

**DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI**

**Szaruhártya Stróma és Endothel Sejtek Izolálása,  
Tenyésztése és Fenotipizálása- 3 Dimenziós  
Szövettenyésztéshez és Transzplantációs Célokra**

**Nagymihály Richárd, M.Sc.**

Témavezető:

**Prof. Dr. Petrovski Goran**

MD, PhD, med. Habil



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

**SZEGED, 2017**

## **Szaruhártya Stróma és Endothel Sejtek Izolálása, Tenyésztése és Fenotipizálása- 3 Dimenziós Szövettenyésztéshez és Transzplantációs Célokra**

Nagymihály Richárd (M.Sc.)

Témavezető: Dr. med. habil Petrovski Goran, PhD

Szegedi Tudományegyetem, Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola, SzTE  
ÁOKSzemészeti Klinika

A szigorlati bizottság elnöke:

**Dr. Zarándi Márta, MTA**

(SzTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet)

Tagok:

**Dr. Csont Tamás, PhD**

(SzTE ÁOK Biokémiai Intézet)

**Dr. Deli Mária, MTA**

(MTA SZBK Biofizikai Intézet)

A bíráló bizottság elnöke:

**Dr. Mándi Yvette, MTA**

(SzTE ÁOK Orvosi Mikrobiológiai és  
Immunbiológiai Intézet)

Opponensek:

**Dr. Bata Zsuzsanna, MTA**

(SzTE ÁOK Bőrgyógyászati és Allergológiai  
Klinika)

**Dr. Csósz Éva, PhD**

(DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai  
Intézet)

Tagok:

**Dr. Fodor Mariann, PhD**

(DE KK Szemklinika)

**Dr. Csont Tamás**

(SzTE ÁOK Biokémiai Intézet)

**Dr. Zarándi Márta, MTA**

(SzTE ÁOK, Orvosi Vegytani Intézet)

## Bevezetés

Az emberi szem legkülső rétege a szaruhártya (cornea). A szövet avaskularitása és átlátszósága teszi lehetővé a látást, feladatai közé tartozik emellett, hogy a beérkező fényt megtörve, azt a retinára fókuszálja. Ezen felül mikrobák, egyéb patogének, a levegő által szállított káros kémiai anyagok és általános mechanikai behatások ellen szolgál védőpajzsként. A cornea átlagos átmérője kb. 11,5 mm és 0,5-0,7 mm vastagságú. Itt fiziológiás körülmények között nincsenek jelen erek, hanem a tápanyag a sejtekhez diffúzióval jut el a könnyrétegből a szemfelszín felől, illetve a hátsó irányból a csarnokvízből, amelyet a ciliáris test választ ki. Az oxigénfelvétel a levegőből történik. Kívülről befelé haladva, a szaruhártya 5 hivatalosan elismert nagyobb rétegre tagolódik, ebből a legkülső a cornea epithélium, mely 5-6 rétegnyi, gyorsan osztódó-, laphámsejtekből álló, el nem-szarusodó hám, egyben a szem külső védelmi vonala. A sejtek száma a pislogás miatt állandóan csökken, viszont az utánpótlás a mélyebb rétegekből, fiziológiás körülmények között, folyamatos. A következő réteg, egy sejtek nélküli, kollagénrostok által alkotott határfelület, a Bowman- tok, amely a strómát választja el az epithéliumtól.

A stróma a szaruhártya tömegének 90%-át alkotja. Ez egy rendkívül rugalmas réteg, amelyet víz, proteoglikánok és I-es típusú kollagén alkot. A szövet adja a szem fénytörő képességének 2/3-át. A strómában elszórtan quiescens (nyugvó) keratocyták találhatóak. Ezek a proteoglikánokat és kollagéneket szintetizálják, amely a szövetet felépíti. Ez a hálózat kb. 200 réteg, uniform vastagságú I. és V-ös típusú kollagénből áll. A szövet boltozatos alakja, stabilitása, mechanikai rugalmassága, speciális anatómai felépítése és az egymásra párhuzamosan elhelyezkedő lamellák miatt, a szövet teljesen átlátszó. A kollagénrostok átlagos átmérője 31 nm, az emberi szemben. A proteoglikánok- főleg keratin-, chondroitin- és dermatán- szulfát- a kollagénekhez kapcsolódik, mintegy hidakat létrehozva. A rostok az ínhártya (sclera) felé futnak tovább, ahol változik az elrendeződésük. A szaruhártya stróma az embriogenezis során a velősáncból (neurális crest) alakul ki, mely a fej mesenchymális szöveteinek fejlődéséért is felelős.

A strómához kapcsolódik egy újonnan feldezt membrán, a Dua réteg. Ennek létezése vitatott. Ez egy acelluláris határhártya, amely a strómát és Descemet membránt választja el. Az utóbbi réteg is minden bizonnyal acelluláris és a corneal endothéliumnak szolgál bazális membránként. Neve ellenére, a cornea endothéliumot nem klasszikus vaszkuláris endothél, viszont egymással szoros kapcsolatban álló, poligonális (hexagonális) laphámsejtek építik fel. A sejtek közvetlen kapcsolatban állnak a csarnokvízzel, ebből nyerik a tápanyagokat, és sejt felszíni pumpáik segítségével szabályozzák a stróma és az egész szaruhártya vízháztartását. Ez elengedhetetlen az átlátszóság fenntartásához.

Mivel a szaruhártya a szem legelülső rétege, rendkívül sérülékeny és védtelen külső behatások ellen, viszont kisebb sérülésekből képes komplikációk nélkül felépülni. A szemet érintő mélyebb sérülések esetén, és az ez által indított immunológiai folyamatok miatt, a látás veszélybe kerül és krónikus szaruhártya vakság alakulhat ki cornea homály miatt. A szemet érintő leggyakoribb elváltozás a pollenallergia, minimális bosszúságot okozva. A második leggyakoribb a száraz szem szindróma, amelyet főleg a légkondicionáló berendezések okoznak. A cornea akut gyulladással elváltozása, a keratitis, nem-fertőző és fertőző típusokra csoportosítható. Az első, főleg apró karcolások miatt alakulhat ki, míg az utóbbi általában kontaktlencse-viselés által előidézett mikrobiális fertőzések következménye. Antibakteriális vagy szteroid szemcseppekkel történő kezelése, eredményes.

