

Doktori (PhD) értekezés tézisei

**Tranziens Receptor Potenciál (TRP)  
ioncsatornák orálbiológiai szerepének  
vizsgálata**

Dr. Kunka Árpád

Témavezető: Dr. Tóth István Balázs



DEBRECENI EGYETEM  
Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
Debrecen, 2026

# Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatornák orálbiológiai szerepének vizsgálata

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében  
az „Elméleti Orvostudományok” tudományágban

Írta: Dr. Kunka Árpád okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Molekuláris Orvostudomány doktori iskolája  
(Élettan és neurobiológia programja) keretében

Témavezető: Dr. Tóth István Balázs, PhD

Az értekezés bírálói:

Dr. Kecskés Angéla, PhD

Dr. Priksz Dániel, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szöllősi János, akadémikus

tagok: Dr. Nagy Ákos Károly, PhD

Dr. Angyal János, PhD

Az értekezés védésének helye és időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület  
tantermében, 2026.05.08., 13:30.

## Bevezetés

A fogbél (pulpa dentis) élő, erősen differenciált kötőszövet, amely alapvető szerepet játszik a fogak élettani működésében, regenerációjában és az érző, illetve immunológiai válaszok koordinálásában. Gyulladásos folyamatok során – mint pulpitisben – a fogbél sejtjei oxidatív és gyulladásos mediátoroknak vannak kitéve, amelyek szövetkárosodást és fájdalomérzetet eredményezhetnek. A pulpitis sejt szintű mechanizmusainak feltárása ezért kiemelt jelentőségű a diagnosztikai és terápiás stratégiák fejlesztésében.

A Tranziens Receptor Potenciál (TRP) ioncsatorna-család egyik fontos tagja, a tranziens receptor potenciál ankyrin 1 (TRPA1), nem-szelektív kationcsatorna, amely elsősorban  $\text{Ca}^{2+}$  beáramlását közvetíti. Aktivációját különböző fizikai és kémiai ingerek válthatják ki, köztük az oxidatív stressz során képződő reaktív oxigénszarmazékok (ROS). Bár a TRPA1 ismert szerepet játszik az érzőidegek fájdalomközvetítésében, egyre több adat utal arra, hogy a fogbél nem idegi sejtjeiben – például odontoblasztokban és fibroblasztokban – is funkcionális jelentőséggel bír.

Az oxidatív stressz a pulpitis kórlelettanának meghatározó tényezője: a gyulladásos mediátorok és bakteriális hatások fokozzák a ROS-termelést, ami sejtkárosodáshoz, mitokondriális diszfunkcióhoz és apoptózishoz vezethet. A TRPA1 közvetlen redox-érzékenysége azt sugallja, hogy a csatorna az oxidatív folyamatok fontos modulátora, és aktivációja pozitív visszacsatolási mechanizmus révén tovább fokozhatja a sejtek oxidatív terhelését és a gyulladás fennmaradását. Mindezek alapján a TRPA1 szerepének vizsgálata a fogbélsejtekben alapvető jelentőségű lehet, a pulpitis patomechanizmusának jobb megértéséhez.

Kutatásunk célja ezért a TRPA1 expressziójának, működésének és oxidatív stresszel való kapcsolatának feltárása egy in vitro pulpitis modellben, valamint annak vizsgálata, hogy a csatorna gátlása képes-e mérsékelni a sejtkárosodást és a mitokondriális diszfunkciót. A vizsgálatokhoz humán pulpa eredetű primer sejttenyészeteket alkalmaztunk, a gyulladásos környezetet polinozin-policitidil sav indukcióval modelleztük, és a TRPA1 expresszióját RNS és fehérjeszinten egyaránt elemeztük. A funkcionális aktivitást  $\text{Ca}^{2+}$ -imaging, a ROS-termelést fluoreszcens próbák, a sejtek életképességét pedig MTT-alapú vizsgálatok segítségével mértük.

A génexpresszió pontos térbeli vizsgálatára – különösen komplex, sokféle sejtípust tartalmazó szövetekben, mint a fogbél – a hagyományos RT-qPCR korlátozott, mivel a homogenizált mintából származó RNS nem hordoz információt a szöveti lokalizációról. Ezzel

szemben az in situ hibridizáció (ISH) a lokalizált génexpressziót mutatja megtartott szöveti struktúra mellett. Ugyanakkor az ISH kivitelezése kalcifikált szövetekben – például fogakban – különösen nehéz, mivel a dekalifikáció savas vagy hosszú idejű eljárásai az RNS degradációját okozhatják. Az RNAscope technika a hagyományos ISH továbbfejlesztett, nagy érzékenységű változata, amely többszörös próbák és erős jelamplifikáció révén a részlegesen degradált mRNS detektálására is alkalmas. Bár a módszer sikeresen alkalmazható dekalifikált csontmintákban, a fogakon történő optimális alkalmazásról kevés adat áll rendelkezésre. A fogbelet körülvevő mineralizált szövetek – dentin és zománc – jelentősen megnehezítik a mintaelőkészítést és a megfelelő RNS-minőség megőrzését. A szakirodalom arra utal, hogy a hagyományos dekalifikáló eljárások jelentős mRNS-veszteséggel járhatnak, ezért a technika alkalmazása gondos optimalizációt igényel.

Annak érdekében, hogy a későbbiekben in vivo vizsgálataink során az RNAscope technikát is alkalmazhassuk, tanulmányunk második részében öt különböző dekalifikációs módszert értékeltünk egér metszőfog-mintákon, vizsgálva a szövettani struktúra megőrzését és az mRNS integritását. A cél egy olyan mintaelőkészítési protokoll meghatározása volt, amely a legjobban támogatja az RNAscope alkalmazását fogszövetekben.

# Célkitűzés

## 1. A TRPA1 szerepének vizsgálata pulpitis modellben

- A TRPA1 ioncsatorna expressziójának meghatározása humán dentális pulpasejtekben normál és gyulladásos körülmények között.
- Annak vizsgálata, hogy gyulladásos stimulus hatására bekövetkezik-e a TRPA1 expressziójának és funkcionális aktivitásának megváltozása.
- A TRPA1-mediált  $Ca^{2+}$ -jelátvitel jellemzése gyulladásos környezetben.

## 2. Oxidatív stressz és TRPA1 kölcsönhatásának elemzése

- Az oxidatív stressz kialakulásának vizsgálata in vitro pulpitis modellben.
- Annak meghatározása, hogy a TRPA1 aktivációja hogyan járul hozzá a reaktív oxigéngyökök termelődéséhez.
- A TRPA1 farmakológiai és genetikai gátlásának hatása az oxidatív károsodás mértékére.

## 3. Módszertani optimalizálás RNAscope ISH vizsgálatokhoz

- Különböző dekalifikációs eljárások összehasonlítása rágcsáló fogmintákon a szövettani szerkezet megőrzése szempontjából.
- Az egyes dekalifikációs módszerek hatásának vizsgálata az mRNS integritására RNAscope in situ hibridizáció alkalmazásával.
- Olyan mintapreparálási protokollok azonosítása, amelyek egyidejűleg biztosítják a megfelelő morfológiát és a molekuláris érzékenységet.

## 4. Transzlációs jelentőség

- Olyan kísérletes alap megteremtése, amely hozzájárulhat a fogbélgyulladás sejtszintű patomechanizmusainak jobb megértéséhez.
- A TRPA1 mint potenciális terápiás célpont szerepének alátámasztása gyulladásos eredetű dentális kórképekben.

## Anyagok és módszerek

### *Primer humán fogbélsejt (hDPC) kultúrák létrehozása*

A primer hDPC-eket ép, harmadik molárisokból izoláltuk, amelyeket egyébként egészséges páciensektől távolítottunk el helyi érzéstelenítés mellett ortodonciai okból a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Karán. A páciensek írásos beleegyező nyilatkozatot adtak, és az eljárást a Debreceni Egyetem Regionális és Intézményi Etikai Bizottsága hagyta jóvá az alábbi azonosítószámmal: ETT TUKEB 49849-3/2016/EKU. Az extrakciót követően a fogakat 3% nátrium-hipoklorit oldattal fertőtlenítettük 2 percig, majd foszfátpufferelt sóoldattal (PBS; 115 mM NaCl, 20 mM Na<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4; valamennyi Sigma-Aldrich/Merck, St. Louis, MO, USA) öblítettük és pamutgézzel szárítottuk. Korono-apikális irányban bemetszést végeztünk sterilizált fogászati gyémánt fissura fúróval (Hager & Meisinger GmbH, Neuss, Németország), nagysebességű kézidarab (W&H Dentalwerk Bürmoos GmbH, Bürmoos, Ausztria) használatával, folyamatos bő vízhűtés mellett, egészen addig, amíg a pulpakamrát körülvevő dentinfal vékony, de még folytonos maradt. A metszett fogakat transzport médiumba (DMEM-F12 tenyésztőoldat kiegészítve 10% magzati marhaszérummal (FBS) (mindkettő Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA), penicillinnel (500 U/ml), streptomocinnel (500 µg/ml) és amfotericinnel (1,25 µg/ml) (valamennyi Sigma-Aldrich)). helyeztük és jégen tartva a sejtenyésztő laboratóriumba szállítottuk további feldolgozásra. Steril lamináris áramlású fülke alatt a fogakat steril Bein gyökéremelővel (MEDICOR Kézműszer Zrt., Debrecen, Magyarország) feltörtük, majd a koronális és a radikuláris pulpaszövetet steril endodonciai Kerr reszelővel (#30; Dentsply Sirona, Charlotte, USA) és fogászati csipesszel (MEDICOR Kézműszer Zrt., Debrecen, Magyarország) távolítottuk el.

A pulpaszövetet új Petri-csészébe helyeztük azonos összetételű médiumba, és sebészi szike #20 (Feather, WPI, Sarasota, FL, USA) segítségével 1–2 mm-es darabokra aprítottuk. A pulpaszövetet ezt követően kollagenáz I (3 mg/ml; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és dispáz (4 mg/ml; Gibco, Waltham, MA, USA) oldatában emésztettük 1 órán át 37°C-on. A kapott sejtszuszpenziót 6-lyukú tenyésztőedénybe (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) oltottuk és tenyésztettük azonos összetételű médiumban 37°C-on, párás inkubátorban, 5% CO<sub>2</sub> jelenlétében. A kultúrákat naponta ellenőriztük invertált mikroszkóppal (Olympus Corp., Center Valley, PA, USA) esetleges kontamináció és sejtnövekedés szempontjából. Amikor a kultúrák elérték a 70–80%-os konfluenciát, vagy továbbpasszáltuk őket további vizsgálatokhoz, vagy krioprezerváltuk későbbi felhasználásra folyékony nitrogénben. A

passzálás során a sejteket kétszer alaposan PBS-sel mostuk, majd 0,05% Trypsin-EDTA-val (Sigma-Aldrich) 10 percig tripszinezttük, a tripszint tenyésztőmedium hozzáadásával semlegesítettük, a sejteket centrifugáltuk ( $125 \times g$ , 8 perc, szobahőmérsékleten), majd tenyésztőoldatban (DMEM-F12 + 10% FBS) reszuszpendáltuk. A kísérletekhez csak legfeljebb 5-ször passzált hDPC-ket használtunk fel.

