

EGYETEMI DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

Humán szem eredetű szöveti őssejtek tenyésztése és karakterizálása –szerepük az egészség és betegség közötti egyensúly fenntartásában

Dr. Albert Réka

Témavezető: Dr. Petrovski Goran, PhD



DEBRECENI EGYETEM

KLINIKAI ORVOSTUDOMÁNYOK DOKTORI ISKOLA

DEBRECEN, 2014

Humán szem eredetű szöveti őssejtek tenyésztése és karakterizálása –szerepük az egészség és betegség közötti egyensúly fenntartásában

Értekezés a doktori (PhD) fokozat megszerzése érdekében

a klinikai orvostudományok tudományágban

Írta: Dr. Albert Réka okleveles orvos

Készült a Debreceni Egyetem Klinikai Orvostudományok doktori iskolája

keretében

Témavezető: Dr. Petrovski Goran, PhD

A doktori szigorlati bizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Dr. Gócza Elen, PhD

A doktori szigorlat időpontja: DE ÁOK Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet könyvtára
2014.09.05. 11óra

Az értekezés bírálói:

Prof. Dr. Tara Moore, PhD
Dr. Fodor Mariann, PhD

A bírálóbizottság:

elnök: Prof. Dr. Szabó Gábor, az MTA doktora
tagok: Prof. Dr. Vereb György, az MTA doktora
Prof. Dr. Tara Moore, PhD
Dr. Fodor Mariann, PhD
Dr. Gócza Elen, PhD

Az értekezés védésének időpontja: DE ÁOK Belgyógyászati Intézet „A” épület tanterme
2014.09.05. 13 óra

1. Bevezetés

A látás a vizuális ingerek egy, a külvilágot és a látókérget összekötő, komplex rendszer általi feldolgozás eredménye. A WHO 2012-es adatai szerint a világon 285 millió látáskárosult ember él, melyből 39 millióan vakok. Minden igyekezetünk ellenére azonban számos látáskárosodáshoz vezető betegségnek nincs definitív terápiája.

Az emberi szem egy, az orbita elülső felébe beépített, kicsinyített fényképezőgéphez hasonlít: a szemhéjak a zárszerkezet, a pupilla a nyílás, a cornea és a lencse állítja a fókusz távolságot, a retina pedig a fényérzékeny papír megfelelője.

Az emberi szem 3 koncentrikus rétegből áll 1) kötőszövetes réteg, 2) érhártya, 3) ideghártya. A szaruhártya tiszta, transzparens, óraüveg-szerűen illeszkedik a szem elülső felszínére. 6 rétegből áll, melyek a felszíntől befelé haladva sorban a következők: cornea epithel réteg, Bowman membrán, stroma, Dua réteg, Descemet membrán és endothel réteg.

A cornea epithel többrétegű, el nem szarusodó laphám, mely védelmet nyújt a külső behatásokkal szemben a szem belső rétegei számára. A szaruhártya vastagságának kb. 90%-át a stroma párhuzamosan rendezett kollagénrostjai teszik ki. Ez a rendezett struktúra biztosítja a cornea transzparenciáját. A kollagénrostok és proteoglikánok termeléséért felelős keratocyták mellett számos más sejtféleség is pl. fibroblasztok, mesenchymális őssejtek (MSC) és immunsejtek is megtalálhatók a kollagénrost rétegek között. A cornea endothel sejtek egyrétegű hámot képeznek a szaruhártya belső felszínén és aktív pumpájuk segítségével jelentősen hozzájárulnak a szaruhártya transzparenciájának megőrzésében. A cornea átlátszósága a kollagénrostok rendezettségének, az érmentességének és az endothel sejtek megfelelő funkciójának köszönhető.

A középső réteg az érhártya vagy uvea, mely a szivárványhártya, sugártest (CB) és chorioidea együtteséből áll és a retina vérellátásáért felelős. A CB és iris felépítése hasonló: mindkettő egy pigmentált és nem-pigmentált epithel rétegből áll, ami megfelel a retina (neuroretina és pigmentált epithelium) rétegei folytatásának, valamint egy kötőszöveti rétegből, ami izmokat és ereket tartalmaz. A CB nem pigmentált epithel rétege felelős a csarnokvíz termelésért.

A szemlencse egy bikonvex, transzparens szövet 3-20Dioptria törőerővel.

A szemgolyó legbelső rétege a retina, ami fényérzékítő- és átalakító tulajdonsággal bír. A retina CB-vel határos része az ún. ora serrata. A retina 10 rétegből a belső 9 réteget együttesen neuroretinának nevezzük, a legkülső a retina pigment epithel réteg, mely egy rétegű, erősen pigmentált sejtekből (RPE) áll. Az RPE és az alatta lévő Bruch membrán

együttesen képezi a vér-retina gátat, mi több az RPE sejtek jelentősen hozzájárulnak a megfelelő fotoreceptor funkcióhoz, azáltal, hogy szabályozzák a hozzájuk jutó fény mennyiségét, fagocitálják a lehámló külső-szegmentumokat, növekedési faktorokat és citokineket termelnek és az A-vitamin bioszintézisében is szerepet játszanak. A fotoreceptor réteg csapokat és pálcikákat tartalmaz. A belső magvas rétegében található Müller sejtek a retinára jellemző fő gliális sejtípus, mely támasztószövet funkcióval bír.

A chorioidea 3 rétegből épül fel, az erek lumenének átmérője a rétegmélységétől függ.

Fejlődéstanilag a szem felépítésében mindhárom csíralemez részt vesz (neuronális ektoderma, felszíni ektoderma, velőcső és mezoderma). A szem fejlődésében résztvevő szabályozó molekulák közül az egyik legfontosabb PAX6. Az SHH expresszió indítja be a szemhólyagok előboltosulását; továbbá felregulálja a PAX2 és csökkenti a PAX6 gének kifejeződését a szemtelep középső részében, így elindítva a látóideg formálódást. A szemlencse kialakulásában a PAX6 és számos egyéb transzkripciós faktorral együttműködve pl. BMP-4 (a szemhólyag által termelt), SOX2 és LMAF vesz részt. A látóidegfő kialakulását a FGF és TGF β expresszió szabályozza, olyan transzkripciós faktorok mellett, mint MITF és CHX10.

A szaruhártya fejlődése gén szinten szigorúan szabályozott folyamat melyben számos transzkripciós faktor és jelátviteli útvonal szerepel, a folyamat részletei azonban még nem definiáltak.

Az ún. neuroprogenitor sejtek egyedi transzkripciós faktor mintázattal rendelkeznek, fejlődéstani eredetük és differenciációs elkötelezettségük miatt. A retinális őssejtek (RPC) végső differenciációs formájuk alapján tovább csoportosíthatóak.

Általánosságban az őssejtek olyan, nem differenciált sejtek, melyek asszimmetrikus osztódásuk révén önmegújító tulajdonsággal rendelkeznek: létrehoznak egy őssejtet és egyik leánysejtet, mely képes speciális sejté differenciálódni.

Három őssejtípust különböztetünk meg: embrionális őssejt (ESC), ún. indukált pluripotens őssejtet (iPSC) és felnőtt vagy szöveti őssejtet/progenitor sejtet (PC). A PC-k multi-, oligo- vagy unipotent és limitált proliferációs kapacitással rendelkeznek.

Annak ellenére, hogy az utóbbi 10 évben az őssejt-biológia sokat mennyit fejlődött, a klinikai gyakorlatba való átültetés sokkal lassabb folyamat. Napjainkban csupán néhány helyzetben alkalmazunk őssejt-terápiát számos megoldatlan probléma miatt. Az emberi szervezetben számos szövetben találunk PC-ket pl. csontvelő, vázizomzat, szív, agy, bőr, szem. Ezek a sejtek csak annak az adott szövetnek a sejtjeivé tudnak differenciálódni, amelyben

megtalálhatóak; ugyanakkor *in vitro* körülmények között tenyésztethetők, de osztódási kapacitásuk limitált

A PC-k felhasználása relatíve biztonságos az autológ transzplantáció, ill. az etikailag elfogadott alternatív források miatt. A szem különböző részeiben írtak találtak már PC-eket, köztük a szaruhártyában és a retinában is. Viszonylag alacsony sejtszámban, ún. „össejt-niche”-ekben található és biztosítják az adott szövet sejtjeinek megújulását. Szövettípustól függően az PC-k lehetnek aktívak (limbus), vagy kevésbé aktívak (retina).

A szaruhártya epithel sejtek folyamatosan pótlódnak a limbális epitheliális össejtekből (LESC), a retina sérülése azonban visszafordíthatatlan károsodást okozhatnak és bár vannak PC-k jelenlétére utaló bizonyítékok, a retinát egy limitált regenerációs kapacitású szövetnek tartjuk.

LESC-k

Napjaink legsikeresebb össejt-terápiás eljárása a LESK-kel való cornea epithel regeneráció. A limbus egy kb. 1.5-2 mm széles gyűrű; a cornea és a sclera határán, mely kriptákból és ún. Vogt-paliszádokból épül fel. A cornea epithel a limbus felől pótlódik és újul meg. A corneo-sclerális határ szövettani vizsgálatai megerősítették a PC-k jelenlétét a kripták alsó sejtrétegében. Úgy tartjuk, hogy a LESK-k aszimmetrikus osztódás következtében tranziensen amplifikálódó sejteket hoznak létre (TAC), ezek tovább osztódnak, leánysejtjeik terminálisan differenciált sejtekké alakulnak, miközben a felszín felé és centrálisan vándorolnak, amíg le nem hámlanak.

Limbus hiányos állapotokban a regenerációs kapacitás erősen korlátozott. Egyes kutatócsoportok oligopotens sejteket mutattak ki egerek centrális corneájában.

Sajnos nem ismert a PC-kre, sem azon belül specifikusan a corneális össejtek kimutatására alkalmas marker, ezért bizonyos morfológiai tulajdonságok (kis sejt méret, nagy mag/citoplazma arány) (megléte vagy hiánya), továbbá specifikus fehérje és génexpressziós mintázat együttes vizsgálata alapján következtetünk a sejt differenciációs állapotára.

