

PH.D. TÉZIS

**HUMÁN CORNEA HÁROMDIMENZIÓS
SZÖVETTENYÉSZTÉSE *EX VIVO* MÓDSZEREKKEL**

Szabó Júlia Dóra, M.D.

Témavezető:

Prof. Dr. Goran Petrovski

M.D., Ph.D., med. Habil.



**SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
SZEMÉSZETI KLINIKA
KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYI DOKTORI ISKOLA**

SZEGED, 2020

Bevezetés

A szaruhártya a szem elülső részét alkotó átlátszó, lamelláris szerkezetű szövet, mely az alábbi 5 rétegből áll (előlről hátrafelé haladva): epithelium, Bowman-membrán, stroma, Descemet-membrán, endothelium. A hám folyamatos megújulásra képes, melynek során a felszínen lévő sejtek lelökődnek és helyüket a periféria felől centripetálisan mozgó, a limbus basalis epitheliumából kiinduló sejtek veszik át. A limbus a corneosclerális határon elhelyezkedő, kb. 1,5-2 mm széles terület, mely radier irányú kriptákból és ún. Vogt-paliszádokból áll, melyekben a limbális őssejtek (LESC-ek) egy speciális mikrokörnyezetben, a limbális niche-ben helyezkednek el. A LESEC-ek olyan unipotens őssejtek, melyek relatív differenciálatlan állapotot tartanak fent a niche-ben, de magas proliferációs potenciállal rendelkeznek. Aszimmetrikus osztódás révén létrejött sejtek a centrum felé migrálnak, egyre jobban megközelítve a felszínt, míg végül elveszítik proliferációs képességüket és terminálisan differenciált centrális epitheliális sejtekké (CEC) válnak. Az őssejtek számának csökkenése vagy a mikrokörnyezetben bekövetkező zavarok fájdalmas epitheliális defektusokat, stromális hegesedést, corneális neovascularizációt, conjunctivalizációt okozhatnak, mely látás csökkenéséhez, végső esetben látásvesztéshez vezethet.

A limbális őssejt-elégtelenség (LESCD) kezelése a betegség súlyosságától függ: súlyos esetekben invazív beavatkozásra lehet szükség. Az egyik ilyen lehetőség az őssejtek grafftal való pótlása, mely származhat a beteg ellenoldali, egészséges szeméből vett limbális biopsziából, vagy allograftból, bár ez utóbbinál hátrányt jelent a donorhiány, valamint a szisztémás immunszuppresszió szükségessége. Autogén grafftok használatával jó eredményt lehet elérni, bár ez kétoldali esetekben nem alkalmazható ill. nagyobb méretű szövet átültetése esetén fennáll annak a kockázata, hogy az addig egészséges szemben is LESCD-et indukálunk. Ennek elkerülés érdekében kifejlesztettek egy *ex vivo* tenyésztési módszert, mellyel a betegből, hozzátartozójából vagy cadaver donorból származó kis méretű biopsziás mintát expandálhatják (CLET: cultured limbal epithelial cell therapy). A LESEC-ek kultivációjának segítésére különböző szintetikus vagy biológiai scaffoldot alkalmazhatnak, melyek elősegítik a sejtlemezek kialakulását, amelyeket azután az érintett szemekbe juttatnak. A leggyakrabban használt ilyen hordozó a humán amnionmembrán (HAM), mely amellett, hogy avasculáris szövet, anti-inflammatórikus és angiogenezist gátló tulajdonságokkal is bír. A LESEC-ek feeder-layeren

(tápláló sejtrétegen) való tenyésztése szintén elterjedt módszer, melyhez általában inaktivált egér eredetű 3T3 fibroblasztokat vesznek igénybe. Az elmúlt években az ezen a területen végzett számos kutatás ellenére a hosszú távon ex vivo tenyésztett LESC-ek jellegzetességeinek vizsgálatára még nem került sor.