### *Génexpressziós vizsgálatok*

Az mRNS-transzkriptumok expresszióját reverz transzkripciót követő kvantitatív valósídejű PCR-rel (RT-qPCR) határoztuk meg. A teljes RNS izolálása TRIzol reagenssel (Thermo Fisher Scientific) történt a gyártó utasításai szerint, majd a kinyert RNS minőségellenőrzését Nanodrop-1000 spektrofotométerrel (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA) végeztük, a nukleinsavtartalmat 260 nm-en, a fehérjeszennyeződést 280 nm-en mért abszorbancia segítségével jellemeztük. Ezt követően 2  $\mu$ g teljes RNS-t cDNS-sé írtunk át a High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával, a gyártó protokollja szerint. A PCR-amplifikáció a TaqMan universal PCR master mix protokoll (Thermo Fisher Scientific) és TaqMan génexpressziós assay-k felhasználásával történt (assay ID-k: Hs00175798\_m1 a TRPA1-hez, Hs00202960\_m1 a TRPC5-höz, Hs01066091\_m1 a TRPM2-höz, Hs00257553\_m1 a TRPM3-hoz, Hs01066596\_m1 a TRPM8-hoz, Hs00218912\_m1 a TRPV1-hez, Hs00275032\_m1 a TRPV2-höz, Hs00376854\_m1 a TRPV3-hoz, Hs00222101\_m1 a TRPV4-hez, Hs00985639\_m1 az IL-6-hoz, Hs00174103\_m1 az IL-8/CXCL8-hoz, Hs01551078\_m1 a TLR3-hoz, Hs00533490\_m1 a SOD1-hez [szuperoxid-diszmutáz 1], Hs00167309\_m1 a SOD2-höz, Hs00156308\_m1 a CAT-hoz [kataláz], és Hs00829989\_gH a GPX1-hez [glutation-peroxidáz 1]). Belső kontrollként a peptidil-prolil izomeráz A (PPIA), a gliceraldehid-3-foszfát-dehidrogenáz (GAPDH) és a  $\beta$ -aktin (ACTB) transzkriptumait határoztuk meg (assay ID-k rendre: Hs99999904\_m1, Hs99999905\_m1, Hs99999903\_m1). A génexpresszió (CT-értékek) megbízhatóságának biztosítása érdekében három technikai ismétlést alkalmaztunk. A transzkriptek mennyiségét a háztartási gének expressziójára normalizáltuk a  $\Delta$ CT módszerrel, referenciaként a háztartási gének geometriai átlag CT-értéke szolgált.

### *Gyulladásos citokinek szekréciójának mérése*

A különböző kezeléseknek 24 órán át kitett hDPC-kultúrák felülúszóit (100 000 sejt kultúránként) összegyűjtöttük, és humán IL-6 és IL-8 jelenlétének meghatározására kereskedelmi forgalomban kapható ELISA készlettel vizsgáltuk (BD Biosciences, Franklin Lakes, NJ, USA) a gyártó protokolljai szerint. A mikrotiter lemezeket befogó antitesttel vontuk be, amelyet bevonópufferben (0,1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, pH 9,5, 10 N NaOH-val beállítva) hígítottunk, és 4°C-on inkubáltuk egy éjszakán át. Ezután a lemezeket assay hígítóval (10% magzati marhaszérum PBS-ben) inkubáltuk szobahőmérsékleten 1 órán keresztül, miközben elkészítettük a standard- és minta-hígításokat, szintén assay hígítóban. A koncentrációs standardokat és a mintákat a megfelelő lyukakba adagoltuk, és 2 órán keresztül inkubáltuk szobahőmérsékleten. Két óra elteltével minden lyukhoz hozzáadtuk a detektor munkaooldatot (detektáló antitest + SA<sub>v</sub>-HRP reagens), és 1 órán át inkubáltuk szobahőmérsékleten. A lépések között a lemezeket mosópufferrel (0,05% Tween-20 PBS-ben oldva) mostuk. A mosást követően minden lyukhoz szubsztrátoldatot (tetrametil-benzidin és hidrogén-peroxid citrát-pufferben, pH 5,0) adtunk 30 percre, sötétben, majd stop oldatot (2 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). Az abszorbanciát 405 nm-en mértük a reakció leállítását követő 30 percen belül. A citokinek mennyiségét (pg/ml) az IL-6 és IL-8 standardok sorozathígításával készített kalibrációs görbe alapján számítottuk ki.

### *Az intracelluláris Ca<sup>2+</sup>-koncentráció fluoreszcens mérései*

A citoplazmatikus Ca<sup>2+</sup>-koncentráció ([Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>) változásait a fluoreszcens, Ca<sup>2+</sup>-érzékeny Fura-2 festékkel mértük. A méréseket korábban optimalizált protokollunk szerint végeztük (53). A hDPC-eket 96-lyukú, fekete falú/átlátszó aljú lemezekbe (Greiner Bio-One, Kremsmünster, Ausztria) szélesztettük 20 000 sejt/lyuk sejtsűrűséggel tenyésztő médiumban, és 1 napig tenyésztettük. Másnap a sejteket poly(I:C)-vel vagy vivőanyaggal kezeltük további 24 órán keresztül. A kezelést követően a sejteket 2 μM Fura-2 AM-mel (Thermo Fisher Scientific), tenyésztőmédiumban oldva, 37°C-on 30 percig töltöttük. A sejteket háromszor mostuk, majd Ca<sup>2+</sup>-pufferben (150 mM NaCl, 5 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O, 2 mM CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O, 10 mM glükóz·xH<sub>2</sub>O, 10 mM HEPES, pH 7,4; mind Sigma-Aldrich) inkubáltuk (100 μl/lyuk). A plate-eket ezután FlexStation 3 multimodális mikroplate-olvasóba (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA) helyeztük, és a [Ca<sup>2+</sup>]<sub>IC</sub>-t a folyamatosan mért fluoreszcencia segítségével követtük nyomon, miközben a sejteket különböző koncentrációkban alkalmazott

vegyületekkel kezeltük. A mérés során egy lyukban egy anyagnak csak egy adott koncentrációját alkalmaztuk. A mért fluoreszcencia adatokat F340/F380 formában adtuk meg, ahol az F340 a 340 nm-es gerjesztés és 510 nm-es emisszió mellett mért fluoreszcencia, míg az F380 a 380 nm-es gerjesztés és 510 nm-es emisszió mellett mért fluoreszcencia. A kísérleteket több lyukban megismételve végeztük, és az egyes lyukokban lévő sejteket egymástól függetlenül szélesztettük, tenyésztettük és kezeltük. Az adatelemzés során az N ezeket a független lyukokban zajlott kísérleteket jelöli. A kísérleti terv szerint  $N = 6$ , azonban néhány mintát kizártunk az elemzésből nyilvánvaló pipettázási hiba és/vagy a pozitív kontrollként a kísérletek végén alkalmazott ionomicinre adott válasz hiánya miatt.

A válaszadó sejtek eloszlásának vizsgálatához a  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -t egyedi sejtekben mértük fluoreszcens mikroszkóppal. Ezekhez a mérésekhez a sejteket fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatra alkalmas, üveg aljú Petri-csészékbe (Ibidi, Gräfelfing, Németország) szélesztettük, és 24 órán át poly(I:C)-vel vagy vivő kontrollal kezeltük. Ezt követően a sejteket  $2 \mu M$  Fluo-4 AM-mel (Thermo Fisher Scientific) töltöttük fel, majd a Zeiss LSM 5 Live konfokális fluoreszcens mikroszkóp (Carl Zeiss AG, Oberkochen, Németország) tárgyasztalára helyeztük a fluoreszcencia mérésére. A  $Ca^{2+}$ -pufferben oldott vegyületeket gravitációs elven működő lokális perfúziós rendszerrel juttattuk a vizsgált sejtek közelébe, miközben a puffer folyamatos eltávolítását perfúziós pumpával működtetett szírórendszer biztosította, fenntartva a folyamatos áramlást a mérések során. A fluoreszcenciát 490 nm-es gerjesztési és 520 nm-es emissziós hullámhossz mellett monitoroztuk. A  $[Ca^{2+}]_{IC}$  változásait F1/F0 formában jellemeztük, ahol az F1 az aktuális fluoreszcenciát, míg az F0 a mérés kezdetén, bármilyen vegyület alkalmazása előtti bazális fluoreszcencia átlagát jelenti.

#### *A mitokondriális szuperoxid-termelődés mérése*

A mitokondriális szuperoxid-termelődést a MitoSOX™ Red assay (Thermo Fisher Scientific) alkalmazásával vizsgáltuk, amely egy specifikusan a mitokondriumokba targetált, szuperoxid-érzékeny fluoreszcens festéken alapul. A festék a mitokondriumban keletkező szuperoxidgyökök hatására oxidálódik, más reaktív oxigén- vagy nitrogénygyökökkel nem reagál. Az oxidált forma a mitokondriális nukleinsavakhoz kötődve hozza létre a fluoreszcens jelet, amelynek intenzitása arányos a mitokondriális szuperoxid-termelés mértékével, ezáltal lehetővé téve az egyes kezelések oxidatív hatásának kvantitatív összehasonlítását. A kísérletek során  $2 \times 10^4$  sejtet szélesztettünk  $200 \mu l$  DMEM-F12 médiumban 96-lyukú, fekete falú, átlátszó aljú mikrolemezbe (Greiner Bio-One), majd a sejteket 24 órán keresztül

tenyésztettük. A következő napon minden lyukhoz 50 µl MitoSOX Red fluorogén festékoldatot adtunk és a sejteket 20 percig inkubáltuk 37 °C-on. Ezt követően a sejteket poliinozin:policitidil savval (poly(I:C); InvivoGen, San Diego, CA, USA), valamint TRPA1 csatorna agonistákkal és antagonistákkal kezeltük különböző koncentrációkban. Pozitív kontrollként 10 µg/ml Antimycin A-t alkalmaztunk. A fluoreszcens jelet FlexStation 3 mikrolemez-olvasóval (Molecular Devices) mértük 510 nm gerjesztési és 580 nm emissziós hullámhosszak mellett, a kezeléseket követően 60 perccel. Az adatelemzés során az *N* az egymástól függetlenül szélesztett, tenyésztett, kezelt és mért sejteket tartalmazó lyukakat jelölte.

#### *A sejtek életképességének vizsgálata*

A sejtek életképességét két módszerrel értékeltük, amelyek a mitokondriális és a citoplazmatikus enzimaktivitást mérik. A mitokondriális aktivitást egy nem toxikus tetrazólium vegyület oldható formazán festékké történő átalakulásán keresztül vizsgáltuk, amelyet mitokondriális dehidrogenázok katalizálnak, az EZ4U (Biomedica, Wien, Ausztria) assay alkalmazásával, a gyártó protokollja szerint. A sejteket 96-lyukú sejtenyésztő lemezekre szélesztettük ( $2 \times 10^4$  sejt/lyuk), 24 órán át tenyésztettük, majd további 24 órán át különböző vegyületekkel kezeltük. A kezelést követően minden lyukhoz 20 µl tetrazólium szubsztrátot tartalmazó munkaoldatot adtunk 180 µl fenolvörös-mentes tenyésztőmédiához, majd további egy órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően a formazántermék abszorbanciáját 450 nm-en mértük, míg a referenciamérést 620 nm-en végeztük FlexStation 3 mikroplate-olvasóval (Molecular Devices). Az abszorbanciaértékeket a kontrollcsoport átlagos optikai sűrűségére normalizáltuk.