A szaruhártya dystrophiák általában genetikailag örökölt betegségek, melyek mindkét szemet érintik. Ezek progresszív elváltozások, amelyek során cornea vakság alakulhat ki egy- vagy több réteg diszfunkciója miatt. Leggyakoribb a keratoconus, amikor a szaruhártya elvékonyodása miatt az előreboltosul, és a szövet kúp-alakot vesz fel, az elváltozás innen kapta a nevét. A pontos okok ismeretlenek, viszont a kezeléseknél köszönhetően a cornea általában felépül, ritkán az állapota romlik, és a látás sérülhet a hegesedés miatt. Végső esetben a szaruhártya transzplantáció jelenthet megoldást. A Fuchs dystrophia mindkét szemben kialakuló, főleg a nőket érintő, betegség. A cornea endothel sejtek száma csökken, majd egy bizonyos sűrűség alatt, a szövetben beáramló folyadék miatt lokális ödéma alakulhat ki veszélyeztetve a látást. Terápia során főleg az ödémát próbálják csökkenteni az orvosok, viszont súlyosabb esetekben a transzplantáció a megoldás. A „rácsos” (lattice) dystrophiában szenvedőknél, amyloid depozitumok jelennek meg a strómában. A felgyülemelő törmelék rácsos formát alkot és kárt okoz a stróma szerkezetében, gyakran az epithéliumot is érintve. A szaruhártya transzplantációja jelenthet megoldás a problémára, habár a betegség visszatérhet. Egyéb elváltozások is érinthetik a corneát, például Herpes Zoster fertőzés és reaktiváció (bárányhimlő után), vagy Herpes simplex vírus- 1 (HSV-1) fertőzés, amelynek szövődményei steril, nem- gyógyuló szaruhártya fekélyek, ezekből keratitis is kialakulhat. A súlyos cornea dystrophiák kezelése általában teljes vastagságú vagy lamelláris szaruhártya transzplantációval történik, viszont világszerte szövethiány van, 1 szaruhártya jut 70 betegre. A transzplantációk általában sikeresek, az esetek 5-30%-ban viszont van esély rejekciókra. Amennyiben a terápia nem eredményes, mert a beteg több szaruhártyát is kivetett, lehetőség van keratoprotézisek (Kpro) beültetésére. A sikeres eljárás ellenére, szövődmények kialakulhatnak, például glaucoma, diszlokáció, vagy a szövet lokális gyulladása.

Mivel a humán donorok száma nem elegendő, viszont a súlyosabb esetekben a transzplantáció az egyetlen megoldás, alternatívákra van szükség. A regeneratív orvoslás és a sejterápiás eljárások egyre népszerűbbek, ezek megoldást jelenthetnek a problémára. A kihívás abban rejlik, hogy a szaruhártyát felépítő sejtek rendkívül bonyolult és sokrétű feladatot látnak el. Az őssejtek általában képesek többféle sejtípusba differenciálni, attól függően, hogy milyen szövetben találhatóak. Embriionális őssejtek mellett, felnőtt mesenchymális és hematopoetikus őssejtek is léteznek. Az embriionális őssejtek használata vitatott, valamint követéses vizsgálatok bebizonyították, hogy azok hosszú távon daganatkeltő hatásúak lehetnek. Indukált pluripotens sejteket genetikai reprogramozással nyerhetünk, habár annak ellenére, hogy ezek a sejtek embriionális őssejtekhez hasonlóan bármivé képesek differenciálni, beültetésükkor képesek az immunrendszer aktiválására, valamint az újraprogramozás önmagában rizikót jelent a daganatos sejt kialakulására. Ezekkel ellentétben a felnőtt őssejteknel nem figyeltek meg daganatkeltő hatást, valamint a szövet regenerációja mellett a lokális őssejt populáció utánpótlásra is képes. Ezenfelül a felnőtt mesenchymális őssejtek (MSCk), az általuk kibocsájtott faktorok által, képesek immunszuppresszív hatás kifejtésére is. Hátrányuk, hogy csak bizonyos sejtípusokat tudnak létrehozni és önmegújító képességük is limitált. Világszerte folyik a kutatás őssejt terápiás- és szövetpótló eljárások kidolgozására, melyek gyakran laboratóriumi körülmények között létrehozott szövettel dolgoznak (tissue engineering), viszont ezek közül csak néhány jutott a klinikai kipróbálás fázisába.

### **Szaruhártya epithélium**

A cornea epithélium 5-6 réteg, szoros összefüggésben álló sejtéből áll, melyek bármely, a felszínt érintő sérülésre képesek gyors osztódással válaszolni. Számuk folyamatosan csökken a pislogás miatt, de a szaruhártya perifériáján, az epithélium bazális részén található limbusból, ún. őssejt „niche”-kből pótlódik. Ebben a szemhéjak által védett speciális mikro környezetben a szaruhártya epithélium progenitor sejtei, azaz a limbális epithél őssejtek (LESC) képesek

fenntartani differenciálatlan állapotukat, így fenntartva és megújítva az őssejt populációt. Ha az epithéliumot trauma éri, az LESCK centripetálisan a cornea középpontja felé kezdenek vándorolni, közben fokozatosan differenciálva, először tranziens amplifikálódó sejtekké (TAC), majd érett epithéliummá. Az LESCK-k -és egyéb őssejt- által alkalmazott asszimmetrikus osztódásnak, és a sejtek önmegújító képességének köszönhetően képesek teljesen regenerálni a szemfelszín, 12-24 óra alatt. Az LESCK elvesztése, különböző kemikáliák, sérülések, vagy betegség miatt, tönkreteszi a szaruhártya felszín regenerációs képességét. Ennek a folyamatnak során, mely limbális őssejt deficiencia (LSCD) néven ismert, a conjunctiva (kötőhártya) epithél sejtei kezdenek osztódni és vándorolni a cornea középpontja felé, így szaruhártya beereződését, neovaszkuarizációt, vakságot okoznak.