A cornea stroma fő alkotóeleme a vízben gazdag extracelluláris mátrix (ECM), melynek legnagyobb részét lamellákba rendeződött I-es és V-ös típusú kollagén képezi. Ez a szabályos szerkezetű lemezes struktúra biztosítja a szaruhártya átlátszóságát. A centrális stromában található ún. cornea stroma eredetű mesenchymális őssejt-szerű sejtek (CSMSC-k) multipotens őssejtek, melyek képesek in vitro „trilineage” differenciációra, zsír-, csont- és porcszöveté alakulni, valamint keratocyták és idegi sejtek is létrejöhetnek belőlük. Bizonyos fokú immunosuppresszív tulajdonsággal is rendelkeznek, ami a helyi mikrokörnyezet immunológiai szabályzásában, a cornea stroma és epithelium regenerációjában betöltött fontos szerepére utalhat. Kimutatták, hogy a CSMSC-k expresszálják az MSC-k fontos markereit, ám negatívak a hematopoietikus sejtvonal és az aktivált sejtek markereire.

A Schnyder cornea dystrophia ((SCD), korábbi nevén Schnyder kristályos cornea dystrophia) egy ritka, öröklődő, progresszív betegség, melyben kétoldali, fokozódó subepitheliális homályok jelennek meg. A homályokat extra- és intracellulárisan elhelyezkedő kóros foszfolipid és koleszterin felhalmozódás okozza, az utóbbi a Bowmann-membránt is érintheti. A betegség előző elnevezésében szereplő kristályos szó azokra a sárgás-fehér, tű alakú depozitumokra utal, melyeket korábban szükségesnek tartottak a diagnózis felállításához. Mára bebizonyosodott, hogy a betegek csupán 50%-ában látható ez az elváltozás. Az SCD genetikai háttereként az 1 kromozómán (1p36.3) elhelyezkedő UBIAD1 (UbiA Prenyltransferase Domain Containing 1) gén mutációját írták le, mely egy koleszterin és foszfolipid metabolizmusban résztvevő fehérjét kódol. Jelenleg nem ismert olyan kezelés, mellyel a betegséget gyógyítani vagy a progressziót lassítani lehetne.

Elektronmikroszkópos vizsgálattal a szaruhártyák stromájában multilamelláris testeket (MLB) figyelhetünk meg. A kerek, 100-2400 µm átmérőjű vezikulumokat koncentrikus elrendezésű, elektron denz, lipoproteinben gazdag lamellák töltik ki. Az MLB képződés fiziológiás körülmények között is jelen van bizonyos sejtekben (pl surfactant termelő pneumocyták), de patológiás elváltozások (pl. lizoszómális tárolási betegségek) is vezethetnek kialakulásukhoz.

Képződésükről bebizonyosodott, hogy autofágiafüggő mechanizmus. Az autofágia során a cytoplazmában található, lebontásra ítélt anyagok lizoszómális degradációja történik, majd a bomlástermékek újrahasznosulnak. Elengedhetetlen a homeosztázis fenntartásához. Stressz hatására az autofágia upregulálódik, hogy megvédje a sejtet a lehetséges károsodásoktól. Az autofágiás vákuólumok (AV-k) és az MLB-k lizoszómális jellege hasonló kialakulási mechanizmusra utal. Az autofágia stimulálható éhezéssel és rapamicinnel (RAP), és gátolható 3-metiladeninnel (3-MA).

Célkitűzések

1. LESC-ek izolálása és hosszú távú tenyésztése scaffold vagy speciális felületkezelés alkalmazása nélkül, olyan tápfolyadékban, mely tápanyagforrásként csak szérumot tartalmaz.
2. A hosszú távon tenyésztett LESC-ek jellemzése morfológiai (fénymikroszkópia, transzmissziós elektronmikroszkóp (TEM)) és molekuláris biológiai (immunfluoreszcens festés, áramlási cytometria, viabilitás teszt) vizsgálatokkal.
3. Az ex vivo hosszú távon tenyésztett LESC-ek felszíni marker expressziójának összehasonlítása az ex vivo rövid távon tenyésztett LESC-ek markereinek vizsgálatával kapott korábbi eredményeivel.
4. CSMSC-k izolálása a cornea centrális részéből és hosszú távú tenyésztésük MLB képződés indukciójának céljából.
5. Az autofágia MLB képződésre kifejtett hatásának vizsgálata a hosszú távon tenyésztett CSMSC tenyészetekben.
6. A hosszú távú CSMSC tenyészetek SCD modellként való alkalmazási lehetőségének vizsgálata a betegség tanulmányozására.

