

**A szövetregenerációs felhasználás céljára alkalmas
humán mesenchymalis őssejtek azonosítása,
kiválogatása és *in vitro* vizsgálata**

Doktori értekezés

Szepesi Áron

Eötvös Loránd Tudományegyetem Természettudományi Kar
Biológia Doktori Iskola, Immunológia oktatási program

Doktori Iskola vezetője: Dr. Erdei Anna
Programvezető: Dr. Erdei Anna
Témavezető: Dr. Német Katalin



Magyar Tudományos Akadémia, Természettudományi Kutatóközpont,
Enzimológiai Intézet

Budapest

2016

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	4
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés	6
1.1. Az őssejtek, és a regeneratív orvoslásban betöltött szerepük	6
1.2. A mesenchymalis őssejtek jellemzése	8
1.3. A mesenchymalis őssejtek immunológiai sajátosságai	9
1.4. A mesenchymalis őssejtek szövetregenerációs képessége	10
1.5. A mesenchymalis őssejtek szöveti forrásai	11
1.6. A periodontális ligamentum sejtek	12
1.7. A periodontális ligamentum őssejtek, és a „side population”	13
1.8. Implantátumok beépülésének elősegítése	14
2. Célkitűzések	16
3. Módszerek	17
3.1. A vizsgált sejtek izolálása és tenyésztése	17
3.2. A sejtek morfológiájának és méretének meghatározása	19
3.3. A sejtek jellemzése áramlási citometriás módszerrel	19
3.4. Az izolátumok jellemzése immuncitokémiai módszerrel	22
3.5. Kolónia formáló teszt	22
3.6. Sejtsztódás, és a sejtek mennyiségének meghatározása	22
3.7. A mesenchymalis stroma sejtek differenciációs képességének vizsgálata	23
3.7.1. Csont irányú differenciációs képesség vizsgálata	23
3.7.2. Zsír irányú differenciációs képesség vizsgálata	24
3.7.3. Porc irányú differenciációs képesség vizsgálata	25
3.7.4. Az endotél irányú differenciáció vizsgálata angiogenezis módszerrel	25
3.8. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű PCR módszerrel	26
3.9. GFP fehérjét kifejező zsírszöveti őssejt előállítása lentivírus felülúszóval	27
3.10. A SAK-c[RGDfC] peptidkonjugátum vizsgálatához használt módszerek	27
3.10.1. A bevonatok elkészítése, és a sejtek kikapasztása	28
3.10.2. Time-lapse mikroszkópiás mérések	29
3.11. Statisztikai analízis	29
4. Eredmények	30
4.1. A különböző humán szövetekből származó mesenchymalis őssejtek jellemzése	30

4.1.1. Morfológia és méret tanulmányozása.....	30
4.1.2. Kolónia formáló teszt és osztódási képesség	31
4.1.3. A mesenchymalis őssejtek sejtfelszíni markerei	32
4.1.4. A különböző eredetű őssejtek csont, zsír és porc irányú differenciációja.....	34
4.1.5. Endotél irányú differenciációs képesség vizsgálata	38
4.1.6. A pluripotencia- és mesodermalis eredetre utaló markerek vizsgálata	41
4.2. Az ABCG2 fehérjét kifejező periodontális ligamentum őssejtek jellemzése	44
4.2.1. Az ABCG2 transzporter kifejeződése periodontális ligamentum őssejteken	44
4.2.2. Az ABCG2 kifejező Pl sejtek differenciációs képességének vizsgálata	45
4.3. Implantátumok csontbeépülését elősegítő vegyület tesztelése.....	51
4.3.1. A peptid koncentrációjának és a sejtek szélesztési idejének optimalizálása.....	52
4.3.2. A sejtek kitapadása és differenciációja különböző implantátumok felszínén	52
5. Eredmények megvitatása.....	55
6. Összefoglalás.....	63
7. Summary	64
8. Köszönetnyilvánítás	65
9. Irodalomjegyzék.....	66
10. Saját közlemények jegyzéke	85

Rövidítések jegyzéke

ABCG2	ATP kötő kazetta transzporter család G2 génje (ATP-binding cassette sub-family G member 2)
ALP	alkalikus foszfatáz
APC	allofikocianin
α -SMA	α -simaizom aktin (α -smooth muscle actin)
bFGF	bázikus fibroblaszt növekedési faktor (basic fibroblast growth factor)
BSA	szarvasmarha szérum albumint (bovine serum albumin)
CD marker	differenciálódási antigén (cluster of differentiation)
cDNS	copy (másolati) DNS
CEMP1	cementum protein 1
CFU-F	fibroblaszt-kolónia képző sejtek (colony-forming unit fibroblast)
DCV	Vibrant® DyeCycle Violet™
EGM-2	endotél sejt növekedési médium (endothelial cell growth medium)
cRGD	ciklikus arginil-glicil-aszpartát motívumot tartalmazó peptid
Csv-MSC	csontvelői mesenchymalis őssejt
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol dihidroklorid
DMEM	Dulbecco módosított Eagle médium (Dulbecco's Modified Eagle Medium)
FBS	foetalis borjúsavó (fetal bovine serum)
FITC	fluoreszcein-izotiocianát
FN	fibronectin
FTC	fumitremorgin C
GAPDH	glicerinaldehid-3-foszfát-dehidrogenáz
GBO	Geistlich cég által forgalmazott Bio-Oss® csontgranulátum
GFP	zöld fluoreszcens fehérje (green fluorescent protein)
GVHD	graft versus host betegség (graft versus host disease)
HEK 293	humán embrionális vesesejt (Human Embryonic Kidney 293)
HEK 293T	humán embrionális vesesejt (Human Embryonic Kidney 293T)
HLA	humán leukocita antigének
Hox gének	homeotikus szelektor (homeotic selector) gének
HUES9	humán embrionális őssejtvonal 9 (human embryonic stem cell line 9)

HUVEC	humán köldökvéna endotél sejt (human umbilical vein endothelial cells)
hTERT	humán telomeráz reverz transzkriptáz
iPS	indukált pluripotens őssejt (induced pluripotent stem cell)
MFI	medián fluoreszcencia intenzitás
MHC	fő hisztokompatibilitási komplex (major histocompatibility complex)
MOI	fertőzés multiplicitása (multiplicity of infection)
MSC	multipotens vagy mesenchymalis ő-, vagy stroma sejt (multipotent/mesenchymal stem/stromal cell)
mRNS	hírvivő RNS (messenger RNA)
OCN	osteocalcin
OPN	osteopontin
OSX	osterix
PBS	foszfát-pufferolt fiziológiás sóoldat (phosphate-buffered saline)
PCR	polimeráz lánreakció (polymerase chain reaction)
PE	fikoeritrin
PI-MSC	periodontális ligamentum eredetű mesenchymalis őssejt
RGD	arginil-glicil-aszpartát motívumot tartalmazó peptid
RUNX2	runt-related transcription factor 2
SP	side population
SSEA-4	stage-specific embrionic antigen-4
SVF	stroma vasculáris frakció (stromal-vascular fraction)
VEGF	vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (vascular endothelial growth factor)
Wk-MSC	Wharton kocsonya eredetű mesenchymalis őssejt
Zs-MSC	zsírszövet eredetű mesenchymalis őssejt

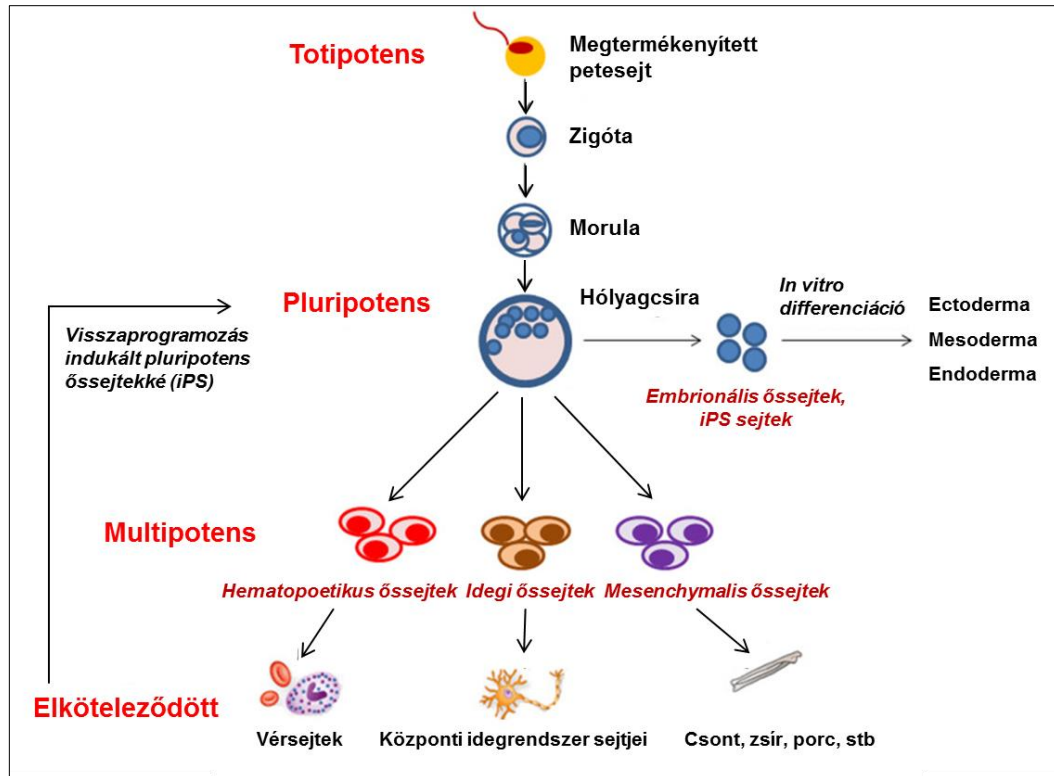
1. Bevezetés és irodalmi áttekintés

1.1. Az őssejtek, és a regeneratív orvoslásban betöltött szerepük

Az emberi szervezetben számtalan különböző típusú őssejt megtalálható. Ezek közös vonása, hogy egyenlőtlen osztódással képesek önmaguk klónját létrehozni, vagyis önmegújító képességgel rendelkeznek, valamint létre tudnak hozni önmaguktól eltérő tulajdonsággal rendelkező, valamilyen szöveti funkcióra specializálódott utódsejtet. Ez utóbbi folyamatot nevezzük differenciálódásnak. Ezt a természetes folyamatot mesterségesen tenyésztőedényben, vagy úgynevezett bioreaktorokban is végre lehet hajtani, ha tudjuk biztosítani az irányított differenciációhoz szükséges speciális faktorokat, tenyésztési körülményeket. Az ilyen módon - *in vitro* körülmények között - létrehozott szövet felhasználható olyan sérülések gyógyítására, ahol a szervezet nem képes ezt a feladatát ellátni. Az állandó donorhiány, valamint szöveti összeférhetetlenség miatt folyamatos a klinikai igény a „tissue engineering” módszerrel (nem túl szerencsés magyar fordításban nevezik szöveti sebészetnek is) előállított szövetekre olyan esetekben, mint például a szervezet regenerációs képességét meghaladó méretű csontsérülések [1], kiterjedt porcdefektusok [2], vagy teljes szervet érintő károsodások [3]. Éppen ezért nagyon intenzíven kutatott területről van szó, amely számos eredményt szolgáltatott az elmúlt években a legkülönbözőbb szövetek, szervek - mint például szív(izom) [4], máj [5], hámszövet [6] valamint csont [7] - egy részének vagy egészének pótlására. Forrásukat és differenciálódási állapotukat tekintve különböző sejtekkel történtek próbálkozások regeneratív orvoslás céljából történő felhasználásra (**1. ábra**) [8]. A továbbiakban részletesebben jellemezzük a terápiás alkalmazás szempontjából szóba jöhető sejteket.

Az első humán *embrionális őssejtvonalt* létrehozása 1998-ban [9] nagy reményekkel kecsegtetett a szövetregenerációs felhasználás területén. A hólyagcsíra állapotban lévő embrió belső sejtcsoomójából kivett sejtek fenntarthatók speciális tenyésztési körülmények között, és pluripotens differenciációs állapotuknak köszönhetően spontán, vagy irányított differenciáció segítségével elkötelezhetők az emberi szervezetben fellelhető bármely szövet irányába, kivéve az extraembrionális szöveteket, mint a méhlepény, vagy köldökzsinór. Hamar kiderült azonban, hogy terápiás célból történő felhasználásukat korlátozza teratóma képző tulajdonságuk, valamint szöveti

összeférhetetlenségük. További hátrányuk, hogy a sejtvonalak alapítása csak emberi embrió elpusztításának árán lehetséges, ezért használatukkal kapcsolatban nagyon komoly etikai kétségek merülnek fel [10].



1. ábra: A terápia alkalmazás szempontjából érdekes őssejtek

Hasonló okokra vezethető vissza a mérsékelt optimizmus, ami az *indukált pluripotens őssejtek* transzplantációs célú felhasználását (induced pluripotent stem cell, iPS) övezi. Le kell küzdeni ugyanis a kutatóknak a differenciált sejtekből pluripotens állapotba visszaprogramozott sejtek genomi instabilitását, tumorképző hajlamát, valamint esetleges allogén transzplantáció esetén HLA (humán leukocita antigének) összeférhetlenségét [11]. A legkülönbözőbb farmakológiai vizsgálatokban és a személyre szabott orvoslás területén történő alkalmazásuk mindenesetre nagyon ígéretesnek látszik [12].

Az *in vivo* transzplantációs kísérletekben azonban egyre inkább háttérbe szorítják a pluripotens sejteket a *szöveti eredetű ős-,* vagy *elődsejtek,* amelyek - szemben a fent említett embrionális és iPS sejtekkel - már részben elköteleződtek valamilyen szöveti irányba, vagyis csak bizonyos sejtípusokat tudnak létrehozni. Ilyenek a csontvelői állományban, illetve a köldökzsinórvérben található hematopoetikus őssejtek, amelyek a

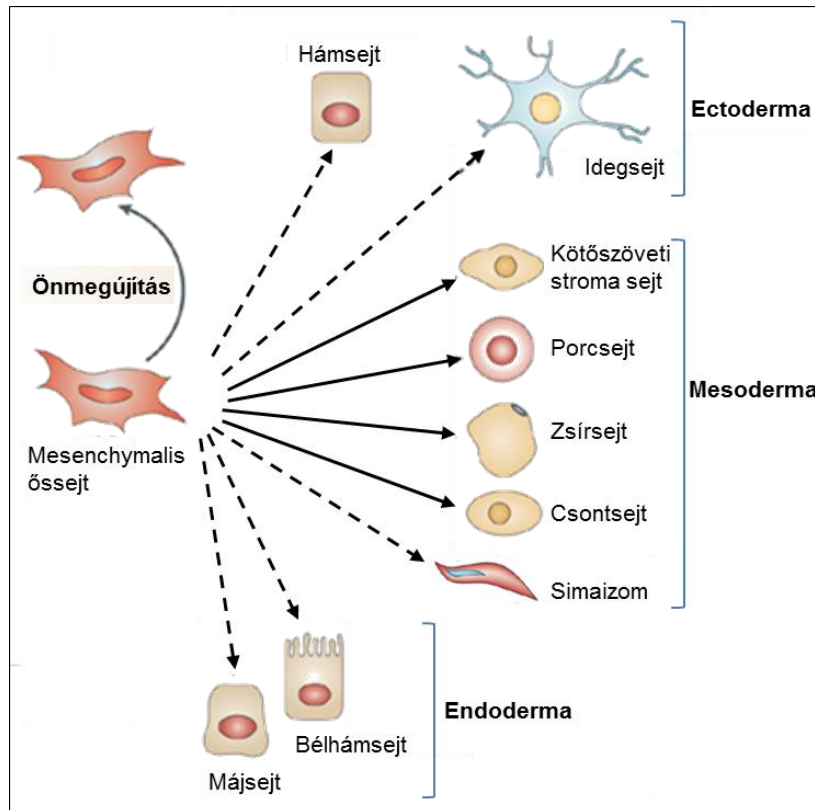
mai napig a legnagyobb transzplantációs sikertörténetet jelentik. Számptalan, a vérképző rendszer defektusára visszavezethető betegség esetében alkalmaztak már eredményes csontvelő átültetést, mint például a különböző eredetű limfómák [13], szisztémás lupus erythematosus [14] vagy sarlósejtes anémia [15] gyógyításában.

1.2. A mesenchymalis őssejtek jellemzése

A csontvelőben a hematopoetikus őssejtek mellett megtalálhatók még olyan fibroblaszt alakú önmegújulásra képes sejtek, amelyek egyik fontos feladata, hogy a vérképző őssejtek számára biztosítanak megfelelő mikrokörnyezetet [16]. Először Friedenstein és munkatársai, majd később több munkacsoport is kimutatta, hogy az alkalmas „niche” megteremtésén túl ezek a sejtek képesek egyenlőtlen osztódással, *in vitro* és *in vivo* környezetben csont, zsír, porc, illetve fibroblaszt sejteket is létrehozni [17-21]. Ezeket a *multipotens stroma sejteket* nevezik más néven *mesenchymalis őssejteknek (multipotent/mesenchymal stem/stromal cell)*, röviden MSC-nek.

Az International Society for Cellular Therapy (ISCT) által 2006-ben megfogalmazott, és ma is elfogadott kritériumrendszer szerint akkor beszélhetünk MSC-kről, ha egy szöveti izolátumból nyert sejtpopulációt alkotó sejtek: a) kitapadnak műanyag tenyésztőedény felületére, b) a fentebb már említett csont, zsír, porc irányú *in vitro* differenciációs képességgel rendelkeznek, c) sejt felszínükön kifejezik a CD105, CD73, CD90 és CD44 antigéneket és nem hordozzák a hematopoetikus sejtekre jellemző CD45, CD34, CD14 vagy CD11b, CD79alpha vagy CD19 és HLA-DR antigéneket [22].

Napjainkig - a csontvelői forráson túl - gyakorlatilag minden létező szövetből izoláltak ezen tulajdonságokkal rendelkező sejteket, beleértve zsírt, vázizmot, simaizmot, valamint fogasszociált szöveteket [20,23-25]. Az MSC-k a „standard” mesodermális sejt típusokon (csont, zsír, porc) kívül képesek további mesodermális eredetű sejt típusokat, úgymint endotél [26], vázizom [27] vagy simaizom sejteket [28], illetve csírvonalakat átívelően - eredetileg endodermális eredetű - májsejteket [29], vagy - klasszikus embriológiai értelemben - ektodermális eredetű idegsejteket [30] is létrehozni (**2. ábra**) [31].



2. ábra: A mesenchymalis őssejtek plaszticitása

1.3. A mesenchymalis őssejtek immunológiai sajátosságai

Az MSC-k többirányú differenciálódási képessége mellett mindenképpen ki kell emelni különleges immunológiai szerepüket is. Kimutatták *in vitro* valamint *in vivo* vizsgálatok során, hogy az MSC-k gyakorlatilag az immunrendszer valamennyi sejt-típusára képesek hatni, mégpedig az immunszuppresszió irányába. A citotoxikus és helper T, valamint a B limfociták, makrofágok és monociták, természetes ölősejtek, továbbá a dendritikus sejtek proliferációjának, valamint differenciációjának gátlását sejt-sejt kapcsolatokon keresztül, valamint szolubilis faktorok termelésével is ki tudják fejteni. Az immunválasz gátlásában szerepet játszó regulátoros T sejtek működését ellenben serkentik, ezzel is fokozva annak immungátló hatását [32]. További immunológiai vonatkozású tulajdonságuk, hogy alacsony szinten (vagy egyáltalán nem) fejezik ki a szöveti összeférhetetlenségért felelős MHC-I és MHC-II (major histocompatibility complex, fő hisztokompatibilitási komplex) antigéneket [33,34].

A fentebb felsorolt előnyös adottságaiknak: a) széleskörű plaszticitásuknak, b) különleges immunológiai sajátágaiknak, c) valamint annak a tulajdonságuknak, hogy a

pluripotens sejtekkel szemben *in vivo* nem képeznek teratómát, d) továbbá annak a ténynek, hogy hozzáférésükhöz nem szükséges elpusztítani embriókat, köszönhetően kerültek az elmúlt években a regeneratív medicina figyelmének fókuszába [10].

Az MSC-k olyan nagyfokú immunuszpresszív tulajdonsággal bírnak, hogy az autológ alkalmazáson túl allogén terápiás beavatkozásokra is alkalmasnak bizonyultak [35], sőt olyan klinikai kísérletekben kerültek felhasználásra, ahol a szervezet immunválaszának drasztikus mérséklésére volt szükség, mint például az akkut GVHD (graft versus host disease, graft versus host betegség) [36], vagy az előrehaladott autoimmun Chron betegség [37]. Az MSC terápia egyik jelentős mérföldköve volt a Prochymal nevű MSC készítmény piacra kerülése 2012-ben. Azóta számtalan olyan klinikai esetben alkalmazták sikeresen, amikor a hagyományos szteroid gyulladáscsökkentők hatástalannak bizonyultak [38].

1.4. A mesenchymalis őssejtek szövetregenerációs képessége

Az MSC-k természetes szövetregenerációban betöltött szerepe kettős. Egyfelől parakrin faktorokkal képesek gátolni a szöveti sérülés helyén a túlzott gyulladásos folyamatokat, továbbá megakadályozzák a hegképződést, és segítik a szövet érhalózatának kialakítását is. Ezek a termelt faktorok különböző összetételű szekretált gyulladáscsökkentő citokin/kemokin elegyből, mikrovezikulákból/exoszómákból állnak, valamint kimutatták, hogy az MSC-k képesek mitokondriumok átadásával is segíteni a sérült szövet helyreállítását [39]. Másfelől, differenciációs képességüknek köszönhetően - a sérülés helyére vándorolva - képesek a szöveti sérülés helyreállításában önmaguk is közvetlenül részt venni, mint szövetpótló elemek. Elsősorban a már említett mesodermális csíravonal irányú - csont, zsír, porc - sejtekké tudnak elköteleződni, de egyes források szerint, ennél jóval szélesebb differenciációs spektrummal rendelkeznek [29, 30]. A regeneratív orvoslásban igyekeznek kihasználni immunmoduláns hatásuk mellett nagyfokú differenciációs képességüket is. Éppen ezért, a csontpótló beavatkozásokban való felhasználásuk egyik legintenzívebben, és legreménykeltőbb eredményekkel szolgáló terület.

A klinikai gyakorlatban óriási szükség lenne olyan módszerekre, melyek gyakorlatilag korlátlanul szolgáltatnák a beültethető csontgraftokat trauma, vagy tumor következtében kialakult kritikus méretű csontdefektusok, [40] vagy a periodontiumot érintő agresszív periodontitisz [41] okozta léziók pótlására. Az ilyen jellegű sérülések

regenerációja nagyon sok időt vesz igénybe, sok esetben nem is valósul meg kizárólag a szervezet támogatásával. Az idegen donor eredetű csontgraftok korlátozott elérhetősége, és az autológ csontok kinyerésekor jelentkező fájdalom, valamint a sebészeti beavatkozással járó egyéb mellékhatások miatt jelentősen megnőtt az *in vitro* tervezett csontszövetek iránti igény [42].

A jelenlegi gyakorlatban különböző autológ, vagy allogén csontképző sejteket tartalmazó szöveti graftokat használnak fel, gyakran valamilyen szintetikus implantátummal kombinálva, a csontszövet regenerációjának elősegítésére. Ezeknek a sejteknek, a gyors és hatékony beépülés érdekében, nagy csontképző potenciállal kell rendelkezni. A humán oszteoblasztok limitált hozzáférhetősége miatt a figyelem az elődsejtek, és az őssejtek - ezen belül is a mesenchymalis őssejtek - irányába fordult [43].

A megfelelő csontgraftok előállításához nem elegendő csupán a legjobb csontképző tulajdonsággal rendelkező sejt kiválasztása. A kritikus méretű csontdefektusok regenerációjához nagyméretű graftokra van szükség, amelyek belsejének tápanyagellátásáról is gondoskodni kell. Az érhalózat kialakításának hiányában ugyanis, a graft belsejében nekrotikus folyamatok indulnak el, amelyek a szövet teljes elhalásához vezethetnek. Ez megakadályozható az *in vitro* előállított, kiterjedt csontszövethez érkező sejtek hozzáadásával [44]. Ideális esetben ugyanazon forrásból származó előd-, vagy őssejt képes lehet ezt a kettős funkciót ellátni. A mesenchymalis őssejtek teljesítik ezt az igényt, ugyanis a szövetekből kinyert stroma vasculáris frakcióban (stromal-vascular fraction, SVF) nagy mennyiségben vannak jelen csont-, és érprogenitor sejtek, amelyek felhasználásával vaszkularizált csontgraftok hozhatók létre [45].

1.5. A mesenchymalis őssejtek szöveti forrásai

Csontvelői mesenchymalis sejteket már néhány éve felhasználnak regeneratív orvoslás céljából. A donorból történő izolálásuk azonban számos hátránnyal jár, többek között fájdalommal, esetleges szövődeményekkel, mindezt csak viszonylag kevés mennyiségű hasznos őssejtért [20]. A zsírszövet ezzel szemben arányaiban sokkal nagyobb számban tartalmaz önmegújító képességgel rendelkező őssejteket, amelyek minimális mellékhatással - például zsírleszívással - kinyerhetők, és az eljárás akár rövid időn belül megismételhető. Ennek megfelelően, számos klinikai alkalmazásban

próbálták hasznosítani, többek között csontgraftok humán felhasználás céljából történő előállítására [46,47]. A zsírszöveten kívül még több olyan műtéti melléktermékként keletkező szöveti forrás létezik, amely az esetek túlnyomó többségében kidobásra kerül, pedig terápiás szempontból hasznos őssejteket tartalmaz [48]. Ilyen például a köldökzsinór belsejében, az erek között található kötőszövetes állomány, a Wharton kocsonya, vagy a méhlepény [49-51], illetve a szájszészeti úton eltávolított fog. A felnőtt fogak fogbél, más néven pulpa állománya, illetve a foggyökér felszínén található periodontális ligamentum is tartalmaz multipotens sejteket [52].

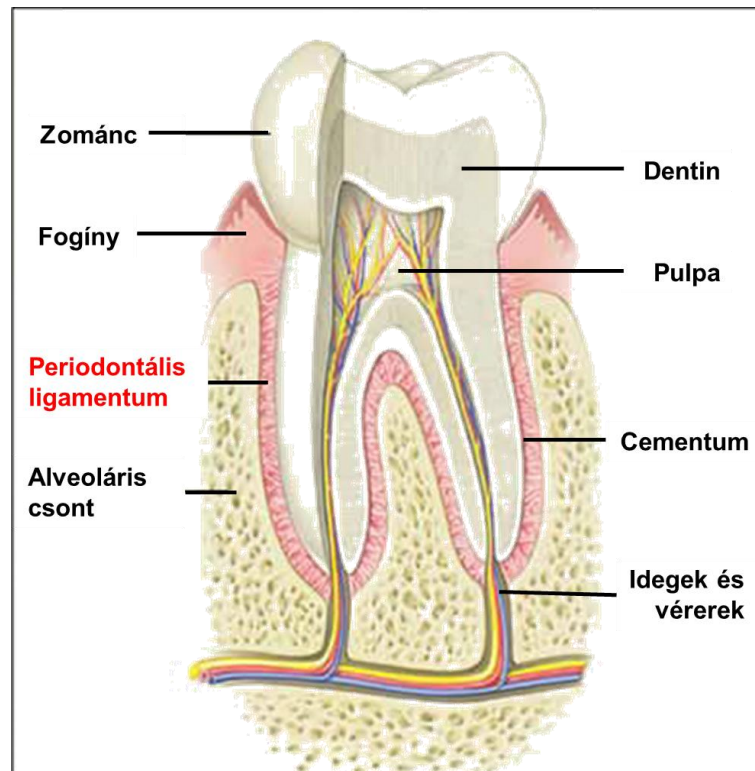
A különböző szövetekből származó őssejtek között azonban jelentős különbségek lehetnek osztódási-, differenciálódási valamint immunmoduláns képességüket tekintve [53]. Az *in vitro* tenyésztett sejt kultúrákon belül is nagyon eltérő alakú, méretű és differenciáltsági állapotú sejtek találhatók, attól függően, hogy a sejt ciklus mely fázisában állnak, illetve elköteleződtek-e már valamely irányba. A terápiás felhasználás szempontjából elengedhetetlen a különböző szöveti forrásból származó sejtek alapos feltérképezése. Ez a folyamat a kétezres évek közepétől kezdve a mai napig tart [54,55].