A citoplazmatikus enzimaktivitást a membránon átjutó calcein-acetoximetil-észter (calcein-AM) citoplazmában felhalmozódó, fluoreszcens, membránon nem átjutó calceinné történő átalakulása alapján értékeltük. A sejteket ugyanúgy szélesztettük és kezeltük, mint az EZ4U assay esetében, majd 2 µM calcein-AM-mel töltöttük fel 30 perc alatt. Az inkubációt és a mosást követően a calcein fluoreszcenciáját 490 nm-es gerjesztés és 520 nm-es emisszió mellett mértük FlexStation 3 mikroplate-olvasóval. A kísérleteket több lyukban végeztük, és az egyes lyukokban lévő sejteket külön-külön szélesztettük, tenyésztettük és kezeltük.

## *Géncsendesítés*

A TRPA1 expresszió csendesítéséhez hDPC-kben RNS-interferencia technikákat alkalmaztunk, TRPA1 kódoló mRNS-transzkriptumokat célzó kis interferáló RNS-ek (siRNS) felhasználásával. A sejteket hatlyukú vagy 96-lyukú lemezekbe szélesztettük, és 24 órával később siRNS-próbákkal transzfektáltuk őket a Lipofectamine RNAiMAX reagenssel (Thermo Fisher Scientific) a gyártó protokollja szerint. Az RNAiMAX-ot és a siRNS-próbákat gondosan összekevertük Opti-MEM médiumban (Thermo Fisher Scientific), 5 percig inkubáltuk, majd óvatosan hozzáadtuk a kultúrákhoz. Végző koncentrációban 100 pmol/ml siRNS-t adtunk a sejtekhez, a Lipofectamine RNAiMAX pedig 3:1000 arányban került alkalmazásra. A sejteket a transzfekciót követő 24 órával kezeltük poly(I:C)-vel, TRPA1 antagonistákkal vagy vivőoldat kontrollokkal, és további 24 óra elteltével vizsgáltuk (azaz a transzfekció után 48 órával). A három TRPA1-t célzó szekvencia hatékonyságát (Silencer® Select siRNA, Thermo Fisher Scientific, Assay ID-k: s17147, s17148, s17149) előzetes kísérletekben teszteltük a transzfekció utáni 48. órában, és a leghatékonyabbat (Assay ID: s17148) használtuk a kísérletekben. Nem célzó negatív kontroll siRNS-t (Thermo Fisher Scientific) alkalmaztunk a transzfekció nem specifikus hatásainak kontrollálására.

## *Anyagok*

A gyulladásoz körülmények kialakításához poliinozin:policitidil savat (poly(I:C), InvivoGen, San Diego, CA, USA) alkalmaztunk 24 órán keresztül. A TRPA1 agonisták, az allil-izotiocianát (AITC) és a cinnamaldehyde (CA), a Sigma-Aldrich-tól, illetve a Santa Cruz-tól (Santa Cruz, CA, USA) származtak. A TRPA1 antagonistá A967079 a MedChemExpress-től került beszerzésre, míg a HC030031 a Sigma-Aldrich-tól, ugyanúgy, mint a hidrogén-peroxid (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) és a glutation. Bizonyos mérésekben az ionomycin (Abcam, Cambridge, Egyesült Királyság) vagy az antimycin A (Sigma-Aldrich) szolgált pozitív kontrollként.

## *Állatok*

A kutatást 12 és 16 hetes, ép, hím C57BL/6/J egerekből származó mintákon végeztük. Az állatokat standard polikarbonát ketrecekben (330 mm × 100 mm × 130 mm, 2–5 egér/ketrec) tartották a Pécsi Tudományegyetem Farmakológiai és Farmakoterápiás Intézetében, és standard rágcsáló tápot (LT/n, Szinbád Kft., Gödöllő, Magyarország) valamint csapvizet kaptak ad libitum, 20–24 °C hőmérsékleten, 50–60% relatív páratartalom mellett, 12–12 órás sötét–világos ciklusban. Az egészséges, kezeletlen egereket eutanáziát követően szervek és szövetek

eltávolítására használtuk. Minden eljárást jóváhagyott a Pécsi Tudományegyetem Állatjóléti Bizottsága, valamint a Nemzeti Tudományos Állatkísérleti Etikai Bizottság (BA/73/00064-4/2025), összhangban az Európai Közösségek Tanácsának 1986-os irányelvével és a magyarországi XXCIII. törvénnyel (1998) az állatok gondozásáról és felhasználásáról. Folyamatosan arra törekedtünk, hogy a felhasznált állatok számát a lehető legkisebbre csökkentsük, és szenvedésüket a lehető legnagyobb mértékben minimalizáljuk.

### *Mintagyűjtés*

Összesen 20 felső és alsó metsző- illetve őrlőfogot gyűjtöttünk 20 darab, 12 és 16 hetes kor közötti hím C57BL/6J egérettől. Először mély anesztéziát indukáltunk intraperitoneálisan beadott urethánnal (2,4 g/kg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA; Cikkszám: 501838936). Ezt követően az egereket transzkardiálisan perfundáltuk 20 ml jéghideg, 0,1 mol/l foszfátpufferolt sóoldattal (PBS, pH 7,4), majd 150 ml 4%-os paraformaldehid (PFA) oldattal (Sigma-Aldrich; Cikkszám: 158127). A felső és alsó metszőfogakat a környező alveoláris szövetrel és ínnyel együtt ezt követően 4 °C-on, PFA-oldatban posztfixáltuk három napon keresztül. Ezt követően a mintákat véletlenszerűen öt csoportba osztottuk (n=4 csoportonként), és mindegyik csoport különböző dekalifikációs eljárásokon esett át.

### *Dekalcifikációs eljárások*

Öt különböző dekalifikációs módszer hatékonyságát értékeltük. Az alkalmazott oldatok részletes összetételét és az inkubációs körülményeket az 1. táblázat tartalmazza. Minden komponens a Sigma-Aldrich cégtől származott. Minden mintához 50 ml dekalifikáló oldatot adtunk. Minden esetben a dekalifikáció hatékonyságát manuálisan ellenőriztük, és a minták rugalmas tulajdonságainak elérésekor megkezdtük a dehidratálási folyamatot.

<b>Dekalcifikáló ágens</b>	<b>Dekalcifikáló oldat összetétele</b>	<b>Dekalcifikálás körülményei</b>
<b>Plank-Rychlo oldat</b>	8,5 mL sósav (Kat. sz.: 320331), 5 mL hangyasav, 7 g alumínium-klorid (Kat. sz.: 237051), 100 mL desztillált víz	6 óra 4 °C-on
<b>Morse-oldat</b>	10% nátrium-citrát (Kat. sz.: S4641), 20% hangyasav desztillált vízben	12 óra 4 °C-on
<b>5%-os hangyasav (Kat. sz.: F0507)</b>	5% hangyasav desztillált vízben	1 hét 4 °C-on
<b>EDTA (Kat. sz.: E9884)</b>	150 g EDTA felmelegítve 1000 mL desztillált vízben tisztulásig, majd 15 g nátrium-hidroxid (Kat. sz.: 221465) hozzáadása (pH 7–7,4)	1 hét 56 °C-on
<b>ACD csont-dekalcifikáló puffer (Kat. sz.: 321918)</b>	Használatra kész formuláció. A vállalat a megoldás összetételét üzleti titokként kezeli	2 hét 4 °C-on

## Dekalcifikáló oldatok és protokollok

### *Mikro-CT*

Az alkalmazott dekalifikációs protokollokat egérfog-mintákon végeztük, és azok hatékonyságát kvantitatívan értékeltük a moláris fogak ásványianyag-sűrűségének mérése alapján mikro-CT segítségével, ugyanazon állatokból származó mintákon, amelyekből a metszőfogakban az RNS integritását is meghatároztuk. A felvételeket egy Skyscan 1176 mikro-CT készülékkel készítettük (Bruker, Billerica, MA, USA). A feszültség 30 kV volt, az áramerősség 360  $\mu$ A, és minden felvételnél az expozíciós idő 3500 ms volt, 0,5 mm-es alumínium szűrő használatával és 0,7 fokos lépésközzel 180 fokos elforgatás során. Egy felvétel körülbelül 36 percet vett igénybe. Egy pixel oldalmérete a valóságban 8,74355  $\mu$ m-nek felelt meg. A nyers képeket NRecon (v.: 1.7.4.2) szoftverrel rekonstruáltuk. A kiválasztott területeket CTan (v.: 1.20.8.0+) és ImageJ (1.52a verzió, NIH, USA) szoftverekkel elemeztük. Az értékelés előtt a szoftvereket fogászati sűrűség mérésére kalibráltuk.

### *Minták előkészítése és metszése*

A dehidratálást követően a mintákat orientáltuk és paraffinba ágyasztuk. A fogakról 5  $\mu$ m vastagságú keresztmetszeti metszeteket készítettünk egy mikrotómmal (HM 430, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA). A metszeteket SuperFrost Ultra Plus tárgylemezekre helyeztük (Thermo Fisher Scientific; Cat. No.: 1014356190). Egyetlen minta sem sérült a beágyazás vagy az RNAscope feldolgozás során.

### *Hematoxilin-eozin festés*

Hematoxilin-eozin (HE) festést végeztünk a fogmetszeteken, hogy megállapítsuk a dekalifikációs eljárások hatékonyságát és értékeljük a hisztológiai mikroszerkezet integritását. A festés során a metszeteket háromszor 5 percig xilollal (Sigma-Aldrich; Cat. No.: X4126), majd kétszer 3 percig izopropil-alkohollal (Sigma-Aldrich; Cat. No.: I9516) kezeltük. Ezt követően a mintákat Mayer-féle hematoxilinnel (BioGnost, Zagreb, Horvátország; Cat. No.: HEMM-OT-X) 5 percig kezeltük, majd további 5 percig csapvízben áztattuk. Ezután a metszeteket 2 percig eozinnal (BioGnost; Cat. No.: EOY-10-OT-X) kezeltük, desztillált vízzel leöblítettük, majd kétszer újabb három percig izopropil-alkohollal kezeltük. A tárgylemezeket 2 percig xilolba helyeztük, majd DPX fedőanyaggal (Fluka/Honeywell, Seelze, Németország) fedtük.

### *RNAscope in situ hibridizáció*

RNAscope in situ hibridizációt (ISH) alkalmaztunk a paraffinba ágyazott egér fogminták RNS-integritásának vizsgálatára. Az előkezelést az RNAscope Multiplex Fluorescent Reagent Kit v2 felhasználói kézikönyv (ACD, Hayward, CA, USA; Cat. No. 323100) szerint végeztük. A metszeteket 60 °C-on 1 órán át inkubáltuk, majd 2 × 5 percig xilolban paraffinmentesítettük, ezt követően pedig 2 × 2 percig abszolút etanollal kezeltük. A metszeteket ezután 60 °C-on 5 percig szárítottuk, majd 10 percig hidrogén-peroxiddal kezeltük az endogén peroxidáz gátlása érdekében, ezt követően Milli-Q (MQ) vizes mosás következett.

