

***Az irányított szövettervezés („tissue engineering”)
lehetséges gyógyászati alkalmazásainak vizsgálata***

Ph. D. értekezés tézisei

Dr. Zsedényi Ádám Kornél, DDS

Témavezetők:

Prof. Dr. Nagy Katalin, DDS, Ph.D.

Dr. Buzás Krisztina, Ph. D.



***Szegedi Tudományegyetem
Fogorvostudományi kar
Szeged
2017***

Közlemények listája:

- **A tézis alapjául szolgáló közlemények:**

1. Excimer Laser-produced Biodegradable Photopolymer Scaffolds Do Not Induce Immune Rejection *In Vivo*

Balazs Farkas*, **Adam Zsedenyi***, Edina Gyukity-Sebestyen, Ilaria Romano, Katalin Nagy, Alberto Diaspro, Fernando Brandi, Krisztina Buzas and Szabolcs Beke
JLMN-Journal of Laser Micro/Nanoengineering Vol. 10, No. 1, 2015
IF:0.66 (2015) Q2

*Megosztott első szerző

2. Gold nanoparticle-filled biodegradable photopolymer scaffolds induced muscle remodeling: *in vitro* and *in vivo* findings

Adam Zsedenyi, Balazs Farkas, Gaser N. Abdelrasoul, Ilaria Romano, Edina Gyukity-Sebestyen, Katalin Nagy, Maria Harmati, Gabriella Dobra, Sandor Kormondi, Gabor Decsi, Istvan Balazs Nemeth, Alberto Diaspro, Fernando Brandi, Szabolcs Beke, Krisztina Buzas

Materials Science Engineering C Materials for Biological Applications 72, 625-630.2016
Dec 02

IF: 3.420 (2016) Q1

- **További közlemények:**

3. Role of epigenetics in EBV regulation and pathogenesis

Niller, H. H., Tarnai, Z., Decsi, G., **Zsedényi, Á.**, Bánáti, F., & Minarovits, J. (2014).

Future microbiology, 9(6), 747-756

IF: 3.374 (2014), Q1

Kumulatív Impakt Faktor: 7.454

Tartalomjegyzék

Közlemények listája:.....	2
I. Bevezetés.....	4
II. Célkitűzéseink.....	7
III. Anyag és Módszer.....	8
IV. Eredmények.....	9
V. Diskusszió.....	11
VI. Konklúzió.....	12
VII. Az megvalósított célkitűzéseink összefoglalása:.....	13
VIII. Köszönetnyilvánítás.....	14

I. Bevezetés

A regeneratív orvoslás célja, hogy működő szövetet tudjon teremteni az elveszett szövet vagy szerv helyreállítására. Az öregedés, különböző betegségek és veleszületett fejlődési rendellenességek eredményezhetnek olyan állapotokat, ami a betegek életminőség csökkenéséhez vezetnek. A helyreállító medicina rendkívül gyorsan fejlődik, célja az egyénre szabott kezelések kidolgozása, minél kevesebb szövődménnyel. A helyreállító medicina legfontosabb bástyái az irányított szövettervezés vagy szöveti sebészet (továbbiakban az eredeti angol terminológia szerint „tissue engineering”), a bioanyagok és az őssejt terápia.

A tissue engineering interdiszciplináris terület, mely a műszaki tudományok alapjait és az élettudományokat ötvözi, hogy helyreállítsa, karbantartsa vagy fejlessze a szöveti funkciókat. A tissue engineering folyamat szükségessé tesz i) egy precízen megtervezett mikrokörnyezetet, támasztó struktúrát, melyet scaffoldnak nevezünk ii) sejt kultúrát és iii) kiemelkedő sebészi képzettséget. Ennek a komplex feladatnak a megoldását kizárólag a természettudományok több területének, fizika, anyagtan, kémia, biológia, genetika, orvostudományok, azon belül is az immunológia ötvözése segítheti. Minden tudományos szakterületnek megvan a jól körülhatárolt szerepe ebben a folyamatban, ebből is látszik a szakterület összetettsége.