1.6. A periodontális ligamentum sejtek

A periodontális ligamentum olyan lágy kötőszövet, amely embrionális eredetét tekintve a velőcsőből fejlődött ki, és fiziológiás feladata a fog rögzítése a fogmederbe. A foggyökér cementum rétege, valamint az alveoláris csont felszíne között helyezkedik el (**3. ábra**) [56], és pányvázó feladata mellett a periodontium homeosztatikuss és regenerációs funkcióját is ellátja [57, 58]. A periodontális ligamentum fibroblaszt sejtekből épül fel, amelyek között kisebb számban mesenchymalis őssejt tulajdonságokkal rendelkező, úgynevezett periodontális ligamentum őssejtek (PI-MSC) találhatók, ahogyan azt korábban más csoportok, valamint mi is kimutattuk [24,59]. Ezek az őssejtek egyszerűen izolálhatók a műtéti úton eltávolított bölcsességfogak felszínéről, és könnyen fenntarthatók, valamint szaporíthatók *in vitro* sejttenyésztésben.

Fogvesztés, vagy agresszív periodontitisz esetén [60,61] felmerül az igény olyan sejtterápiás megoldásra, amely képes pótolni a roncsolódott szöveteket. Ilyen esetben nem elegendő csak a pányvázó kötőszöveti rostok regenerációja, hanem a cementum réteg pótlásáról is gondoskodni kell [62]. A hatékony regeneratív orvoslás céljából történő felhasználáshoz figyelembe kell venni, hogy mely anatómiai szegmensből izolált sejtek lehetnek a legalkalmasabbak [47]. Megfigyelték, hogy a PI-MSC-k pozitív

hatással vannak a csontregenerációra és összeintegrációra csontgrafttal [63], vagy szintetikus implantátummal [64] együtt beültetve a defektus helyére. Kimutatták továbbá hatékony cementum képző tulajdonságát is [24,65], ezért talán érdemes lehet előnyben részesíteni ezt a sejtípust az egyéb szövetekből származó MSC izolátumokkal szemben. A PI őssejtek oszteoblaszt és cementoblaszt fenotípusának megállapítása az alkalikus foszfatáz (ALP) enzim, osteopontin (OPN), osteocalcin (OCN), osterix (OSX), és cementum protein 1 (CEMP1) gének kifejeződésén alapszik [65-67]. Az oszteogén/cementogén tulajdonságuk mellett zsír, és porcsejteket is tudnak létrehozni indukció hatására, és kifejezik az MSC sejtekre jellemző sejtfelszíni jelölő molekulákat (CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105, CD166), valamint nem expresszálják a hematopoetikus markereket, ezért nevezhetjük őket mesenchymalis őssejteknek.



3. ábra: A periodontális ligamentum fiziológiás elhelyezkedése

1.7. A periodontális ligamentum őssejtek, és a „side population”

Régóta fennálló igény a multipotens stróma sejtek esetében, hogy egyedi marker alapján ki lehessen válogatni a heterogén sejtpopulációból a terápiásan hasznos sejteket.

A PI-MSK-k esetében is számos próbálkozás történt fokozott differenciációs képességgel rendelkező sejtek, egyedi molekulák (CD106, CD146, SSEA-4, STRO-1) segítségével történő azonosítására. Ezek az eredmények azonban gyakran nem voltak elég meggyőzőek, vagy a módszer csupán nagyon kevés hasznos sejt kiválogatására volt alkalmas, amely nem teszi lehetővé azok terápiás célú felhasználását [68-70].

Egy lehetséges megközelítés multipotens sejtek megtalálására az úgynevezett „side-population” (SP) sejtek kiválogatása. Ezeket a sejteket az alacsony Hoechst 33342 festődés jellemzi. Az ABCG2 fehérje aktív transzport segítségével megakadályozza ugyanis, hogy a sejtek felvegyék a festéket [71]. Az elmúlt években számos egészséges, és tumoros szövetben találtak SP sejteket, amelyeket elődsejtekként, vagy őssejtekként jellemeztek [72-74]. A periodontális ligamentum is tartalmaz ilyen SP populációt [75], azonban még semmilyen funkciót nem tudtak társítani ezekhez a sejtekhez. Ninomiya és munkatársai [76] patkányok periodontális ligamentumából származó SP frakciójának fokozott csont differenciációs képességéről számoltak be, ám ebben az esetben a festék eltávolításáért egy másik multidrog transzportert, az ABCB1 fehérjét tették felelőssé.

Ezen tanulmányok alapján feltételezhető volt, hogy az ABCG2 fehérjét kifejező periodontális ligamentum sejtek megváltozott differenciációs profillal rendelkeznek. Fontos megjegyezni, hogy az ABCG2 kifejező sejteket antitest segítségével válogattuk ki, ami alkalmassá teszi a módszer terápiás célból történő alkalmazását, szemben a mutagén tulajdonsággal bíró DNS-kötő festékek segítségével történő szortolással.

1.8. Implantátumok beépülésének elősegítése

Trauma, vagy tumor okozta kiterjedt csontszövet hiány esetében, szükségessé válhat implantátumok beültetése a károsodott területre. A szintetikus csontpótló anyagok beépülésének MSC-vel történő elősegítése, az utóbbi évtizedben a regeneratív orvoslás egy új irányzatát jelölte ki. A titánötvözet csontszövethez tapadását felgyorsítja a beültetésre váró implantátum mesenchymalis stroma sejtekkel való befedése [77], továbbá fokozott csontszövetképződés figyelhető meg titánból készült hálóra kitapasztott őssejtek ortotopikus, vagy ektopikus alkalmazása esetén [78,79]. Intenzív csontképződést eredményezett, ha nyúlóból származó MSC-vel borítottak felületkezelt titáncsavarokat és ültettek immundeficiens egerek bőre alá [80]. Szervetlen csontmátrix pótló anyagok, mint a hidroxipatit, a trikalcium-foszfát, vagy a szarvasmarha csontból

készült Bio-Oss® granulátumok multipotens sejtekkel való kombinációja is a csontképződés fokozódását eredményezte [81,82].

Ezek az eredmények azt mutatják, hogy az MSC-k megkönnyítik, elősegítik az implantátumok oszeintegrációs folyamatát. A zsírszövetből származó MSC-k titánötvözet és ásványi mátrix felületen is képesek osztódni, valamint oszteoblasztokat képezni, ezért implantológiai felhasználás szempontjából ideális jelöltek lehetnek [83,84].

A megfelelő beépülés legnagyobb akadályát az esetek túlnyomó többségében az jelenti, hogy a terápia célra szánt sejtek lassan, és nehezen tapadnak ki az implantátum felületére. Nehézséget jelent továbbá, hogy a mesenchymalis őssejtek *ex vivo* tenyésztése állati szérumban történik, míg a klinikai gyakorlatban ez nem megengedett. Szérumban azonban a sejtek viselkedése megváltozik, adhéziós képességük csökken [85]. Kitapadásuk elősegítésére, és hosszú távú túlélésük biztosítása érdekében ezért ezeket a felszíneket valamilyen fizikai, vagy kémiai eljárással kezelik. Ilyen kémiai eljárásnak tekinthető a felületek biomimetikus anyaggal történő bevonása. Az arginil-glicil-aszpartát (RGD) peptideket széles körben alkalmazták ilyen biomimetikus polimerek létrehozására [86]. Ezek a vegyületek alkalmasnak bizonyultak MSC-k titán és csontmátrix szcaffoldok felületéhez történő rögzítésére, és oszteogén differenciációjának indukciójára is [87-90].

A szintetikus peptidek nagy előnye a természetes anyagokból készült bevonatokkal szemben, amilyen például a fibronectin, hogy ellenállnak a proteolitikus degradációnak, valamint szabadon változtatható bioaktív motívumaik segítségével a kívánt hatás optimalizálható. További előnyük, hogy előállításuk költséghatékony [86].

2. Célkitűzések

- 1) Célunk volt a regeneratív orvoslás céljára felhasználható, *in vitro* kultúrában tartott humán a) zsírszöveti, b) Wharton kocsonyából izolált, c) foggyökérhez asszociált, fejlődéstanilag velőcső eredetű periodontális ligamentumból, valamint d) csontvelőből származó mesenchymalis őssejtek összehasonlítása, és a minták heterogenitásának bemutatása különböző módszerekkel. Az izolátumokat alkotó sejtek méretének, morfológiájának, kolóniaformáló és osztódási képességének vizsgálata, sejtfelszíni molekuláinak feltérképezése áramlási citométerrel. Terveink között szerepelt továbbá a sejtek zsír- és porcképző potenciálja mellett részletesen a csont-, valamint endotél irányú differenciációs képességük, illetve pluripotencia markereik kifejeződésének tanulmányozása.
- 2) További célunk volt olyan sejtfelszíni jelzőmolekula megtalálása mesenchymalis őssejteken, amelynek segítségével a heterogén összetételű izolátumokból kiválogathatók a terápiás szempontból hasznos őssejtek.
- 3) A velünk együttműködő csoport kimutatta egy ciklikus RGD motívumot tartalmazó elágazó polimerről, hogy segíti a különböző sejtek kitapadását, és túlélését műanyag sejttenyésztő edényeken és üveg felületen. Célunk volt ennek továbbfejlesztett változatán adhéziós és sejt differenciációs kísérletek elvégzése mesenchymalis őssejtekkel, klinikai szempontból érdekes implantátum anyagok - titán, Bio-Oss® csontgranulátum - felszínén.

3. Módszerek

3.1. A vizsgált sejtek izolálása és tenyésztése

Szöveti összejekészítményeket állítottunk elő különböző humán szöveti mintákból. A mesenchymalis összejteket egészséges, 4-20 éves nő és férfi páciensekből: a) ortopédiai műtét során eltávolított szubkután zsírszövetből (Zs-MSc, n=3, kor: 4-5 év); b) szülést követően a köldökzsinór ereit körülvevő zselés kötőszöveti állományból, a Wharton kocsonyából (Wk-MSc; n=3); c) szájsebészeti úton eltávolított bölcsességfogak gyökérfelszínén található, úgynevezett periodontális ligamentum szálakból (Pl-MSc; n=3, kor:17-20 év), d) ortopédiai műtét melléktermékeként keletkező combcsont csontvelőjéből (Csv-MSc; n=1, kor: 4 év) izoláltuk. A tevékenységet a magyar Egészségügyi Tudományos Tanács (ETT) hivatalos engedélyével végeztük (az engedély száma: 24083-3/2013/EHR). A kísérletben szereplő valamennyi szövetminta vételezése, illetve tudományos kísérletekben történő felhasználása a donorok (illetve szülőjük vagy gondviselőjük) megfelelő szóbeli és írásbeli tájékoztatását követően, írásos beleegyezésükkel történt.

A kísérleteink többségében a Thermo Fisher Scientific (Waltham, USA) cég által forgalmazott reagenseket használtuk, az ezektől való eltérést jeleztük.

Zsírszövetből származó összejtek

A zsírszöveti mintákat kétszeri foszfát pufferelt sóoldatos (phosphate buffered saline, PBS) mosást követően, 0.1% IV-es típusú kollagenázzal (Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) 1 órán keresztül, 37°C hőmérsékleten emésztettük. Az emésztés leállításához alpmédiumot használtunk, amelynek összetétele a következő: DMEM-F12 1:1 arányú oldat, kiegészítve 10% magzati szarvasmarha szérummal (fetal bovine serum, FBS), 2 mM L-glutaminnal, valamint 50 µg/mL gentamicinnel. A sejteket centrifugáltuk 1200 percenkénti fordulatszámra. A csapadékot *növekedési médiumban*: alpmédium kiegészítve 1 ng/ml bázikus fibroblaszt növekedési faktorról (basic fibroblast growth factor, bFGF) szuszpendáltuk, és 1×10^5 db sejt/cm² sűrűséggel tenyésztőedénybe tettük. A továbbiakban hetente egyszer 4×10^3 db sejt/cm² sűrűséggel oltottuk át a sejteket.

Periodontális ligamentum eredetű őssejtek

A szájbélszervi úton eltávolított fogakat PBS oldattal mostuk, majd steril szikével leválasztottuk a felszínéhez tapadt periodontális ligamentum szálakat. A szövet emésztését 0.1% I-es típusú kollagenázzal 1 órán keresztül 37°C hőmérsékleten végeztük (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). Az emésztést azonos térfogatú növekedési médiummal állítottuk le, és centrifugáltuk 2100 percenkénti fordulatszámon, majd a csapadékot *növekedési médiumban* szuszpendáltuk, és 2×10^5 db sejt/cm² sűrűséggel tenyésztőedénybe tettük. Tenyésztésük során hetente egyszer 4×10^3 db sejt/cm² sűrűséggel oltottuk át a sejt kultúrákat.

Wharton kocsonyából származó őssejtek

A köldökzsinórokat a születést követő 24 órán belül feldolgoztuk. A középső, körülbelül 10 cm hosszúságú részt 1-2 cm-es darabokra vágtuk, majd csipesz segítségével eltávolítottuk a véreket, és a kocsonyás állománnyal a tenyésztőedény felszíne felé fordítva kiterített darabokat 2 mg/ml IV-es típusú kollagenázzal, valamint 100 IU/ml hialuronidáz enzimmel (Sigma-Aldrich), 45 percen keresztül 37°C hőmérsékleten emésztettük. Az inkubációs idő leteltét követően DMEM alapmédiummal mostuk a darabokat, és az összegyűjtött kocsonyás állományt steril 18G injekciós tűn keresztül homogenizáltuk, majd 20% FBS-sel, és antibiotikum-antimikotikum oldattal kiegészített magas glükóz tartalmú DMEM tenyésztőfolyadékban szuszpendáltuk és 2×10^5 darab sejt/cm² kezdeti sűrűséggel tenyésztőedénybe tettük. A harmadik átoltást követően hetente egyszer 4×10^3 db sejt/cm² sűrűséggel oltottuk át a kultúrákat *növekedési médiumban*.

Csontvelői mesenchymalis őssejtek

Az ortopédiai műtétekből származó humán combcsont eredetű csontvelő aspirátumot PBS-sel mostuk, majd Ficoll-Hypaque (Sigma-Aldrich) oldattal 2100 percenkénti fordulatszámon centrifugáltuk, fék nélkül. A gradiens centrifugálást követően PBS oldattal mostuk a Ficoll oldat tetején összegyűlt mononukleáris sejtfrakciót, és *növekedési médiumban* szuszpendálva 2×10^5 db sejt/cm² sűrűséggel tenyésztőedénybe

tettük. A továbbiakban hetente egyszer 4×10^3 db sejt/cm² sűrűséggel oltottuk át a sejt kultúrákat.

HUVEC

A humán köldökvéna endotél sejteket (human umbilical vein endothelial cells, HUVEC) Németh Adrienn-től kaptuk ajándékba a Semmelweis Egyetem, Általános Orvosi Karának Kórélattani Intézetéből. A sejtek izolálása és tenyésztése a *Bodor és munkatársai által* leírt módon történt a Semmelweis Egyetem, Általános Orvosi Karának Kórélattani Intézetében [91].

HUES9

A kísérletekben kontrollként felhasznált humán embrionális őssejtvonal (human embryonic stem cell line 9, HUES9) eredeti forrása Douglas Melton laboratóriuma (Harvard University, USA). Az MTA TTK Pluripotens Őssejtlaboratóriuma bocsátotta rendelkezésünkre. A HUES9 sejtek tenyésztése az *Apáti és munkatársai által* leírt módon történt [92].

3.2. A sejtek morfológiájának és méretének meghatározása

A tenyésztőedény felületéhez tapadt sejteket 4% formaldehid oldattal fixáltuk, ezt követően 10% Giemsa festéssel tettük láthatóvá. Minden izolátumból 50 darab véletlenszerűen kiválasztott sejt hosszanti átmérőjét mértük le SPOT Advanced Plus program segítségével, majd az értékeket átlagoltuk.

3.3. A sejtek jellemzése áramlási citometriás módszerrel

Az izolátumok sejt felszíni markereinek kifejeződését áramlási citometriával vizsgáltuk.

A sejteket 0.05% tripszin / 0.02% EDTA oldat segítségével választottuk el a tenyésztőedénytől, és 10% FBS-t tartalmazó alapható médiummal semlegesítettük a tripszin hatását majd PBS oldattal mostuk. A fluoreszcens festéssel jelölt monoklonális ellenanyagokat, vagy a megfelelő izotípus kontroll antitesteket 0.5% szarvasmarha

szérum albumint (bovine serum albumin, BSA) tartalmazó PBS oldattal (röviden 0.5% BSA/PBS) hígítottuk a forgalmazó által javasolt végkoncentrációban. A sejteket 30 percen keresztül, 37°C hőmérsékletű vízfürdőben inkubáltuk az elkészített oldattal. A jelöletlen monoklonális ellenanyagokhoz izotípusnak megfelelő, fluoreszcens festékekkel jelölt másodlagos antitesteket használtunk 200x hígításban. Áramlási citometriás módszerrel az alábbi antigéneket vizsgáltuk: ABCG2, CD4, CD13, CD14, CD29, CD31, CD34, CD44, CD49d, CD73, CD90, CD105, CD17, CD133, CD144, CD146, CD166, CD271, CD309 valamint SSEA-4. Az antitestek részletes adatai az **1. táblázatban** találhatóak.

Azokat az izolátumokat tekintettük a vizsgált markerre nézve pozitívnak, amelyeket legalább a sejtek 3%-a kifejezett. Az adatok bemutatása során legalább három mérés átlagát vettük alapul. A CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 és CD166 markerek esetében, medián fluoreszcencia intenzitás (MFI) arányt számoltunk oly módon, hogy a vizsgált markerre nézve pozitív sejtek fluoreszcencia intenzitás jelének medián értékére normáltuk a hozzá tartozó izotípus kontroll fluoreszcencia intenzitás jelének medián értékét.

Az ABCG2 fehérje maximális kimutathatóságát a transzporter specifikus gátlószerének - Ko143 hidrát (Sigma-Aldrich) - 5 μ M végkoncentrációban a konformáció érzékeny monoklonális 5D3 antitesthez (IgG2b) adásával érték el. A halott sejtek kizárásához 1 μ g/ml propídiium jodid, 2.5 μ m 7-amino-aktinomicin D (7-AAD) vagy 0.5 μ m TO-PRO-3 jodid oldatot használtunk. A mérések négy színcsatornás FACSCalibur™ (BD Biosciences) áramlási citométeren történtek, és az adatok feldolgozását CellQuest Pro™ (BD Biosciences) programmal végeztük.

Az ABCG2 fehérjét magasan és alacsonyan kifejező sejtek különválogatását FACS Aria™ fluoreszcencia aktivált sejtiszortírozó készülékkel (BD Biosciences) végeztük 1×10^6 db sejt fentebb leírt módon történő megjelölését követően.

A Vibrant® DyeCycle Violet™ (DCV) festéshez a tenyésztőedénytől elválasztott, és PBS oldattal mosott sejteket 2 μ M festékekkel inkubáltuk alpmédiumban 30 percen keresztül 37°C-os vízfürdőben. Az ABCG2 működésének gátlásához 5 μ M Ko143 hidrát oldatot használtunk, míg az összes transzporter funkciójának gátlását 10 μ M verapamil (Sigma-Aldrich) segítségével érték el. A DCV mérést Attune® Acoustic Focusing áramlási citométeren (Life Technologies) végeztük, a festék gerjesztéséhez 405 nm hullámhosszú ultraibolya lézert használtunk, és a kettős hullámhosszon történő detektáláshoz 450/40 (DCV-Kék) és 603/48 (DCV-Vörös) szűrőket alkalmaztunk.

Antigén	Konjugált fluorofór	Specifitás	Termelő állat	Izotípus	Gyártó / forgalmazó	Katalógusszám
Elsődleges / közvetlen jelölt ellenanyagok						
ABCG2	-	Humán	Egér	IgG2b	Beckton Dickinson	552823
CD4	APC	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561840
CD13	APC	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561698
CD14	FITC	Humán	Egér	IgG2a	Beckman Coulter	IM0645U
CD29	APC	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561794
CD31	FITC	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	560984
CD34	FITC	Humán	Egér	IgG1	Beckton Dickinson	345801
CD44	FITC	Humán	Egér	IgG2b	BD Pharmingen	560977
CD49d	APC	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561892
CD73	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	550257
CD90	APC	Humán	Egér	IgG1	BD	559869
CD105	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	560839
CD106	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561679
CD117	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	555714
CD133	APC	Humán	Egér	IgG1	Miltenyi biotec	130-090-8226
CD144	APC	Humán	Egér	IgG1	eBioscience	17-1449-73
CD146	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	561013
CD166	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	559263
CD271	AlexaFluor® 647	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	560877
CD309	PE	Humán	Egér	IgG1	BD Pharmingen	560872
GATA6	-	Humán	Kecske	poliklonális	R&D	AF1700
HLA-DR	PE	Humán	Egér	IgG2a	BD Pharmingen	560943
Nestin	-	Humán	Nyúl	poliklonális	AbCam	Ab92391
SSEA-4	PE	Humán	Egér	IgG3	R&D	FAB1435P
Vimentin	-	Humán	Egér	IgG1	Dako	M0725
α-SMA	-	Humán	Egér	IgG2a	Sigma	A5228
β-III-tubulin	-	Humán	Egér	IgG2b	Sigma	T8660
Izotípus kontrollok						
IgG1	-	-	Egér	IgG1	Thermo Fisher Scientific	554121
IgG1	FITC	-	Egér	IgG1	Beckton Dickinson	345815
IgG1	PE	-	Egér	IgG1	Beckton Dickinson	345816
IgG1	APC	-	Egér	IgG1	Beckton Dickinson	345818
IgG1	AlexaFluor® 647	-	Egér	IgG1	Beckton Dickinson	557783
IgG2a	-	-	Egér	IgG2a	Thermo Fisher Scientific	559319
IgG2a	FITC	-	Egér	IgG2a	Thermo Fisher Scientific	556652
IgG2a	PE	-	Egér	IgG2a	BD Pharmingen	559319
IgG2b	-	-	Egér	IgG2b	Thermo Fisher Scientific	555740
IgG2b	FITC	-	Egér	IgG2b	BD Pharmingen	555742
IgG3	PE	-	Egér	IgG3	R&D	IC007P
Másodlagos ellenanyagok						
IgG1	AlexaFluor® 488	Egér	Kecske	-	Thermo Fisher Scientific	A21121
IgG1	AlexaFluor® 647	Egér	Kecske	-	Thermo Fisher Scientific	A21240
IgG2b	AlexaFluor® 555	Egér	Kecske	-	Thermo Fisher Scientific	A21147
IgG2b	PE	Egér	Kecske	-	Thermo Fisher Scientific	P21149
IgG(H+L)	AlexaFluor® 488	Nyúl	Kecske	-	Thermo Fisher Scientific	A11008
IgG(H+L)	AlexaFluor® 568	Kecske	Számár	-	Thermo Fisher Scientific	A11057
IgG(H+L)	AlexaFluor® 568	Nyúl	Számár	-	Thermo Fisher Scientific	A10042

1. táblázat: Az áramlási citometriás mérésekhez, valamint immuncitokémiai vizsgálatokhoz használt ellenanyagok listája

3.4. Az izolátumok jellemzése immuncitokémiai módszerrel

A tenyésztőedény aljához tapadt sejteket 4% formaldehid oldattal fixáltuk, és az ellenanyagok aspecifikus kötődését 1% BSA és 4% szérum hozzáadásával akadályoztuk meg. A sejteket a gyártók által javasolt hígításban a Vimentin, Nestin, β -III-tubulin, α -simaizom-aktin (α -smooth muscle actin, α -SMA) és GATA6 elleni antitestekkel 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten, majd az izotípusnak megfelelő másodlagos antitesttel 200x hígításban további 1 órán át szobahőmérsékleten inkubáltunk, és a sejtmagokat 0.5 μ g/ml végkoncentrációban hozzáadott DAPI (Sigma-Aldrich) festékkel jelenítettük meg.

A DiSC₃(5) fluoreszcens membránfestéket 5 μ M végkoncentrációban adtuk a sejtekhez.

A készítményeket Olympus IX51 típusú inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk, az észleléseket fényképezéssel rögzítettük, amelyhez SPOT RT3 Slider CCD-kamerát használtunk.

3.5. Kolónia formáló teszt

Egysejtes szuszpenzióban 40 db sejt/cm² sűrűséggel szélesztettük 10 cm átmérőjű Petri csészében a sejteket, majd 14 nappal később 4% formaldehid oldattal fixáltuk, és 0.04% kristályibolya festékkel festettük a készítményt. A számolás során a legalább 50 darab sejtből álló egyedi kolóniákat vettük figyelembe. A kiértékelés során három párhuzamos mérés értékeit mutattuk be. A kolóniaképzés hatékonyságát a kolóniák számának, a szélesztett sejtekhez viszonyított hányadosában állapítottuk meg, és százalékos értékben ábrázoltuk.

3.6. Sejtosztódás, és a sejtek mennyiségének meghatározása

A vizsgált sejtek osztódási ütemének meghatározásának alapja a nem-fluoreszcens resazurin festék, élő sejtek által fluoreszcens rezorufin festékké történő átalakításán alapul.

A sejteket 500 db sejt/cm² sűrűségben 96 lyukú sejtenyésztő edénybe tettük, majd 24 óránként, három azonosan tenyésztő lyukhoz, resazurin (Sigma-Aldrich) festéket adtunk 0.1 mg/ml végkoncentrációban, és 1 órán keresztül 37°C hőmérsékleten

inkubáltuk. A felülűszót optikai plate-re pipettáztuk, és a keletkezett rezorufin festék koncentrációját 540 nm hullámhosszon történő gerjesztést követően, 579 nm hullámhosszon mértük. A fluoreszcens jel leolvasásához Perkin-Elmer (Waltham, MA, USA) Victor X3 plate olvasót használtunk. A kapott értékekből számoltunk populációkettőződést, a hét napos mérési sorozat eredményeit átlagolva. A különböző peptidbevonatok műanyag felületen történő optimalizációját Szigeti Anna végezte.

A sejtekkel borított BioOss® granulátumokat 0.1 mg/ml koncentrációjú resazurin oldatba helyeztük, és 1 órán keresztül 37°C hőmérsékleten inkubáltuk. A felülűszót optikai plate-re pipettáztuk, majd a leolvasott fluoreszcens jel alapján, az ismert sejtszámmal beállított kalibrációs görbe segítségével állapítottuk meg a sejtek mennyiségét.

A titánkorongokat a sejtekkel fedett felszínünkkel az átlátszó 96 osztású plate alja felé fordítva helyeztük el, és Perkin-Elmer Victor X3 plate olvasón mértük a GFP fluoreszcencia jel intenzitását. A sejtszámra ismert sejtszámmal beállított kalibrációs görbe segítségével következtettünk.

3.7. A mesenchymalis stroma sejtek differenciációs képességének vizsgálata

A sejtek *csont*-, *zsír*-, valamint *porcképző* képességét a 4-8 átoltások között végeztük el a Thermo Fisher Scientific által forgalmazott StemPro® oszteogenezis (katalógusszám: A10072-01), adipogenezis (katalógusszám: A10070-01) és kondrogenezis (katalógusszám: A10071-01) indukciós médiumok segítségével.

3.7.1. Csont irányú differenciációs képesség vizsgálata

A vizsgált szöveti őssejtek csont irányú elköteleződését, a differenciáció kezdeti szakaszában – hét nap indukciót követően –, az alkalikus foszfatáz (ALP) enzim kolorimetriás, illetve citokémiai módszerrel történő detektálásával mutattuk ki. A csontmátrixba berakódott szerves kalciumot alizarinvörös festékkel tettük láthatóvá.

Az ALP, valamint további korai, és késői csont differenciációs gének RNS szintű vizsgálatát valós idejű PCR reakcióban a *Módszerek fejezet 3.8. bekezdésében* részletezett módon végeztük.

Az alkalikus foszfatáz enzim kimutatása kolorimetriás és citokémiai módszerekkel

Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának meghatározásához a kontroll, valamint 7 napig *csont* irányba differenciáltatott mintákat lízis pufferben (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100, pH 9.5) szuszpendáltuk, ultrahanggal szonikáltuk, majd centrifugáltuk (10 percig, percenként 12000 fordulaton). A mintákat lízis pufferben 10x-re hígítottuk, majd azonos térfogatú *ALP puffer* (50 mM TRIS, 150 mM NaCl, 10 mM MgCl₂, pH 9.5) és dinátrium 4-nitrofenil foszfát hexahidrát szubsztrát (Sigma-Aldrich) 2.6 mg/ml végkoncentrációban történő hozzáadását követően 1 órán keresztül, 37° C-on inkubáltuk a mintákat. A reakciót NaOH oldat 0.2 M végkoncentrációban történő hozzáadásával állítottuk le, majd Perkin-Elmer Victor X3 plate olvasó műszer segítségével 405 nm hullámhosszon mértük a fényelnyelődést. A kapott értékeket fehérje koncentrációra normálva mutattuk be. A fehérje mennyiségi meghatározását Lowry-féle módszerrel végeztük.