Limbális biopsziás autológ transzplantációja, a másik, egészséges szemből, illetve közeli családtagokból, kedvező terápiás eljárás és az elmúlt 25-30 évben 80%-ban sikerrel alkalmazták. LESCK-et kadaverekből eltávolított szövetből is kinyerhetünk transzplantációhoz, viszont ezek nem sikeresek hosszú távon, valamint szisztémás immunszuppresszió is szükséges. Az amnion membrán egy avaszkuláris szövet, születéseknél melléktermék, viszont anti-inflammatorikus és anti-angiogén tulajdonságokkal bír és széles körben használják limbális graftok fedésére, így csökkenve a szövetrejekció esélyét. A membrán önmagában is jótékony hatással van a részleges LSCD megelőzésében, kezelésében.

1997-ben első alkalommal ültettek be terápiás céllal limbális biopsziákból, *in vitro* tenyésztett sejteket, hosszú távú eredményességgel. Állati adalékoktól mentes médiumban is képesek proliferálni a sejtek, *in vitro*. Újabb tanulmányok szerint a LESCK implantációja a beteg szemébe kontaktlencsék segítségével jó prognózissal rendelkezik. Az ígéretes eredmények ellenére, a sikeres eljárások aránya 70%, valamint nem mindig elégségesek az optimális látás visszanyeréséhez. 2015-ben az Európai Bizottság (European Commission) először engedélyezte az első, őssejteket alkalmazó ún. „advanced therapy medicinal product” (ATMP, „élvonalbeli terápiás gyógyszert”)- forgalmazását, a Holoclar®-t, mely biopsziákból származó, *ex vivo* tenyésztett sejteket tartalmaz. Ez mérföldkő az okuláris regeneratív gyógyításban, viszont egyelőre csak a szemfelszíni, epithéliumot-érintő állapotok gyógyítására alkalmazható.

## **Szaruhártya stróma**

A stróma kifinomult szerkezetének, összetételének fenntartásáért a keratocyták felelősek. A sejtek dendritikus morfológiát vesznek fel *in vivo*, viszont sebgyógyulás során myofibroblastokká alakulhatnak, melyek hegszövetet választanak ki, így látásromlást okozva. Kadaverekből eltávolított strómából, szérumot tartalmazó médiumban tenyésztve adherens, egyenletesen proliferáló sejteket nyerhetünk. Érdekes módon, ezek a cornea strómából származó sejtek (CSC), MSCk által expresszált markereket hordoznak, *in vitro*. A sejtek pozitívak CD73, CD90, CD105, míg negatívak CD34, CD45, CD14, CD11b, CD79 $\alpha$ , CD19, HLA-DR sejt felszíni markerekre, adherensek műanyagra és képesek kanonikus „trilineage” differenciációra, zsír, porc- és csontszöveté alakulni, *in vitro*. Előbbi tulajdonságaiknak köszönhetően a sejtek megfelelnek az ISCT (International Society for Cellular Therapy), MSC-vel szemben támasztott követelményeinek, valamint a mesenchymális őssejteknel megfigyelt, anti-inflammatorikus citokinek kibocsátásával kifejtett, immunszuppresszív hatást is leírták már a CSCk-vel kapcsolatban. A CSCk előnyös hatását sejterápiás eljárásokban, állatkísérletekben is bizonyították. A sejtek pontos eredete nem ismert, illetve vitatott, de valószínűleg az izoláció során bizonyos populációk aktiválódnak és dominánssá válhatnak. Különböző médiumban tenyésztett CSCk különböző *in vitro* sejtfenotípusokat hoztak létre egy

kísérletben, valamint a szérumentes környezetben tenyésztett sejteknél visszaáll a keratococya állapot, viszont azok kevésbé viabilisak és nem választanak ki extracelluláris mátrixot (ECM).

A szaruhártya stróma kutatás legnehezebb feladata olyan, a stróma finomszerkezetét utánzó struktúra létrehozása, amely visszadja annak összetételét, elrendeződését. Szérumot tartalmazó médiumban tenyésztett CSCk ECM-et választanak ki a tenyésztőedénybe. 10% szérumot, valamint aszkorbinsavat tartalmazó médiumban növesztett sejtek olyan ECM-et választottak ki, amely szerkezeti, összetételbeli hasonlóságot mutatott a natív strómához, beleértve a kollagének, proteoglikánok jelenlétét és a sejtek apikális-bazális polarizációját. Transzformáló növekedési faktort (TGF)  $\beta 1$ -t és  $\beta 2$ -t médiumhoz adva, a sejtek fibrotikus-hegyszövet-szerű ECM struktúrákat hoztak létre, míg  $\beta 3$ -mal, normál, nem sérült ECM-et választottak ki a sejtek, hasonlóan a TGF mentes médiumban tenyésztett kontroll sejtekhez. A *de novo* szekretált kötőszöveti állománynak köszönhetően a CSC-nek nagy előnyük van a szöveteket alkalmazó biotechnológiai kutatásokban („tissue- engineering”), valamint esetleges klinikai felhasználás terén, habár ez az „*in vitro* előállított szövet” egyelőre nem teljes mértékben produkálja a natív cornea flexibilitását, mechanikai sajátságait. Ez vezetett újabb kutatásokhoz, ahol állatokból- származó szaruhártyákat decellularizálnak, majd emberi sejtekkel repopularizálják azokat, így csökkentve a xenotranszplantációból származó kilökődés esélyét.

