális szerepük a regenerációban

#### 1.3.1. Az őssejtekről általában

Őssejtnek nevezünk minden olyan sejtet, amely korlátlan önmegújító képességgel rendelkezik és differenciált utódsejtek létrehozására képes (24). Eredet szerint kétféle őssejt-típust különböztetünk meg. A korábban felfedezett típus az embrionális őssejt (ESC – *Embryonal Stem Cell*), míg ennek az érett, felnőtt szövetekben megtalálható formája a posztnatális őssejt (2, 4).

Ezen sejtek elsődleges feladata a felnőtt szövetekben, hogy belső *repair*, vagyis javító rendszerként működjenek, részt vegyenek a megújításban és a gyógyulásban. Bizonyos szövetekben, például a csontvelőben az osztódás állandó, a sérült vagy előregedett sejtek pótlása azonnali. Ezeket a szöveteket megújuló szöveteknek nevezzük. Más szövetekben a sejtek az idő nagy részében ezen a téren inaktívak és csak speciális szignálok hatására kezdenek el osztódni (ilyenek például a szív őssejtjei), ezek az állandósult szövetek. A felnőtt őssejtek jellemző tulajdonsága, hogy alapvető differenciálódási útvonalukat meghatározza a szövet, amiben találhatóak. Ez alapján megkülönböztethetünk például epiteliális (hám), hematopoetikus (vérképző), vagy mezenchimális (középső csiralemezből kialakult szövetcsoport) őssejteket. Emellett azonban lehetséges, hogy egy adott szövetben megtalálható differenciálódott sejt egy teljesen eltérő, érett sejttypussá alakul tovább, a közbenső progenitor állapot kihagyásával – ez az ún. transzdifferentiáció jelensége (25).

Differentiálódási potenciál szerint négyféle őssejt-típust különböztethetünk meg. A totipotens őssejt mind intra-, mint extraembrionális szövetek létrehozására képes, ilyen például a megtermékenyített petesejt. A pluripotens őssejtek csökkent potenciállal rendelkeznek, ugyanis csak intraembrionális szöveteket képesek létrehozni. Ilyen sejttypus az embrionális őssejt. A multipotens őssejtek nem képesek ivarsejtek létrehozására, azonban bármely más felnőtt szöveti sejt kialakulhat belőlük – ilyen típusú sejtek például a fog eredetű őssejtek is. Az unipotens őssejt egyféle sejttypussá tud csak differentiálódni, de képes megújulásra, ilyen tulajdonsággal rendelkeznek például az izom-őssejtek (26).

Mind az embrionális, mind a felnőtt őssejtek rendelkeznek előnyös és hátrányos tulajdonságokkal, amelyek terápiás felhasználhatóságukat is befolyásolják. A fő

különbség, hogy míg az embrionális őssejtek pluripotensek, a felnőtt őssejtek multipotensek, elsősorban azon szövet sejtjeivé differenciálódnak, amely csíralemezből származnak. Jellemző továbbá, hogy az embrionális őssejtek nagyobb számban izolálhatóak és korlátlanul fenntarthatóak differenciálatlan állapotban, a felnőtt őssejteket azonban transzplantálás során kisebb mértékben utasítja el a szervezet (ez többek között immunszuppresszió hatásuknak köszönhető (27)), ami előnyt jelent a terápiás alkalmazás szempontjából. Az embrionális őssejtek további hátránya a felnőtt őssejtekhez képest a tumorképző potenciáljuk, illetve az etikai problémák, amiket felvet a használatuk (2). Emiatt az elmúlt években könnyen és nagy számban izolálható felnőtt őssejt-típusok kerültek a regeneratív kutatások középpontjába. Ilyenek például a középső csíralemez szöveiből (pl. támasztószövetek, izomszövet) származó multipotens mezenchimális őssejtek.

### 1.3.2. Multipotens mezenchimális őssejtek és tulajdonságaik

Ahhoz, hogy egy sejtpopulációról kimondható legyen, hogy multipotens, mezenchimális őssejtekből (Mesenchymal Stem Cell, MSC) áll, három kritériumnak kell megfelelnie.

1. Az MSC-k első alapvető tulajdonsága, hogy multipotens differenciációs képességgel rendelkeznek: megfelelő *in vitro* differenciációs körülmények között képesek zsír, porc és csontsejtek létrehozására is. (24).
2. A sejtek műanyag felületekkel szemben adherens tulajdonságot mutatnak, vagyis standard körülmények között képesek letapadni a szövettenyésztő edényekre (24).
3. A tenyészet több, mint 95%-ának ki kell fejeznie bizonyos sejtfelszíni antigéneket (például CD-105 (endoglin), CD-73 (ekto 5'-nukleotidáz) és a CD-90 (Thy-1)), de fontos hogy a sejtpopuláció ne fejezzen ki 2%-nál magasabb mértékben hematopoetikus markereket (például CD-45 (pán-leukocita marker), a CD-34 (primitív hematopoetikus és endothel-marker), a CD-14 és CD-11b (monocita és makrofág markerek), CD-79 $\alpha$  és CD-19 (B-sejt markerek) és a HLA-DR marker) (24).

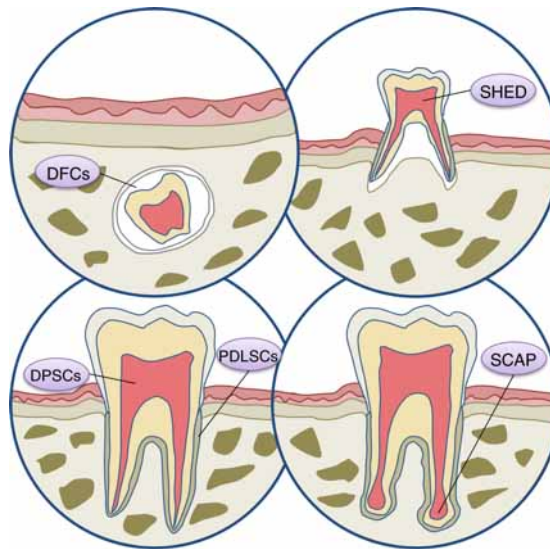
Amennyiben az adott sejtpopuláció mutatja a három alapvető kritériumot (multipotens differenciációs potenciál, adherens tulajdonság és a megfelelő markerek

megléte illetve hiánya), akkor kimondhatjuk, hogy multipotens MSC populációról van szó (24).

Multipotens mezenchimális őssejtek számos felnőtt szövetből izolálhatóak, ezek közül azonban az egyik legkönnyebben hozzáférhető és számos előnyös tulajdonsággal rendelkező forrást a maradó és tejfogak, valamint a fog körüli szövetek jelentik (6).

### 1.3.3. Fog eredetű őssejtek típusai és tulajdonságai

Az elmúlt két évtizedben számos felnőtt szövetben találtak mezenchimális őssejtforrásokat, többek közt fog-asszociált szövetekben is (3, 4, 28). A kutatások nyilvánvalóvá tették, hogy például fogpulpából és parodontális ligamentumból is izolálható magas proliferációs aktivitással rendelkező, önmegújító, klonogén tulajdonságú sejt (1. ábra). Ezen sejtek multipotens differenciációs képességekkel bírnak, sejt felszíni markereik pedig a legtöbb esetben azonosítottak.



**1. ábra**

*Fog eredetű őssejtek és forrásaik. DFSc: Dental Follicle Stem Cells, Fogzacskó eredetű őssejt. SHED: Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth, Tejfogpulpa eredetű őssejt. DPSCs: Dental Pulp Stem Cells, Fogpulpa eredetű őssejt. PDLSCs: Periodontal Ligament Stem Cells, Foggyökérhártya eredetű őssejt. SCAP: Stem Cells from Apical Papilla, Apikális papillából származó őssejt. (29)*

Az elsőként felfedezett fog eredetű őssejt-típus a fogpulpa eredetű őssejt (DPSC - *Dental Pulp Stem Cell*) amelyet Gronthos és munkatársai izoláltak elsőként (23).

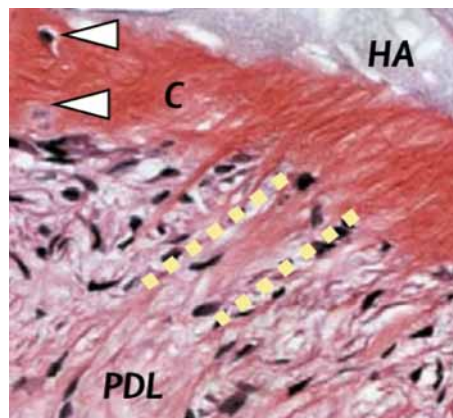
Differenciációs potenciáljuk hasonló a csontvelői őssejtekéhez, kolóniaképző frekvenciájuk és a sejtek proliferációs aktivitása kiemelkedő. Egyik legfontosabb tulajdonságuk az odontoblaszt-képző (dentin képzésért felelős sejt) potenciáljuk: képesek *in vitro* polarizált, odontoblaszt-fenotípust mutató sejtek és mineralizációs góccok létrehozására. Differenciáltathatóak ezen felül oszteogén, adipogén, neurogén és miogén irányba *in vivo*. Hidroxiapatittal és trikálcium-foszfáttal összekeverve képesek a dentin-pulpa komplex létrehozására *in vivo*: a DPSC-k egy vaszkularizált, pulpa-szerű szövetet hoznak létre, amelyet vékony rétegben dentin-szialoproteint expresszáló odontoblaszt-szerű sejtek vesznek körbe (30-32).

A DPSC-k rendelkeznek immunmodulációs hatással is: *in vitro* gátolják a T és B-sejt proliferációt, valamint csökkentik a *Natural Killer* és dendritikus sejtek aktivitását is, sejt-sejt interakciókon vagy szekretált faktorokon keresztül (28, 33). A DPSC-k immunfenotípusát több csoport is vizsgálta, azonban az eredmények helyenként eltérnek egymástól. Megegyeznek azonban abban, hogy a DPSC-k az oszteogén antigének közül kifejezik az oszteokalcin, oszteonektin, DSP (dentin szialoprotein) és MEPE (matrix extracelluláris foszfoglikoprotein) markereket; neurogén markerek közül a NFM (neurofilamentum M) és a GFAP (*Glial Fibrillaric Acidic Protein*) markereket (34); kifejezik ezen felül a CD-13 (membrán alanil-aminopeptidáz), CD-29 (integrin- $\beta$ 1), CD-44 (migrációt és adhéziót befolyásoló sejt felszíni glikoprotein), CD-105 (endoglin), CD-117 (c-kit, őssejt növekedési faktor receptor), CD-146 (melanoma sejtadhéziós molekula)(34), VCAM-1 (vaszkuláris sejtadhéziós molekula 1), kollagén-I, kollagén-III, és FGF-2 (fibroblaszt növekedési faktor) markereket(23) valamint bizonyos százalékban a STRO-1-et (az elsőként a csontvelői sztróma sejtekből izolált mezenchimális marker) is (35). Negatívak a CD-14, CD-34, CD-45, MyoD (izomdifferenciációs gén), kollagén-II, BSP (csont szialoprotein) és PPAR $\gamma$  (peroxiszóma-proliferátor aktivációs receptor) markerekre (5, 34-36).

2003-ban Miura és munkatársai sikeresen izoláltak tejfog-pulpa eredetű őssejteket (SHED - *Stem cells from Human Exfoliated Deciduous teeth*) (20). Ezek a sejtek szintén több irányú differenciációs (adipogén, neurogén, miogén, kondrogén) képességgel rendelkeznek és proliferációs potenciáljuk meghaladja mind a pulpa, mind a csontvelő őssejtekét. Számos neuronális markert expresszálnak ( $\beta$ -3 tubulin, Tau, NeuN, NFM, GFAP) (37). Habár közvetlenül nem képesek oszteoblasztok létrehozására, *in vivo*

oszteoinduktív tulajdonságot mutatnak és elősegítik a csontképződést. Dentin-pulpa komplex létrehozására képtelenek, de odontoblaszt-szerű sejtek és dentin-szerű struktúra létrejöhet belőlük *in vivo* (38, 39). A sejtek különlegessége, hogy olyan embrionális markereket is kifejeznek, mint a Oct-4 vagy a Nanog (40). Expresszálják ezen kívül az oszteogén MEPE, oszteokalcin és DSP markereket, valamint a CD-29, CD-73 (5'-nukleotidáz), endosztatin, bFGF, FGFR3 (20), SSEA-3, SSEA-4 (fázis-specifikus embrionális antigén)(40) és néhány esetben a CD-146 és CD-106 (VCAM-1) markereket (5, 41, 42).

Egy évvel a tejfog-pulpa eredetű őssejtek izolálását követően publikálták eredményeiket Seo és munkatársai a parodontális ligamentum eredetű multipotens őssejtekről (PDLSC - *Periodontal Ligament Stem Cell*) (22). A PDLSC *in vitro* számos irányba (adipogén, neurogén, oszteogén, kondrogén) differenciáltható őssejttípus (22, 35). A PDLSC-k a DPSC-khez hasonlóan immunmoduláns hatással is bírnak: *in vitro* gátolják a T és B-sejt proliferációját, valamint csökkentik a *Natural Killer* és dendritikus sejtek aktivitását is (33). *In vivo* képesek PDL-szerű struktúrát kialakítani, és cementképző potenciáljuk van: a kialakított komplex struktúra egy vékony, cement-szerű rétegből, kondenzált kollagén-szálakból és PDL-szerű sejtekből áll. A kollagén-szálak képesek összekapcsolódni az újonnan formálódott cement-szerű struktúrával, a Sharpey-rostokat utánozva (22) (2.ábra).



**2. ábra**

*Transzplantált PDL eredetű őssejtek képe hidroxipatit trikálcium foszfát (HA) layer-en. A kollagén-szálak (sárga szaggatott vonal) összekapcsolódnak az újonnan formálódott cement-szerű struktúrával (C), a Sharpey-rostokat utánozva. (25)*

A PDL eredetű őssejtek kifejezik az oszteogén markerek közül az ALP (alkalikus foszfatáz), BSP, MEPE és oszteokalcin markereket, valamint bizonyos pluripotens és embrionális markereket is mint a SSEA-1, SSEA-3, SSEA-4, TRA-1-60, TRA-1-81, SOX2 és a REX1 (22). Kifejezetten magas mértékben expresszálják az ín-specifikus transzkripciós faktort, a Scleraxist. Kifejezik ezen felül a CD-13, CD-29, CD-44, CD-59, CD-106 és STRO-1 markereket is (5, 22, 43, 44).

Morszecek és munkatársai később fogzacskból izoláltak őssejteket (DFSC, *Dental Follicle Stem Cell*), amelyek *in vitro* adipogén, oszteogén és neurogén irányba is differenciálthatóak (21). A sejtek tipikus fibroblaszt-szerű morfológiát mutatnak, könnyen izolálhatóak elő nem tört bölcsességfogakból, s különlegességük, hogy olyan idegi markereket is azonosítottak a felszínükön, mint például a nesztin, vagy a notch-1. *In vivo* rostos szövetből álló struktúrát hoznak létre, nem sikerült azonban esetükben dentin, cement vagy csont-formációt megfigyelni. Kifejezik az oszteogén markerek közül a BSP-t és az oszteokalcint, expresszálják továbbá kollagén-I, és FGFR1 IIIC markereket, negatívak azonban a hematopoetikus CD-34, CD-45 és HLA-DR markerekre (5, 21, 35).

A legkésőbb felfedezett fog-asszociált őssejt-típus az éretlen fogak apikális papillájából származó őssejt (SCAP – *Stem Cells from Apical Papilla*) (45). Az apikális papilla a növekedésben lévő fog gyökerének csúcsán található, s csak az erupció előtti időszakban hozzáférhető. Mivel az apikális papilla a későbbiekben átalakul gyökéri pulpává, kérdéses, hogy a SCAP sejtek prekursorai lehetnek-e a DPSC-knek, ez további kutatás szükségességét veti fel. A SCAP sejtek szerepe természetes körülmények között a foggyökér szöveteinek kialakításában van. A SCAP sejtek két olyan gént is magas szinten expresszálnak, amely a sejtproliferáció modulálásában vesz részt, ezek a *survivin* és a telomeráz, aminek köszönhetően proliferációs potenciáljuk kiemelkedően magas, ezáltal erős szövetregeneráló hatással bírnak. Ezek a sejtek *in vitro* képesek oszteogén valamint adipogén irányba differenciálódni. *In vivo* képesek a dentin-pulpa komplex létrehozására, a DPSC-khez hasonlóan. Különleges tulajdonságuk, hogy neurogén indukció nélkül is kifejeznek számos neurogén markert, ilyen a nesztin,  $\beta$ 2-tubulin és GFAP (46). Kifejezik az oszteogén markerek közül az ALP, BSP, DSP, MEPE valamint a CD-24, bFGF, Flg, MUC18 markereket is (45). A CD-34 és CD-45 hematopoetikus markerre ezek a sejtpopulációk is negatívak (5, 47).

Fentebb láthattuk, hogy a fog eredetű őssejtek magas proliferációs aktivitással rendelkeznek, valamint *in vitro* és *in vivo* differenciációs képességük is meglehetősen sokrétű, éppen ezért az elmúlt években a sejtek karakterizálását követően a kutatások már a potenciális alkalmazási lehetőségek felé irányulnak (17, 48, 49).

#### **1.3.4. Fog eredetű őssejtek alkalmazási lehetőségei a regeneratív terápiában**

A fog eredetű őssejtek alkalmazására több lehetőség kínálkozik mind a fogorvoslás, mind pedig az általános orvoslás területén. A fogorvosláson belül a pulparegeneráció az egyik legérdekesebb aspektus. Gyerekfogászatban, még nem záródott apexű (gyökércsúcsú) de traumán átesett éretlen fogakon alkalmazzák például azt a módszert, hogy a gyökéri pulpa eltávolítását követően egy apró túsúrással apikálisan vérszivárgást indukálnak, ezzel mobilizálják a fogban és az apikális papillában található őssejteket. Ezáltal olyan, pulpához nagyon hasonló szövet jöhet létre a fogban, ami által az apex záródása befejeződhet. A módszer a regeneratív endodoncia nevet viseli (50).

A másik, fogorvosláson belüli igen fontos terület a parodontológia (amely a fogágy egészségével foglalkozó szakág), ugyanis a csontvesztés megállítása, esetleges visszafordítása nagyon lényeges cél. KI és munkatársai autológ (saját) PDL őssejtek hatását vizsgálták a csontdefektusokra, és esettanulmányuk szerint az őssejtek *in vivo* elősegíthetik a csontfejlődést (51). A periimplantitisz következtében létrejött csontvesztés és ennek a regenerációja kapcsán szintén folyt kutatás ligamentum-őssejtek alkalmazásával. Az eredmények azt mutatják, hogy habár létrejött a gyógyulás, nem tapasztaltak szignifikáns különbséget a kontroll csoport (szemipermeábilis membrán és koagulum) és az őssejteket is tartalmazó csoport (kollagén scaffold és PDLSC-k) között (52). Ezen felül ígéretes eredmények születtek DPSC sejtek esetében, kraniofaciális csontdefektusok gyógyulásának vonatkozásában is (53).

A SHED és DPSC őssejtek csont irányú differenciációs képességük mellett kiemelt neurogén differenciációs potenciállal rendelkeznek, éppen ezért számos kutatás irányul az ilyen jellegű regeneratív potenciáljuk kihasználására (54). Mindkét sejtípus *in vivo* neuroprotektív hatást mutatott gerincvelő átmetrészt követően (48), illetve nemrégiben elindult egy tanulmány is, amelynek során stroke-on átesett betegeken



vizsgálják DPSC-k regeneratív hatásait. A kutatás TOOTH (*The Open study Of dental pulp stem cell Therapy in Humans*, Nyílt vizsgálat a pulpa eredetű őssejtek humán terápiás hatásairól) néven indult 2016-ban és jelenleg is folyik (55). A DPSC-k korábbi állatkísérletek szerint cerebrális transzplantációt követően elősegítik az endogén idegi progenitorok migrációját és proliferációját, valamint pozitív hatással vannak a vaszkulogenezisre is (56). A DPSC-k *in vitro* dopaminerg neuronok létrehozására is képesek, amely a Parkinson-kór vonatkozásában egy igen lényeges felfedezés, hiszen lehetőséget teremthet a betegség során elpusztuló dopaminerg neuronok pótlására (57).

Az előzőekben ismertetett terápiák mellett a fog eredetű őssejtek immunszuppresszív potenciálja is jelentős, mely számos területen kihasználható. Autoimmun encephalomyelitis (58), akut respiratorikus distress szindróma (59), rheumatoid arthritis (60) valamint szisztémás lupus erythematosus (61) kezelése során is biztatóak az eredmények, amelyeket a sejtek immunmodulátor hatásának tulajdonítanak (28). A DPSC és SHED sejtek képesek ezen felül inzulintermelő, hasnyálmirigy szigetsejt-szerű struktúrákat is létrehozni, ami immunmodulátor képességükkel együtt ígéretessé teszi őket a diabétesz sejt-terápiájában is (62).

Mindezek mellett a DPSC-knek fontos szerepe lehet a későbbiekben miokardiális infarktuson átesett betegek gyógyításában is: *in vivo* kísérletekben ugyanis csökkentették az infarktusos terület méretét, elősegítették az angiogenezist és jelentős javulást indukáltak a szív működésben is (63).

A PDL őssejtek lehetséges szerepére ínregenerációban nemrégiben született egy *in vivo* tanulmány. Ennek kapcsán világossá vált, hogy a sejtek elősegítik a szövetérést, növelik a kollagénszálak szervezettségét, valamint a megfelelő sejtmorfológia kialakulását is Achilles-ín átmetszést követően patkányokban (64).

Egy 2017-es *in vivo* kutatás szerint PDL őssejtek képesek retina-degenerációs megbetegedésekben a fotoreceptor-vesztés késleltetésére, valamint a retinastruktúra és retinafunkciók megőrzésére (49).

Látható tehát, hogy számos területen kaphat teret a fog eredetű őssejtek alkalmazása. A legtöbb esetben azonban pusztán a sejt implementációja nem elég: szerkezeti elemek, illetve biológiai mediátorok is szükségesek a megfelelő eredmény eléréséhez. Szövetek pótlásánál, regenerálásánál ugyanis rendkívül fontos, hogy olyan

háromdimenziós környezetet biztosítsunk a sejtek számára, amely - utánozva a fiziológias állapotokat - megfelelő körülményeket teremt a növekedésükhöz és szaporodásukhoz.

#### 1.4. Szövetámaszok

A sejtek természetes körülmények között a sejtközötti állományban, az ún. extracelluláris mátrixban (ECM) vannak jelen, amely fehérjékből és szénhidrátokból felépülő komplex hálózat. Az ECM elsődlegesen kollagénszálak rostos hálójából áll, alátámasztást nyújt a sejteknek és biztosítja a szövet megfelelő szakítószilárdságát. Az elasztin teszi lehetővé a mátrix nyújthatóságát, a proteoglikánok pedig vízmegkötő képességükkel és kompressziós stabilitás biztosításával járulnak hozzá a rendszerhez. Számos glikoprotein is található még a mátrixban, melyeknek a sejtadhézió és migráció irányításában van szerepe (65). Az ECM alapvető feladata tehát, hogy szerkezetet, támaszt adjon a sejteknek, de ezen felül számos biológiai folyamat szabályozásában is részt vesz, mint például az embrionális fejlődés, a véralvadás, a gyulladás vagy az angiogenezis. Az ECM szerkezete a környezethez alkalmazkodva folyamatosan változik, lebontásáért a mátrix metalloproteázok felelősek, újraképződésének iránya pedig mindig az adott fiziológias körülmények függvénye (66).

Ahhoz, hogy a regenerációs terápia folyamán komplex szöveti struktúra alakulhasson ki, olyan szerkezeti elem alkalmazása szükséges, amely a sejtek proliferációját, migrációját esetleges differenciációját segíti elő, illetve támaszként és rögzítőként szolgál. Ezeket az anyagokat együttesen szövetámaszoknak nevezzük (67). Mivel a sejtek szaporodása és differenciálódása az élő szervezetben az ECM-ben játszódik le, ezért a szövetámaszoknak ehhez minél hasonlóbb mikrokozmetet kell kialakítaniuk. Az ideális szövetámasznak emiatt számos tulajdonsággal kell rendelkeznie: lehetővé kell tennie a sejtek kitapadását, migrációját, szaporodását, a növekedési faktorok megfelelő helyre való szállítását, valamint az optimális tápanyag és oxigénellátást, ezen felül biokompatibilisnek és biodegradábilisnek kell lennie. Mivel a különböző sejtípusok eltérő környezetet részesítenek előnyben szaporodásuk illetve differenciálódásuk során, ezért az előzőekben említett tulajdonságok optimalizálása az adott sejtípushoz szintén fontos feladat (9).

A szövettámaszok fizikai és kémiai tulajdonságai nemcsak a sejtek, hanem a befogadó környezet szempontjából is lényegesek. A szövettámasz mechanikai tulajdonságait úgy kell kialakítani, hogy kompatibilis legyen az őt körülvevő szövetekkel, de ellenálljon az esetlegesen fellépő stresszhatásoknak. A szövettámasz anyagának kiválasztása függ a kívánt eredmény fizikai és kémiai sajátosságaitól, befolyásolhatja az adott szövet reológiai viselkedése, mechanikai tulajdonságai, felületi érdessége, porozitása, vagy akár a kialakuló bomlástermékek is (19). A szövettámaszok ezen tulajdonságai a sejtek differenciációs útvonalát, ezáltal a szövet kialakulását is befolyásolhatják. A letapadás során a sejtek mechanikus visszajelzést kapnak a környezetükből mechanotranszdukció útján, amire a citoszkeleton és a morfológia megfelelő változásával reagálnak (68). Csontszövet képzésekor a merevebb szövettámasz a megfelelő választás, ha azonban a kívánt struktúra lágyszövet, rugalmas vagy viszkoelasztikus szövettámasz használata az előnyösebb (69, 70).