A csontgranulátumokon lévő sejtek ALP citokémiai kimutatásához egy hétig stimuláltuk StemPro® oszteogenezis tápfolyadékkal, majd az alkalikus foszfatáz enzim jelenlétét *ALP pufferben* oldott 0.02 % w/v 5-bromo-4-kloro-3-indolil foszfáttal és 0.03 % nitro-kék tetrazoliummal vizsgáltuk. A reakció következményeként képződött kék színű termék intenzitásából lehetett következtetni az ALP enzimaktivitás jelenlétére.

A kalcifikálódás meghatározása alizarinvörös festéssel

A *csont* irányú differenciáltatás 14. napján a sejteket 4% formaldehid oldattal fixáltuk, majd az extracelluláris kalciumot pH 4.3 kémhatáson, 2% alizarinvörös festékkel tettük láthatóvá. A kalcifikálódás mértékét a festék 10% ecetsavat és 20% metanolt tartalmazó oldattal történő kioldását követően plate leolvasó segítségével 450 nm hullámhosszon mérve állapítottuk meg.

3.7.2. Zsír irányú differenciációs képesség vizsgálata

A *zsír* irányú differenciálódás 14. napján 4% formaldehid oldattal fixáltuk a sejteket, majd 0.5% olajvörös festékkel jelenítettük meg az intracellulárisan felhalmozódott lipidcseppeket. A készítményekből 100% izopropanollal kioldott festék fényelnyelését plate leolvasó segítségével 490 nm hullámhosszon mértük meg. A festék

koncentrációjából a felhalmozódott zsírcseppek mennyiségére, ezáltal az adott sejttípus zsír irányú differenciációs képességére lehetett következtetni.

3.7.3. Porc irányú differenciációs képesség vizsgálata

A *porc* indukciós médiumban tartott sejtek, 14 nappal a stimuláció kezdete után, 1-2 mm átmérőjű gömbölyű, rugalmas képletet hoztak létre, melyet 4% formaldehid oldattal fixáltunk. A paraffinba ágyazást, és hisztológiai metszetek elkészítését a SOTE Általános Orvostudományi Karának I.sz. Patológiai és Kísérleti Rákkutató Intézetében végezték el. A deparaffinálást követően a porcszövetet jellemző glükózaminoglikánokat 0.5% 1,9-dimetil-metilénkék festéssel tettük láthatóvá.

3.7.4. Az endotél irányú differenciáció vizsgálata angiogenesis módszerrel

A különböző szövetekből származó őssejteket 1.5×10^4 db sejt/cm² denzitásban, endotél differenciációt elősegítő tápfolyadékkal (Endothelial Cell Growth Medium, EGM-2, Lonza, Basel, Switzerland) előindukáltuk egy héten keresztül orbitális rázógépen, 37°C hőmérsékleten, sejtenyészítő termosztátban. Az inkubációs idő letelte után csövek képződését elősegítő, félkemény, gél állagú Matrigel közegbe tettük a sejteket az alábbi módon: jéghideg extracelluláris mátrix komponensekből álló Matrigelt (Corning, New York, USA) rétegeztünk 24 osztású tenyésztőedény mélyedéseibe, majd 37°C-on inkubáltuk 30 percig, hogy térhálós szerkezetet vegyen fel. Az előstimulált, tripszinnel a tenyésztőedényről elválasztott sejtekből 5×10^4 darabot a Matrigellel megegyező térfogatú EGM-2 médiumban a megszilárdult mesterséges bazális membránra rétegeztünk. A morfológiai változásokat inverz mikroszkóppal követtük 24 órán keresztül a 37°C hőmérsékleten, sejtenyészítő termosztátban inkubált mintákon. Óránként fényképeztük, és TubeCount program [93] segítségével kiértékeljük a képződött kapilláris hálózat paramétereit a csövek száma, hossza, illetve az elágazások száma alapján. Amikor további csövek képződése már nem volt megfigyelhető, három jellemző látóteret fényképeztünk, és elemeztünk ki. Három független kísérlet eredményeit átlagolva jelenítettük meg az adatokat oszlopdiagramon.

3.8. Génkifejeződés vizsgálata valós idejű PCR módszerrel

A vizsgálni kívánt sejteket TRIzol® reagenssel lizáltuk, majd fenol-kloroform eleggyel izoláltunk belőlük össz.RNS-t. Reverz transzkriptáz enzimmal való átírást követően, reakciónként 50 ng cDNS-t használtunk a valós idejű PCR mérésekhez. Az oszteokalcin (osteocalcin, OCN), osterix (OSX), RUNX2 (runt-related transcription factor 2) és SOX9 gének kifejeződését Power SYBR® Green PCR Master Mix, míg a további (2. táblázatban felsorolt) gének expresszióját TaqMan® Universal PCR Master Mix használatával határoztuk meg StepOnePlus™ Real-Time PCR készülékben (Thermo Fisher Scientific). A SYBR® Green mérésekhez a Fwd és Rev primerek 10 pmol végkoncentrációban kerültek a reakcióba, a TaqMan® mérések esetén a gyártó által javasolt koncentrációt használtuk. Az adatokat StepOne szoftver segítségével hívtuk le a készülékről, és Excel programban értékeltük ki $2^{(-\Delta Ct)}$ módszerrel a GAPDH gén kifejeződésére vonatkoztatva.

Primer neve	Szekvencia / hivatkozási szám
ABCG2	Hs01053790_m1
ALP	Hs01029144_m1
CEMP1	Hs04185363_s1
GAPDH	Hs_02758991_g1
NANOG	Hs02387400_g1
OCN Fwd	CATGAGAGCCCTCACA
OCN Rev	AGAGCGACACCCTAGAC
OCT4	Hs00999632_g1
OSX Fwd	CCCAGGCAACACTCCTACTC
OSX Rev	GGCTGGATTAAGGGGAGCAAA
PECAM1	Hs00169777_m1
PPAR γ	Hs_01115513_m1
RUNX2 Fwd	GACGAGGCAAGAGTTTCACC
RUNX2 Rev	GCCTGGGGTCTGTAATCTGA
SOX2	Hs01053049_s1
SOX9 Fwd	TCTGAACGAGAGCGAGAAGC
SOX9 Rev	CCGTTCTTCACCGACTTCCT
TERT	Hs00972650_m1

2. táblázat: A valós idejű PCR mérésekben használt primerek

3.9. GFP fehérjét kifejező zsírszöveti őssejt előállítás lentivírus felülúszóval

Vírustermelés céljából, T-antigént kifejező humán embrionális vesesejteket (Human Embryonic Kidney, HEK293T), kalcium-foszfát precipitációs eljárással kotranszfektáltuk lentivírus struktúrfehérjéket és reverz transzkriptáz enzimet kódoló csomagoló plazmidokkal, valamint az elongációs faktor 1 alfa gén (EF1 α) promoterével meghajtott, GFP fehérjét kódoló, öninaktiválódó lentivektorral (pRRLsin- EF1 α -GFP). A transzfekeciót követő napon a szérumot nem tartalmazó DMEM F12 (1:1) médiumba termelt víruspartikulumokat 0.45 μ m pórusméretű sterilszűrőn (Nalgene, Rochester, NY, USA) sejtmentesítettük. A vírustiter megállapításához 3×10^4 db sejt/cm² sűrűségben kitapasztott HEK293 sejtekre, polibrén (Sigma-Aldrich) 6 μ g/ml végkoncentrációban történő hozzáadásával, különböző koncentrációkban mértünk felülúszót. Hét nappal a transzdukeciót követően FACSCalibur™ készülék segítségével mértük a GFP fehérjét kifejező sejtek arányát. A százalékos érték alapján következtettünk a fertőzőképes víruspartikulumok számára, egységnyi térfogatban (transducing units per milliliter, TU/ml) [94].

A vírustiter ismeretében a fertőzés multiplicitását (multiplicity of infection, MOI) 1-2 érték közé választottuk meg, vagyis elméletileg minden sejtre 1-2 fertőzőképes víruspartikulum jutott. A transzdukeciós hatékonyságot FACSCalibur™ áramlási citométerrel állapítottuk meg. A GFP-t kifejező sejtpopulációkat FACS Aria készülékkel válogattuk ki.

3.10. A SAK-c[RGDfC] peptidkonjugátum vizsgálatához használt módszerek

A biomimetikus polipeptid konjugátumot az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport, Dr Mező Gábor által vezetett laboratóriuma állította elő ciklikus[Arg-Gly-Asp-D-Phe-Cys] - röviden c[RGDfC] - peptid és elágazó poli[Lys(Ser_i-DL-Ala_m)] - röviden SAK - váz kovalens összekapcsolásával. A sejtek kitapasztásának hatékonyságát megcélzó kísérletekben kontrollként a c[RGDfC] peptid és a SAK váz önállóan is vizsgálat tárgyát képezte. Az előállítás és a polimerizáció részleteinek leírása az alábbi munkákban megtalálhatók [95-97]

A peptid konjugátum sejtadhézióra gyakorolt hatását különböző felületeken vizsgáltuk: a) a Greiner Bio-One (Mosonmagyaróvár, Magyarország) cég által forgalmazott műanyag sejttenyésztő edényeken; b) 5 mm átmérőjű, és 1.44 mm

vastagságú titán ötvözetből (Ti6Al4V) készült savmaratott korongokon; c) a Geistlich Biomaterials (Wolhusen, Svájc) cég által forgalmazott Bio-Oss® (GBO) marhacsont granulátumokon (méret: 0.25-1 mm).

3.10.1. A bevonatok elkészítése, és a sejtek kitapasztása

A különböző felszínhez (plasztik, csontgranulátum, titán) egyszerű fizikai abszorpcióval kötöttük a) a SAK-c[RGDfC] peptidet, vagy az alább felsorolt kontroll vegyületeket: b) SAK váz, peptid konjugátum nélkül; c) konjugátlan c[RGDfV] peptid; d) human plazma fibronectin (FN) (Millipore, Billerica, MA, USA). A szintetikus peptid oldásához desztillált vizet, a FN oldásához PBS-t használtunk. A kísérletekhez a peptid optimális hígítását 10 µg/ml-es koncentrációban határoztuk meg. A különböző felszín bevonását 2 órán keresztül 37°C hőmérsékleten végeztük, majd szobahőmérsékleten szárítottuk, és a felhasználásig 4°C-on tároltuk. A FN oldattal kezelt felszínre közvetlenül a bevonat készítése után adheráltattuk a sejteket. A zsírszöveti stroma sejteket szérum-mentes *adhéziós médiumban* (Thermo Fisher Scientific cég által forgalmazott StemPro® MSC SFM, kiegészítve 2 mM L-glutaminnal és 25 µg/ml gentamicinnel) szuszpendáltuk.

Dózisfüggő görbe elkészítéséhez a vizsgálandó bevonatokból hígítási sort készítettünk (0.04 – 10.0 µg/ml), és az oldatokkal 96 lyukú sejttenyésztő edény alját kezeltük. A sejteket 5×10^3 db sejt/lyuk sűrűséggel, bevonatonként 3 párhuzamos lyukba mértük, 4 órán keresztül hagytuk letapadni, majd további 24 óráig inkubáltuk szérum-mentes tápfolyadékban. A kvantitatív meghatározást resazurin redukciós vizsgálattal végeztük a *Módszerek fejezet 3.6. bekezdésében* részletezett módon.

Time-laps mikroszkópiás mérésekhez a sejteket 5200 db sejt/cm² denzitásban szélesztettük 24 lyukú sejttenyésztő edényre, 10 mM HEPES oldattal kiegészített *adhéziós médiumban*.

A sejtek *3D szcaffoldokhoz* történő adhéziós képességének megfigyelését célzó kísérletekhez 5×10^3 db sejtet mértünk lyukanként 5-6 db GBO granulátumra, valamint 4×10^4 db sejtet lyukanként egy titánkorongra 100 µl térfogatban. A 45 perces inkubációt követően PBS oldattal mostuk le azokat a sejteket, amelyek nem tapadtak a felületekhez, majd az adherált sejtek mennyiségét resazurin redukciós módszerrel, vagy GFP jelintenzitás alapján határoztuk meg a *Módszerek fejezet 3.6. bekezdésében* leírtak szerint.

3.10.2. Time-lapse mikroszkópiás mérések

A time-laps mikroszkópiás méréseket Dr Kristóf Zoltán végezte az ELTE Növény szerzettani Tanszékén. Az *adhéziós médiumban* szélesztett sejtek letapadását CO₂ ellátás nélküli 37°C-os kamrában fényképeztük 5 perces időközönként, 3.5 órán keresztül. Lyukanként három különböző látómezőről készítettünk képet, és a letapadás korai jeleit - mint gömb alak elvesztése, a sejtek sötétebb középpontja és világosabb körvonala közötti kontraszt csökkenése - mutató sejteket számoltuk. A párhuzamos mérések eredményeit átlagoltuk, és kumulatív Kaplan-Meier görbén ábrázoltuk.

3.11. Statisztikai analízis

A mérési adatok számtani átlagát \pm standard eltéréssel ábrázoltuk. A statisztikai összehasonlításhoz Student-féle t-eloszlást használtunk, ahol a legtöbb esetben $P < 0.001$ értéket, a különböző bevonatok vizsgálata során $P < 0.05$ értéket vettük szignifikáns különbségnek. Az ezektől az értéktől való eltérést minden esetben külön jeleztük.

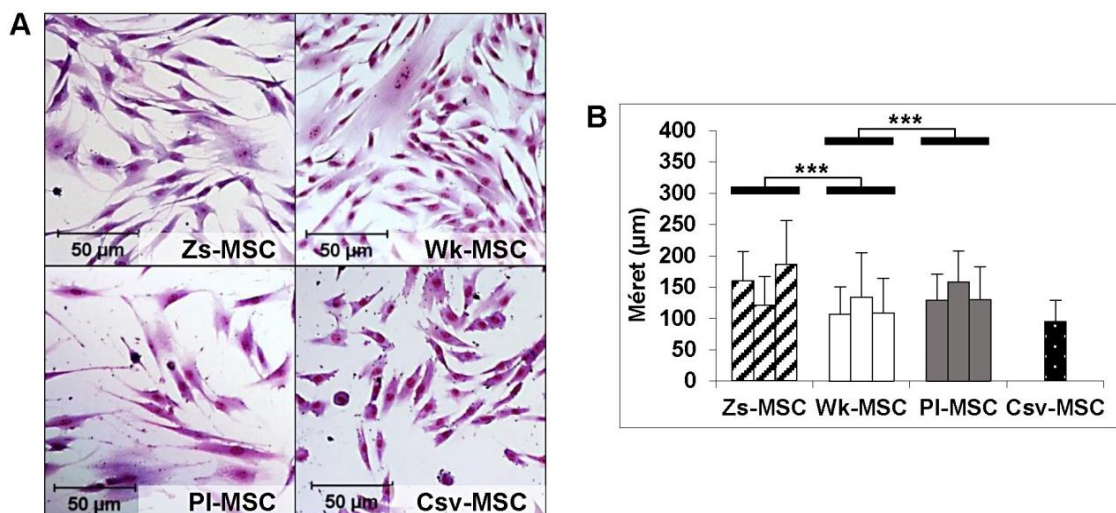
4. Eredmények

4.1. A különböző humán szövetekből származó mesenchymalis őssejtek jellemzése

Multipotens őssejteket izoláltunk humán zsírszövetből (Zs-MSC), Wharton kocsonyából (Wk-MSC) és periodontális ligamentumból (PI-MSC). Kísérleteinkhez kontrollként csontvelői mesenchymalis őssejtet (Csv-MSC) használtuk. A további vizsgálatokat az izolálást követő 3-8 átoltás között végeztük, amikor a minták már nem tartalmaztak vérképző ős-, és elődsejteket, továbbá még nem mutatták a szenescencia jeleit – elnyúló osztódási idő, sejtvakulizáció, a differenciációs képesség visszaesése.

4.1.1. Morfológia és méret tanulmányozása

A Zs-MSC, Wk-MSC, PI-MSC, illetve Csv-MSC izolátumok alaki és méretbeli vizsgálatait egységesen a harmadik átoltást követően végeztük el. A műanyag edény felszínére kitapasztott, Giemsa festéssel láthatóvá tett sejtek között nagyfokú változatosság volt megfigyelhető (4. ábra A, B).



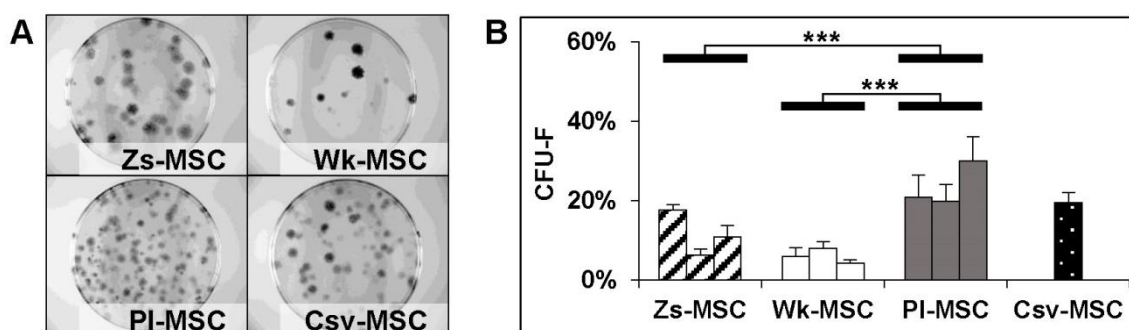
4. ábra: A különböző szövetekből kinyert mesenchymalis őssejtek alaki és méretbeli tulajdonságainak vizsgálata.

Az egyes izolátumokat alkotó sejtek nagyfokú morfológiai különbözőségének demonstrálása Giemsa festéssel (A). Mintánként ötven darab sejt átlagos hosszanti átmérőjének ábrázolása oszlopdiagramon (B).

A legegységesebb képet a csontvelői eredetű izolátum mutatta, amely szinte kizárólag kisméretű (átlagosan $94 \pm 35 \mu\text{m}$ átmérőjű), orsó alakú sejtekből állt, szemben a Wharton kocsonyából származó mintákkal, ahol az egészen kicsi ($50\text{-}100 \mu\text{m}$ átmérőjű) hosszúkas, fibroblaszt alakú sejtektől az extrém nagyméretű ($200\text{-}300 \mu\text{m}$) lapos, kiterült sejtekig mindenféle típusúak megtalálhatók voltak. A periodontális ligamentum (átlag $137 \pm 48 \mu\text{m}$) és a zsírszövet eredetű izolátumokat (átlag $155 \pm 62 \mu\text{m}$) többé-kevésbé egységesen kiterjedt romboid, vagy háromszög alakú sejtek alkották. Az azonos szöveti eredetű, de különböző donoroktól származó minták hasonló méret és alaki eloszlást mutattak.

4.1.2. Kolónia formáló teszt és osztódási képesség

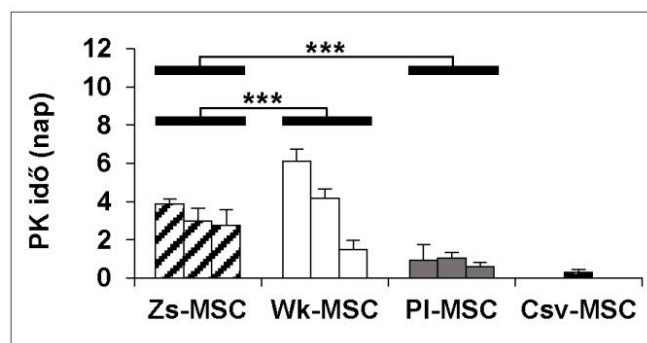
Fontos vizsgálati elem a sejtészítmények minőségi meghatározása során, hogy az alacsony sejtszámmal szélesztett MSC izolátumok milyen arányban tartalmazznak önmegújulásra képes sejteket, vagyis milyen hatékonysággal képesek kolóniákat képezni a műanyag tenyésztőedény felületén. A PI-MSC izolátumokban 400 db sejt szélesztését követően 94.3 ± 27.0 darab önmegújulásra képes sejt volt megtalálható, amely kiemelkedően magas szám a Zs-MSC (46.3 ± 21.0) és a Wk-MSC (24.2 ± 8.9) mintákéhoz képest. A Csv-MSC is gyengébb határfokkal képezett kolóniákat (78.0 ± 10.5), ám a különbség nem bizonyult szignifikánsnak a PI-MSC izolátumokhoz viszonyítva (5. ábra A, B).



5. ábra: A mesenchymalis őssejtek kolónia formáló képessége.

A tenyésztőedényekbe szélesztett 400 darab sejtől kinőtt kolóniákat kristályibolya festéssel tettük makroszkópiusan láthatóvá (A). A párhuzamos kísérletek eredményeiből származó kolónia számok átlaga (B).

Az őssejtek kolóniaképző és sejtosztódási képessége között szoros kapcsolatot figyeltünk meg. Azok az izolátumok, amelyek nagyobb százalékban tartalmaztak önmegújulásra képes sejteket, gyorsabb osztódási sebességgel bírtak. A sejtosztódás gyorsaságát rezaurin redukciós vizsgálat alapján állapítottuk meg, és populációkettőződési (PK) idő formájában ábrázoltuk (**6. ábra A, B**). Minél gyorsabban osztódik egy sejt, annál rövidebb populációkettőződési idővel teszi azt. A PI-MSC és a Csv-MSC izolátum esetében volt tapasztalható a legrövidebb populációkettőződési idő (0.87 ± 0.2 és 0.28 ± 0.2 nap), szemben a Wharton kocsonya eredetű (3.93 ± 2.3 nap) és zsírszövetből izolált sejtekkel (3.21 ± 0.6 nap).



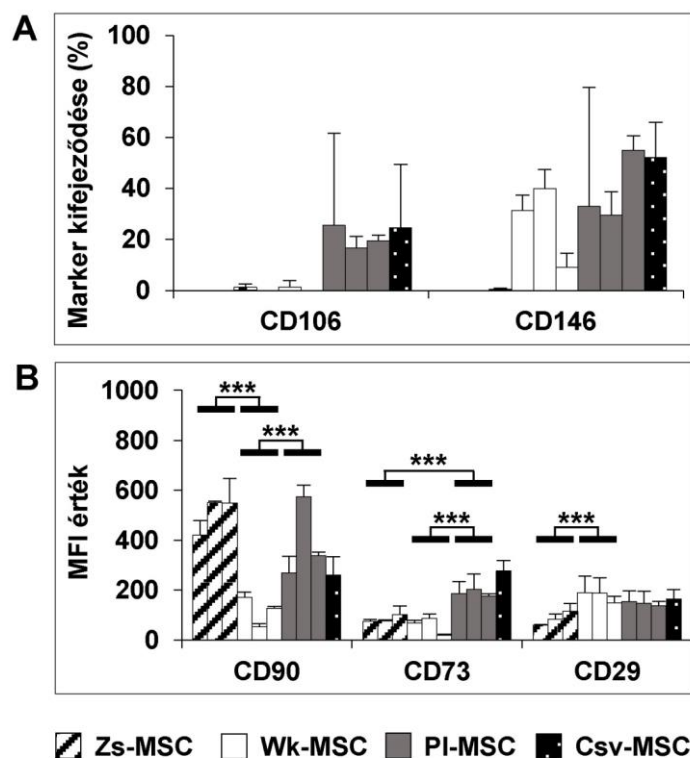
6. ábra: A különböző izolátumok populációkettőződési ideje.

A sejtosztódási kísérletek eredménye, populációkettőződési értékekkel feltüntetve.

4.1.3. A mesenchymalis őssejtek sejtfelszíni markerei

A kultúrában tartott adherens sejtek immunprofilját az *Módszerek* fejezetben található **1. táblázatban** bemutatott antitestek segítségével, áramlási citometriás módszerrel határoztuk meg. Vizsgálataink során a különböző szöveti környezetből származó sejtek 100%-ban kifejezték a mesenchymalis őssejtekre jellemző markereket, úgymint CD13, CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 és CD166. Az endotél sejtekre jellemző antigéneket, mint a CD31, CD144, CD309, valamint a vérképzőrendszer őssejtjeire jellemző CD14, CD34, CD45, CD117 vagy CD133 és a HLA-DR antigéneket nem, vagy elhanyagolható mértékben hordozták a felszínükön. Itt érdemes megjegyezni, hogy az egyik vizsgált Wharton kocsonyából származó minta esetében az átoltsók során a CD90 fehérje jelenlétének fokozatos csökkenése volt megfigyelhető.

Az irodalmi adatoknak megfelelően a CD106 (vascular cell adhesion molecule 1, VCAM-1) sejtadhéziós fehérje a PI összejtek ($20.6 \pm 4.5 \%$) és a Csv összejtek egy jelentős hányadán ($55.5 \pm 2.1 \%$) volt megtalálható, míg a zsír-, valamint Wk-MSC minták nem fejezték ki. A pericita markerként is számon tartott CD146 (melanoma cell adhesion molecule, MCAM), azonban a csontvelői-, zsír- és Wharton kocsonyából származó sejtekkel (25-55%) szemben nem volt kimutatható a Zs-MSC mintákban, noha erre számos irodalmi utalás található (7. ábra A).



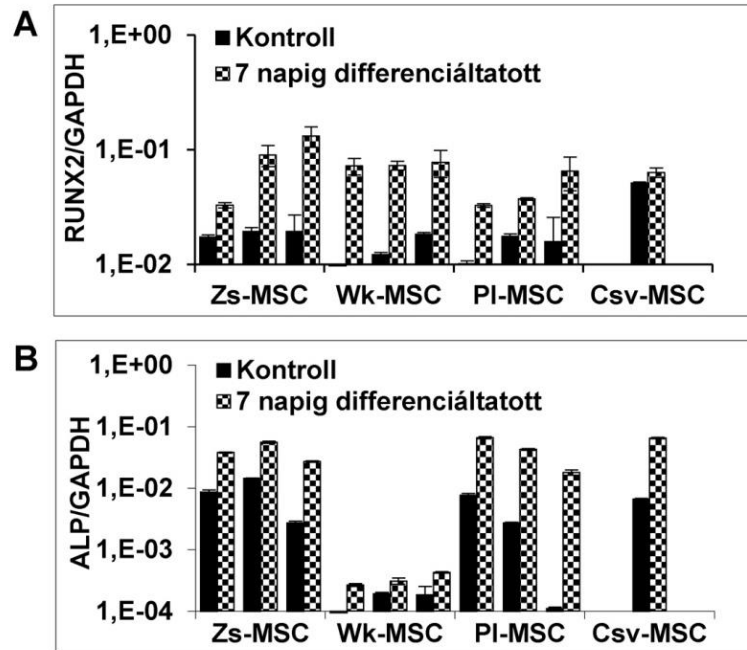
7. ábra: A különböző humán szövetekből izolált sejtek felszíni jelzőfehérjéi. Az áramlási citométerrel meghatározott CD106 és CD146 fehérjék szövetspecifikus kifejeződése (A). Az összes sejten jelen lévő CD90, CD73 és CD29 markerek medián fluoreszcencia intenzitás (MFI) értéke alapján számolt fehérjekifejeződés mértéke jellemző az adott szövetre (B).

Az eddigi eredmények alapján kijelenthető, hogy az általunk tanulmányozott izolátumok mind kifejezték az általános MSC markereket. További vizsgálatokat követően azonban azt tapasztaltuk, hogy az egyes antigének sejt felszíni sűrűsége eltér a különböző szövetekből származó minták esetében. A szakirodalomban fellelhető adatok alapján ismert, hogy bizonyos markerekhez változatos funkciók rendelhetők hozzá.