A regeneratív orvoslás hajnalán az élő szövet volt az első választás a sérült terület helyreállításánál. A szövetpótlásnak ezt a formáját 'graft'-nak nevezzük. A mai napig használunk autológ szövetet, bár a pácienseket ez jobban megviseli, hisz a donorszövet kinyerése miatt a műtéti terhelés nagyobb. A bioanyagok fejlődése új utat nyitott a tissue engineering számára, alternatívát kínálva a graftokra épülő regeneratív orvoslás mellett, helyett.

A bioanyagok első definícióját 1976-ban az Európai Bioanyag Társaság konferenciáján határozták meg a következőképpen: „egy élettelen anyag orvostechikai eszköz részeként biológiai rendszerekkel szándékozik kölcsönhatásba lépni”. A jelenlegi definíció pedig így szól: „egy anyag mely biológiai rendszerekkel lép kapcsolatba, hogy értékelje, kezelje,

augmentálja vagy helyettesítse a test bármely szövetét, szervét vagy működését”. Már a két definíció is megmutatja hogyan változott a bioanyagok szerepe.

A bioanyagok osztályozása legtöbbször az összetételük alapján történik:

A *fémeket* már a késői 18. század óta használják az orvoslásban bioanyagként. A csontok fixálásához aranyat, ezüstöt, platinát alkalmaztak, de már az ókori Egyiptomban is használtak aranyat a fogpótlások készítéséhez.

A *kerámiákat* fogászatban egyre szélesebb körben használják, korábban az ortopédiában is fontos szerepet töltek be.

A *kompozitok* olyan bioanyagok, melyek két- vagy több különböző szerkezetű, különböző mérettartományú, makro-, mikro- vagy nanoméretű részecskékből épülnek fel. Ezekkel az eltérő anyagkombinációkkal lehetőség nyílik a kompozitok előnyös tulajdonságai kiemelésére, illetve hátrányos tulajdonságaik tompítására. Legelterjedtebb orvosi alkalmazásai a (1) fogászati tömőanyagok, (2) csont és cement helyettesítés, (3) ortopédiai implantátumok.

A szintetikus *Polimer bioanyagokat* széles körben használják az egészségügyben, a fogászattól, az általános orvosláson át, a gyógyszeriparig. Nagy előnyük az alakíthatóság, alacsony ár, elérhetőség és a személyre szabható mechanikai és fizikai tulajdonságaik.

Az utóbbi évtizedben jelentősen megnőtt az érdeklődés a *Biológiai úton lebomló polimerek* iránt. Környezetbarát polimerek a szervezetbe ültetve nem váltanak ki krónikus idegentest reakciókat, valamint a tissue engineering-hez kapcsolódó kutatásokban új horizontot nyitottak a scaffold készítés témakörében.

A biológiai úton lebomló polimereknek a következő feltételeknek kell megfelelniük:

(i) Megfelelő *biokompatibilis* környezetet szükséges teremteniük, hogy a sejtek a scaffoldok felületére és a pórusokba tudjanak migrálni, majd ott tudjanak funkcionálni. A beültetés után bármilyen immunreakció és kilökődés lehetőségét minimalizálni kell.

(ii) *Biodegradabilitás*. Az ideiglenesen beültetett bioinert scaffoldok helyét egy idő után a sejtek, szövetek teljesen átveszik. A bomlástermékek természetes úton kiürülnek a szervezetből.

(iii) A scaffoldok *mechanikai tulajdonságainak* a célszövetéhez szükséges hasonlítaniuk. Könnyen kezelhetőnek kell lenniük és az egész gyógyulási folyamat végéig meg kell tartaniuk ezen tulajdonságaikat.

(iv) A *scaffold szerkezete* sem kevésbé fontos: a pórusos szerkezeti struktúra alapvető követelmény, hogy a celluláris penetrációt és a megfelelő tápanyag eloszlást biztosítani tudjuk.

A scaffold gyártása legyen alapvetően gyors, megbízható és olcsó. A klinikusok előnyben részesítik a kész termékeket, emellett nagyon fontos a folyamatos elérhetőség és szállítás.

A harmadik „bástya” az őssejt terápia. Az őssejtek legfontosabb tulajdonsága a pluri- vagy multipotencia, vagyis hogy többféle típusú sejté képesek differenciálódni. Mesenchimális őssejteket nyerhetünk csontvelőből (Bone Marrow Derived Stem Cells - BMSC), ennek az eljárásnak viszont komoly hátrányai vannak. Ilyen hátrányok a korlátozottan kinyerhető sejtmennyiség, az invazív beavatkozással járó fájdalom és komplikációk lehetősége, amelyek mind nehezítik az eljárást.