Egy ezeket a tulajdonságokat összefoglaló táblázat megléte segítené a különböző munkacsoportok eredményeinek összevetését, valamint az egyes PC szubpopulációk definiálását.

LESC Deficiencia (LESCD)

Az LESCD egy olyan öröklődő vagy szerzett kórkép, melyben az LESK-k hiányoznak vagy károsodtak. LESCD-hez vezető leggyakoribb genetikai eltérés az aniridia, míg a leggyakoribb szerzett okok közé a kémiai anyag okozta maródások, égések és a gyulladós állapotok, mint

például a Stevens-Johnson szindróma, okuláris cicatricial pemphigoid és krónikus limbitis), tartós kontaktlencse viselés okozta toxicitás, mechanikai irritáció, extenzív kryotherápia és sugárzás vagy sebészi beavatkozás. A definitív therápia minden esetben az egészséges LESC-vel sejtekkel való pótlás. Allo-és autograftokat gyűjthetünk és transzplantálhatunk, azonban az elégtelen mennyiségű cornea donor és graft rejekció miatt az autológ vagy homológ LESC-k *ex vivo*, ill. *in vitro* expansziója kerül előtérbe.

Habár a sejterápiás eljárásoknak állati anyag-mentesnek kellene lenniük, a legtöbb LESC tenyésztéséről szóló standardizált protokoll állati eredetű FCS-t, növekedési faktorokat, hormonokat, vagy kolera toxint tartalmazó tápfolyadékot használ, ill. egér eredetű 3T3 fibroblasztokat feeder sejtként. Az állati eredetű anyagok használata prionok és egyéb -esetleg napjainkig még fel nem ismert- betegségek átvitelének kockázatát hordozza magában.

Az LESC-k tenyésztésének segítésére számos hordozót vizsgáltak már: a szintetikustól (hőérzékeny polimerek, kitoszán-zselatin biopolimerek, kontaktlencse, kompresszált kollagén) a természetes alapanyagokig (fibrin mátrix, humán amnion membrán (HAM), szemlencse-tok).

A legtöbb klinikai vizsgálatban az intakt vagy epithel-mentesített HAM-ot használják, mivel az gátolja a kötőhártya epithel terjeszkedését és megfelelő talajt biztosít az egészséges epithel növekedésnek, ugyanakkor olyan növekedési, anti-angiogenikus és anti-inflammatórikus faktorokat tartalmaz, ami megelőzi vagy csökkenti a gyógyuló szövet hegesedését. A HAM használatának legnagyobb hátránya az, hogy a szövet nem transzparens.

A tenyésztett sejtek transzplantációja különböző biológiai (humán sejtmentesített amnion membrán és szemlencse tok) és művi hordozók segítségével lehetséges.

Retinális őssejtek

Az emberben a neuroretina és a központi idegrendszer egyéb részei a retinogenezis/neurogenézis befejeződését követően csökkent regenerációs képességű szövetekké válnak. Ennek ellenére jelentős kutatások folynak, NPC-k felderítését célozva a humán retinában. Az egyik potenciális területnek a CB epithelt (CBE) tartják, mivel az fejlődéstanilag a neuroretinához hasonlóan neuroektodermális eredetű, valamint az alacsonyabb rendű gerincesekben a retinán belül jelentős regenerációs kapacitást figyeltek meg. Ezekben a fajokban az ún. ciliaris marginális zónában (CMZ) az őssejtek élethosszig fennmaradnak és képesek a neuroretina és a RPE sejteket pótolni, pl. új neuron képződést írtak le a retina periférián csirkékben egy hónappal a kikelés után.

A retinogenezis során -a CMZ-nek megfeleltethető- humán CBE-ban is vannak NPC-k, és feltételezzük, hogyha azok a felnőtt emlős szemben is jelen vannak, akkor képesek a retinasérülésekre proliferációval és az érintett területre való migrációval válaszolni.

Definitív NPC marker hiányában, morfológiai vizsgálatok, valamint az őssejt és differenciált sejtek gén és fehérje szintű együttes vizsgálata, továbbá differenciációs kísérletek szükségesek az NPC fenotípus igazolására.

Úgy gondoljuk, hogy az őssejtek egy speciális, védelmet nyújtó mikro környezetben találhatóak, *in vivo*. A gömb-szférák, ún. "*in vitro niche*"-k, különböző ingereket és megfelelő környezetet biztosítanak a benne lévő sejteknek. NPC-ről tudjuk, hogy képesek ilyen szférákat létrehozni akár egyetlen sejtől is, mitogéneket tartalmazó tápfolyadékban („neurosphere formation assay”). Ugyanakkor csak a több passzálon át való folyamatos szféra-képződés bizonyítja az önmegújító és indukálható proliferációs kapacitását. Ahhoz, hogy egy sejtet retinális őssejtnek lehessen nevezni, képes kell legyen érett retinasejteket létrehozására, a differenciált sejt pedig a szövet-specifikus funkciói ellátására, mely elengedhetetlen a sikeres őssejt terápiához.

A Retina Degeneratív Betegségei

Világszerte, emberek milliói szenvednek különböző mértékű látáscsökkenéssel járó, degeneratív retina betegségben. Ezek a betegségek egy igen diverz betegségcsoportot hoznak létre, melyre a retinális sejtek folyamatos károsodása végül pusztulása jellemző (AMD, retinitis pigmentosa, glaucoma, retina leválás (RD)).

A RD okait két nagy csoportba oszthatjuk: rhegmatogén és nem-rhegmatogén esetek. Teljes vastagságú neuroretina sérülés, lehetővé teszi a folyadék beáramlást a lyukak szakadások mentén így elválasztva a neuroretinát az alatta lévő RPE rétegtől, kialakítva az ún. rhegmatogén RD-t. A vitreoretinális membrán kontrakciója retina szakadások nélkül létrehozhat ún. trakciós leválást. Amikor a leválást a retina rétegek közötti szubretinális folyadék okozza - mely neuroretinális ér- vagy chorioidea-eredetű- exudatív ablationak nevezzük. Üvegtesti térbe törő vérzések, traumás vagy retina műtétek okozta gyulladások növelik proliferatív vitreoretinopathia (PVR) kialakulásának veszélyét. A rendszeres szemészeti vizsgálat, a retina leválás korai felismerése és kezelése megakadályozhatja a PVR kialakulását. PVR-ben a retina sejtek károsodása miatt az NPC jelenlétére utaló jeleket várunk.

2. Célkitűzések

- Össejtek izolálása a humán cornea limbus őssejt niche-ből.
- LESC-k tenyésztése olyan tápfolyadékban mely nem tartalmaz csupán humán szérumot, mint tápanyag-forrást.
- *Ex vivo* expandált LESC-k jellemzése morfológiai (fénymikroszkópia, szövettan) és molekuláris biológiai (transzkripciós vizsgálatok, áramlási cytometria, immunfluoreszcens festés, kolónia formációs assay) vizsgálatokkal.
- A LESC-k *in situ* vizsgálata.
- Az emberi szemlencse-tok (LC), mint LESC transzplantációban használatos biológiai hordozó vizsgálata.

- Össejtek izolálása a humán CB és retina periféria (RP) őssejt niche-ből.
- CBE/RP eredetű sejtek adherens monolayer vagy nem-adherens szféra formában való tenyésztése.
- *Ex vivo* expandált CB/RP-eredetű sejtek jellemzése morfológiai (fénymikroszkópia, transzmissziós elektronmikroszkópia) és molekuláris biológiai (transzkripciós vizsgálatok, immunfluoreszcens festés) vizsgálatokkal.
- A fent említett sejtek *in situ* vizsgálata.

- A fent említett őssejtek szerepének részletezése fiziológias és pathológias körülmények között.

3. Anyagok és módszerek

Etikai Engedélyek

Minden izolálás a Helsinki Deklarációban foglalt irányelveknek megfelelően, a Regionális Etikai Bizottság engedélyével (DE OEC: 3094-2010) történt. Az állatkísérletek az ARVO Nyilatkozat irányelveinek megfelelően zajlottak.

LESC-k Izolálása

A limbális szövetet cadaverekből izoláltuk, a halált követő 12 órán belül. A donorok (férfi:nő aránya 4:3) átlagéletkora 70 ± 9.3 év volt. A szemek alapos Betadinos fertőtlenítését követően, a kötőhártya felpreparálása után, két koncentrikus kört rajzoltunk a corneo-sclerális határtól 0.25mm-re a tiszta corneára és a sclerára. Ezután a kb. 0.5 mm széles limbális gyűrűt lamelláló késsel preparáltuk az epithel rétegben felszínesen haladva. A limbális gyűrűt $2 \times 2 \times 0.5$ mm –es darabokra vágtuk, majd epitheliális felszínükkel felfelé tenyésztőedényre, ill. üveglemezre vagy előzőleg sejtmentesített –szövődménymentes szürkehályog ellenes műtétek során nyert -humán szemlencse-tokra helyeztünk. A LC epithel sejtek eltávolításához 0.025% trypsin-EDTA előkezelést (20 perc, 37°C) végeztünk.

Retinális és CBE Sejtek Izolálása

A szem elülső szegmentumának eltávolítását követően minden esetben (PVR-től függetlenül) a CB és retina szövetek elválasztása után Leibowitz-15 médiumba vagy 10 percre trypsin-EDTA (0.05%, Invitrogen) oldatba kerültek. Alapos szuszpendálást követően a sejteket egy $70 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű szűrőn átréselve ún. „single cell” formában 150 000 sejt/mL-es végkoncentrációban vettük fel.