Anyagok és módszerek

Szövetgyűjtés és sejtizolálás

Minden szövetgyűjtés a Helsinkii Deklarációban foglalt irányelveknek megfelelően, a Regionális Etikai Bizottság engedélyével (DEOEC RKEB/IKEB 3094/2010 és 14415/2013/EKU-183/2013) történt. A limbális és cornea szövetet cadaverekből izoláltuk, a halált követő 12-24 órán belül. A

LESC-ek izolálása során a limbus területéről felszínesen haladva téglalap alakú szövetrészeket preparáltunk lamelláló kés segítségével. CSMSC izoláláskor a cornea centrális részének lamelláló késsel való eltávolítása után, a kapott korongról lekapartuk a hámot és az endotheliumot. Az így megmaradt stromaszövetet ezután több apró darabra vágtuk.

Sejttenyésztés

A limbális graftokat 24-lyukú sejttenyésztő edénybe helyeztük, tetejükre viscoelasticus anyagot (ProVisc, Alcon) cseppentettünk a letapadás elősegítésére. Ezeket a sejteket 10% FCS-t (Sigma-Aldrich), 200mM/mL L-glutamint (Sigma-Aldrich) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldatot (PAA) tartalmazó DMEM (Sigma-Aldrich) tápfolyadékban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ mellett.

A cornea stroma graftokat 10% FCS-t (Sigma-Aldrich) és 1% antibiotikum-antimikotikum oldatot (PAA) tartalmazó alacsony glükóz tartalmú DMEM (Sigma-Aldrich) tápfolyadékban tenyésztettük 37°C-on, 5% CO₂ mellett, 24-lyukú sejttenyésztő edényben.

A médiumot mindkét esetben másnaponta cseréltük, passzázs nem történt. A sejttenyészeteket fáziskontraszt mikroszkóppal rendszeresen monitoroztuk.

Hosszú távú tenyésztés (>3 hónap) után a CSMSC kultúrákon autofágiát indukáló ill. gátló kezelést végeztünk. Az autofágia fokozását szérummegvonással (szérum mentes tápfolyadék használata) vagy rapamycin (RAP) (Sigma-Aldrich) kezeléssel (50nM), gátlását 3-methyladenin (3-MA) (Sigma-Aldrich) kezeléssel (10nM) idéztük elő, melynek időtartama mindhárom esetben 24 óra volt. Ezek után a membránt alkotó tenyészeteket csipesz segítségével gyűjtöttük be további vizsgálatok céljára. A tenyészetek átlagéletkora ekkor 239 ± 130 nap ($n = 3$) volt.

Életképesség vizsgálat és sterilitási teszt

A LESC tenyészetekben az élő sejtek számát CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability Assay segítségével ill. tripán-kék kizárási teszttel határoztuk meg. A tenyészetek Mycoplasma kontaminációjának kizárása céljából rendszeres ellenőrző vizsgálat történt (Mycoalert PLUS Mycoplasma Detection Kit, Lonza), melyet akkreditált mikrobiológiai laboratórium végzett (Debreceni Tudományegyetem).

Immunfluoreszcens festés

A begyűjtött és 4%-os PFA-ben fixált szöveteket paraffinba ágyztuk, metszettük, majd elsődleges- és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel jelöltük. Magfestéshez DAPI-t használtunk. A LESC minták jellemzésére összejt- (ABCG2, CK15, CK19, Vim), proliferációs- (p63 α , Ki-67), limbális epitheliális sejt- (CK8/18) és differenciált cornea epithelium sejt (CK3 and CK12) markereket használtunk. Az ECM összetételének elemzésére I-es, IV-es és V-ös típusú kollagén festést végeztünk. A CSMSC mintákban az autofágia jelenlétét ill. indukciójának/ gátlásának hatását microtubulus-asszociált protein 1 könnyű lánc 3 (LC3) és p62, más néven sequestosome 1 (SQSTM1) markerek használatával vizsgáltuk. A fluoreszcens képek ZEISS Axio Observer. Z1 és EVOS FL mikroszkóppal készültek. A felvételek elemzését Image J szoftver segítségével végeztük el.

LESC-ek immunfenotipizálása áramlási cytometriával

A LESC-ek sejtfelszíni fehérje expresszióját FITC, PE és APC fluorokrómmal konjugált antitesttel jelöltük CD47,CD90/Thy-1, CD117/c-kit, CD146/MCAM, CD166/ALCAM, CXCR4 (R&D) ellen. A minták lemérése FACS Calibur áramlási cytométerrel (BD Bioscience) történt, majd az eredményeket Flowing Software 2.5-tel (PerttuTerho) értékeltük ki.