A zsírszövetből nyert őssejtek (Adipose tissue-derived stromal/stem cells - ASC) 2001 óta kerültek az őssejt-terápiás kísérletek középpontjába. Viszonylag egyszerűen, zsírleszívással, könnyen és megismételhetően tudunk az emberi szervezetből osteoblasztá és myocytává differenciálódni képes őssejteket nyerni. A sejthozam magasabb, mint a csontvelő esetében és az eljárás is jóval kíméletesebb a páciens számára. A BMSC és az ASC is hasonló tulajdonságokkal rendelkezik (adherens, fibroblast típusú sejtek). A proliferatív kapacitás és az öregedés szempontjából is az ASC jobb választás, valamint *in vitro* hosszabb ideig eltartható stabil proliferációs rátával. Az ASC ráadásul magasabb oszteogénikus potenciállal rendelkezik, ezért a „tissue engineering” felhasználás céljából *in vitro* és *in vivo* is jobb választásnak bizonyul a BMSC-nél.

II. Célkitűzéseink

Fő célkitűzésünk az volt, hogy egy innovatív módszert dolgozzunk ki a regeneratív orvoslás területéhez kapcsolódva. *In vitro* and *in vivo* kísérletekben a sztereolitografikusan gyártott biopolimer scaffoldokkal a következő céljaink voltak:

1. Biopolimer scaffoldok sejtenyésztésre való alkalmasságának vizsgálata.
2. A 'scaffold-sejt' rendszer sikeres átvitele, beültetése *in vivo* környezetbe.
3. A 'scaffold-sejt' rendszer biodegradabilitásának és biokompatibilitásának vizsgálata *in vivo* körülmények között.
4. A scaffold összetételének optimalizálása őssejtek számára.
5. Szöveti növekedés vizsgálata arany nanorészecske tartalmú poli(propilén-fumarát):dietylén fumarát (PPF:DEF) scaffoldokon.
6. Az 'őssejt-scaffold' struktúra tanulmányozása *in vivo* környezetben.

III. Anyag és Módszer

III.1. Biodegradábilis polimer scaffoldok

A scaffoldokat Maszk Projekciós Excimer lézer SztereoLitografikus (MPEXSL) rendszerrel készítettük. A metódus rétegzéses technológiával valósult meg, ahol a rétegeket pulzáló excimer lézer besugárással készítettük. A scaffoldok rezinből és fotoiniciátorból készültek.

A PPF biodegradábilis, fényre kötő bioanyag, egy lineáris poliészter telítetlen gerinccel, ami lehetővé teszi a keresztkötéseket, és a degradációt. A sztereolitográfiához megfelelő viszkozitás elérése érdekében dietil fumaráttal (DEF) hígítottuk. Irgacure 819 vagy Bis(2,4,6-trimetilbenzoil)-fenilfosfinoxid ún. „BaPO”-t használtunk a PPF:DEF fotoiniciátorként. Nanorészecskéket is integráltunk a rezinbe. Könnyen előállítható arany nanorészecskéket választottunk, mert ezek ideálisak gyógyszer és növekedési faktor szállítására, akár csak DNS adhézióra.

III.2. Biológiai kísérletek

Az *in vivo* and *in vitro* tesztekhez 5 mm átmérőjű és 100 µm vastag scaffoldokat készítettünk 200 µm átmérőjű pórusokkal. Két féle 200 µm pórusméretű PPF:DEF scaffoldot használtunk. A rezin egyik típusa 5.52 µM arany nanorészecskéket tartalmazott, a másik rezinben nem volt nanorészecske töltés.

Három féle sejtet teszteltünk. K7M2 egér osteoszarkóma sejt vonalat (Dennis Klinman, NCI-Frederick, MD, USA), RAW 264.7 rágszáló makrofág sejt vonalat (Sigma-91062702) és elsődleges autológ zsírszövetből származó őssejtet (ASC). ASC-eket 4-6 hetes Balb/c hím egerekből nyertük (Charles River Laboratories International, Inc.).