Ezután három különböző permeabilizációs módszert teszteltünk az optimalizálás érdekében: Permeabilizációs módszer 1. A metszeteket 20 mg/mL koncentrációjú, előmelegített proteináz K (Sigma-Aldrich; Cat. No.: P2308) oldatban inkubáltuk 37 °C-on 20 percig. Permeabilizációs módszer 2. A metszeteket mikrohullámú sütőben 700 W teljesítményen 10 percig kezeltük 100 mL, pH 6-os citrátpufferben (Sigma-Aldrich; Cat. No.: C9999). MQ vízzel történő mosás után 3 perc abszolút etanolkezelés következett, majd 60 °C-on 5 perc szárítás. A metszetek hidrofób tollal való körberajzolását (Vector Immedge Pen, Vector Laboratories, Newark, CA, USA) követően a metszeteket Protease Plus (ACD; Cat. No.: 322331) oldattal kezeltük 30 percig 40 °C-on, párasított gőzkamrában. Permeabilizációs módszer 3. A metszeteket nagy nyomáson forraltuk 10 percig Target Retrieval oldatban (ACD; Cat. No.: 322000). MQ vízzel történő mosás után 3 perc abszolút etanolkezelés következett, majd 60 °C-on 5 perc szárítás. A metszetek hidrofób tollal való körberajzolását követően

Protease Plus (ACD; Cat. No.: 322331) kezelést alkalmaztunk 30 percig 40 °C-on, párasított gőzkamrában.

A kísérletek befejezését követően a további lépések minden minta esetében azonosak voltak, és a gyártó (ACD) felhasználói kézikönyvében leírtakat követték. A permeabilizáció után a metszeteket MQ vízzel mostuk, majd két órán át hibridizáltuk az egér 3-plex pozitív kontrollpróbáival (ACD, Cat. No.: 320881). Ez a reagens három különböző szinten expresszálódó, eltérő fluorokrómmal jelölt egér háztartási génspecifikus szekvenciát céloz meg. Az alacsony expressziójú RNS polimeráz II A alegység (Polr2a) mRNS fluoreszceinnel, a közepesen expresszálódó peptidil-prolil cis-trans izomeráz B (Ppib) mRNS cianin 3-mal (Cy3), míg a magas expressziójú ubiquitin C (Ubc) mRNS cianin 5-tel (Cy5) került megjelölésre. Negatív kontrollként a bakteriális L-2,3-dihidrodipikolát-reduktáz mRNS-t (dabP) célzó 3-plex negatív kontrollpróbát alkalmaztuk. A hibridizációt követően a jelamplifikáció és a csatornafejlesztési lépések a gyártó (ACD) utasításai szerint történtek. Végül a mintákat  $2 \times 15$  percig PBS-ben mostuk, majd 4',6-diamidino-2-fenilindollal (DAPI) (ACD; Cat. No.: 320858) festettük a sejtmagok megjelölése érdekében. A mosást követően a metszeteket ProLong Gold Antifade (Thermo Fisher Scientific; Cat. No.: P36930) fedőközeggel fedtük le, és -20 °C-on tároltuk képalkotásig.

### *Mikroszkópia, morfológia*

A HE-metszeteket Nikon Microphot FXA mikroszkóppal vizsgáltuk és Spot RT színes digitális kamerával (Nikon, Tokyo, Japán) rögzítettük. Az RNAscope ISH festett mintákat Olympus FluoView 1000 konfokális mikroszkóppal (Olympus, Hamburg, Németország) digitalizáltuk analóg módban, szekvenciális pásztázással. A fluoreszcens képalkotást a következő beállításokkal végeztük: 80 µm konfokális apertúra, 3,5 µm optikai vastagság,  $1024 \times 1024$  pixeles felbontás, 40× és 60× objektívek használatával. A fluoreszcens festékek gerjesztési és emissziós spektrumait a FluoView szoftverrel (FV10-ASW; Version 0102, Olympus) választottuk ki, és a 405, 488, 550 és 647 nm lézernyalábokkal világítottuk meg a DAPI, fluoreszcein, Cy3 és Cy5 festékeket. A metszeteket négy csatornában pásztáztuk és ezt követően digitálisan egyesítettük. A digitális képeken a kék (DAPI), zöld (fluoreszcein), piros (Cy3) és fehér (Cy5) színek a négy különböző csatornát jelölik. A denzitometriát ImageJ szoftverrel (version 1.52a, NIH, USA) végeztük szerkesztetlen képeken, hogy kvantifikáljuk az RNAscope jeleket minden háztartási gén esetében a különböző dekalifikációs módszerek között. A fluoreszcencia intenzitását négy manuálisan kiválasztott felszíni területen mértük a pulpában, szerkesztetlen képeket használva. A jel denzitását a háttérjelhez viszonyítva

korrigáltuk. Az adott területek specifikus jeldenzítésének (SSD) átlagát állatonként négy metszet alapján határoztuk meg. E négy érték átlaga adta egy egér SSD értékét. Az SSD-t arbitrális egységekben fejeztük ki.

#### *Adat- és statisztikai elemzés*

A sejt kultúrákon végzett kísérletek során a kezelt és nem kezelt mintákat ugyanabból a primer kultúrából származó mintákkal hasonlítottuk össze; ezért randomizálást nem alkalmaztunk. A statisztikai elemzést végző személy vak volt a kísérleti körülmények tekintetében. Az adatok és a statisztikai elemzés megfelelnek a farmakológiai kísérlettervezésre és adatértékelésre vonatkozó ajánlásoknak. Az adatelemzéshez és az adatok megjelenítéséhez Origin 2018 szoftvert (OriginLab Corporation, Northampton, MA, USA) használtunk. Ha másképp nem jelezzük, az egyedi adatokat szórásdiagramokon ábrázoltuk, az átlag  $\pm$  SD megjelölésével. A logisztikus koncentráció–válasz görbéket az  $y = A2 + (A1 - A2)/(1 + (x/x0)^p)$  egyenlet alkalmazásával illesztettük, ahol a számított paraméterek a következők: A1: kezdeti érték ( $y_{min}$ ), A2: végső érték ( $y_{max}$ ),  $x0$ : középpont (EC50),  $p$ : számított hatvány. A statisztikai elemzést IBM SPSS Statistics 22 szoftverrel (IBM, Armonk, NY, USA) végeztük. A génexpressziós vizsgálatokban az expressziós értékeket  $\log_{10}$  transzformációnak vetettük alá, ezt követően végeztünk statisztikai elemzést. A paraméteres statisztikai tesztek alkalmazása előtt megvizsgáltuk az adatok alkalmasságát. Az adatok normalitását Shapiro-Wilk teszttel ellenőriztük, a varianciák homogenitását pedig Levene-teszttel vizsgáltuk. Két csoport összehasonlítására független mintás Student-féle t-próbát alkalmaztunk. Ugyanazon donoroktól származó két minta génexpressziójának összehasonlítására párosított t-próbát hajtottunk végre. Több csoport összehasonlítására egyutas varianciaanalízist (one-way ANOVA) alkalmaztunk. Ha az F érték szignifikáns volt, páronkénti összehasonlítást végeztünk Tukey HSD post hoc teszttel. Ha több csoportot hasonlítottunk egyetlen kontrollcsoporthoz, Dunnett post hoc tesztet alkalmaztunk páronkénti összehasonlításra. Két kezelés közötti kölcsönhatás vizsgálatához kétutas varianciaanalízist (two-way ANOVA) alkalmaztunk. Minden esetben  $*P < 0.01$  értéket tekintettünk szignifikánsnak.

A szövettani mintákból nyert adatok statisztikai elemzését Statistica 13.5.0 szoftverrel végeztük. Az adatokat átlag  $\pm$  SEM formájában adtuk meg. Minden adatsort teszteltünk normáloszlásra (Kolmogorov–Smirnov) és varianciahomogenitásra (Levene). A főhatásokat egyutas varianciaanalízissel (ANOVA, változó: dekalifikációs eljárás) vizsgáltuk, majd Tukey-féle post hoc tesztet alkalmaztunk. A 0,05 alatti p-értéket statisztikailag szignifikánsnak

tekintettük. A csoporton belül kisebb variabilitás előfordult az állatok között, de egyértelmű kiugró érték nélkül.

## Eredmények

### I. TRPA1 in vitro vizsgálatok eredményei

#### *A hőmérséklet-érzékeny TRP csatornák expresszálnak hDPC-kben*

A primer hDPC-kben a hőmérséklet-érzékeny TRP ioncsatornák expressziójának vizsgálatához teljes RNS-t izoláltunk több donor hDPC-kultúráiból, majd reverz transzkripciót követően Q-PCR-nek vetettük alá. A hDPC-k nagy mennyiségben expresszálták a meleg-érzékeny TRPV2 és TRPV4 csatornákat. A TRPV1 transzkriptumok expressziója körülbelül egy nagyságrenddel alacsonyabb volt, míg a TRPV3, TRPM2 és TRPM3 alacsony szinten és csak néhány donorban volt kimutatható. A hideg-érzékeny TRP-k vizsgálatokor a legtöbb donorban magas TRPA1 expressziót detektáltunk, és a TRPC5 transzkriptumok valamivel alacsonyabb expressziót mutattak. Fontos megjegyezni, hogy a TRPM8 — amely a szomatoszenzoros neuronok fő hidegérzékelő receptora — egyik mintában sem volt kimutatható.

#### *A poly(I:C) gyulladáshoz való válaszreakciót indukál és fokozza a TRPA1 csatornák expresszióját*

Annak vizsgálatára, hogy a fenti TRP csatornák expressziója változik-e gyulladáshoz való körülmények között, megvizsgáltuk expresszióinkat egy poly(I:C) által kiváltott gyulladáshoz való modellben is. Ennek érdekében a primer kultúráinkban a hDPC-ket 24 órán át poly(I:C)-vel kezeltük gyulladáshoz való körülmények kialakítása céljából. A poly(I:C) markánsan és koncentrációfüggően emelte a proinflammatorikus citokin-transzkriptumok, az IL-6 és az IL-8/CXCL8 expresszióját, és növelte ezen citokinek felszabadulását is. A poly(I:C) emellett jelentősen fokozta a TLR3 expresszióját, amely a receptor aktivációjának jól ismert markere. A fenti TRP csatornák expresszióját ebben a gyulladáshoz való modellben is elemeztük, amelyben a hDPC-ket 20 µg/ml poly(I:C)-vel kezeltük. Azt találtuk, hogy ez csekély hatással volt a melegre érzékeny TRP csatornák expressziójára. A hidegre érzékeny csatornákat illetően a TRPM8 expressziója gyulladáshoz való körülmények között sem indukálódott, és a kontroll esetekhez hasonlóan a poly(I:C)-kezelt mintákban sem volt kimutatható. Érdekes módon a TRPC5 expressziója minden vizsgált donor esetében jelentősen lecsökkent (a kontroll érték  $\approx 14\%$ -ára). Ezzel szemben a TRPA1 expressziója jelentősen megnövekedett, átlagosan körülbelül 37-szeresére hét donor mintáiban. Egy további donor esetében a növekmény meghaladta a 10 000-

szeres értéket, jóllehet a kontroll mintában ennek a donornak nagyon alacsony volt a kiindulási expressziója.