A szövettámasz porozitásának mértéke szintén fontos faktor lehet a szövetregeneráció kialakulásának folyamatában. A pórusok nagysága és mennyisége lényeges a permeabilitás szempontjából, ami hatással van a sejtek kitapadására, a tápanyagok diffúziójára és a szövetek benövésének mértékére. A pórusméret növelése pozitív hatással van a sejtek növekedésére, csökkentheti azonban a szövettámasz szilárdságát (71-73). Hogy milyen célra pontosan milyen pórusméret az ideális, azt Annabi és munkatársai határozták meg: neovaszakulizációra a megfelelő méret 5  $\mu\text{m}$ , a hepatociták növekedésére 20  $\mu\text{m}$ , felnőtt emlős bőr regenerálására 20-125  $\mu\text{m}$ , a csont regenerálására pedig 100-350  $\mu\text{m}$  (71).

A biodegradabilitás szintén fontos faktor lehet a regeneratív terápia során. Ebből a szempontból felszívódó és nem felszívódó szövettámaszokat különböztethetünk meg. Ideális esetben a szövettámasz lebomlik, szinkronban az új szövet formálódásával. A bomlás során nem képződhet toxikus termék, a bomlástermékeknek pedig minél gyorsabban fel kell szívódnuk, hogy az immunválasz kialakulásának lehetőségét minimálisra csökkentsük. A degradáció nem változtathatja meg szignifikánsan a természetes pH-t sem, mert nagymértékű csökkenés vagy növekedés veszélyezteti a környező szöveteket és sejteket (74). Az irodalomban éppen ezért nagyon sokféle anyagot találhatunk szövettámaszként, ezek közül kiemelkednek azok, amelyeknek az alapvető összetevője valamilyen természetes vagy szintetikus polimer molekula (9).

Természetes anyagok közül elsősorban az extracelluláris mátrix alkotóelemei alkalmasak szövetátmaszk kialakítására. A kollagén, a fibrin, a poliszacharidok és a glükózaminoglikánok (GAG) is alkalmazhatóak a sejtek számára szövetátmaszként, előnyük, hogy megfelelő kémiai környezetet alakítanak ki a sejtek számára. Kihívást jelent azonban, hogy nehéz reprodukálható struktúrát előállítani belőlük, és a mechanikai tulajdonságaik is gyengék, ezért például az ortopédia területén, ahol nagyobb terhet kéne viselniük, limitált a felhasználhatóságuk. Természetes poliszacharidokat, mint az alginát, a dextrán vagy a cellulóz, illetve ezekre épülő struktúrákat egyaránt alkalmaznak szövetátmaszként, például gingivából származó mezenchimális őssejtek, vagy csontszövet esetén (75-77).

A szintetikus polimerek használatának több előnye is van a természetes eredetűekkel szemben, mint például a reprodukálható előállításuk, pontosabban megtervezhető kémiai és fizikai tulajdonságaik, azonban sokszor nem biodegradálisek, illetve bomlástermékeik alacsony biokompatibilitással rendelkeznek (78). Gyakran használt szintetikus szövetátmaszkok a poliészterek, poliuretánok és poliéterek. Előbbire példa a politejsav (PLA), a poliglikolsav (PGA) és a polikaprolakton (PCL), amelyeknek előnye biodegradabilitásuk, valamint, hogy bomlástermékeik a szervezetben előforduló természetes anyagok, ezáltal kiürülésük könnyű és gyors (79).

A mesterséges szövetátmaszkok egy speciális csoportját képezik a hidrogélek, amelyek vizsgálatára az elmúlt évtizedekben számos kutatás irányult (80-83). Ennek oka, hogy a hidrogélek mind struktúrájukban, mind összetételükben hasonlítanak a természetes ECM-re, amely kiemelten alkalmassá teszi őket az őssejtekkel közös terápiás alkalmazásra. (84).

#### **1.4.1. Hidrogélek szövetátmaszként történő alkalmazása**

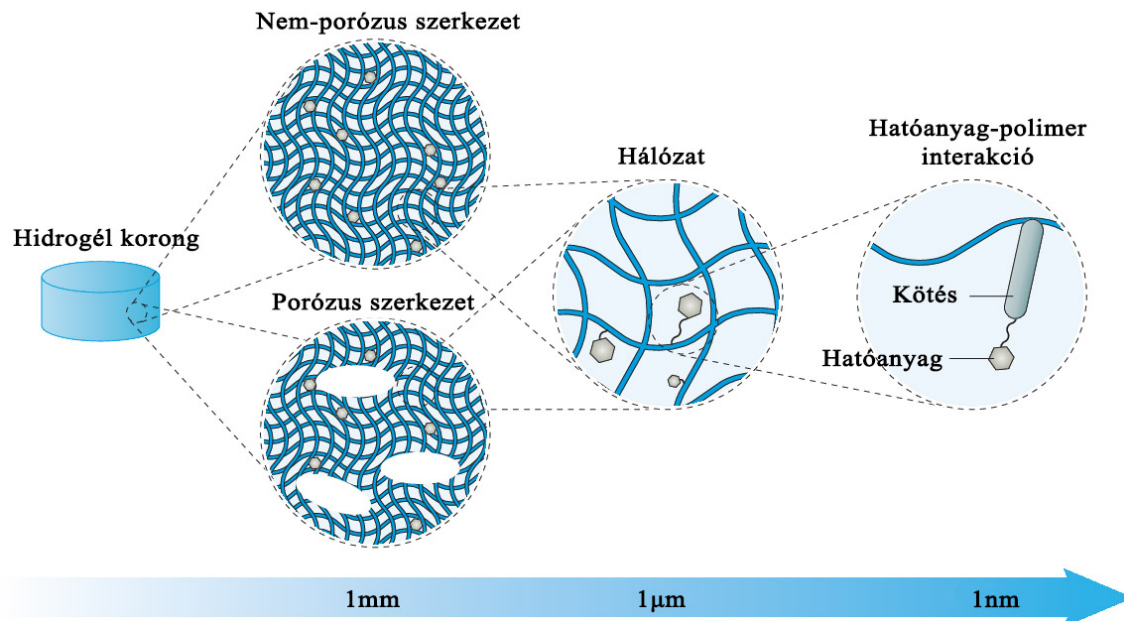
A hidrogélek kétkomponensű rendszerek, amelyek egy polimer térhálóból és az ezt kitöltő folyadékból (víz vagy vizes oldat) állnak. A folyadék kifeszíti a térhálót, tartást biztosítva a rendszernek, míg a térháló a folyadékot magába zárva megakadályozza annak spontán kifolyását. A hidrogélek tehát rendelkeznek a folyadék és a szilárd halmazállapotú anyagok tulajdonságaival is (72).

Az alapján, hogy a polimer térhálót milyen kötések tartják össze, különféle

géleket különböztethetünk meg. Amennyiben a polimer láncok között kovalens kötések vannak jelen, kémiai hidrogélről beszélünk. Ezek a kötések kialakíthatóak egyrészt keresztkötő molekulákkal (pl.: polivinil-alkohol keresztkötése glutáraldehiddel), vagy a polimerizációs folyamat során kialakuló elágazásokkal (pl.: polietilén-imin) (85). A másik típus a fizikai hidrogél. Ez esetben a van der Waals erők, hidrogénkötés, ionos kötés, micella vagy kristályképződés, vagy ezek kombinációi szerepelnek összetartó erőként. Ezek a másodrendű kötések hő hatására felbomlanak, így a fizikai hidrogélek instabil rendszerek, ellentétben a kémiai kötést is tartalmazó gélekkel. Bizonyos gélekben megtalálható mind a két kölcsönhatás típus, ezeket attól függően, hogy melyik kölcsönhatás a domináns, fizikai-kémiai, illetve kémiai-fizikai géleknek nevezzük (8, 85).

A hidrogélek csoportosítása ezen felül történhet például anyaguk, töltésük, degradabilitásuk vagy szerkezetük alapján is. Anyaguk alapján beszélhetünk szintetikus vagy természetes, töltésük alapján pedig semleges, kationos, anionos vagy amfifil gélekről. Szerkezet alapján megkülönböztethetünk amorf vagy szemi-kristályos géleket, valamint homopolimer, kopolimer, blokk-kopolimer vagy multipolimer hidrogéleket, lebomlási tulajdonságaik alapján pedig degradábilis vagy nem degradábilis géleket. Háromdimenziós szerkezetük alapján elkülöníthetünk mátrix, film, membrán, mikrogömb és makrokapszula hidrogéleket is (8, 67, 72).

A hidrogélek kémiai, fizikai, reológiai és diffúziós tulajdonságai több hasonlóságot is mutatnak az élő szervezeteket felépítő szövetekkel és a sejt közötti állománnyal, ami alkalmassá teheti őket szövetámaszként való használatra (8). Ilyen paraméter például a magas víztartalom és a lágyszövetekhez hasonló viszkoelasztikus tulajdonság. Emellett a kémiai gélek a környezet paramétereinek megváltozására válaszreakciót mutatnak, ami különösen a sejt – ECM kommunikáció megvalósulása szempontjából fontos (86). Alaktartóak, deformálhatóak, de képesek formájuk megtartása mellett az adott anyagra jellemző mértékig duzzadni. A sejtek migrációja, és a tápanyagok, valamint az oxigén diffúziója is megvalósulhat bennük. Emellett biokompatibilisek valamint biodegradábilisek lehetnek, az alap-polimer tulajdonságaitól függően. Bizonyos típusaik létrehozhatóak injektálható formában is, és könnyen köthetőek rájuk különböző hatóanyagok, ezért alkalmazásuk a gyógyszer-célbajuttatás és a szövetépítés területén is eredményesnek ígérkezik (13, 72, 87, 88). (3. ábra)



### 3. ábra

*A hidrogélek makroszkópos és mikroszkópos szerkezete, és a hatóanyag konjugáció lehetősége (89)*

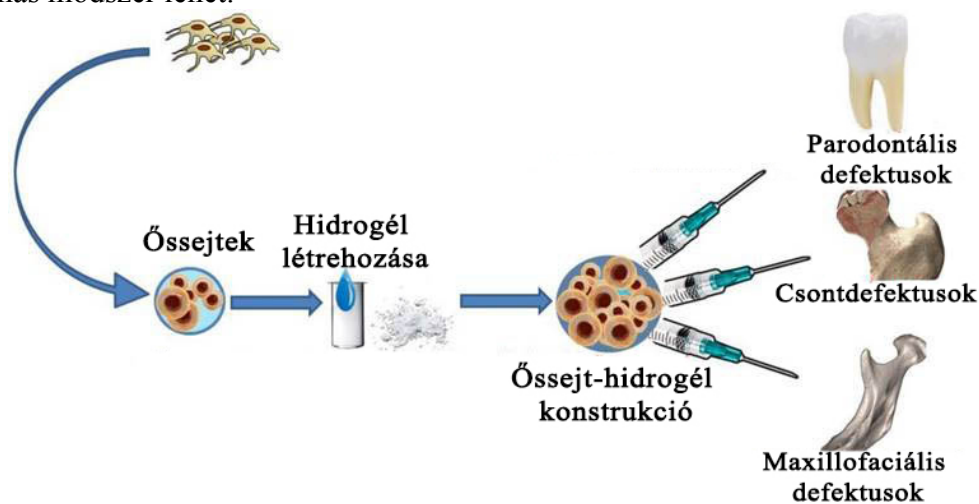
Az ECM-hez való kémiai hasonlóság, ahogy fentebb említettem, növelhető a polimer összetételének gondos kiválasztásával: a hidrogél előállításához érdemes lehet aminosav alapú polimert alkalmazni, hiszen az ECM alapját képező fehérjék és poliaminosavak is aminosavakból épül fel, ezáltal a hasonlóság tovább növelhető (90). Az ilyen típusú polimerek további előnye, hogy ezek a polipeptidek feladatuk végeztével a szervezetben is megtalálható aminosavakra bomlanak, ami biztosítja a biokompatibilitást és biodegradabilitást.

A különböző keresztkötők alkalmazásával, valamint a polimer láncon végzett módosításokkal kialakíthatunk olyan csoportokat a gélben, amelyek növelik a sejtek adhézióját (például RGD (arginin-glicin-aszpartát) peptidszekvencia) (84, 91, 92). Az RGD-szekvencia a szervezetben igen gyakran (például a kollagénben is) megtalálható tripeptid szakasz, amely az integrin típusú receptorokon keresztül elősegíti a sejtkapcsolódást és ezen keresztül közvetve a proliferációt és differenciációt (92). Ez biológiai szempontból rendkívül fontos, hiszen a sejtekkel való kommunikáció ezeken a kötőhelyeken keresztül valósulhat meg igazán. Kollagén és fibrin hidrogéleknél ez relatíve egyszerű, hiszen ilyenkor a felület eleve tele van potenciális kötőhelyekkel. Más

szintetikus géleknél (például agaróz vagy alginát) azonban ezek nincsenek meg, így valamilyen oligopeptid, például az előbb említett RGD-szekvencia beépítésével biztosítják a kötőhelyek meglétét. Számos más molekula is beépíthető a hidrogélekbe, attól függően, hogy mi a cél: ha például csontszövet formálásának irányába kívánunk elmenni, úgy kalcium és foszfát ionok kombinált beépítése, alkalikus foszfatáz enzim hidrogélhez kötése ajánlott. Ezek hatását savas peptidek és a megfelelő növekedési faktorok (BMP-2, PDGF, FGF-2) beépítésével lehet növelni (93, 94).

A hidrogélek merevsége a sejtek adhéziójára, vándorlására és differenciációjára is hatással van. A gélek merevsége a kifejezetten lágytól (0,1 kPa alatt) a kiemelten merevig (kb. 500 kPa) terjedhet. Attól függően, hogy mi a preferált differenciációs irány, más és más gélmerevséget érdemes alkalmazni (84). A merevség változtatható a polimer molekulák között létrehozott keresztkötések mennyiségével, illetve a polimer molekula hosszának változtatásával egyaránt. Emellett, az anyagon belül inhomogenitást létrehozva az anyag merevségében, befolyásolható a sejtek migrációs útvonala (95).

Látható tehát, hogy a hidrogélek számos olyan tulajdonsággal rendelkeznek, amelyek alkalmassá teszik őket a regeneratív terápiában való alkalmazásra, s ezen tulajdonságok könnyen testre is szabhatóak attól függően, hogy milyen sejtípussal kívánjuk őket alkalmazni, illetve milyen szövet létrehozása a cél. A fogorvoslás területén például parodontium, valamint csontdefektusok regenerációjának van kiemelt jelentősége (100) (4. ábra), amire a hidrogélek és fog eredetű őssejtek kombinálása alkalmas módszer lehet.



4. ábra

*Szövetépítés hidrogélek és őssejtek felhasználásával a fogorvoslásban (96)*

*In vitro* kísérletekre hidrogélek és fog eredetű őssejtek kapcsán csak néhány példát találhatunk a szakirodalomban. Galler és munkatársai eredményei szerint DPSC és SHED sejtek képesek proliferálni és differenciálódni amfifil, peptid hidrogélek belsejében (97), SHED sejtek pedig magas életképességet és migrációs potenciált mutatnak multidomén peptid hidrogélekben (98). A munkacsoport további eredményei szerint a DPSC és PDL őssejtek képesek megtapadni és szaporodni polietilén-glikol tartalmú, fibrin alapú hidrogéleken, és oszteogén aktivitás is megfigyelhető volt mindkét sejtípus esetében (99). Diniz és munkatársai kísérletei során DPSC sejtek magas proliferációs rátát és oszteogén, valamint adipogén differenciációs aktivitást mutattak *Pluronic*® F-127 (polietilén-oxid, polipropilén-oxid és polietilén-oxid tri-blokk kopolimerjei) hidrogélekbe ágyazva (100). Egy másik kísérlet során DPSC őssejtek esetében 1-es és 2-es típusú kollagén hidrogél szövettámaszokat hasonlítottak össze, amelynek során mindkét típus megfelelőnek mutatkozott a sejtek tenyésztésére és kondrogén irányú differenciáltatására (101). Vizsgálták PDL őssejtek proliferációs és differenciációs potenciálját hialuronsav-alginát hidrogéleken (102), valamint BMP2-t tartalmazó metoxipolietilén hidrogéleken (103) és háromrétegű nanokompozit hidrogéleken is (104). Előbbi kísérlet a kondrogén, utóbbi két kutatás oszteogén irányra koncentrált, és minden esetben sikerült kimutatni a kontroll csoporthoz képest magasabb differenciációs aktivitást.

A hidrogélek általános orvosi alkalmazására is több példa akad az irodalomban: készítenek belőlük például hatóanyag-szállító rendszereket, amelyek különleges tulajdonsága, hogy képesek elnyújtott és kontrollált hatóanyag-leadásra. Készülnek belőlük továbbá implantátumok is, mesterséges bőr, keményszöveti protézisek vagy membránok mesterséges szervekbe (87, 105-108).

#### **1.4.2. Poliaszparaginsav (PASP) alapú hidrogélek**

A hidrogélek alkalmazhatóságának, hasonlóan más szövettámaszokhoz, fontos feltétele a biokompatibilitás és a biodegradabilitás. Emiatt találunk egyre több példát poliaminosav alapú hidrogélek alkalmazására, amelyek speciális csoportját jelentik a poliaszparaginsav alapú hidrogélek (109).

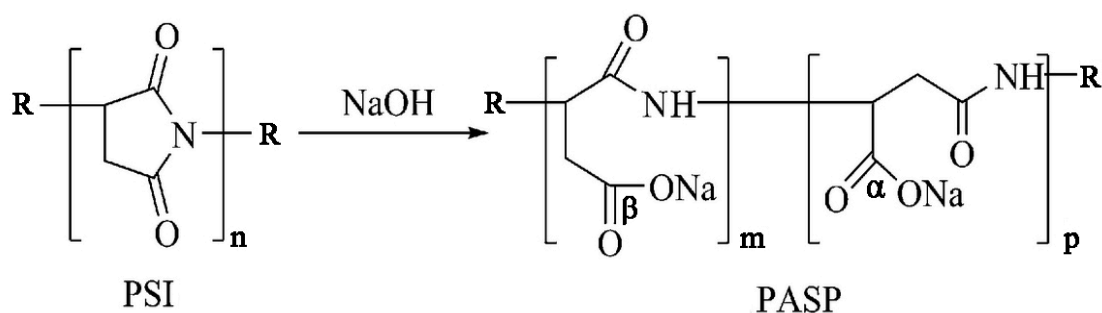
A poliaszparaginsav (PASP) egy szintetikus, biodegradábilis poliaminosav. Utóbbi tulajdonsága abból adódik, hogy az aszparaginsav monomer egységei peptid kötéssel



kapcsolódnak egymáshoz, amely kötés a szervezetben megtalálható több enzim által is felbontható. A felhasználási területe meglehetősen széles körű, orvosi alkalmazási lehetőségek között van a szövetátmaszként, illetve a célzott hatóanyagszállítás céljára való felhasználás is (110).

A PASP regeneratív terápiában való alkalmazása ígéretes, hiszen pozitív hatással bír keményszöveti sejtek túlélésére, letapadására: ezt bizonyítja Cai és munkatársai kutatása, akik politejsav filmeket módosítottak PASP segítségével, majd patkány oszteoblasztokat tenyésztettek a felületen. Eredményeik szerint a PASP nem csak a sejtek proliferációját és életképességét, de oszteogén differenciációs potenciálját is elősegíti (111). Összeeseng ezzel Liu és munkatársai vizsgálata is, akik szintén PASP módosított szövetátmaszok biokompatibilitását vizsgálták patkány csontvelői őssejtek segítségével. A szövetátmaszok támogatták az őssejtek túlélését, s az előbb idézett vizsgálathoz hasonlóan, az oszteogén differenciációs potenciált is (112).

PASP alapú hidrogélek létrehozására több lehetőség kínálkozik. A gélek leghatékonyabban két lépésben szintetizálhatóak: az aszparaginsav termikus polikondezációja révén poliszukcinimid állítható elő foszforsav katalizátor jelenlétében, majd a létrejött poliszukcinimid (PSI) lúgos hidrolízise PASP-ot eredményez. (5. ábra)



5. ábra

*PASP előállítása PSI hidrolízise révén. Az n, m, és p betűk a polimerizációs fokot jelölik ( $n = m + p$ ) (109)*

Habár az irodalomban előfordul példa a közvetlen szintézisre is, ez azonban költséges, és kisebb molekula tömeget eredményező eljárás (113). Meg kell említeni azonban, hogy a poliszukcinimid nem oldódik vízben, így a géleket szerves közegben, dimetil-formamidban vagy dimetil-szulfidban lehet előállítani vagy módosítani (114).

PSI és PASP gélek szintézisére egy másik lehetőség is rendelkezésre áll, ennek során először egy funkciós csoport kerül kialakításra a polimeren, majd hidrolízis

segítségével PASP forma alakul ki, végül pedig egy fizikai vagy kémiai behatás indukálja a gélesedést. Ezzel a módszerrel állítottak elő tiol oldalláncot tartalmazó PASP hidrogélt Gyarmati és munkatársai, ahol oldat fázisban a tiol oldalláncok oxidálódnak, aminek következtében szol-gél átmenet játszódik le (114).

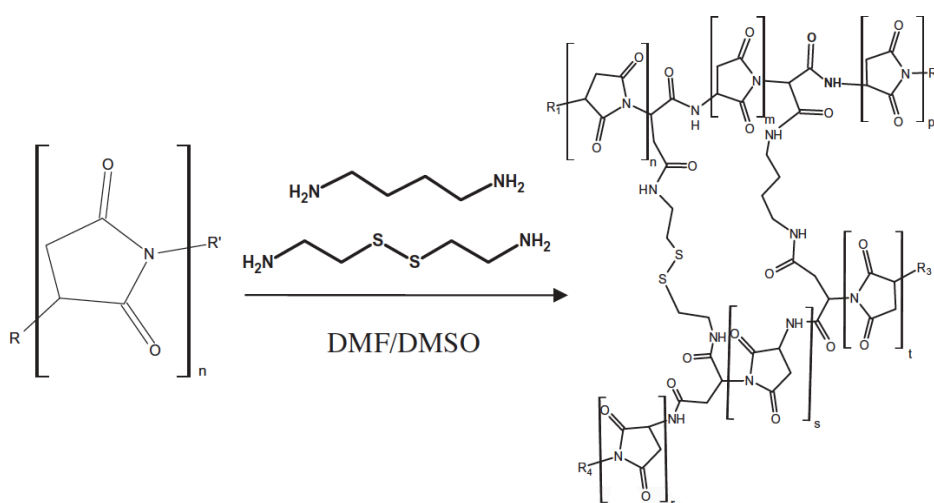
### 1.4.3. Poliaszparaginsav alapú gélek módosítási lehetőségei

A poliaszparaginsav alapú hidrogélek két lépésben történő szintézisének egyik előnye, hogy a PSI a PASP-pal ellentétben könnyen reakcióba vihető primer amin csoportokat tartalmazó vegyületekkel, így a polimer tulajdonságai széles skálán változtathatóak. A polimerhez dopamint kötve például adhezív tapaszként használható gél jön létre (115), de a gél oldhatósága, vagy mukoadhezív tulajdonsága is befolyásolható különböző oldalláncok létrehozásával (116-118).

A gélek biokompatibilitása, ahogy korábban említettem, rendkívül fontos, amennyiben szövettámaszként szeretnénk őket használni. Érdekes tehát keresztkötőként olyan molekulákat alkalmazni, amelyek természetesen is megtalálhatóak a szervezetben: ilyen például a diaminobután, vagy putreszcin. A diaminobután aminosavak lebomlásakor keletkezik, és szerepe lehet a sejtproliferációban, elősegíti az oszteogén differenciációt csontvelői őssejtekben (119), illetve gyulladáscsökkentő hatását is kimutatták *in vivo* (120). Sejtproliferációt elősegítő hatása miatt néhány kutatócsoport már alkalmazta korábban szövettámaszok elkészítéséhez (121, 122), s stabilitása miatt Dr. Zrínyi Miklós és munkatársai a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézetének Nanokémiai kutatócsoportjában 2012 óta alkalmazzák keresztkötőként poliaszparaginsav alapú hidrogélekben (123).