Transzmissziós elektronmikroszkópia (TEM)

A TEM elemzéshez a LESC-eket frissen készített rögzítőoldatban (2% glutáraldehidet tartalmazó kakodilát-puffer (pH 7,4)) fixáltuk egy éjszakán át 4°C –on.

A CSMSC-eket frissen készített, 2.5% glutáraldehidet és 4% paraformaldehidet tartalmazó 0.2 M kakodilát pufferes rögzítőoldatban tároltuk 24 órán át, szobahőmérsékleten. Fixálás után PBS-ben tároltuk 4°C-on további feldolgozásig.

Mindkét fajta sejtet tartalmazó mintát 1%-os ozmium-tetroxidos utófixálást követően növekvő alkoholsorban dehidráltuk, végül Eponba (Electron Microscopy Sciences) ágyztuk be. A Leica Ultracut Ultramicrotommal készített ultravékony metszeteket uranil-acetáttal és ólom-citráttal festettük meg. A képeket Tecnai 12 transzmissziós elektronmikroszkóppal (Philips) készítettük.

Statisztikai vizsgálat

Egy adott markerre pozitív sejtek százalékos aránya három független vizsgáló által, egy látótérben számolt sejt alapján került meghatározásra. Az eredményeket átlag \pm SD vagy SEM formában adtuk meg. Minden vizsgálatot legalább háromszor ismételtünk meg és minden mintából három technikai párhuzamost képeztünk. A csoportok közötti statisztikailag szignifikáns különbséget Student-féle t-tesztel határoztuk meg és a $p \leq 0.05$ értéket tekintettük szignifikánsnak.

Eredmények

LESC –ek 3 dimenziós szövettényesztése

A limbális tenyészeteknél 5-7 nap után figyeltünk meg először sejteket az explantátumok szélénél fáziskontraszt mikroszkóppal, melyek 2 héten belül konfluens sejtréteget képeztek, majd a 4. hét végére többrétegű, 3 dimenziós szerkezetet hoztak létre. Hosszú távú kultiváció után az edény alját kitöltő, makroszkóposan is látható, vastag membrán alakult ki, mely csipesszel megragadva felemelhető.

A membránok immunfluoreszcens festése során különböző mintázatot figyeltünk meg az explantátumhoz közelebb és az explantátumtól távolabb eső területek között.

A differenciált cornea epitheliumra jellemző CK3 és CK12 markerek közül az előbbi negatív volt mindkét részen, míg az utóbbi esetében az explantátumhoz közel látott enyhe pozitívitás (18.1+1.6%) a távolabbi részek sejtjeiben még tovább csökkent (7.4+2.4%). CK19 festődés a sejtek 12.0+1.3%-ban volt megfigyelhető a graftokhoz közel és 20.3+2.7%-ban a graftoktól távol. Az ABCG2 putatív őssejt-marker expressziója 6.0+1.7% volt a proximalis és 9.8+2.0% a distalis területeken. A CK15 pluripotencia marker az explantátumokhoz közeli sejtek 15.6 \pm 2.5%-ában, míg a távoli sejtek 54.3 \pm 1.2%-ában volt detektálható. A sejtmagi p63 és a cytoplazmatikus Vim ko-lokalizációját láttuk a közeli sejtek 8.6+0.1% és a távoli sejtek 67.3+3.7%-ában. A Ki-67 proliferációs marker a sejtek 5,0 \pm 0,1% -ában mutatott pozitívitást. A kollagén I, IV és V markerek a membrán egész területén festődést mutattak. A sejtmagok DAPI-val való megfestése után látható vált, hogy a graftok gyakorlatilag sejtmentessé váltak, a belőlük kinövő sejtek az explantátumot körülvevő többrétegű ECM-beágyazódva helyezkedtek el.

A hosszú távú sejt kultúrák életképessége 90% feletti volt, hasonlóan a rövid távú tenyészetekhez. TEM vizsgálata látható volt a többrétegű ultrastruktúra ill. a sejtek között desmosomák voltak megfigyelhetők.