Tovább vizsgáltuk a fokozott TRPA1 génexpresszió funkcionális következményeit, és monitoroztuk az  $[Ca^{2+}]_{IC}$  változásait a TRPA1 csatorna agonisták alkalmazása során. Azt találtuk, hogy az AITC és a CA gyors, koncentrációfüggő növekedést váltott ki az  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -ben a kontroll hDPC-kben. Ezek a  $Ca^{2+}$  jelek a poly(I:C)-vel előkezelt sejtekben jelentősen fokozódtak, ami jól összhangban állt a TRPA1 csatornák emelkedett expressziójával. Fontos, hogy mind az AITC-, mind a CA által kiváltott válaszokat szinte teljesen gátolták a TRPA1-antagonisták, a HC030031 és az A 967079, ami alátámasztja az alkalmazott agonisták TRPA1-specifikus hatását. Az egyedi sejtszinten végzett mérések azt mutatták, hogy a poly(I:C)-előkezelés növelte az AITC által kiváltott  $Ca^{2+}$  válaszok átlagos amplitúdóját az egyes sejtekben, de nem befolyásolta a válaszadó sejtek arányát, amely mind a kontroll, mind a gyulladáshoz vezető körülmények között hasonlóan magas volt. A CA farmakológiai tulajdonságainak vizsgálata feltárta, hogy mind a hatásosság (maximális válasz,  $\Delta(F340/F380)$ :  $1,94 \pm 0,05$  vs.  $1,06 \pm 0,07$ ), mind a potencia ( $EC_{50}$ ,  $\mu M$ :  $19,3 \pm 1,6$  vs.  $62,6 \pm 13,9$ ) magasabb volt a gyulladáshoz vezető csoportban a kontroll értékekhez képest.

*A hDPC-k érzékenyebbek válnak az exogén  $H_2O_2$ -re gyulladáshoz vezető körülmények között a TRPA1 expresszió növekedése miatt*

A TRPA1 csatornát általában a káros ingerek sejtes szenzorának tekintik, és többek között a reaktív oxigéngyökök (ROS) aktiválják. Ezért azt a hipotézist állítottuk fel, hogy a TRPA1 gyulladáshoz vezető körülmények közötti felregulációja fokozott érzékenységet eredményezhet a reaktív oxigéngyökökkel szemben. Ennek tesztelésére a hDPC-eket  $H_2O_2$ -vel kezeltük, és mértük annak akut hatását a  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -re. A kontroll sejtek csak mérsékelt  $Ca^{2+}$ -választ mutattak 1 mM feletti  $H_2O_2$  alkalmazására. Ezzel szemben a poly(I:C)-vel előkezelt hDPC-eket már alacsonyabb  $H_2O_2$ -koncentráció is aktiválta, és lényegesen nagyobb válaszokat produkáltak. Fontos módon a  $H_2O_2$  által kiváltott  $Ca^{2+}$ -jelek megszűntek HC030031 jelenlétében, ami egyértelműen jelzi, hogy a  $H_2O_2$  által indukált  $[Ca^{2+}]_{IC}$ -növekedést a TRPA1 csatorna aktiválása váltja ki.

*A poly(I:C) oxidatív stresszt indukál és fokozza a mitokondriális szuperoxid-termelést*

A mitokondriumok a sejten belüli ROS-termelés elsődleges helyei, amelyeket az antioxidáns védelmi rendszer semlegesít. A ROS-termelés és az antioxidáns védelem közötti egyensúly felborulása oxidatív stresszhez és a sejten belüli ROS-koncentráció növekedéséhez vezet. Mivel a ROS fontos jelátvivő molekulák a gyulladásban, és súlyosbíthatják a gyulladás okozta szövetkárosodást, megvizsgáltuk, hogy a poly(I:C) indukál-e oxidatív stresszt és ROS-termelést a gyulladásos modellünkben. Azt találtuk, hogy a mitokondriális szuperoxid-diszmutáz 2 (SOD2) expressziója, amely enzim felelős a mitokondriális szuperoxidgyökök H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-vé történő átalakításáért, jelentősen megemelkedett, ugyanakkor a citoplazmatikus SOD1 és a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t semlegesítő kataláz és glutation-peroxidáz 1 (GPX1) expressziója nem változott. Ezek az eredmények súlyos zavarokra utaltak a sejtés redox-homeosztázisban, és mitokondriális oxidatív stresszt jeleztek. Valóban megállapítottuk, hogy a poly(I:C) gyorsan (60 percen belül) indukálta a mitokondriális szuperoxid-termelést koncentrációfüggő módon. A poly(I:C)-tól eltérően a TRPA1 agonisták nem stimulálták a szuperoxid-termelést, ami arra utal, hogy a TRPA1 szelektív aktiválása nem indukál oxidatív stresszt. Továbbá a TRPA1 antagonisták csak részleges hatást fejtettek ki a poly(I:C) által indukált szuperoxid-termelésre. Bár a 10 µg/ml poly(I:C) által kiváltott szuperoxid-termelést a HC-030031 és az A967079 részben csökkentette, az még ezek jelenlétében is jelentősen emelkedett maradt, 20 µg/ml poly(I:C) hatását pedig a TRPA1 gátlása nem befolyásolta. Ezek az eredmények arra utaltak, hogy a TRPA1 csupán részleges szerepet játszik a mitokondriális ROS-termelés szabályozásában poly(I:C) által indukált gyulladásos körülmények között. A TRPA1 antagonisták nem fordították vissza a poly(I:C)-indukálta gyulladást, és nem gátolták a gyulladásos IL-6 és IL-8/CXCL8 termelését.

*A poly(I:C) által kiváltott gyulladás csökkenti a mitokondriális aktivitást, amit a ROS-termelés és részben a TRPA1 közvetít*

Bár a TRPA1 csak csekély mértékben befolyásolta a mitokondriális ROS-termelést gyulladásos körülmények között, feltételeztük, hogy az upregulált ioncsatorna célpontja lehet az endogén módon termelődő reaktív gyököknek, és hozzájárulhat az oxidatív stressz következményeihez gyulladásos körülmények között. Ezért megvizsgáltuk a poly(I:C) által kiváltott gyulladás hatását a sejtek életképességére és a TRPA1 lehetséges szerepét a hatásban. A sejtek életképességének felméréséhez a mitokondriális enzimaktivitást és a citoplazmatikus

észterázok aktivitását mértük. Azt találtuk, hogy a poly(I:C) jelentős csökkenést eredményezett a mitokondriális funkciókban, de alig befolyásolta a citoplazmatikus enzimaktivitást. A mitokondriális zavarokat a ROS eltávolító glutation koncentrációfüggő módon mérsékelte, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz jelentős szerepet játszik a poly(I:C) negatív hatásában a mitokondriális működésre. A citoplazmatikus enzimaktivitás azonban nem állt helyre glutation hatására, ami arra utal, hogy a poly(I:C) egyes hatásaiban nem oxidatív mechanizmusok is szerepet játszhatnak.

Mivel a TRPA1 expressziója szintén jelentősen emelkedett ezekben a körülményekben, felvetettük, hogy ez a ROS-érzékeny ioncsatorna szerepet játszhat-e a gyulladás által kiváltott mitokondriális életképességi károsodásban. Megállapítottuk, hogy a poly(I:C) által kiváltott mitokondriális károsodást részben megelőzte a TRPA1 antagonisták, a HC-030031 és az A 967079 alkalmazása, de ezek az inhibitorok alig befolyásolták a citoplazmatikus enzimaktivitást. Ezenkívül a poly(I:C) hatása jelentősen csökkent a TRPA1 RNAi-alapú csendesítését követően is. Emellett jelentős kölcsönhatást találtunk a poly(I:C) kezelés és az A 967079 vagy a siRNS transzfekció között (kétirányú ANOVA). Ezek az eredmények alátámasztják azt a következtetést, hogy a megemelkedett TRPA1 expresszió szerepet játszik a gyulladással összefüggő pulpaszövet-károsodásban, bár TRPA1-től független mechanizmusok is érintettek.

## II. Az optimális dekalifikációs módszer és szövételőkészítési protokoll kidolgozása

Eddigi eredményeink alapján a további vizsgálati terveink között szerepel a TRPA1 expresszió *in situ* vizsgálata is a pulpában. Mivel a TRPA1 ellen nem állnak rendelkezésre szelektív, megbízható antitestek, ezért ezeket a vizsgálatokat RNS *in situ* hibridizáció segítségével tervezzük végrehajtani. A vizsgálatokat nehezíti a pulpát körülvevő magas ásványi anyag tartalmú kemény szövet, melynek dekalifikálása jelentősen befolyásolhatja az RNS minőségét és degradációját. Ezért további célunk volt egy dekalifikációs és mintapreparálási eljárás optimalizálása a fogak hisztológiai vizsgálatához, amely lehetővé teszi a fogak megfelelő metszését az mRNS károsítása nélkül, és így alkalmas az RNAscope ISH-ra. Ehhez öt különböző dekalifikációs módszert teszteltünk, majd a dekalifikáció ellenőrzésére mikro-CT vizsgálatot, a minták mikroszerkezetének értékelésére pedig HE festést végeztünk. Az RNS integritását egér 3-plex pozitív kontroll próbák alkalmazásával vizsgáltuk, amelyek egyidejűleg képesek kimutatni magas, közepes és alacsony expressziójú géneket.

### *A dekalifikáció hatása a fogak denzitására*

Öt különböző dekalifikációs protokollt alkalmaztunk egér fogmintákon, és hatékonyságukat kvantitatív módon értékeltük mikro-CT vizsgálat során. Az ásványianyag-denitász mérések minden dekalifikált mintában jelentős csökkenést mutattak a kezeletlen, ép kontrollcsoporthoz képest. Az egyutas varianciaanalízis (one-way ANOVA) erősen szignifikáns különbséget igazolt a csoportok között ( $p = 3.06 \times 10^{-11}$ ), és a poszt hoc összehasonlítások azt mutatták, hogy valamennyi dekalifikációs kezelés szignifikánsan alacsonyabb denitászértéket eredményezett, mint a kontroll ( $p < 0.0001$ ). Ezek az eredmények azt mutatják, hogy mind az öt dekalifikációs protokoll hatékonyan eltávolította a kalciumot a fogszövetekből.

### *A dekalifikáció hatása a fogak hisztológiai szerkezetére*

Általánosságban elmondható, hogy mind az öt módszer kielégítő dekalifikációt eredményezett, és a minták metszése nyilvánvaló nehézségek nélkül kivitelezhető volt. Ugyanakkor mérsékelt különbségek voltak megfigyelhetők a hisztológiai szerkezet minőségében, és a módszerek hossza is jelentősen eltért egymástól. A Plank–Rychlo

dekalcifikáló oldat erős szerves savat (sósavat), valamint szerves hangyasavat tartalmaz. Ebben az oldatban történő dekalcifikáció után a fogminták jól metszhetők voltak, és a HE festés megőrzött pulpaszerkezetet mutatott.

A módszer előnye a viszonylag rövid inkubációs idő, mindössze 6 óra 4 °C-on. Amennyiben csak szerves hangyasavat alkalmaztunk 5%-os koncentrációban, az elérni kívánt metszhetőségi állapothoz szükséges dekalcifikációs idő sokkal hosszabb volt, mivel egy hét 4 °C-on volt szükséges a megfelelő konzisztencia eléréséhez. A fogak hisztológiai szerkezete jól megőrzött volt, amit a HE festés is jelzett. Ugyanakkor némi pulpaszövet-zsugorodást figyeltünk meg. Az EDTA-oldat alkalmazása általánosan javasolt módszer a dekalcifikációra, ha a roncsoló savak használatát kerülni kell. Eredményeink szerint a 15%-os EDTA-oldatban, 56 °C-on, egy héten át történő inkubáció puha, rugalmas és kiválóan metszhető mintákat eredményezett. A megfelelő dekalcifikációt a dentincsatornák jó megőrzése is jelezte, amint azt a HE festés mutatta. Bár a keményszövet megfelelően volt feldolgozva, a pulpavolumen csökkenését tapasztaltuk, és az elvált a dentintől, ahogyan ez a hangyasavas dekalcifikáció esetében is megfigyelhető volt. A Morse-oldat alkalmazása optimálisnak bizonyult a gyors fogászati dekalcifikációhoz. A 10%-os citrát és 20%-os hangyasav keverékének 12 órás alkalmazása gyors és megfelelő dekalcifikációt, valamint kiválóan metszhető szöveteket eredményezett. A fogak hisztológiai szerkezete jól megőrzött volt mind a keményszövetben (dentin), mind a pulpában. Végül alkalmaztunk egy olyan dekalcifikáló oldatot is, amelyet az ACD ajánl csontminták RNAscope előtti dekalcifikációjához. Fogmintáinkat ennek megfelelően két hétig inkubáltuk 4 °C-on, hogy elérjék a puha, jól metszhető állapotot. A hisztológiai szerkezet a dekalcifikációt követően ép volt.