Az *in vitro* kísérletekben a sejtes scaffoldokat pásztázó elektron mikroszkóppal (SEM), és konfokális mikroszkóppal vizsgáltuk.

Az *in vivo* kísérletekben K7M2 egér osteoszarkóma sejt vonal sejteteket növesztettünk a scaffoldokra. A sikeres implantáció után a sejtek jelenlétét szövettani vizsgálattal igazoltuk.

Az ASC-k sikeres implantációját szintén szövettani vizsgálattal bizonyítottuk. Minden állatkísérletet a nemzeti (1998. XXVIII; 40/2013) és az európai (2010/63/EU) állatetikai irányelveknek megfelelően végeztünk. A kísérleti protokollokat jóváhagyta az Állatkísérleti Tudományos Etikai Tanács és az MTA Osztályközi Állatkísérleti Tudományos Bizottsága (engedélyszám: XVI./ 03521/2011.).

A beültetett bioanyagok által okozott lehetséges gyulladási reakciókat citokin és kemokin profilozás útján monitoroztuk.

Fluoreszcens *in situ* hibridizációval is vizsgáltuk a mintákat (FISH). Ez egy molekuláris diagnosztikai technológia, gének vagy speciális szekvenciák detektálására.

A kísérletes munkákhoz pénzügyi forrást biztosítottak a Nemzeti Kutatási Fejlesztési és Innovációs Alap K112493 számú programja és a GINOP 2.3.2.-15-2016-00015 pályázatok.

IV. Eredmények

1. K7M2 sejteket sikeresen ültettünk a biopolimer scaffoldokra.

14 nap inkubáció után fluoreszcens mikroszkópos képeket készítettünk a scaffoldokról és a rajtuk lévő Tomato vörössel transzfektált sejtekről. A mikroszkópos felvételek igazolták az életképes sejtek megtapadását a scaffold pórusaihoz. Ezzel bizonyítottuk, hogy a scaffoldjaink alkalmasak életképes sejtekkel kialakítani egy irányított szöveti környezetet.

2. K7M2 sejtekkel kolonizált scaffoldokat sikeresen ültettünk be *in vivo* környezetbe. Nem tapasztaltunk erőteljes immunreakciót, kilökődést.

14 nappal az implantáció után, a műtéti területet, az egerek hátbőrét eltávolítottuk és vérmintákat gyűjtöttünk. Egy kisméretű nodulus volt látható mindegyik K7M2 sejtekkel oltott scaffolddal implantált egér esetében. Seb, gyulladás, vérzés vagy fekélyesedés egy esetben sem volt megfigyelhető. A kísérleti állatokon nem volt megfigyelhető hőemelkedés, fájdalom, vakarózás, egyéb bőrtünet, illetve egyéb szisztémás vagy lokális tünet, mellékhatás.

A vérmintákat citokin és kemokin profilozással vizsgáltuk. A tumor sejtessel scaffolddal implantált és a kontroll csoport között nem volt szignifikáns különbség a szérumok citokin

illetve kemokin profiljai között. Egyik csoport sem mutatott emelkedett proinflammatorikus citokin vagy kemokin szintet.

A szövettani vizsgálattal nem találtunk gyulladásra vagy kilökődésre utaló jeleket és visszamaradt biopolimer darabot sem a műtéti területen. A tumor sejttel kolonizált scaffoldokkal implantált egerek esetében életképes anaplasztikus szarkomatózus tumor sejteket találtunk.

3. Arany nanorészecskékkel töltött scaffoldok a nanorészecskékkel nem töltött scaffoldokhoz képest elősegítették az őssejtek tapadását és életképességét.

In vitro kísérletekben a makrofágok, melyek magas adherenciával bírnak, sikeresen kolonizálták a scaffoldok felszínét, és adherenciájuk foka nem mutatott különbséget a nanorészecskékkel töltött és nem töltött scaffoldok esetében. A jóval érzékenyebb ASC-k adherenciáját viszont befolyásolta a scaffoldok aranynanorészecske töltése. A nanorészecske-mentes scaffoldok esetében az ASCk nem mutattak kitapadási hajlamot és megfelelő proliferációt a scaffold felületén, a sejtek aggregálódtak a pórusok közepén, míg az arany nanorészecskékkel töltött scaffoldok esetében az őssejtek optimális mértékben és eloszlásban tapadtak ki a scaffoldok felszínéhez.