A cisztamint, ami egy szerves diszulfid, számos kutatócsoport alkalmazta már szövettámaszok elkészítéséhez (124-127). A benne lévő gyenge diszulfid kötések hasításával, és ezáltal szabad tiol-csoportok létrehozásával változtathatóak a gélek kémiai tulajdonságai. A tiol-csoportok képesek *in vivo* diszulfid hidak képzésére, ezért a tiol funkcionált polimerek kiválóan kötődnek sejtfelszíni fehérjékhez, míg a redukált tiolok az emlős sejtek felületén fontos szerepet játszanak az oxidáló szerek elleni védelemben, és részt vesznek a sejtek jelátvitelében is (128). Az irodalomban található példa a szövettámaszok ilyen jellegű módosítására Matsusaki és munkatársai vizsgálata, akik diszulfid keresztkötött poliglutaminsav hidrogéleket hoztak létre, amelyek alkalmasnak

bizonyultak egér L929 sejtek 3D tenyésztésére (124). Hasonló sejtekkel végzett kísérletet Zhao és munkacsoportja is, akik diszulfid keresztkötött alginát hidrogéleket szintetizáltak, amelyek biokompatibilisnek bizonyultak (127). MG-63 oszteoszarkóma sejtvonal alkalmazásával vizsgálták különböző fizikai- kémiai tulajdonságokkal bíró poliaszparaginsav alapú hidrogélek biokompatibilitását Juriga és munkatársai, ennek során világossá vált, hogy a tiol-tartalmú gélek támogatják legjobban a sejtvonal proliferációját (84). (6. ábra)



### 6. ábra

*PSI láncok térhálósítása DAB és a CYS molekulák segítségével (123).*

A sejtproliferáció és kitapadás elősegítésére lizin (LYS) is alkalmazható keresztkötőként. A lizin a fehérjékben megtalálható 20 természetes aminosav egyike, poliaminosav formában (poli-L-lizin, poli-D-lizin) számos munkacsoport használta fel szövettámaszok szintetizálására (129-132). Fog eredetű őssejtekkel való vizsgálatokra is találunk példákat az irodalomban: Fu és munkatársai humán fogpulpa sejtek életképességét, proliferációját is differenciációs potenciálját vizsgálták poli-L-lizint is tartalmazó zselatin szövettámaszokon. Eredményeik szerint a DPSC-k nemcsak fokozott kitapadási és proliferációs hajlamot mutattak ezeken a szövettámaszokon, de az oszteogén irányú differenciációs potenciáljuk is nőtt (133). Galli és munkatársai vizsgálatai megerősítik ezt: kísérletükben az implantátumok készítéséhez széles körben használt titánium-6-alumínium-4-vanádium (Ti6Al4V) felületet kezeltek poli-L-lizinnel, ami fokozta a sejtek kitapadását, valamint az oszteogén irányú differenciációs markerek

kifejeződését is a sejtekben (134). A lizin monoaminosav formájában, keresztkötként is használható szövetámaszokban, azonban az ilyen jellegű alkalmazására egyelőre nem található példa az irodalomban.

A poliaminosav alapú hidrogélekhez más molekulák is köthetők oldalláncként, ezáltal szélesebb tér nyílik a gélek tulajdonságainak befolyásolására. A dopamin például az emberi testben természetesen előforduló jelátviteli molekula, amelynek szisztémás, gyógyulást elősegítő hatása széles körben ismert. Az L-dopamin a hipofízisben található dopaminerg rendszereket stimulálva megemeli a plazma növekedési hormon szintjét, ezáltal segítve elő a regenerációt (135). A szisztémás hatáson kívül azonban úgy tűnik, a dopamin helyi, gyógyulást és sejtproliferációt elősegítő hatással is rendelkezik, például a fogak esetében is: Baudry és munkatársai tanulmánya szerint pulpasérüléskor a vérlemezkékből felszabaduló dopamin a DPSC sejtek  $D_1$  és  $D_3$  receptorán keresztül jelátvitel révén fontos szerepet tölt be a dentinregenerációban (136). A dopamin gyógyulást elősegítő hatását támasztja alá Jones és munkatársai *in vivo* vizsgálatai is, amelyek során patkány mandibula defektusok gyógyulását figyelték meg 6 héten keresztül L-dopamint kapott, illetve kontroll csoportokban. Az L-dopamint kapott csoportban több állat esetében figyelték meg teljes gyógyulást a kontroll csoporthoz képest, eredményeik szerint tehát az L-dopamin elősegítette csontdefektusok regenerációját (137). Dopamint tartalmazó szövetámaszok vizsgálatára is találunk példát az irodalomban: több kutatócsoport vizsgálta őket csont irányú szövetépítés kapcsán is, a kísérletek eredményei arra mutatnak, hogy a dopamin tartalmú szövetámaszok elősegítik a sejtproliferációt valamint mineralizációt (138, 139). Fog eredetű őssejtek tényésztésére dopamin tartalmú hidrogéleken azonban még nincsen példa az irodalomban.

## 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 diamino-bután** 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 szövetámaszként a regeneratív terápiában.

### 3. MÓDSZEREK

#### 3.1. Alkalmazott anyagok és eszközök

A Minimal Essential Medium Alpha-t ( $\alpha$ MEM), foszfát puffert (PBS), penicillint és sztreptomocint, valamint a tripszin-EDTA keveréket az Invitrogen-től vásároltuk. A Vybrant DiD fluoreszcens jelölőanyagot a Molecular Probes-től rendeltük. A főtális borjú szérumot (FBS) a Gibco-tól vásároltuk. Az L-aszcorbinsav-2-foszfátot,  $\beta$ -glicerofoszfátot, dexametazont, L-glutamint, kollagenáz IA enzimet, 2-amino-2-metil-1-propanolt (AMP), az Alkaline Phosphatase Liquid Yellow Substrate-ot (ALP Yellow) és egyéb vegyi anyagokat a Sigma-Aldrich-től rendeltük. A WST-1 reagenst [2-(4-Iodofenil)-3-(4-nitrofenil)-5-(2,4-diszulfófenil)-2H-tetrazolium] a Roche-től vásároltuk.

Alkalmazott eszközök: Párásított inkubátor (Nuaire, USA), 100 mm-es tenyésztőedények (Orange Scientific, Belgium), 48 lyukú lemezek (Sigma-Aldrich, St.Louis, Missouri), low cell binding (letapadást nem támogató) 96 lyukú lemezek (Nunc<sup>TM</sup> Dishes, St.Louis, Missouri), microplate reader (Model 3550, Bio-Rad Laboratories, Japan), fáziskontraszt mikroszkóp (Nikon Eclipse TS100, Nikon, Japan), nagyteljesítményű CCD kamera (COHU, USA), Scion image szoftver, kétfoton mikroszkóp (Femto2d, Femtonics, Hungary), SpectraPhysics DeepSee lézer, MES4.4v program, STATISTICA 10 szoftver (Statsoft, USA).

#### 3.2. Fog eredetű összejtek tenyésztése aminosav alapú hidrogéleken

##### 3.2.1. Alkalmazott hidrogélek

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

Az aszparaginsav magas hőmérsékleten és alacsony nyomáson történő termikus polikondenzációja révén előbb poliszukcinimidet (PSI) állítottunk elő. A szukcinimid monomerek nukleofil csoportokat tartalmazó vegyületekkel könnyen reakcióba vihetőek,

így lúgos hidrolízisük révén poliaszparaginsav jön létre. Kapcsolhatóak hozzá funkciós csoportok is, amennyiben primer amin csoportot tartalmazó vegyületet használunk: például a dopamin is tartalmaz ilyen amin csoportot, így a polimer és a dopamin között peptid kötések alakulnak ki. Kettő vagy több funkciós aminokkal keresztkötéseket is létrehozhatunk a polimer molekulák között (84). Amennyiben különböző keresztkötő illetve módosító molekulákat alkalmazunk, úgy könnyen változtathatóak a kapott hidrogél fizikai és kémiai tulajdonságai. A kísérletek során emiatt a polimer térháló kémiai szerkezetét (keresztkötők típusa és mennyisége) változtatva vizsgáltuk, hogy melyek azok a funkciós csoportok, valamint kismolekulájú anyagok, amelyek elősegítik a sejtek letapadását a gél felszínére. A térhálósító molekulák kémiai szerkezetének, valamint mennyiségének változtatásával a gélek merevsége befolyásolható, ezenkívül elősegíthető a sejtek bejutása a polimer mátrixba, így háromdimenziós sejttenyésztés valósítható meg. Célunk olyan kémiai szerkezet kialakítása volt, amely ezt a legnagyobb mértékben segíti elő.

A gélek előállításának első lépése tehát PSI gélek létrehozása volt, ennek során PSI 25m/m% oldatát kevertük össze az adott géltypustól függő keresztkötő molekula DMSO-s oldatával. A keveréket ezt követően henger alakú keretbe öntöttük, és egy napig hagytuk gélesedni. Egy nap után a géleket DMSO-ba helyeztük, hogy kimosódjanak a reakcióba nem lépett molekulák, illetve a gél is ekkor vette fel egyensúlyi térfogatát. A PASP gélek szintéziséhez a DMSO-ban duzzasztott géleket lúgos imidazol pufferbe (pH=8, c=250 mM) helyeztük. Hogy a hidrolízis teljes egészében végbemenjen, a puffert 3 napig naponta cseréltük. A keresztkötések ezen a pH-n stabilak maradtak.

Kísérletünkben a keresztkötőként alkalmazott anyagok a diaminobután (DAB), a cisztamin (CYS) és a lizin (LYS) voltak, ezen felül dopamint (DOPA) tartalmazó géleket is szintetizáltunk. A cisztamin diszulfid hídjainak felszakításával ciszteamin (CYSE) keletkezett, így szabad tiol-csoportok jöttek létre a polimer gélben. A diszulfid hidak tiol csoportokká való redukálásához ditiotreitolt (DTT) oldatot alkalmaztunk. Amennyiben a gél cisztamint tartalmazott, az elegyhez DBA-t is adtunk a cisztamin hidrokloridból származó hidroklorid megkötéséhez.

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 kísérletekben használt gélek listája az 1. táblázatban látható.

### 1. táblázat

*A kísérletek során használt gélek listája.*

<b>CYS és DAB keresztkötött gélek</b>	<b>Tiol tartalmú gélek</b>	<b>CYS és LYS keresztkötött gélek</b>	<b>Dopamin tartalmú gélek</b>
DAB 1/20	CYSE 1/2 -DAB	CYS 0% -LYS	DOPA 1/10 - CYSE-DAB
CYS 1/20	CYSE 1/5 -DAB	CYS 20% -LYS	DOPA 1/20 - CYSE-DAB
CYS-DAB 1/20	CYSE 1/10 -DAB	CYS 40% -LYS	
CYSE-DAB 1/20	CYSE 1/20 -DAB	CYS 60% -LYS	
DAB 1/40	CYSE 1/40 -DAB	CYS 80% -LYS	
CYS 1/40	CYSE 1/80 -DAB	CYS 100% -LYS	
CYS-DAB 1/40		CYSE 20% -LYS	
CYSE-DAB 1/40			

A korábban kidolgozott protokoll (84) alapján a kísérletek megkezdése előtt minden esetben előkezeltük a géleket: 3 órán keresztül tenyésztő tápoldatban áztattuk őket, 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.

#### 3.2.2. Sejtek izolálása és tenyésztése

A foggyökérhártya eredetű őssejteket humán bölcsességfogakból izoláltuk, melyekből tenyészeteket hoztunk létre és tartottunk fent kutatócsoportunk korábban publikált protokolljaik szerint. A sejtek kolóniaformáló képessége, proliferációs és differenciációs képessége korábbi kísérletek során már kimutatásra került (28, 140).

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 27 alkalommal. Az etikai engedély száma:



17458/2012/EKU. A fogeltávolítást követően a fogakat tenyésztő tápoldatba helyeztük, majd azt átszállítás után azonnal megkezdtük a szövetek izolálását. Caries profunda vagy pulpakamráig hatoló mechanikai sérülés esetén a baktérium kontamináció veszélye miatt a fog nem került feldolgozásra. A foggyökérhártya-szövetet steril körülmények között izoláltuk, majd I. típusú kollagenáz-oldatban (1 mg/ml) emésztettük 1 órán keresztül, 20 percenként vortexelve. Az enzimátikus emésztést követően 21G-s tüvel mechanikusan fellazítottuk, majd 5 percen keresztül centrifugáltuk a mintákat 250g gyorsulás mellett. A felülúszó eltávolítását követően a sejteket tenyésztő médiumban felfuszpendáltuk, majd tenyésztő edénybe ültettük.

A sejteket standard körülmények között (100% páratartalom, 37 °C, 5% CO<sub>2</sub>-dal dúsított levegő) tartottuk  $\alpha$ MEM alapú tápoldatban, amely 2 mM glutamint, 100 U/ml penicillint, 100 $\mu$ g/ml sztreptomocint és 10% főtális borjú szérumot is tartalmazott. Hetente kétszer végeztünk tápcserét, ennek során a tenyésztő médium felét (Petri csésze használata esetén 10 ml-ből 5 ml-t) cseréltük le friss médiumra. A tenyészet szubkonfluenssé válását követően a kontakt gátlás kialakulását megakadályozandó, passzálás történt: a sejteket a tápoldat leszívását majd PBS-es mosást követően 0,25% tripszint és 0,2% EDTA-t tartalmazó oldattal kezeltük, majd 10 perc inkubációs idő letelte után 4-szeres mennyiségű friss tápoldattal semlegesítettük az emésztő oldatot. Ezután szükség szerinti mennyiségben mértük át a felfuszpendált sejteket tartalmazó oldatot a friss tenyésztőedénybe, leggyakrabban 1: 10 vagy 1: 20 arányban.

A sejtek fagyasztása során passzálást követően a sejteket 1,5 ml 10% DMSO-t tartalmazó standard tápoldatba szuszpendáltuk fel, majd gumitömítéssel ellátott fagyasztócsövekbe helyeztük őket, amelyen jelöltük a pontos sejtszámot. A csöveket egy nagy hőkapacitással bíró termosztáló folyadékkal (általában izopropanollal) feltöltött fagyasztó tégelybe tettük, amit 24 órára -80 °C-os hűtőbe helyeztünk. Ezt követően a csöveket a folyékony nitrogénes tartályba tettük.

A sejtek felolvasztása később szükség szerint történt, a lehető legrövidebb idő alatt. Ennek során a fagyasztócsöveket 37 °C-os vízfürdőbe helyeztük, majd a felolvadt sejtsuszpenziót centrifugacsövekbe mostuk. 250 g mellett, 5 percig való centrifugálás után a felülúszót eltávolítottuk a csövekből, a sejt pelletet friss tenyésztő médiumban felfuszpendáltuk, majd a szétosztottuk friss tenyésztő médiumot tartalmazó Petri csészékbe.

### 3.2.3. Fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálatok

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.

### 3.2.4. Életképesség vizsgálata

A sejtek életképességét WST-1 reagens segítségével határoztuk meg, amely a mitokondriális dehidrogenáz enzim aktivitásából adódó színreakción alapuló módszer.

A sejteket 20 000 sejt/lyuk mennyiségben ültettük ki 200 µl tápoldatban, 6 mm átmérővel rendelkező gél korongokra, 96 lyukú lemezekre. Ezek a lemezek különleges, a sejtek letapadását nem támogató bevonattal rendelkeznek (*low cell binding plate*). Ezek alkalmazásával biztosítottuk, hogy a sejtek csak a gélekre tapadjanak le, az edény aljára ne, így a géleken lévő életképes sejtek tényleges mennyiségét vizsgálhattuk. A kiültetést követő 1,3, 7 és 14 nap után mértük meg a sejtek életképességét.

PBS-el való mosást követően a WST-1 reagenst 1:20 hígításban a kiültetett sejtekre pipettáztuk, majd 37 °C-on 2 óra inkubációs időt követően megfigyeltük az oldatok színváltozását. Az életképes tenyészetek fölött az oldat sárga színreakciót adott, amelyet *microplate reader* segítségével kvantifikáltunk. Az abszorbancia mérés 450 nm-en történt, míg a referencia hullámhossz 655 nm volt.

### 3.2.5. Vybrant DiD vitális festés

A kétfoton mikroszkóp (Femtonics, Hungary) segítségével vizsgálható a sejtek vertikális irányú növekedése, vagyis, hogy képesek-e belenőni a gélek belsejébe.

A sejteket Vybrant DiD fluoreszcens festék segítségével tettük láthatóvá. A sejteket a gélekre való kiültetés előtt festettük meg: a tenyészetet 20 percen keresztül inkubáltuk 37 °C-on, 10 ml-es Petri csészében, 50 µl Vybrant DiD festéket tartalmazó szintelen tenyésztő médiumban. A kiültetést követő 1,3, 7 és 14 napot követően 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal fixáltuk őket és a vizsgálatig PBS-ben tároltuk őket 4°C-os hűtőben.

A kétfoton mikroszkóp segítségével készített képeken a gél zöld autofluoreszcenciát mutatott, míg a sejtek piros színnel jelentek meg. A képek 10× objektívvel, MES4.4v program segítségével készültek. Ennek köszönhetően pontos képet kaphattunk a sejtek elhelyezkedéséről a gélek felszínén, illetve a különböző magasságokban készített képek segítségével arról is, hogy milyen mélyen képesek bejutni a polimer mátrix belsejébe.

### 3.2.6. Oszteogén differenciáció vizsgálata

Az oszteogén differenciáció vizsgálata során az oszteogén  $\alpha$ 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-aszkorbinsav-2-foszfátot és 10 mmol/l  $\beta$ -glicerofoszfátot tartalmazott, míg a kontroll médium az tenyésztő tápoldathoz hasonló összetételű volt, egyedül az FBS mennyisége változott 10%-ról 1%-ra.

Az oszteogén differenciációt ALP (alkalikus foszfatáz) aktivitás-mérés segítségével mutattuk ki (82) a harmadik, a hetedik és a tizennegyedik napon. A sejteket a letapadásukat nem támogató, 96 lyukú lemezbe ültettük ki, 6 mm átmérővel rendelkező gél korongokra. 14 napig tenyésztettük őket passzálás nélkül, hetente kétszer cseréltünk rajtuk tápoldatot. A mérés során PBS-es mosást követően a sejteket 100  $\mu$ l 12-amino-2-metil-1-propanol (pH = 10,5) segítségével lizáltuk, majd 100  $\mu$ l ALP yellow szubsztrátot adtunk minden well-hez. 60 perc inkubációs idő leteltével a p-nitrofenilfoszfát (pNPP)  $\rightarrow$  p-nitrofenol (pNP) reakció sárga színű végtermékének abszorbanciáját *microplate reader* segítségével mértük, 405 nm hullámhosszon.

### 3.3. Statisztikai értékelés

Az életképességi vizsgálat és az ALP aktivitás mérések során kapott adatok átlagértékét számítottuk ki, ezen számítások minden esetben legalább 4 különböző kísérletről, 4 különböző betegből származó adatokkal történtek, 15-25 független kísérleti adat segítségével. A statisztikai kimutatáshoz STATISTICA 10 szoftvert használtunk, Kruskal-Wallis nem-parametrikus ANOVA alkalmazásával, amelyet median teszt követett. A különbségeket  $p < 0.05$  esetén vettük szignifikánsnak.

#### 4. EREDMÉNYEK

Vizsgálataink a következő sorrendet követték.

- Az első kísérletsorozatunkban először rövid távon vizsgáltuk cisztamin és diaminobután keresztkötésű poliaszparaginsav alapú hidrogélek biokompatibilitását foggyökérhártya eredetű őssejtek alkalmazásával. Ezt követően a három, legjobb eredményt elért géllal hosszabb távú, 14 napos mérések következtek.
- A második kísérletsorozatban a gélek tiol tartalmának hatását vizsgáltuk az őssejtek letapadására és proliferációjára.
- A harmadik kísérletsorozatban a gélek oszteogén differenciációt támogató hatását figyeltük meg.
- A negyedik kísérletsorozatban lizin és cisztamin keresztkötőket tartalmazó géleken vizsgáltuk az őssejtek letapadását és szaporodását.
- az ötödik kísérletsorozatban pedig dopamin tartalmú hidrogélek biokompatibilitását tanulmányoztuk.

#### 2. táblázat

*Az elvégzett kísérletek a használt gélek, az időtartam, valamint a vizsgált sejt paraméterek szerint.*

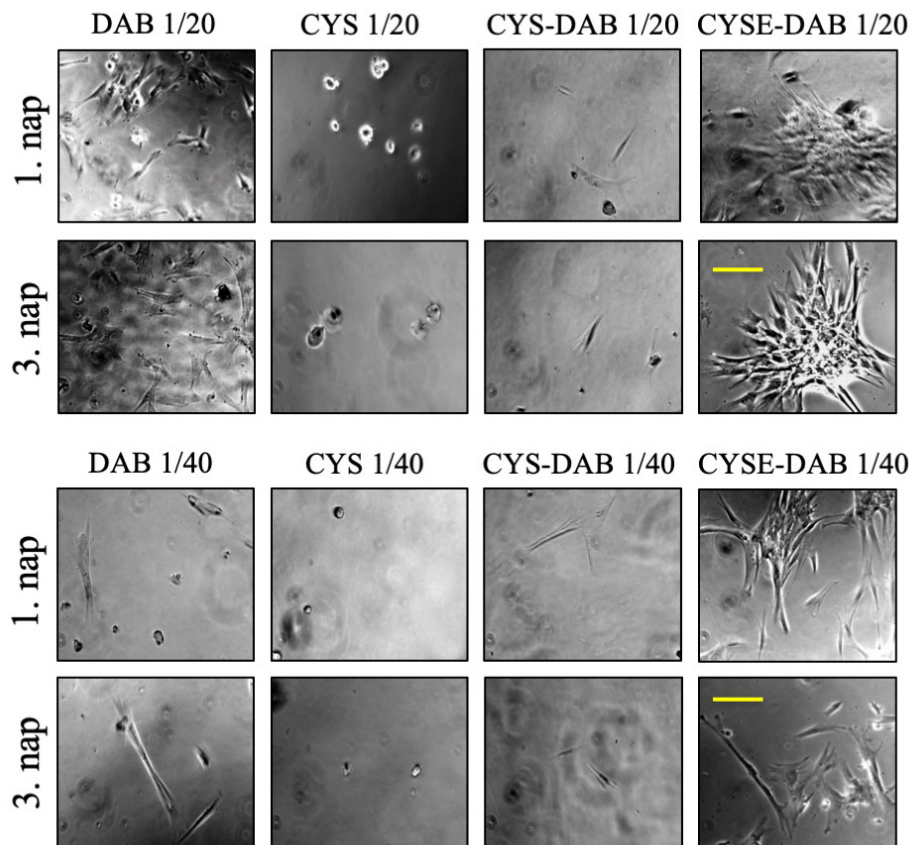
1.	CYS és DAB tartalmú gélek	Rövid távú vizsgálat	Sejt morfológia, életképesség
		Hosszú távú vizsgálat	
2.	Tiol tartalmú gélek	Hosszú távú vizsgálat	Sejt morfológia, életképesség
3.	Tiol tartalmú gélek (szükített)	Hosszú távú vizsgálat	Oszteogén differenciáció
4.	CYS és LYS tartalmú gélek	Rövid távú vizsgálat	Sejt morfológia, életképesség
5.	DOPA tartalmú gélek	Hosszú távú vizsgálat	Sejt morfológia, életképesség

#### 4.1. Fog eredetű őssejtek tenyésztése cisztamin és diaminobután kereszt kötésű géleken

##### 4.1.1. Cisztamin és diaminobután kereszt kötésű gélek 3 napos vizsgálata

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 nap tenyésztés után a merevebb (1/20-as kereszt kötési fokkal rendelkező), DAB kereszt kötésű géleken, valamint a tiol-csoportokat tartalmazó (CYSE 1/20 és 1/40) géleken egészséges, fibroblaszt morfológiájú sejteket láthattunk, számuk a merevebb, tiol tartalmú géleken látszódnak a legmagasabbnak. A tiol tartalmú géleken csak elvétve került a látótérbe gömb morfológiát felvett sejt (ami sejtadhézió hiányára utalna), és megfigyelhető volt egy enyhe, csoport-formálási tendencia is. (7. ábra)



**7. ábra**

*PDL őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe különböző PASP-alapú hidrogéleken. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.*

A vegyes keresztkötésű (CYS-DAB) géleken csak egy-egy elnyúltabb morfológiát mutató sejtet láttunk, azonban ezek sem az egészséges, fibroblaszt alakot mutatták, sokkal inkább a szenescens (előregedett) sejtek jellemzőit, amely arra utal, hogy a gélek által biztosított környezet nem támogatta a sejtek túlélését és szaporodását. A CYS keresztkötésű géleken a sejtek egyáltalán nem voltak képesek megtapadni, a látótérbe csak kis számú, felkerekedett sejt került. (7. ábra)

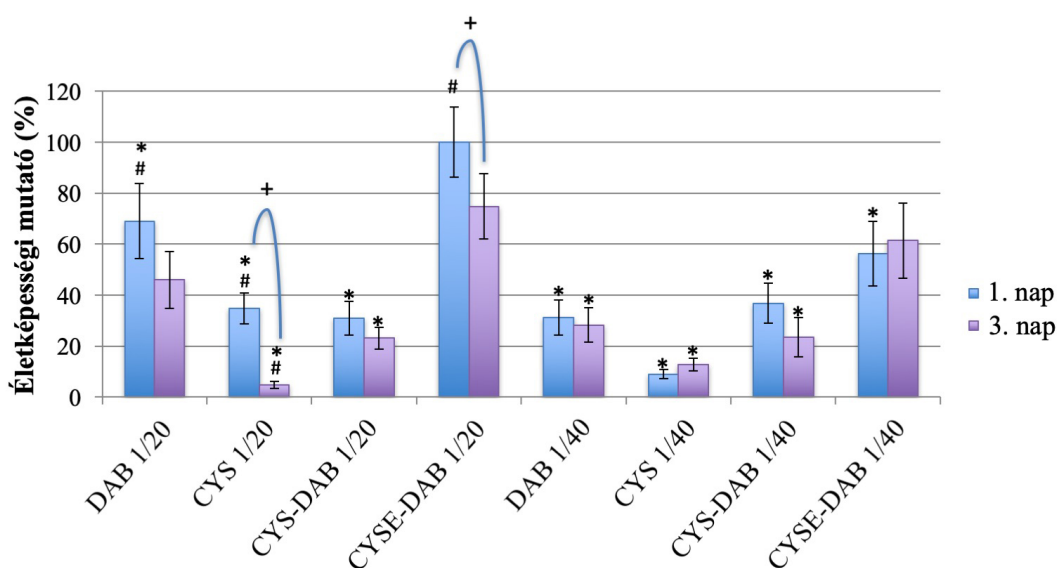
Három nap után a merevebb, DAB keresztkötésű géleken, valamint a tiol-csoport tartalmú géleken továbbra is megfigyelhetőek voltak a fibroblaszt morfológiát mutató PDLSC-k, kifejezett számbeli növekedést azonban nem tapasztaltunk. A csoportalkotási tendencia a merevebb, tiol tartalmú gélen volt a legjobban megfigyelhető. (7. ábra)