#### *A permeabilizáció optimalizálása és a különböző dekalcifikációs módszerek hatása az RNS integritására*

Miután meggyőződünk arról, hogy valamennyi dekalcifikációs eljárás sikeres volt metszhetőség és mikroszerkezet szempontjából, RNAscope ISH-t végeztünk az RNS integritásának vizsgálatára. Először három különböző permeabilizációs módszert teszteltünk az RNS visszanyerésére. A proteináz K-val történő emésztés (1. permeabilizációs módszer) hatástalannak bizonyult, mivel az ISH próbák nem hatoltak be megfelelően a mintákba, és gyenge, bizonytalan jelölést eredményeztek. A citrátoldatban, mikrohullámú sütőben történő inkubáció (2. permeabilizációs módszer) gyengítette a tapadást, ezért több minta levált a tárgylemezről a kezelés után. A legoptimálisabb emésztési módszer a Target Retrieval oldatban

(ACD) történő kezelés volt 10 percen át gőzölőben, majd Protease Plus (ACD) kezeléssel 30 percig 40 °C-on (3. permeabilizációs módszer). Az ISH során három, egér háztartási génre specifikus, egér 3-plex pozitív kontrollpróbákat alkalmaztunk, amelyek megfelelő információt szolgáltatottak az RNS integritásáról. Azon minták kerültek tesztelésre, amelyeket az előzőekben ismertetett öt különböző dekalifikációs eljárással készítettünk elő. A Plank–Rychlo oldatban történő dekalifikáció az RNS erőteljes degradációját eredményezte. A három vizsgált háztartási gén mindegyike alig volt kimutatható, bár a várható jelintenzitás-különbség még felismerhető maradt a három háztartási gén között.

Az 5%-os hangyasavval végzett egyhetes kezelés valamivel jobb RNS integritást eredményezett. Valamennyi háztartási gén egyértelműen detektálható volt RNAscope ISH-val, bár szintjük alacsonyabb volt a vártnál, ami részleges RNS-degradációra utalt a mintákban. Az EDTA-oldat, amely a leggyakrabban ajánlott dekalifikációs módszer az érzékeny, lebomlásra hajlamos fehérjeantigének megőrzésére, súlyos mRNS-károsodást okozott, és a legrosszabb RNAscope jelet eredményezte a vizsgált módszerek között. Ennek következtében az alacsony expressziójú Polr2a transzkriptumok kimutathatatlanná váltak. A közepes szinten expresszálódó Ppib transzkriptumok szintén alig voltak detektálhatók. Még a nagy kópiaszámú Ubc transzkriptumokat célzó próbák is csak nagyon gyenge ISH jelet adtak. Az előző módszerekkel ellentétben a Morse-oldatban történő dekalifikáció, illetve az ACD csont dekalifikáló puffer alkalmazása kiváló minőségű ISH jeleket eredményezett. Még az alacsony kópiaszámú Polr2a transzkriptumok is egyértelműen kimutathatók voltak nagy megbízhatósággal, míg a Ppib-t és Ubc-t célzó próbák az elvárt expressziós szintjüknek megfelelően erős, pontos és összefüggő jeleket mutattak. A fenti eredmények azt mutatták, hogy az ACD Bone Decalcification Bufferrel vagy Morse-oldattal végzett dekalifikáció megőrzi az RNS integritását, és kiválóan alkalmas a későbbi RNAscope ISH eljáráshoz. Az RNS integritását az öt különböző dekalifikációs protokollt követően RNAscope ISH segítségével, három különböző expressziós szintet mutató háztartási gén denzitometriai kvantifikációjával értékeltük. Ez az elemzés azt a célt szolgálta, hogy meghatározzuk, melyik dekalifikációs módszer őrzi meg legjobban az RNS minőségét. Az egyutas ANOVA statisztikailag szignifikáns különbséget mutatott a csoportok között ( $p = 6,25 \times 10^{-13}$ ). A post hoc összehasonlítások azt mutatták, hogy a Morse-oldattal és az ACD-oldattal dekalifikált minták őrizték meg a legmagasabb RNS-integritást, és e két kezelés között nem volt

szignifikáns különbség. Ezzel szemben minden más dekalifikációs protokoll szignifikánsan csökkentette az RNS jelintenzitását mind a Morse-, mind az ACD-csoporthoz képest ( $p < 0,0001$ ). Ezek az eredmények azt jelzik, hogy a Morse- és az ACD-oldat biztosítja leginkább az RNS integritásának megőrzését a fogminták dekalifikációja során.

## Megbeszélés

A dentális pulpa érzékenysége elsősorban az azt beidegző trigeminális rostokhoz kapcsolódik, de a nem-neurális pulpaszöveti sejtek is jelentősen hozzájárulhatnak az érzékelési transzdukcióhoz. A sejtek érzékenységét különböző receptorok határozzák meg, amelyek közül kiemelkednek a TRP csatornák.

Eddig a TRP ioncsatornák több tagját is kimutatták a dentális pulpában és az azt beidegző trigeminális rostokban, azonban pontos szerepük a pulpa gyulladásában még nem teljesen tisztázott. Vizsgálatunkban az emberi pulpa nem-neurális elemeire fókuszáltunk, és szisztematikusan elemeztük a TRP család hőérzékeny tagjainak expresszióját primer humán pulpaszöveti sejtekben (hDPC) normál és gyulladásos körülmények között, amely utóbbit poly(I:C) alkalmazásával idéztünk elő – ez az anyag a TLR3 mintázatfelismerő receptor erőteljes aktivátora. Kontroll körülmények között jelentős expressziót találtunk a meleg-érzékeny TRPV1, TRPV2 és TRPV4 csatornák, a hideg-érzékeny TRPC5, valamint a TRPA1 csatorna esetében, amely a károsító hideg és meleg ingerekre egyaránt érzékeny lehet. A TRPM2 és TRPM3 csatornák csak néhány donor mintájában voltak kimutathatók, és ott is viszonylag alacsony szinten, míg a TRPV3 csatorna csak néhány mintában, nagyon kis mennyiségben volt jelen. Érdekes módon a TRPM8 csatorna – amely a szomatoszenzoros rostok fő hidegérzékelője – egyáltalán nem volt kimutatható egyik hDPC mintában sem.

A korábbi vizsgálatok egyszerre csak néhány TRP csatornát elemeztek, ezért a különböző modellek eredményei néhol eltértek. Ugyanakkor eredményeinkkel összhangban több tanulmány is megerősítette a TRPV1, TRPV2, TRPV4, TRPC5 és TRPA1 csatornák expresszióját nem-neurális pulpasejtekben, mind rágcsálókban, mind emberben. Hasonlóan ahhoz, amit mi is tapasztaltunk, a TRPM8 csatorna nem volt kimutatható rágcsáló odontoblasztokban és humán odontoblasztokban, bár egy vizsgálat funkcionális expressziót mutatott ki humán odontoblasztokban és pulpa fibroblasztokban. Immunhisztokémiai adatok szerint a TRPM8 csatorna jelen van az odontoblaszt rétegben, de szinte egyáltalán nem az emberi fog belső pulpájában. Értelmezhető, hogy ez az eltérés abból adódik, hogy a TRPM8 expressziója esetleg kizárólag a differenciált odontoblasztokra korlátozódik, így proliferáló sejt kultúrákban már nem kimutatható. Emellett a fajok közötti különbségek és a TRP csatornák ellen elérhető kereskedelmi antitestek minőségének gyakran kérdéses volta tovább bonyolíthatják az értelmezést. A helyzetet tovább nehezíti, hogy a TRPM8 csatorna agonistái, az icilin és a mentol nagyobb koncentrációban a TRPA1 csatornát is aktiválhatják, ami

megnehezíti a két csatorna farmakológiai elkülönítését. Egy elegáns, friss vizsgálatban Zimmermann csoportja kimutatta, hogy a TRPM8 szerepe a hidegérzékelésben inkább a fogat beidegző elsődleges afferens rostokra korlátozódik, míg az odontoblasztok elsődleges hidegérzékelője a TRPC5 csatorna, de mellette a TRPA1 hozzájárulását is igazolták.

A TRPA1 csatorna multimodális nociceptorként ismert, amely mind hő-, mind kémiai ingerekre érzékeny. Számos tanulmány kimutatta, hogy általánosan expresszálódik a pulpában, és mi is jelentős expressziót találtunk hDPC sejtekben. A poly(I:C)-indukálta gyulladási körülmények között a TRPA1 transzkriptumok expressziója drámaian – körülbelül 40-szeresére – megnövekedett mintáinkban. A TRPC5 expressziója csökkent, míg a többi hőérzékeny TRP csatorna expressziója érdemben nem változott. A TRPA1-csatornák úgy tűnik, általánosan részt vesznek a pulpa gyulladási jelátviteli folyamataiban, mivel más vizsgálatok is leírták, hogy a TNF $\alpha$  és a bakteriális lipopoliszacharid fokozza az expresszióját pulpa eredetű sejtekben. Bár a TRPA1-csatornák expresszióját fokozó jelátviteli útvonal részletesen nem ismert, korábbi eredmények arra utalnak, hogy az NF- $\kappa$ B aktivációja – amely a TLR3 ismert downstream jelátviteli útvonala – hozzájárulhat a csatorna upregulációjához gyulladási modellünkben. Az NF- $\kappa$ B aktivációja különféle ingerek hatására a TRPA1-csatorna expresszióját fokozta tüdőráksejtekben, HaCaT keratinocitákban, allergiás kontakt dermatitiszben és szenzoros neuronokban is. Fibroblaszt-szerű szinoviocitákban a gyulladási citokinek NF- $\kappa$ B-hez kapcsolódó jelátviteli útvonalon keresztül a hypoxia-indukálható faktor-1 $\alpha$  (HIF1 $\alpha$ ) transzkripciósi faktor aktiválásához vezetett, ami fokozta a TRPA1-expresszióját. A TRPA1-csatornák klinikai jelentőségét pulpitisben az is alátámasztja, hogy humán carieses fogakban fokozott TRPA1-immunreaktivitást írtak le. Továbbá a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t tartalmazó fogfehérítő gélek is fokozzák a TRPA1-csatornák expresszióját fogbél-eredetű őssejtekben.