Üvegtesti Minták

Az üvegtestből a mintákat pre-operatív fundus vizsgálat során diagnosztizált PVR-es és nem-PVR-es retina leválás miatti vitrectómiák során gyűjtöttük. Azok az esetekben, ahol a vitrectomia során retinotómiát, retinectomiát végeztek, vagy műtét során retina szakadása is bekövetkezett, kizárásra kerültek. A mintákat centrifugáltuk (15000 rpm, 5 perc), a nyert pelletet 4% PFA-ban fixáltuk és festettük, vagy *in vitro* tenyésztettük.

Egér Minták

A PVR kialakulásához kapcsolódó patológiai eltérések vizsgálatához, egérszemekbe intravitreálisan proteolitikus enzimet (diszpáz) injektáltunk. A diszpázzról ismert, hogy gliális aktivációt valamint epi- és szubretinális membránképződést okoz. 4-6 hónapos, vad típusú

(C57/BL6, n=6) nőtény egerek általános (pentobarbital (90 mg/kg i.p.)) és lokális (1%Novocaine (procaine hydrochloride)) érzéstelenítését követően egy csepp Mydrum (tropicamide) adásával iris dilatációt értünk el. Mikroszkóp segítségével 4 µL diszpázt (Sigma; 0.4 U/mL, steril fiziológiás sóoldatban) intravitrealisan adtunk a jobb szembe automata pipettára erősített 30G 1/6 tűvel. A kontroll állatok 4 µL steril fiziológiás sóoldatot kaptak a jobb szemükbe. A bal szem minden esetben kezeletlen maradt. Stratus OCT segítségével követtük a PVR formációt az injekció beadását követő időszakban. 1-2 héttel a kezelés után, amikor a PVR kialakulása evidenssé vált, a kontroll és diszpáz kezelt egerek szemgolyója is enucleálására került, majd ezután immunfluoreszcens vizsgálatra.

In Vitro Sejtenyésztés

Limbális graftokat 20% human AB szérumot, 200 mM/mL L-glutamint, 10,000 U/mL penicillin-10 mg/mL streptomycint tartalmazó DMEM tápfolyadékban tenyésztjük, 37°C, 5% CO₂ mellett. Az LESC-k LC-n való növesztéséhez, egy csepp médiumot cseppentettünk a sejtenyésztő edény aljára, melynek segítségével a LC-t kiterítettük, majd annak közepére helyeztük a graftot. Miután a szövetdarab megtapadt a LC-n ill. a tenyésztő edény alján, a tápfolyadékot 1 mL -re egészítettük ki, majd kétnaponta cseréltünk. A sejtenyésztet fáziskontraszt mikroszkóppal rendszeresen monitoroztuk. Azokat a graftokat melyek 24 órán belül nem mutattak sejtnövekedést kizártuk a vizsgálatból, csökkentve a fibroblasztos szennyeződés esélyét.

A letapadó humán retinális őssejtek, valamint CBE-ből és a PVR-es betegek üvegtestjéből izolált szférák B27 (2%), EGF (20 ng/ml), bFGF (10 ng/ml), 1% FCS, heparin (2.5 mg/ml) és penicillin/streptomycin (100 U/ml) tartalmú DMEM/F12 tápfolyadékban tenyésztettük, 37°C-on, 5% CO₂ tartalom mellett. A szférák tápfolyadékához hetente két alkalommal bFGF és EGF-t adtunk, 2-3 hetente passzáltuk 2-4 perces trypsin-EDTA (0.05%) kezelést követően.

LESC

Életképesség Vizsgálat és Sejthalál Analízis

A sejthalál analízist Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit (MBL, Woburn, MA, USA) segítségével végeztük, a gyártó leírása szerint. Az Annexin-V és PI pozitív sejtek arányát áramlási cytométeren (FACSCalibur) mértük le és az eredményeket WinMDI szoftver segítségével elemeztük ki. A sejtek életképességét MTT assay segítségével vizsgáltuk, a gyártó által ajánlott protokoll szerint.

Szövettan és Immunfluoreszcens Festés

Az üveglapocskákra ill. LC-re növesztett LESC-eket 4% PFA-ban fixáltuk. A LC-re növesztett LESC-eket paraffinba ágyasztuk, metszettük, majd hematoxylin-eozinnal (H&E) festettük. Az üveglapocskákra növesztett sejteket p63, ABCG2, CK19, CK8/18, Vimentin és Ki67 ellenes elsődleges- és fluoreszcensen jelölt másodlagos antitesttel, a sejtmagot DAPI-val jelöltük. A festések kiértékeléséhez ZEISS Axio Observer.Z1 (ZEISS, Oberkochen, Germany) mikroszkópot használtuk.

Sejtfelszíni Markereinek Detektálása Áramlási Cytometriával

A tenyésztett LESC-k sejtfelszíni molekuláinak jellemzésére FITC-, PE-, APC-jelölt antitesteket használtunk. Vizsgáltuk a CD34, CD44/HCAM, CD45, CD49f/Itg α 6, CD73, CD144/VE-Cadherin, CD147/Neurothelin (BD Biosciences, San Jose, CA, USA); CD49a/Itg α 1 (Biolegend, San Diego, CA, USA), CD14, CD29/Itg β 1, CD31/PECAM, CD47, CD49b/Itg α 2, CD56/NCAM, CD90/Thy-1, CD104/Itg β 4, CD105/Endoglin, CD117/c-kit, CD146/MCAM, CD166/ALCAM, CXCR4, HLA-DR, PDGF-R β , VEGFR2/KDF és CD133 molekulák expresszióját. A kapott mintázatot, a jól ismert és karakterizált csontvelői eredetű mesenchymális őssejtekével (bmMSC) hasonlítottuk össze.

A specifikus sejtfelszíni szénhidrát-mintázatot Lectin analysis kit (Vector Labs, Burlingame, CA) segítségével vizsgáltuk: sziálsav (WGA: Wheat germ agglutinin (*Triticum vulgare*)); N-acetilglükózaminok (STL: Potatoe lectin (*Solanum tuberosum*), DSL: *Datura stramonium* lectin (*Datura stramonium*), ECL: *Erythrina cristagalli* lectin (*Erythrina cristagalli*), LEL: Tomato lectin (*Lycopersicon esculentum*), GSL II: *Griffonia (Bandeiraea) simplicifolia* lectin II (*Griffonia simplicifolia*)); mannóz (ConA: Concanavalin A (*Canavalia ensiformis*)); galaktóz N-acetilgalaktózaminok (RCA: *Ricinus communis* Agglutinin (*Ricinus communis*), PNA: Peanut agglutinin (*Arachis hypogaea*), AIL: Jacalin (*Artocarpus integrifolia*), VVA: Hairy vetch agglutinin (*Vicia villosa*), DBA: Horse gram lectin (*Dolichos biflorus*), SBA: Soy bean agglutinin (*Glycine max*)) és fukóz (UEA: *Ulex europaeus* agglutinin (*Ulex europaeus*)). A mintákat áramlási cytométerrel (FACSCalibur) vizsgáltuk, az eredményeket WinMDI szoftver segítségével elemeztük ki.

Microarray Analízis

A tenyésztett LESC-eket 28869 gén vizsgálatára alkalmas Affymetrix GeneChip Human Gene 1.0 ST Array (Affymetrix, Santa Clara, CA) segítségével elemeztük. A transzkriptom analízishez 150 ng totál RNS-t izoláltunk a tenyésztett LESC-ből, ill. differenciált cornea epithelsejt-kaparárból (kontroll), majd a mintákat Ambion WT Expression Kit és GeneChip

WT Terminal Labeling Kit segítségével dolgoztuk fel. A két csoportban tapasztalt eltérő expressziós mintázatot egyirányú ANOVA és klaszter analízis (Partek Genomics Suite Software) módszerekkel értékeltük.

Kolónia Formáló Assay

Az LESC-k kolóniaformáló képességének vizsgálata céljából a sejttenyésztő edényen ill. LC-n növe LESC-eket összegyűjtve (n=4), azokat 3000 sejt/cm² koncentrációban, előzetesen zselatin (0.1%), fibronectin (10 ng/mL) vagy MethoCult kezelt 6 lyukú sejttenyésztő edénybe tettük. A mintákat a 7. Napon 4% PFA-ban fixáltuk, majd kristályibolyával (0.5% w/v) vagy fluoreszcensen jelölt sejtmag (Hoechst 33342) aktin (FITC konjugált) ellenes antitesttel festettük. Kiértékeléshez Olympus IX81 invertált mikroszkópot és ScanR (Olympus) szoftvert használtunk.

A Tenyésztett Retina, CB és Üvegtest Eredetű Minták

Szöveti és Immunofluoreszcens Vizsgálat

4% PFA-val való fixálás és paraffinba ágyazás előtt, a szférákat plazma és thrombin segítségével alvadékba kötöttük, majd a metszeteket H&E festettük. A gömbökben N-cadherin, Claudin1, GFAP, Nestin, β -III-tubulin, Rhodopsin, Ki-67, Sox2, Pax6, RPE65 és ABCG2 expresszióját vizsgáltuk (sejtmag: Hoechst 33342). Az elemzést Olympus BV 61 FluoView konfokális mikroszkóp és ZEISS Axio Observer.Z1 fluoreszcens mikroszkóp segítségével végeztük.

Transzmissziós Elektron Mikroszkópia

Frissen készített aldehides fixálóban (0.1 M nátrium-kakodilát puffer, 2% glutáraldehid, 2% PFA, 0.025% kalcium klorid (pH 7.4)) 30-60 percig szobahőmérsékleten, majd éjszakán át 4°C-on fixáltuk a szférákat. 1% ozmium tetroxidos utófixálást és dehidratálást növekvő alkoholsorban végeztünk. 20 perces propilén-oxidos áztatást követően a gömböket Epon-ba ágyaztuk. Ultravékony metszeteket (60-70 nm) készítettünk Leica Ultracut Ultramicrotome UCT segítségével, majd a mintákat Urania-acetáttal és nitráttal festettük, végül Tecnai12 transzmissziós elektron mikroszkóppal vizsgáltuk.