A vegyes keresztkötésű géleken már egyáltalán nem találtunk egészséges sejtet, a látótérbe elvértve került csak egy-egy aspecifikus morfológiát mutató sejt. Ezek a gélek tehát 3 nap alatt sem voltak képesek a túléléshez és szaporodáshoz megfelelő környezetet teremteni a PDLSC-k számára. A CYS keresztkötésű gélek esetében csak szórványosan láttunk egy-egy gömb alakú sejtet vagy sejtmaradványt. Ennek magyarázata, hogy az utóbbi gélek ekkorra gyakorlatilag teljesen feloldódtak a tenyésztő tápoldatban. A vegyes keresztkötésű géleken hasonló jelenséget figyeltünk meg, amely a diszulfid hidak felszakadásából bekövetkező „lágulásnak” a következménye. (7. ábra)

A merevebb és lágyabb gél-változatok közül mindkét nap a merevebb géleken láthattunk több, egészséges morfológiát mutató sejtet. Az első és a harmadik napon is a CYSE 1/20 tiol tartalmú géleken volt megfigyelhető a legmagasabb számú sejt. (7. ábra)

A gélek által teremtett környezet letapadást és szaporodást elősegítő tulajdonságát kvantitatív vizsgálat segítségével is alátámasztottuk, a kiültetett sejtek életképességének mérésével, WST-1 reagens segítségével. (8. ábra)

Egy nap inkubáció után (kék oszlopok) a merevebb, tiol tartalmú gélen (CYSE-DAB 1/20) mértük a legmagasabb életképességeket, amely szignifikánsan különbözött az összes többi gélen mért egy napos eredménytől. Kiemelkedőbb életképességi mutatót mértünk a merevebb, DAB keresztkötésű, valamint a lágyabb, tiol-csoport tartalmú géleken is. (8. ábra) Az összes többi gélen alacsonyabb volt a kiültetett sejtek életképességi mutatója, amely összecseng a fáziskontraszt mikroszkópos vizsgálat során megfigyelt eredményekkel. (7. ábra)



8. ábra

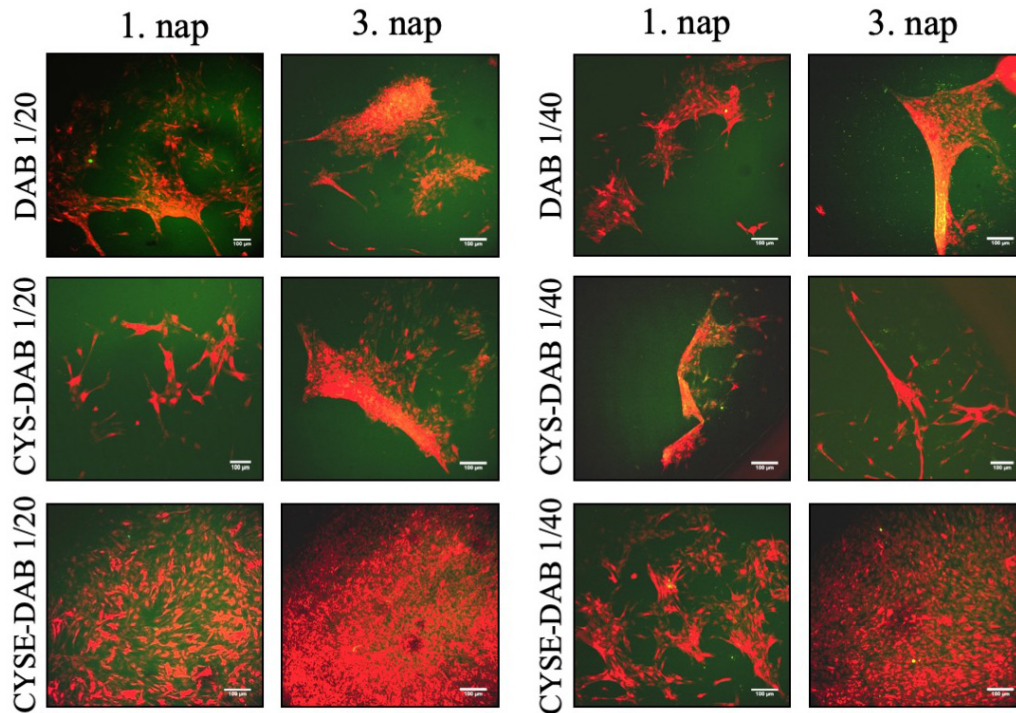
*PDL* összejtek életképességi mutatója különböző PASP-alapú hidrogéleken. A CYSE-DAB 1/20-on mért életképességek átlagértékét tekintettük 100%-nak. Az adatok számtani átlagértékét adjuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  a CYSE-DAB 1/20-hoz viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  a következő naphoz képest. #  $p < 0,05$  a lágyabb (1/40) csoporthoz képest a megfelelő időpontban.

Három nap után (lila oszlopok) még mindig a merevebb, tiol tartalmú gélek mutatták a legmagasabb életképesség-mutatót, azonban a különbség már volt nem szignifikáns a merev DAB és a lágy tiolos gélhez képest. A többi gélen megmaradt a közepes vagy alacsony életképesség. (8. ábra) A két mérési időpont között szignifikáns életképesség-növekedés nem volt megfigyelhető, a legtöbb esetben éppen ellenkezőleg, az életképességi mutató lecsökkent. Ennek pontos okát ez alapján a kísérlet alapján nem tudtuk meghatározni, ezért hosszabb távú kísérletek elvégzése mellett döntöttünk.

Vybrant DiD fluoreszcens vitális festés segítségével detektálható a sejtek vertikális irányú növekedése is a gélek belseje felé, illetve egy átfogóbb képet kaphatunk a sejtek eloszlásáról nagyobb területen. A kiültetést követő 1 és 3 nap után vizsgáltuk a géleken kitapadt sejtek morfológiáját és növekedésének irányát kétfoton mikroszkóp segítségével. (9. ábra)

A kétfoton mikroszkópiás vizsgálatok eredményei korreláltak a korábban kapott eredményekkel: a legtöbb sejtet ebben az esetben is a tiol tartalmú géleken figyelhettük meg. Az összejtek a géleken különböző méretű szigetekbe rendeződtek, a sejteket nem

lehetett egymástól elkülöníteni. A sejtszoptok között helyenként nyúlványokat is megfigyeltünk, ami sejtek közti kommunikációra utal. (9. ábra)



**9. ábra**

*PDL őssejtek kétfoton mikroszkóppal készített képei különböző merevségű PASP hidrogéleken. A képek azonos nagyításban készültek. A mérce 100  $\mu$ -t jelöl.*

Ezen kísérletek alapján tehát a tiol tartalmú (CYSE 1/20 és 1/40), valamint a merevebb DAB keresztkötésű gélek támogatják legjobban a sejtek megtapadását, valamint túlélését és szaporodását.

#### **4.1.2. Cisztamin és diaminobután keresztkötésű gélek hosszú távú vizsgálata**

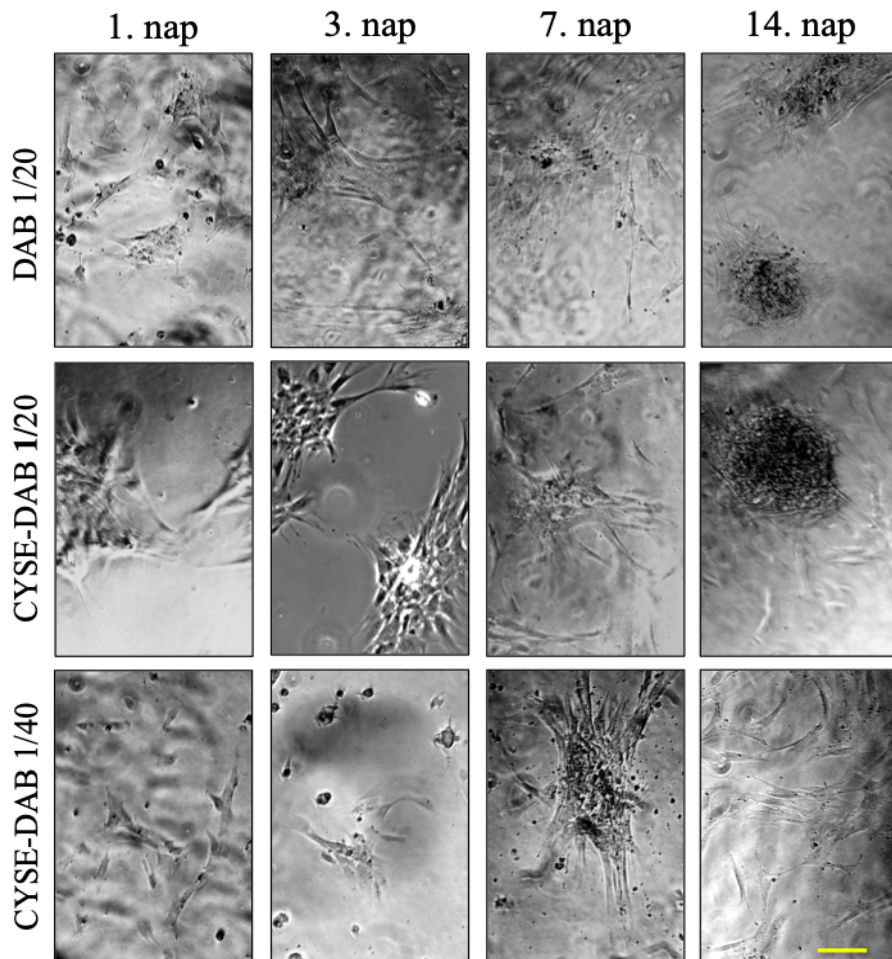
A rövid távú méréseket követően a három legjobb eredményt elért, tehát a sejtek túlélését és szaporodását leginkább támogató géltípussal dolgoztunk tovább (DAB 1/20, CYSE DAB 1/20 és CYSE-DAB 1/40), amelynek célja a gélek hosszú távú (1, 3, 7 és 14 nap) biokompatibilitásának vizsgálata volt.



Az első három nap folyamán tapasztaltak megegyeztek a korábbi kísérleteink eredményeivel: a fáziskontraszt mikroszkópos képeken a sejtek egészséges, fibroblaszt morfológiát mutattak mindhárom gél esetében. (10. ábra)

7 nap után a képeken az összes gél esetében egészséges, orsó alakú morfológiát mutató sejteket láthattunk, meglehetősen nagy számban. A tiol tartalmú géleken ezen kísérlet során is megfigyelhettük a sejtek csoportalakítási tendenciáját. (10. ábra)

14 nap után nagyszámú, csoportokba rendeződött sejteket figyeltünk meg a merevebb géleken (CYSE-DAB 1/20 és DAB 1/20). A csoportosulások meglehetősen szorosak, a sejthárak elmosódottak voltak. Ilyen jellegű sejtcsoportok alakulhatnak ki például az oszteogén differenciáció folyamata során is. A lágyabb géleken továbbra is különálló, orsó alakú sejtek voltak láthatóak. (10. ábra)



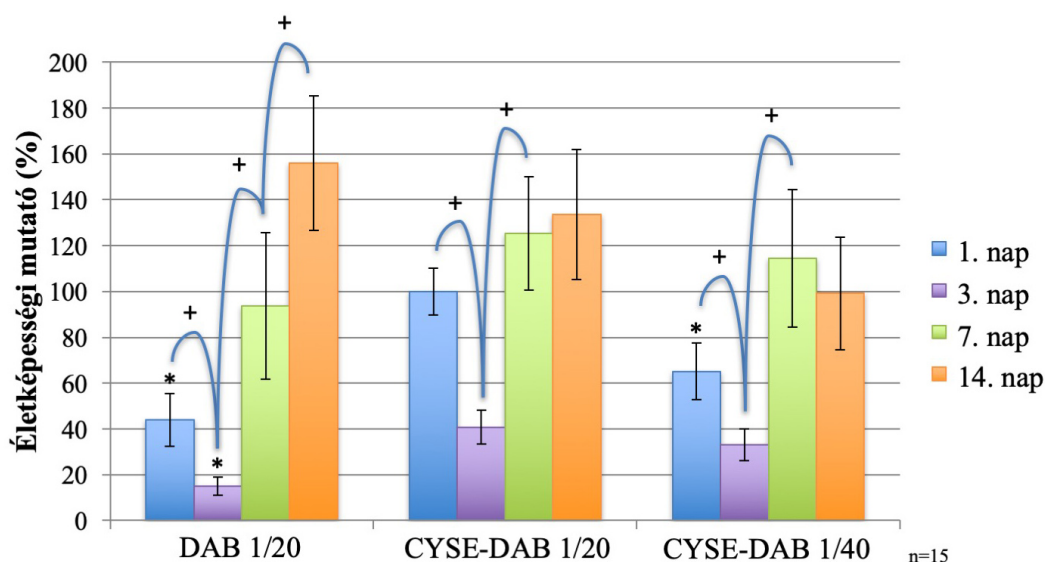
**10. ábra**

*PDL őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe különböző PASP-alapú hidrogéleken, 1,3,7 és 14 nap után. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.*

Az életképesség-vizsgálat során az első napon a merevebb, tiol tartalmú gélen (CYSE-DAB 1/20) szignifikánsan magasabb értékeket mértünk a másik két gélhez képest. 3. napon ismét megfigyeltük a mutatók csökkenését, azonban az eredmények a hetedik napon újra növekvő tendenciát kezdtek mutatni, így kimondhatjuk, hogy a csökkenés átmeneti volt. (11. ábra)

A hetedik napon nem mértünk szignifikánsan eltérő eredményeket a gélek között, de a tiol tartalmúak, különösen a merevebb (CYSE 1/20), magasabb értékeket mutatott a többi gélnél. (11. ábra)

A 14. napon további életképesség növekedést figyelhettünk meg a merevebb gélek esetében, amely a DAB-keresztötött gélnél statisztikailag is szignifikáns volt a hetedik naphoz képest. A három gél között nem tudtunk szignifikáns különbséget kimutatni a 14. napon. (11. ábra)



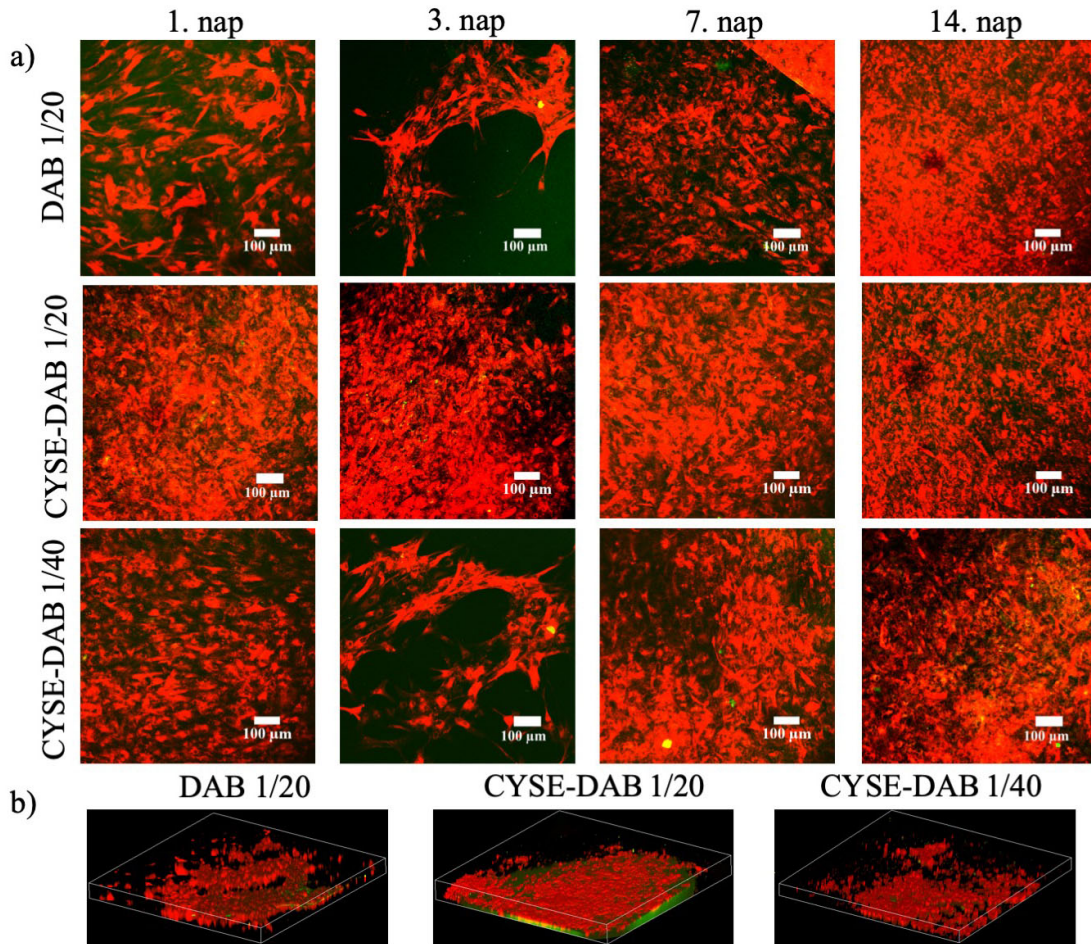
**11. ábra**

*PDL* őssejtek életképességi mutatója különböző PASP-alapú hidrogéleken. A CYSE-DAB 20-on mért életképességek átlagértékét számítottuk 100%-nak. Az adatok számtani átlagértékét adjuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  a CYSE-DAB 20-hoz viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  a következő naphoz képest.

A kétfoton mikroszkóppal készített képeken 7 és 14 nap után is megfigyelhetőek voltak a gélek belseje felé növekvő sejtek, a látótérbe minden gél esetében meglehetősen nagy számú sejt került. (12. ábra)

A megfelelő magasságokban készített fotók integrálásával háromdimenziós ún. z-stack képek készültek, amelyeken sokkal pontosabban figyelhettük meg a sejtek vertikális

irányú növekedését. A képek alapján sejtek nem csak a gél felszínén szaporodtak, hanem (feltehetően enzimatisz folyamatok révén (84)) vertikálisan, a gélek belseje felé is növekedtek. (12. b ábra)



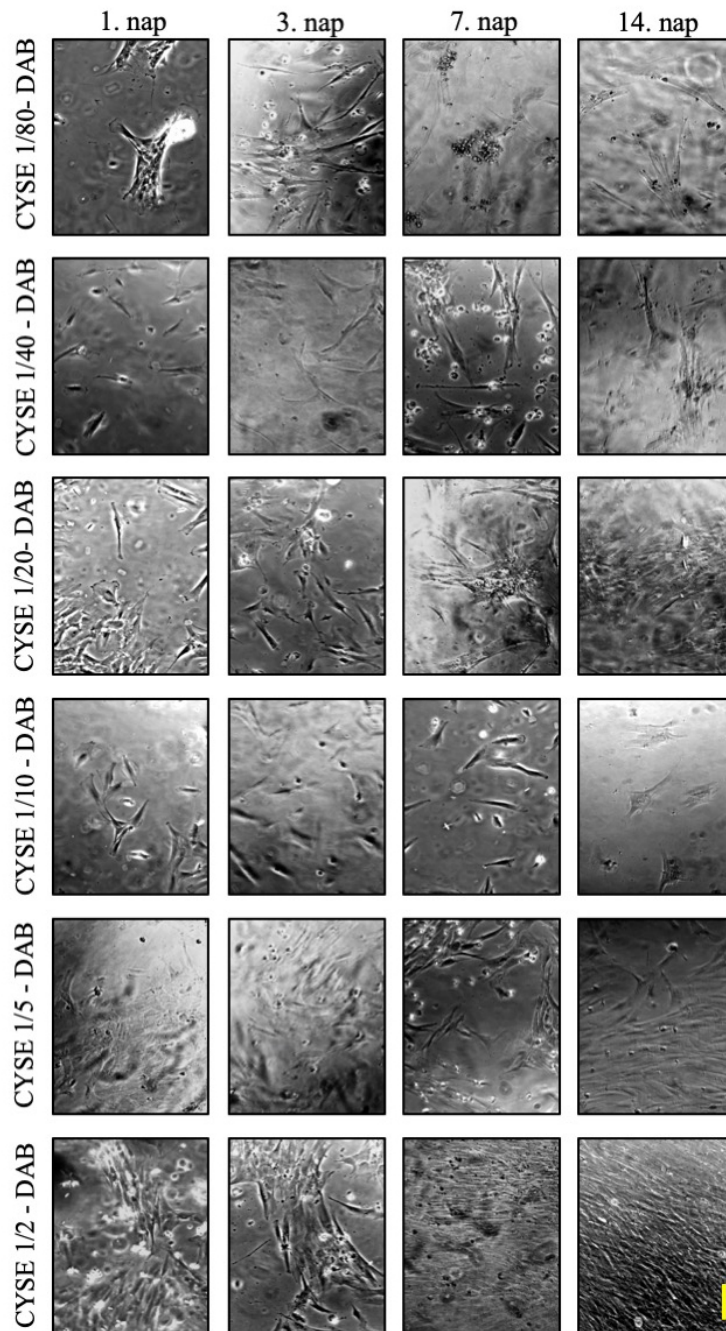
**12. ábra**

- a) PDL őssejtek két foton mikroszkóppal készített képei különböző PASP hidrogéleken.  
 b) A sejtek 3 dimenziós képe a gélek belsejében 14 nap után. A 3D képek z-mélysége 120 μm, míg az átmérő 1.7x1.7 mm. A mérce 100 μm-t jelöl.

#### 4.2. Fog eredetű őssejtek tenyésztése különböző tiol-csoport mennyiségeket tartalmazó géleken

Az előző kísérletekből látható volt, hogy a tiol-csoportok jelenléte pozitív hatással van a sejtek letapadására és növekedésére, ezért a következő kísérletsorozatban 6-féle, eltérő tiol-csoport mennyiséggel rendelkező gél vizsgáltunk. A legalacsonyabb tiol tartalmú gél (CYSE 1/80) esetében minden nyolcvanadik monomer, míg a legmagasabb

tiol tartalmú gél (CYSE 1/2) esetében minden második monomer tartalmazott tiol-csoport oldalláncot.



**13. ábra**

*PDL őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe különböző tiol-csoport mennyiséget tartalmazó PASP-alapú hidrogéleken, 1, 3, 7 és 14 nap után. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.*

Az első napon készített fáziskontraszt mikroszkópos képeken jól látható, hogy mindegyik tiol tartalmú gélen képesek voltak megtapadni és a sejtek. A PDLSC-k

nyúlványos, orsó alakot vettek fel, elenyésző mennyiségben kerültek csak a látótérbe kerek sejtek vagy sejtmaradványok. (13. ábra)

A harmadik napon megfigyeltük, hogy a magasabb tiol tartalmú gélek jobban támogatják a sejtek proliferációját, ezeken ugyanis több sejtet láthattunk, mint az alacsonyabb tiol tartalmú géleken. (13. ábra 2. oszlop)

A hetedik napra a legmagasabb tiol tartalmú gélen (CYSE 1/2) a sejtek elnyúltabb alakot vettek fel és konfluens *monolayer*-t alkottak, vagyis egy rétegben teljesen benőtték a gél felszínét a látótérben. A második legmagasabb tiol tartalmú (CYSE 1/5) gélen szubkonfluens tenyészet alakult ki. Habár nem ilyen mértékben, de a többi gélen is megfigyelhető volt a sejtek mennyiségének növekedése, amelyek továbbra is egészséges, fibroblaszt morfológiát mutattak. (13. ábra)

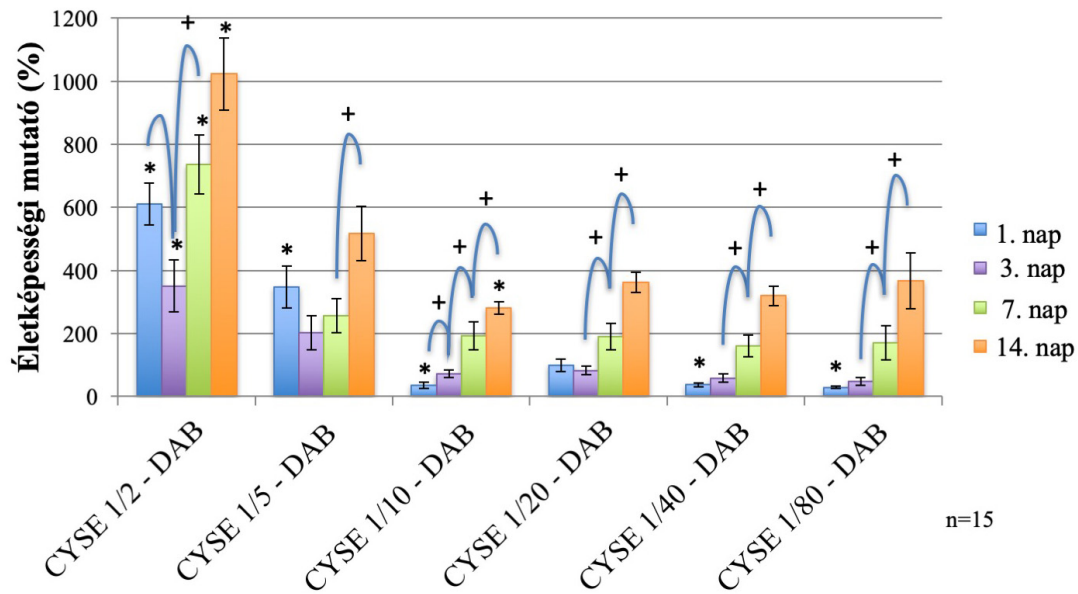
A 14. napra a két legmagasabb tiol tartalmú gélen konfluens monolayert alkottak a sejtek. A többi gélen is nagy mennyiségű, egészséges sejtet láttunk, melyek száma a tiol-mennyiség csökkenésével csökkent. (13. ábra, 4. oszlop)

Az életképesség-vizsgálat során, a mikroszkópos vizsgálatokkal összhangban a két legnagyobb tiol-csoport tartalmú gél mutatta a legmagasabb értékeket. A négy alacsonyabb tiol-tartalmú gélen hasonló, alacsonyabb életképességi mutatót mértünk. Referencia-gélként a korábbi kísérletekben használt CYSE-DAB 1/20-at használtuk. Ehhez a gélhez képest szignifikánsan magasabb életképességet a két legmagasabb (1/2 és 1/5) tiol tartalmú gélen tenyésztett sejtek mutattak. (14. ábra)

A harmadik napon ezen kísérlet esetében is megfigyelhettünk egy degressziót, ami azonban ezúttal is csak ideiglenesen állt fent. Ezen a napon is a fent említett két gél mutatta a legmagasabb életképességi értékeket. (14. ábra)

A hetedik napra mindegyik gélen magasabb életképességet mértünk a harmadik naphoz képest, ez különösen látványos volt a CYSE 1/2 esetében. (14. ábra)

A 14. napos 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. (14. ábra)



14. ábra

*PDL* őssejtek életképességi mutatója különböző tiol-csoport mennyiségeket tartalmazó PASP-alapú hidrogéleken. A CYSE-DAB 1/20-on mért életképességek átlagértékét számítottuk 100%-nak. Az adatok számtani átlagértékét adtuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  a CYSE-DAB 1/20-hoz viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  a következő naphoz képest.