A számtalan kutatás és eredmény ellenére, a kutatócsoportok világszerte más-más forrásból szerzik a szövetet (keratoplasztika műtétek után visszamaradt szövet, szövetbankok, halottas házak) és különböző módszereket alkalmaznak a sejtek kinyerésére. Még nem született olyan tanulmány, mely összehasonlította volna a különböző anatómiai régiókból, explantátum- vagy enzimes módszerrel előállított populációk fenotípusát, vagy a specifikus gének kifejeződését. A CSCk-kel kapcsolatban nem áll rendelkezésre annyi tanulmány, mint az LESCK-kel, ennek ellenére a CSCk rendkívüli adottsága kétségtelen és az MSCk jótékony hatása a állatkísérletes, szaruhártya rekonstrukciós beavatkozásokban már bizonyított, viszont a sejtek rutin klinikai, humán alkalmazásának esélye még csekély.

### **Szaruhártya endothélium**

A szaruhártya leghátsó rétege az endothélium, amely nem a klasszikus, vaszkuláris szövet, viszont szoros összefüggésben álló, laphámsejtek alkotják. Ezek feladata a cornea normál vízháztartásának biztosítása. Korábban azt gondolták, hogy a sejtek nem képesek proliferálni és a sejtek a mitózis  $G_1$  fázisában vannak megállítva és amikor egy sejt elhal, a szomszédos a citoplazmája megnagyobbodásával próbálja kitölteni az űrt. A korral, illetve betegségek miatt, ahogy az endothél sejtek száma csökken és elér egy kritikus számot, többlet víz áramlik a corneába, így ödémát, károsodást és látásromlást okoz. Újabb kutatási eredményeknek köszönhetően ma már tudjuk, hogy a réteg képes regenerálni kisebb defektusokat. Egy tanulmány feltételezett progenitor sejteket tartalmazó, tranziens zónát írt le a cornea endothélium és a trabekuláris hálózat határán, az ún. Schwalbe vonalon, melyből feltehetőleg mindkét képlet prekursorai származhatnak. Egy másik tanulmány szerint a perifériás endothéliumban mért nagyobb sejtűrűség egy megújult populációt jelent. Sebgyógyulások kísérletekben őssejt-szerű marker expressziót írtak le a réteg perifériáján, viszont egy hasonló tanulmány szerint ez csak az esetek 10%-ában volt megfigyelhető. Az eredmények még nem elég meggyőzőek, habár arra engednek következtetni, hogy az endothélium képes lassan, kisebb sérülésekből regenerálni, *in vivo*.

A cornea endothélium kutatások célja a sejtek *in vitro* tenyésztése és felszaporítása, viszont viabilis, homogén, stabil proliferációt mutató sejt kultúrák és reprodukálható

eredmények létrehozása az elmúlt 30 év óta nagy kihívásnak mutatkozik. A humán corneal endothél sejtek (HCEnC) képesek visszanyerni proliferációs képességüket, szérumban tartalmazó médiumban tenyésztve, morfológiai, funkcionalitásbeli változások árán, illetve az egyéb sejtípusokkal való szennyeződés is kockázati tényező. A sejtek *in vivo* poligonális (hexagonális) morfológiát mutatnak, míg tenyészetekben, hosszú távon egy polarizáltabb, hosszúkás forma mutatkozik. A folyamat epitheliális (endotheliális)- mesenchymális tranzícióként (EMT vagy EndoMT) ismert és a TGF  $\beta$ 2 regulálja, melynek során a sejtek mikrofilament rendszere átrendeződik. Néhány tanulmányban ún. rho kináz inhibitorokat (ROCK) alkalmaznak az EMT visszaszorítására, viszont ez csak időlegesen akadályozza a mikrofilament újrendeződést, és hatással van a sejtmotilitásra, proliferációra is. Léteznek sejtvonalak, viszont ezek közül egyik sem modellezi megfelelően az eredeti sejteket, genomikai tanulmányok szerint. Embriónális őssejtek képesek HCEnC-ké differenciálni és expresszálnak funkcionális markereket, például zonula occludens-1-et (ZO-1) és Na/K-ATPáz, viszont az embriónális sejtek használata etikai problémákba ütközik, így nem jelent megoldást hosszú távon, a klinikumban használható készítmények kifejlesztésében.

A sejtek izolációja során az endothéliumot az alatta található Descemet membránnal együtt távolítják el. Enzimikus eljárás során a sejtek leválnak a bazális membránról, majd egymástól is, így felbomlik a szoros kapcsolat. A már különvált sejtek előkezelt-felületű tenyészetödény aljára letapadva lassú proliferációba kezdenek és eleinte poligonális morfológiát mutatnak, majd megjelennek a hosszúkás sejtek, felhetőleg stróma-sejtes szennyeződés, vagy az EMT miatt. A CD166, glipikán-4 és a CD200 markerek használhatóak a tenyészet homogenitásának vizsgálatára, egy tanulmány pedig „szortolt” sejteket is karakterizált.

Egy majmokon végzett preklinikai tanulmány elégtelen eredménnyel zárult, amikor kollagén I-et tartalmazó lapocskákon ültettek be HCEnC-et. Egy másik klinikai tanulmányban 243 embert egy minimálisan invazív HCEnC szuszpenziót tartalmazó injekcióval kezeltek. Jelen tanulmányban, egy munkacsoportok által széleskörben használt módszerrel izoláltunk sejteket a humán cornea endothéliumból, majd karakterizáltuk a tenyészeteket bizonyos specifikus markerek, felszíni fehérjék és szénhidrátok/ glikokomplexek expressziója alapján, így egy pontosabb identifikációs, ujjlenyomatszerű panelt kívánunk létrehozni a sejtek egyszerűbb azonosításához, a tenyészetek homogenitásának meghatározásához.