Többek között a CD29, CD44, CD73, CD90, CD105 és CD166 antigéneknek is tulajdonítanak valamilyen – aktív vagy passzív - szerepet a többirányú differenciációs folyamatokban [98-100]. Mi is igyekeztünk összefüggést találni az általunk vizsgált minták felszíni antigén expressziójának mértéke, valamint a csont-, zsír- és endotél irányú differenciációs képessége között. Az egyes markerek génkifejeződését áramlási citometria segítségével mértük, majd median fluoreszcencia intenzitás mérőszámmal értékeltük, a *Módszerek fejezetben* leírtak szerint. Nem találtunk kiemelkedő eltérést a minták CD44, CD105 és a CD166 antigén kifejeződésében. A Thy1 glikoprotein (CD90) azonban jellemzően a zsírszöveti, valamint Pl eredetű őssejteken volt nagymértékben fellelhető, míg a Wharton kocsonyából izolált sejteken jelentősen alacsonyabb volt az antigén sűrűsége. A CD73 ektonukleáz enzim a Pl és a Csv őssejtek sejtmembránjában szignifikánsan nagyobb denzitásban volt megtalálható, a Zs-MSC valamint a Wk sejtekéhez képest. Az integrinek családjába tartozó CD29 kifejeződése a zsírszövet eredetű sejtekben mutatkozott mérsékeltenek (**7. ábra B**).

4.1.4. A különböző eredetű őssejtek csont, zsír és porc irányú differenciációja

A mesenchymalis őssejtek plaszticitásának igazolásához a sejteket a nemzetközi irodalomból ismert indukciós médiumban neveltük. A *csontképződés* korai fázisában - hét nap oszteogén médiummal történő indukciót követően - megvizsgáltuk a runt-related transzkripció faktor 2 (runt-related transcription factor 2, RUNX2) és a nem szövet specifikus alkalikus foszfatáz (ALP) enzim gén expressziójának változását a kiindulási mintákéhoz képest, valós idejű PCR reakciókban. A RUNX2 gén terméke mester transzkripció faktoraként szolgál a csontképződés kezdeti szakaszában, míg az alkalikus foszfatáz enzim jelenléte elengedhetetlen a csontmátrix érési folyamata során. Indukciót követően minden sejt típusban megnövekedett a RUNX2 gén kifejeződése, és a különböző izolátumok között nem volt statisztikailag jelentős különbség kimutatható (**8. ábra A**). Az ALP enzim expressziója azonban a zsírszövetből, a periodontális ligamentumból, illetve csontvelőből származó őssejtek esetében is számottevően megemelkedett a Wharton kocsonyából izolált sejtekéhez képest (**8. ábra B**).

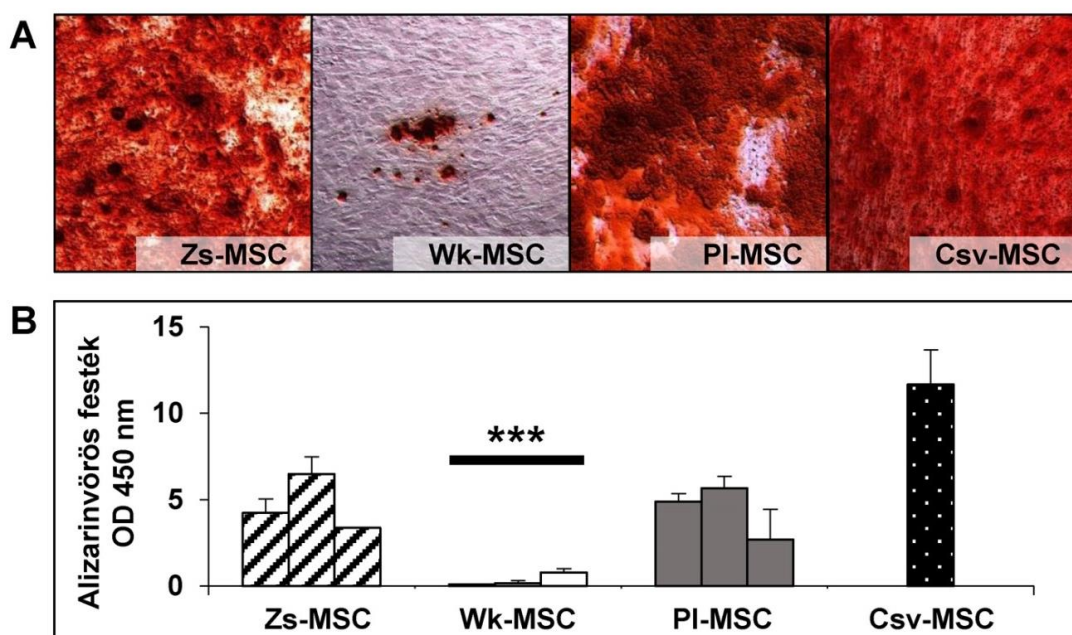


8. ábra: A csont irányú differenciáció markereinek követése stroma sejtekben.

Egy hét oszteogén indukció hatására a RUNX2 (A) és az alkalikus foszfatáz (ALP) gén (B) kifejeződésében bekövetkezett változás kimutatása valós idejű PCR-rel.

A sejtek extracelluláris állományában felhalmozódott kalcium kimutatását 14 nappal az indukciót követően Alizarin vörös festéssel végeztük el (**9. ábra A**). A festék kolorimetriás mennyiségi meghatározása után azt találtuk, hogy a legnagyobb mennyiségben a csontvelői MSC halmozta fel a szerves kalciumot. A zsírszövetből és a periodontális ligamentumból kinyert sejtek mutattak még nagyfokú ásványi anyag felhalmozódást, míg a Wharton kocsonyából származó sejtek festődése jelentősen elmaradt a többi őssejt mögött (**9. ábra B**).

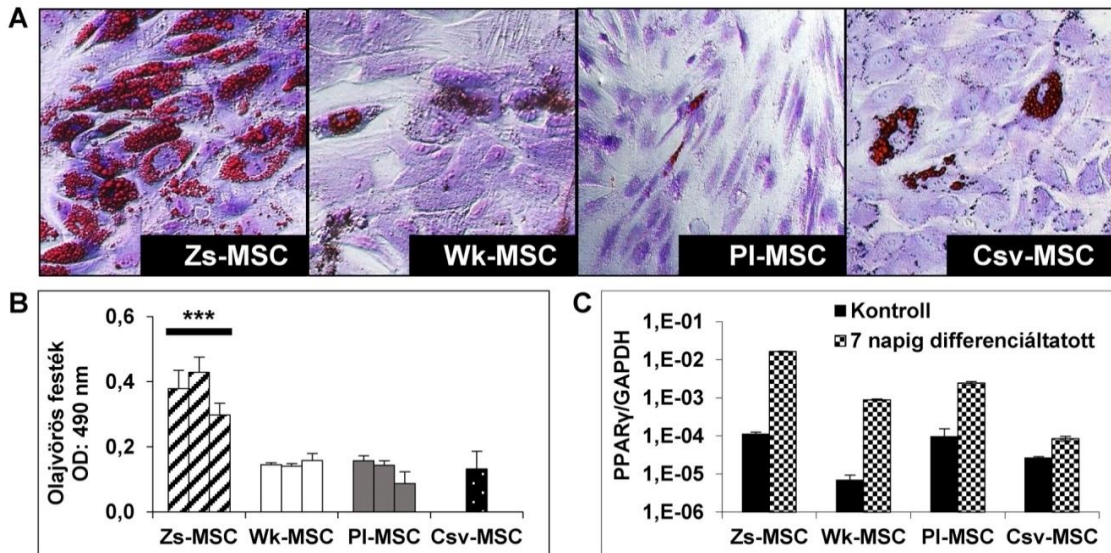
Irodalmi adatokra alapozva megvizsgáltuk, hogy a Thy-1 (CD90) fehérje kifejeződése és a sejtek differenciációs képessége között kimutatható-e összefüggés. Ennek részeként összevetettük a sejtek csontmátrix formáló képességét a CD90 fehérje kifejeződésének mintázatával, és szoros összefüggést találtunk közöttük. (**7. ábra B**).



9. ábra: A kalcifikálódás kimutatása a csontképződési folyamat végén.

Az extracelluláris térben felhalmozódott kalciumot 14 napi oszteogén indukciót követően alizarinvörös festéssel tettük láthatóvá (A), majd a festéket kioldva kolorimetriás módszerrel meghatároztuk annak koncentrációját (B).

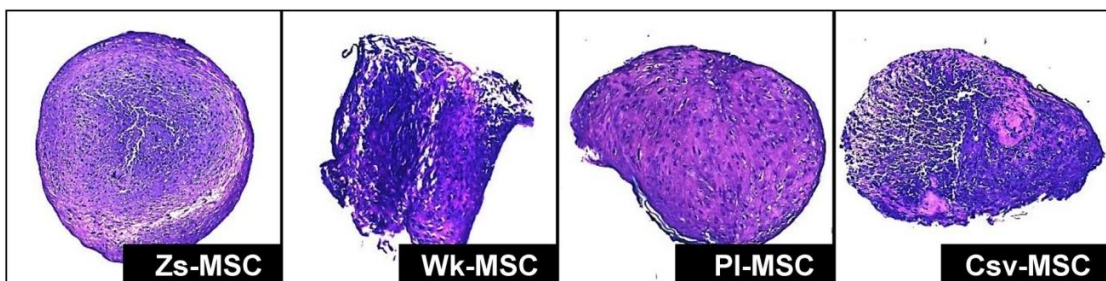
Az zsírszövet képzés folyamatának vizsgálatát megcélzó kísérletek során a zsírszövetből származó őssejtek olajvörös festést követően statisztikai módszerekkel kimutatható mértékben több lipidcseppet halmoztak fel a további vizsgált izolátumhoz képest (**10. ábra A, B**). Ez a jelentős különbség megfigyelhető volt a zsír irányú differenciációs folyamatokban kulcsszereplő, sejtmagi receptor PPAR γ gén valós idejű PCR reakcióval vizsgált változásában is (**7. ábra B**). Ezek az eredmények együttesen azt jelzik, hogy a zsírszövet eredetű őssejtek zsírképző képessége kiemelkedik a többi vizsgált szöveti őssejt közül. A korábban említettek szerint a CD29 gén kifejeződése a zsírszövet eredetű sejtekben volt a legalacsonyabb, ez fordított összefüggést feltételezhet a CD29 expressziójának mértéke és az adipogenezis hatékonysága között (**7. ábra B**).



10. ábra: A mesenchymalis őssejtek zsír irányú differenciációs képessége.

A 14 napos adipogén indukciót követően olajvörös festéssel tettük láthatóvá a lipidcseppeket. A vörös színű cseppek megjelenése zsírsejtek képződését mutatja az (A) ábrán. A sejteket dimetil metilénkékkel festettük (A). Az olajvörös festék koncentrációját kolorimetriás módszerrel határoztuk meg kioldás után (B). A PPAR γ gén mRNS szintjét valós idejű PCR módszerrel követtük a differenciáltatás hetedik napján (C).

Elvégeztük az izolátumok porc irányú differenciáltatását is a *Módszerek* bekezdésben leírtak szerint, majd 14 nappal az indukció megkezdése után dimetil metilénkék festési eljárással jelenítettük meg az újonnan képződött glukoaminoglikánokat. Ezek alapján mindegyik preparátum képes volt porcszövet formálására (11. ábra).

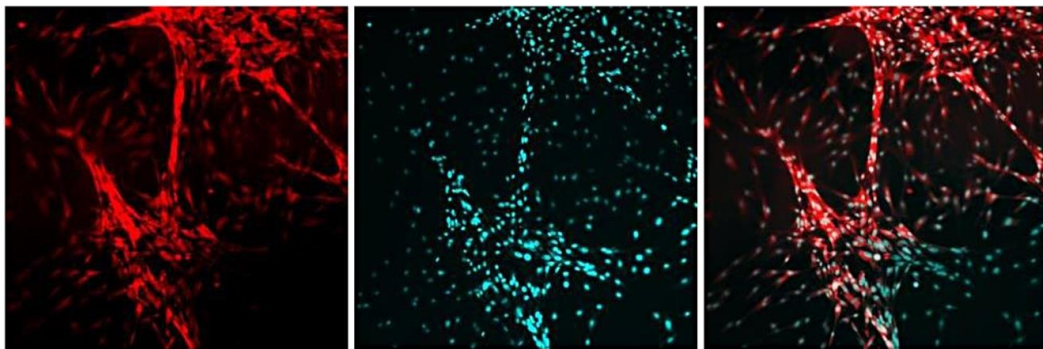


11. ábra: Az izolátumok porc irányú differenciációja.

A 14 napos differenciációs kísérlet végén a porcszövetre jellemző glukoaminoglikánokat dimetil metilénkék festéssel tettük láthatóvá.

4.1.5. Endotél irányú differenciációs képesség vizsgálata

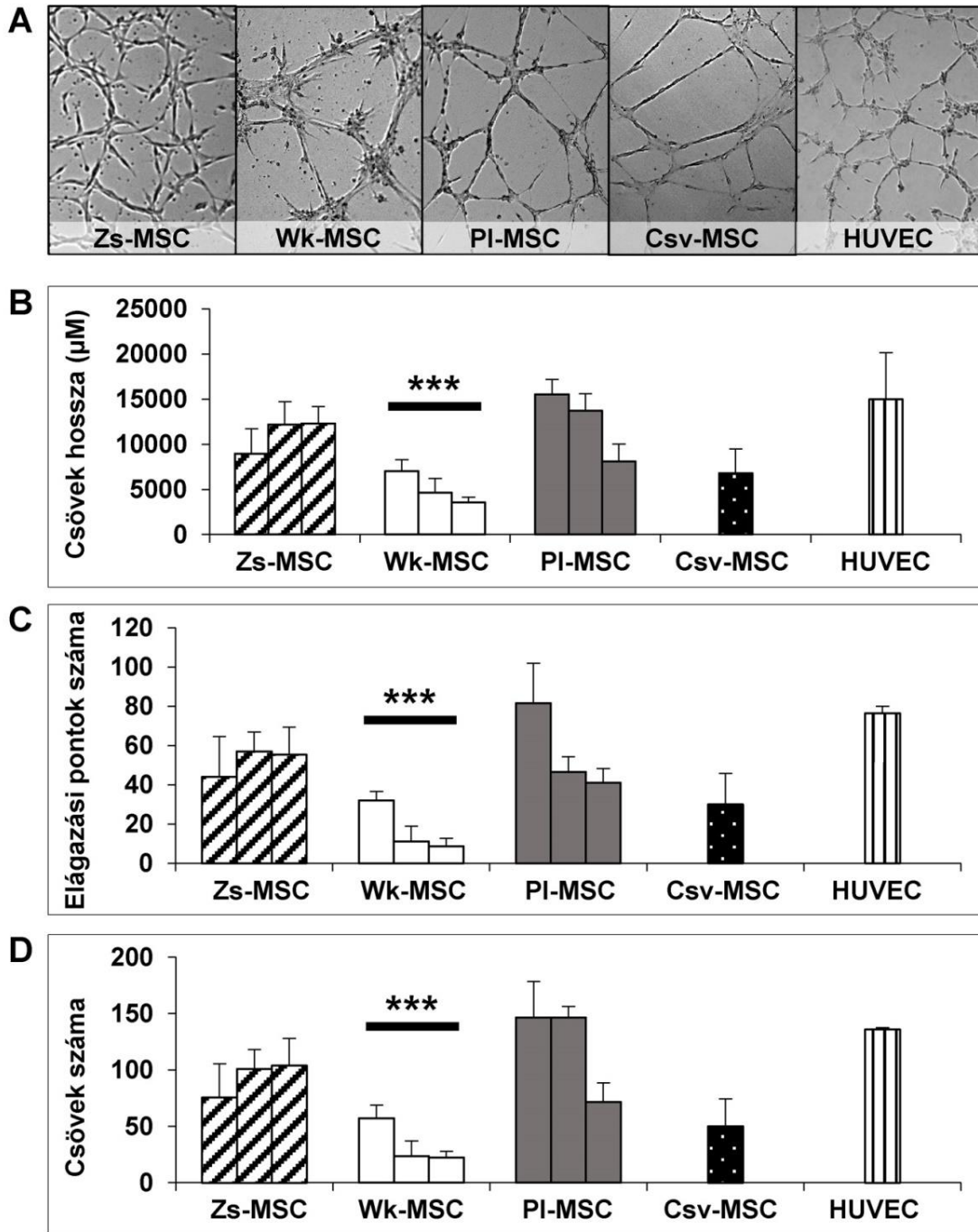
A különböző szövetekből izolált mesenchymalis őssejtek érképző képességét angiogenesis tesztben vizsgáltuk. A sejteket egy hétig kezeltük endotél differenciáltató tápoldatban, majd 24 lyukú tenyésztőedényen matrigelre rétegezve 24 órán keresztül követtük, hogy milyen hatékonysággal formálnak érkapillárisokra jellemző hálózatokat. Óránként készítettünk reprezentatív felvételeket, és kiértékeljük azokat a csövek száma, hosszúsága, valamint elágazási pontjainak száma alapján. Amikor további csövek képződése már nem volt megfigyelhető, 2 további fényképet készítettünk minden preparátumról, és három különböző kísérlet adatait összesítve értékeltük. A vizsgálat során azt találtuk, hogy a zsírszövetből, Wharton kocsonyából és csontvelőből származó őssejtek a maximális csőformáló képességüket 3-7 órával a szélesztés után érték el, míg a periodontális ligamentum őssejteknek a kifejlődött érkapilláriszerű hálózat kialakításához egységesen 18-20 órára volt szükségük. Egy, a periodontális ligamentum sejtek által létrehozott fluoreszcensen jelölt képletet a **12. ábrán** lehet megfigyelni.



12. ábra: Endotél irányba differenciáltatott periodontális ligamentum sejtek által létrehozott 3D kapilláris hálózat fluoreszcens képe.

Az angiogenesis tesztben vizsgált sejtek membránját DiSC₃(5) (vörös) a magját DAPI (cián) festékekkel tettük láthatóvá.

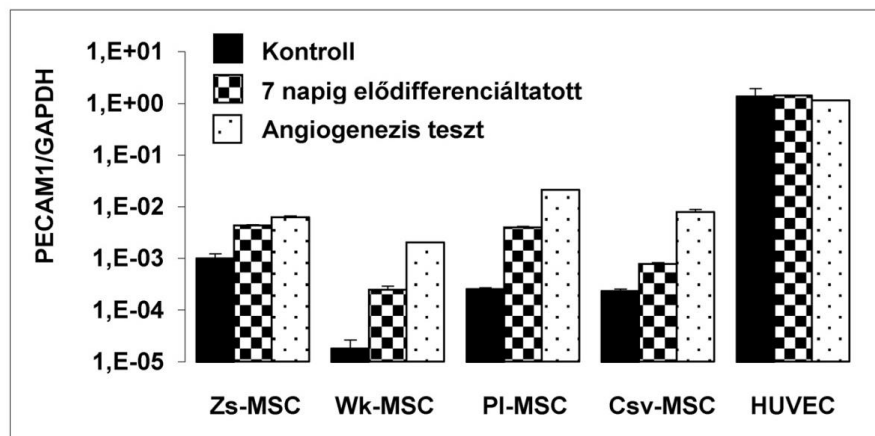
Ebben a kísérletben a zsír és periodontális ligamentum eredetű őssejtek a kontrollként használt HUVEC sejtekéhez közelítő értékeket mutattak, miközben a Wharton kocsonyából és csontvelőből izolált sejtek által képzett hálózat mutatói statisztikailag számottevő mértékben elmaradtak a többi sejt esetében mért értékektől (**13. ábra A, B, C, D**).



13. ábra: A mesenchymalis őssejtek endothél irányú differenciációs képessége. Egy hetes elődifferenciáltatást követően Matrigelen kapilláriszerű struktúrát alkottak a sejtek (A). TubeCount szoftverrel analizálva megállapítottuk a csövek teljes hosszát (B), elágazási pontjainak a számát (C), valamint az összes cső mennyiségét (D). A kísérletekhez kontrollként humán köldökzsinór vénából származó primer endothél sejteket (HUVEC) használtunk.

A különböző típusú sejtek által létrehozott hálózatok fenotípusa között is jelentős különbség volt tapasztalható. Míg a Zs-MSc és Wk-MSc izolátumok jellemzően rövid csöveket képeztek, amelyek közül a köldökzsinór őssejtek kifejezetten vastos kötegeknek bizonyultak, addig a PI-MSc minták által alkotott kiterjedt hálózatot, valamint a Csv-MSc izolátumok által formált struktúrát vékony, hosszú csövecskék alkották.

Az endotél sejtekre jellemző PECAM1 (platelet endothelial cell adhesion molecule, CD31) gén kifejeződésének változását valós idejű PCR módszerrel követtük a stimulálatlan, az elődifferenciáltatott, valamint az angiogenezis teszt során a matrigelből kinyert kapillárist formált sejtekben (**14. ábra**). Indukció hatására minden MSc mintában megfigyelhető volt a PECAM1 gén expressziójának növekedése. Ez a Zs-MSc-ben 2,8-szoros, a Wk-MSc-ben 6,6-szoros, a PI-MSc-ben 9,9-szeres, míg a Csv-MSc esetében 3,4-szeres változást jelentett a kontroll mintákhoz képest. A sejtek érhálózat formálását követően további PECAM1 mRNS expresszió emelkedést tapasztaltunk, azonban ennek szintje még így is minden esetben statisztikailag jelentős mértékben elmaradt a HUVEC sejtekben mért értékekhez képest. A HUVEC sejtekben nem váltott ki a PECAM1 gén kifejeződésében változást sem az indukciós médiummal történő kezelés, sem a Matrigel által biztosított extracelluláris mátrix környezet.



14. ábra: A PECAM1 gén kifejeződésében bekövetkező mRNS szintű változások.
Valós idejű PCR reakcióban vizsgáltuk az endotél-specifikus marker gén változását egy hét indukció után, majd az angiogenezis teszt elvégzését követően.

Az eredmények alapján azt a következtetést vonhatjuk le, hogy a vizsgált periodontális ligamentum és a zsírszöveti mesenchymalis őssejtek érképző képessége kimagasló a Wharton kocsonyából, valamint csontvelőből izolált mintákhoz képest.

A csontképzéshez hasonlóan az MSC-k endotél irányú differenciációs képessége és a CD90 marker kifejeződésének mintázata között is összefüggés mutatkozott. Ezek a megfigyelések arra engednek következtetni, hogy a magas CD90 expresszióval rendelkező sejtek kiemelkedő differenciációs képességgel rendelkezhetnek, jóllehet erre közvetlen kísérletes bizonyítékot nem kerestünk (**7. ábra B**).

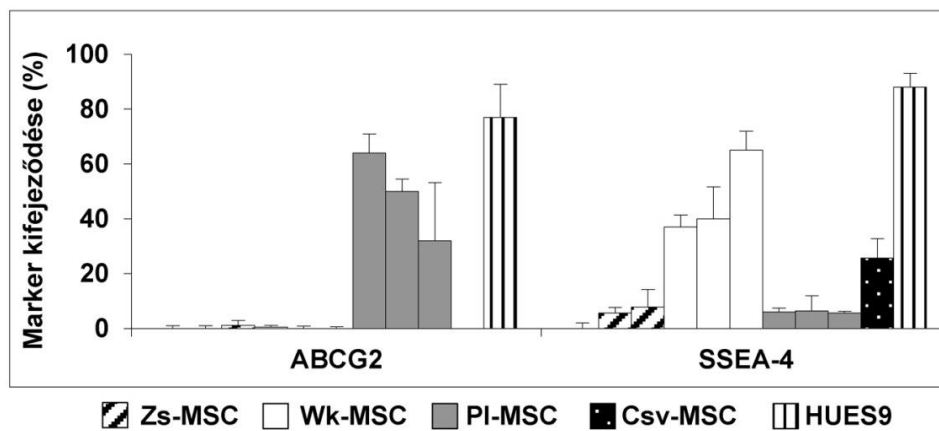
4.1.6. A pluripotencia- és mesodermális eredetre utaló markerek vizsgálata

Sokat vitatott kérdés hogy az MSC-k kifejeznek-e az embrionális őssejtekre jellemző géneket, illetve ezek játszanak-e szerepet a sejtek önmegújító, illetve többirányú differenciációs képességében? Hagyományosan a POU5F1 (más néven Oct4) Sox2, illetve Nanog transzkripciós faktor hármast tekintik kulcsszereplőknek az embrionális őssejtek pluripotens állapotának fenntartásáért [101]. Továbbá szükséges a sejtek „halhatatlanságához” a kromoszóma - sorozatos osztódások következtében folyamatosan rövidülő - telomer régiójának állandó pótlása, amelyet a telomeráz reverz transzkriptáz (hTERT) enzim segítségével végeznek a sejtek [102]. Megvizsgáltuk, hogy az általunk létrehozott MSC tenyészetekben aktívak-e ezek a faktorok. További kérdésként vetettük fel, hogy a Wharton kocsonyából származó sejtek, mint extraembrionális szövetből származó sejt típus vajon „ősibbnek” tekinthető-e a többi tanulmányozott felnőtt szöveti őssejthez képest, és amennyiben igen, akkor ez mely gének kifejeződésében nyilvánul meg. Kísérleteinkben pozitív kontrollként HUES9 embrionális őssejtvonalat használtunk.

A valós idejű PCR módszerrel vizsgált transzkripciós faktorok (Oct4, Sox2, Nanog) és a hTERT nem, vagy csupán elhanyagolható mértékben fejeződtek ki a mesenchymalis őssejtekben az embrionális sejt vonalban mérhető expressziós szinthez képest (az eredményt nem mutatjuk).

A Wharton kocsonyából izolált sejtek nagy részének felszínén (37-65%) ugyanakkor áramlási citometriás módszerrel megtalálható volt az SSEA-4 glikoprotein (stage-specific embryonic antigene-4), amelyet az embrionális őssejtek differenciálatlan állapotának egyik fontos jelzőjeként tartanak számon. A csontvelőből származó sejtek kisebb hányada (26%) is kifejezte az SSEA-4 jelzőmolekulát, míg a zsírszöveti, és a

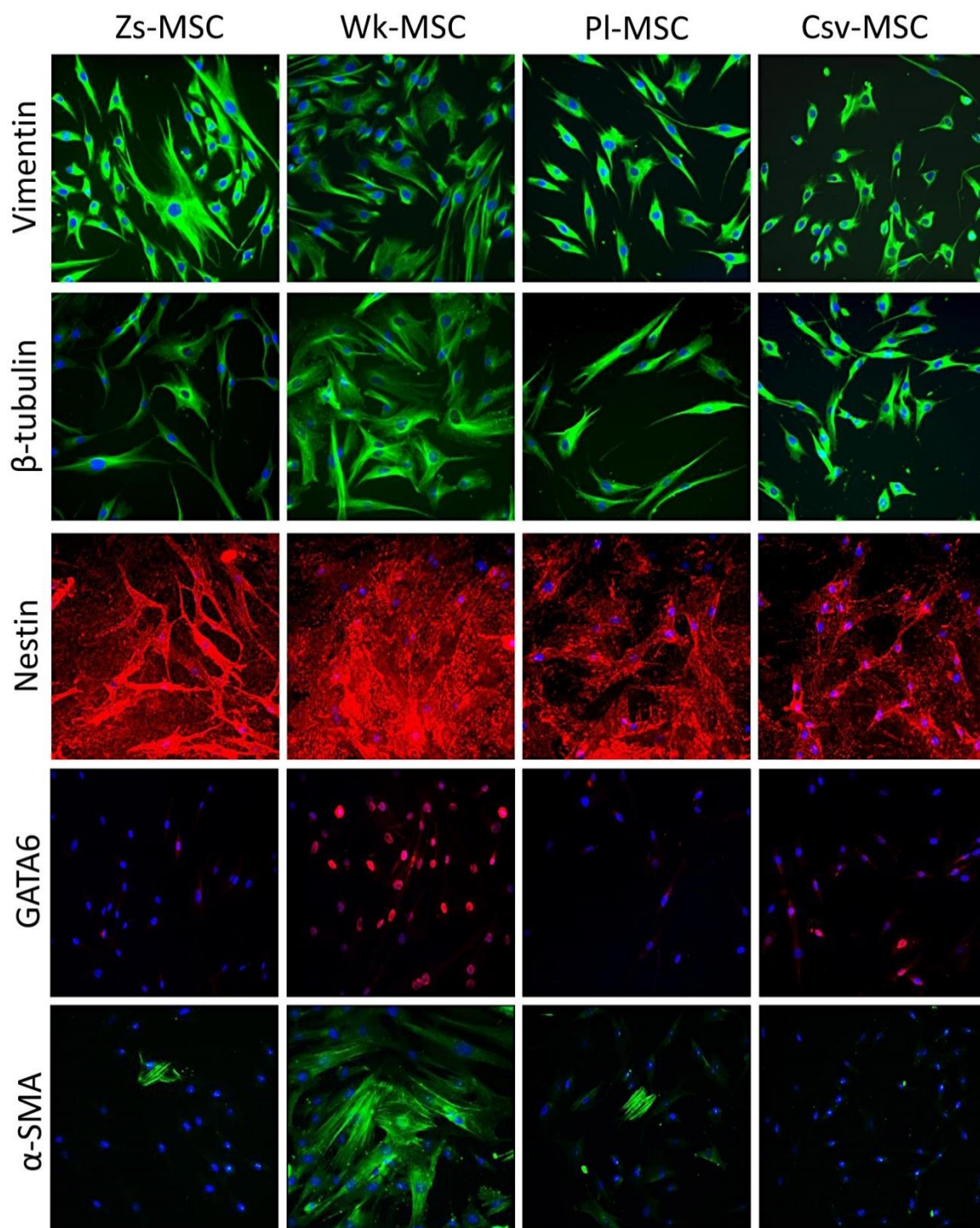
periodontális ligamentum őssejteken csak egy egészen kis populáción (6-8%) volt megállapítható a jelenlétük (**15. ábra**).