A kétfoton mikroszkóppal készített képeken nagy mennyiségű sejtet figyeltünk meg a magas tiol tartalmú géleken, mindhárom mérési időpontban. A z-stack fotók alapján bizonyítást nyert a sejtek vertikális irányú migrációja a gélek belsejébe a 14. napon. (16. ábra)

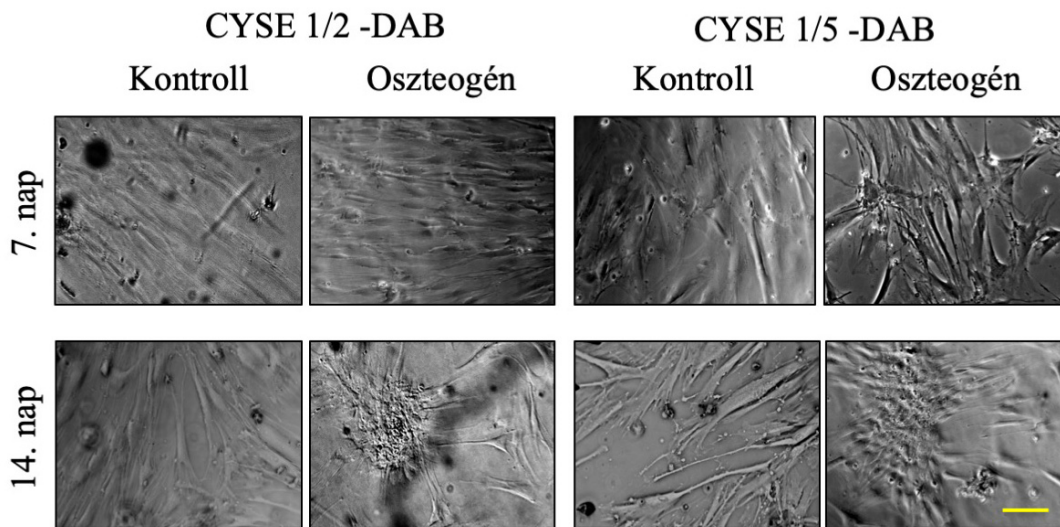
Ebből az eredményből világosan látszik, hogy a szabad tiol-csoportok mennyisége, amennyiben meghaladja a gélekben az 1/10 arányt, nem csak átmeneti, hanem hosszabb távú pozitív hatással is bír a sejtek proliferációjára migrációs képességére.

#### 4.3. Fog eredetű őssejtek oszteogén differenciációjának vizsgálata

Számos kísérlet bizonyította, hogy a PDL sejtek képesek oszteogén irányú differenciációra (22, 140-142), és korábbi kísérletek kapcsán (84) felmerült annak a lehetősége, hogy bizonyos géltípusok támogathatják ezt a hajlamot. Emiatt 4 géllal, amik kiemelkedő eredményt produkáltak a korábbi kísérletek során (a DAB 1/20 és 3 tiol

tartalmú gél, a CYSE 1/2, 1/5 és 1/20 gél), vizsgáltuk PDLSC-k spontán, illetve indukált oszteogén differenciációs képességét.

A hetedik napon készült fáziskontraszt mikroszkópos képeken mindkét magas tiol tartalmú gél esetében nagy mennyiségű, egészséges, orsó morfológiát mutató sejtet láthattunk számos nyúlvánnyal. A kontroll és az oszteogén tápoldatot kapott csoport között ezen a napon nem tudtunk jelentős különbséget megfigyelni, mind mennyiségben, mind alakban hasonló eredményt mutattak. (15. ábra)

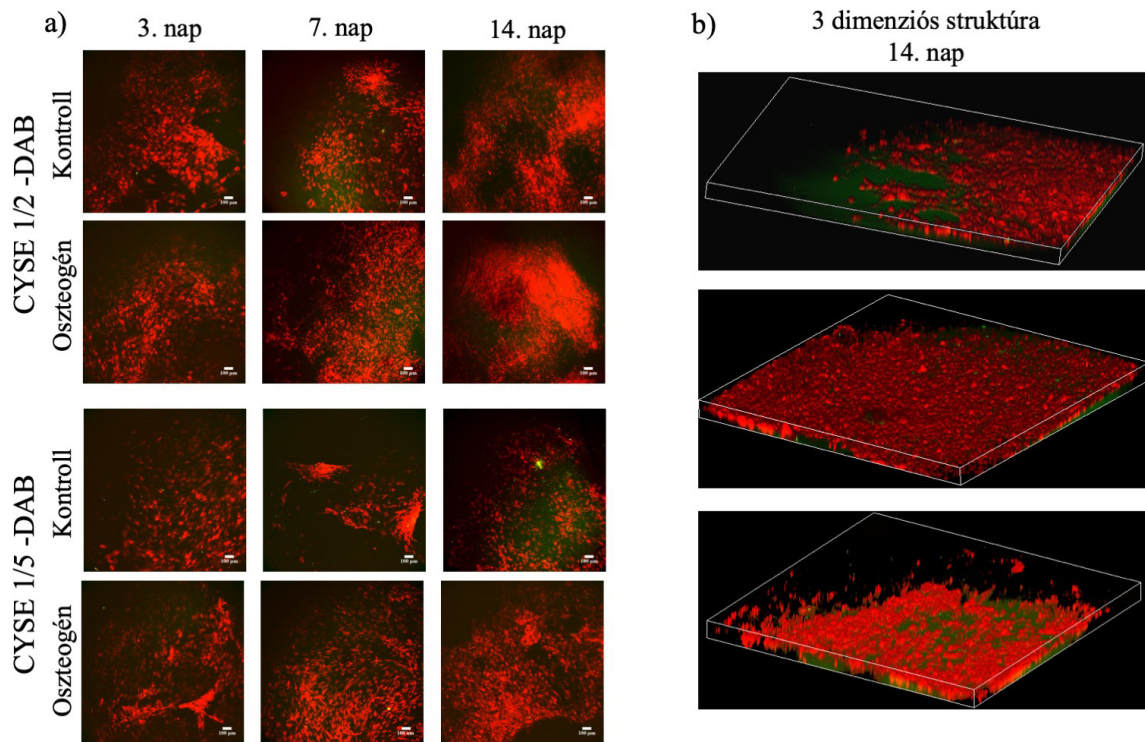


**15. ábra**

*PDL őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe az oszteogén és kontroll csoportban, PASP-alapú hidrogéleken, 7 és 14 nap után. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.*

A 14. napon szintén nagy mennyiségű, fibroblaszt morfológiájú sejtet figyelhettünk meg mindkét gél és mindkét kísérleti csoport esetében. A kontroll csoport sejtjei elnyújtottabb orsó alakot mutattak, a sejtek egymástól elkülönülve helyezkedtek el. Ezzel szemben az oszteogén csoportban megfigyelhető volt egy csoportalakítási tendencia, itt a sejtek sűrűn helyezkedtek el, és tömörebb morfológiát mutattak. (15. ábra)

A kétfoton-mikroszkóppal készített képeken már a harmadik napon jól megfigyelhető volt, hogy mindkét gél esetében a kontroll és az oszteogén csoportban is nagy mennyiségű sejt tapadt meg, illetve kezdett szaporodni a gélek felszínén. Hasonlóan nagy számú sejtet figyelhettünk meg a további napokon is, releváns különbséget azonban nem tapasztaltunk a csoportok között. (16. a ábra) A z-stack fotókon továbbá jól látható volt a 14. napon a sejtek penetrációja gélekbe. (16. b ábra)



**16. ábra**

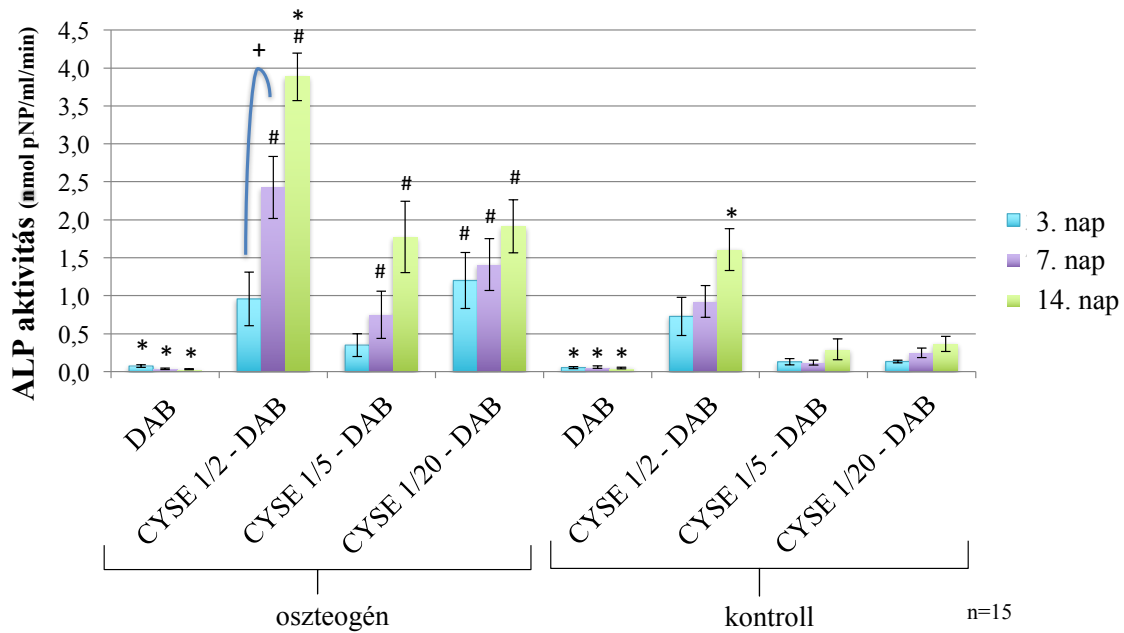
- a) Oszteogén és kontroll tápban tenyésztett PDL őssejtek kétfoton mikroszkóppal készített képei különböző PASP hidrogéleken. A mérce  $100\ \mu\text{m}$ -t jelöl.
- b) A PDL őssejtek 3 dimenziós képe a gélek belsejében 14 nap után. A 3D képek z-mélysége  $120\ \mu\text{m}$ , míg az átmérő  $1.7 \times 1.7\ \text{mm}$ .

Az oszteogén differenciáció folyamatának kvantifikálása céljából alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitás mérést végeztünk. Ennek során már az első mérési időpontban (vagyis 3 nap után) szignifikáns különbséget tapasztaltunk a gélek között. (17. ábra) A DAB 1/20 gélen tenyésztett sejtek minden csoportban minimális oszteogén differenciációs hajlamot mutattak, míg a tiol tartalmú gélek mindegyike esetében mérhető volt az ALP aktivitás az oszteogén tápoldatot kapott csoportban. A kontroll és az oszteogén csoport között szignifikáns különbséget ezen a napon csak a CYSE 1/2 esetében mértünk. A CYSE 1/2 gél esetében mind a kontroll, mind az oszteogén csoportban magasabb értékeket kaptunk, vagyis nemcsak indukált, hanem spontán aktivitás is kimutatásra került ezen a napon. (17. ábra)

A hetedik napon a DAB 1/20 továbbra sem mutatott oszteogén aktivitást egyik csoportban sem. A tiol tartalmú gélek aktivitása azonban megugrott az oszteogén csoportban, leglátványosabban a CYSE 1/2 esetében, ahol a különbség szignifikáns volt



a harmadik naphoz mért értékekhez képest. A korábban mért spontán aktivitás szintén megfigyelhető volt ezen gél esetében és enyhén nőtt is az értéke. (17. ábra)



**17. ábra**

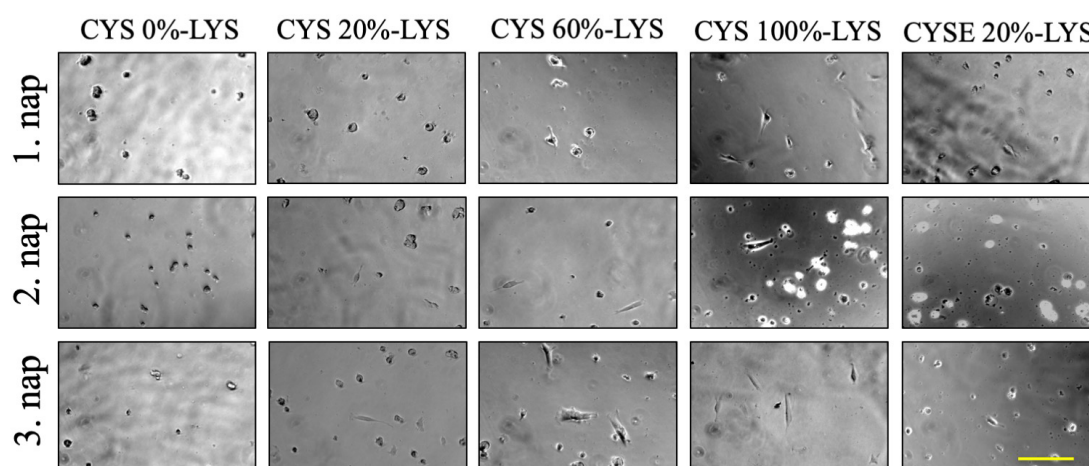
*Oszteogén vagy kontroll médiumban tenyésztett PDLSC-k ALP aktivitása PASP-alapú hidrogéleken 3,7 és 14 nap után. Az adatok számtani átlagértékét adjuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  a CYSE-DAB 20-hoz viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  a következő naphoz képest, #  $p < 0,05$  a kontroll csoporthoz viszonyítva.*

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 figyelhattunk meg az oszteogén csoportokban. A legmagasabb ALP aktivitás értéket ismét a CYSE 1/2 gél mutatta, míg a másik két géltípus között nem találtunk szignifikáns különbséget. A kontroll csoportban 3 géltípus továbbra is csak nagyon alacsony aktivitást mutatott, míg a CYSE 1/2 hasonló értékeket produkált, mint az oszteogén csoport CYSE 1/5 és 1/10 gélje. (17. ábra) Úgy tűnik tehát, hogy a gélek tiol-csoport tartalom a sejtek életképességén és letapadásán kívül hatással bír a PDL őssejtek oszteogén differenciációs hajlamára is.

#### 4.4. Fog eredetű őssejtek tenyésztése cisztamin és lizin keresztkötésű géleken

A DAB keresztkötés helyett ebben a kísérletsorozatban lizint alkalmaztunk, mivel utóbbi - mint természetes aminosav - jobb tulajdonságokkal rendelkezik biodegradabilitás szempontjából (143). Habár szövettámaszokba építve a DAB in vitro sejtproliferációt elősegítő hatással rendelkezik (121), mégis fennáll a veszélye, hogy a gélek lebomlásakor a felszabaduló diaminobután toxikus hatással bír a sejtekre (144), amely lehetőség lizin keresztkötő alkalmazásával csökkenthető vagy akár teljesen kiküszöbölhető. A gélek ebben a kísérletsorozatban minden esetben annyi keresztkötőt tartalmaztak összesen, mint az előző kísérletek merevebb géljei, ezen belül pedig különböző arányban tartalmaztak a lizint és cisztamint. A gélek nevében a cisztamin keresztkötések mennyiségét a teljes keresztkötő mennyiségére vonatkoztatva százalékos értékben adtuk meg.

A kiültetett sejtek morfológiáját az első, második és harmadik napon vizsgáltuk a gélek felszínén. Az első napon a legtöbb gél esetében hasonló morfológiát mutattak a sejtek: gömb alakú, a letapadási folyamat elejére jellemző alakot vettek fel, csak kisebb mennyiségben lehetett észrevenni nyúlványokat növesztő sejteket. Az orsó alakot mutató legtöbb sejt a kevesebb lizint tartalmazó géleken volt felfedezhető (CYS 80%-LYS, CYS 100%-LYS). (18. ábra)

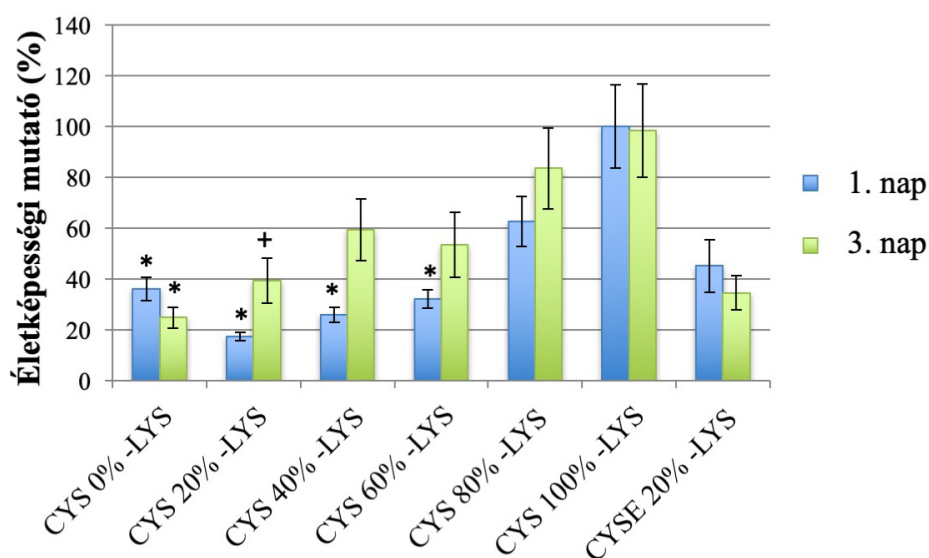


**18. ábra**

*PDL őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe különböző lizin-mennyiséget tartalmazó PASP-alapú hidrogéleken, 1,2 és 3 nap után. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.*

A második napon hasonló képeket láhattunk, de a lizint nem tartalmazó gélen (CYS 100%-LYS) már megfigyelhető volt több fibroblaszt-szerű sejt, illetve osztódásra utaló jelek is, azonban a sejtek túlnyomó többsége továbbra is felkerekedett alakot mutatott. A harmadik napon sem tapasztaltunk változást a sejtek morfológiájának vizsgálatakor. A tiol tartalmú gélen sem tudunk több, fibroblaszt morfológiát mutató sejtet megfigyelni, itt is elsősorban kerek sejtek vagy sejtmaradványok voltak láthatóak. Egyedül a lizint nem tartalmazó gélen, a CYS 100%-LYS-en volt megfigyelhető néhány orsó formát mutató sejt. (18. ábra)

Az életképességi vizsgálat eredményei a 19. ábrán láthatók. Az első napon a CYS 100%-LYS gélen (amely csak redox érzékeny cisztamint tartalmaz) tenyésztett sejtek esetében mértük a legmagasabb életképességi mutatót, amely összhangban van a fáziskontraszt mikroszkópos analízis eredményeivel. A gél típusok többségénél az első és a harmadik nap között enyhe életképesség-növekedést figyeltünk meg. Habár a CYS 20%-LYS és CYS 40%-LYS géleken az első napon alacsony volt az életképesség-mutató, ez az érték megduplázódott a harmadik napra, a 20%-os gél esetében pedig szignifikáns volt a növekedés. Az életképességi értékek alapján valószínűnek tűnt, hogy a 60-80% LYS arány vezet a legnagyobb proliferációs aktivitáshoz PDL sejtek esetében. (19. ábra)

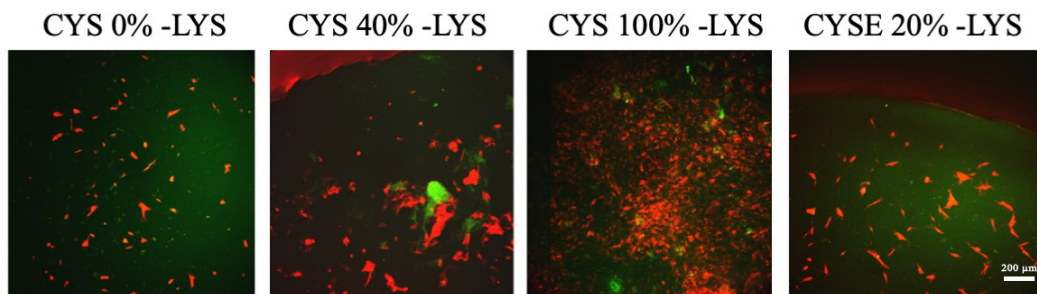


**19. ábra**

*PDL* össejtek életképességi mutatója különböző lizin keresztkötésű hidrogéleken. A 100 CYS-LYS-en mért életképességek átlagértékét számítottuk 100%-nak. Az adatok számtani átlagértékét adjuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  100 CYS-LYS -hez viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  az első naphoz képest.

A sejtek 3D mozgását és a gélmátrix-sejt kapcsolatokat kétfoton-mikroszkóp segítségével vizsgáltuk. A harmadik napon készített fotók alapján arra a következtetésre jutottunk, hogy habár kevés, aspecifikus morfológiájú sejt található csak a látótérben, ezek – mivel látható körülöttük a gél zöld autofluoreszcenciája – úgy tűnik, képesek voltak penetrálni a gélmátrixba. (20. ábra)

Az egészséges morfológiát mutató sejtek mennyisége a CYS/LYS aránnyal együtt változott, minél magasabb volt a CYS aránya, annál több sejt került a látótérbe. A legnagyobb mennyiségű sejtet a CYS 100%-LYS gélen lattuk, ami korrelál a korábbi eredményeinkkel. (20. ábra)



**20. ábra**

*PDL* őssejtek kétfoton mikroszkóppal készített képei lizin tartalmú PASP hidrogéleken a harmadik napon. A képek azonos nagyításban készültek. A mérce 200  $\mu\text{m}$ -t jelöl.

Összességében megállapítottuk, hogy sejtek csak korlátozott mértékben tudnak megtapadni és szaporodni a lizin-tartalmú géleken, így további vizsgálatot nem végeztünk velük.

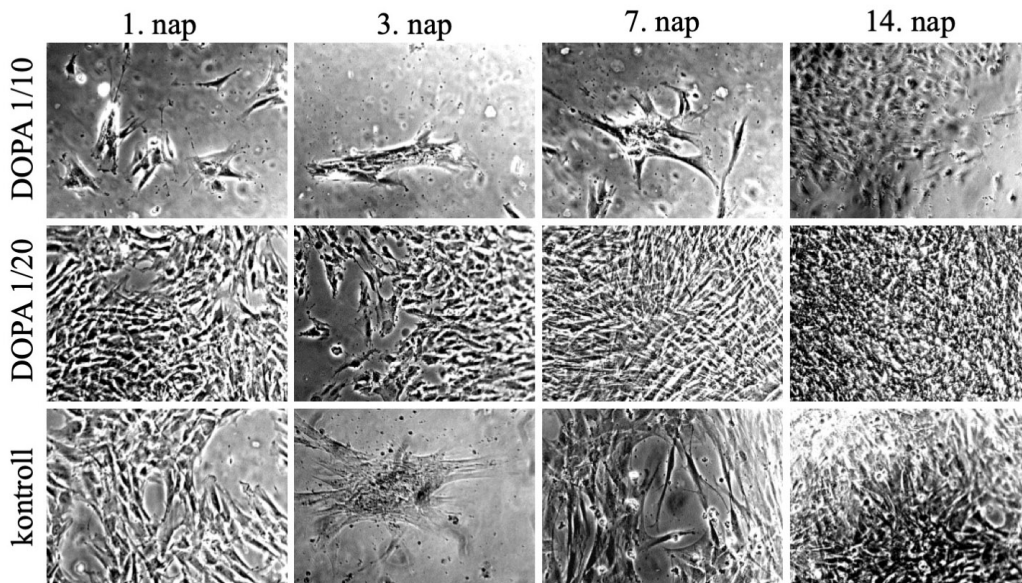
#### 4.5. Fog eredetű őssejtek tenyésztése dopamin tartalmú géleken

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

A fáziskontraszt mikroszkóppal készített képeken (21. ábra) jól látszik, hogy már 1 nap után gyakorlatilag teljesen benőtték a sejtek a gélfelszínt az alacsonyabb dopamin tartalmú gél (DOPA 1/20) valamint a kontroll esetében. A sejtek egészséges, fibroblaszt

morfológiát mutattak, proliferációjuk nagyon felgyorsult. A magasabb dopamin tartalmú gélen (DOPA 1/10) a sejtek csak korlátozottan tapadtak meg egy nap elteltével.