Kvantitatív Polimeráz Láncreakció (qPCR)

qPCR-t végeztünk a P1 passzázsszámú, PVR-es betegek üvegtestjéből származó szférák és két, korábban már leírt, NPC-nek feltételezett sejtípus - Müller-glia fenotípusú retinális- és *in vitro* pigmentált szférákat létrehozó CBE sejtek- összehasonlítása végett. TRIzol reagens

segítségével teljes RNS-t izoláltunk a gyártó ajánlása szerint, majd High Capacity cDNA Archive Kit segítségével reverz transzkripcióval írtuk cDNS-sé. A qPCR-t StepOnePlus RT-PCR rendszer és Taqman Gene Expression assay-k segítségével a gyártó utasításai szerint végeztük (95°C 10percen át, 40 ciklus 15 másodperces 95°C és 60°C 1 percig). A génexpressziós szintek meghatározására az ún. comparative cycle threshold (Ct) módszert alkalmaztuk majd CBE szférák génexpressziójához normalizáltuk.

In Situ Vizsgálatok

A humán limbus kereszt-, valamint PVR-es ill. kontroll cadaver és egér szemek hátsó szegmentumának axiális irányú metszetein vizsgáltuk az őssejtmarkerek lokalizációját.

A teljes vastagságú cadaver limbusokat 4% PFA-ban fixáltuk majd paraffinba ágyaztuk. H&E-nal és immunfluoreszcensen jelöltünk anti-CD34, CD45, CD144/VE-Cadherin, CD144/HCAM, CD146/MCAM and CD166/ALCAM antitestekkel, majd detektáló másodlagos antitestekkel.

A PVR-es és kontroll cadaver szemek hátsó szegmentumaiban, 4% PFA-s fixálást és paraffinba ágyazást követően, immunfluoreszcens festéssel N-cadherin, Claudin1, GFAP, Nestin, Rhodopsin, Sox2, Pax6 és ABCG2 expressziót vizsgáltunk.

A kontroll és diszpázzal injektált egér szemek egészben lettek fixálva 4% PFA-ban. Fagyasztómédiumba való beágyazást követően, 10 µm-es metszeteket készítettünk, melyeket felhasználásig -20°C-os fagyasztóban tároltunk. Immunfluoreszcens festést Claudin1, GFAP, Nestin és Sox2 kimutatására végeztünk.

Statisztikák

Minden vizsgálatot legalább három, egymástól független módon ismételtünk meg, és minden mintát triplikáltunk. Immunfluoreszcens festéseknél a pozitív sejtek aránya 2 független vizsgáló által, 5 független metszeten számolt sejt alapján került meghatározásra. Az eredményeket átlag±SD formában adtuk meg. Csoportok közötti különbség vizsgálatára kétmintás t-próbát alkalmaztunk, SPSS v18.0 program segítségével. Szignifikancia szinteket a következő módon jelöltük: $p < 0.05 = *$, $p < 0.01 = **$, $p < 0.001 = ***$.

4. Eredmények

Tenyészett LESC-k

Tenyésztés és Életképesség Vizsgálat

Már az izolálást követő első 24 órában figyeltünk meg sejtosztódást a limbális graftokból. A kinövő sejtek intakt aktin cytoszkeletonnal és epitheliális morfológiával rendelkeztek, valamint konfluens sejtréteget alkottak a 2. hét végére a sejttenyésztő edények alján és többrétegű hámot hoztak létre a LC-n 7 nap alatt. MTT assay alapján az LESC-k életképessége mindkét vizsgálati időpontban (7. és 14. tenyésztési nap) 97% feletti volt, összhangban az Annexin-V-FITC Apoptosis Detection Kit-tel mért apoptotikus sejtek számával (korai apoptotikus: annexin V-FITC⁺<2%; késői apoptotikus: annexin V-FITC⁺/PI⁺<1%).

Szövetan és Immunfluoreszcens Festés

Habár nem ismert olyan definitív őssejt-marker, amivel a szöveti őssejteket vagy akár a corneális őssejteket lehetne azonosítani, jelen vizsgálatban egy különböző markerekből álló egyezményes vizsgálati panel és néhány, eddig még nem vizsgált marker segítségével jellemeztük a tenyésztett sejteket. Munkánk során a LC-n növényő LESC-k CK8/18/Ki-67, CK19, ABCG2, p63 α /Vim expresszióját elemeztük immunfluoreszcens festéssel. Mintáinkban erős CK8/18 festődést és helyenként Ki-67-tel (proliferációs marker) való ko-lokalizációt figyeltünk meg, bizonyítva ezzel a sejtek osztódó képességét és corneális epithel irányú differenciációs potenciálját. Putatív őssejt-markerek, mint CK19, szórványos cytoplazmatikus festődést mutatott; ABCG2-t az LESC-k citoplazmájában és sejtmembránhoz kötötten is láttunk; a sejtmagi p63 α -t és cytoplazmatikus Vim ko-lokalizációját a LC-n növényő LESC-k többségében tapasztaltuk –bizonyítva a tenyésztett LESC-k progenitor jellegét. A limbus szövetből készült metszeteken végzett *in situ* immunfluoreszcens jelölésekből egyértelműen látszott, hogy a LESC-k nem-haematopoetikus, -endotheliális vagy –mesenchymális őssejt jellegűek, ugyanakkor sikerült olyan, eddig nem vizsgált markereket, mint CD44/HCAM a limbális epithelium apikális-, CD146/MCAM és CD166/ALCAM bazális rétegében lokalizálni.

Sejtfelszíni Markereinek Detektálása Áramlási Cytometriával

A LC-n növényő LESC-k felszínén áramlási cytométerrel vizsgáltuk a haematopoetikus, -endotheliális és –mesenchymális sejtekre jellemző markerek expresszióját, és hasonlítottuk

össze bmMSC-ével. A haematopoetikus sejtekre jellemző CD45, CD34, CD133 and HLA-DR az LESC-k felszínén nem volt detektálható. A CD14, CD117/c-kit (korai progenitor/pluripotens őssejt marker) és CXCR4 (migráló sejtekre jellemző) enyhén, de a bmMSC-hez képest szignifikánsan több sejten fejeződött ki ($p < 0.05$, $p < 0.01$). A CD47 magas expressziója a sejtek viabilitását és immunkompetenciáját mutatja. Az általános endothelsejt-markerek, mint CD31/PECAM vagy VEGFR2/KDR, nem voltak detektálhatóak, kizárva a tenyészet endothelsejt-kontaminációját. A bmMSC-hez képest szignifikánsan nagyobb volt az LESC-k CD144/VE-Cadherin ($p = 0.0321$) és CD104/Itg $\beta 4$ ($p = 0.0458$) expressziója. Szignifikáns különbségeket találtunk ($p < 0.001$) a legfőbb mesenchymális őssejt-markerek tekintetében is: csupán az LESC-k 12%-nak felszínén fejeződött ki a CD90/Thy-1 ($p = 0.000032$) és kevesebb, mint 50%-uk volt CD105/Endoglin pozitív ($p = 0.0006$). Ezzel szemben nem volt szignifikáns különbség a CD73, CD147/Neurothelin és PDGF-R β expressziójában LESC és bmMSC között. Vizsgáltuk a sejt-adhéziónak és integrinek jelenlétét is, a sejt-sejt közötti és sejt-extracelluláris mátrix közötti kapcsolatok létrehozásában betöltött szerepük miatt. A CD29/Itg $\beta 1$, CD49a/Itg $\alpha 1$, CD56/NCAM, CD146/MCAM és CD166/ALCAM expressziója a két sejt-típusban hasonló, míg az LESC-k CD44/HCAM-t kevésbé ($p = 0.00052$), CD49b/Itg $\alpha 2$ -t ($p = 0.038$) és CD49f/Itg $\alpha 6$ -t ($p = 0.008$) nagyobb arányban fejezték ki. A LC epithel sejtek áramlási cytometriás vizsgálatának célja az volt, hogy a LC-n növekvő LESC-k által a bmMSC-hez képest szignifikánsan eltérő mértékben kifejezett markerek LC epithel eredetét kizárjuk. A LC epithelsejtek felszínén CD34, CD45 és CD144/VE-Cadherin nem expresszálódott, míg a CD166/ALCAM (74.19 \pm 46.07%) alacsonyabb, CD146/MCAM (74.22 \pm 2.23%) hasonló és a CD44/HCAM (50.43 \pm 29.28%) nagyobb mértékben expresszálódott a tenyésztett LESC-hez képest ($n = 3$).

Ismert, hogy az őssejteket felszíni szénhidrát mintázatuk alapján is fel lehet ismerni és, hogy ez a mintázat a differenciálódás során változik. A leggyakoribb sejt-felszíni glikolipidek és glikoproteinek lektinokkal való vizsgálata során a LESC tenyészetben belüli szubpopulációkat fedeztünk fel. A WGA-val való festés a teljes populáción belüli magas szíálsav tartalomra utal, míg a sejtek csupán 50%-a (51.59 \pm 3.1%) mutatott erős ConA (Fluorescence Intensity Median (FI_{med}) = 2125.02 \pm 25.99) kötődést, köszönhetően az elágazó lánccú mannózok felszíni jelenlétének. Az LESC-k a galaktóz és/vagy N-acetilglükóz kötő lektinokat (RCA, JAIL and PNA) is kötötték, habár a PNA esetében alacsonyabb fluoreszcencia intenzitást (FI_{med} = 185.75 \pm 1.06) tapasztaltunk, a valószínűleg alacsony T-antigén expresszió miatt. UEA-lectin 61.1 \pm 1.97%-os fluoreszcencia intenzitást mutatott, utalva az alacsony sejt-felszíni fukóz szintre.