A sejtek fehérje- és szénhidrát expressziójának homeosztázisa fontos és több folyamattal összefüggésben áll, például sejtadhézió, differenciáció, tumorigenezis és metasztázálás, tehát sejt állapotának, képességeinek jó indikátora. A tudománynak rengeteg tanulmányt kell még elvégezni ahhoz, hogy felállíthassuk a lehető legjobban optimalizált módszert a sejtek kinyeréséhez, tenyésztéséhez, hogy azokat biotechnológiai-, esetleg klinikai terápiás célokra lehessen felhasználni.

## A tanulmány céljai

1. Annak a vizsgálata, hogy a különböző izolációs módszerrel előállított CSCk eltérő populációkat eredményeznek-e.
2. Különböző módszerekkel, más anatómiai régiókból kinyert, tenyésztett CSC kultúrák karakterizálása specifikus, összejtszerű és sejtadhéziós markerek alapján.
3. Annak a vizsgálata, hogy a CSCk milyen változáson mennek keresztül, *ex vivo* tenyésztés során, funkcionális, összejtszerű, adhéziós és proliferációs gének és fehérjék expressziójának vizsgáltával, a natív állapothoz képest.
4. Humán szaruhártya endothéliumból kinyerhető sejtek tenyésztése és fenotípusos karakterizálása.
5. Különböző, CSCk és HCEnCk-vel összefüggésbe hozott markerek kifejeződésének vizsgálata.
6. HCEnCk sejtfelszíni fehérje és szénhidrát expressziójának vizsgálata, mintegy „ujjlenyomatot” létrehozva a sejtek könnyebb azonosításához, a sejt kultúra homogenitásának vizsgálatához.



## Módszerek

### Sejtizolálás és tenyésztés

A kadaverekből történő mintagyűjtés a Helsinki Deklaráció direktíváinak megfelelően történt és a magyar Egészségügyi Tudományos Tanács hagyta jóvá (14387/2013/EKU-182/2013). A mintákat a halál beállta utáni 24 órán belül gyűjtöttük. Miután a bulbusokat diszinfektáltuk, a szaruhártyát sebészi eszközökkel eltávolítottuk. Petri- csészékben a corneát lefelé fordítva, az endothéliumot a Descemet membránnal együtt elválasztottuk a strómától, majd kollagenáz enzimmel kezeltük 3 órán keresztül, amíg a sejtek a bazális membránról disszociáltak. A továbbiakban tripszinnel kezeltük a sejteket, hogy egymástól is teljesen elváljanak, majd fibronektinnel fedett tenyésztőedényekbe pipettáztuk a szuszpenziót. A visszamaradt szaruhártya elülső részét alaposan, de óvatosan megkapargattuk és mostuk, hogy eltávolítsuk a corneal epithéliumot. Egy trepán segítségével kis szöveteket lyukasztottunk ki a centrális és perifériás strómából, majd azokat direkt explantátum (CE és PE), vagy enzimes kezelés után (CD és PD) tenyésztettünk. Primer HCEnCk-et 5% FBS-t tartalmazó endothél médiumban tenyésztettük az első 2 napig, majd Ham's 12/M199 médiumra cseréltük ki, mely 5% FBS-t, 1% ITS-t, 10 ng/mL bFGF-et, 0,02 mg/mL aszkorbinsavat tartalmazott. Kontrollként egy kommerciális B4G12 cornea endothél sejt vonalat használtuk. A CSCk-et 10% FBS tartalmú DMEM, alacsony glükóz tartalmú médiumban tenyésztettük. A médiumot minden második nap cseréltük.

### RT-qPCR analízis

Totál RNS-t szaruhártya endothél, stróma és B4G12 sejtekből izoláltunk, az RNeasy kit gyártói utasítása szerint. RNS-t a natív szaruhártya strómából Qiazol reagenssel nyertünk ki (Qiagen). A reverz transzkripciót High Capacity cDNA Archive kittel (Applied Biosystems), Superscript III enzimmel és random hexamerek (Life Technologies) segítségével végeztük el. A sejt vonalból a amplifikációt Mx3005P PCR (Agilent Technologies) rendszerrel, míg a primer sejtekből szintetizált cDNS-t StepOnePlus (Applied Biosystems) rendszeren mértük és Taqman génexpressziós próbákat használtunk, *ALDH1A1*, *ABCG2*, *AQP1*, *CD31*, *CD34*, *CD73*, *CD90*, *claudin14*, *CXCR4*, *cytokeratin-19*, *ENG (CD105)*, *GPC4*, *ITGAV*, *ITGB4*, *KLF4*, *Nestin*, *Vimentin*, *ZO-1* génekre. A mérés során az első ciklus 95°C-on 10 percig, majd 95°C-on 40 ciklus 15 másodpercig, végül 60°C-on 1 percig tartott. Az eredmények analíziséhez a 2- $\Delta\Delta C_t$  módszert használtuk és különböző gének expresszióját relatív mennyiségként (RQ) adtuk meg. Minden mintát triplikátumban mértünk. *GAPDH* és *18S RNS* szolgáltak referenciagénként.

### Fluorescence-activated cell sorting (FACS) analízis

FACS módszerrel vizsgáltuk a HCEnCk és CSCk sejtefelszíni fehérje expresszióját. A tenyésztett sejtek begyűjtése után azokat három különböző fluorokrómmal (FITC, PE, APC) konjugált antitesttel jelöltük *ABCG2*, *CD31*, *CD34*, *CD44*, *CD47*, *CD49a*, *CD49d*, *CD51*, *CD54*, *CD73*, *CD90*, *CD105*, *CD106*, *CD112*, *CD146*, *CD166*, *CD325* és *Nestin* ellen. A mintákat lemérése FACS Calibur citométerrel (BD, Biosciences) történt, majd az eredményeket FCS Express 6 (De Novo Software) és Flowing Software 2.5-tel (Perttu Terho) értékeltük ki. A hierarchikus klaszter készítéséhez R software-t használtunk.