3 nap után az alacsonyabb dopamin tartalmú gél (DOPA 1/20) esetében konfluenssé vált a tenyészet. A sejtek sűrűn elhelyezkedve, egymáshoz szorosan tapadtak a gélek felszínén, némelyik elnyújtottabb morfológiát vett fel. A magas dopamin tartalmú gélen (DOPA 1/10) továbbra is csak nagyon kevés sejtet találtunk. (21. ábra, második oszlop)



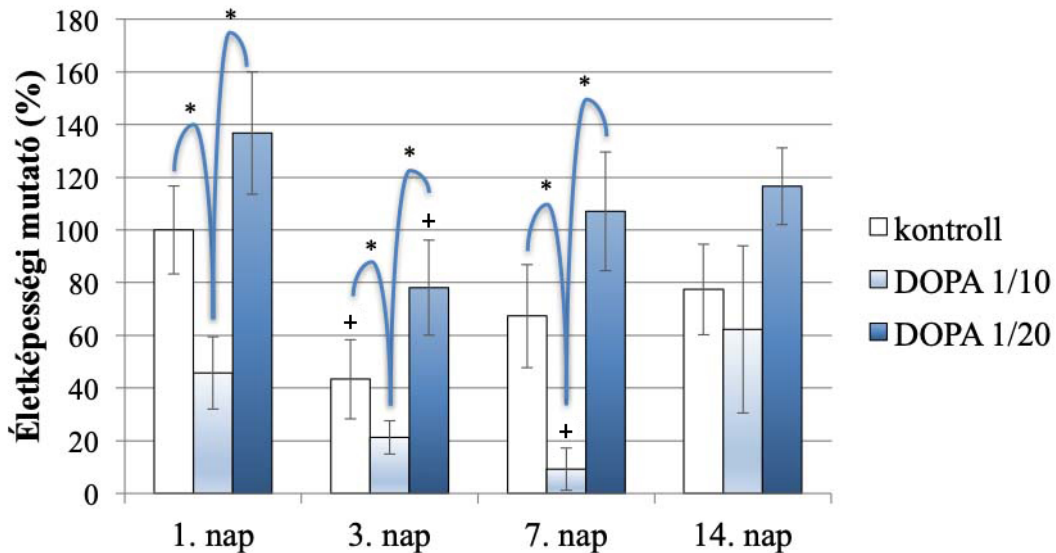
**21. ábra**

*PDL* őssejtek fáziskontraszt mikroszkópos képe különböző dopamin-mennyiséget tartalmazó PASP-alapú hidrogéleken, 1, 3, 7 és 14 nap után. Minden kép azonos nagyításban készült. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelöl.

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. A magas dopamin tartalmú gélen 14 nap elteltével is jóval kisebb számú egészséges morfológiát mutató sejtet láttunk. (21. ábra, harmadik és negyedik oszlop)

Az életképesség-vizsgálat során az első napon a legmagasabb életképességi mutatót az alacsonyabb dopamin tartalmú gél esetében (DOPA 1/20, sötétkék oszlopok) mértük, amely szignifikánsan magasabb volt mind a kontroll, mind a DOPA 1/10 gélhez képest. (22. ábra)

A harmadik napon mindhárom gél esetében csökkent az érték. Ezen a napon is az 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. (22. ábra)



**22. ábra**

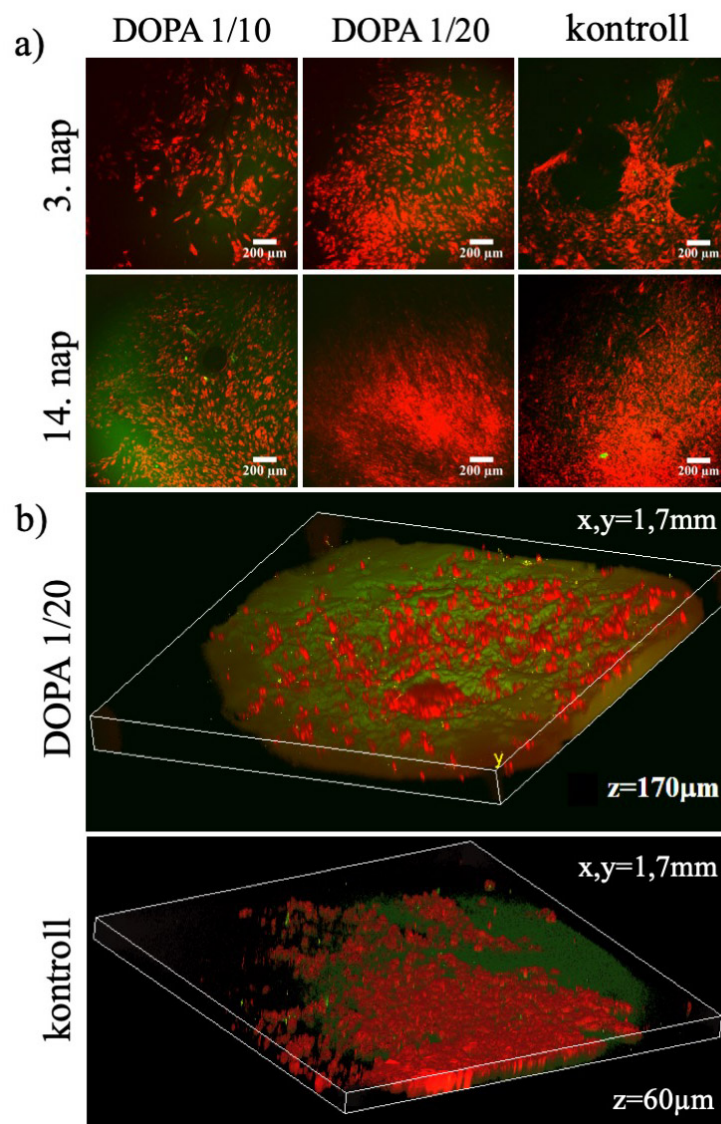
*PDL őssejtek életképességi mutatója különböző dopamin-mennyiségeket tartalmazó PASP-alapú hidrogéleken. A kontroll gélen (CYSE-DAB 20) mért első napi életképességek átlagértékét számítottuk 100%-nak. Az adatok számtani átlagértékét adtuk meg  $\pm$  SEM (standard error of the mean). \*  $p < 0,05$  másik gélekhez viszonyítva a megfelelő időpontban. +  $p < 0,05$  a következő naphoz mért értékhez képest.*

Mind a fáziskontraszt mikroszkóppal készült képek alapján, mind pedig az életképességi vizsgálat alapján azt a következtetést vontuk le, hogy a dopamin koncentráció függően 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 jó egyezést mutat az irodalomban megtalálható adatokkal (145, 146).

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. A magasabb dopamin tartalmú gélen jóval kevesebb sejtet figyeltünk meg. (23. ábra)

14 nap után az DOPA 1/10 gélen továbbra sem tudunk kiemelkedően magas mennyiségű sejtet megfigyelni, míg az DOPA 1/20 és a kontroll gélen nagy mennyiségű, csoportalakítási tendenciát mutató sejtet láttunk. (23. ábra)

A z-stack képeken jól látható, hogy a DOPA 1/20 gél esetében a sejtek körülbelül 170  $\mu\text{m}$  mélységig (amely körülbelül 4 sejtrétegnek felel meg) penetráltak a gél mátrixába, míg a kontroll gélekbe mindössze 60  $\mu\text{m}$  mélységig tudtak behatolni a sejtek. (23. ábra)



**23. ábra**

a) PDL összejtek kétfoton mikroszkóppal készített képei különböző dopamin-mennyiséget tartalmazó PASP hidrogéleken.

b) A PDL összejtek 3 dimenziós képe a gélek belsejében 14 nap után.

A DOPA 1/20 tartalmú gélekbe tehát a korábban tapasztaltaknál mélyebbre penetráltak a sejtek, így ezen géltípus rendkívül ígéretes fog eredetű 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. MEGBESZÉLÉS

### 5.1. Cisztamin és diaminobután tartalmú gélek vizsgálata

Az elmúlt néhány évben több tanulmány született az ideális szövetátmasz létrehozásáról a fog eredetű össejtek számára (82, 100). PASP-alapú hidrogéleket azonban csak kevés említ (108, 147, 148), pedig ezek a típusú gélek fokozottan alkalmasak az össejtek tenyésztésére, mivel jól utánozzák az extracelluláris mátrix kémiai és mechanikai tulajdonságait. A gélek könnyű funkcionálizálhatósága, tulajdonságaik széles körű változtatásának lehetősége szintén előnyt jelent szövetátmaszként való alkalmazásuk szempontjából.

A kísérleteink első fázisában ezért cisztaminnal és/vagy diaminobutánal keresztkötött, tiol tartalmú PASP hidrogéleket vizsgáltunk. Diaminobutánal keresztkötött szövetátmaszok használatára több példát találunk az irodalomban, s habár ezek nagyobb része a szövetátmaszok mechanikai tulajdonságainak vizsgálatára koncentrált (149, 150), több kutatás is igazolta ezen gélek biokompatibilitását is. Munkacsoportunk korábbi kutatásai során MG-63 oszteoszarkóma sejtek letapadását és szaporodását vizsgálta diaminobutánal és cisztaminnal keresztkötött géleken, az ennek során kapott eredmények is ezen hidrogélek biokompatibilitását támasztják alá: a sejtek képesek voltak megtapadni és proliferálni a hidrogéleken (84). In vitro vizsgálatot végeztek Eglin és munkatársai is kondrociták használatával, poliuretán láncba inkorporáltak bifunkcionalizált izoprenoidot, amely diaminobutánt is tartalmazott, így hozva létre 3D szövetátmaszokat. Az ily módon módosított szövetátmaszok hasonlóan biokompatibilisnek bizonyultak, mint a nem inkorporált változatok, és az előbbieket esetében tapasztalt nyitottabb pórusszerkezet előnyösebb is volt a sejtkiültetés homogenitása szempontjából (151). A Semmelweis Egyetem Orálbiológiai Tanszékén Czumbel és munkatársai in vivo vizsgálatokat végeztek diaminobután tartalmú hidrogélekkel. A preklinikai vizsgálatok eddigi eredményei szerint a hidrogélek biokompatibilisnek bizonyultak és támogatják a sebgyógyulást (Czumbel és munkatársai, személyes közlés).

Munkánk során két különböző merevségű (merevebb 1/20 és lágyabb 1/40) gélsorozatot vizsgáltunk az elasztikusan aktív hálóláncok koncentrációjának

változtatásával. A fázis-kontraszt mikroszkópos vizsgálatok szerint (7. ábra és 10. ábra) a merevebb, tiol tartalmú PASP gélek a legalkalmasabbak a sejtenyésztéshez, mivel ezeken a géltípusokon látható a legtöbb egészséges, fibroblaszt morfológiát mutató PDL őssejt. Ez összecseng azokkal az irodalmi adatokkal, melyek szerint a gélek merevsége jelentős hatást gyakorol az őssejtek letapadására, életképességére és proliferációjára (152). Winer és munkatársai eredményei szerint mezenchimális őssejtek merev szubsztrátumon való tenyésztése elősegíti a sejtproliferációt (153). Bizonyos kutatások szerint a szövettámasz merevsége meghatározhatja az őssejtvonal-specifikációt is: 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 (68). Ezzel összhangban az általunk használt gélek paraméterei a következők: lágyabb gélek (1/40 kereszt kötő arány) rugalmassági modulusa 7,2-10,5 kPa, míg a merevebb géleké (1/20 kereszt kötő arány) 55,3 és 66 kPa közötti értéket vett fel (84), amelyek közül a merevebb gélek biztosítottak előnyösebb környezetet a PDL őssejtek számára. Összecseng ezzel Liu és munkatársai vizsgálata, akik különböző merevségű polidimetilxiloxán (PDMS) szubsztrátumokon vizsgálták PDL eredetű őssejtek letapadását és proliferációját. Eredményeik szerint a sejtek a legnagyobb mértékben a merevebb, 54 és 135 kPa rugalmassági modulussal rendelkező géleken szaporodnak, illetve a sejtek oszteogén aktivitása is magasabb volt ezeken a géleken, mint a lágyabbakon (154).

A mikrokörnyezet merevsége tehát nemcsak a sejtek letapadását, hanem a migrációját és differenciációs képességét is befolyásolja. Merevebb felületeken az MC3T3-E1 preoszteoblasztok fokozottabb növekedést, proliferációt, mozgékonyt mutatnak, valamint több volt a kialakult kalcium-depozitok száma is, mint a lágyabb szövettámaszokon (155). A PDL őssejtek merevebb hidrogél felszínre való fokozott tapadásával és proliferációjával kapcsolatos eredményeink jól összecsengenek ezekkel a vizsgálatokkal.

A WST reagens segítségével végzett életképesség-vizsgálatok során az első és a harmadik nap között csökkenő tendenciát mutattunk ki a géleken, amely a 7., majd a 14. napra ismét emelkedni kezdett (11. ábra). Ennek oka lehet, hogy a primer PDL tenyészetek heterogén populációt alkotnak, vagyis a tenyészet többféle sejtvonalat

tartalmaz. A gélek mechanikai tulajdonságai csak egy bizonyos szubpopuláció proliferációját támogatják, ezáltal az első napokban egy természetes szelekció játszódik le. Az életképesség átmeneti csökkenése, majd hosszabb távú növekedése a támogatott populáció szelektív felszaporodására utalhat (155, 156).

Kétfoton mikroszkópos felvételeink azt mutatják, hogy a sejtek képesek penetrálni gélmátrixba (12. ábra) amely felfedezés közvetve bizonyíthatja a PASP hidrogélek biológiai lebonthatóságát in vitro (84), korábbi kutatások szerint ugyanis a sejtek számára a gélmátrixban való elmozdulás egyik útja a gél szerkezet enzimatis bontása (84). A másik út a pórusokon keresztüli migráció (157), így a poliaszparaginsav gélek ideális pórusmérete is jelentős szerepet játszhat a sejt migráció elősegítésében. Az általunk használt hidrogélek pórusainak mérete körülbelül 70-80 µm közé tehető, amely mintegy kétszerese a sejtek átlagos méretének (11). Liao és munkatársai vizsgálatai szerint ez a méret megfelelő lehet ligamentum-eredetű sejtek számára: kutatásuk során ugyanis hasonló pórusméretű, poli-L-laktid mátrixokat hoztak létre, amelyek megfelelőnek bizonyultak humán periodontális ligamentum eredetű fibroblasztok tenyésztésére (158).

Az első kísérletsorozat eredményeiből tehát arra következtethetünk, hogy a gélek merevségének növelése, illetve a tiol csoportok jelenléte kedvező hatással van a PDL sejtek adhéziójára, migrációjára, illetve proliferációjára. Az első kísérletsorozatban vizsgált 8-féle gél (1/20 vagy 1/40 keresztükötési fokkal rendelkező DAB, CYS, CYS-DAB, CYSE-DAB gélek) közül a merevebb, tiol csoportokat is tartalmazó gélek használata tűnik a legígéretesebbnek szövetépítés szempontjából. Ebből kifolyólag a következő kísérletsorozatban az előző módszerek segítségével a tiol csoport mennyiségének a hatását vizsgáltuk PDL őssejtek kitapadására és szaporodására.

## 5.2. Különböző tiol-csoport tartalmú gélek vizsgálata

A mikroszkópos vizsgálatok (13. ábra), valamint az életképességgel kapcsolatos kísérleteink is (14. ábra) kimutatták, hogy a PDL sejtek képesek megtapadni és szaporodni a tiol tartalmú hidrogéleken, s a tiol-csoportok mennyiségének növelése pozitív hatással van ezen sejtek adhéziójára, proliferációjára és életképességére, valamint migrációs potenciáljára is. A legkiemelkedőbb pozitív hatást rövidebb és hosszabb távon is azon gélek esetében mértük, amelyekben a tiol-csoportok mennyisége meghaladta az

1/10 arányt. A kétfoton mikroszkóppal készült felvételek vertikális integrálásával készült 3 dimenziós képeken bizonyítást nyert a sejtek penetrációja a gélek belsejébe, 30-60  $\mu\text{m}$  mélységben. (16.ábra)

Habár az irodalomban több példát találhatunk tiol-csoportokat tartalmazó polimerek vizsgálatára (126, 159, 160), a szabad tiol-csoportok hatása még nem lett széles körűen vizsgálva az osztek letapadására és proliferációjára. Eredményeink összhangban vannak Galli és munkatársai nemrégiben publikált kutatásával, amelyben kimutatták, hogy a tiolmódosított, zselatinnal dúsított kitozán szövettámaszok fokozzák az oszteoblaszt sejtek proliferációját. A sejtek magasabb életképességi mutatókat produkáltak, valamint a tenyészetek előbb érték el a szubkonfluens állapotot a módosított szövettámaszok felszínén, mint a kontrollokon (161). Bae és munkatársai tiol-módosított és módosítatlan kitozán szövettámaszok biokompatibilitását vizsgálták egér oszteoblaszt sejtvonalon (MC3T3-E1). Eredményeik szerint a tiol-módosított szövettámaszokon tenyésztett sejtek életképessége magasabb volt, mint a módosítatlan szövettámaszokon (162). Ezzel összecseng Matsusaki és munkatársai vizsgálata is, aminek során 3D szöveteket állítottak elő egér fibroblaszt sejtekből, amelyeket diszulfid-térhálósított poliglutaminsav hidrogéleken tenyésztettek. Ezen kísérlet során is megerősítést nyert a tiol-csoportok pozitív hatása a sejtek adhéziójára és proliferációjára (124).

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 (163). A gélek tioltartalmának növekedése valószínűleg ilyen módon képes pozitívan befolyásolni a sejtek adhézióját és proliferációját (164, 165).

### 5.3. Oszteogén differenciáció vizsgálata

Eredményeink szerint a tiol-csoportok jelenléte a hidrogélekben nemcsak a sejtek letapadását és proliferációját befolyásolta, hanem pozitív hatást gyakorolt a PDL osztek oszteogén differenciálódási potenciáljára is in vitro. A fázis-kontraszt mikroszkóppal készült 14 napos képeken jól megfigyelhető a sejtek csoportalakítási hajlama az oszteogén indukált csoportban. (15. ábra) Az ALP vizsgálatok szerint a legmagasabb tioltartalmú gélek (CYSE 1/2) nem csak az oszteogén tápoldatot kapott sejtek csont irányú

differenciációs potenciálját támogatták, de spontán aktivitást is indukáltak a kontroll csoportban. A tiol csoportot nem tartalmazó gél esetében az oszteogén csoportban sem mértünk számottevő aktivitást. (17. ábra)

Olyan kutatás nem található jelenleg a szakirodalomban, amelynek során fog eredetű őssejteken vizsgálták a tiol csoportok oszteogén hajlamot fokozó hatását, és más típusú sejtek részvételével is csak igen kevés vizsgálat született. Bae és munkatársai korábban említett in vivo kísérletei azonban erre az aspektusra is kitértek, és korrelálnak az általunk kapott eredményekkel: a BMP-2-tartalmú tiolált kitozán szövettámaszok nagyobb mértékű ektópiás csontképződést indukáltak az egér oszteoblaszt sejtekben, mint a csak BMP-2-t tartalmazó kollagén szövettámaszok (162).

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 jelkaskádokat (166). 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/  $\beta$ -katenin (167) valamint a p38-MAPK (mitogén aktivált protein kináz) útvonalon keresztül (168).

#### 5.4. Cisztamin és lizin tartalmú gélek vizsgálata

Kísérleteink során jóval alacsonyabb életképesség értékeket, illetve a mikroszkópiás felvételeken látható kisebb sejtszámot tapasztaltunk, mint a DAB keresztkötött géleken. A magasabb lizin-tartalmú géleken a sejtek nem voltak képesek megtapadni és szaporodni. A fáziskontraszt mikroszkóppal (18. ábra) és a kétfoton-mikroszkóppal (20. ábra) készített képeken nem, vagy csak nagyon kis mértékben láthatóak egészséges sejtek, a látótérbe kevesebb, felkerekedett morfológiát mutató sejt került. Az életképesség vizsgálat pedig mindkét vizsgálati időpontban nagyon alacsony értékeket mutatott (19. ábra). Ezzel szemben az alacsonyabb lizin tartalmú géleken megfigyelhetőek voltak egészséges sejtek, a legnagyobb életképesség-növekedést pedig

a CYS 20%-LYS géleken mértük (ahol a LYS koncentrációja körülbelül 1,5 tömeg%). Ez korrelál Datta és munkatársai eredményeivel, ahol a lizin 1,5 tömeg% -os alkalmazása szignifikánsan növelte a sejtek életképességét (169).

Az irodalomban ezzel ellentétben számos példa található sikeres kísérletre lizin tartalmú szövettámaszok és őssejtek kapcsán, a legtöbb esetben poli-L-lizin vagy poli-D-lizin formában alkalmazva: Haridas és munkatársai szintén lizin-tartalmú géleken vizsgálták mezenchimális őssejtek letapadását és proliferációját. Eredményeik szerint ezek a gélek támogatják a sejtek adhézióját és szaporodását (170). Hasonló eredményt hozott az a kísérlet is, amelynek során alginát-poli-lizin hidrogél mikrokapszulák biokompatibilitását vizsgálták Acarregui és munkatársai egér mioblasztok felhasználásával. A sejtek jól adaptálódtak és kielégítő életképességi mutatókat produkáltak a kapszulák belsejében, és in vivo alkalmazásuk is sikeres volt (80). Egy friss kutatás során Liu és munkatársai vizsgálták poli-L-lizinnel és hyaluronsavval bevont többrétegű poli-L-lizin-ko-kaprolakton szövettámasz biokompatibilitását, Wharton zseléből és csontvelőből származó mezenchimális őssejtek segítségével. A sejtek emelkedett metabolikus aktivitást és kemotaxist mutattak a szövettámaszokon, valamint 14 nap után 1-es és 3-as típusú kollagén-szekretálás volt kimutatható, így a ligamentum-szövetépítés egyik ígéretes alanya lehet ez a típusú szövettámasz (131). Ezen kísérletek során a poli-L-lizin pozitív befolyással bírt a sejtek adhéziójára és proliferációjára, azonban ez a hatás koncentrációfüggő, optimális mennyiség szükséges a legmagasabb életképességi mutatók eléréséhez. Magas koncentrációban a lizin citotoxikus hatással bír, mind vízdékony formában, mind pedig poli-L-lizinként, szövettámaszba építve (169, 171).

A sejtek korlátozott letapadási és szaporodási képességének oka lehet, hogy kísérleteink során egyedülálló módon, keresztkötőként alkalmaztunk lizint PASP alapú hidrogélekben a sejtproliferáció elősegítése érdekében. Ez azonban gyengébb mechanikai tulajdonságokat és kisebb stabilitásást eredményezett a gélekben, amely nagy hatással van a sejtek letapadási képességére, mint azt az előző fejezetekben már részletesen kifejtettem (154).

### 5.5. Dopamin tartalmú gélek vizsgálata

Habár a dopamin az irodalmi adatok szerint pozitív hatással van fog eredetű őssejtek túlélésére és migrációjára (136, 172), szövetátmaszokba beleépítve eddig még csak igen kevés esetben alkalmazták.

A mikroszkópos képek tanúsága szerint az első és a harmadik napon is nagy mennyiségű sejt került a látótérbe az alacsonyabb dopamin tartalmú gélen, a tenyészet a hetedik npra pedig konfluenssé vált a gélek felszínén. (21. ábra) Az életképességi vizsgálatok során is ezen a gélen (DOPA 1/20) mértük a legkiemelkedőbb mutatókat, mind a négy kísérleti napon. (22. ábra)

Eredményeinket több kutatócsoport vizsgálatai is alátámasztják. Több tanulmányból is kiderült, hogy a polidopamin növeli a szövetátmaszok biokompatibilitását, például Hong és munkatársai, valamint Scognamiglio és munkatársai in vivo vizsgálata is erre irányult. Kimutatták, hogy a poli-L-laktát, valamint alginát alapú szövetátmaszok dopaminnal való bevonása csökkenti a szövetátmaszok toxicitását in vivo alkalmazás során (173, 174). Kao és munkatársai politejsav szövetátmaszok felületét vonták be polidopaminnal, és ennek hatását figyelték humán zsírszövet eredetű őssejtek kitapadására és proliferációjára. Eredményeik szerint a bevont szövetátmaszon fokozottabb volt a sejtek adhézioja és proliferációja mint a kontroll csoportban, ami korrelál a mi eredményeinkkel is. Vizsgálataik érdekessége, hogy a dopamin-bevonat ezen felül pozitív hatással volt az angiogenezis-asszociált fehérjék kifejeződésére és az oszteogén hajlamra is (139). Szintén alátámasztja eredményeinket Partovi és munkatársai munkája, akik L-dopamin lokális hatását vizsgálták periodontális ligamentum eredetű fibroblasztok esetében. A sejtek alacsony koncentrációjú dopaminnal kezelve jóval magasabb proliferációs aktivitást produkáltak, mint a kontroll csoport (172). Tsai és munkatársai patkány oszteoblasztok esetében jutottak hasonló eredményre: polidopamin bevonatú, biodegradábilis polimereken a sejtek fokozott adhézio és proliferációs hajlamot mutattak, és a mineralizációs potenciál is megnövekedett (138).