Microarray Analízis

Microarray analízist végeztünk a tenyésztett LESC-k és a differenciált cornea epithel sejtek (CEC) összehasonlítására. A logaritmikusan transzformált jelértékek intenzitásprofilja alapján 28869 transzkriptot nyertünk, melyből 1830 génesetében volt az expressziós változás mértéke (fold change (FC)) 2-től több (955 emelkedett és 875 csökkent), ezzel felhívva a figyelmet a két csoport közötti relatíve nagy transzkripciós profil-beli különbségre (n=3, p<0.01). A hőtérkép és a funkcionális klaszterezés során 67 gént tüntettünk fel, melyeket elsősorban az irodalomban dokumentált LESC-hez való viszonyuk alapján válogattunk ki (n=3, p<0.01). Ezek főként ion-, nukleotid- vagy fehérjekötő, receptor vagy enzim aktivitással rendelkező fehérjék génjei. Az általános epithel markerek között találtunk olyat, ami specifikusan a limbális epithelre jellemző fehérje (KRT8/KRT18, KRT14), vagy amelyik a differenciált corneális epithelre jellemző (KRT3/12). LESC-kben a KRT8 és KRT14 expressziója a CEC-ben mérthez hasonló (FC: 4.0 és 1.9, egyenként) bizonyítva a LESC-k cornea epitheliális irányba való elköteleződését. Ugyanakkor a differenciált cornea epithelsejtekre jellemző KRT3 (FC: 231.0) és KRT12 (25.8) gének alacsonyabb szinten expresszálódtak az LESC-kben valószínűleg a korábbi differenciációs állapot esetleg a megőrzött multipotens tulajdonságuk miatt. Magasabban expresszálódtak az őssejt-gének, mint a KRT19 (FC: 6.0) és VIM (FC: 4.4) a differenciált CEC-hez képest, erősítve az LESC-k őssejt jellegét. A magasabb MKI67 (FC: 3.0) expresszió pedig a nagyobb proliferációs kapacitás bizonyítéka.

Kolónia Formáló Assay

Azért, hogy megerősítsük a tenyésztett LESC-k őssejt jellegét igazoló fent bemutatott gén és fehérje vizsgálati módszerek eredményét, vizsgáltuk azok kolónia formáló képességét. Az összes vizsgált LESC tenyészet képes volt 7 nap alatt kolóniák létrehozására zselatin és fibronectin bevonaton, de MethoCult-on nem.

A Tenyésztett Retina, CB és Üvegtest Eredetű Minták

Szöveti és Immunfluoreszcens Vizsgálat

A kontroll humán szemekben a retina belső felszínén és néhány, a centrális lamináris retina (LR) Müller glia-szerű sejtjeiben találtunk Nestin pozitivitást. Viszont nem láttunk pozitivitást a pars plana (Pla) vagy plicata (Pli) perifériás részein, csak a perifériás ciszták falában (Pc). Az ilyen cisztikus degeneráció időkben gyakori, de a patológiai következménye egyelőre nem ismert. A ciszta falban lévő sejtek további két, a szem fejlődésében fontos szerepet játszó gén, Pax6 és Sox2, valamint ABCG2 pozitivitást is mutattak. N-cadherin Pi és GFAP-ta

retina periférián lévő Pc falában találtunk. A kontroll szemek CBE-je differenciált epithelsejt markereket, Claudint és N-cadherint, expresszáltak, míg NPC markert vagy Rhodopsint nem tudtunk detektálni. Rhodopsint csak a LR-ban lévő differenciált fotoreceptorok és néhány, a nem-LR (NLR) perifériáján elhelyezkedő, sejt expresszált.

A PVR-es szemekben a Nestin pozitivitás a proximális Pla területére is kiterjedt. Az ora serrata körüli sejtek nem csak Nestin de Sox2 és GFAP pozitívak is voltak. A proximális Pla területén Nestin⁺ és GFAP⁺sejteket tudtunk detektálni. A perifériás Pla, Pli vagy iris pigment epithel (IPE) területén sem Nestin, sem Sox1 vagy GFAP pozitivitást nem láttunk. PVR-es humán szemekben nem-pigmentált CBE jelentős proliferációját (Ki-67 pozitivitás) tapasztaltuk a tranzíciós a Pla és Pli közötti zónában. Néhány Rhodopsin⁺ sejt csoportosulást figyeltünk meg a PVR okozta jelentős fotoreceptor károsodástól perifériásan a NLR-ban, de a perifériás Pla, Pli vagy IPE területén sem találtunk hasonló pozitivitást.

Szövetteni és Immunfluoreszcens Vizsgálat Egérben

A kontroll egerek szemében csak néhány Nestin pozitív sejtet találtunk, azokat is a CBE területén. Pax6 vagy Sox2 pozitivitást nem láttunk, ellenben robosztus Claudin pozitivitást. A humán rendszerben tapasztaltakhoz hasonlóan PVR indukció hatására a CBE adenomatózus proliferációját, nukleáris hyperpláziát és emelkedett GFAP pozitivitást tapasztaltunk. A humánban tapasztalt eredményekkel szemben, egerekben, PVR indukció után a CBE-ben jelentős Nestin pozitivitás növekedést láttunk. A perifériás üvegtestben pedig Sox2⁺/Nestin⁺ és Nestin⁺/GFAP⁺sejteket találtunk, valószínűleg a PVR kialakulása miatt.

Retina Leválásos Betegek Üvegtestjéből Izolált Szférák Jellemzése

Szférákat a retinaleválás miatt vitrectomián átesett betegek üvegtestéből izoláltuk. PVR jelenlétét műtét előtt minden esetben tisztáztuk. Az izolált szférák immunfluoreszcens vizsgálata NPC-k detektálását célozta meg, mivel feltételezzük, hogy az NPC-k képesek a központi idegrendszer (KIR) sérüléseit (mint pl. retina leválás) érzékelve a trauma helyére migrálni. Ez a magyarázhatja a vitrectomia műtét során a vitreus bázisánál észlelt gömb-szerű képletek jelenlétét. A szférát alkotó sejtek többsége Nestin és GFAP, néhány Sox2 és Pax6 pozitív volt. Egyetlen sejt sem volt Rhodopsin (fotoreceptor marker)vagy RPE65 (RPE marker) pozitív, de volt néhány éretlen neuronsejt marker- β -III-tubulin- pozitív sejt.

***In Vitro* Tenyésztett, Retina Leválásos Betegek Üvegtestjéből Izolált Szférák Jellemzése**

A retinaleválás miatt vitrectomián átesett PVR-es betegek üvegtestjéből izolált sejtek nagyobb része tudott szférát létrehozni, mint a nem PVR-es betegből izolált sejtek. A szférákat P2

passzálásig sikerült fenntartani, bár fenntartásukra további kísérletet nem tettünk. A transzmisszióelektron mikroszkópia alapján a szférákat a perifériájukon elnyújtott, polarizált sejtek, a centrumban pedig pigmentált és nem-pigmentált, polimorf, magas sejtmag/citoplazma arányú sejtek alkotják. Erős Nestin és GFAP pozitivitást detektáltunk a szférák belsejében, míg a perifériás rész néhány sejtje β -III-tubulin expressziót mutatott. qPCR-t végeztünk a P1 passzázsszámú, PVR-es betegek üvegtestjéből származó szférák és két, korábban már jellemzett, NPC tulajdonságúnak feltételezett sejtípus - Müller-glia fenotípussal bíró retinális sejtek és a CBE területéről izolált, *in vitro* pigmentált szférákat formáló sejtek - összehasonlítására. Az összesen 9 vizsgált korai szem-telep gének közül, csupán az OTX2 és MITF mutatott szignifikáns különbséget ($p < 0.05$) a retina és CB Ct értékei között, az OTX2 inkább a retina, míg MITF inkább a CB sejteiben expresszáldott ($n=3$). CHX10 magasan expresszáldott mind a retina mind a PVR-es mintákban, így statisztikai különbséget nem találtunk. Habár az immunfluoreszcens festés a Pc-k falában Nestin és Pax6 pozitivitást mutatott, az *in vitro* tenyészetek mRNS expressziója hasonló volt. A PVR-es humán szemekből izolált szférák immunfluoreszcens festése során tapasztaltaknak megfelelően a PVR-es tenyészetek 40.4-szer nagyobb GFAP (differenciációs marker) expressziót mutatnak a CBE tenyészetéhez képest, ugyanakkor nincs különbség a GS expresszióban. A korábban differenciálódó RPE markernek vélt Tyrosinase (TYR) a CBE és PVR szférákban összehasonlítható mértékű expressziót mutattak (FC=1.34). Eredményeink alátámasztják azt a megfigyelést, miszerint CBE-eredetű sejtekben az NPC-kre jellemző markerek expressziója megemelkedik szféra-képződést indukáló tenyésztés során.

5. Megbeszélés

Napjainkban a sérülések és degeneratív betegségek kezelésében a regeneratív medicina egyre nagyobb teret nyer. Az ESC és iPSC kapcsán felmerülő nehézségek a szöveti őssejtek felhasználásának irányába mozdítja el a klinikai gyakorlatot. A szöveti őssejtek alkalmasak a retina betegségeiben és LESCD-ben a látás és diszkomfort jelentős javulásának előidézésére.

Munkánk célja limbus és CBE eredetű szöveti típusú őssejtek izolálása valamint tenyésztése volt, melyek később transzplantációra alkalmasak is lehetnek/klinikai transzplantáció céljával. A megsemmisült vagy károsodott sejtek pótlása ősz- vagy progenitor sejtekkel közvetlenül azok izolálását, vagy *ex vivo* expandálását, esetleg részleges *in vitro* differenciáltatását követően lehetséges.

Az első két esetben a paracrin hatás érvényesülése –azaz a transzplantált sejtek által szekretált trophikus faktorok idézik el a befogadó szövet önmegújító és proliferációs választ; míg az utóbbi esetben a differenciáltott sejt integrációja biztosítja a funkciójavulást.