4. Az őssejtekkel oltott scaffoldok izomregenerációt indukáltak *in vivo*.

A nőstény kísérleti állat hátbőre alá beültetett scaffoldok területén Y kromoszómát is hordozó, fúziós sejteket mutattunk ki. Mivel az ASC-k hím egerekből származtak, ez az eredmény egyértelműen igazolta, hogy a hím egerekből származó őssejtekkel kolonizált scaffoldok idézték elő a szöveti regenerációt, legnagyobb valószínűség szerint a mesenchimális stromális sejtek és az ASCk regeneratív fúziója következményeképpen. Ebből arra következtetünk, hogy a biopolimerek ASC-vel együtt alkalmazva, megfelelő szöveti környezetben, szövet-helyreállítást eredményezhetnek.

V. Diszkusszió

Kísérleteink első szakaszában a tissue engineering scaffoldok alapvető tulajdonságait tanulmányoztuk. Arra fókuszáltunk, vajon kísérletes biológiai rendszerekben meg tud-e felelni az általunk alkalmazott anyag azoknak az alapvető követelményeknek, amelyek meghatározzák a felhasználhatóság lehetőségeit és korlátait. Ezen célok megvalósítása érdekében sejtadhéziót, biokompatibilitást és biodegradabilitást vizsgáltunk. Az általunk alkalmazott anyagot először Kasper és munkatársai írták le 2009-ben. Tissue engineering scaffoldjaink PPF:DEF összetételű polimerből készültek.

Vizsgálataink kezdeti szakaszában PPF:DEF scaffoldokra K7M2 egér osteoszarkóma sejteket ültettünk majd ezt a „scaffold–sejt” rendszert sikerrel élő szövetbe, a kísérleti állatokba transzplantáltuk.. Gyulladás jeleit sem szövettani vizsgálattal, sem a szérum citokin illetve kemokin tartalmának a vizsgálatával nem tudtunk kimutatni. A szövettani analízis során nem találtunk visszamaradt scaffold törmeléket. Ezen eredményeink alapján elmondhatjuk, hogy a rendszerünk rendelkezik a scaffoldok három alapvető kívánalmával: adhézió, mechanikai tartósság, és a biokompatibilitás/biodegradabilitás.

Az eredményeink szerint az őssejtek érzékenyek a scaffold összetételére. *In vitro* kísérletekben az arany nanorészecskékkel inkorporált scaffoldokat hasonlítottunk össze nanorészecske nélküli scaffoldokkal. Amíg a makrofág sejtvonal esetében a különböző scaffoldok között nem volt különbség az adhézióban, addig az őssejtek tapadása és eloszlása kimondottan jobb volt az arany hibrid polimeren. Ez növeli a lehetőségét a scaffoldok regeneratív „tissue engineering” célú felhasználhatóságának. Az *in vivo* kísérletek során bebizonyítottuk, hogy az őssejt scaffold rendszert sikeresen tudtuk transzplantálni a kísérleti állatokba és azokban izomregenerációt tudtunk indukálni.

Az tudományos irodalomban az őssejt felhasználás egyik legkomolyabb rizikójának a tumoros elfajulást tekintik. A rendszerünk biztonságosnak bizonyult ebből a szempontból. A scaffoldjaink megfeleltek azoknak az elvárásoknak, amelyeket a felhasználásukhoz kapcsolódó szakirodalom dokumentált: a sejtek a scaffoldok segítségével a beültetés helyén maradtak, így a véráramba kerülésük rizikója minimalizálódott, illetve az autológ őssejtek használatával csökken a kilökődés veszélye.

A PPF:DEF scaffoldokkal folytatott kutatásunk olyan új eredményekkel szolgáltak, amelyek bizonyították az általunk használt irányított szövettervezés, 3D sejt kultúrák létjogosultságát a regeneratív orvoslás területén.

VI. Konklúzió

A tézisben leírt tanulmányainkkal a PPF:DEF scaffoldok használatát szeretnénk volna közelebb vinni a klinikai felhasználáshoz.