A kétfoton mikroszkóppal készített képek alapján a sejtek képesek voltak penetrálni a gél mátrixába. (23. ábra) A DOPA 1/20 gél esetében a sejtek kiemelkedő vertikális migrációs hajlamot mutattak, ugyanis háromszor olyan mélyen is detektáltunk sejteket, mint a kontroll, CYSE-DAB 1/20 gél esetében. (23. ábra) A dopamin migrációs

potenciálra gyakorolt hatásmechanizmusát mezenchimális őssejtek esetében Mirones és munkatársai vizsgálták: in vitro a dopamin elősegíti az MSC-k migrációját, D2 receptoron és alternatív foszfoinozítid-3-kináz / Akt útvonalon keresztül. Ezt a hatást in vivo is megfigyelték: emberekben L-dopa adása jelentősen megnöveli a perifériás vérben MSC-szerű sejtek (CD45<sup>-</sup> CD31<sup>-</sup> CD34<sup>-</sup> CD105<sup>+</sup>) mennyiségét (145). Érdekes módon Shome és munkatársai ennek ellenkezőjét állapították meg: kísérleteikben a dopamin D2 receptorokon keresztül gátolta a VEGF indukált migrációt, és a perifériás vérben D2 antagonisták adása után mértek megnövekedett őssejt-szerű sejtmennyiséget. A különbség az eltérő dopamin-koncentrációk használatából adódhat, amely alátámasztja a dopamin általunk is megállapított koncentráció-függő hatását (146).

A kísérlet tehát felveti, hogy a dopamin esetében kiemelkedően fontos a megfelelő koncentráció alkalmazása, amely összecseng az irodalomban található adatokkal is (145, 146). Megfelelő mennyiségben a dopamin kiemelkedően pozitív hatással van a sejtek életképességére, szaporodására és migrációs potenciáljára, így ez a géltípus rendkívül ígéretes őssejtek tenyésztése szempontjából, amit további kísérletekkel tervezünk alátámasztani.



## 6. KÖVETKEZTETÉSEK

Kutatómunkám új tudományos eredményei a következő pontokba foglalhatók össze:

1. Kimutattam, hogy humán foggyökérhártya eredetű mezenchimális őssejtek képesek megtapadni és szaporodni cisztamin és diaminobután keresztkötőket tartalmazó poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken. Legnagyobb mértékben a merevebb, diaminobutánt, valamint a tiol-csoportokat is tartalmazó géleken mutatkoztak életképesnek a sejtek, illetve a gélek belseje felé való penetráció is ezen gélek esetében volt kiemelkedő, ezek a gélek tehát biokompatibilisek és biodegradábilisek.
2. Kimutattam továbbá, hogy foggyökérhártya eredetű őssejtek megtapadnak és szaporodnak különböző tiol-csoport mennyiséget tartalmazó 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 fog eredetű 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, poliaszparaginsav-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.

## 7. ÖSSZEFOGLALÁS

Az elmúlt évek kutatásainak és fejlesztéseinek köszönhetően kutatócsoportunk ma már rutinszerűen izolál mezenchimális őssejteket fog-asszociált szövetekből, melyek multipotens differenciációs képességgel bírnak. A sejtek terápiás alkalmazásához azonban olyan szövettámaszok is szükségesek, amelyek biztosítják számukra a megfelelő körülményeket, hasonlóan az extracelluláris mátrixhoz. Célunk ezért egy olyan hidrogél szövettámasz létrehozása volt, amely megfelelő kondíciókat biztosít a sejtek számára, s a későbbiekben alkalmazható lehet a regeneratív terápiában.

Munkám során poliaszparaginsav-alapú hidrogéleken vizsgáltuk a sejtek életképességét, morfológiáját és differenciációs potenciálját. Az első kísérletsorozatban lágyabb és merevebb, diaminobután és/vagy cisztamin keresztkötött géleket vizsgáltunk, amelyek között tiol-csoport tartalmú is volt. A sejtek a merevebb géleken mutattak magasabb proliferációs aktivitást és életképességet, ezek közül is kiemelkedtek a tiol-csoport tartalmú valamint a csak diaminobutánt tartalmazó gélek, amelyek hosszabb távon is biokompatibilisnek bizonyultak. A sejtek képesek voltak penetrálni a gélek belseje felé. A második kísérletsorozatban a tiol-csoport mennyiség hatását vizsgáltuk a sejtekre: a tiol tartalom pozitív hatással bírt a sejtek életképességére és proliferációjára. A magas tiol tartalom kiemelten támogatta ezen felül a spontán oszteogén aktivitást is. A következő kísérletsorozatban a sejtekben a diaminobutánt lizinre cseréltük, ezeken a géleken azonban csak korlátozottan voltak képesek megtapadni és szaporodni a sejtek, amelynek mértéke erősen függött a lizin koncentrációjától. Ezt követően dopamint tartalmazó géleket alkalmaztunk, amelyek – a megfelelő dopamin tartalom mellett – kiemelten támogatták a sejtek túlélését és proliferációját, valamint migrációs aktivitását is.

Összefoglalva, sikerrel állítottunk elő több olyan, poliaszparaginsav alapú szövettámaszt, amelyek in vitro biokompatibilisek, biodegradábilisek, támogatják a sejtek adhézióját, szaporodását és oszteogén differenciálódását. Ezek a gélek a későbbiekben alkalmasak lehetnek a regeneratív terápiában való használatra is.

## 8. SUMMARY

The research and development of the past few years allowed our research team to routinely isolate mesenchymal stem cells from tooth-associated tissues that have multipotential differentiation capacity. However, for the therapeutic use of these cells, scaffolds are required to provide the appropriate conditions for the cells, such as the ECM does. The aim of our work was to create a hydrogel scaffold that provides optimal conditions for the cells, which could be a promising alternative in regenerative therapy.

The viability, morphology and differentiation potential of the cells were investigated on poly(aspartic acid)-based hydrogels. In the first series of experiments, softer and stiffer diaminobutane and / or cystamine crosslinked gels were tested, including thiol-containing gels. Cells showed higher proliferative activity and viability on stiffer gels, including thiol-containing and diaminobutane-only gels, which were shown to be biocompatible in the long run. The cells were able to penetrate inside the gels. In the second experimental series, we investigated the effect of thiol groups on the cells' behaviour: thiol content had a positive effect on cell viability and proliferation. The high thiol content also strongly supported spontaneous osteogenic activity. In the next experiment, diaminobutane was changed to lysine, but on these gels the cells' adhesion and proliferation was limited, the extent of which was strongly dependent on the concentration of lysine. According to the next experiment, dopamine containing gels seem to be suitable for cell culturing in case of appropriate dopamine content: it strongly supported cell survival and proliferation, as well as migration activity.

To summarize, we have successfully produced poly(aspartic acid)-based scaffolds that are biocompatible, biodegradable and support cell adhesion, proliferation and osteogenic differentiation in vitro. These gels may later be suitable for use in regenerative therapy.

## 9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Howard D, BATTERY LD, Shakesheff KM, Roberts SJ. (2008) Tissue engineering: strategies, stem cells and scaffolds. *J Anat.* 213 (1):66-72.
2. de Wert G, Mummery C. (2003) Human embryonic stem cells: research, ethics and policy. *Hum Reprod.* 18 (4):672-682.
3. Hass R, Kasper C, Bohm S, Jacobs R. (2011) Different populations and sources of human mesenchymal stem cells (MSC): A comparison of adult and neonatal tissue-derived MSC. *Cell Commun Signal.* 9:12.
4. Baksh D, Song L, Tuan RS. (2004) Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy. *J Cell Mol Med.* 8 (3):301-316.
5. Huang GT, Gronthos S, Shi S. (2009) Mesenchymal stem cells derived from dental tissues vs. those from other sources: their biology and role in regenerative medicine. *J Dent Res.* 88 (9):792-806.
6. Bansal R, Jain A. (2015) Current overview on dental stem cells applications in regenerative dentistry. *J Nat Sci Biol Med.* 6 (1):29-34.
7. Liu J, Yu F, Sun Y, Jiang B, Zhang W, Yang J, Xu GT, Liang A, Liu S. (2015) Concise reviews: Characteristics and potential applications of human dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells.* 33 (3):627-638.
8. Drury JL, Mooney DJ. (2003) Hydrogels for tissue engineering: scaffold design variables and applications. *Biomaterials.* 24 (24):4337-4351.
9. Evans ND, Gentleman E, Polak JM. (2006) Scaffolds for stem cells. *Materials Today.* 9 (12):26-33.
10. Juriga D, Sipos E, Hegedus O, Varga G, Zrinyi M, Nagy KS, Jedlovsky-Hajdu A. (2019) Fully amino acid-based hydrogel as potential scaffold for cell culturing and drug delivery. *Beilstein J Nanotechnol.* 10:2579-2593.
11. Hegedus O, Juriga D, Sipos E, Voniatis C, Juhasz A, Idrissi A, Zrinyi M, Varga G, Jedlovsky-Hajdu A, Nagy KS. (2019) Free thiol groups on poly(aspartamide) based hydrogels facilitate tooth-derived progenitor cell proliferation and differentiation. *PLoS One.* 14 (12):e0226363.
12. Gera I. *Parodontológia. Semmelweis Kiadó, Budapest, 2009: 210-212.*
13. Kung FC. (2018) Injectable collagen/RGD systems for bone tissue engineering applications. *Biomed Mater Eng.* 29 (2):241-251.
14. Zhu H, Kimura T, Swami S, Wu JY. (2018) Pluripotent stem cells as a source of osteoblasts for bone tissue regeneration. *Biomaterials.*
15. Kawasaki T, Ohba S, Nakatani Y, Asahina I. (2018) Clinical study of guided bone regeneration with resorbable polylactide-co-glycolide acid membrane. *Odontology.* 106 (3):334-339.
16. Mohammadi M, Mousavi Shaegh SA, Alibolandi M, Ebrahimzadeh MH, Tamayol A, Jaafari MR, Ramezani M. (2018) Micro and nanotechnologies for

- bone regeneration: Recent advances and emerging designs. *J Control Release*. 274:35-55.
17. Bakhtiar H, Mazidi SA, Mohammadi Asl S, Ellini MR, Moshiri A, Nekoofar MH, Dummer PMH. (2018) The role of stem cell therapy in regeneration of dentine-pulp complex: a systematic review. *Prog Biomater*. 7 (4):249-268.
  18. Rosa V, Zhang Z, Grande RH, Nor JE. (2013) Dental pulp tissue engineering in full-length human root canals. *J Dent Res*. 92 (11):970-975.
  19. Rosa V, Della Bona A, Cavalcanti BN, Nor JE. (2012) Tissue engineering: from research to dental clinics. *Dent Mater*. 28 (4):341-348.
  20. Miura M, Gronthos S, Zhao M, Lu B, Fisher LW, Robey PG, Shi S. (2003) SHED: stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100 (10):5807-5812.
  21. Morszeck C, Gotz W, Schierholz J, Zeilhofer F, Kuhn U, Mohl C, Sippel C, Hoffmann KH. (2005) Isolation of precursor cells (PCs) from human dental follicle of wisdom teeth. *Matrix Biol*. 24 (2):155-165.
  22. Seo BM, Miura M, Gronthos S, Bartold PM, Batouli S, Brahim J, Young M, Robey PG, Wang CY, Shi S. (2004) Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*. 364 (9429):149-155.
  23. Gronthos S, Mankani M, Brahim J, Robey PG, Shi S. (2000) Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 97 (25):13625-13630.
  24. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop D, Horwitz E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8 (4):315-317.
  25. Lin DPL, Dass CR. (2018) Transdifferentiation of adipocytes to osteoblasts: potential for orthopaedic treatment. *J Pharm Pharmacol*. 70 (3):307-319.
  26. Wu J, Izipisua Belmonte JC. (2016) Stem Cells: A Renaissance in Human Biology Research. *Cell*. 165 (7):1572-1585.
  27. Andrukhov O, Behm C, Blufstein A, Rausch-Fan X. (2019) Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells: Implication in disease and tissue regeneration. *World J Stem Cells*. 11 (9):604-617.
  28. Foldes A, Kadar K, Keremi B, Zsembery A, Gyires K, Z SZ, Varga G. (2016) Mesenchymal Stem Cells of Dental Origin-Their Potential for Antiinflammatory and Regenerative Actions in Brain and Gut Damage. *Curr Neuropharmacol*. 14 (8):914-934.
  29. Zheng C, Chen J, Liu S, Jin Y. (2019) Stem cell-based bone and dental regeneration: a view of microenvironmental modulation. *Int J Oral Sci*. 11 (3):23.
  30. Gronthos S, Brahim J, Li W, Fisher LW, Cherman N, Boyde A, DenBesten P, Robey PG, Shi S. (2002) Stem cell properties of human dental pulp stem cells. *J Dent Res*. 81 (8):531-535.

31. Zhang W, Walboomers XF, Van Kuppevelt TH, Daamen WF, Van Damme PA, Bian Z, Jansen JA. (2008) In vivo evaluation of human dental pulp stem cells differentiated towards multiple lineages. *J Tissue Eng Regen Med.* 2 (2-3):117-125.
32. Liu SH, Wei FC, Sun SZ, Zhang CY, Liu YS. (2004) The characteristics of cultured dental pulp cells and the localization of dental pulp stem cells. *Shanghai Kou Qiang Yi Xue.* 13 (2):106-109.
33. Li Z, Jiang CM, An S, Cheng Q, Huang YF, Wang YT, Gou YC, Xiao L, Yu WJ, Wang J. (2014) Immunomodulatory properties of dental tissue-derived mesenchymal stem cells. *Oral Dis.* 20 (1):25-34.
34. Martens W, Wolfs E, Struys T, Politis C, Bronckaers A, Lambrechts I. (2012) Expression pattern of basal markers in human dental pulp stem cells and tissue. *Cells Tissues Organs.* 196 (6):490-500.
35. Navabazam AR, Sadeghian Nodoshan F, Sheikhha MH, Miresmaeili SM, Soleimani M, Fesahat F. (2013) Characterization of mesenchymal stem cells from human dental pulp, preapical follicle and periodontal ligament. *Iran J Reprod Med.* 11 (3):235-242.
36. Karamzadeh R, Eslaminejad MB, Aflatoonian R. (2012) Isolation, characterization and comparative differentiation of human dental pulp stem cells derived from permanent teeth by using two different methods. *J Vis Exp.* (69).
37. Morsczeck C, Vollner F, Saugspier M, Brandl C, Reichert TE, Driemel O, Schmalz G. (2010) Comparison of human dental follicle cells (DFCs) and stem cells from human exfoliated deciduous teeth (SHED) after neural differentiation in vitro. *Clin Oral Investig.* 14 (4):433-440.
38. Suchanek J, Visek B, Soukup T, El-Din Mohamed SK, Ivancakova R, Mokry J, Aboul-Ezz EH, Omran A. (2010) Stem cells from human exfoliated deciduous teeth--isolation, long term cultivation and phenotypical analysis. *Acta Medica (Hradec Kralove).* 53 (2):93-99.
39. Sakai VT, Zhang Z, Dong Z, Neiva KG, Machado MA, Shi S, Santos CF, Nor JE. (2010) SHED differentiate into functional odontoblasts and endothelium. *J Dent Res.* 89 (8):791-796.
40. Kerkis I, Kerkis A, Dozortsev D, Stukart-Parsons GC, Gomes Massironi SM, Pereira LV, Caplan AI, Cerruti HF. (2006) Isolation and characterization of a population of immature dental pulp stem cells expressing OCT-4 and other embryonic stem cell markers. *Cells Tissues Organs.* 184 (3-4):105-116.
41. Martacic JD, Francuski J, Luzajic T, Vukovic N, Mojsilovic S, Drndarevic N, Petakov M, Glibetic M, Markovic D, Radovanovic A, Todorovic V, Filipovic MK. (2014) Characterization of deciduous teeth stem cells isolated from crown dental pulp. *Vojnosanit Pregl.* 71 (8):735-741.
42. Kerkis I, Caplan AI. (2012) Stem cells in dental pulp of deciduous teeth. *Tissue Eng Part B Rev.* 18 (2):129-138.

43. Wu LP, Wei X, Ling JQ, Liu L. (2009) [The surface antigen expression of periodontal ligament cells and dental pulp cells in vitro]. *Hua Xi Kou Qiang Yi Xue Za Zhi*. 27 (1):20-23.
44. Kawanabe N, Murata S, Murakami K, Ishihara Y, Hayano S, Kurosaka H, Kamioka H, Takano-Yamamoto T, Yamashiro T. (2010) Isolation of multipotent stem cells in human periodontal ligament using stage-specific embryonic antigen-4. *Differentiation*. 79 (2):74-83.
45. Sonoyama W, Liu Y, Yamaza T, Tuan RS, Wang S, Shi S, Huang GT. (2008) Characterization of the apical papilla and its residing stem cells from human immature permanent teeth: a pilot study. *J Endod*. 34 (2):166-171.
46. Abe S, Yamaguchi S, Amagasa T. (2007) Multilineage Cells from Apical Pulp of Human Tooth with Immature Apex. *Oral Science International*. 4 (1):45-58.
47. Bakopoulou A, Leyhausen G, Volk J, Koidis P, Geurtsen W. (2013) Comparative characterization of STRO-1(neg)/CD146(pos) and STRO-1(pos)/CD146(pos) apical papilla stem cells enriched with flow cytometry. *Arch Oral Biol*. 58 (10):1556-1568.
48. Yang C, Li X, Sun L, Guo W, Tian W. (2017) Potential of human dental stem cells in repairing the complete transection of rat spinal cord. *J Neural Eng*. 14 (2):026005.
49. Huang L, Li Z, Tian H, Wang W, Cui D, Zhou Z, Chen X, Cheung HS, Xu GT, Chen Y. (2017) Adult human periodontal ligament-derived stem cells delay retinal degeneration and maintain retinal function in RCS rats. *Stem Cell Res Ther*. 8 (1):290.
50. Bansal R, Jain A, Mittal S. (2015) Current overview on challenges in regenerative endodontics. *J Conserv Dent*. 18 (1):1-6.
51. Kl V, Ryana H, Dalvi PJ. (2017) Autologous periodontal stem cell assistance in periodontal regeneration technique (SAI-PRT) in the treatment of periodontal intrabony defects: A case report with one-year follow-up. *J Dent Res Dent Clin Dent Prospects*. 11 (2):123-126.
52. Kammerer PW, Scholz M, Baudisch M, Liese J, Wegner K, Frerich B, Lang H. (2017) Guided Bone Regeneration Using Collagen Scaffolds, Growth Factors, and Periodontal Ligament Stem Cells for Treatment of Peri-Implant Bone Defects In Vivo. *Stem Cells Int*. 2017 (3):1-9
53. Giuliani A, Manescu A, Langer M, Rustichelli F, Desiderio V, Paino F, De Rosa A, Laino L, d'Aquino R, Tirino V, Papaccio G. (2013) Three years after transplants in human mandibles, histological and in-line holotomography revealed that stem cells regenerated a compact rather than a spongy bone: biological and clinical implications. *Stem Cells Transl Med*. 2 (4):316-324.
54. Sakai K, Yamamoto A, Matsubara K, Nakamura S, Naruse M, Yamagata M, Sakamoto K, Tauchi R, Wakao N, Imagama S, Hibi H, Kadomatsu K, Ishiguro N, Ueda M. (2012) Human dental pulp-derived stem cells promote locomotor

- recovery after complete transection of the rat spinal cord by multiple neuro-regenerative mechanisms. *J Clin Invest.* 122 (1):80-90.
55. Nagpal A, Kremer KL, Hamilton-Bruce MA, Kaidonis X, Milton AG, Levi C, Shi S, Carey L, Hillier S, Rose M, Zacest A, Takhar P, Koblar SA. (2016) TOOTH (The Open study Of dental pulp stem cell Therapy in Humans): Study protocol for evaluating safety and feasibility of autologous human adult dental pulp stem cell therapy in patients with chronic disability after stroke. *Int J Stroke.* 11 (5):575-585.
  56. Leong WK, Henshall TL, Arthur A, Kremer KL, Lewis MD, Helps SC, Field J, Hamilton-Bruce MA, Warming S, Manavis J, Vink R, Gronthos S, Koblar SA. (2012) Human adult dental pulp stem cells enhance poststroke functional recovery through non-neural replacement mechanisms. *Stem Cells Transl Med.* 1 (3):177-187.
  57. Gnanasegaran N, Govindasamy V, Mani V, Abu Kasim NH. (2017) Neuroimmunomodulatory properties of DPSCs in an in vitro model of Parkinson's disease. *IUBMB Life.* 69 (9):689-699.
  58. Shimojima C, Takeuchi H, Jin S, Parajuli B, Hattori H, Suzumura A, Hibi H, Ueda M, Yamamoto A. (2016) Conditioned Medium from the Stem Cells of Human Exfoliated Deciduous Teeth Ameliorates Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *J Immunol.* 196 (10):4164-4171.
  59. Wakayama H, Hashimoto N, Matsushita Y, Matsubara K, Yamamoto N, Hasegawa Y, Ueda M, Yamamoto A. (2015) Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating acute lung injury in mice. *Cytotherapy.* 17 (8):1119-1129.
  60. Ishikawa J, Takahashi N, Matsumoto T, Yoshioka Y, Yamamoto N, Nishikawa M, Hibi H, Ishigro N, Ueda M, Furukawa K, Yamamoto A. (2016) Factors secreted from dental pulp stem cells show multifaceted benefits for treating experimental rheumatoid arthritis. *Bone.* 83:210-219.
  61. Yamaza T, Kentaro A, Chen C, Liu Y, Shi Y, Gronthos S, Wang S, Shi S. (2010) Immunomodulatory properties of stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Stem Cell Res Ther.* 1 (1):5.
  62. Kanafi MM, Rajeshwari YB, Gupta S, Dadheech N, Nair PD, Gupta PK, Bhonde RR. (2013) Transplantation of islet-like cell clusters derived from human dental pulp stem cells restores normoglycemia in diabetic mice. *Cytotherapy.* 15 (10):1228-1236.
  63. Gandia C, Arminan A, Garcia-Verdugo JM, Lledo E, Ruiz A, Minana MD, Sanchez-Torrijos J, Paya R, Mirabet V, Carbonell-Uberos F, Llop M, Montero JA, Sepulveda P. (2008) Human dental pulp stem cells improve left ventricular function, induce angiogenesis, and reduce infarct size in rats with acute myocardial infarction. *Stem Cells.* 26 (3):638-645.
  64. Hsieh CF, Alberton P, Loffredo-Verde E, Volkmer E, Pietschmann M, Muller PE, Schieker M, Docheva D. (2016) Periodontal ligament cells as alternative source



- for cell-based therapy of tendon injuries: in vivo study of full-size Achilles tendon defect in a rat model. *Eur Cell Mater.* 32:228-240.
65. Yamada KM, Collins JW, Cruz Walma DA, Doyle AD, Morales SG, Lu J, Matsumoto K, Nazari SS, Sekiguchi R, Shinsato Y, Wang S. (2019) Extracellular matrix dynamics in cell migration, invasion and tissue morphogenesis. *Int J Exp Pathol.* 100 (3):144-152.
  66. Frantz C, Stewart KM, Weaver VM. (2010) The extracellular matrix at a glance. *J Cell Sci.* 123 (Pt 24):4195-4200.
  67. Tibbitt MW, Anseth KS. (2009) Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol Bioeng.* 103 (4):655-663.
  68. Engler AJ, Sen S, Sweeney HL, Discher DE. (2006) Matrix elasticity directs stem cell lineage specification. *Cell.* 126 (4):677-689.
  69. Huang AH, Farrell MJ, Mauck RL. (2010) Mechanics and mechanobiology of mesenchymal stem cell-based engineered cartilage. *J Biomech.* 43 (1):128-136.
  70. Huang C, Dai J, Zhang XA. (2015) Environmental physical cues determine the lineage specification of mesenchymal stem cells. *Biochim Biophys Acta.* 1850 (6):1261-1266.
  71. Annabi N, Nichol JW, Zhong X, Ji C, Koshy S, Khademhosseini A, Dehghani F. (2010) Controlling the porosity and microarchitecture of hydrogels for tissue engineering. *Tissue Eng Part B Rev.* 16 (4):371-383.
  72. El-Sherbiny IM, Yacoub MH. (2013) Hydrogel scaffolds for tissue engineering: Progress and challenges. *Glob Cardiol Sci Pract.* 2013 (3):316-342.
  73. Huang Z, Nooeaid P, Kohl B, Roether JA, Schubert DW, Meier C, Boccaccini AR, Godkin O, Ertel W, Arens S, Schulze-Tanzil G. (2015) Chondrogenesis of human bone marrow mesenchymal stromal cells in highly porous alginate-foams supplemented with chondroitin sulfate. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl.* 50:160-172.
  74. Wiesmann H, Lammers L. *Scaffold structure and fabrication.* Springer, New York, 2009.
  75. Wolfe SP, Sell AS, Bowlin LG. *Tissue engineering: From lab to clinic 2011.* 41-67.41-67
  76. Diniz IM, Chen C, Ansari S, Zadeh HH, Moshaverinia M, Chee D, Marques MM, Shi S, Moshaverinia A. (2016) Gingival Mesenchymal Stem Cell (GMSC) Delivery System Based on RGD-Coupled Alginate Hydrogel with Antimicrobial Properties: A Novel Treatment Modality for Peri-Implantitis. *J Prosthodont.* 25 (2):105-115.
  77. Chakraborty PK, Adhikari J, Saha P. (2019) Facile fabrication of electrospun regenerated cellulose nanofiber scaffold for potential bone-tissue engineering application. *Int J Biol Macromol.* 122:644-652.
  78. Galler KM, D'Souza RN, Hartgerink JD, Schmalz G. (2011) Scaffolds for dental pulp tissue engineering. *Adv Dent Res.* 23 (3):333-339.

