

PACAP hatásai mesenchymalis eredetű őssejtek differentiációjára

Debreceni Egyetem, Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

Tóth Anna Henrietta
3. évfolyam Biomérnök BSc

Témavezető:

Dr. Juhász Tamás
egyetemi adjunktus

Fillér Csaba
tudományos segédmunkatárs

Kelt: Debrecen, 2024.

Tartalomjegyzék

1.	Rövidítések	3
2.	Absztrakt	4
3.	Bevezetés	5
3.1	Porcszövet.....	5
3.2	Osteoarthritis	6
3.3	Chondroprogenitor sejtek (CPC)	7
3.4	Porcdifferenciáció lépései és szabályozása.....	9
3.4.1	Porcdifferenciáció <i>in vivo</i> körülmények között	9
3.4.2	A Sox9 és a CREB a porcdifferenciáció mestergénjei	10
3.5	Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP).....	10
4.	Célkitűzés	13
5.	Anyagok és módszerek.....	14
5.1	Sejttenyésztés	14
5.2	Sejtek életképességének vizsgálata MTT teszttel	14
5.3	Proliferáció vizsgálata triciált timidin beépülésével	15
5.4	Triciált prolin beépülésének vizsgálata	15
5.5	Sejtmorfológia vizsgálata	15
5.6	vDMMK festés.....	16
5.7	Picosirius vörös festés	16
5.8	Immunhisztokémia	17
5.9	Western blot	17
6.	Eredmények	19
6.1	MTT teszt és proliferáció	19
6.2	Sejtmorfológiai analízis.....	20
6.3	A CPC sejtek ECM termelésének változásai	21
6.4	A transzkripció faktorok expressziójának vizsgálata	23
6.5	A transzkripció faktorok nukleáris lokalizációja	24
7.	Diszkusszió	26
8.	Irodalomjegyzék.....	29
9.	Függelék	34

1. Rövidítések

PACAP: hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid

PAC1: hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid receptor 1

VPAC1: Vasoactive intestinal polypeptide receptor 1

VPAC2: Vasoactive intestinal polypeptide receptor 2

HE: hematoxinilin-eosin

vDMMK: vizes dimetil-metilénkék

PS: picrosirius

ECM: extracelluláris mátrix

Sox9: SRY (sex determining region Y)-box 9

PKA: protein kináz A

CREB: cAMP response element-binding protein

GAG: glükózaminoglikán

CPC: chondroprogenitor cell

2. Absztrakt

Bevezetés: A hypophysis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP) elsőnek a központi idegrendszerből lett izolálva, azonban mára tudjuk, hogy ez a 38 aminosavból álló polipeptid számos jelátviteli kaszkádban játszik szerepet, ezáltal több fejlődéstani folyamatban is fontos szabályozó funkciót tölt be. Három receptora ismert, a VPAC1, a VPAC2 és a PAC1, mely utóbbi köti a legnagyobb affinitással a PACAP 1-38-at. Korábbi kísérletek alapján tudjuk, hogy az osteogenesis és chondrogenesis, továbbá az öregedési folyamatokban is fontos szereppel bír a PACAP 1-38.

Célkitűzés: Kísérleteink célja volt, hogy megvizsgáljuk a PACAP 1-38 chondrogenikus differenciációra gyakorolt hatásait chondroprogenitor (CPC) őssejtkultúrán.

Anyagok és módszerek: Humán eredetű osteoarthritisben szenvedő betegekből izolált CPC sejtvonalakat monolayer kultúraként tenyésztettünk, majd szintetikus PACAP 1-38 kezeléseket alkalmaztunk. Ezt követően MTT életképességi teszttel vizsgáltuk a sejtek életképességére gyakorolt hatásait a kezeléseknél. A sejtek proliferációját triciált timidin beépülésével vizsgáltuk 2 napon keresztül. Különböző szövettani festésekkel a sejtek morfológiai változásait ítéltük meg, továbbá a sejtek mátrixtermelését vizsgáltuk. A kollagéntermelés nyomkövetéséhez triciált prolin beépülését használtuk, valamint picrosirius vörös festéssel vizsgáltuk a kollagénrostok orientációját. Western blottal monitoroztuk a Sox9 és CREB transzkripciós faktorok expresszióját és foszforilációját, a P-Sox9 és P-CREB intracelluláris lokalizációját immuncitokémiával határoztuk meg.