15. ábra: Az őssejtek membránjában megtalálható pluripotencia markerek.
Áramlási citometriás módszerrel meghatároztuk az egyes izolátumok ABCG2, valamint SSEA-4 kifejeződését. Az oszlopdigramokon a vizsgált markert kifejező sejtek, teljes populációra viszonyított arányát tüntettük fel. A legalább három mérésből származó eredmények átlaga képezi a hibaszázalékot.

Az SSEA-4-hez hasonlóan az ABCG2 transzporter is az embrionális őssejtek és egyes szöveti őssejtek membránjában található pluripotencia marker, azonban vizsgálataink során ezt a fehérjét kizárólag a periodontális ligamentum őssejteken tudtuk detektálni (**15. ábra**). Az ABCG2 fehérje és a periodontális ligamentum őssejtek kapcsolata részletesen a következő bekezdésben olvasható.

Az MSC-k csírvonal eredetének vizsgálatát célzó immuncitokémiai kísérleteinkben azt találtuk, hogy a preparátumokban - összhangban az irodalmi adatokkal - minden sejtben egységesen jelen volt a vimentin, amely a mesenchymalis eredetű sejtekre jellemző intermedier filamentum fehérje. Az előbbiekhöz hasonló egységes kifejeződést mutatott az idegsejtek differenciációjában szerepet játszó β -III-tubulin és nestin fehérje is. A mesodermalis eredetre utaló - egyes források szerint az MSC-k önmegújító képességét is meghatározó [103] - GATA6 fehérje, és a simaizom sejtek jellemző alkotója, az α -simaizom aktin azonban, csak a Wharton kocsonyából izolált sejtekben volt számottevően kimutatható (**16. ábra**).



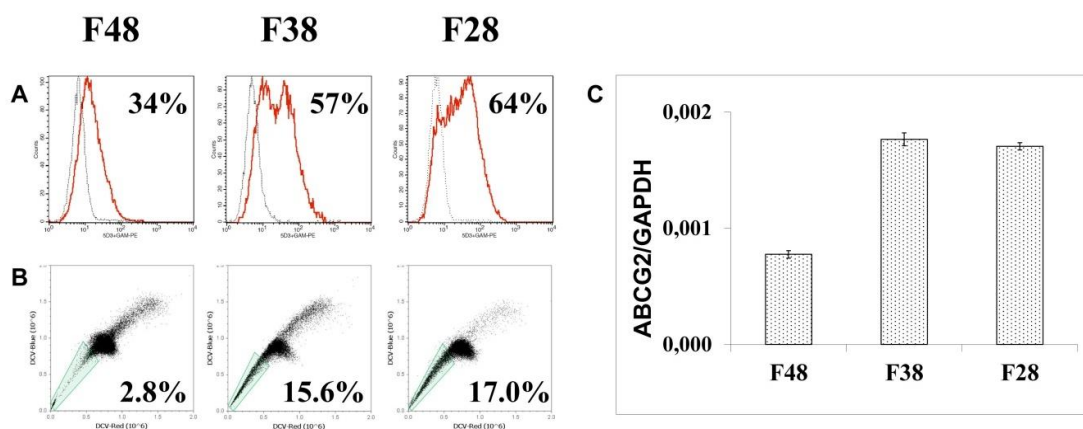
16. ábra: A mesodermális eredetre utaló gének kifejeződése a különböző szöveti eredetű őssejtekben.

Immuncitológiai módszerrel mutattuk ki a sejtekben kifejeződő Vimentin (zöld), β -III-tubulin (zöld), Nestin (piros), GATA6 (piros) és α -simaizom aktin (α -SMA, zöld) fehérjéket (DAPI-kék). Különbséget csak a Wk-MSC mintákban találtunk, amelyek nagy számban tartalmaztak GATA6 és α -SMA B) kifejező sejteket.

4.2. Az ABCG2 fehérjét kifejező periodontális ligamentum őssejtek jellemzése

4.2.1. Az ABCG2 transzporter kifejeződése periodontális ligamentum őssejteken

Az ABCG2 multidrog transzporter jelenlétét leírták korábban embrionális-, indukált pluripotens-, és különböző szöveti őssejtek egy kisebb csoportjának felszínén [104,105]. Az ABCG2 fehérjét kifejező sejtekre jellemző, hogy a Hoechst 33342-t, vagy annak analógját, a Dye Cycle Violet (DCV) fluoreszcens festéket nem engedik az intracelluláris térbe, ezért áramlási citométerrel vizsgálva halványan festődnek. Az ABCG2-t nem expresszáló sejtekbe a festék akadálytalanul jut be. A transzporter működése gátolható specifikus inhibitorok segítségével, mint a fumitremorgin C (FTC), vagy a Ko143 hidrát [106]. Ha az ABCG2-t kifejező sejteket a fentebb említett festékek egyikének felhasználásával kiválogatták, akkor azok különleges tulajdonsággal, úgynevezett „side population” (SP) fenotípussal rendelkeztek, amely egyik jellemzője a fokozott többirányú differenciációs képesség.



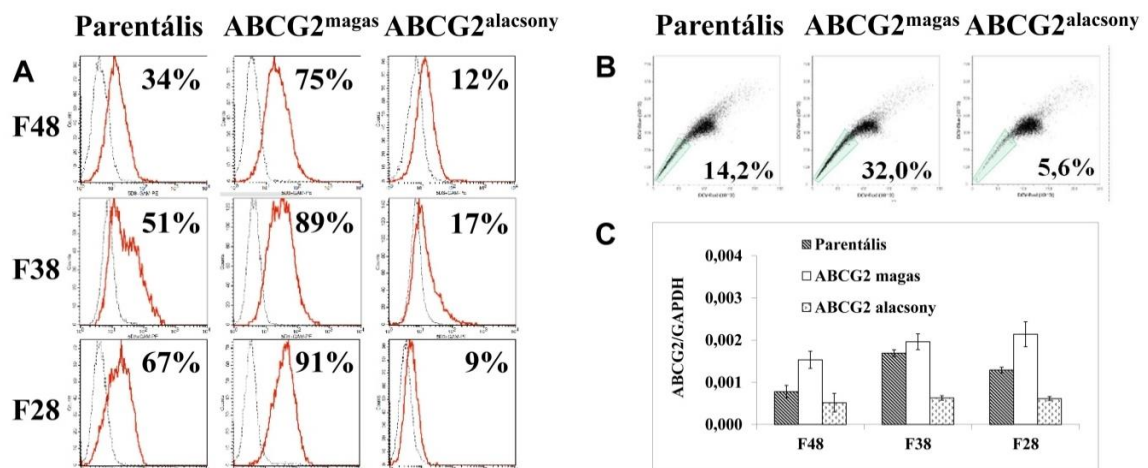
17. ábra: Az ABCG2 transzporter kifejeződése PI-MSC izolátumokban.

Áramlási citométerrel vizsgáltuk az ABCG2 fehérjét kifejező sejtek arányát, antitest-jelölés segítségével (piros vonal, izotípus kontroll - fekete vonal) (A), valamint DCV kizárásos módszerrel (B). A szögletes kapukon belül található a Ko143, az ABCG2 specifikus inhibitorával gátolható SP sejtek. A sejtekben található ABCG2 mRNS szint összhangban volt a fehérjét kifejező sejtek arányával (C).

Három egészséges páciensből származó PI-MSC izolátumot jelöltünk meg monoklonális ellenanyag (5D3) segítségével. A különböző mintákat F48, F38 és F28 jelzéssel láttuk el. Az áramlási citometriás mérések során a **15. ábrán** bemutatott eredményt kaptuk: az egyes minták $34\pm 21\%$ -a, $57\pm 5\%$ -a illetve $64\pm 7\%$ -a fejezte ki az ABCG2 fehérjét (**17. ábra A**). Ezt követően DCV festék felvételével, illetve annak specifikus gátlásával vizsgáltuk az antitest segítségével kimutatott ABCG2 fehérje funkcióját. A DCV festéket a sejtek lényegesen alacsonyabb hányada pumpálta ki, vagyis a SP mérete kisebbnek bizonyult az antitesttel kapott populáció méreténél (**17. ábra B**). Értékekben kifejezve a SP sejtek aránya teljes populációra nézve 2,8%, 15,6% és 17% volt. Az ABCG2 gén RNS szintű kifejeződése a különböző PI-MSC mintákban követte a funkcionális fehérje mintázatát (**17. ábra C**).

4.2.2. Az ABCG2 kifejező PI sejtek differenciációs képességének vizsgálata

Monoklonális ellenanyag segítségével, fluoreszcencia aktivált sejtválogató készülékkel kiválogattuk a PI-MSC izolátumokból az ABCG2 fehérjét magas ($ABCG2^{\text{magas}}$) és alacsony ($ABCG2^{\text{alacsony}}$) szinten kifejező sejteket.



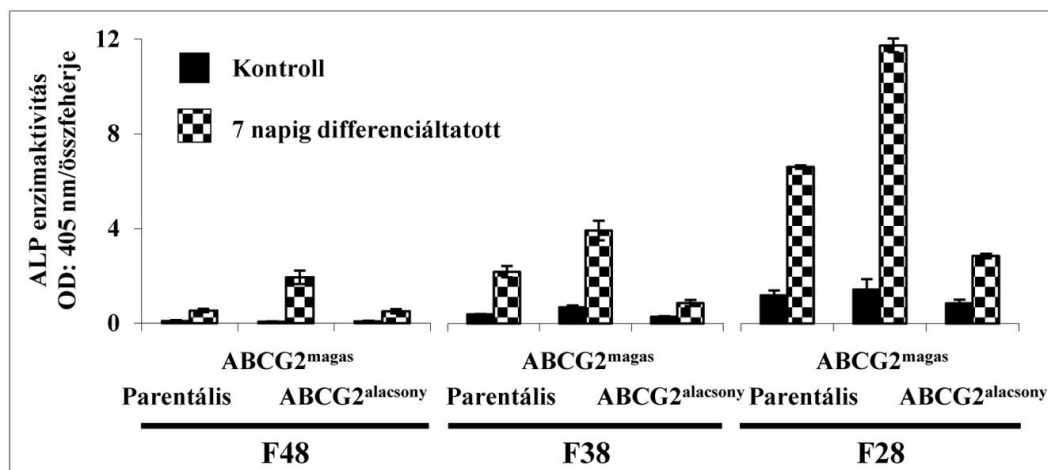
18. ábra: Az ABCG2 transzporter kifejeződése a kiválogatott PI-MSC sejtekben.

A szortolt PI-MSC-k áramlási citometriás mérése antitesttel történő jelölést követően (anti-ABCG2 jelölt sejtek - piros vonal, izotípus kontroll - fekete vonal) (A), és funkcionális tesztben (a szögletes kapukon belül található a DCV kizáró SP sejtek egy reprezentatív minta esetében) (B), valamint az ABCG2 RNS mérés eredménye (C).

A szortolást követően ellenőriztük az ABCG2 kifejeződését antitest jelöléssel, DCV kizárási módszerrel, valamint valós idejű PCR-rel (**18. ábra**).

Az ellenőrző mérések megerősítették elvárásainkat, vagyis minden mintában sikerült elkülöníteni ABCG2^{magas} és ABCG2^{alacsony} populációkat. Mind fehérje, mind pedig az RNS szintű ABCG2 kifejeződés összhangban volt a funkcionális tesztben kapott eredménnyel. A SP fenotípus igazolásának érdekében megvizsgáltuk a kiválogatott minták csont irányú differenciációs képessége mellett a zsír és porc képző kapacitásukat is.

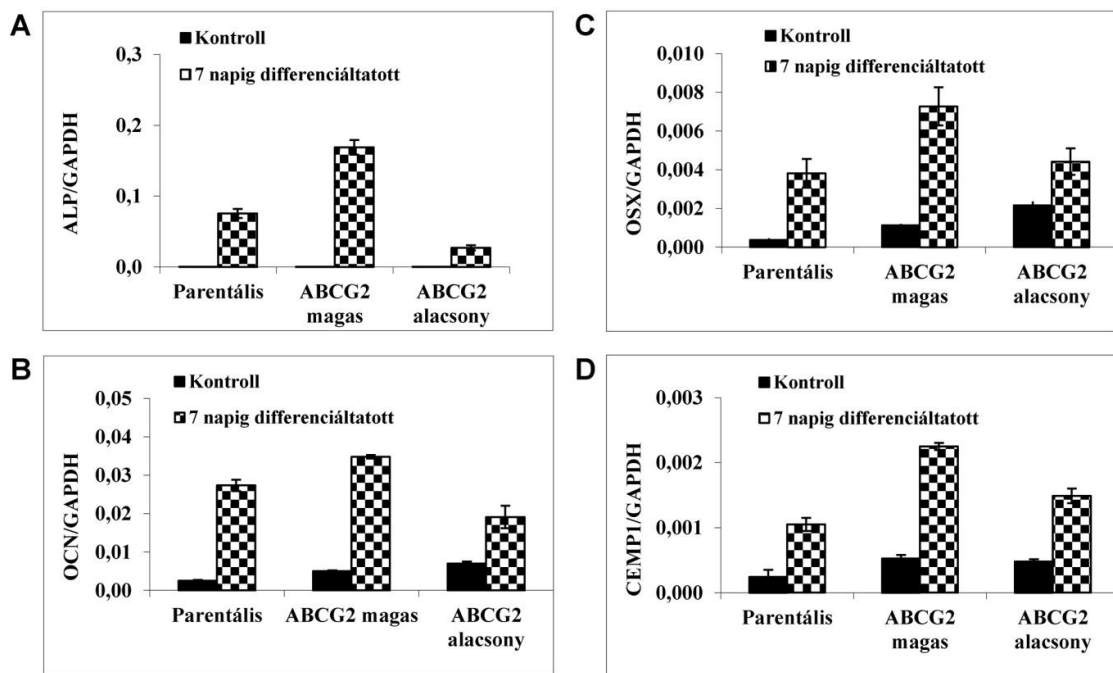
A szortolt sejtek csontformáló képességének összehasonlításához a parentális, az ABCG2^{magas} és ABCG2^{alacsony} populációkat csont-indukciós tápközegben tartottuk egy hétig, majd megmértük az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásukat. Ahogyan az a **19. ábrán** látható, az ABCG2^{magas} populáció minden esetben szignifikánsan magasabb enzimaktivitást mutatott a hét napos stimulációt követően a parentális, valamint ABCG2^{alacsony} populációkhoz képest. A kapott eredményeket RNS szintű mérésekkel is alátámasztottuk, ahol az ALP gén expressziós mintázata megegyezett az enzimaktivitás vizsgálata során tapasztaltakkal.



19. ábra: Az alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának meghatározása az ABCG2 kifejeződés alapján kiválogatott populációkban.

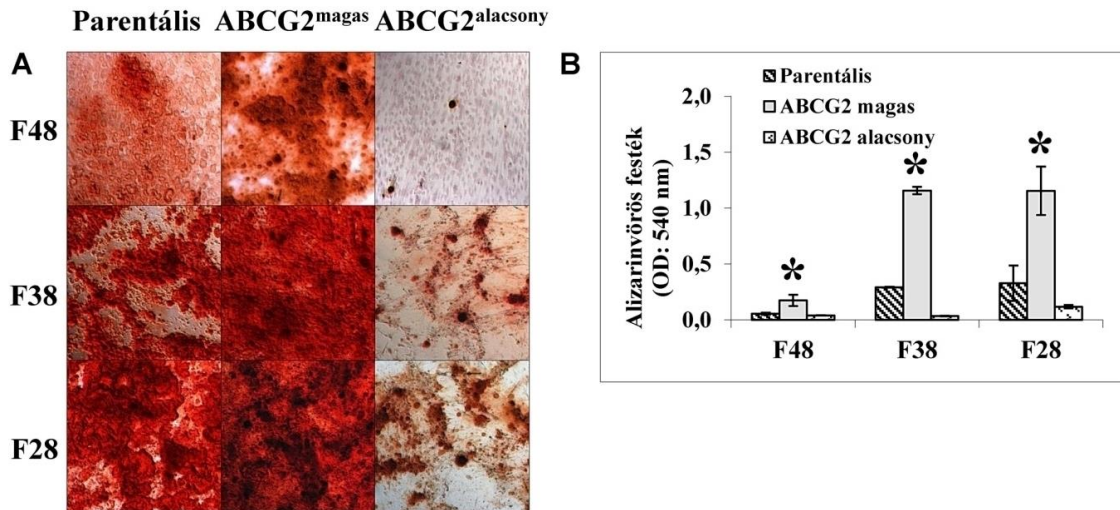
A nem differenciáltatott, és a 7 napig oszteogén tápfolyadékkal kezelt periodontális ligamentum sejtek ALP enzimaktivitását kolorimetriás módszerrel határoztuk meg.

Hasonló - az ABCG2 expressziós szintjével pozitív összefüggést mutató jelenség - volt tapasztalható a csontmátrix érési folyamataiban szintén kulcsszereplő oszteokalcin (OSC), a csontképződés során elengedhetetlen jelentőségű transzkripciós faktor osterix (OSX), és a fogágyi eredetű őssejtekre jellemző, cementogenezisben szerepet játszó cementum protein 1 (CEMP1) gén kifejeződése során is (20. ábra).



20. ábra: Az oszteo-/cementogenezisben szerepet játszó gének kifejeződése a kiválogatott PI-MSC sejtekben. A csontdifferenciáció korai szakaszában (7 nap után) vett mintákban minden vizsgált marker magasabb expressziót mutatott az ABCG2^{magas} sejtekben a parentális és az ABCG2^{alacsony} populációkhoz képest.

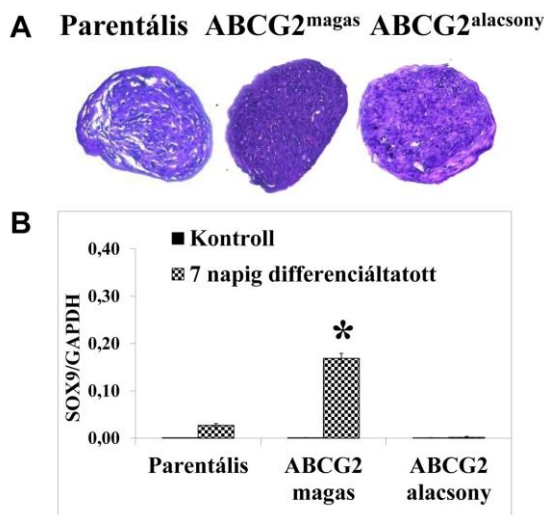
A csontszövet pótlását célzó klinikai alkalmazáshoz elengedhetetlen, hogy az adott készítmény csontmátrixába megfelelő mennyiségben ágyazódjanak be a sejtek által kiválasztott ásványi anyagok, amelyek tulajdonképpen a szövet szilárdító funkcióját biztosítják. A differenciáció késői fázisában - 14 nap után - a minták ásványi anyag tartalmának mértékét kalciumkötő alizarinvörös festék segítségével határoztuk meg. A 21. ábrán látható, hogy az ABCG2^{magas} sejtek nagyobb mértékben kalcifikálódtak (intenzív vörös festődés) a parentális és az ABCG2^{alacsony} populációkhoz képest. Kolorimetriás módszerrel azonban pontosan meghatároztuk a festék kioldása után annak mennyiségét is, amely alátámasztotta hisztológiai megfigyeléseinket (21. ábra B).



21. ábra: A szortolt sejtek kalcifikációjának meghatározása.

Alizarinvörös festékekkel tettük láthatóvá 14 nap után a sejtek mátrixában felhalmozott szerves kalciumot (A), majd kioldás után kolorimetriás módszerrel megállapítottuk a festék koncentrációját (B).

Köveztük a szortolt sejtek porcképző képességét is. A 14 napos kondroinduktív tenyésztőfolyadékkal történő kezelés után a képződött glukoaminoglikánokat 1,9-dimetil metilénkék festékekkel tettük láthatóvá, és azt találtuk, hogy a festődés mértéke az ABCG2^{magas} sejtekben volt a legnagyobb mértékű (22. ábra A).

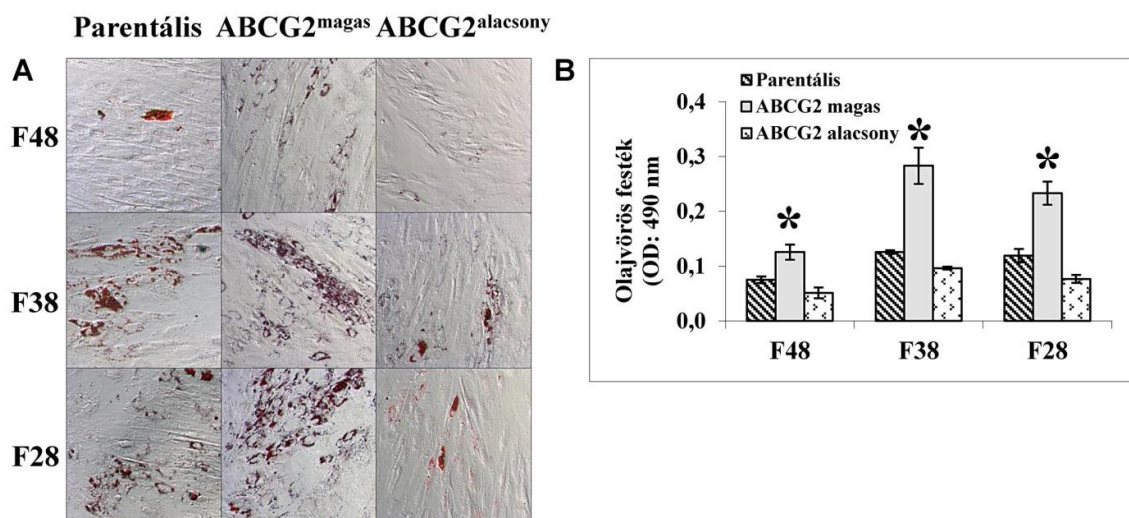


22. ábra: A kiválogatott sejtek porcképzése.

A 14 napos indukció végén 1,9-dimetil-metilénkék festéssel vizsgáltuk a szortolt sejtek glukoaminoglikán képződését (A), valamint valós idejű PCR-rel köveztük a porcszövetre jellemző SOX9 gén kifejeződését (B).

A vizsgálat során vizuális tapasztalatainkra hagyatkoztunk, azonban a SOX9 gén kifejeződése alátámasztotta megfigyelésünket. A SOX9 egy, a porc irányú differenciációban szerepet játszó transzkripciós faktor, melynek expressziós mintázata hűen tükrözte a differenciációs protokoll végén tett immunhisztokémiai megfigyeléseinket (22. ábra B).

Elvégeztük az ABCG2 fehérjét eltérő mértékben kifejező PI sejtek zsír irányú differenciáltatását is. Az ABCG2 kifejező sejtek szignifikánsan több lipidcseppet halmoztak fel, amelyeket olajvörös festéssel tettünk láthatóvá. A festék kioldását követő kolorimetriás analízis alátámasztotta megfigyeléseinket (23. ábra A, B).



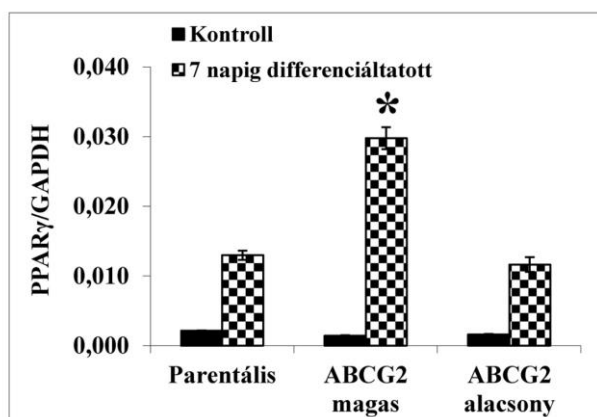
23. ábra: A szortolt össejtek zsírképző képessége.

A sejtek lipidképzést a differenciáció 14. napján olajvörös festéssel mutattuk ki (A).

A sejtekből kioldott festék koncentrációját kolorimetriásan állapítottuk meg (B).

A differenciáció hetedik napján megvizsgáltuk a PPAR γ gén kifejeződését is, amely összhangban volt az ABCG2 gén expressziójával, tehát emelkedett szintet mutatott az ABCG2^{magas} sejtekben a parentális, valamint az ABCG2 fehérjét alacsony szinten kifejező sejtekhez képest (24. ábra).

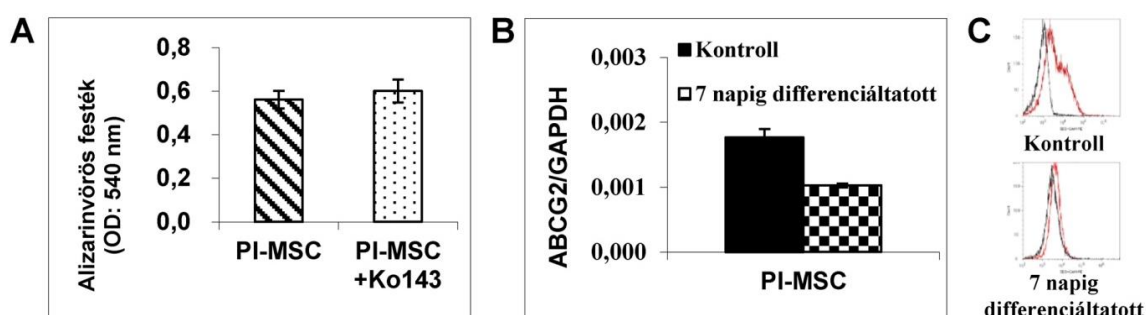
Általánosságban elmondható tehát, hogy az ABCG2 transzporter fehérjét magas szinten kifejező periodontális ligamentum össejtek kiválogatásával olyan össejtpopulációt azonosítottunk, amely nem csak kiemelkedő csont/cementum irányú differenciációs képességgel rendelkezik, hanem hatékonyabban képes porc- és zsírszövetet is létrehozni stimuláló tápfolyadékban a parentális, illetve ABCG2 fehérjét nem - vagy alacsony szinten kifejező - sejtekhez képest.



24. ábra: Az ABCG2-t eltérő mértékben kifejező őssejtek PPAR γ expressziója.

A PPAR γ gén kifejeződésének változását valós idejű PCR-rel követtük a kontroll, és a 7 napig indukált sejtekben.

Az ABCG2 fehérje csont irányú differenciációban betöltött szerepének tisztázása érdekében egy PI-MSC mintát az ABCG2 egy szelektív gátlószerének - Ko143 - jelenlétében stimuláltuk és követtük a kalcifikációra gyakorolt hatását. Ahogyan az a **25. ábrán** is látszik, a transzportfolyamatok kikapcsolása nem volt hatással a sejtek mátrixában felhalmozott kalcium mennyiségére. A nem gátolt mintákban történt génexpressziós vizsgálatok azt mutatták továbbá, hogy a differenciáció során az ABCG2 gén kifejeződése jelentős mértékben csökken a sejtekben (**25. ábra B**), sőt a hetedik npra teljesen eltűnik a sejtfelszínről, ahogyan azt áramlási citométerrel kimutattuk (**25. ábra C**).