79. Patrício T, Glória A, Bártolo P, . (2013) Mechanical and Biological Behaviour of PCL and PCL/PLA Scaffolds for Tissue Engineering Applications. *Chem Eng Trans.* 32.
80. Acarregui A, Pedraz JL, Blanco FJ, Hernandez RM, Orive G. (2013) Hydrogel-based scaffolds for enclosing encapsulated therapeutic cells. *Biomacromolecules.* 14 (2):322-330.
81. Radhakrishnan J, Krishnan UM, Sethuraman S. (2014) Hydrogel based injectable scaffolds for cardiac tissue regeneration. *Biotechnol Adv.* 32 (2):449-461.
82. Nagy K, Lang O, Lang J, Perczel-Kovach K, Gyulai-Gaal S, Kadar K, Kohidai L, Varga G. (2018) A novel hydrogel scaffold for periodontal ligament stem cells. *Interv Med Appl Sci.* 10 (3):162-170.
83. Fukushima KA, Marques MM, Tedesco TK, Carvalho GL, Goncalves F, Caballero-Flores H, Morimoto S, Moreira MS. (2019) Screening of hydrogel-based scaffolds for dental pulp regeneration-A systematic review. *Arch Oral Biol.* 98:182-194.
84. Juriga D, Nagy K, Jedlovszky-Hajdu A, Perczel-Kovach K, Chen YM, Varga G, Zrinyi M. (2016) Biodegradation and Osteosarcoma Cell Cultivation on Poly(aspartic acid) Based Hydrogels. *ACS Appl Mater Interfaces.* 8 (36):23463-23476.
85. Rogovina LZ, Vasil'ev VG, Braudo EE. (2008) Definition of the concept of polymer gel. *Polymer Science Series C.* 50 (1):85-92.
86. Lee KY, Mooney DJ. (2001) Hydrogels for Tissue Engineering. *Chemical Reviews.* 101:1869–1880.
87. Van Tomme SR, Storm G, Hennink WE. (2008) In situ gelling hydrogels for pharmaceutical and biomedical applications. *Int J Pharm.* 355 (1-2):1-18.
88. Lee JH. (2018) Injectable hydrogels delivering therapeutic agents for disease treatment and tissue engineering. *Biomater Res.* 22:27.
89. Li J, Mooney DJ. (2016) Designing hydrogels for controlled drug delivery. *Nat Rev Mater.* 1 (12).
90. Cai L, Heilshorn SC. (2014) Designing ECM-mimetic materials using protein engineering. *Acta Biomater.* 10 (4):1751-1760.
91. Liu X, Shi S, Feng Q, Bachhuka A, He W, Huang Q, Zhang R, Yang X, Vasilev K. (2015) Surface Chemical Gradient Affects the Differentiation of Human Adipose-Derived Stem Cells via ERK1/2 Signaling Pathway. *ACS Appl Mater Interfaces.* 7 (33):18473-18482.
92. Park KH, Na K, Chung HM. (2005) Enhancement of the adhesion of fibroblasts by peptide containing an Arg-Gly-Asp sequence with poly(ethylene glycol) into a thermo-reversible hydrogel as a synthetic extracellular matrix. *Biotechnol Lett.* 27 (4):227-231.
93. Gkioni K, Leeuwenburgh SC, Douglas TE, Mikos AG, Jansen JA. (2010) Mineralization of hydrogels for bone regeneration. *Tissue Eng Part B Rev.* 16 (6):577-585.

94. Iaquinta MR, Mazzoni E, Manfrini M, D'Agostino A, Trevisiol L, Nocini R, Trombelli L, Barbanti-Brodano G, Martini F, Tognon M. (2019) Innovative Biomaterials for Bone Regrowth. *Int J Mol Sci.* 20 (3).
95. Musah S, Morin SA, Wrighton PJ, Zwick DB, Jin S, Kiessling LL. (2012) Glycosaminoglycan-binding hydrogels enable mechanical control of human pluripotent stem cell self-renewal. *ACS Nano.* 6 (11):10168-10177.
96. Pacifici A, Laino L, Gargari M, Guzzo F, Velandia Luz A, Polimeni A, Pacifici L. (2018) Decellularized Hydrogels in Bone Tissue Engineering: A Topical Review. *Int J Med Sci.* 15 (5):492-497.
97. Galler KM, Cavender A, Yuwono V, Dong H, Shi S, Schmalz G, Hartgerink JD, D'Souza RN. (2008) Self-assembling peptide amphiphile nanofibers as a scaffold for dental stem cells. *Tissue Eng Part A.* 14 (12):2051-2058.
98. Galler KM, Aulisa L, Regan KR, D'Souza RN, Hartgerink JD. (2010) Self-assembling multidomain peptide hydrogels: designed susceptibility to enzymatic cleavage allows enhanced cell migration and spreading. *J Am Chem Soc.* 132 (9):3217-3223.
99. Galler KM, Hartgerink JD, Cavender AC, Schmalz G, D'Souza RN. (2012) A customized self-assembling peptide hydrogel for dental pulp tissue engineering. *Tissue Eng Part A.* 18 (1-2):176-184.
100. Diniz IM, Chen C, Xu X, Ansari S, Zadeh HH, Marques MM, Shi S, Moshaverinia A. (2015) Pluronic F-127 hydrogel as a promising scaffold for encapsulation of dental-derived mesenchymal stem cells. *J Mater Sci Mater Med.* 26 (3):153.
101. Yao L, Flynn N. (2018) Dental pulp stem cell-derived chondrogenic cells demonstrate differential cell motility in type I and type II collagen hydrogels. *Spine J.* 18 (6):1070-1080.
102. Ansari S, Diniz IM, Chen C, Aghaloo T, Wu BM, Shi S, Moshaverinia A. (2017) Alginate/hyaluronic acid hydrogel delivery system characteristics regulate the differentiation of periodontal ligament stem cells toward chondrogenic lineage. *J Mater Sci Mater Med.* 28 (10):162.
103. Park SH, Kwon JS, Lee BS, Park JH, Lee BK, Yun JH, Lee BY, Kim JH, Min BH, Yoo TH, Kim MS. (2017) BMP2-modified injectable hydrogel for osteogenic differentiation of human periodontal ligament stem cells. *Sci Rep.* 7 (1):6603.
104. Sowmya S, Mony U, Jayachandran P, Reshma S, Kumar RA, Arzate H, Nair SV, Jayakumar R. (2017) Tri-Layered Nanocomposite Hydrogel Scaffold for the Concurrent Regeneration of Cementum, Periodontal Ligament, and Alveolar Bone. *Adv Healthc Mater.* 6 (7).
105. Park K. (2011) Injectable hyaluronic acid hydrogel for bone augmentation. *J Control Release.* 152 (2):207.
106. Freeman JW, Woods MD, Cromer DA, Ekwueme EC, Andric T, Atiemo EA, Bijoux CH, Laurencin CT. (2011) Evaluation of a hydrogel-fiber composite for ACL tissue engineering. *J Biomech.* 44 (4):694-699.

107. Park K. (2015) Biodegradable thermosensitive polymer gel for sustained BMP-2 delivery. *J Control Release*. 209:337.
108. Vega-Chacon J, Arbelaez MIA, Jorge JH, Marques RFC, Jafellicci M, Jr. (2017) pH-responsive poly(aspartic acid) hydrogel-coated magnetite nanoparticles for biomedical applications. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 77:366-373.
109. Gyenes T, Torma V, Gyarmati B, Zrinyi M. (2008) Synthesis and swelling properties of novel pH-sensitive poly(aspartic acid) gels. *Acta Biomater*. 4 (3):733-744.
110. Adelnia H, Blakey I, Little PJ, Ta HT. (2019) Hydrogels Based on Poly(aspartic acid): Synthesis and Applications. *Front Chem*. 7:755.
111. Cai K, Yao K, Hou X, Wang Y, Hou Y, Yang Z, Li X, Xie H. (2002) Improvement of the functions of osteoblasts seeded on modified poly(D,L-lactic acid) with poly(aspartic acid). *J Biomed Mater Res*. 62 (2):283-291.
112. Liu Y, Miao YL, Qin F, Cao C, Yu XL, Wu YH, Wang TL, Xu RG, Zhao L, Wu F, Zhang ZC, Yang JM, Yang Y, Xie X, Zhang LM, Deng FL. (2019) Electrospun Poly (Aspartic Acid)-Modified Zein Nanofibers for Promoting Bone Regeneration. *Int J Nanomedicine*. 14:9497-9512.
113. Harada K. (1959) Polycondensation of Thermal Precursors of Aspartic Acid. *J Org Chem*. 24 (11):1662-1666.
114. Gyarmati B, Némethy Á, Szilágyi A. (2013) Reversible disulphide formation in polymer networks: A versatile functional group from synthesis to applications. *European Polymer Journal*. 49 (6):1268-1286.
115. Lim S, Nguyen MP, Choi Y, Kim J, Kim D. (2017) Bioadhesive Nanoaggregates Based on Polyaspartamide-g-C18/DOPA for Wound Healing. *Biomacromolecules*. 18 (8):2402-2409.
116. Nemeth C, Gyarmati B, Abdullin T, Laszlo K, Szilagyi A. (2017) Poly(aspartic acid) with adjustable pH-dependent solubility. *Acta Biomater*. 49:486-494.
117. Craparo EF, Porsio B, Sardo C, Giammona G, Cavallaro G. (2016) Pegylated Polyaspartamide-Polylactide-Based Nanoparticles Penetrating Cystic Fibrosis Artificial Mucus. *Biomacromolecules*. 17 (3):767-777.
118. Németh C, Szabó D, Gyarmati B, Gerasimov A, Varfolomeev M, Abdullin T, László K, Szilágyi A. (2017) Effect of side groups on the properties of cationic polyaspartamides. *European Polymer Journal*. 93:805-814.
119. Lee MJ, Chen Y, Huang YP, Hsu YC, Chiang LH, Chen TY, Wang GJ. (2013) Exogenous polyamines promote osteogenic differentiation by reciprocally regulating osteogenic and adipogenic gene expression. *J Cell Biochem*. 114 (12):2718-2728.
120. Liu B, Jiang X, Cai L, Zhao X, Dai Z, Wu G, Li X. (2019) Putrescine mitigates intestinal atrophy through suppressing inflammatory response in weanling piglets. *J Anim Sci Biotechnol*. 10:69.

121. Guan J, Sacks MS, Beckman EJ, Wagner WR. (2002) Synthesis, characterization, and cytocompatibility of elastomeric, biodegradable poly(ester-urethane)ureas based on poly(caprolactone) and putrescine. *J Biomed Mater Res.* 61 (3):493-503.
122. Dahiyat BI, Hostin E, Posadas EM, Leong KW. (1993) Synthesis and characterization of putrescine-based poly(phosphoester-urethanes). *J Biomater Sci Polym Ed.* 4 (5):529-543.
123. Zrinyi M, Gyenes T, Juriga D, Kim JH. (2013) Volume change of double cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. *Acta Biomater.* 9 (2):5122-5131.
124. Matsusaki M, Yoshida H, Akashi M. (2007) The construction of 3D-engineered tissues composed of cells and extracellular matrices by hydrogel template approach. *Biomaterials.* 28 (17):2729-2737.
125. Shu XZ, Liu Y, Palumbo F, Prestwich GD. (2003) Disulfide-crosslinked hyaluronan-gelatin hydrogel films: a covalent mimic of the extracellular matrix for in vitro cell growth. *Biomaterials.* 24 (21):3825-3834.
126. Wu ZM, Zhang XG, Zheng C, Li CX, Zhang SM, Dong RN, Yu DM. (2009) Disulfide-crosslinked chitosan hydrogel for cell viability and controlled protein release. *Eur J Pharm Sci.* 37 (3-4):198-206.
127. Zhao Y, Gao S, Zhao S, Li Y, Cheng L, Li J, Yin Y. (2012) Synthesis and characterization of disulfide-crosslinked alginate hydrogel scaffolds. *Materials Science and Engineering: C.* 32 (8):2153-2162.
128. Poole LB. (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry. *Free Radic Biol Med.* 80:148-157.
129. Lam J, Clark EC, Fong EL, Lee EJ, Lu S, Tabata Y, Mikos AG. (2016) Evaluation of cell-laden polyelectrolyte hydrogels incorporating poly(L-Lysine) for applications in cartilage tissue engineering. *Biomaterials.* 83:332-346.
130. Datta S, Barua R, Sarkar R, Barui A, Chowdhury AR, Datta P. (2018) Design and development of alginate: Poly-l-lysine scaffolds by 3D bio printing and studying their mechanical, structural and cell viability properties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 402.
131. Liu X, Laurent C, Du Q, Targa L, Cauchois G, Chen Y, Wang X, de Isla N. (2018) Mesenchymal stem cell interacted with PLCL braided scaffold coated with poly-l-lysine/hyaluronic acid for ligament tissue engineering. *J Biomed Mater Res A.* 106 (12):3042-3052.
132. Zheng S, Guan Y, Yu H, Huang G, Zheng C. (2019) Poly-l-lysine-coated PLGA/poly(amino acid)-modified hydroxyapatite porous scaffolds as efficient tissue engineering scaffolds for cell adhesion, proliferation, and differentiation. *New Journal of Chemistry.* 43 (25):9989-10002.
133. Fu Q, Ren H, Zheng C, Zhuang C, Wu T, Qin J, Wang Z, Chen Y, Qi N. (2018) Improved osteogenic differentiation of human dental pulp stem cells in a layer-by-layer-modified gelatin scaffold. *J Biomater Appl.* 33 (4):477-487.

134. Galli D, Benedetti L, Bongio M, Maliardi V, Silvani G, Ceccarelli G, Ronzoni F, Conte S, Benazzo F, Graziano A, Papaccio G, Sampaolesi M, De Angelis MG. (2011) In vitro osteoblastic differentiation of human mesenchymal stem cells and human dental pulp stem cells on poly-L-lysine-treated titanium-6-aluminium-4-vanadium. *J Biomed Mater Res A*. 97 (2):118-126.
135. Boyd AE, 3rd, Lebovitz HE, Pfeiffer JB. (1970) Stimulation of human-growth-hormone secretion by L-dopa. *N Engl J Med*. 283 (26):1425-1429.
136. Baudry A, Alleaume-Butaux A, Dimitrova-Nakov S, Goldberg M, Schneider B, Launay JM, Kellermann O. (2015) Essential Roles of Dopamine and Serotonin in Tooth Repair: Functional Interplay Between Odontogenic Stem Cells and Platelets. *Stem Cells*. 33 (8):2586-2595.
137. Jones GT, Jian XC, Laskin DM. (1996) The effect of L-dopa on the healing of a rat mandibular defect. *J Oral Maxillofac Surg*. 54 (4):470-473.
138. Tsai WB, Chen WT, Chien HW, Kuo WH, Wang MJ. (2014) Poly(dopamine) coating to biodegradable polymers for bone tissue engineering. *J Biomater Appl*. 28 (6):837-848.
139. Kao CT, Lin CC, Chen YW, Yeh CH, Fang HY, Shie MY. (2015) Poly(dopamine) coating of 3D printed poly(lactic acid) scaffolds for bone tissue engineering. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 56:165-173.
140. Kadar K, Kiraly M, Porcsalmy B, Molnar B, Racz GZ, Blazsek J, Kallo K, Szabo EL, Gera I, Gerber G, Varga G. (2009) Differentiation potential of stem cells from human dental origin - promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol*. 60 Suppl 7:167-175.
141. Jung IH, Lee SH, Jun CM, Oh N, Yun JH. (2014) Characterization of the enhanced bone regenerative capacity of human periodontal ligament stem cells engineered to express the gene encoding bone morphogenetic protein 2. *Tissue Eng Part A*. 20 (15-16):2189-2199.
142. Nagatomo K, Komaki M, Sekiya I, Sakaguchi Y, Noguchi K, Oda S, Muneta T, Ishikawa I. (2006) Stem cell properties of human periodontal ligament cells. *J Periodontal Res*. 41 (4):303-310.
143. Ma L, Gao C, Mao Z, Zhou J, Shen J. (2004) Biodegradability and cell-mediated contraction of porous collagen scaffolds: the effect of lysine as a novel crosslinking bridge. *J Biomed Mater Res A*. 71 (2):334-342.
144. Del Rio B, Redruello B, Linares DM, Ladero V, Ruas-Madiedo P, Fernandez M, Martin MC, Alvarez MA. (2019) The biogenic amines putrescine and cadaverine show in vitro cytotoxicity at concentrations that can be found in foods. *Sci Rep*. 9 (1):120.
145. Mirones I, Angel Rodriguez-Milla M, Cubillo I, Marinas-Pardo L, de la Cueva T, Zapata A, Gonzalez C, Ramirez M, Garcia-Castro J. (2014) Dopamine mobilizes mesenchymal progenitor cells through D2-class receptors and their PI3K/AKT pathway. *Stem Cells*. 32 (9):2529-2538.

146. Shome S, Dasgupta PS, Basu S. (2012) Dopamine regulates mobilization of mesenchymal stem cells during wound angiogenesis. *PLoS One*. 7 (2):e31682.
147. Gong C, Lu C, Li B, Shan M, Wu G. (2017) Injectable dopamine-modified poly(alpha,beta-aspartic acid) nanocomposite hydrogel as bioadhesive drug delivery system. *J Biomed Mater Res A*. 105 (4):1000-1008.
148. Lu C, Wang X, Wu G, Wang J, Wang Y, Gao H, Ma J. (2014) An injectable and biodegradable hydrogel based on poly(alpha,beta-aspartic acid) derivatives for localized drug delivery. *J Biomed Mater Res A*. 102 (3):628-638.
149. Ma Z, Hong Y, Nelson DM, Pichamuthu JE, Leeson CE, Wagner WR. (2011) Biodegradable polyurethane ureas with variable polyester or polycarbonate soft segments: effects of crystallinity, molecular weight, and composition on mechanical properties. *Biomacromolecules*. 12 (9):3265-3274.
150. Stawikowski MJ, Fields GB. (2018) Tricine as a convenient scaffold for the synthesis of C -terminally branched collagen-model peptides. *Tetrahedron Letters*. 59 (2):130-134.
151. Eglin D, Grad S, Gogolewski S, Alini M. (2010) Farnesol-modified biodegradable polyurethanes for cartilage tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 92 (1):393-408.
152. Sawicki LA, Kloxin AM. (2014) Design of thiol-ene photoclick hydrogels using facile techniques for cell culture applications. *Biomater Sci*. 2 (11):1612-1626.
153. Winer JP, Janmey PA, McCormick ME, Funaki M. (2009) Bone marrow-derived human mesenchymal stem cells become quiescent on soft substrates but remain responsive to chemical or mechanical stimuli. *Tissue Eng Part A*. 15 (1):147-154.
154. Liu N, Zhou M, Zhang Q, Yong L, Zhang T, Tian T, Ma Q, Lin S, Zhu B, Cai X. (2018) Effect of substrate stiffness on proliferation and differentiation of periodontal ligament stem cells. *Cell Prolif*. 51 (5):e12478.
155. Khatiwala CB, Peyton SR, Putnam AJ. (2006) Intrinsic mechanical properties of the extracellular matrix affect the behavior of pre-osteoblastic MC3T3-E1 cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 290 (6):C1640-1650.
156. Wang HB, Dembo M, Wang YL. (2000) Substrate flexibility regulates growth and apoptosis of normal but not transformed cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 279 (5):C1345-1350.
157. Gamal AY, Al-Berry NN, Hassan AA, Rashed LA, Iacono VJ. (2017) In vitro evaluation of the human gingival fibroblast/gingival mesenchymal stem cell dynamics through perforated guided tissue membranes: cell migration, proliferation and membrane stiffness assay. *J Periodontal Res*. 52 (3):628-635.
158. Liao W, Okada M, Sakamoto F, Okita N, Inami K, Nishiura A, Hashimoto Y, Matsumoto N. (2013) In vitro human periodontal ligament-like tissue formation with porous poly-L-lactide matrix. *Mater Sci Eng C Mater Biol Appl*. 33 (6):3273-3280.
159. Liu Y, Zheng Shu X, Prestwich GD. (2005) Biocompatibility and stability of disulfide-crosslinked hyaluronan films. *Biomaterials*. 26 (23):4737-4746.

160. Aravindan L, Bicknell KA, Brooks G, Khutoryanskiy VV, Williams AC. (2013) A comparison of thiolated and disulfide-crosslinked polyethylenimine for nonviral gene delivery. *Macromol Biosci.* 13 (9):1163-1173.
161. Galli C, Parisi L, Elviri L, Bianchera A, Smerieri A, Lagonegro P, Lumetti S, Manfredi E, Bettini R, Macaluso GM. (2016) Chitosan scaffold modified with D-(+) raffinose and enriched with thiol-modified gelatin for improved osteoblast adhesion. *Biomed Mater.* 11 (1):015004.
162. Bae IH, Jeong BC, Kook MS, Kim SH, Koh JT. (2013) Evaluation of a thiolated chitosan scaffold for local delivery of BMP-2 for osteogenic differentiation and ectopic bone formation. *Biomed Res Int.* 2013:878930.
163. Ren F, Wang K, Zhang T, Jiang J, Nice EC, Huang C. (2015) New insights into redox regulation of stem cell self-renewal and differentiation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects.* 1850 (8):1518-1526.
164. Chang HY, Kao WL, You YW, Chu YH, Chu KJ, Chen PJ, Wu CY, Lee YH, Shyue JJ. (2016) Effect of surface potential on epithelial cell adhesion, proliferation and morphology. *Colloids Surf B Biointerfaces.* 141:179-186.
165. Hasan A, Saxena V, Pandey LM. (2018) Surface Functionalization of Ti6Al4V via Self-assembled Monolayers for Improved Protein Adsorption and Fibroblast Adhesion. *Langmuir.* 34 (11):3494-3506.
166. Wouters MA, Iismaa S, Fan SW, Haworth NL. (2011) Thiol-based redox signalling: rust never sleeps. *Int J Biochem Cell Biol.* 43 (8):1079-1085.
167. Cen SD, Yu WB, Ren MM, Chen LJ, Sun CF, Ye ZL, Deng H, Hu RD. (2016) Endogenous hydrogen sulfide is involved in osteogenic differentiation in human periodontal ligament cells. *Arch Oral Biol.* 68:1-8.
168. Jiang Z, Hua Y. (2016) Hydrogen sulfide promotes osteogenic differentiation of human periodontal ligament cells via p38-MAPK signaling pathway under proper tension stimulation. *Arch Oral Biol.* 72:8-13.
169. Datta S, Barua R, Sarkar R, Barui A, Chowdhury AR, Datta P. (2018) Design and development of alginate: Poly-L-lysine scaffolds by 3D bio printing and studying their mechanical, structural and cell viability properties. *IOP Conference Series: Materials Science and Engineering.* 402.
170. Haridas V, Sadanandan S, Collart-Dutilleul PY, Gronthos S, Voelcker NH. (2014) Lysine-appended polydiacetylene scaffolds for human mesenchymal stem cells. *Biomacromolecules.* 15 (2):582-590.
171. Lu H, Guo L, Kawazoe N, Tateishi T, Chen G. (2009) Effects of poly(L-lysine), poly(acrylic acid) and poly(ethylene glycol) on the adhesion, proliferation and chondrogenic differentiation of human mesenchymal stem cells. *J Biomater Sci Polym Ed.* 20 (5-6):577-589.
172. Partovi M, Sadeghein A, Azizi E, Ostad SN. (2002) Mitogenic effect of L-dopa on human periodontal ligament fibroblast cells. *J Endod.* 28 (3):193-196.



173. Hong S, Kim KY, Wook HJ, Park SY, Lee KD, Lee DY, Lee H. (2011) Attenuation of the in vivo toxicity of biomaterials by polydopamine surface modification. *Nanomedicine (Lond)*. 6 (5):793-801.
174. Scognamiglio F, Travan A, Borgogna M, Donati I, Marsich E, Bosmans JW, Perge L, Foulc MP, Bouvy ND, Paoletti S. (2016) Enhanced bioadhesivity of dopamine-functionalized polysaccharidic membranes for general surgery applications. *Acta Biomater*. 44:232-242.

## 10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

### 10.1. Az értekezés alapját képező saját közlemények

1. **Orsolya Hegedűs**, Dávid Juriga, Evelin Sipos, Constantinos Voniatis, Ákos Juhász, Abdenacer 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**

## 10.2. 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)

## 11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Hálával tartozom a családomnak, akik teljes szívvel támogattak tanulmányaim befejezésében.

Köszönettel tartozom témavezetőmnek, Prof. Dr. Varga Gábornak, aki biztos háttérrel adott és lehetővé tette a kutatás megvalósulását és támogatott az elképzeléseim megvalósításában.

Kiemelt hálával tartozom Dr. Nagy Krisztinának, aki a kezdetektől egyengette az utamat a tudományos életben, segített megtervezni a kísérleteimet, javítgatta a munkámat, a kézirataimat és óriási segítséget nyújtott a cikkeim elkészülésében is.

Szeretném megköszönni Dr. Perczel-Kovács Katalinnak, hogy elindított ezen az úton és mind tudományos téren, mind emberileg példakép a számomra.

Rengeteg segítséget és útmutatást kaptam Dr. Földes Annától, Dr. Kádár Kristóftól és Dr. Kerémi Beától is, amit szeretnék nekik ezúton is megköszönni. Köszönet illel továbbá az Orálbiológiai Tanszék összes dolgozóját, amiért támogatták a munkámat: Dr. Blazsek Józsefet, Dr. Czumbel László Márkot, Dr. Farkasdi Sándort, Dr. Hriczó-Koperdák Gergelyt, Rác Róbertet, Prof. Dr. Zelles Tivadart, Dr. Zsembery Ákost.

Szeretettel gondolok vissza a közös munkánkra a Nanokémiai Kutatócsoporttal: kiemelt köszönet illeti Dr. Jedlovsky-Hajdú Angélat és Dr. Juriga Dávidot, akik nélkül ez a munka nem jöhetett volna létre, és akik nem csak tudományos téren, de emberileg is utat mutattak és segítettek. Köszönöm továbbá a Kutatócsoport többi dolgozójának, Prof. Dr. Zrínyi Miklósnak, Dr. Molnár Kristófnak és Sípos Evelinnek az együttműködést.