A hosszú távon tenyésztett LESC-k immunfenotípusát összehasonlítottuk a rövid távú LESC-k sejt felszíni marker expressziós profiljával. CD117 / c-kit (korai progenitor/ pluripotens őssejt marker) expresszióját ($0,6 \pm 0,1\%$) kifejeződésének vizsgálatkor a marker eltűnése volt megfigyelhető a hosszú távú kultúrában. A CD34-et nem expresszálták sem a hosszú távú, sem a rövid távú LESC-ek. Az őssejt vándorlás szabályozásában fontos szerepet játszó CXCR4 kemokin receptor expressziója $22,4 + 10,3\%$ volt a hosszú távú tenyészetekben, ám nem volt detektálható a rövid távúakban. A CD47 magas expressziója ($95,0 \pm 2,6\%$) mindkét sejt kultúrában az életképességét és immunkompetenciáját jelzi. A CD31 / platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM) egyik sejt típuson sem lehetett kimutatni, kizárva ezzel az endothelialis kontaminációt. A környező ECM-mel és más sejtekkel való kölcsönhatásban résztvevő sejt felszíni adhéziós molekulákban bekövetkezett változásokat vizsgálva kiderült, hogy a CD146 / MCAM ($45,0 \pm 63,0\%$) és a CD166 / ALCAM ($64,16 + 12,7\%$) expressziója jelentősen csökkent, míg a CD44 / homing-associated cell adhesion molecule (H-CAM) kifejeződése szignifikánsan növekedett ($73,4 \pm 3,1\%$) ($p < 0,001$) a hosszú távú LESC tenyészetekben.

SCD modellezése háromdimenziós humán corneal stroma eredetű szövet kultúrával

A CSMSC tenyészetekben a 2. héten jelentek meg fibroblast jellegű sejtek az explantátum szélénél, amik a 2.-3. hét során konfluens réteget hoztak létre, majd többrétegű válás után a 4.-5. hétre alakítottak ki 3D-s struktúrát. Immunfluoreszcens festéssel a *de novo* létrejött ECM depozíció volt megfigyelhető, mely a natív stromához hasonlóan I-es típusú kollagénből épült fel. TEM vizsgálattal nagy mennyiségű MLB képződés volt látható. RAP kezelés és szérummegvonás hatására a MLB-k expressziója növekedett, míg 3-MA kezelés hatására számuk csökkent. Az autofágia jelentését és változását az LC3 és p62 expressziójának fordított arányú növekedésével ill. csökkenésével bizonyítottuk immunfluoreszcens festéssel.

Megbeszélés

A mesterséges biológiai szövettervezés-, és előállítás (tissue engineering) az utóbbi évtizedek gyorsan fejlődő, nagy potenciálú tudományterülete, miközben az őssejtek felhasználási lehetősége is egyre szélesebb körben vizsgált a károsodott szövetek helyreállításával és újraformálásával foglalkozó regeneratív medicinában. A cornea felnőtt őssejtjeinek alkalmazása ígéretes lehet a szövetregeneráció és az őssejt-alapú betegségmodellezés területén. Munkánkban limbális szöveti explantátumból származó szövetkultúrákat több, mint 3 hónapon át tenyésztünk passzálás nélkül, melynek során nem használtunk scaffoldot, ill. médiumunk tápanyag-kiegészítőforrásként csupán szérumot tartalmazott. A hosszú távú tenyésztés során a sejtek transzparens, 3D-s, lemezszerű szerkezetet hoztak létre, melyet proteolitikus enzim alkalmazása nélkül, csipesszel való mechanikai manipulációval lehetett begyűjteni. A mikroszkópos morfológia az *in vivo* szerkezethez hasonló szabályos, többrétegű térbeli szerkezetet mutatott. A sejtek eltűnése az explantátumból arra utálhat, hogy a hosszú távú tenyésztés során a sejtek elhagyták a graftokat és a tenyésztőedényben vándorolva saját ECM-et hoztak létre. Ez az ECM főleg I-es típusú kollagénből állt, mely a cornea stromájának fő alkotórésze *in vivo*, ezért ez szövettervezés során saját termelésű scaffoldként alkalmazható lehetne. Ezenkívül V-ös típusú kollagén, valamint a bazálmembrán fontos komponense, a IV-es típusú kollagén szintézise is kimutatható volt tenyésztésünkben. Ez a szerkezet kiválthatja a biológiai vagy szintetikus eredetű scaffold ill. feeder-layer szükségességét a többrétegű, térbeli szerkezet eléréséhez, valamint kiküszöbölheti az immunreakciók létrejöttét azáltal, hogy szükségtelenné teszi az idegen eredetű, antigénitással rendelkező komponensek használatát. A TEM vizsgálattal a tenyésztetek ultrastruktúrájában dezmoszómák voltak kimutathatók, melyeket hozzájárulhatnak a szerkezet mechanikai szilárdságához.