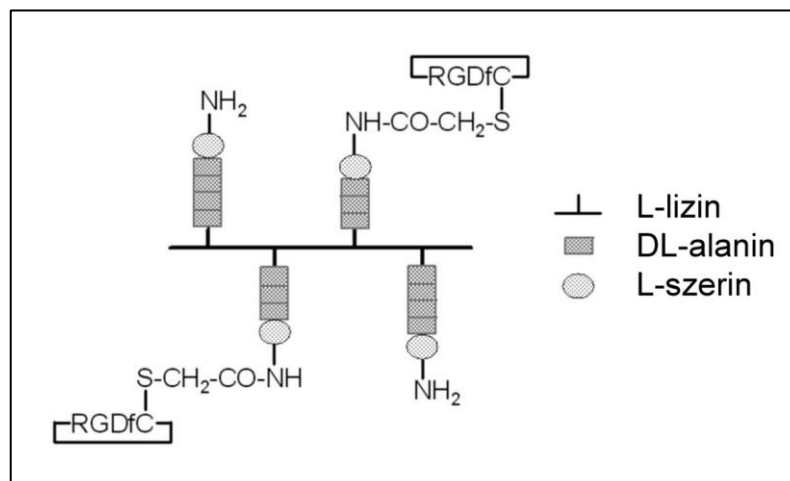


25. ábra: Az ABCG2 szerepe a csont irányú differenciációs folyamatban.

A specifikus gátlószer (Ko143) jelenlétében differenciáltatott PI-MSC kalcium felhalmozása megegyezett a kontroll mintáéval (A). Az indukciós folyamat hetedik napján valós idejű PCR-rel (B) és áramlási citométerrel (piros vonal – anti-ABCG2 ellenanyaggal jelölt sejtek, fekete vonal – izotípus kontroll) (C) is megállapítottuk az ABCG2 kifejeződésének csökkenését.

4.3. Implantátumok csontbeépülését elősegítő vegyület tesztelése

Az *in vitro* 2D tenyésztési körülmények között vizsgált sejtek csak korlátozott információt szolgáltatnak annak szövetpótló képességéről. Az *in vivo* kísérletekhez 3D struktúrákba rendezett sejtekre van szükség. Nagymértékű csontkárosodás, vagy fogvesztés esetén ugyanis szükségesé válhat implantátum felhasználása az eredeti csontszövet pótlására. Az alkalmazási területtől függően nagyon változatos méretű, formájú, illetve anyagú implantátumok kerülnek beültetésre: pl. ortopédiai vagy fogpótló titánimplantátumok, humán vagy állati eredetű sejtmentes csontörlemény (Bio-Oss®), stb. Minden esetben fontos azonban, hogy a környező csontszövethez megfelelően rögzüljenek, hiszen az implantátumok részleges beágyazódása idővel annak kimozdulásához vezet, és az adott szerv így nem lesz képes ellátni teljes körűen fiziológiai feladatát. A csontbeépülés elősegítésének egy lehetséges módja, hogy az implantátum felületét valamilyen fizikai vagy kémiai kezelésnek vetik alá. Csoportunk az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport által kifejlesztett elágazó poli[Lys(Ser_i-DL-Ala_m)] - röviden SAK - polimerhez kötött ciklikus arginil-glicil-aszparagin (cRGD) motívumot tartalmazó peptid, mesenchymalis őssejtek letapadására és csont irányú differenciációjára gyakorolt hatását vizsgálta. A peptid sematikus képe a **26. ábrán** látható. Az előállítási módszer a [92,93] cikkekben található.



26. ábra: A SAK-cyclo[RGDfC] peptid sematikus képe

4.3.1. A peptid koncentrációjának és a sejtek szélesztési idejének optimalizálása

A mesenchymalis őssejtek SAK-c[RGDfC] peptidhez való optimális kitapadási idejének beállítását, és az ideális peptidkoncentráció megválasztását műanyag felületen végeztük zsírszövetből származó sejtekkel. A vizsgálatok alapját a *Módszerek fejezet 3.6. bekezdésében* részletesen ismertetett, a sejtek osztódását kimutató tesztek képezték.

A SAK-c[RGDfC] peptidből, illetve a kontroll vegyületekből koncentrációfüggő görbét készítettünk, amely alapján 24 órával a kitapasztást követően, 10 µg/ml koncentrációnál állapítottuk meg a teljes telítődést. Az ennél az értéknél leolvasott sejtszámok alapján, a bevonattal nem kezelt műanyag felülethez képest 69±13%-kal több sejt maradt a tenyésztőedény felületén a SAK-c[RGDfC] peptiddel bevont felületen. A pozitív kontrollként használt fibronectin esetében ez 65±12%-kal több sejtet jelentett, míg a nem-konjugált c[RGDfV] nem fejtett ki pozitív hatást. Érdeemes megemlíteni, hogy a SAK váz önmagában kifejezetten negatívan befolyásolta a sejtek tapadását. A 3D szcaffoldok vizsgálata során a 10 µg/ml SAK-c[RGDfC] peptidkoncentrációt használtuk.

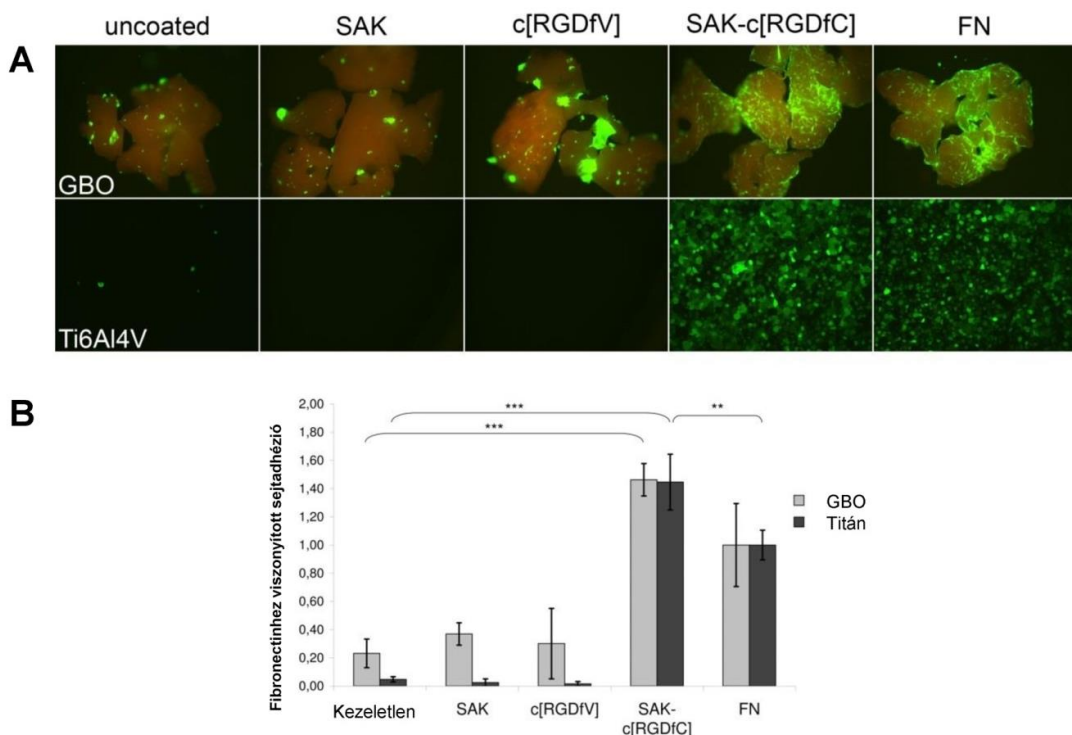
A sejtek kitapadásának kinetikáját time-lapse mikroszkópiával követtük, és azt tapasztaltuk, hogy már 30 perc elteltével a sejtek 82%-a mutatta a letapadás jeleit a SAK-cyclo[RGDfC] peptiddel kezelt felületen (FN: 71%), míg a 3,5 órás követés végére sem haladta meg a letapadt sejtek aránya a 93%-ot (FN: 87%). A kontrollként használt, nem-konjugált c[RGDfV] motívum csak részleges adhézios hatással bírt (71%), míg a SAK vázhoz, illetve a kezeletlen felülethez nagyon kevés, vagy egyetlen sejt sem tapadt le (7.0% és 0.0% 3,5 óra alatt). Mindezek alapján az ideális kitapasztási időt 45 percen állapítottuk meg.

4.3.2. A sejtek kitapadása és differenciációja különböző implantátumok felszínén

A peptidkonjugátum tesztelését két klinikai szempontból érdekes implantátum anyagon végeztük el. A sejtek láthatóságát saját készítésű, GFP fehérjét kifejező őssejtek alkalmazásával oldottuk meg. A sejtmentes fogászati implantátumként használt marhacsont granulátum-készítmény - Bio-Oss (GBO) – mellett, Ti6Al4V anyagból - későbbiekben titán - készült korongok felszínét kezeltük a konjugált peptiddel, illetve a nem konjugált alkotórészekkel. A Bio-Oss granulátumok esetében resazurin redukciós teszben, míg a titánkorongok esetében GFP pozitivitás alapján vizsgáltuk a sejtek

letapadását, majd csont irányú differenciációját a fibronectinnel kezelt felülethez viszonyítva.

A kezeletlen, illetve kizárólag SAK vázzal vagy c[RGDfV]-vel kezelt titán felszínhez képest - ahol elhanyagolható mennyiségű letapadt GFP-pozitív sejt volt megfigyelhető - szignifikánsan több sejt adherált a konjugált peptiddel, illetve fibronectinnel kezelt felületekhez. A kontroll anyagokkal kezelt felületek helyett a sejtek inkább egymáshoz tapadva kis sejtsomókat hoztak létre, és mosási lépések során könnyen eltávolíthatók voltak, míg a c[RGDfV]-vel és a fibronectinnel kezelt felületen nagy mennyiségben voltak található kiterült orsó alakú összejtek, amelyek gyakorlatilag összefüggő réteget képeztek a titánkorongok felszínén. Figyelemre méltó, hogy a SAK-c[RGDfC] peptiddel bevont titán felületre a pozitív kontrollként használt fibronectin kezeléshez képest $145\pm 20\%$ -kal több tapadt ki (27. ábra A, B).



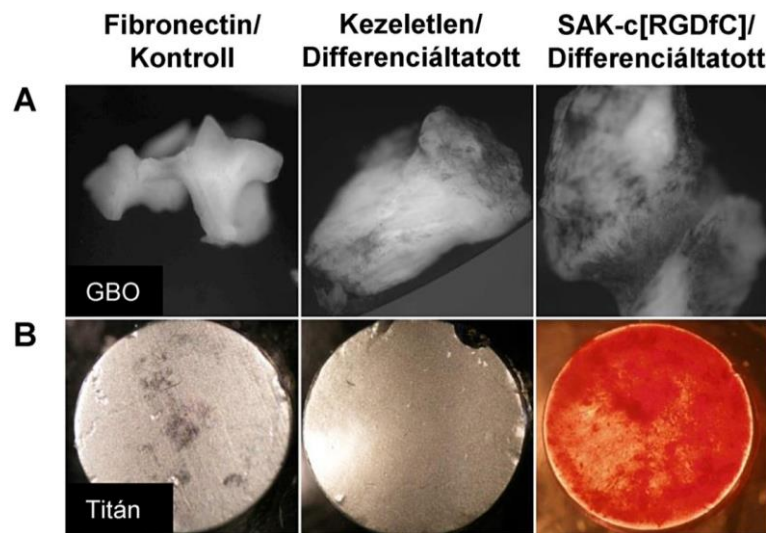
27. ábra: A sejtek titán illetve csont felszínhez kötődésének hatékonysága, különböző kezelések hatására.

*A GFP kifejező összejtek (A) zöld fluoreszcencia jelintenzitásán, valamint resazurin viabilitási teszten alapuló mérések során statisztikailag is a SAK-cyclo[RGDfC] peptidkonjugátum kezelés bizonyult a leghatékonyabbnak (B), (FN= fibronectin). Az oszlopok fölötti csillagok az eltérés mértékét jelzik: **, $P=0.007$; ***, $P<0.001$.*

A GBO-n elvégzett kísérletek hasonló eredményre vezettek, a peptid kezelés 146±11%-kal több sejt kitapadását eredményezte a FN-kezeléshez viszonyítva, azonban a kontroll felületeken is megfigyelhető volt 23-37% sejtadherencia. Érdekeség, hogy a SAK váz sejtaszító hatása ebben a kísérletben nem volt megfigyelhető (27. ábra A, B).

Az eredmények tükrében talán nem meglepő, hogy indukciót követően, a sejtek csont irányú differenciációs markerei is a SAK-cyclo[RGDfC] és fibronectin kezelt felületek esetében voltak a legkifejezettebbek. A Bio-Oss felületére kitapasztott sejteken, 10 nap csont irányú differenciáltatást követően elvégzett ALP enzim citokémiai kimutatása során (28. ábra A) a nem bevont Bio-Oss granulátumokon is megfigyelhető volt nyomokban a jellegzetes sötét elszíneződés, ami az enzim működését jelezte. Az elszíneződés mértéke azonban jelentősen elmaradt a konjugált peptiddel bevont felületen differenciáltatott sejtekéhez képest.

A kitapadás nyújtotta előny, a titán felszínen végzett 21 napos csont irányú differenciáltatást követően is tapasztalható volt. A SAK-c[RGDfC] kezelt titánkorongon jelentős szervesen kalciumfelhalmozódás volt tapasztalható, ezzel szemben a kezeletlen felületen nem maradt sejt, amelyen a kalcifikálódás kimutatható lett volna (28. ábra B).



28. ábra: A zsír eredetű őssejtek csont irányú differenciációs képessége SAK-c[RGDfC] kezelt és bevonat nélküli csontgranulátumokon, illetve titánkorongon.

Alkalikus foszfatáz enzim aktivitásának kimutatása Bio-Oss felszínén citokémiai módszerrel (sötétszürke festődés), 10 nap differenciáltatást követően (A), és kalcium felhalmozódás megjelenítése 4 hét csontosítás után alizarinvörös festéssel, titánkorongon (B).

5. Eredmények megvitatása

Régóta ismert, hogy mesenchymalis őssejtek megtalálhatók az emberi szervezet gyakorlatilag összes szövetében, sőt plasztikadherencia alapján könnyűszerrel izolálhatók is. Közös tulajdonságuk - a szöveti forrástól függetlenül-, hogy a) kifejezik a CD44, CD73, CD90 és CD105 molekulákat, b) nem a vérképző rendszer fejlődési soraiból származnak, továbbá c) képesek megfelelő indukciós hatásokra *in vitro* tenyésztési körülmények között csont, zsír, valamint porcsejteket létrehozni [22]. A Dominici és munkatársai által kidolgozott egységesnek látszó meghatározás azonban jelentősen eltérő tulajdonságokkal rendelkező sejttípusokat takar, akár egy adott szövetből származó sejtek esetében is. Munkánk során ezeket a különbségeket kívántuk feltárni regeneratív orvoslás céljára történő felhasználás szempontjából érdekes mesenchymalis őssejttípusok között.

Multipotens sejteket izoláltunk: a) ortopédiai műtét során eltávolított szubkután zsírszövetből, b) a köldökzsinórokban futó ereket körülvevő Wharton kocsonyából, c) szájszéjszeti úton eltávolított bölcsességfogak foggyökerének felszínén található periodontális ligamentumból, d) kontrollként combcsonti csontvelő állományból.

Az egyes izolátumokban megtalálható sejtek között nagyfokú különbségek látszottak méret, alak, osztódási-, valamint kolóniaformáló képesség tekintetében, azonban a heterogenitás mértéke az adott szövettípusra jellemző volt. A velőcső eredetű periodontális ligamentum sejtek képeztek a leghatékonyabban kolóniákat a zsírszöveti és Wharton kocsonya eredetű stromasejtekhez képest, míg a csontvelői izolátumban a Pl őssejtekkel összevethető számú kolóniaformáló sejtet találtunk.

A nemzetközi elvárásoknak megfelelően jellemeztük izolátumainkat a sejtfelszíni fehérjék kifejeződése alapján, amelyek mindegyike kimutatható volt a sejteken. A vérképző rendszer őssejtjeire jellemző markerek hiányoztak a sejtfelszínről, vagy csak nagyon kismértékben fejeződtek ki. A különböző szöveti izolátumok CD90, CD73 és CD29 antigének expressziós mintázatában is jelentős eltéréseket találtunk, ami az egyes csoportokon belül azonban homogénnek mutatkozott, tehát ezen géntermékek kifejeződése jellemző volt az adott szövetre.

A CD90 fehérje magas expressziója a zsírszöveti, periodontális ligamentum és csontvelői őssejtek felszínén, párhuzamos ezen sejtek nagymértékű oszteogén differenciációs képességével. Ez a megfigyelés összhangban van azokkal az irodalmi

adatokkal, amelyek egér calvaria defektus modellben írják le a Thy-1 (CD90) molekulát magas szinten kifejező zsír eredetű mesenchymalis sejtek kiemelkedő *in vivo* csontregenerációs képességét. A korai és késői csontdifferenciációs markerek expressziójának változása követte a CD90 gén kifejeződésének mintázatát [107]. Az endotél irányú differenciáció során vizsgált paraméterek, úgymint a matrigélben végzett angiogenezis teszt, PECAM1 génexpresszió mintázata is megegyezett a CD90 fehérje kifejeződésével. Közvetlen vizsgálattal ugyan nem bizonyítottuk, mégis arra a következtetésre jutottunk, hogy a Thy-1 fehérjének közvetve vagy közvetlenül szerepe lehet a többirányú differenciációs folyamatokban, illetve olyan sejtek felszínén fejeződik ki, melyek fokozott differenciációs képességgel rendelkeznek.

Rodeheffer és munkatársai kimutatták, hogy a CD29 molekula jelenléte gátolta az MSC-k zsírsejteké alakulását [108]. A kísérleteink során mi is azt találtuk, hogy a CD29 fehérje a zsír eredetű sejtek felszínén található meg a legalacsonyabb denzitásban a többi vizsgált izolátumhoz képest.

Statisztikailag jelentős eltérést találtunk még a CD73 antigén szövetek közötti eloszlásában, azonban semmilyen differenciációs kísérleti eredménynek nem lehetett megfelelni az ecto-5'-nukleotidáz enzim (CD73) áramlási citometriásan meghatározott expressziós mintázatát.

A mesenchymális őssejtek sejtfelszíni fehérjéinek jellemzésével párhuzamosan, elvégeztük multipotens képességük igazolását is. Az *in vitro* porc irányú differenciációs folyamat végén, immunhisztológiai eljárással minden izolátumban kimutatható volt újonnan keletkezett glükózaminoglikán, amely a kondrogenezisben meghatározó szerepet játszó poliszacharid. A sejtek tehát eleget tettek a porcképző képességet előíró követelménynek.

A *in vitro* adipogén indukció eredményeképpen a zsírszövetből származó sejtek nagy mértékű lipidképződést mutattak, amelyet a PPAR γ gén megnövekedett kifejeződése kísért. Azok a sejtek, amelyek természetes környezetükben részt vettek csontképzési folyamatokban, mint a periodontális ligamentum, vagy a csontvelői eredetű őssejtek, jelentősen kisebb mértékben mutattak lipidhalmozódást, ellenben 14 nap oszteogén indukciót követően intenzív csontképződést figyeltünk meg. Figyelemre méltó, hogy oszteoindukció során a zsírszövet eredetű sejtek által képzett kalcium mennyisége összemérhető volt a periodontális ligamentum őssejtekével. Ezek az eredmények alátámasztják a korábban *in vitro* és *in vivo* kísérletek során mások által tett megfigyeléseket [109,110]. A csontmátrix formálódásához elengedhetetlen

alkalikus foszfatáz enzim szintjének emelkedése a sejtekben teljes összhangot mutatott a kalcifikációs folyamatokkal. Érdeemes megemlíteni, hogy a Wharton kocsonya eredetű sejtek csontformáló képességéről különböző kutatócsoportok ellentmondásos adatokat közöltek. Yu és munkatársai hasonló eredményre jutottak, mint a mi csoportunk, vagyis a periodontális ligamentum őssejtek jelentősen több kalciumot halmoztak fel a Wharton kocsonya őssejtekhez képest, noha a RUNX2 gén kifejeződésében nem mutatkozott jelentős eltérés a vizsgált sejtek között [111]. Tankönyvi adat, hogy a csontosodási folyamat a RUNX2 mester transzkripciós faktor sejtmagban történő megjelenése nélkül nem indul el, azonban önmagában ez nem elegendő érett oszteociták létrehozásához. Egyebek mellett az ALP enzim fokozott expressziójára is szükség van az érett csontmátrix kialakulásához, valamint a differenciáció késői szakaszában a RUNX2 géntermék mennyiségének mérséklődését is megfigyelték [112]. A Wharton kocsonyából származó izolátumainkban oszteogén indukció hatására kimutatott magas RUNX2, valamint viszonylagosan alacsony ALP génexpresszió együttesen szolgálhat magyarázatul a mérsékelt csontformáló képességükre. Eredményeinkkel ellentétesen, Zhang és munkatársai részletes munkában bizonyította, hogy *in vitro* vizsgálati körülmények között, a köldökzsinór eredetű MSC-k éppen olyan hatékonyan képesek csontszövetpótló szerepet betölteni, mint a zsíraspirátum eredetű stroma sejtek, valamint *in vivo*, ektopikusan immundeficiens egér bőre alá ültetve [113]. Meg kell jegyezni, hogy Zhang csoportja az általunk használt differenciációs protokollhoz képest kétszeres indukciós idővel dolgozott.

Számos publikáció számol be egyebek mellett a zsírszöveti, periodontális ligamentum, Wharton kocsonya, illetve csontvelői őssejtek biztonságos klinikai felhasználásáról, ahogyan azt Gamie és munkatársai egy összefoglaló cikkben leírták [114]. A craniofaciális régióban, és ezen belül a periodontiumban, bekövetkező defektus regenerációjához azonban alaposan meg kell választani, hogy milyen szöveti forrásból származó sejteket alkalmazunk a hosszú csontoktól eltérő, egyedi felépítése miatt [115].

A hosszú csontok endokondrális csontosodási folyamattal jönnek létre, amely során a mesenchymalis sejtek köztes porcszöveti differenciációs állapotot követően alakulnak csontszövevé, szemben az intramembrán csontosodással, ahol a lemezekbe rendeződött mesenchymalis kötőszövet közvetlen alakul csontszövevé. A craniofaciális csontok jellemzően a két folyamat kombinációjának eredményeképpen, azonban az intramembrán csontosodási típus túlsúlyával alakulnak ki. A két különböző mechanizmus hátterében eltérő fejlődéstani okok állnak: míg a végtagok, és

függesztővelek az embrió lateralis mesodermájából eredeztethetők, addig a fej-nyaki régióban található csontok a velőcsőből, illetve a paraxialis mesoderma rétegből alakultak ki [116].

Patkányokon [117,118] és nyulakon [119] végzett calvaria defektus modellekben kimutatták, hogy az intramembrán differenciációs folyamat eredményeképpen létrejött csontból származó graft, hosszú távon jobban képes regenerálni a kritikus méretű sérülést az endokondrális csontokból származóhoz képest. A jelenség hátterében a sejtek eltérő HOX génexpressziós mintázata állhat. A mesenchymalis őssejtek a szervezetből eltávolítva is megtartják az eredeti *niche*-re jellemző tulajdonságaikat, vagyis megőrzik a pozicionális memóriájukat [120,121].

Kritikus méretű csontdefektusok regenerációja esetén a megfelelő szöveti eredetű sejt típus és implantátum kiválasztása mellett, komoly kihívást jelent a csontgraft belső vérellátásának biztosítása is. A nem megfelelően érzett csontszövet belseje nekrotizálódik, így veszít szilárdító funkciójából, és végül szükségessé válik újbóli pótlása [44]. A mesenchymalis őssejtek érregenerációs felhasználása is ígéretes klinikai lehetőségként kínálkozik. A sejtek egyfelől parakrin faktorok (pl. VEGF) termelésén keresztül segítik az érképző folyamatokat, másrészt maguk is képesek közvetlenül endotél sejtekké formálódni. Számos klinikai tanulmány számol be csontvelői, zsírszövet eredetű vagy Wharton kocsonya eredetű multipotens sejtek autológ vagy allogén ér pótló transzplantációs felhasználásáról [122-124]. Periodontális ligamentum sejtek közvetlen érregenerációs felhasználásáról nem áll rendelkezésünkre irodalmi adat, azonban a fejlődéstanilag nagyon közel álló fogpulpa eredetű őssejtekkel már sikeresen hajtottak végre érújraképző kísérleteket egér iszkémiás-reperfüziós modell rendszerben [125]. Kimutatták más csoportok továbbá, hogy Pl őssejtek pericitákként funkcionálva, hatékonyan képesek segíteni az érprogenitor sejtek hálózatformálását [126-127]. Endotél irányú differenciációs képességüket azonban eddig senki nem írta le. Az általunk vizsgált Pl izolátumok a zsírszöveti MSC-vel összehasonlítható mértékben voltak képesek kapillárisok képzésére, ahogyan az *in vitro* érképzés során kapott eredményeinket a PECAM1 gén kifejeződése is alátámasztotta.

Vitatott kérdés, hogy a mesenchymalis őssejtek kifejeznek-e embrionális őssejtekre jellemző pluripotencia markereket, illetve ha igen, akkor ezek hogyan befolyásolhatják a sejtek különböző szövetek irányába történő elköteleződését [128,129]. Az általunk vizsgált szöveti őssejtek mRNS szintjén, a kontroll HUES9 sejt vonalhoz képest nem, vagy csak elhanyagolható mértékben expresszálták az OCT4, SOX2, Nanog

transzkripciós faktorokat, illetve a hTERT gént. A szintén embrionális őssejtmarkerként számon tartott SSEA-4 sejtfelszíni antigén azonban viszonylag nagymértékben volt megtalálható a Wharton kocsonya, továbbá a csontvelői eredetű sejtek membránjában.

Az SSEA-4, valamint a csak a köldökzsinór eredetű sejtek által kifejezett α -SMA és a GATA6 jelzőmolekulák jelenléte, azt a következtetést engedik levonni, hogy ezek a sejtek valóban közelebb állhatnak az embrionális őssejt állapothoz, mint a többi vizsgált felnőtt szöveti MSC [103]. Több olyan tanulmány is megjelent, amelyben az SSEA-4 glikolipidet kifejező különböző MSC-k differenciációs képességét vizsgálták. Ezekben a munkákban egymásnak ellentmondó eredmények születtek, amelyek alapján tehát nem lehet egyértelmű következtetéseket levonni [130-132].

További őssejt jellemzőként vizsgáltuk az ABCG2 multidrog transzporter kifejeződését, amely az általunk tanulmányozott izolátumok közül kizárólag a PI őssejtben volt kimutatható. Ismert, hogy ezeknek a sejteknek egy kis populációja („side population”, SP) képes kipumpálni a fluoreszcens Hoechst33342-t [76], vagy annak analógját a Vibrant DyeCycle Violet (DCV) festéket [133]. Ez leggyakoribb esetben az ABCG2 multidrog transzporter közvetítésével történik. Ezekről az SP sejtekről leírták, hogy őssejt-tulajdonságokkal bírnak, habár a legkülönbözőbb szövetekből izolálták őket [134,135], beleértve patkányok fogzacsóját [136] vagy humán fogpulpát is [137]. Ezért kísérleteink során megpróbáltunk választ találni arra a kérdésre, hogy vajon a humán ABCG2 fehérjét kifejező periodontális ligamentum sejtek is nagyfokú differenciációs képességgel rendelkeznek-e?

Az ABCG2 transzporter jelenlétét igazoltuk mRNS szintjén, továbbá egy - a sejtek membránjának külső felszínén lévő epitópot felismerő, konformációérzékeny - monoklonális antitest segítségével (5D3), valamint DCV kizáró módszerrel is. A DCV festék kipumpálása a sejtekből gátolható volt a legtöbb multidrog transzporter inhibitoraként ismert verapamillal (az eredményt nem mutattuk be), valamint az ABCG2 transzporter specifikus gátlószerével a Ko143-mal is. A két vegyület hasonló mértékű gátló hatása arra enged következtetni, hogy a DCV kipumpálása kizárólag az ABCG2 aktivitásának tulajdonítható. A két különböző áramlási citometriás mérési módszer közül a monoklonális antitesttel történő jelölés bizonyult érzékenyebbnek a DCV kizáró módszerrel szemben, ugyanis a sejteknek jelentősen magasabb hányadát sikerült így kimutatnunk. Megfigyelhető volt ugyanakkor, hogy az áramlási citométerrel

mért adatok és az ABCG2 mRNS vizsgálatok is megegyeztek arányaikban a különböző sejtek esetében, csupán mértékük tért el a vizsgálati módszertől függően.

Kísérleteinkben azt tapasztaltuk, hogy a magasabb ABCG2 expresszióval rendelkező sejtek több kalciumot voltak képesek felhalmozni az extracelluláris térben. Annak bizonyítására, hogy ez a fokozott kalcifikálódás az ABCG2 fehérjéhez köthető, és független a donorok egyéni tulajdonságaitól (kor, nem, genetikai háttér), monoklonális antitest segítségével különválogattunk ABCG2^{magas} és ABCG2^{alacsony} populációkat három különböző izolátumból, és vizsgáltuk azok csontdifferentiációs tulajdonságai mellett a zsír-, továbbá porcképző képességüket is.