## **Immunfluorescens- és lektin festés**

Paraffinba ágyazott humán szaruhártyákból metszeteket készítettünk el, immunfestéshez. ABCG2, CXCR4, Nestin, Ki-67, ALDH1A1, Kollagén I, CD34, CD73, CD90, CD105, Vimentin, Fibronectin, Kollagén IV, VE-Cadherin,  $\alpha$ -aktinin, ABCG5 és anti-fibroblaszt markereket festettünk meg a teljes vastagságú szövetben. 5% BSA-PBS oldattal blokkoltuk a nem-specifikus kötőhelyeket, majd az előbb említett markerek elleni antitestekkel inkubáltuk a tárgylemezeket. Később, egy rövid mosás után, Alexa Fluor 488- konjugált másodlagos antitestekkel jelöltük a mintákat, majd magestéshez DAPI-t használtunk. A képeket Zeiss Axio Observer Z1 fluoreszcens mikroszkóppal készítettük. Primer HCEnCk-et speciális, 8-kamrás tárgylemezekben tenyésztettük, majd jelöltünk CD73, CD166, Kollagén I és IV, Na/K ATPáz, ZO-1 és Ki-67 ellenes antitestekkel, a fentiekben leírtakhoz hasonlóan. BX51 Olympus mikroszkóppal készítettünk felvételeket.

8-kamrás tárgylemezekben tenyésztett primer HCEnCk-et, FITC-cel konjugált lektinokkal is jelöltünk. Griffonia (bandeiraea) simplicifolia lektin I-et használtunk (GSL I) galaktóz és N-acetilgalatózaminok jelölésére, dolichos biflorus agglutinint (DBA), Peanut agglutininint (PNA), Ricinus communis agglutinin I-t (RCA 120), Soybean agglutininint (SBA), Phaseolus vulgaris erythroagglutininint (PHA E) és Phaseolus vulgaris leucoagglutininint (PHA L) galaktóz jelölésére, Concanavalin A-t (CON A), Lens culinaris agglutininint (LCA) és Pisum sativum agglutininint (PSA) mannóz és glükóz jelölésére, valamint fukóz és arabinózt pedig Ulex europaeus (UEA I) festettük. Wheat germ agglutinin (WGA) és a szukcinilált formája (sWGA) pedig a szialinsavat jelölte. A sejtmagot Hoechst 33342-vel festettük, képeket pedig EVOS® FL mikroszkóppal készítettük.

## **Statisztikai analízis**

Graphpad Prism 7, Microsoft Excel és SPSS programokkal végeztünk statisztikai számolásokat. Egyszempontos ANOVA-t, Student-féle t-próbát és Mann-Whitney U-tesztet használtunk a p-értékek meghatározásához. A  $<0.05$  értékeket tekintettünk szignifikánsnak ( $p<0,05$  \*;  $p<0,01$  \*\*). Az eredmények jelölése átlag  $\pm$  SD vagy SEM.

## Eredmények

### CSCk morfológiája és proliferációja

A CD és PD kultúrákból a sejtek azonnal, a tenyésztőedénybe történő szélesztés után láthatóvá váltak és konfluens réteget hoztak létre a következő 10-12 nap alatt, míg a CE és PE tenyészetek esetén a sejtek csak a 12-14. napon jelentek meg az explantátum széleinél, majd a 20-25. nap után hoztak létre konfluens réteget. A négy tenyészetben található sejtek között nem volt jelentős morfológiai különbség megfigyelhető. Mindegyik sejt kultúrában találtunk Ki-67 expressziót, az összes jelölt sejt közül ez  $4,21 \pm 1,53\%$ ,  $7,87 \pm 4,73\%$ ,  $8,60 \pm 4,58\%$  és  $10,95 \pm 4,42\%$  volt, CD, CE, PD és PE esetében. ( $p=0,43$ )

### A natív szaruhártya stróma immunfluoreszcens festése

ABCG2 és ABCG5 expressziót nem detektáltunk a natív szövetben, viszont az ALDH1A1,  $\alpha$ -aktinin, CD31 és CD34 pozitív volt a stróma egészében. A Kollagén I erős festődést mutatott a metszeteken, viszont Kollagén IV expressziót nem detektáltunk. CD73, CD90 és CD105, MSC marker pozitivitást nem figyeltünk meg, valamint a Ki-67, CXCR4 és Nestin is negatívak voltak. Vimentin expressziót láttunk, de Fibronektint nem. Egyéb, anti-fibroblaszt és VE-Cadherin markereket nem detektáltunk a natív szövetben.

### Tenyésztett CSCk FACS analízise

A tenyésztett sejteken a CD73, CD90 és CD105 expresszió magas értéket mutatott, viszont a négy kondíció között nem volt szignifikáns különbség. Az ABCG2 és Nestin expressziója is magas volt, viszont CD34 és CD31 nem volt detektálható a sejteken. CD51, CD49a, CD49d adhéziós molekulák és integrin-asszociált CD47 pozitív volt, de szignifikáns eltérést nem találtunk a különböző kondíciók között.

### Génexpresszió a natív szaruhártyában és tenyésztett cornea stróma sejtekben

A tenyésztett CSCk-ben CD73, CD90 és CD105 upregulációt figyeltünk meg a natív állapothoz képest. A Vimentin is upregulálódott a kultúrában, itt 18-szor magasabb értéket mértünk, mint a szövetben. A CD34 és CD31 esetében szignifikánsan expresszió csökkenést detektáltunk a sejt kultúrákban, a natív strómához képest. Az ALDH1A1 kifejeződése szintén csökkent a tenyésztett sejteken, viszont az ABCG2 upregulálódott, 60-szor magasabb értéket mértünk. A tenyésztett CSCk-ben szignifikánsan alacsonyabb expressziót mértünk AQP1, CXCR4, ITGB4, KLF4 gének esetében, viszont az ITGAV és Nestin upregulációt mutatott, a natív strómához képest. A GPC4 expressziója nem változott a tenyésztés során.