Mivel nem ismert a LESC-ek azonosítására szolgáló definitív marker, vizsgálatunkban putatív őssejt markerek jelenlétének és a differenciált sejtekre jellemző markerek hiányának segítségével jellemeztük a tenyésztett sejteket. A differenciált epitheliális sejtekre jellemző CK3 és CK12 marker hiánya, ill. alacsony szintje arra utal, hogy a sejtek a hosszú távú kultiváció után is relatív differenciálatlan állapotban maradtak. Az ABCG2, CK15 és CK19 pozitív expressziója azt jelzi, hogy a sejtek egy kis mennyisége képes volt fenntartani az őssejt tulajdonságát a 3D-s környezetben. A limbális kriptákban elhelyezkedő sejtekre jellegzetes Vim magas kifejeződése a

graftok környezetében az explantátumok közelségével magyarázható, vagy más mátrix kapcsolatokra utalhat, valamint további bizonyítékkal szolgál a differenciálatlan progenitor sejtek jelenlétére. A Ki-67 sejtproliferációs marker graftoktól távoli sejtekben kimutatott alacsony expressziója bizonyítja, hogy a sejtek hosszú távú tenyésztés után is képesek voltak fenntartani egy alacsony fokú proliferációs képességet. Ismert, hogy a sejtmagi elhelyezkedésű p63 α , progenitor és putatív őssejt marker a limbális transzplantáció kimenetelének jó indikátora, mivel átültetés után jobb prognózist biztosít, ha ezen sejtek aránya több, mint 3%. A mintáinkban a graftok körül látott magas p63 expresszió ígéretes a klinikai alkalmazás szempontjából. A CD47 viabilitási és immunregulátoros marker expressziója a 3 hónapot meghaladó kultiváció után is magas volt, magas életképességet és a fagocitózis gátlását indikálva. A korai progenitor/pluripotens őssejt marker, a CD117/c-kit és a proliferáló sejteken kifejeződő kemokin receptor, a CXCR4 expressziója a megszűnt, ill. nagymértékben lecsökkent. Ennek a változásnak a lehetséges magyarázata az lehet, hogy a konfluencia és réteges szerkezet elérése után a tenyészetek további terjeszkedése korlátozottá vált.

A CD90/Thy-1 mesenchymalis/ epitheliális marker expressziója a hosszú távú tenyészetekben hétszeresére nőtt a rövid távú tenyészetekhez képest, mely a hosszabb idő során kialakult epitheliális sejtvonal irányába történő elköteleződést, vagy transzdifferentiálódási potenciál létrejöttét jelezheti.

A vizsgált sejtheadhéziós molekulák (CD44/HCAM, CD144/VE-Cadherin, CD146/MCAM and CD166/ALCAM) expressziójának változása a hosszú távú tenyészetekben a rövid távú kultúrákhoz képest a kialakult ECM létrejöttével magyarázható.

A tanulmány második felében CSMSC-k *ex vivo* hosszú távú tenyésztését vizsgáltuk. A CSMSC-k 3-4 hét elteltével spontán, az *in situ* cornea stromához hasonló, szabályos, többrétegű, 3D-s szöveti szerkezet létrehozására képesek. Az immunfluoreszcens vizsgálat során bebizonyosodott, hogy a *de novo* termelt ECM-et nagyrészt I-es típusú kollagén alkotja. A tenyészetek ultrastruktúrájának vizsgálata alátámasztotta a hosszú távú tenyésztés után intracellulárisan kialakuló MLB-k jelenlétét. Mintáinkban az MLB-k létrejöttéhez szükséges autofágia jelenlétét annak RAP és szérummegvonásos kezeléssel végzett indukciójával, ill. 3-MA kezeléssel előidézett gátlásával igazoltuk. Az autofágia markereit (p62 és LC3) immunfestéssel vizsgáltuk, változásuk a különböző kezelések hatására alátámasztotta az autofágia