Kísérleteinkben azt találtuk, hogy az ABCG2^{magas} populációkban minden vizsgált csont/cementum marker kifejeződése (ALP, OSX, OCN, CEMP1) megemelkedett indukció hatására az ABCG2^{alacsony} és a parentális populációkhoz képest, és a fokozott kalciumfelhalmozódás is kimutatható volt alizarinvörös festék segítségével.

Hasonló jelenséget tapasztaltunk porcformáló képességet vizsgáló kísérleteink során is: az ABCG2^{magas} populációk megemelkedett SOX9 kifejeződést mutattak, valamint nagyobb sűrűségben volt tapasztalható a glükozaminoglikánok képződése is.

A periodontális sejtek zsírképző potenciálja meglehetősen limitált, azonban az antitest alapú szortolást követően itt is kimutatható volt szignifikáns különbség az ABCG2^{magas} sejtek javára, amely a PPAR γ gén kifejeződésének megemelkedésében, valamint a lipidcseppek felhalmozódásának mennyiségében nyilvánult meg.

Eredményeink összhangban vannak a humán fogpulpából izolált sejteken végzett hasonló kísérletekkel, ahol az SP sejtek fokozott *in vitro* oszteogén, adipogén, továbbá neurogén és endotél irányú differentiációját tapasztalták a parentális sejtpopulációhoz képest [PI-MS, 29]. Ezek az eredmények együttesen azt mutatják, hogy a fogasszociált ABCG2 kifejező őssejtek többirányú differentiációs képességgel rendelkeznek.

Az általunk alkalmazott ABCG2 kifejező periodontális ligamentum őssejtek egyszerű antitest alapú kiválogatása olyan *in vivo* vizsgálatokat alapozhat meg, amely bebizonyíthatja ezen sejtek alkalmazhatóságát csont/cementumpótló felhasználásra. A PI őssejtek oszteogén/cementogén tulajdonságát kimutatták már korábban ektopikus egér modellben [138], patkány periodontium regenerációs kísérletben allogén PI sejtek felhasználásával [139], bárány-egér xenogén rendszerben [140], valamint kutyákon is [141]. Fontos megemlíteni, hogy sikeresen alkalmaztak autológ sejteket három előrehaladott periodontitiszben szenvedő humán betegen is [60], tehát ezen sejtek klinikai felhasználása biztonságosnak és eredményesnek tűnik.

A PI őssejtek nagyobb méretű defektusok regenerációjára történő felhasználhatóságát nehezíti a sejtek korlátozott hozzáférhetősége. Megoldást jelenthet, hogy hosszú ideig kultúrában tarthatók, és szaporíthatók fenotípusos változás nélkül. További előnyük, hogy fagyasztva tárolhatók későbbi felhasználás céljából [142].

Kíváncsiak voltunk, vajon az ABCG2 fehérje csak őssejt markerként, xenobiotikumok elleni védelmi funkciót ellátva található-e meg a sejtek membrájában, vagy aktív szerepet játszik a differenciációs folyamatokban? A kísérleteink során az előbbi hipotézis került bizonyításra, ugyanis amellet, hogy az oszteogenetikus folyamat korai fázisában jelentősen csökkent az expressziója, ha specifikus inhibitor jelenlétében indukáltuk a sejteket, nem tapasztaltunk eltérést a csontmátrix kalcifikációjában.

A többi vizsgált MSC izolátum sejt felszínén nem volt kimutatható az ABCG2 transzporter, differenciációs képességük mégis összevethető volt a PI őssejtekével. Ezekben a megfigyeléseken alapulva kijelenthető, hogy az ABCG2 fehérjének nincs funkcionális szerepe a differenciációs folyamatokban.

Érdeemes megjegyezni azonban, hogy a paraxialis mesodermából származó MSC-kel szemben a velőcső eredetű őssejteken (pl. fogpulpából [137], vagy cornea strómájából izolált sejteken [143]) korábban mások is megfigyeltek magas ABCG2 kifejeződést. Elképzelhető, hogy a velőcső eredetű, a craniofaciális régióban elhelyezkedő szöveti progenitor sejtek sajátosága ez a viszonylag magas ABCG2 génexpresszió.

A megfelelő sejtek megválasztása csontpótló beavatkozásokhoz önmagában sok esetben nem elegendő. A nagyméretű csontdefektusok regenerációjához számtalan esetben alkalmaznak titánból készített implantátumokat, illetve állati vagy humán eredetű (decellularizált) csontgraftokat a csonthiány pótlására. Ezek az implantátumok biokompatibilis anyagokként képesek beépülni a szervezetbe, azonban a rögzülés lassú folyamat sok esetben tökéletlen, idővel az implantátumok kilazulnak és cseréjük szükségessé válhat, ezzel újabb műtéti beavatkozásnak kitéve a beteget [144].

A beépülési hatékonyság fejlesztésének egyik módja, hogy az implantátumok felszínét a csontképző sejtek kitapadását, illetve differenciációját elősegítő anyaggal kezelik. Korábbi megfigyelések is igazolták, hogy a kezeletlen titán felületre, valamint a szájsebészeti beavatkozásoknál széleskörűen alkalmazott csonthelyettesítő GBO granulátum felszínére *in vitro* körülmények között az MSC-k kis hányada tapadt ki [145,146]. A szérum-faktorok megvonásával, eredményeinkkel megegyezően, a sejtadhézió hatékonysága tovább romlott [147]. Humán felhasználás céljára *in vitro*

előállított, sejttel bevont implantátumok esetében pedig állati eredetű szérum felhasználása nem megengedett.

Az MTA-ELTE Peptidkémiai Kutatócsoport által kifejlesztett ciklikus RGD motívumot tartalmazó elágazó peptidkonjugátum jelentősen képes volt megnövelni a különböző implantátumok felületén a zsírszöveti MSC-k kitapadásának hatékonyságát. Az adhézió elősegítésére gyakran használt polilizinnel ellentétben az elágazó SAK-c[RGDfC] peptid nem toxikus. További előnye, hogy egyszerű fizikai abszorpció segítségével feljuttatható a kezelni kívánt felületre, és immobilizálása nem igényel semmilyen specifikus munkafázist, szemben más ciklikus RGD peptidekkel, ahol szilanizálásra illetve bifunkcionális keresztkötések kialakítására is szükség lehet [87].

Az RGD motívumot tartalmazó peptidok titánötvözethez való sejtadhéziót elősegítő és oszteoinduktív tulajdonságai ismertek voltak korábbi csontvelői oszteoprogenitor, illetve egér MC3T3-E1 oszteoblasztokon végzett munkákból [87,148], de egészséges, humán eredetű sejteken eddig nem végeztek hasonló kísérleteket.

Bevonatok tesztelésére gyakran alkalmaznak még (a GBO granulátumhoz hasonló) hidroxipatitból (HA) készült korongokat is. Az elágazó, illetve nem elágazó RGD peptidok HA korongokon történő alkalmazása esetében sokkal ellentmondásosabb eredményekről számoltak be. Oszteoprogenitor sejtek és csontvelői MSC-k kitapadását elősegítette, ha előtte kezelték a felületet [88], azonban mások szerint természetes adhéziós faktorok jelenlétében ez a kitapadást serkentő hatás elmarad a sejteken található mátrix receptorokért történő verseny miatt [149]. Szérummentes rendszerben ez a kompetíció, a kezdeti kitapasztási lépésnél kizárható. Tovább árnyalja a képet, hogy egyes források az RGD motívum elhanyagolható sikeréről, vagy teljes hatástalanságáról számolnak be *in vitro* [150,151], illetve *in vivo* rendszerekben [149]. Meg kell ugyanakkor jegyezni, hogy a felsorolt esetekben a kísérleti elrendezés nagy mértékben eltért az általunk alkalmazottól (pl. HA korongok alkalmazása a GBO granulátumokkal szemben).

Az általunk tesztelt ciklikus RGD motívumot tartalmazó, SAK vázhoz konjugált peptid azonban - a fibronectinhez hasonló mértékben - egyértelműen és jelentősen megnövelte a Zs-MSK-k plasztikhoz, titánötvözethez, illetve csont felszínhez való kitapadásának hatékonyságát, és lerövidítette annak időtartamát. Elősegítette továbbá a sejtek *in vitro* csont irányú differenciációját. Az ígéretes *in vitro* kísérleti eredmények indokolták tennék a vegyület *in vivo* rendszerben történő kipróbálását is.

6. Összefoglalás

Az emberi szervezetből izolálható mesenchymalis őssejtek (MSC) a regeneratív medicina nagy ígéretének számítanak. Ezek az önmegújulásra képes sejtek *in vitro* körülmények között differenciálthatók *csont*, *zsír*, és *porc* irányba, meghatározott sejtfelszíni fehérjéket fejeznek ki, és nem hematopoetikus eredetűek.

Ellentmondásos irodalmi adatok utalnak a különböző szöveti MSC-k eltérő tulajdonságaira, pedig terápiás alkalmazás szempontjából ezek tisztázása nagy jelentőséggel bír. *In vitro* kísérleteink során humán zsírszövetből (Zs-MSC), Wharton kocsonyából (Wk-MSC), és periodontális ligamentumból (Pl-MSC), továbbá csontvelőből (Csv-MSC) izoláltunk stroma sejteket. Az egyes izolátumokat alkotó sejtek mérete, osztódási, és kolóniaformáló képessége, valamint sejtfelszíni markerkifejezése jelentősen eltérőnek bizonyult, de a származási szövettípusra minden esetben jellemző volt. Csont irányú differenciálást követően a Zs-MSC, Pl-MSC, és Csv-MSC sejtek fokozott kalciumhalmozódást mutattak, míg zsír differenciáltság során a Zs-MSC-k intenzív lipidtermelése emelkedett ki a többi izolátuméhoz képest. A munka egyik fő újdonsága, az MSC-k endotél irányú differenciálódásának bemutatása. A vizsgált izolátumok mindegyike mutatott Matrigelben érhálózatszerű csösképződést, de a legkiterjedtebb kapilláris hálózatot a Pl-MSC és a Zs-MSC minták képezték. A Wk-MSC-k csont-, zsír- és érképző képessége elmaradt a többi izolátumhoz képest, ezt bizonyos markerek (SSEA-4, GATA6, α -SMA) jelenlétével magyaráztuk.

Célul tűztük ki továbbá, hogy találjunk olyan szelekciós markert, amely segítségével a heterogén izolátumból kiválogathatók terápiás szempontból hasznos őssejtek. A különböző őssejteken megtalálható ABCG2 transzportert a Pl-MSC sejtek egy populációja is kifejezte. Ezek a sejtek monoklonális antitest-jelölés segítségével szortolhatóak voltak, és fokozott *csont*, *zsír* valamint *porc* differenciálódási képességet mutattak. Az így kiválogatott őssejtek hosszú távú megoldást jelenthetnek a fogágyi megbetegedések kezelésében (Szepesi és mtsai, 2014).

Végül, klinikai gyakorlatban alkalmazott 3D implantátum-anyagok felszínét vontuk be ciklikus arginil-glicil-aszparagin (RGD) motívumot tartalmazó peptiddel. Az így kezelt titán, valamint szájsebészeti csontpótló eljárásokban alkalmazott marhacsontörlemény felszínéhez jelentősen több sejt és rövidebb idő alatt tapadt ki, illetve képezett csontszövetet, mint a kontroll felszíneken (Tátrai és mtsai, 2012).

7. Summary

Mesenchymal stem cells (MSCs) isolated from various tissues are promising candidates to be used in the field of regenerative medicine. These cells are not of haematopoietic origin, express specific cell surface markers, possess self-renewal ability, and a capacity to differentiate into bone, fat and cartilage.

Data in the literature are controversial regarding the properties of MSCs derived from various tissues, while for a proper therapeutic application a clarification of these features is required. For achieving a comparative characterization, in our *in vitro* experiments we used human MSCs, derived from adipose tissue (Zs-MSC), Wharton's jelly (Wk-MSC), periodontal ligament (Pl-MSC), and bone marrow (Csv-MSC). The size, morphology, frequency of colonies, population expansion time and surface marker expression of the cells were considerably different, but showing tissue-specificity. Zs-MSC, Pl-MSC and Csv-MSC isolates showed enhanced calcium accumulation after induction of bone differentiation, while an enhanced lipid droplet production was observed in Zs-MSCs. One of the key achievements in our studies was the detailed characterization of the endothelial differentiation capacity of the MSCs isolates. We found that capillary structures were developed by all the examined MSC isolates in Matrigel, and the most extensive tubular network was formed by Pl-MSC and Zs-MSC samples. The bone, fat and endothelial differentiation ability of Wk-MSCs was less pronounced than that of other isolates, and the expression of certain marker genes (SSEA-4, GATA6, α -SMA) may explain this difference.

In these studies we also aimed to find selection markers allowing to obtain therapeutically relevant MSC populations. We found that the stem cell marker ABCG2 was expressed in a small population of Pl-MSCs. The ABCG2 expressing cells could be sorted out after antibody labeling, and these MSCs exerted enhanced *osteogenic*, *adipogenic* and *chondrogenic* differentiation potential. These MSCs may offer long-term regeneration potential in the treatment of periodontal diseases (Szepesi *et al*, 2014).

In order to study MSC function in 3D implants, we coated the surface of materials, used in clinical practice, e.g. in oral surgery, with a special cyclic arginine-glycine-aspartic (cRGD) peptide. We found that significantly more MSCs adhered to the treated surface of titanium and bovine bone substitute, and the MSCs also showed elevated bone differentiation capacity (Tátrai *et al*, 2012).

8. Köszönetnyilvánítás

Elsőként témavezetőmnek, **Dr. Német Katalinnak** tartozom köszönettel, hogy felkarolt még főiskolai hallgatóként, és bevezetett a kutató világ rejtelmeibe. Ellátott szakmai, valamint személyes tanácsaival, továbbá egyengette az utamat akkor is, ha az gyakran rögsnek bizonyult.

Nem készülhetett volna el ez az értekezés **Szigeti Anna**, **Bakki Margit** és **Bátkai Monika** asszisztensek kitartó és precíz munkája nélkül, ahogy **Matula Zsolt** PhD hallgató sorstársam támogatása nélkül sem. Köszönöm nekik ezt a végtelen sok segítséget, amivel munkámat előre mozdították.

Köszönettel tartozom továbbá **Dr. Uher Ferencnek**, **Dr. Sarkadi Balázsnak**, és **Dr Tátrai Péternek**, akik rengeteg javaslattal segítették szakmai fejlődésemet.

A legnagyobb hála azonban elsősorban feleségemnek **Szepesi-Erdős Zsuzsának**, és kislányaimnak, **Almának**, valamint **Csengének** jár, amiért türelemmel viseltettek irántam, és támogattak, amikor szükségem volt rá.

Köszönettel tartozom végül, minden - egyenként nem nevesített - munkatársnak, kollaborációs partnernek, barátoknak és rokonoknak, akik valamilyen módon előremozdították a Doktori értekezésem elkészülését.

9. Irodalomjegyzék

1. Li S, Huang KJ, Wu JC, Hu MS, Sanyal M, Hu M, Longaker MT, Lorenz HP. (2015). Peripheral blood-derived mesenchymal stem cells: candidate cells responsible for healing critical-sized calvarial bone defects. *Stem Cells Transl Med.* 4(4):359-68.
2. Ahmed TA, Hincke MT. (2014). Mesenchymal stem cell-based tissue engineering strategies for repair of articular cartilage. *Histol Histopathol.* 29(6):669-89.
3. Zhang L, Zhao YH, Guan Z, Ye JS, de Isla N, Stoltz JF. (2015). Application potential of mesenchymal stem cells derived from Wharton's jelly in liver tissue engineering. *Biomed Mater Eng.* 25:137-43.
4. Coulombe KL, Bajpai VK, Andreadis ST, Murry CE. (2014). Heart regeneration with engineered myocardial tissue. *Annu Rev Biomed Eng.* 16:1-28.
5. Lin C, Ballinger KR, Khetani SR. (2015). The application of engineered liver tissues for novel drug discovery. *Expert Opin Drug Discov.* 10(5):519-40.
6. Bin Mh Busra MF, Chowdhury SR, Bin Ismail F, Bin Saim A, Idrus RH. (2016). Tissue-Engineered Skin Substitute Enhances Wound Healing after Radiation Therapy. *Adv Skin Wound Care.* 29(3):120-9.
7. Thompson EM, Matsiko A, Kelly DJ, Gleeson J, O'Brien FJ. (2016). An endochondral ossification-based approach to bone repair: Chondrogenically-primed MSC-laden scaffolds support greater repair of critical-sized cranial defects than osteogenically stimulated constructs in vivo. *Tissue Eng Part A.* [Epub ahead of print]
8. Hayes M, Curley G, Ansari B, Laffey JG.(2012). Clinical review: Stem cell therapies for acute lung injury/acute respiratory distress syndrome - hope or hype? *Crit Care.* 16(2):205.

9. Thomson JA, Itskovitz-Eldor J, Shapiro SS, Waknitz MA, Swiergiel JJ, Marshall VS, Jones JM. (1998). Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. *Science*. 282:1145-7.
10. Wei X, Yang X, Han ZP, Qu FF, Shao L, Shi YF. (2013). Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol Sin*. 34(6):747-54.
11. de Lázaro I, Yilmazer A, Kostarelos K. Induced pluripotent stem (iPS) cells: a new source for cell-based therapeutics? (2014). *J Control Release*. 185:37-44.
12. Zuba-Surma EK, Józkowicz A, Dulak J. (2011). Stem cells in pharmaceutical biotechnology. *Curr Pharm Biotechnol*.12(11):1760-73.
13. Bhatt VR, Vose JM. (2014). Hematopoietic stem cell transplantation for non-Hodgkin lymphoma. *Hematol Oncol Clin North Am*. 28(6):1073-95.
14. Su G, Luan Z, Wu F, Wang X, Tang X, Wu N, Wang K. (2013). Long-term follow-up of autologous stem cell transplantation for severe paediatric systemic lupus erythematosus. *Clin Rheumatol*. 32(12):1727-34.
15. Talano JA, Cairo MS. (2015). Hematopoietic stem cell transplantation for sickle cell disease: state of the science. *Eur J Haematol*. 4(5):391-9.
16. Friedenstein AJ, Chailakhyan RK, Gerasimov UV. (1987). Bone marrow osteogenic stem cells: in vitro cultivation and transplantation in diffusion chambers. *Cell Tissue Kinet*. 20:263-72.
17. Owen M, Friedenstein AJ. (1988). Stromal stem cells: marrow-derived osteogenic precursors. *Ciba Found Symp*. 136:42–60
18. Haynesworth SE, Goshima J, Goldberg VM, Caplan AI. (1992). Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. *Bone*. 13:81-8.

19. Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR. (1999). Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. 284(5411):143-7.
20. Zuk PA, Zhu M, Mizuno H, Huang J, Futrell JW, Katz AJ, Benhaim P, Lorenz HP, Hedrick MH. (2001). Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. *Tissue Eng*. 7(2):211-28.
21. Wang HS, Hung SC, Peng ST, Huang CC, Wei HM, Guo YJ, Fu YS, Lai MC, Chen CC. (2004). Mesenchymal stem cells in the Wharton's jelly of the human umbilical cord. *Stem Cells*. 22(7):1330-7.
22. Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini F, Krause D, Deans R, Keating A, Prockop Dj, Horwitz E, (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. 8(4):315-7
23. Beltrami AP, Barlucchi L, Torella D, Baker M, Limana F, Chimenti S, Kasahara H, Rota M, Musso E, Urbanek K, Leri A, Kajstura J, Nadal-Ginard B, Anversa P. (2003). Adult cardiac stem cells are multipotent and support myocardial regeneration. *Cell*. 114(6):763-76.
24. 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):149-55.
25. Bi Y, Ehirchiou D, Kilts TM, Inkson CA, Embree MC, Sonoyama W, Li L, Leet AI, Seo BM, Zhang L, Shi S, Young MF. (2007). Identification of tendon stem/progenitor cells and the role of the extracellular matrix in their niche. *Nat Med*. 13(10):1219-27.
26. Qiu X, Zhang Y, Zhao X, Zhang S, Wu J, Guo H, Hu Y. (2015). Enhancement of endothelial differentiation of adipose derived mesenchymal stem cells by a three-dimensional culture system of microwell. *Biomaterials*. 53:600-8.

27. Okumachi E, Lee SY, Niikura T, Iwakura T, Dogaki Y, Waki T, Takahara S, Ueha T, Sakai Y, Kuroda R, Kurosaka M. (2015). Comparative analysis of rat mesenchymal stem cells derived from slow and fast skeletal muscle in vitro. *Int Orthop.* 39(3):569-76.
28. Alimperti S, You H, George T, Agarwal SK, Andreadis ST.(2015). Cadherin-11 regulates both mesenchymal stem cell differentiation into smooth muscle cells and the development of contractile function in vivo. *J Cell Sci.* 127:2627-38.
29. Zheng G, Liu Y, Jing Q, Zhang L. (2015). Differentiation of human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells into hepatocytes in vitro. *Biomed Mater Eng.* 25:145-57.
30. Jahani H, Jalilian FA, Wu CY, Kaviani S, Soleimani M, Abassi N, Ou KL, Hosseinkhani H. (2015). Controlled surface morphology and hydrophilicity of polycaprolactone toward selective differentiation of mesenchymal stem cells to neural like cells. *J Biomed Mater Res A.* 103(5):1875-81.
31. Uccelli A, Moretta L, Pistoia V. (2008). Mesenchymal stem cells in health and disease. *Nat Rev Immunol.* 8(9):726-36.
32. Consentius C, Reinke P, Volk HD. (2015). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stromal cells: what has been seen in vitro and in vivo? *Regen Med.* 10(3):305-15.
33. Lupatov AY, Karalkin PA, Suzdal'tseva YG, Burunova VV, Yarygin VN, Yarygin KN. (2006). Cytofluorometric analysis of phenotypes of human bone marrow and umbilical fibroblast-like cells. *Bull Exp Biol Med.* 142(4):521-6.
34. Schu S, Nosov M, O'Flynn L, Shaw G, Treacy O, Barry F, Murphy M, O'Brien T, Ritter T. (2012). Immunogenicity of allogeneic mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med.* 16(9):2094-103.

35. Weiss ML, Anderson C, Medicetty S, Seshareddy KB, Weiss RJ, VanderWerff I, Troyer D, McIntosh KR. (2008). Immune properties of human umbilical cord Wharton's jelly-derived cells. *Stem Cells*. 26(11):2865-74.
36. Kebriaei P, Isola L, Bahceci E, Holland K, Rowley S, McGuirk J, Devetten M, Jansen J, Herzig R, Schuster M, Monroy R, Uberti J. (2009). Adult human mesenchymal stem cells added to corticosteroid therapy for the treatment of acute graft-versus-host disease. *Biol Blood Marrow Transplant*. 15(7):804-11.
37. Forbes GM, Sturm MJ, Leong RW, Sparrow MP, Segarajasingam D, Cummins AG, Phillips M, Herrmann RP. (2014). A phase 2 study of allogeneic mesenchymal stromal cells for luminal Crohn's disease refractory to biologic therapy. *Clin Gastroenterol Hepatol*. 12(1):64-71.
38. Kurtzberg J, Prockop S, Teira P, Bittencourt H, Lewis V, Chan KW, Horn B, Yu L, Talano JA, Nemecek E, Mills CR, Chaudhury S. (2014). Allogeneic human mesenchymal stem cell therapy (remestemcel-L, Prochymal) as a rescue agent for severe refractory acute graft-versus-host disease in pediatric patients. *Biol Blood Marrow Transplant*. 20(2):229-35.
39. Liang X, Ding Y, Zhang Y, Tse HF, Lian Q. (2014). Paracrine mechanisms of mesenchymal stem cell-based therapy: current status and perspectives. *Cell Transplant*. 23(9):1045-59.
40. Fröhlich M, Grayson WL, Wan LQ, Marolt D, Drobnic M, Vunjak-Novakovic G. (2008). Tissue engineered bone grafts: biological requirements, tissue culture and clinical relevance. *Curr Stem Cell Res Ther*. 3(4):254-64.
41. Erdogan Ö, Supachawaroj N, Soontornvipart K, Kheolamai P. (2015). Treatment of Peri-Implant Defects in the Rabbit's Tibia with Adipose or Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stems Cells. *Clin Implant Dent Relat Res*. [Epub ahead of print]
42. Mercado-Pagán ÁE, Stahl AM, Shanjani Y, Yang Y. (2015). Vascularization in bone tissue engineering constructs. *Ann Biomed Eng*. 43(3):718-29.

43. Scherberich A, Müller AM, Schäfer DJ, Banfi A, Martin I. (2010). Adipose tissue-derived progenitors for engineering osteogenic and vasculogenic grafts. *J Cell Physiol.* 225:348-53.
44. Feisst V, Meidinger S, Locke MB. (2015). From bench to bedside: use of human adipose-derived stem cells. *Stem Cells Cloning.* 8:149-162.
45. Mattioli-Belmonte M, Teti G, Salvatore V, Focaroli S, Orciani M, Dicarolo M, Fini M, Orsini G, Di Primio R, Falconi M. (2015). Stem cell origin differently affects bone tissue engineering strategies. *Front Physiol.* 6:266.
46. Ma S, Xie N, Li W, Yuan B, Shi Y, Wang Y. (2014). Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ* 21(2):216-25.
47. Bieback K, Klüter H. (2007). Mesenchymal stromal cells from umbilical cord blood. *Curr Stem Cell Res Ther.* 2(4):310-23.
48. Mitchell KE, Weiss ML, Mitchell BM, Martin P, Davis D, Morales L, Helwig B, Beerensrauch M, Abou-Easa K, Hildreth T, Troyer D, Medicetty S. (2003). Matrix cells from Wharton's jelly form neurons and glia. *Stem Cells.* 21(1):50-60.
49. Parolini O, Alviano F, Bagnara GP, Bilic G, Bühring HJ, Evangelista M, Hennerbichler S, Liu B, Magatti M, Mao N, Miki T, Marongiu F, Nakajima H, Nikaido T, Portmann-Lanz CB, Sankar V, Soncini M, Stadler G, Surbek D, Takahashi TA, Redl H, Sakuragawa N, Wolbank S, Zeisberger S, Zisch A, Strom SC. (2008). Concise review: isolation and characterization of cells from human term placenta: outcome of the first international Workshop on Placenta Derived Stem Cells. *Stem Cells.* 26:300–311.
50. Yu T, Volponi AA, Babb R, An Z, Sharpe PT. (2015). Stem Cells in Tooth Development, Growth, Repair, and Regeneration. *Curr Top Dev Biol.* 115:187-212.

51. Alcayaga-Miranda F, Cuenca J, Luz-Crawford P, Aguila-Díaz C, Fernandez A, Figueroa FE, Khoury M. (2015). Characterization of menstrual stem cells: angiogenic effect, migration and hematopoietic stem cell support in comparison with bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res Ther.* 6:32.
52. Bieback K, Kern S, Kocaömer A, Ferlik K, Bugert P. (2008). Comparing mesenchymal stromal cells from different human tissues: bone marrow, adipose tissue and umbilical cord blood. *Biomed Mater Eng.*18:S71-6.
53. Strioga M, Viswanathan S, Darinkas A, Slaby O, Michalek J. (2012). Same or not the same? Comparison of adipose tissue-derived versus bone marrow-derived mesenchymal stem and stromal cells. *Stem Cells Dev.* 21(14):2724-52.
54. Palomo L, Buencamino-Francisco MC, Carey JJ, Sivanandy M, Thacker H. (2011). Is long-term bisphosphonate therapy associated with benefits to the periodontium in postmenopausal women? *Menopause.* 18(2):164-70.
55. Shimono M, Ishikawa T, Ishikawa H, Matsuzaki H, Hashimoto S, Muramatsu T, Shima K, Matsuzaka K, Inoue T. (2009). Regulatory mechanisms of periodontal regeneration. *Microsc Res Tech.* 60:491-502.
56. Beertsen W, McCulloch CA, Sodek J. (1997). The periodontal ligament: a unique, multifunctional connective tissue. *Periodontol* 2000. 13:20-40.
57. Szepesi Á, Matula Z, Szigeti A, Várady G, Szabó G, Uher F, Sarkadi B, Németh K. (2014). ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev.* 24(2):244-52.
58. Feng F, Akiyama K, Liu Y, Yamaza T, Wang TM, Chen JH, Wang BB, Huang GT, Wang S, Shi S. (2010). Utility of PI progenitors for in vivo tissue regeneration: a report of 3 cases. *Oral Dis.* 16:20-8.