Eredmények: A PACAP 1-38 kezelés nem okozott citotoxikus változásokat kultúránkban. A sejtek proliferációja nem változott szignifikáns mértékben. A morfológiai elemzésből szignifikáns változásokat állapítottunk meg, a sejtek longitudinális irányú csökkenést mutattak. Az extracelluláris matrix termelése fokozódott a sejtekben, mely a chondrogenikus differenciációt feltételezi, viszont a kollagéntermelés nem mutatott szignifikáns változást a kezelések hatására. Western blottal kimutattuk a P-Sox9 és P-CREB transzkripciós faktorok emelkedett expresszióját, melyek jelentős magi transzlokációt mutattak.

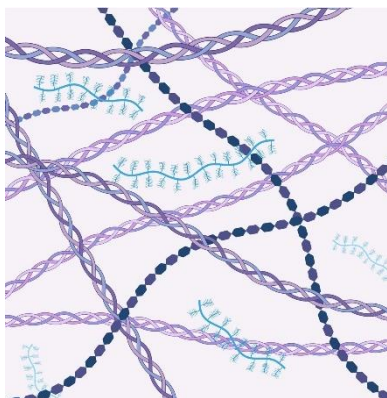
Diszkusszió: Eredményeink felvetik a PACAP 1-38 gyógyászati alkalmazásának lehetőségeit osteoarthritisben szenvedő betegek esetében.

3. Bevezetés

3.1 Porcszövet

A porcszövet a kötő-és támasztószövetek csoportjába sorolható. A szervezetben előforduló porcszövetet három csoportba sorolhatjuk úgy, mint elasztikus porc, rostos porc, továbbá a hialinporc. Közös tulajdonság, hogy érmentes, továbbá beidegzés se található a szövetekben differenciálódott állapotban [1, 2], tehát diffúzió segítségével képesek felvenni a synoviális térből a szövet számára szükséges anyagokat.

A szervezetben számos helyen előfordul porc, az általunk vizsgálni kívánt hialinporc funkcionálisan elkülöníthető formái jelen vannak, mint állandósult porc, hátramarad a csontfejlődésből mint epifízis porc, valamint ízületi porcként van jelen a szervezetben. Kutatásaink fókuszában olyan ízületi porc van, melynek legnagyobb a teherbíróképessége és mechanikai kitettsége és a leggyakrabban érintett ízületi megbetegedésekben, ez a térdízületet borító ízületi porc. A szövetre jellemző a nagy mértékű extracelluláris matrix (ECM) termelés, melyben különböző típusú kollagének találhatók. A porcra jellemző II-es típusú kollagén fibrillumokat képez és nagy a szakítószilárdsága és a nyomó erők elleni kompressziótűrése. Jellemző továbbá a VI-es, IX-es és a XI-es kollagén is, melyek lokalizációja és orientációja növeli a hialinporc ellenállóképességét. Számos proteoglikán található az extracelluláris mátrixban, legjelentősebb az aggregán. Ez utóbbihoz nagy mennyiségű glükózaminoglikán (GAG) oldallánc asszociál, így pl. kondroitin-szulfát és keratán-szulfát. Több aggregán molekula egy központi hialuronsavhoz kötődve proteoglikán aggregátumot hoz létre, melyekhez a porcszövetben található víz legnagyobb része kötődik. Ez az elrendeződés a nagy vízmegkötőképességen kívül sok ion számára is egyfajta csapdaként szolgál, mely így egy speciális ionmiliót is kölcsönöz a szövetnek (1. ábra).



1.ábra: Stilizált ábra a porcszövetet alkotó extracelluláris matrixról. Az ECM legfontosabb komponensei a különböző GAG molekulák, kollagénrostok valamint hialuronsav láncok. Több aggregánmolekula egy központi hialuronsavlánchoz kötődve proteoglikán aggregátumokat hoz létre, mely a porcszövetben megtalálható víz mintegy 60-70 %-át képes megkötni. BioRender

Az ízületi porc szövettani szerkezetében számos régiót különíthetünk el az előforduló sejtek, valamint a kollagénrostok lefutása alapján. A felszíni tangenciális rétegben osztódásra képes fiatal sejtek vannak, melyek a lubricin nevű molekulát termelik, ami a porcfelszín ellenállóképességét fokozza. A II-es típusú kollagén lefutását tekintve a felszínnel párhuzamos, majd ívesen meghajlik a mélyebb zónák irányába. Így pl. az átmeneti, majd osztódási és kalcifikálódó zónákban a felszínre merőleges lefutást mutat. A chondrocyták az ár-apály zónáig izogenikus sejtcsoportokat alkotnak, melyek speciális VI-os típusú kollagénben gazdag matrixszal veszik magukat körül és chondronokat képeznek. A chondronok körül a kollagénrostok úgynevezett Máltai-keresztek formájában megfigyelhető polarizációs mikroszkópban. A radiális réteg és az ár-apály zóna környékén hipertrófiás sejtek találhatók. Az ár-apály zóna alatt már kalcifikálódó területek vannak jelen, melyekben gyakran halmozódik fel a X-es típusú kollagén is [3].