LESCD

LESCD olyan kórkép, melyben az őssejtek és a limbus barrier-funkciója is károsodott pl. genetikai okok vagy valamilyen külső tényezők miatt. Az ESC-k számának csökkenése vagy hiánya ismétlődő és perzisztáló felszíni sérülésekhez és végül azok kötőhártya epithellel való gyógyulásához vezet – mely érújdonképződés, krónikus gyulladás és hegesedés révén a jelentős látáscsökkenést és diszkomfortot okoz. A károsodott, vagy hiányzó ESC-k egészséges sejtekkel való pótlása képes jelentősen javítani a látást. Az *ex vivo* expandált ESC-k transzplantálása különböző hordozók, pl. sejt-mentesített HAM vagy LC, segítségével lehetséges. Jelen tanulmányban a humán eredetű, epithel-mentesített LC előnyeit kihasználva –melyre előzőleg egy másik munkacsoport publikációja hívta fel a figyelmet- *ex vivo* expandált ESC-k transzplantációjára alkalmas graftot hoztunk létre. A LC könnyen hozzáférhető és a leggyakrabban végzett szemészeti (szürkehályog ellenes) műtét során, valamint cadaver szemekből is egyszerűen izolálható. Korlátozott a mérete és nem teljesen lapos, de a legnagyobb előnye a HAM-mal –és más anyagokkal- szemben, hogy transzparens és vékony. Munkánk során kombináltuk az epithel-mentesített LC, mint hordozó használatát az ESC-k állati anyag-mentesített tenyésztésével, mely során a tápfolyadékhoz csupán humán szérumot, mint egyetlen tápanyag-forrást adtunk.

Mivel nem ismert olyan definitív marker, melynek segítségével képesek lennénk a cornea epithel fenntartásáért felelős őssejteket megkülönböztetni a környező többi sejtől, jelen

vizsgálatban egy többféle markerből álló egyezményes vizsgálati panel és néhány, eddig még nem vizsgált marker segítségével bizonyítottuk a limbusból izolált *ex vivo* expandált tenyésztett sejtjeink LESC voltát.

Ismert őssejt markerek -TP63/ Δ p63 α , ABCG2, CK19 and VIM/vimentin- gén és fehérje szintű expressziója a sejttenyészetben őssejtek jelenlétére utal. A sejt kultúrában lévő, erősen p63 α pozitív sejtek aránya használható a transzplantáció kimenetelének jóslására mivel megfigyelések szerint több mint 3% p63 α ⁺ sejt jelenléte jó prognózisú. Tehát csupán azon tenyészetek felhasználásának van értelme, melyekben a p63 α ⁺ sejtek aránya a 3%-ot meghaladja. A p63 α ⁺ sejtek aránya alapján pedig lehetne a sejttenyészetek tisztaságát minősíteni. Az LESC tenyészetekben egy alpopulációt tudunk megkülönböztetni a Hoechst 33342 magfesték ABCG2 transzporterrel keresztüli kipumpálása alapján. Ezek az alpopulációk nemcsak ABCG2-t de p63 α -t is magasabban expresszálnak és jobb kolóniaformáló kapacitással is rendelkeznek.

CK19 expresszióval kapcsolatban az irodalmi adatok megoszlanak –egyes csoportok a CK19-et, mint a kötőhártya epithel markerét, mások, mint LESC markert használják. Az általunk végzett gén array analízis során a CK19 expresszió emelkedését tapasztaltuk a differenciált cornea epithelhez képest. Az LESC-k az őssejt markerek jelenléte mellett, magasabb proliferációs potenciált (MKI67 expresszió és Ki67 pozitivitás) is mutatnak és képesek kis-ill. nagyméretű kolóniák létrehozására különböző ECM borítású tenyésztőedényekben, ami a sejtek pluripotens természetével magyarázható. Mivel az őssejtek általában lassan osztódó sejtek, megfigyeléseink szerint az *ex vivo* expandált LESC sejt kultúra őssejtek és gyorsan osztódó TAC keveréke, mivel a sejtek egy része őssejt tulajdonságokkal bír és lassan proliferál, másik része viszont elkötelezett a cornea epithel irányba, gyorsan osztódik és jelentős migrációs potenciállal rendelkezik.

Az LESC-k immunfluoreszcens festése CK14 és CK8/18 pozitivitást mutatott, megerősítve azok corneo-conjunctivális eredetét; a differenciált CEC-kre jellemző markerek alacsony expressziója azonban az LESC differenciálatlan állapotát, de cornea epitheliális irányú elkötelezettségét mutatja. Migrációs kapacitásukat az ITG α 9, CK8 és CXCR4 expresszió jellemzi. Az LESC-k jellemzése során találtunk néhány, eddig nem vizsgált marker-pozitivitást (CD44/HCAM, CD144/VE-Cadherin, CD146/MCAM és CD166/ALCAM), mi több a limbális epithelen belüli *in situ* lokalizációját is meghatároztuk. CD44/HCAM az apikális rétegében, míg CD146/MCAM és CD166/ALCAM a limbus bazális rétegében helyezkedik el.

A sejtfelszíni glikoproteinek és glikolipidek expressziójának mintázata ilyen terjedelemben még nem volt vizsgálva. Összesen 14 szénhidrátot vizsgáltunk az LESC-k felszínén (1 sziálsav, 5 N-acetilglükózamin, 1 mannóz, 6 galaktóz és 1 fukóz). A korábbi eredményekkel szemben -miszerint az LESC-k sziálsavmentes galaktózt expresszálnak és nem fejeznek ki α -2,3-kötött sziálsavat a felszínükön- az általunk tenyésztett LESC-k esetében a PNA alacsonyabb fluoreszcencia intenzitását tapasztaltuk a WGA, ConA, RCA vagy AIL-hoz képest, míg a sejtek 98%-a volt PNA pozitív.

A tenyésztett LESC-k transzkriptom analízise során találtunk néhány olyan expresszáldó gént, melyeknek LESC-ben betöltött funkciója egyelőre ismeretlen: SERPINA3(FC: 21.1) – melyet korábban anti-angiogenikus és anti-inflammatorikus hatása miatt vizsgáltak cornea sérülésekben. SEMA3A (FC: 40.2) - szerepét egér cornea fejlődésében és a corneális epithelsejtek differenciációjában igazolták, míg FN1 (FC: 74.9), sebgyógyulásban, sejt adhéziók kialakításában és sejtmigrációban jut szerephez. A fent említett markerekkel kiegészíthető lenne az LESC-k „ujjlenyomata”, lehetővé téve a bazális limbális epithelen belüli könnyebb azonosításukat. Áramlási cytometriával bizonyítottuk, hogy az LESC-k nem-haematopoetikus eredetűek, a bmMSC-hez képest alacsonyabb mértékben expresszálnak MSC markereket és nincs a felszínükön CD31, ami az érendothel sejtek fő jellemzője. A már korábban a bazális limbális és bazális corneális epithelen leírt CD49a/Itg α 1, CD49b/Itg α 2, CD49f/Itg α 6 és CD29/Itg β 1 erős festődést mutatott *in situ* és a tenyésztett LESC-kben is.

Összefoglalásképpen elmondható, hogy a pozitív és negatív markereket egyaránt tartalmazó, az általunk tenyésztett limbális eredetű sejtekről készült pontos sejtfelszíni profil alapján, hogy a tenyészet egy lassan proliferáló LESC és egy gyorsan osztódó, migráló és differenciációs potenciállal rendelkező TAC keveréke. Gyakorlati szempontból egy ilyen, őssejtekből és már elkötelezett sejtekből álló keverék populáció transzplantációja, igen előnyös a sikeres cornea átültetéshez. A LC, mint hordozó, használata *ex vivo* expandált LESC átültetéshez, nemcsak megfelelő, de kiemelkedően jó alternatívája lehet a HAM-nak, transzparenciájának köszönhetően és a tenyésztett sejtekre gyakorolt védő hatása miatt. Kétoldali LESC esetén, az *ex vivo* expandált szájnyalakártya epithelsejtek és a transzdifferentiált bmMSC-k jelenthetnek alternatív cornea epithel pótlást. Ígéretesnek mutatkozik a hajhagyma őssejtek transzdifferentiációjával előállított sejtekkel történő cornea epithel pótlás, a két sejtvonal hasonlósága miatt, de a vizsgálatok egyelőre nem mutatnak az *in vitro* kísérleten túl.

Retinális őssejtek

Az őssejt-therápia nagyon ígéretesnek mutatkozik a retina betegségek gyógyításában. Ezt bizonyítja a folyamatban lévő humán embrionális, újszülött, köldökzsínór és csontvelői őssejteket használó klinikai vizsgálatok nagy száma, mely az olyan betegségek kezelését célozza meg, mint az AMD vagy retinitis pigmentosa. Az első felvetés, miszerint a CBE tartalmaz NPC -ket, amelyek képesek új idegsejtek létrehozására- 2000-ben fogalmazódott meg. A CBE könnyen hozzáférhető, ezért kiváló NPC forrás lenne. Definíció szerint a retinális NPC-k - hasonlóan a KIR egyéb területin lévő NPC-hez- önfenntartóak és képesek a sérülésekre reagálni úgy, hogy a lézióhoz migrálnak és funkcionáló célsejtté differenciálódnak.