In vitro és *in vivo* kísérleteinket úgy terveztük, hogy bizonyítani tudjuk a scaffoldok illeszkedését az orvosi használathoz elengedhetetlen (*sine qua non*) követelményekhez. A következő lépésekben az össejtes alkalmazás felé irányítottuk figyelmünket.

A PPF:DEF scaffoldok biokompatibilitásuk, biodegradabilitásuk és a sejtenyésztésre való alkalmasságuk révén megfelelő „tissue engineering” eszköznek, továbbá zsírszövetből származó autológ össejtek immunkompetens állatokba történő transzplantációjára alkalmasnak bizonyultak. Az arany nanorészecskével dúsított scaffoldok fokozták a sejtadhéziót és proliferációt.

Vizsgálataink eredményei alapján felmerülhet a kísérletek klinikai alkalmazás felé való kiterjesztése. A további kutatásokban érdemes lenne nagyobb méretű scaffoldok alkalmazása vagy a térbeli viszonyokat jól imitáló, egyéb, speciális formájú, az egyén anatómiai viszonyaira tervezett 3D struktúrák kipróbálása is.

VII. Az értekezésben szereplő új eredmények összefoglalása:

- PPF:DEF biopolimer scaffold támogatja a sejtek adhézióját.
- A sejtekkel kolonizált PPF:DEF biopolimer scaffold alkalmas a sejtek *in vivo* transzplantálására. A módszerrel sikeresen bevittünk élő sejteket a kísérleti állatokba.
- A PPF:DEF biopolimer scaffold biokompatibilis és biodegradábilis „tissue engineering” eszköz, jelentős immunreakciót nem indukál.
- Az inkorporált nanorészecskék (különösen az arany nanorészecskék) a scaffold anyagában fokozhatják a sejtek megtapadását, az irányított szövettervezés sikerességét.
- Őssejttel oltott PPF:DEF scaffoldok *in vivo* sikeres szöveti regenerációt indukálnak.

VIII. Köszönetnyilvánítás

Mindenekelőtt társ-témavezetőmnek **Professzor Nagy Katalinnak**, a Fogorvostudományi Kar Szájsebészeti tanszékének vezetőjének, a kar korábbi dékánjának, szeretnék köszönetet mondani a folyamatos támogatásáért, segítségért és útmutatásáért. Szakmai fejlődésemben minden céltom elérésében támogatott az évek folyamán. Az nélküle a kutatás környékére sem kerültem volna, soha.

Továbbá szeretném kifejezni hálámat **Dr. Buzás Krisztinának**, társ-témavezetőmnek és megköszönni az irányomba tanúsított türelmét. Ő mutatta meg nekem, hogy az alap kutatás is lehet izgalmas, neki köszönhetően körbe utaztam a világot, szélesítettem látókörömet.

Különlegesen hálás vagyok **Dr. Beke Szabolcsnak**. Az évek folyamán nem csak kollégám, barátom is lett. Megmutatta nekem, hogy a fizika jóval több, mint amit el tudtam képzelni valaha és vendégül látott külföldi tanulmányútjaim során.

Rendkívül hálás vagyok a háttérben dolgozó kutatócsoportnak, **Gyukity-Sebestyén Edinának, Harmati Máriának és Dobra Gabriellának**. Megtanították nekem, hogyan kell laborban dolgozni. Nélkülük a sejtek nem érték volna meg a másnapot.

Köszönöm továbbá **Dr. Turzó Kingának**, a Fogorvostudományi Kar dékánjának és **Professzor Minárovits Jánosnak**, hogy biztosították a feltételeket a Ph. D. tanulmányaimhoz.

Köszönöm **Dr. Németh Istvánnak**, a szövettani vizsgálatokban történő együttműködését.

Valamint szeretném megköszönni **Dr. Braunitzer Gábornak**, hogy megmutatta a publikálás elegáns módját.

Végül, de nem utolsósorban szeretném megköszönni a **családomnak és barátaimnak**, akik ösztönöztek és kitartásra sarkalltak az egész folyamat alatt.

A legnagyobb támogatóm, a menyasszonyom, **Dr. Tarnai Zsófi** volt, akivel a Ph.D. képzésen sikerült megismerkednünk, mi voltunk az egész évfolyam. Azóta is naponta tartunk évfolyam találkozót!