3.2 Osteoarthritis

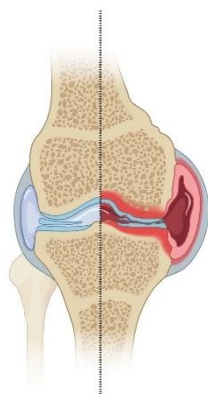
Az osteoarthritis a WHO felmérése szerint világszerte az egyik leggyakoribb mozgásszervi megbetegedés, körülbelül 300 millió felnőttet érinthet világszinten [4], de Magyarországon is jelentős a betegek száma. Az osteoarthritis egy degeneratív elváltozás, mely az ízület teljes egészét érinti [5]. A betegség korai stádiumában is már megjelennek gyulladásos faktorok például a TNF α [6]. A szövetben számos a chondrocyták apoptózisát indukáló jelátviteli útvonal aktív, többek között a mitokondrium mediálta kaszpáz-függő útvonal [7]. Korábbi kísérletek alapján tudjuk, hogy az OA összefüggésbe hozható az extracelluláris mátrix lebomlásával és meszesedéssel, amelynek súlyossága pozitívan korrelált az apoptózissal [7]. A chondrocyták hipertrófiássá válnak és a synoviális térben is megjelennek sejtek. Az osteoarthritisre jellemző, hogy a szabályos porcfelszín felpuhul, a korábban említett matrixalkotók degradációja erőteljesen megindul, a kollagén lefutása, ezzel együtt a szövet vízmegkötőképessége nagy mértékben csökken [8]. Ez utóbbi természetesen a porcszövet teherbíróképességét is jelentősen csökkenti.

Az OA kialakulásának pontos okai nem ismertek, de tisztában vagyunk a betegség kialakulásának hajlamosító tényezőivel. Ilyen például a meniscus sérülés, elhízás, de a betegség megjelenésének valószínűsége kapcsolatban áll az öregedési folyamatokkal [9]. Azonban a

betegség kialakulása és porcfelszín sérülésének megjelenése visszafordíthatatlan sérüléseket indukál.

A betegség korai fázisában nem jár állandó fájdalommal, sok esetben csak egy-egy tevékenység végzésekor jelentkezik spontán módon, azonban az idő előrehaladtával a fájdalom állandósul, a komfortérzet romlik [10].

A betegség patológiai elváltozásait tekintve a panaszok az OA egészen késői fázisában jelentkeznek (2. ábra). A panaszokat okozó degeneratív elváltozások jól megfigyelhetők különböző szövettani festési eljárásokat követően, melyekből kezdetben a porc felszíni elváltozásait vehetjük észre, majd a betegség előrehaladtával már a kollagénrostok szerkezeti degradációja is szembetűnővé válik. A kezelési lehetőségek viszonylag szűk keretek között mozognak, hiszen a hialuronsav injekciók csupán a tüneteket kezelik és megóvják a porcfelszínt a mechanikai terhelés okozta további degradációtól. A porcszövet transzplantációja, vagy mozaikplasztika is csak ideiglenes módon tud javítani a beteg kondícióját. Gyakoriak az őssejtbeültetések és azok porc irányú differenciációjának elősegítése, ami nagy anyagi ráfordítást igényel és nem minden beteg esetén működik. Így aztán valódi kuratív lehetőségekről nem beszélhetünk, csupán a beteg életminőségének javítása jöhet szóba.