Mostanában több tanulmányban is vizsgálják, hogy a CBE területén vannak-e NPC-k a felnőtt emberi szemben. A retina leválással és PVR formációval járó retina szakadások és lyukak a szemészetben relatíve gyakran előforduló KIR sérülések. Feltételezzük tehát, hogy ha a felnőtt emberi szemben vannak NPC-k, akkor azok képesek a retinaleválásra és PVR-re is reagálni. NPC-k jelenlétének tisztázása végett mélyrehatóan vizsgáltuk a CBE és retina perifériát NPC markereket kutatva kontroll és PVR-es enukleált szemeken. NPC marker expressziót vizsgáltuk PVR-es egér modellben is. Végül, az NPC-szerű sejtek célzott migrációjának jeleit kerestük PVR-es betegek vitrectomiája során nyert üvegtestekben. Kontroll, nem PVR-es cadaver szemek *in situ* festése során mind neuronális- (Pax6, Sox2, Nestin)és epitheliális (ABCG2, N-Cadherin) őssejt marker pozitivitást tapasztaltunk, de csak a legproximálisabb Pla és retina periféria Pc-inek falában GFAP pozitivitást viszont, csak a retina periférián lévő cisztákban. Az ilyen cisztikus degeneráció időkben gyakori lehet, de azok pontos patológiai következménye egyelőre nem ismert. Hasonlóan a korábbi irodalmi adatokhoz, mi sem láttunk sejtosztódást vagy Ki-67 pozitivitást a sértetlen, humán retinában *in situ*. PVR-re adott válaszként GFAP⁻ és GFAP⁺sejtek proliferációját figyeltük meg mind a proximális Pla és retina periféria területén is. A kapott eredmények részben összevágunk egy másik munkacsoport eredményeivel, azonban ők leírtak néhány Rhodopsin⁺sejtet is a GFAP⁻ pigmentált sejtek közelében, kiterjedt PVR formációval rendelkező szemeken. Mivel sem NPC markert sem Rhodopsin pozitivitást nem tudtunk a CBE területén detektálni, sem kontroll, sem PVR-es szemeken, CBE eredetű NPC-k általi új fotoreceptor képződésnek kicsi a valószínűsége.

Szemben a humán eredményekkel, az egér CBE nem csak hyperpláziát, de megnövekedett Nestin expressziót is mutatott az intravitreálisan adott diszpázzal való PVR indukciót követően. Ezért a különböző munkacsoportok által más fajokban tett felfedezések humánnal való összevetésekor óvatosságnak kell lennünk.

Az ún. neuroszféra formációs assay során speciális tenyésztési körülmények között szabadon úszó klaszterek jönnek létre. Ez egy széles körben elterjedt módszer a sejtek NPC önmegújító és indukálható proliferációs kapacitásának megerősítésére habár a módszer nem specifikus őssejtekre, mivel más sejtek pl. epithel sejtek is képesek szférák létrehozására. Ismert, hogy a kisméretű szférák nem egyetlen sejt osztódásából képződnek, hanem sejtek aggregációja által. Ezért az önmegújító képességüket több passzálon keresztül, megnyújtott tenyésztési idővel kell bizonyítani. Másrészt nehéz megkülönböztetni az egyes sejtípusokat a szférán belül, azok fizikai és geometriai tulajdonságainak köszönhetően, mely befolyásolja a tápanyag, növekedési faktor és oxigén ellátást a szférán belül. Ez azt is jelenti, hogy a szférát alkotó sejtek igen heterogének, mind elköteleződés mind differenciáltság tekintetében. Egy standardizált neuroszféra formációs assay protokoll hiánya, az eltérő sejtszám és tápfolyadék, mitogének, hormonok és táplálék kiegészítők használata megnehezíti a különböző laborokban kapott eredmények összehasonlíthatóságát.

Számos munkacsoport megerősítette a CBE eredetű sejtek önmegújító és proliferációs kapacitását. Azt találták, hogy a CB és iris-ből izolált sejtek által létrehozott szférákhoz hasonlót nem lehet a neuroretinából vagy a RPE-ből izolálni; mások tudtak a neuroretinából és CB-ből szférát izolálni kortól, nemtől és postmortem eltelt időtől függetlenül; továbbá leírtak osztódó, éretlen neuronális és gliális markereket expresszáló CB eredetű szférákat is. Tapasztalataink alapján a humán PVR-es szemek üvegtestjéből izolált sejtekből több szféra képződik, mint a nem PVR-esekből. Ezeket a szférákat második passzálig is fenn tudtuk tartani, bár további fenntartásukra nem tettünk kísérletet.

Az őssejteket egyedi marker mintázatuk alapján ismerjük fel. Ezek lehetnek csak az őssejtekre jellemzőek (pozitív), vagy az őssejtek által nem, de a progenitorai által expresszált (negatív) markerek. Mivel az esetek többségében nem rendelkezünk egyetlen az adott sejtre jellemző definitív markerrel, pozitív és negatív markerek kombinációját használjuk azok jellemzésére. A CBE velőcső ektoderma eredetű, ezért a neuronális és gliális jegyek vizsgálata mellett, ellenőrizni kell, hogy megőrzik-e a szférákban az epitheliális jelleget. Munkatársaink korábban bizonyították, hogy a CBE eredetű szférák tartalmaznak osztódó epithel-szerű sejteket és a KIR neuroszféraihoz képest csökkent NPC marker expressziót mutatnak. Ez a jelen eredményeinkkel is összhangban van, mivel a CBE-eredetű szférák pigmentáltak és kifejezett epithel jegyekkel bírnak. A CBE eredetű sejtek szignifikáns mértékben fejeznek ki NPC markereket, de nem képesek fotoreceptor irányba differenciálódni. A CBE pigmentált és nem pigment sejtjei elkülöníthetőek; csak a pigmentált sejtek tudnak proliferálni és tenyésztéskor, epitheliális markereket magasabban és NPC

markereket limitált mértékben expresszáló, szférákat létrehozni. A PVR-es betegek üvegtestjéből izolált szférák GFAP és Nestin pozitivitást mutattak a centrális-, β -III-tubulin pozitivitást a perifériás részekben *in situ* és *in vitro* körülmények között egyaránt. Ezek a szférák pigmentált és nem-pigmentált sejtekből álltak, de a pigmentált sejtek RPE eredete RPE65 negativitás révén kizárható.

Több alkalommal mutattak ki PC-ken olyan ESC markereket, mint OCT4, SOX2 és Nanog, de szerepük mind a mai napig nem tisztázott. Úgy tartjuk, hogy az ESC markerek jelenléte elengedhetetlen a pluripotencia bizonyításához, és mi képesek voltunk változó, alacsony mértékben mindhárom említett markert kimutatni RT-PCR segítségével a PVR-es betegek vitrectomiája során nyert szférákban. A Pax6 és Sox2-t fehérje szinten is kimutattuk immunfluoreszcens festéssel. A legáltalánosabb NPC marker, a Nestin, egy intermedier filament protein, mely szintje patológiás körülmények között, mint a gliosis megemelkedik. Neuro-ill. gliogenesis során a Nestin szövetspecifikus intermedier filamentekre, pl. GFAP-ra cserélődik. GFAP fontos szerepet játszik a KIR gliális hegese során. Széles körben alkalmazott általános őssejt marker az ABCG2 is, mely, mint xenobiotikus transzporter működik és fontos szerepet játszik a multidrog-rezisztencia kialakulásában. A DNS kötő festék (Hoechst 33342) sejtéből való kipumpálása alapján alpopulációt lehet elkülöníteni, mely, mint ahogy azt korábban már említettük, progenitor-jellegű sejtek heterogén csoportja. A Claudin, egy tight junction protein, mely az intercelluláris molekulák mozgását szabályozza az epithel sejtek között, míg az N-Cadherin Ca-függő sejt-sejt adhéziós glikoprotein, mely a velőlemez kialakulásában játszik fontos szerepet. Az epitheliális és neuroepitheliális ő- és progenitorsejtek mind az N-Cadherint, mind az ABCG2-t expresszálják. Munkatársaink kimutatták a CBE eredetű szférák Nestin és Claudin pozitivitását, de ko-lokalizációt nem, ami arra utal, hogy a szférák két külön sejtípus keverékei; epithel és neuronális progenitor-szerű sejtek. Ezzel szemben mások, CBE eredetű szférákat felépítő epithel sejtek homogén populációjáról számolnak be.

Jelen vizsgálatok során kimutattuk, hogy a PVR-es betegek üvegtestjéből izolált szféra-szerű struktúrák magas GFAP pozitivitással rendelkeznek. A PCR vizsgálat a PVR-es szférák, CBE szférákhoz viszonyított szignifikánsan magasabb GFAP expresszióját mutatta. Nem detektáltunk RPE65 a szférákban, így kizárva a RPE kontamináció lehetőségét.

GFAP⁺Müller gliasejtekről úgy gondoljuk, hogy emberben látens neuroregeneratív kapacitással bírnak. Mi több, nemrégiben kimutatták, hogy vitrectomia során a retina perifériából izolált Müller glia hatékony fotoreceptor forrás lehet. Ez hasonló a mi eredményeinkhez, miszerint Rhodopsin⁺sejteket detektáltunk PVR-es humán szemekben a

NLR perifériáján közel a fotoreceptor-vesztett területekhez, ugyanakkor ez aktív neurogenesisnek nem értékelhető. További vizsgálatok, mint a vitreusból izolált NPC-k klonális expansziójának, differenciációjának vizsgálata szükségesek az eddigi eredmények megerősítéséhez.

Az előzőekben ismertetett eredmények alátámasztják azt a hipotézist mely szerint a felnőtt humán emberi szem tartalmazhat két különböző neuroepitheliális progenitor sejt típust; egy nem-gliális (GFAP⁻) csoportot a proximális Pla közeli Pc-ben és egy Müller glia jellegűt (GFAP⁺). Egyelőre csupán a gliális csoport retina sérülésre adott üvegtesti térbe irányuló migrációs válaszát tudtuk igazolni.

Érett neuronális markerek fehérje és gén szintű expressziója a CBE eredetű szférákban nem bizonyíték a funkcionális differenciációra. Továbbá, szükségesnek tartjuk a differenciált sejtek morfológiai és funkcionális tulajdonságainak vizsgálatát, a poszt-mitotikus akciós potenciál létrejöttének és neurotranszmitter felszabadulásának igazolásával.

6. Kulcsszavak

Őssejtek, Limbális Epitheliális Őssejtek, Retinális Őssejtek, Proloferatív Vitreoretinopathia

7. Összefoglalás

Az őssejt-therápia ígéretesnek mutatkozik az olyan súlyos látásromlást okozó károsodások ill. betegségek kezelésében, mint a vegyi sérülések, égések, időskori macula degeneráció vagy retinitis pigmentosa. Az embrionális őssejtek kapcsán felmerülő etikai kérdések és az indukált pluripotens sejtek esetleges tumor-képző tulajdonságától való félelem miatt a felnőtt szöveti őssejtek használhatósága sokkal valóságosabb.