### A B4G12 sejt vonal és primer HCEnCk expressziójának hasonlítása CSCk-hez

A sejt vonalban 15-ször alacsonyabb Vimentin expressziót mértünk, a CSCk-hez képest. A CD90 13-szor-, a Cytokeratin-19 3-szor nagyobb mértékben fejeződött ki a CSCk-ben, a sejt vonalhoz képest. A Zonula Occludens (ZO-1) 2,2-szer nagyobb, a Claudin 14 pedig 10-szer nagyobb expressziót mutatott a B4G12 sejtekben. A sejt vonalhoz hasonlóan a primer HCEnCk-ben is alacsonyabb Vimentin expressziót mértünk, mint a CSCk-ben (3,1-szer kisebb). A CD90 gén kifejeződés 3,2-szer alacsonyabb, a Cytokeratin-19 7-szer alacsonyabb, a ZO-1 pedig 4,5-ször magasabb volt a primer HCEnCk-ben, a CSCk-hez képest.

## Sejtfelszíni fehérjék jelölése HCEnCk-en (IHC és FACS)

A primer HCEnCk citoplazmájában mérsékelt CD73 festődést figyeltünk meg. A CD166 is pozitív volt, főleg a citoplazma membránszélekhez közeli régiókban, csakúgy mint a Na/K-ATPáz. A ZO-1 nem volt detektálható a sejtek között részben, viszont a citoplazmában egy gyenge jel megfigyelhető volt. A Kollagén I és IV szintén a sejtek citoplazmájában volt látható. A sejtek egy része expresszálta a Ki-67 markert is. Primer cornea endothéliumból frissen izolált, tenyésztés nélküli sejteket is megjelöltünk FACS méréshez, kontrollként. A tenyésztett HCEnCk 89,32±1,35% expresszálta a CD73-at, míg a frissen izoláltak 16,34±23,74%. A primer sejtekben a CD90 expresszió alacsony, vagy negatív volt (7,16±4,46%), hasonlóan a frissen izolált sejtekhez (8,56±13,26%). A tenyésztett sejtek 49,52±17,26% volt pozitív CD105 markerre. A CD44 a tenyésztés- nélküli sejtek 6,68±2,44%-án volt mérhető és a primer HCEnCk 68,39±13,13% expresszálta. A CD47 jelen volt a tenyésztett sejtek többségén (89,12±1,92%), de a CD34 nem volt mérhető (0,13±0,13%). A HCEnCk 54,33±8,03% a CD54-et és 38,08±15,23% a CD106-ot expresszálta, nagy donorok- közti variabilitással. A primer tenyésztett sejtek 43,02±15,53% hordozta a CD146-ot, míg a frissen jelölt sejtek csupán 1,1±3,15%. A HCEnCk 77,73±2,17% expresszálta a CD112-t és két pozitív populáció volt megfigyelhető. A nem-tenyésztett, frissen izolált sejtek 20,20±11,47% mutatott detektálható CD166-ot, míg ez az érték a tenyésztett sejteknél 78,93±1,69% volt. A CD112-hez hasonlóan a CD325 is két pozitív populációt mutatott (69,61±7,08%). Hierarchikus klaszter analízissel összehasonlítva a HCEnC és CSCk-et, a két sejttípus két különböző klaszterbe került, az eltérő fenotípusokat jelölve.

## Primer HCEnCk sejtfelszíni szénhidrát mintázata lektinekkel jelölve

A sejtek expresszáltak terminális galaktóz molekulákat, a Ricinus communis agglutinin I (RCA) festődés alapján. A komplex galaktóz molekulákat Phaseolus vulgaris leucoagglutinin (PHA L) mutatta ki. A szukcinilált és nem- szukcinilált Wheat germ agglutinin (sWGA, WGA) is pozitív volt, dimer és trimer N-acetilgalactozaminokhoz kötődve. A mannóz és D- glükóz és polimerjei is pozitívak voltak, Lens culinaris agglutininnal (LCA), Phaseolus vulgaris erythroagglutininnal (PHA E), Pisum sativum agglutininnal (PSA) és Concanavalin A-val (CON A) kimutatva. N-acetilgalaktózamin monomerek nem voltak kimutathatóak Dolichos biflorus agglutininnal (DBA), Soybean agglutininnal (SBA), Griffonia (bandeiraea) simplicifolia lectin I-gyel (GSL I) a sejtek felszínén. Feltételezett epithél/ endothél markert, az L- fukózt nem detektáltuk Ulex europaeus-szal (UEA I), valamint a T- antigén jelölésére használt Peanut agglutinin (PNA) is negatív volt a HCEnCk-en.

## HCEnC viabilitás

A sejtkultúrák 81,84 ± 11,44% élő sejtet tartalmaztak, míg a nekrotikus sejtek aránya 26,55±15,79% volt, propidium jodiddal (PI) mérve. Annexin V-tel 4,27±5,94% apoptotikus, 5,5±4,23% szekunder/ kései apoptotikus sejtet detektáltunk (dupla pozitív sejtek). A tripánkék exklúziós módszerrel meghatározott viabilitás 80,01±11,92% élő sejtet mutatott a HCEnC kultúrákban.