59. Liu Y, Zheng Y, Ding G, Fang D, Zhang C, Bartold PM, Gronthos S, Shi S, Wang S. (2008). Periodontal ligament stem cell-mediated treatment for periodontitis in miniature swine. *Stem Cells*. 26:1065-73.
60. Ivanovski S, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. (2006). Stem cells in the periodontal ligament. *Oral Dis*. 12:358-63.
61. Shirmohammadi A, Chitsazi MT, Lafzi A. (2009). A clinical comparison of autogenous bone graft with and without autogenous periodontal ligament graft in the treatment of periodontal intrabony defects. *Clin Oral Investig*. 13(3):279-86.
62. Gault P, Black A, Romette JL, Fuente F, Schroeder K, Thillou F, Brune T, Berdal A, Wurtz T. (2010). Tissue-engineered ligament: implant constructs for tooth replacement. *J Clin Periodontol*. 37(8):750-8.
63. Lekic P, Rojas J, Birek C, Tenenbaum H, McCulloch CA. (2001). Phenotypic comparison of periodontal ligament cells in vivo and in vitro. *J Periodontal Res*. 36:71-9.
64. Hirata A, Sugahara T, Nakamura H. (2009). Localization of runx2, osterix, and osteopontin in tooth root formation in rat molars. *J Histochem Cytochem*. 57:397-403.
65. Komaki M, Iwasaki K, Arzate H, Narayanan AS, Izumi Y, Morita I. (2012). Cementum protein 1 (CEMP1) induces a cementoblastic phenotype and reduces osteoblastic differentiation in periodontal ligament cells. *J Cell Physiol*. 227:649-57.
66. Mrozik K, Gronthos S, Shi S, Bartold PM. (2010). A method to isolate, purify, and characterize human periodontal ligament stem cells. *Methods Mol Biol*. 666:269-84.

67. Zhu W, Tan Y, Qiu Q, Li X, Huang Z, Fu Y, Liang M. (2013). Comparison of the properties of human CD146+ and CD146- periodontal ligament cells in response to stimulation with tumour necrosis factor α . *Arch Oral Biol.* 58:1791-803.
68. 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.* 79:74-83.
69. Zhou S, Schuetz JD, Bunting KD, Colapietro AM, Sampath J, Morris JJ, Lagutina I, Grosveld GC, Osawa M, Nakauchi H, Sorrentino BP. (2001). The ABC transporter Bcrp1/ABCG2 is expressed in a wide variety of stem cells and is a molecular determinant of the side-population phenotype. *Nat Med.* 7:1028-34.
70. Honda MJ, Nakashima F, Satomura K, Shinohara Y, Tsuchiya S, Watanabe N, Ueda M. (2007). Side population cells expressing ABCG2 in human adult dental pulp tissue. *Int Endod J.* 40:949-58.
71. Ding XW, Wu JH, Jiang CP. (2010). ABCG2: a potential marker of stem cells and novel target in stem cell and cancer therapy. *Life Sci.* 86:631–637.
72. Sarkadi B, Orbán TI, Szakacs G, Várady G, Schamberger A, Erdei Z, Szebényi K, Homolya L, Apáti A. (2010). Evaluation of ABCG2 expression in human embryonic stem cells: crossing the same river twice? *Stem Cells.* 28:174–176.
73. Kawanabe N, Murakami K, Takano-Yamamoto T. (2006). The presence of ABCG2-dependent side population cells in human periodontal ligaments. *Biochem Biophys Res Commun.* 344:1278-83.
74. Ninomiya T, Hiraga T, Hosoya A, Ohnuma K, Ito Y, Takahashi M, Ito S, Asashima M, Nakamura H. (2013). Enhanced Bone-forming Activity of Side Population Cells in the Periodontal Ligament. *Cell Transplant.* 23:691-701.

75. Morita Y, Yamasaki K, Hattori K. (2010). A feasibility study for in vitro evaluation of fixation between prosthesis and bone with bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Clin Biomech.* 25:829-34.
76. van den Dolder J, Farber E, Spauwen PH, Jansen JA. (2003). Bone tissue reconstruction using titanium fiber mesh combined with rat bone marrow stromal cells. *Biomaterials.* 24:1745-50.
77. Holtorf HL, Jansen JA, Mikos AG. (2005). Ectopic bone formation in rat marrow stromal cell/titanium fiber mesh scaffold constructs: effect of initial cell phenotype. *Biomaterials.* 26:6208-16.
78. Zhou W, Han C, Song Y, Yan X, Li D, Chai Z, et al. (2010). The performance of bone marrow mesenchymal stem cell--implant complexes prepared by cell sheet engineering techniques. *Biomaterials.* 31:3212-21
79. Mylonas D, Vidal MD, De Kok IJ, Moriarity JD, Cooper LF. (2007). Investigation of a thermoplastic polymeric carrier for bone tissue engineering using allogeneic mesenchymal stem cells in granular scaffolds. *J Prosthodont.* 16:421-30.
80. Choi HJ, Kim JM, Kwon E, Che JH, Lee JI, Cho SR, et al. (2011). Establishment of Efficacy and Safety Assessment of Human Adipose Tissue-Derived Mesenchymal Stem Cells (hATMSCs) in a Nude Rat Femoral Segmental Defect Model. *J Korean Med Sci.* 26:482-91.
81. Gastaldi G, Asti A, Scaffino MF, Visai L, Saino E, Cometa AM, et al. Human adipose-derived stem cells (hASCs) proliferate and differentiate in osteoblast-like cells on trabecular titanium scaffolds. *J Biomed Mater Res A.* 94:790-9.
82. Marino G, Rosso F, Cafiero G, Tortora C, Moraci M, Barbarisi M, Barbarisi A. (2010). Beta-tricalcium phosphate 3D scaffold promote alone osteogenic differentiation of human adipose stem cells: in vitro study. *J Mater Sci Mater Med.* 21:353-63.

83. Solmesky L, Lefler S, Jacob-Hirsch J, Bulvik S, Rechavi G, Weil M. (2010). Serum free cultured bone marrow mesenchymal stem cells as a platform to characterize the effects of specific molecules. *PLoS One*. 5(9).
84. Hersel U, Dahmen C, Kessler H. (2003). RGD modified polymers: biomaterials for stimulated cell adhesion and beyond. *Biomaterials*.24:4385-415.
85. Porté-Durrieu MC, Guillemot F, Pallu S, Labrugère C, Brouillaud B, Bareille R, Amédée J, Barthe N, Dard M, Baquey Ch. (2004). Cyclo-(DfKRG) peptide grafting onto Ti-6Al-4V: physical characterization and interest towards human osteoprogenitor cells adhesion. *Biomaterials*. 25:4837-46.
86. Sawyer AA, Weeks DM, Kelpke SS, McCracken MS, Bellis SL. (2005). The effect of the addition of a polyglutamate motif to RGD on peptide tethering to hydroxyapatite and the promotion of mesenchymal stem cell adhesion. *Biomaterials*. 26:7046-56.
87. Chua PH, Neoh KG, Kang ET, Wang W. (2008). Surface functionalization of titanium with hyaluronic acid/chitosan polyelectrolyte multilayers and RGD for promoting osteoblast functions and inhibiting bacterial adhesion. *Biomaterials*. 29:1412-21.
88. Detsch R, Dieser I, Deisinger U, Uhl F, Hamisch S, Ziegler G, Lipps G. (2010). Biofunctionalization of dispense-plotted hydroxyapatite scaffolds with peptides: quantification and cellular response. *J Biomed Mater Res A*. 92:493-503.
89. Bodor C, Nagy JP, Végh B, Németh A, Jenei A, MirzaHosseini S, Sebe A, Rosivall L. (2012). Angiotensin II increases the permeability and PV-1 expression of endothelial cells. *Am J Physiol Cell Physiol*. 302(1):C267-76.
90. Apáti A, Orbán TI, Varga N, Németh A, Schamberger A, Krizsik V, Erdélyi-Belle B, Homolya L, Várady G, Padányi R, Karászi E, Kemna EW, Németh K, Sarkadi B. (2008). High level functional expression of the ABCG2 multidrug transporter in

- undifferentiated human embryonic stem cells. *Biochim Biophys Acta*. 1778(12):2700-9.
91. Janeczek Portalska K, Leferink A, Groen N, Fernandes H, Moroni L, van Blitterswijk C, de Boer J. (2012). Endothelial differentiation of mesenchymal stromal cells. *PLoS One*. 7(10):e46842.
 92. Geraerts M, Willems S, Baekelandt V, Debyser Z, Gijssbers R. (2006). Comparison of lentiviral vector titration methods. *BMC Biotechnol*. 6:34.
 93. Mező G, Kajtár J, Nagy I, Szekerke M, Hudecz F. (1997). Carrier design: Synthesis and conformational studies of poly(L-lysine)based branched polypeptides with hydroxyl groups in the side chains. *Biopolymers*. 42:719-30.
 94. Mező G, de Oliveira E, Krikorian D, Fejlbrieff M, Jakab A, Tsikaris V, Sakarellos C, Welling-Wester S, Andreu D, Hudecz F. (2003). Synthesis and comparison of antibody recognition of conjugates containing herpes simplex virus type 1 glycoprotein D epitope VII. *Bioconjug Chem*. 14:1260-9.
 95. Tátrai P, Sági B, Szigeti A, Szepesi A, Szabó I, Bősze S, Kristóf Z, Markó K, Szakács G, Urbán I, Mező G, Uher F, Német K. (2013). A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med*. 24(2):479-88.
 96. Ciciarello M, Zini R, Rossi L, Salvestrini V, Ferrari D, Manfredini R, Lemoli RM. (2013). Extracellular purines promote the differentiation of human bone marrow-derived mesenchymal stem cells to the osteogenic and adipogenic lineages. *Stem Cells Dev*. 22(7):1097-111.
 97. Maleki M, Ghanbarvand F, Reza Behvarz M, Ejtemaei M, Ghadirkhomi E. (2014). Comparison of mesenchymal stem cell markers in multiple human adult stem cells. *Int J Stem Cells*. 7(2):118-26.

98. Davies OG, Cooper PR, Shelton RM, Smith AJ, Scheven BA. (2015). Isolation of adipose and bone marrow mesenchymal stem cells using CD29 and CD90 modifies their capacity for osteogenic and adipogenic differentiation. *J Tissue Eng.* 6:2041731415592356.
99. Wang Z, Oron E, Nelson B, Razis S, Ivanova N. (2012). Distinct lineage specification roles for NANOG, OCT4, and SOX2 in human embryonic stem cells. *Cell Stem Cell.* 10(4):440-54.
100. Maida Y, Masutomi K. (2015). Telomerase reverse transcriptase moonlights: Therapeutic targets beyond telomerase. *Cancer Sci.* 106(11):1486-92.
101. Kubo H, Shimizu M, Taya Y, Kawamoto T, Michida M, Kaneko E, Igarashi A, Nishimura M, Segoshi K, et al. (2009). Identification of mesenchymal stem cell (MSC)-transcription factors by microarray and knockdown analyses, and signature molecule-marked MSC in bone marrow by immunohistochemistry. *Genes Cells.* 14:407–424.
102. Bhattacharya B, Miura T, Brandenberger R, Mejido J, Luo Y, Yang AX, Joshi BH, Ginis I, Thies RS, Amit M, Lyons I, Condie BG, Itskovitz-Eldor J, Rao MS, Puri RK. (2004). Gene expression in human embryonic stem cell lines: unique molecular signature. *Blood.* 103: 2956–2964.
103. Hirata N, Nakagawa M, Fujibayashi Y, Yamauchi K, Murata A, Minami I, Tomioka M, Kondo T, Kuo TF, Endo H, Inoue H, Sato S, Ando S, Kawazoe Y, Aiba K, Nagata K, Kawase E, Chang YT, Suemori H, Eto K, Nakauchi H, Yamanaka S, Nakatsuji N, Ueda K, Uesugi M. (2014). A Chemical Probe that Labels Human Pluripotent Stem Cells. *Cell Rep.* 6:1165-74.
104. Pick A, Klinkhammer W, Wiese M. (2010). Specific inhibitors of the breast cancer resistance protein (BCRP). *ChemMedChem.* 5(9):1498-505.
105. Chung MT, Liu C, Hyun JS, Lo DD, Montoro DT, Hasegawa M, Li S, Sorkin M, Rennert R, Keeney M, Yang F, Quarto N, Longaker MT, Wan DC. (2013). CD90

- (Thy-1)-positive selection enhances osteogenic capacity of human adipose-derived stromal cells. *Tissue Eng Part A*. 19(7-8):989-97.
106. Rodeheffer MS, Birsoy K, Friedman JM. (2008). Identification of white adipocyte progenitor cells in vivo. *Cell*. 135(2):240-9.
107. Iwata T, Yamato M, Zhang Z, Mukobata S, Washio K, Ando T, Feijen J, Okano T, Ishikawa I. (2010). Validation of human periodontal ligament-derived cells as a reliable source for cytotherapeutic use. *J Clin Periodontol*. 37(12):1088-99.
108. Moshaverinia A, Chen C, Akiyama K, Xu X, Chee WW, Schricker SR, Shi S. (2013). Encapsulated dental-derived mesenchymal stem cells in an injectable and biodegradable scaffold for applications in bone tissue engineering. *J Biomed Mater Res A*. 101(11):3285-94.
109. Yu S, Long J, Yu J, Du J, Ma P, Ma Y, Yang D, Fan Z. (2013). Analysis of differentiation potentials and gene expression profiles of mesenchymal stem cells derived from periodontal ligament and Wharton's jelly of the umbilical cord. *Cells Tissues Organs*. 197(3):209-23.
110. Torreggiani E, Lisignoli G, Manferdini C, Lambertini E, Penolazzi L, Vecchiatini R, Gabusi E, Chieco P, Facchini A, Gambari R, Piva R. (2012). Role of Slug transcription factor in human mesenchymal stem cells. *J Cell Mol Med*. 16(4):740-51.
111. Zhang ZY, Teoh SH, Chong MS, Schantz JT, Fisk NM, Choolani MA, Chan J. (2009). Superior osteogenic capacity for bone tissue engineering of fetal compared with perinatal and adult mesenchymal stem cells. *Stem Cells*. 27(1):126-37. .
112. Gamie Z, MacFarlane RJ, Tomkinson A, Moniakis A, Tran GT, Gamie Y, Mantalaris A, Tsiridis E. (2014). Skeletal tissue engineering using mesenchymal or embryonic stem cells: clinical and experimental data. *Expert Opin Biol Ther*. 14(11):1611-39.

113. Zhao H, Chai Y. (2015). Stem Cells in Teeth and Craniofacial Bones. *J Dent Res.* 94(11):1495-501.
114. Mao JJ, Giannobile WV, Helms JA, Hollister SJ, Krebsbach PH, Longaker MT, Shi S. (2006). Craniofacial tissue engineering by stem cells. *J Dent Res.* 85(11):966-79.
115. Oppenheimer AJ, Tong L, Buchman SR. (2008). Craniofacial Bone Grafting: Wolff's Law Revisited. *Craniofacial Trauma Reconstr* 1(1):49-61.
116. Sullivan WG, Sz wajkun PR. (1991). Revascularization of cranial versus iliac crest bone grafts in the rat. *Plast Reconstr Surg.* 87(6):1105-9.
117. Griffin M, Kalaskar DM, Butler PE, Seifalian AM. (2014). The use of adipose stem cells in cranial facial surgery. *Stem Cell Rev.* 10(5):671-85.
118. Sági B, Maraghechi P, Urbán VS, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik G, Némét K, Monostori E, Góczy E, Uher F. (2012). Positional identity of murine mesenchymal stem cells resident in different organs is determined in the postsegmentation mesoderm. *Stem Cells Dev.* 21(5):814-28.
119. Leucht P, Kim JB, Amasha R, James AW, Girod S, Helms JA. (2008). Embryonic origin and Hox status determine progenitor cell fate during adult bone regeneration. *Development.* 135(17):2845-54.
120. Perin EC, Borow KM, Silva GV, DeMaria AN, Marroquin OC, Huang PP, Traverse JH, Krum H, Skerrett D, Zheng Y, Willerson JT, Itescu S, Henry TD. (2015). A Phase II Dose-Escalation Study of Allogeneic Mesenchymal Precursor Cells in Patients With Ischemic or Nonischemic Heart Failure. *Circ Res.* 117(6):576-84.
121. Bura A, Planat-Benard V, Bourin P, Silvestre JS, Gross F, Grolleau JL, Saint-Lebesse B, Peyrafitte JA, Fleury S, Gadelorge M, Taurand M, Dupuis-Coronas S, Leobon B, Casteilla L. (2014). Phase I trial: the use of autologous cultured adipose-

- derived stroma/stem cells to treat patients with non-revascularizable critical limb ischemia. *Cytotherapy*. 16(2):245-57.
122. Yang SS, Kim NR, Park KB, Do YS, Roh K, Kang KS, Kim DI. (2013). A phase I study of human cord blood-derived mesenchymal stem cell therapy in patients with peripheral arterial occlusive disease. *Int J Stem Cells*. 6(1):37-44.
123. Iohara K, Zheng L, Wake H, Ito M, Nabekura J, Wakita H, Nakamura H, Into T, Matsushita K, Nakashima M. (2008). A novel stem cell source for vasculogenesis in ischemia: subfraction of side population cells from dental pulp. *Stem Cells*. 26(9):2408-18.
124. Yeasmin S, Ceccarelli J, Vigen M, Carrion B, Putnam AJ, Tarle SA, Kaigler D. (2014). Stem cells derived from tooth periodontal ligament enhance functional angiogenesis by endothelial cells. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8):1188-96.
125. Iwasaki K, Komaki M, Yokoyama N, Tanaka Y, Taki A, Kimura Y, Takeda M, Oda S, Izumi Y, Morita I. (2013). Periodontal ligament stem cells possess the characteristics of pericytes. *J Periodontol*. 84(10):1425-33.
126. Pierantozzi E, Gava B, Manini I, Roviello F, Marotta G, Chiavarelli M, Sorrentino V. (2011). Pluripotency regulators in human mesenchymal stem cells: expression of NANOG but not of OCT-4 and SOX-2. *Stem Cells Dev*. 20(5):915-23.
127. Ali H, Al-Yatama MK, Abu-Farha M, Behbehani K, Al Madhoun A. (2015). Multi-lineage differentiation of human umbilical cord Wharton's Jelly Mesenchymal Stromal Cells mediates changes in the expression profile of stemness markers. *PLoS One*. 10(4):e0122465.
128. Rostovskaya M, Anastassiadis K. (2012). Differential expression of surface markers in mouse bone marrow mesenchymal stromal cell subpopulations with distinct lineage commitment. *PLoS One*. 7(12):e51221.

129. Gang EJ, Bosnakovski D, Figueiredo CA, Visser JW, Perlingeiro RC. (2007). SSEA-4 identifies mesenchymal stem cells from bone marrow. *Blood*. 109(4):1743-51.
130. He H, Nagamura-Inoue T, Tsunoda H, Yuzawa M, Yamamoto Y, Yorozu P, Agata H, Tojo A. (2014). Stage-specific embryonic antigen 4 in Wharton's jelly-derived mesenchymal stem cells is not a marker for proliferation and multipotency. *Tissue Eng Part A*. 20(7-8):1314-24.
131. Petriz J. (2013). Flow cytometry of the side population (SP). *Curr Protoc Cytom*. 9:9.23.
132. Huls M, Russel FG, Masereeuw R. (2009). The role of ATP binding cassette transporters in tissue defense and organ regeneration. *J Pharmacol Exp Ther*. 328:3-9.
133. Natarajan K, Xie Y, Baer MR, Ross DD. (2012). Role of breast cancer resistance protein (BCRP/ABCG2) in cancer drug resistance. *Biochem Pharmacol*. 83:1084-103.
134. Yao S, Pan F, Prpic V, Wise GE (2008). Differentiation of stem cells in the dental follicle. *J Dent Res*. 87:767-71.
135. Wang J, Wei X, Ling J, Huang Y, Gong Q, Huo Y. (2012). Identification and characterization of side population cells from adult human dental pulp after ischemic culture. *J Endod*. 38:1489-97.
136. Moshaverinia A, Chen C, Xu X, Akiyama K, Ansari S, Zadeh HH, Shi S (2014). Bone regeneration potential of stem cells derived from periodontal ligament or gingival tissue sources encapsulated in RGD-modified alginate scaffold. *Tissue Eng Part A*. 20:611-21.

137. Han J, Menicanin D, Marino V, Ge S, Mrozik K, Gronthos S, Bartold PM (2014). Assessment of the regenerative potential of allogeneic periodontal ligament stem cells in a rodent periodontal defect model. *J Periodontal Res.* 49:333-45.
138. Menicanin D, Mrozik KM, Wada N, Marino V, Shi S, Bartold PM, Gronthos S (2014). Periodontal-ligament-derived stem cells exhibit the capacity for long-term survival, self-renewal, and regeneration of multiple tissue types in vivo. *Stem Cells Dev.* 23:1001-11.
139. Nuñez J, Sanz-Blasco S, Vignoletti F, Muñoz F, Arzate H, Villalobos C, Nuñez L, Caffesse RG, Sanz M (2012). Periodontal regeneration following implantation of cementum and periodontal ligament-derived cells. *J Periodontal Res.* 47:33-44.
140. Seo B, Miura M, Sonoyama W, Coppe C, Stanyon R, Shi S (2005). Recovery of stem cells from cryopreserved periodontal ligament. *J Dent Res.* 84:907–912.
141. Du Y, Funderburgh ML, Mann MM, SundarRaj N, Funderburgh JL. (2005). Multipotent stem cells in human corneal stroma. *Stem Cells.* 23:1266-75.
142. El-Mekawy N, Fouad MM, El-Hawary YM, Al-Shahat MA, El-Gendy R. (2013). Scanning electron microscopy observations of osseointegration failures of dental implants that support mandibular overdentures. *Implant Dent.* 22(6):645-9.
143. Lavenus S, Pilet P, Guicheux J, Weiss P, Louarn G, Layrolle P. (2011). Behaviour of mesenchymal stem cells, fibroblasts and osteoblasts on smooth surfaces. *Acta Biomater.* 7:1525-34.
144. Herten M, Rothamel D, Schwarz F, Friesen K, Koegler G, Becker J. (2009). Surface- and nonsurface-dependent in vitro effects of bone substitutes on cell viability. *Clin Oral Investig.* 13:149-55.
145. Jafarian M, Eslaminejad MB, Khojasteh A, Mashhadi Abbas F, Dehghan MM, Hassanizadeh R, Houshmand B. (2008). Marrow-derived mesenchymal stem cells-directed bone regeneration in the dog mandible: a comparison between biphasic

- calcium phosphate and natural bone mineral. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 105:e14-24.
146. Oya K, Tanaka Y, Saito H, Kurashima K, Nogi K, Tsutsumi H, Tsutsumi Y, Doi H, Nomura N, Hanawa T. (2009). Calcification by MC3T3-E1 cells on RGD peptide immobilized on titanium through electrodeposited PEG. *Biomaterials.* 30:1281-6.
147. Hennessy KM, Clem WC, Phipps MC, Sawyer AA, Shaikh FM, Bellis SL. (2008). The effect of RGD peptides on osseointegration of hydroxyapatite biomaterials. *Biomaterials.* 29:3075-83.
148. Schliephake H, Scharnweber D, Dard M, Sewing A, Aref A, Roessler S. (2005). Functionalization of dental implant surfaces using adhesion molecules. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 73:88-96.
149. Stadlinger B, Pilling E, Huhle M, Khavkin E, Bierbaum S, Scharnweber D, Kuhlisch E, Eckelt U, Mai R. (2008). Suitability of differently designed matrix-based implant surface coatings: an animal study on bone formation. *J Biomed Mater Res B Appl Biomater.* 87:516-24.

10. Saját közlemények jegyzéke

Az értekezéshez kapcsolódó közlemények:

Szepesi Á, Matula Z, Szigeti A, Várady G, Szabó G, Uher F, Sarkadi B, Német K. (2015). ABCG2 is a selectable marker for enhanced multilineage differentiation potential in periodontal ligament stem cells. *Stem Cells Dev.* 24(2):244-52.

Tátrai P, Sági B, Szigeti A, Szepesi Á, Szabó I, Bősze S, Kristóf Z, Markó K, Szakács G, Urbán I, Mező G, Uher F, Német K. (2013). A novel cyclic RGD-containing peptide polymer improves serum-free adhesion of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells to bone implant surfaces. *J Mater Sci Mater Med.* 24(2):479-88.

Szepesi Á, Matula Z, Szigeti A, Várady G, Szalma J, Szabó G, Uher F, Sarkadi B, Német K. (2016). In vitro characterization of human mesenchymal stem cells isolated from different tissues with a potential to promote complex bone regeneration. (Közlés alatt.)

Az értekezéstől független közlemények:

Tátrai P, Szepesi Á, Matula Z, Szigeti A, Buchan G, Mádi A, Uher F, Német K. (2012). Combined introduction of Bmi-1 and hTERT immortalizes human adipose tissue-derived stromal cells with low risk of transformation. *Biochem Biophys Res Commun.* 422(1):28-35.

Nerada Z, Hegyi Z, Szepesi Á, Tóth S, Hegedüs C, Várady G, Matula Z, Homolya L, Sarkadi B, Telbisz Á. (2016). Application of fluorescent dye substrates for functional characterization of ABC multidrug transporters at a single cell level. (Közlés alatt.)

Matula Z, Nemeth A, Lőrincz P, Szepesi Á, Brozik A, Buzas EI, Low P, Nemet K, Uher F, Urban V. (2016). The role of extracellular vesicle and tunneling nanotube-mediated cross-talk between mesenchymal stem cells and T cells. (Közlés alatt.)

³⁸ADATLAP

a doktori értekezés nyilvánosságra hozatalához

I. A doktori értekezés adatai

A szerző neve: **Szepesi Áron**

MTMT-azonosító: **10035822**

A doktori értekezés címe és alcíme:

A szövetregenerációs felhasználás céljára alkalmas humán mesenchymalis őssejtek azonosítása, kiválogatása és in vitro vizsgálata

DOI-azonosító³⁹: **10.15476/ELTE.2016.051**

A doktori iskola neve: **ELTE Biológia Doktori Iskola**

A doktori iskolán belüli doktori program neve: **Immunológia oktatási program**

A témavezető neve és tudományos fokozata: **Német Katalin (PhD)**

A témavezető munkahelye: **Creative Cell Kft**

II. Nyilatkozatok

A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok, hogy a doktori fokozat megszerzését követően a doktori értekezésem és a tézisek nyilvánosságra kerüljenek az ELTE Digitális Intézményi Tudástárban. Felhatalmazom a Természettudományi Kar Tudományszervezési és Egyetemközi Kapcsolatok Osztályának ügyintézőjét, Bíró Évát, hogy az értekezést és a téziseket feltöltse az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba, és ennek során kitöltse a feltöltéshez szükséges nyilatkozatokat.

2. A doktori értekezés szerzőjeként kijelentem, hogy

a) az ELTE Digitális Intézményi Tudástárba feltöltendő doktori értekezés és a tézisek saját eredeti, önálló szellemi munkám és legjobb tudomásom szerint nem sértem vele senki szerzői jogait;

b) a doktori értekezés és a tézisek nyomtatott változatai és az elektronikus adathordozón benyújtott tartalmak (szöveg és ábrák) mindenben megegyeznek.

3. A doktori értekezés szerzőjeként hozzájárulok a doktori értekezés és a tézisek szövegének plágiumkereső adatbázisba helyezéséhez és plágiumellenőrző vizsgálatok lefuttatásához.

Kelt: Budapest, 2016. április 8.


.....
a doktori értekezés szerzőjének aláírása

³⁸ Beiktatta az Egyetemi Doktori Szabályzat módosításáról szóló CXXXIX/2014. (VI. 30.) Szen. sz. határozat.

Hatályos: 2014. VII.1. napjától.

³⁹ A kari hivatal ügyintézője tölti ki.

⁴¹ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell adni a tudományági doktori tanácshoz a szabadalmi, illetőleg oltalmi bejelentést tanúsító okiratot és a nyilvánosságra hozatal elhalasztása iránti kérelmet.

⁴² A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a minősített adatra vonatkozó közokiratot.

⁴³ A doktori értekezés benyújtásával egyidejűleg be kell nyújtani a mű kiadásáról szóló kiadói szerződést.