Fontos, hogy eredményeink szerint nemcsak az expresszió, hanem a TRPA1-csatorna-agonistákra adott specifikus funkcionális válaszok is nagymértékben fokozottak voltak gyulladási körülmények között tenyésztett hDPC-kben. Gyulladási körülmények között a TRPA1-agonisták által kiváltott maximális válaszok nagyobbak voltak, ami jól korrelál a csatorna megnövekedett expressziójával. Ezen felül a fahéjaldehid hatékonysága is fokozódott, amelyet az EC<sub>50</sub> érték csökkenése jelzett, ami a TRPA1-csatornák fokozott érzékenységére utal. A gyulladás során endogén módon termelődő ROS hozzájárulhat ehhez az érzékenyítődéshez azáltal, hogy a csatorna intracelluláris ciszteinmaradékaival reagál. Ezek a reaktív maradékok további gyulladási mediátorok célpontjai lehetnek, például az elektrofil

arachidonsav-származékoké. Ezen kívül kimutatták, hogy a PGE2 PKA- és PKC $\epsilon$ -mediált útvonalakon keresztül érzékenyíti a TRPA1-csatornákat. Ezek az eredmények több kapcsolódási pontot jeleznek a gyulladásos jelátviteli utak és a TRPA1-csatornák között, amelyek valószínűleg jelen vannak hDPC-kben is.

A TRPA1-csatornákat aktiválják a reaktív oxigéngyökök (ROS), és eredményeink egyértelműen kimutatták, hogy gyulladásos körülmények között fokozódik a hDPC-k érzékenysége az oxidatív stresszel szemben, amelyet akut H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-alkalmazással modelleztünk. A TRPA1-antagonista együttes alkalmazása szinte teljesen megszüntette a H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> által kiváltott Ca<sup>2+</sup>-válaszokat, ami megerősíti, hogy ezek az oxidatív stressz által indukált Ca<sup>2+</sup>-jelzések TRPA1-csatorna-aktivitáson keresztül jönnek létre. A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-t széles körben alkalmazzák fogfehérítő eljárásokban, és ismert, hogy károsítja a pulpa sejtjeit, valamint gyulladásos mediátorok és TRPA1-csatornák expresszióját indukálja. A fogászati restaurációkban használt 2-hidroxietil-metakrilátról azt feltételezik, hogy ROS közvetítésével aktiválja a TRPA1 csatornákat hDPC sejtvonalon. Eredményeink azt mutatják, hogy a gyulladt pulpa még érzékenyebb lehet a ROS-ra a TRPA1 fokozott expressziója miatt. A ROS magas koncentrációban szabadul fel és fontos szerepet játszik a gyulladásban. Pulpitisben a ROS-t az infiltráló immunsejtek termelik, hogy elpusztítsák a patogén baktériumokat, de ez egyben károsíthatja a környező szöveteket is. Emellett a dentális pulpa sejtjei is képesek ROS-t termelni. Megállapítottuk, hogy a poly(I:C) stimuláció fokozza a hDPC-k mitokondriális szuperoxid-termelését, amelyet csökkent mitokondriális aktivitás és 24 órán belül romló sejt túlélés kísért. Korábbi tanulmányok azt sugallták, hogy a pulpa ROS jelátvitelének befolyásolása ígéretes terápiás célpont lehet a gyulladás okozta szövetkárosodás megelőzésére. ROS-fogók gátolták a gyulladásos jelzéseket és megakadályozták pulpasejtek károsodását különböző modellekben. Vizsgálatunkban a glutation szintén gátolta a gyulladással összefüggő mitokondriális diszfunkciókat, ami arra utal, hogy az oxidatív stressz fontos szerepet játszik a poly(I:C) által kiváltott károsodásokban. Ezenkívül a ROS-érzékeny TRPA1-csatornák gátlása vagy a TRPA1 expressziójának csökkentése részben megakadályozta a gyulladással összefüggő sejt károsodást hDPC-kben. Ezek az eredmények egyértelműen jelzik, hogy a TRPA1-csatornák gátlása ígéretes terápiás megközelítést jelenthet a gyulladás és oxidatív stressz által kiváltott pulpakárosodás csökkentésére.

Korábban az irreverzibilis pulpitis egyetlen lehetséges kezelése a gyökérkezelés volt a pulpa teljes eltávolításával. Ez volt az egyetlen lehetőség a fog megtartására az extrakció

elkerülése érdekében. Ennek ellenére negatív hatást gyakorolt a megmaradó fogszerkezet biomechanikai tulajdonságaira, és rontotta a fog hosszú távú élettartamát. Az elmúlt évtizedben az életképes pulpacezelések egyre elterjedtebbé váltak, és ezeket kezdetben csak akkor tartották kivitelezhetőnek, ha a pulpa gyulladását megelőzően reverzibilis pulpitis diagnózisa volt felállítható. Ricucci hisztológiai vizsgálataiban azonban igazolták, hogy a klinikai diagnózis nem feltétlenül áll összhangban a pulpa hisztológiai állapotával. Sok esetben az irreverzibilis pulpitis klasszikus klinikai jelei és tünetei ellenére a bakteriális invázió és a gyulladásos infiltráció csak a pulpaszarkom területére korlátozódik, és ilyen esetekben a részleges vagy teljes pulpotómia kedvezőbb alternatívát jelenthet a gyökérkezeléssel szemben. Ugyanakkor az életképes pulpatériák sikerességi aránya széles tartományban mozog, 31,8%-tól 100%-ig, különböző körülmények között. Úgy véljük, hogy olyan hatékony anyagok alkalmazása, amelyek jelentősen csökkentik a pulpa gyulladását a resectált pulpa felszínén, javíthatja ezeknek a beavatkozásoknak a kimenetelét. Eredményeink azt sugallják, hogy a TRPA1 csatorna antagonistái és a ROS jelátvitel gátlói ígéretes jelöltek lehetnek a pulpa gyulladásának csökkentésére. Így eredményeink hozzájárulhatnak hatékonyabb kezelések kifejlesztéséhez a pulpa gyulladásának mérséklésére, és ezáltal bővíthetik a regeneratív endodoncia eszköztárát.

A munkánk második része nélkülözhetetlen ahhoz, hogy a TRPA1-hez hasonló gyulladásban szerepet játszó ioncsatornák és egyéb molekulák expresszióját nagy térbeli felbontással, szövetspecifikusan vizsgálhassuk. A dekalifikációs és mintapreparálási protokollok összehasonlítása lehetővé tette, hogy azonosítsuk azokat az eljárásokat, amelyek a fogszövet morfológiai épségének megőrzése mellett az mRNS integritását is megóvják, így megbízható alapot teremtenek a TRPA1 expressziós mintázatának és gyulladás-indukáltságának vizsgálatához állatkísérletes modellben. Bár számos protokoll létezik a dekalifikálásra és a megfelelő szövettani előkészítésre – különösen csontok esetében –, ezek RNS ISH-hoz való alkalmasságát jóval kevésbé vizsgálták, és különösen a fogak szövettani mintaként történő vizsgálatáról csak korlátozott információ áll rendelkezésre.

Vizsgálatainkban öt különböző dekalifikációs módszert teszteltünk és értékeltünk szisztematikusan RNAscope ISH alkalmazásával egérmetszőfog-mintákon. A vizsgálatban alkalmazott technikákat eredetileg csontszövetre optimalizálták, ezért jelen célunk az volt, hogy tisztázzuk, hogyan befolyásolják ezek a különböző dekalifikációs eljárások az mRNS kimutathatóságát az egér fogpulpa szöveteiben. Az RNAscope egy új típusú RNS ISH módszer, amely új lehetőségeket nyit a kvalitatív és kvantitatív in situ génexpressziós vizsgálatokban.

Gyakorlatilag bármilyen transzkript kimutatására alkalmas, még meszesedett szövetekben is, nagyfokú specificitással és kiemelkedő érzékenységgel ezért számos esetben igen versenyképes alternatívát nyújt az immunhisztokémiával szemben. Ugyanakkor alkalmazása jelentős kihívást jelent a fogszövetben. A fogszövet dekalcifikálása elengedhetetlen lépés a szövettani vizsgálatokhoz. A fluor- és hidroxapatit-kristályok, illetve más kalciumsók eltávolítása nélkül a mikrotóm pengéi nem tudják átvágni a szövetet, a pengék megsérülnének, a minta pedig széttöredezne. A dekalcifikáció során a szövet kellően meglágyul ahhoz, hogy vékony, egyenletes metszetek készülhessenek mikroszkópos vizsgálatra. A megfelelő dekalcifikáció eltávolítja az ásványi anyagokat anélkül, hogy károsítaná a lágyszöveti elemeket, így lehetővé teszi a sejtek, rostok és extracelluláris mátrixstruktúrák tiszta mikroszkópos megjelenítését, és e vizsgálat szempontjából különösen fontos módon megőrzi az RNS integritását. A kalciumlerakódások a rutinszerű szövettani festéseket (pl. HE, trikróm) is zavarják, míg a dekalcifikáció ezeket az ásványi akadályokat eltávolítva biztosítja az egyenletes festékpentrációt és a megfelelő festődést. Az elégtelen vagy egyenetlen dekalcifikáció szakadásokat, gyűrődéseket vagy gyenge festődést okozhat a metszeteken. Ezzel szemben a túlzott dekalcifikálás károsíthatja a fehérjéket, mRNS-eket és torzíthatja a morfológiát, ezért az időzítés és a reagens megválasztása kritikus.

Számos módszer áll rendelkezésre a dekalcifikálásra, és ezek túlnyomó többsége három nagy csoportba sorolható a felhasznált ásványianyag-eltávolító szer alapján. Az ásványi anyagok eltávolítása történhet erős szerves savakkal, amelyek általában kiválóan oldják az ásványi komponenseket, de nagyon korrozívak és könnyen károsítják az érzékeny biomolekulákat, például a fehérjeantigéneket vagy az RNS-t. Gyengébb szerves savak, mint a hangyasav, kíméletesebb alternatívát jelentenek, és hatékonyabban őrizhetik meg az érzékeny makromolekulákat, miközben hasonló hatékonysággal távolítják el az extracellulárisan lerakódott ásványi sókat. Alternatív megoldásként kelátképző szerek, például az EDTA alkalmazása ajánlott az immunhisztológiai kimutatás során különösen érzékeny antigének megőrzésére.

Ebben a tanulmányban öt dekalcifikációs módszert vizsgáltunk egérmetszőfog-mintákon, és összehasonlítottuk azok hatását a szövettani mikrostruktúrára és az RNAscope ISH alkalmasságára.

Dekalcifikáló szer	Hisztológiai struktúra	mRNS integritás
Plank–Rychlo oldat	Jól megőrzött szövetszerkezet a dentinben és a pulpában	Erős degradáció
5% hangyasav	Jól megőrzött dentinstruktúra, enyhe pulpazsugorodással	Részleges degradáció
EDTA	Jól megőrzött dentinstruktúra, enyhe pulpazsugorodással	Szinte teljes degradáció
Morse oldat	Jól megőrzött szövetszerkezet a dentinben és a pulpában	Megőrzött mRNS integritás
ACD csontdekalifikáló puffer	Ép szövetszerkezet a dentinben és a pulpában	Megőrzött mRNS integritás

A Plank–Rychlo-oldat erős szerves (sósav) és szerves (hangyasav) savat is tartalmaz, valamint alumínium-kloridot. Gyors csontdekalifikációra ajánlott. Mintáinkban rövid inkubációs idő mellett valóban kiváló dekalifikációt eredményezett; ugyanakkor kiválóan megőrizte a morfológiai struktúrát is. Azonban rontotta az RNS integritását, amit a nagyon gyenge RNAscope jelek mutattak. Ezek az eredmények jól összhangban vannak a csontdekalifikációról szóló korábbi adatokkal. Shibata és munkatársai kimutatták egér állkapocsban, hogy a Plank–Rychlo-oldat és más szerves savalapú dekalifikáló ágensek, bár kiválóan megőrzik az ameloblaszt réteg morfológiáját, jelentősen csökkentik mind a 28S rRNS, mind az oszteoblaszt-specifikus mRNS jeleit a hagyományos ISH során.