szerepét a folyamatban. A TEM felvételek kimutatták, hogy az autofágia gátlás csökkenti az MLB-k számát és denz vakuólumok képződéséhez vezet, melyek lebontásra kerülnek, míg indukció esetén az MLB-k száma és mérete megnőtt. A CSMCS-k intracelluláris morfológiájában hosszú távú tenyésztés során létrejött változás az SCD-ben látottakhoz hasonló MLB felhalmozódást mutat, mely a jövőben a cornea stroma betegségek (beleértve az SCD) potenciális *ex vivo* modelljeként szolgálhat. Az autofágia gátlásával elért MLB képződés hatásos csökkentése újfajta eljárások kifejlesztéséhez vezethet a betegség kezelésében.

Összefoglalás

Munkánkban sikeresen izoláltunk és hosszú távon tenyésztettünk LESC-eket. Az explantátumból kinövő sejtek többrétegű, térbeli szerkezetet hoztak létre, melyben ECM anyagok szabályos jellegű deposíciója volt megfigyelhető. A transzparens membránt alkotó szövet mikroszipesszel könnyen manipulálható volt. A sejtek őssejtekre jellemző markereket expresszáltak, de epitheliális irányú elköteleződést is mutattak. A hosszú távú tenyésztést követően a migrációs és proliferációs potenciál csökkenését figyeltük meg. Összefoglalásként elmondható, hogy LESC-k hosszú távú tenyésztésével létrehoztunk egy olyan őssejtben gazdag, háromdimenziós sejt kultúrát, mely a jövőben alkalmas lehet szöveti tervezésre (tissue engineering) és esetleges klinikai alkalmazásra.

A hosszú időn át tenyésztett CSMSC kultúra alkalmas modell lehet az SCD pathogenezisének és kezelésének *ex vivo* tanulmányozására. Vizsgálatunkban a szaruhártya stromát utánzó, I-es típusú kollagénből álló szerkezetet hoztunk létre, valamint bebizonyítottuk, hogy a tenyésztés során létrejött MLB-k autofágia dependens folyamattal alakultak ki. Az autofágia gátlásával csökken az MLB-k képződése, mellyel lassíthatni lehetne az SCD-re jellemző progresszív transzparencia csökkenést, ami újfajta eljárások kifejlesztéséhez vezethet a betegség kezelésében.

Az értekezés alapját képező közlemények:

1. **Szabó DJ**, Noer A, Nagymihály R, Josifovska N, Andjelic S, Veréb Z, Facskó A, Moe MC, Petrovski G. **Long-Term Cultures of Human Cornea Limbal Explants Form 3D Structures Ex Vivo - Implications for Tissue Engineering and Clinical Applications.** *PLoS One.* 2015 Nov 18;10(11):e0143053. PMID: 26580800

IF (2015): 3.057

2. **Szabó DJ**, Nagymihály R, Veréb Z, Josifovska N, Noer A, Liskova P, Facskó A, Moe MC, Petrovski G. **Ex vivo 3D human corneal stroma model for Schnyder corneal dystrophy - role of autophagy in its pathogenesis and resolution.** *Histol Histopathol.* 2018 May;33(5):455-462. doi: 10.14670/HH-11-928. Epub 2017 Sep 5. PMID: 28872183.

IF (2017): 2.025

Köszönetnyilvánítás

Először is szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Petrovski Gorannak a sok támogatásért, motivációért és a türelméért, amit az elmúlt években nyújtott, valamint azokért a lehetőségekért, amiket a szakmai fejlődésem érdekében biztosított.

Szeretném megköszönni a Szemészeti Klinika előző tanszékvezetőjének, Prof. Dr. Facskó Andreának a lehetőséget, hogy a PhD kutatásaimat ebben az intézetben végezhettem, illetve a jelenlegi intézetvezető, Dr. Tóth-Molnár Edit támogatását.

Külön köszönettel tartozom az Óssejt- és Szemészeti Kutatólaboratórium munkatársainak, Dr. Veréb Zoltánnak, Dr. Natasha Josifovskának, Dr. Nagymihály Richárdnak, Dr. Albert Rékának, Dr. Luna Djirackornak, Dr. Szatmári-Tóth Máriának és Eszes Dórának a sok segítségért.

Végül, de nem utolsó sorban hálámat szeretném kifejezni a családomnak türelmükért és szeretetükért, mely nélkül e munka nem jöhetett volna létre.