## Diszkusszió

A világ jelen pillanatban szaruhártya-donorhiánnyal küzd. 1 donor jut 70 betegre, ez nagy problémát jelent, mivel a súlyosabb betegségeknél a transzplantáció az egyetlen kezelési lehetőség. A sejterápiás regeneratív sebészeti eljárások, laboratóriumi körülmények között előállított szöveteket mimikáló struktúrák megoldást jelenthetnek a jövőben a szövethiányra. A szaruhártyát felépítő sejtek azonban bonyolult feladatokat látnak el, mindegyik típus másként funkcionál. Az embrionális őssejtek gyakorlatilag pluripotensek, viszont hosszú távon tumorigén hatás figyeltek meg a használatukkor. Ezzel szemben a felnőtt mesenchymális sejteknél nem ismert ilyen hatás, és annak ellenére, hogy a sejtek csak limitált plaszticitással rendelkeznek, jótékony hatásukat számos tanulmányban bizonyították. Ezek közül a lefontosabb az anti-inflammatorikus, anti-angiogén képességük. A kutatások főleg keratoplasztika, lamelláris beavatkozások (DMEK, DSAEK) műtétek után visszamaradt szövetet használnak szaruhártya stróma sejtek izolálására, különböző módszerekkel. Nem volt eddig olyan tanulmány, mely összehasonlította volna, hogy az eltérő anatómiai régiókból származó, más módszerekkel kinyert és tenyésztett sejtek fenotípusát. Ez azért fontos, mert a tenyésztett CSCk megfelelnek az ISCT által, MSCk-nek támasztott követelményeknek és így nagy potenciállal rendelkeznek a jövőbeli, sejterápiás alkalmazások kidolgozásánál. Ebben a tanulmányban azt találtunk, hogy valószínűleg a humán szaruhártya stróma eltérő régióiból, emésztéses vagy explantátum módszerrel izolált sejtek fenotípusosan megegyeznek, azonos mértékben fejeződnek ki a specifikus, adhéziós, őssejt, proliferációs markerek, így a szövet bármely részéből kinyerhetőek, egyelőre kutatási célokra. A tenyésztett CSCk azonban jelentős változáson mennek keresztül, a fenotípus- és genotípus-beli változásokat figyelembe véve, a natív állapothoz képest, feltehetően a mikrokörnyezeti változások, illetve a szérumot tartalmazó médiumnak köszönhetően. Amíg néhány, a natív szövetben megtalálható specifikus, funkcionális marker expressziója csökken bizonyos, őssejtek által hordozott markerek szintje nő. Mivel a CSCk MSCk-re jellemző tulajdonságokat vesznek fel tenyésztés során, már nem tekinthetjük őket keratocytáknak és ezt figyelembe kell venni, kedvező képességeik mellett (zsír-, porc-, csontszövet létrehozása, immunszuppresszív hatás), valamint biztonságos használatuk humán terápiás alkalmazáshoz még bizonyításra vár.

Tenyésztett cornea endotheliumból izolált sejtek sejtfelszíni markereik és gének expressziója alapján jól definiálhatók és különböznek a stróma sejtektől. A primer szaruhártya endothel sejtek olyan markereket hordoznak, amelyek regenerálódó, integritásukat veszített szövetekkel asszociálhatóak. Az általunk használt és világszerte is széles körben alkalmazott módszerrel előállított HCEnC kultúrák valószínűleg nem tartalmaznak szennyező stróma sejteket, viszont azok feltételezhetően EMT-n mennek keresztül a tenyésztés során, bizonyos markerek elvesztése (ZO1) és megjelenése (CD44, CD73), valamint morfológiai változások alapján. Az kérdéses, hogy a funkciók visszafordíthatóak-e a környezet visszaállításával. Addig azonban a homogén kultúrák előállítása indukált pluripotens segítségével történhet, amíg egy optimalizált, standard és reprodukálható módszer, rendelkezésre nem áll.

Összeségében elmondható az, hogy a humán szaruhártya stróma és endothel rétegeiből izolált sejtek stabilan szaporíthatóak laboratóriumi körülmények között, és az általuk kifejezett gének és sejtfelszíni markerek alapján jelentős potenciállal rendelkeznek, mindezt számos kutatási eredmény alátámasztja. Fontos, hogy a jövőbeli kutatások célja olyan funkcionális, standardizált módszerekkel előállított sejtek előállítása, melyek terápiás alkalmazhatósága, biztonsága és biokompatibilitása kutatási eredményekkel alátámasztott és klinikai körülmények között alkalmazhatóak a szem elülső szegmensét érintő patológiás elváltozások gyógyítására.

## **A disszertációhoz felhasznált tanulmányok:**

### **1. Cultivation and characterisation of the surface markers and carbohydrate profile of human corneal endothelial cells.**

Nagymihály R, Veréb Z, Albert R, Sidney L, Dua H, Hopkinson A, Petrovski G.

*Clin Exp Ophthalmol*. 2017 July; Vol 45, Issue 5: 509-19. doi:10.1111/ceo.12903. [Epub 2017 Feb 14.], IF: 3.0

### **2. Effect of isolation technique and location on the phenotype of human corneal stroma-derived cells**

Richard Nagymihály, Zoltán Veréb, Andrea Facskó, Morten C. Moe, Goran Petrovski. *Stem Cells International, Special issue: "The Stem Cell Niche: Interactions between Stem Cells and Their Environment"*, 2017 Aug, IF: 3.54

**Disszertációhoz felhasznált publikációk IF: 6.54**

## **Köszönetnyilvánítás**

Szeretném hálámat kifejezni, témavezetőm, **Prof. Dr. Petrovski Goran** iránt, hogy segített és támogatott PhD tanulmányaim során, személyes dolgokat beleértve. Rengeteg lehetőséget biztosított a számomra és rajta keresztül a nemzetközi tudományos színtér vezető kutatóival is találkozhattam, megismerkedhettem.

Köszönettel tartozom, **Prof. Dr. Facskó Andreának**, az SzTE Szemészeti Klinikai vezetőjének is, hogy biztosította az intézeti háttérrel a tanulmányaim elvégzéséhez, a pénzügyi és kutatási támogatással egyetemben.

Köszönöm kollégáimnak és barátaimnak az ösztönzést és támogatást, hogy segítettek PhD tanulmányaim során, név szerint **Dr. Luna Djirackor, Dr. Albert Réka, Natasha Josifovska, Dr. Szabó Dóra** and **Dr. Veréb Zoltán**.

Végül, de nem utolsó sorban szeretném megköszönni a szüleimnek és családomnak a türelmet, támogatás és szeretet, amit feltétel nélkül adtak nekem, hogy azzá válhassak, aki ma vagyok.