A hangyasavat gyakran használják csontszövet dekalifikálására, és a szerves savakhoz képest kíméletesebb módszernek tekintik, amely jobban megőrzi az antigéneket immunhisztokémiához. Eredményeink szerint a hangyasav ideális módon őrizte meg a fog histomorfológiáját, bár némi pulpaszövet-zsugorodást megfigyeltünk. Hátránya a Plank–Rychlo-oldathoz képest hosszabb inkubációs idő volt. Megjegyzendő, hogy az RNS integritása jobb volt, mint a szerves savval kezelt mintákban; a viszonylag gyenge ISH jel azonban részleges mRNS degradációra utalt. Hasonló eredményeket írtak le korábban patkány- és egérállkapocsban: a hangyasavas dekalifikáció kissé rontotta a histomorfológia minőségét némi vakuolizáció miatt. Ugyanakkor a 28S rRNS integritása viszonylag jól megmaradt.

Az EDTA-t a dekalifikáció arany standardjának tekintik, ha kíméletes eljárásra van szükség. Ideális például akkor, ha a kimutatandó antigének érzékenyek a savas degradációra.

Kísérletünkben valóban ideálisan őrizte meg a histomorfológiát. Ennek ellenére az EDTA alkalmazása súlyos mRNS degradációhoz vezetett, mivel alig figyeltünk meg RNAscope ISH jelet. Fontos megjegyezni, hogy az erősen eltérő inkubációs körülmények jelentősen befolyásolják az mRNS minőségét. Jól ismert például, hogy a magas hőmérséklet vagy a hosszabb inkubáció rontja az RNS integritását. A protokollunkban az EDTA-oldatban 56 °C-on inkubáltuk a mintákat, hogy felgyorsítsuk a dekalifikációt. Ennek ellenére egy hétre volt szükség ahhoz, hogy az egérmetszetek megfelelően vágható állapotba kerüljenek. Korábbi vizsgálatokban a dekalifikáló EDTA-oldat hőmérsékletének emelése szobahőmérsékletről 37 °C-ra a felére csökkentette a dekalifikációhoz szükséges időt patkány állkapocs esetében. Ez a magasabb hőmérséklet azonban – a rövidebb inkubáció ellenére – rontotta a sejtmorfológiát. Ezzel szemben egy másik tanulmány azt találta, hogy az egér állkapocsban mind az rRNS-ek, mind az mRNS-ek megmaradtak EDTA-s dekalifikáció után az inkubációs hőmérsékletet azonban nem közölték. A hőmérsékleten és az időn túl az EDTA-dekalifikáció hatékonyságát kritikus módon befolyásolja az oldat pH-ja. Savas közegben az EDTA nem okozott dekalifikációt, míg semleges pH-n ideális hatást biztosított, az alkalikus pH pedig tovább rövidítette az inkubáció idejét.

Eredményeink szerint az ACD által javasolt csontdekalifikáló puffer két héten át 4 °C-on alkalmazva kiváló dekalifikációt biztosított anélkül, hogy rontotta volna a szövetek szerkezeti minőségét, és emellett kiemelkedően jó RNS-megőrzést tett lehetővé a fogmintákban. A Morse-oldat hasonlóan kiváló minőségű eredményeket adott. Megjegyzendő, hogy mindez jóval rövidebb, mindössze 12 órás inkubációs idő után volt elérhető. Ez összhangban van korábbi tanulmányokkal, amelyek szerint a Morse-oldat kiváló dekalifikáló szer, és az EDTA-val összehasonlítható mind rágeszáló-, mind humán fogszövet esetében. A Morse-oldatot dekalifikált cochleáris minták esetén is hatékonyak találták, megőrzött szövettani morfológiával és kiváló mRNS-minőséggel qPCR vizsgálatok alapján. Jelen eredményeink és korábbi megfigyelések alapján tehát az ACD puffer és a Morse-oldat egyaránt ajánlható RNAscope ISH-re szánt fogminták dekalifikálásához.

Klinikai esetekben az immunhisztokémiai vizsgálatokat leggyakrabban a fogból eltávolított pulpaszöveten végzik. Jelenleg az RNAscope ISH alkalmazása emberi pulpán még nem rutinszerű vizsgálati módszer, de előnyei miatt várhatóan egyre elterjedtebbé válik. Eddig csak néhány tanulmány számolt be az RNAscope alkalmazásáról hosszú nem-kódoló RNS vagy virális RNS kimutatására humán pulpaszövetben. Fontos, hogy ezekben a vizsgálatokban

eltávolított pulpát vontak be az RNAscope ISH-be, ami jelentősen korlátozza a szövet komponenseinek minőségét és megbízható értékelhetőségét. A teljes fog metszése – a kemény szövetekkel és a pulpakamra lágy tartalmával együtt – lehetővé teszi az mRNS-ek pontosabb lokalizálását a fogban.

Összefoglalva, jelen vizsgálat célja az volt, hogy azonosítsuk az optimális módszert, amely következetes összehasonlítást tesz lehetővé több dekalifikációs protokoll között, és alkalmas az RNAscope technikára egérmetszetek pulpaszövetében. Korlátként megjegyzendő, hogy a különböző protokollokban alkalmazott hőmérséklet- és időbeli eltérések hozzájárulhatnak a morfológiai struktúrában és az RNS-integritásban megfigyelt variabilitáshoz, valamint az egérmetszetekre és a vizsgált egyetlen állatmodellre való korlátozottság csökkenti a kutatás általánosíthatóságát. A jövőbeni tanulmányoknak ezért ki kell terjedniük a moláris fogak vizsgálatára és más állatfajokra is.

## Új megállapítások

1. Igazoltuk, hogy a poly(I:C) által kiváltott gyulladás jelentősen megváltoztatja a TRP ioncsatornák expresszióját humán dentális pulpasejtekben.
2. Bizonyítottuk, hogy a gyulladás során fokozódó TRPA1 expresszió funkcionálisan aktív ioncsatornák megjelenésével jár.
3. Megállapítottuk, hogy a fokozott TRPA1-mediált  $\text{Ca}^{2+}$ -válasz az egyedi sejtek válaszerősségének növekedéséből ered, nem pedig a válaszadó sejtek arányának emelkedéséből.
4. Elsőként igazoltuk, hogy gyulladásos körülmények között a humán dentális pulpasejtek TRPA1-függő érzékenysége reaktív oxigéngyökökkel szemben fokozódik.
5. Kimutattuk, hogy a poly(I:C) mitokondriális oxidatív stresszt és funkciócsökkenést indukál humán dentális pulpasejtekben, amely folyamatban az oxidatív stressz domináns, a TRPA1 pedig részleges szerepet játszik.
6. Optimalizáltunk egy olyan fogdecalcifikációs és mintapreparálási protokollt, amely megőrzi az mRNS integritását, és alkalmassá teszi a fogmintákat RNAscope in situ hibridizációs vizsgálatokra.

## Összefoglalás

A fogbél gyulladáshoz vezető folyamatok (pulpitis) komplex sejtes és molekuláris mechanizmusok eredményeként jönnek létre, amelyekben az oxidatív stressz, a kalciumhoz kapcsolódó jelátviteli útvonalak és a redoxérzékeny ioncsatornák központi szerepet játszanak. A jelen kutatás célja a TRPA1 ioncsatorna szerepének feltárása volt a poly(I:C)-vel kiváltott oxidatív stressz és gyulladáshoz vezető sejtválasz mechanizmusában, humán fogbélsejtek in vitro modelljében. A kísérletek kimutatták, hogy a poly(I:C)-kezelés szignifikánsan növeli a TRPA1 mRNS- és fehérjeszintjét, ami a TLR3-mediált jelátviteli útvonal aktivációjára vezethető vissza. A csatorna expressziójának fokozódása együtt járt a TRPA1 aktivációhoz kapcsolódó fokozott intracelluláris kalcium-szint és a ROS termelés emelkedésével. A TRPA1-gátlás (HC-030031 antagonistá vagy siTRPA1 transzfekció) védő hatást fejtett ki: csökkentette az oxidatív stressz mértékét, javította a mitokondriális funkciókat és a sejtek életképességét. Ezek az eredmények arra utalnak, hogy a TRPA1 fontos tényező lehet a poly(I:C) által kiváltott oxidatív károsodás kialakulásában. A TRPA1 aktiváció szerepének feltárása új perspektívát nyit a fogbél gyulladáshoz vezető folyamatokban részt vevő oxidatív mechanizmusok megértésében. A csatorna modulálása a jövőben potenciális terápiás stratégiát kínálhat gyulladáshoz kapcsolódó és oxidatív stresszrel járó orális kórképek – különösen a pulpitis – célzott kezelésére.

Munkánk második részében azt vizsgáltuk, hogy milyen dekalifikációs és mintapreparálási eljárások alkalmasak leginkább a rágcsáló metszőfogak RNAscope in situ hibridizációs (ISH) vizsgálatára. Öt különböző dekalifikációs módszert hasonlítottunk össze a fogszövetek morfológiai épsége, metszhetősége és az mRNS megőrzése szempontjából. A mikro-CT, HE-festés és RNAscope pozitív kontroll próbák alapján arra jutottunk, hogy az egyes módszerek általában jól megőrzik a szövetszerkezetet, de némelyek jelentős mRNS degradációval járnak. RNAscope ISH-hoz két optimálisnak tekinthető eljárást (dekalifikáció Morse oldattal vagy ACD csont dekalifikáló pufferrel) azonosítottunk, amelyek egyidejűleg megőrzik a fogak szövettani szerkezetét és nem károsítják jelentős mértékben a minta RNS tartalmát, így megbízható alapot nyújtanak a fogpulpában végzett génexpressziós elemzésekhez.

# Függelék



**DEBRECENI  
EGYETEM**

**DEBRECENI EGYETEM  
EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR**

H-4002 Debrecen, Egyetem tér 1, Pf.: 400  
Tel.: 52/410-443, e-mail: publikaciok@lib.unideb.hu

Nyilvántartási szám: DEENK/598/2025.PL  
Tárgy: PhD Publikációs Lista

Jelölt: Kunka Árpád  
Doktori Iskola: Molekuláris Orvostudomány Doktori Iskola  
MTMT azonosító: 10095340

## A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. Konkoly, J., **Kunka, Á.**, Szentágotai, A., Lisztes, E., Marincsák, R., Racskó, M., Bohács, J., Pintér, E., Gaszner, B., Tóth, I. B., Kormos, V.: Identification of Optimal Decalcification Method and Tissue Preparation Protocol for RNAscope in Situ Hybridization in Rodent Incisor Tooth. *Dentistry Journal*. 13 (11), 1-15, 2025.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.3390/dj13110538>  
IF: 3.1 (2024)
2. **Kunka, Á.**, Lisztes, E., Bohács, J., Racskó, M., Kelemen, B., Kovalecz, G., D. Tóth, E., Hegedűs, C., Bágyi, K., Marincsák, R., Tóth, I. B.: TRPA1 up-regulation mediates oxidative stress in a pulpitis model in vitro. *Br. J. Pharmacol.* 181 (17), 3246-3262, 2024.  
DOI: <http://dx.doi.org/10.1111/bph.16386>  
IF: 7.7

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 10,8**

**A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 10,8**

A DEENK a Jelölt által a Tudóstérbe feltöltött adatok bibliográfiai és tudásmetriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2025.11.19.