Munkánk során sikeresen izoláltunk, tenyésztünk és karakterizáltunk a szaruhártya epithel regenerációjáért felelős limbális epitheliális őssejteket (LESC), valamint a vékony és áttetsző tulajdonsággal bíró lencsetokról (LC) bizonyítottuk, hogy az LESC-transzplantáció számára alkalmas biológiai hordozó.

Legfőbb eredményeinknek tartjuk az állati eredetű anyagok teljes kivonását az LESCTenyésztési procedúrából. A tenyésztés során a humán szérum, mint egyetlen tápanyagkiegészítőforrást használtuk. Emellett az LESC jellemzésére szolgáló panelt korábban nem vizsgált sejt adhéziós molekulákkal (CD44/HCAM, CD146/MCAM, CD166/ALCAM) és sejt felszíni glikoproteinekkal bővítettük ki.

A limbális graftokból kiinduló sejtek a LC felszínén 2 hét alatt többrétegű hámot hoztak létre. A kinövő sejtek felszínükön őssejt (ABCG2, CK19, TP63/p63, VIM/Vim), a cornea epitheliális irányba való elköteleződés (CK8/CK18, alacsony CK3/CK12) valamint a nagy proliferációs kapacitásra (MKI67/Ki67) utaló markereket expresszálják, így létrehozva egy őssejtekből és tranziensen amplifikálódó sejtek keverékéből álló populációt, annak minden előnyével.

Irodalmi adatok alapján feltételezzük, hogy a sugártest epithelsejt rétege (CBE) olyan neuronális pluripotens sejteket (NPC) tartalmaz, amelyek érzékelve a retina károsodását, pl. retina leválásnál és következményesen kialakuló proliferatív vitreoretinopáthia (PVR) esete, célzott migrációval és funkcionális differenciációval reagálnak.

Kísérleteink során azonban nem sikerült NPC-t detektálnunk az emberi szemben, a pars plana ill. retina periférián található ún. perifériás cystákon kívül. Mi több, GFAP⁺ sejteket is csak a retina perifériás részén detektáltunk. Eredményeink alátámasztják a humán GFAP⁻ sejtek proliferációját PVR-ben, de azok őssejt mivoltára vagy fotoreceptorra való differenciálódásának képességére nem találtunk bizonyítékot. Csupán néhány Rhodopsin⁺ sejt csoportosulást figyeltünk meg a PVR okozta jelentős fotoreceptor károsodástól perifériásabban.

Szemben a humán eredményekkel, egerekben PVR indukálást követően a CB kifejezett hyperplasiáját és emelkedett Nestin pozitivitást tapasztaltunk.

PVR-es retina leválás miatti vitrectomia során az operatőrök gyakran észlelnek, a retina perifériához közeli vitreusban gömbszerű struktúrákat. Azért, hogy kiderítsük, ezeknek a szféráknak az eredetét és jellemzőit, a vitreusból nyert mintákat tenyésztés előtt és után is megfestettük. Az immunfluoreszcens festés és transzmissziós elektron mikroszkópia alapján a szférák pigmentált és nem pigmentált sejtekből, valamint Nestin és GFAP pozitív centrális és β -III tubulin⁺ külső részből állnak, továbbá retina pigmentepithel-sejtes kontaminációmentesek.

Munkánk során a PVR-re adott gliális és nem-gliális válasz megerősítést kapott, de a gliális sejtek vitreusba való migrációja továbbra sem bizonyított.

8. Publikációk



DEBRECENI EGYETEM EGYETEMI ÉS NEMZETI KÖNYVTÁR
KENÉZY ÉLETTUDOMÁNYI KÖNYVTÁRA

Iktatószám: DEENKÉTK/1/2014.
Tételszám:
Tárgy: Ph.D. publikációs lista

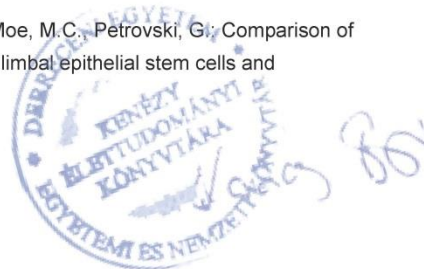
Jelölt: Albert Réka
Neptun kód: CA5WC0
Doktori Iskola: Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola

A PhD értekezés alapjául szolgáló közlemények

1. **Albert, R.**, Veréb, Z., Csomós, K., Moe, M.C., Johnsen, E.O., Olstad, O.K., Nicolaissen, B., Rajnavölgyi, É., Fésüs, L., Berta, A., Petrovski, G.: Cultivation and characterization of cornea limbal epithelial stem cells on lens capsule in animal material-free medium. *PLoS ONE*. 7 (10), e47187, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0047187>
IF:3.73
2. Johnsen, E.O., Froen, R.C., **Albert, R.**, Omdal, B.K., Sarang, Z., Berta, A., Nicolaissen, B., Petrovski, G., Moe, M.C.: Activation of neural progenitor cells in human eyes with proliferative vitreoretinopathy. *Exp. Eye Res.* 98, 28-36, 2012.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1016/j.exer.2012.03.008>
IF:3.026

További Közlemények

3. Veréb, Z., **Albert, R.**, Pólska, S., Olstad, O.K., Akhtar, S., Moe, M.C., Petrovski, G.: Comparison of upstream regulators in human ex vivo cultured cornea limbal epithelial stem cells and differentiated corneal epithelial cells. *BMC Genomics*. 14 (1), 1-33, 2013.
DOI: <http://dx.doi.org/10.1186/1471-2164-14-900>
IF:4.397 (2012)



4. **Albert, R.**, Vásárhelyi, G., Bodó, G., Kenyeres, A., Wolf, E., Papp, T., Terdik, T., Módos, L., Felszeghy, S.: Computer-assisted microscopic analysis of bone tissue developed inside a polyactive polymer implanted into an equine articular surface.
Histol. Histopath. 27 (9), 1203-1209, 2012.
IF:2.281
5. Petrovski, G., **Albert, R.**, Kaarniranta, K., Moe, M.C., Fésüs, L., Berta, A., Das, D.K.: Autophagy in the eye: A double-edged sword.
In: *Autophagy: Principles, Regulation and Roles in Disease*. Szerk.: Nikolai Gorbunov, Nova Science Publishers, Hauppauge, New York, 157-180, 2012.

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora: 13.434

A közlő folyóiratok összesített impakt faktora (az értekezés alapjául szolgáló közleményekre): 6.756

A DEENK Kenézy Élettudományi Könyvtár a Jelölt által a Publikációs Adatbázisba feltöltött adatok bibliográfiai és tudományometriai ellenőrzését a tudományos adatbázisok és a Journal Citation Reports Impact Factor lista alapján elvégezte.

Debrecen, 2014.01.07



9. Köszönetnyilvánítás

Köszönöm a lehetőségért, hogy PhD hallgatóként, a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet, Őssejt és Szemészeti Kutató Laboratóriumában tanulhattam és dolgozhattam, Dr. Petrovski Goran témavezetése alatt.

Köszönettel tartozom Prof. Fésüs Lászlónak, a Biokémiai és Molekuláris biológiai Intézet előző vezetőjének, értékes hozzászólásaiért, konstruktív javaslataiért és a lehetőségért, hogy egy kiváló kutatási körülményeket biztosító intézetben dolgozhattam.

Hálás köszönettel tartozom témavezetőmnek, Dr. Petrovski Gorannak az ötleteiért, támogatásáért, a belém vetett hitéért és a folyamatosan növvő elvárásaiért, ami nélkül nem tartanék itt. Példaképemnek tartom, mégis mindig egyenlő partnerként kezel, amiért nagyon hálás vagyok. Tanító és barát egy személyben. Kifogyhatatlan energiái és végtelen türelme van és mindenre jut ideje (amit mind a mai napig nem értek hogyan csinál). Az Ő nemzetközi kapcsolatainak köszönhetően ismereteim bővítése mellett, külföldi laborban dolgozhattam és saját kapcsolati tőkét építettem norvég, finn és brit kutatókkal.

Köszönöm a segítségét Veréb Zoltánnak, Tóth Máriának, Nagymihály Richárdnak és Berényi Erikának (régi kolléga) az Őssejt és Szemészeti Kutató Laboratóriumából; Demény Máténak, Csomós Krisztiánnak, Németh Istvánnak, Hodrea Juditnak, Tóth Boglárkának, Kristóf Endrének – Prof. Fésüs munkacsoportjából; Kiss Beának Prof. Szondy munkacsoportjából; Mótyán Jánosnak, Tóth Ferencnek – Prof. Tózsér munkacsoportból; Simándi Zoltánnak, Gyöngyösi Adriennek, Nagy Zsuzsannának – Prof. Nagy munkacsoportból. Köszönöm a segítséget Szalóki Nikolettának a Biofizikai és Sejtbiológiai Intézetből, Boratkó Anitának az Orvosi Vegytani Intézetből és Bacskai Ildikónak az Immunológiai Intézetből. Mindannyian jelentősen hozzájárultak, ahhoz hogy jobb kutató és jobb ember lettem.

Köszönet a labor asszisztenciáért és technikai segítségért Mező Irénnek, Nagy Jennifernek, Szalóki Szilviának, Komóczi Editnek, Fürtös Ibolyának és Hathy Editnek, és azért, hogy sosem hagytak egyedül a pácban!

Szeretném megköszönni a Biokémiai és Molekuláris Biológiai Intézet minden jelen és múltbéli, kutató és adminisztrátorának a segítségét, öröm volt velük dolgozni és szocializálódni.

Végül, de nem utolsó sorban hálásan köszönöm családomnak és barátaimnak, Kollár Gabriellának, Jóna Ádámnak, Sántha Orsolyának, Kovács Líviának és Samantha Wilsonnak, hogy kitartottak mellettem a nehéz időkben, bíztattak és lelkiileg támogattak.