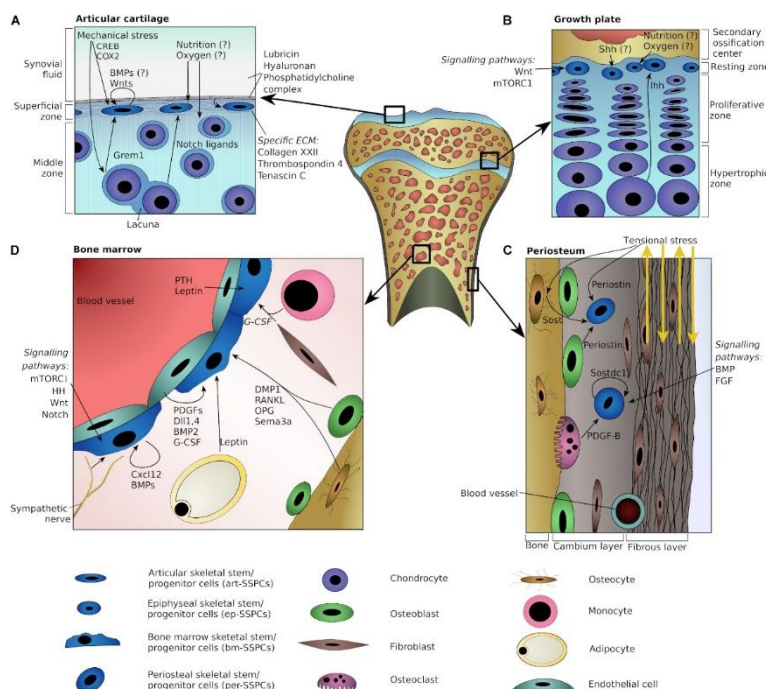


2. ábra: Osteoarthritis sematikus ábrázolása normál, egészséges térdízülethez képest. A betegség előrehaladtával az ízületi porc felszíne degradálódik, számos gyulladásos faktor aktiválódik és az egész térdízületre kiterjedő duzzanat és fájdalom jelentkezik a betegnél. BioRender

3.3 Chondroprogenitor sejtek (CPC)

A mezenchymális eredetű őssejteket számos korábbi kutatás során leírták már, illetve sikeresen izoláltak őssejteket különböző szövetekből [11]. A kísérleteink során használt immortalizált chondroprogenitor őssejteket kései stádiumban lévő osteoarthritisben szenvedő

betegekből izolálták. A CPC sejtek jelentős migratorikus képességekkel rendelkeznek, valamint chondropogenitor irányba elköteleződtek [12], a szubchondralis területekről a synovialis térbe vándorolnak OA esetén [13]. Tudjuk azt is, hogy a CPC sejtek multipotens tulajdonsággal rendelkeznek, továbbá kifejezik a Sox9, valamint a Runx-2 transzkripciós faktorokat [12], melyek a chondrogenesis és osteogenesis mestergénjei. Ezek a sejtek potenciálisan segíthetnének a porc regenerációban azonban *in vivo* körülmények között erre nagyon kis esély van valamilyen külső beavatkozás nélkül (3. ábra).



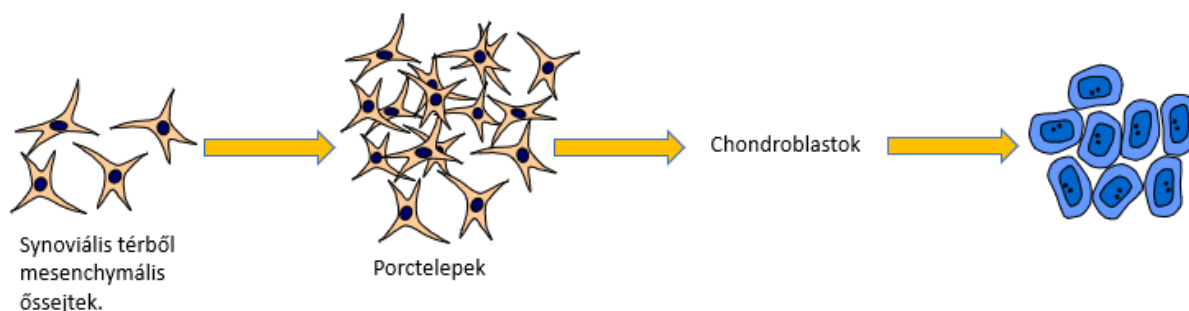
3. ábra: Térdízületből izolálható mezenchymalis őssejtek eredetük szerint. A CPC sejtek chondroprogenitor irányú differenciálódásra képesek porcspecifikus transzkripciós faktorok és citokinek alkalmazásának hatására. [1]

Ezen izolált CPC sejtek mesterséges körülmények között csak BMP és FGF citokinek alkalmazásával bírhatók enyhe differenciációra, azonban mesterséges térhálót alkalmazva faktorok mellett viszonylag szabályos porcszövetet képződik [12].

3.4 Porcdifferenciáció lépései és szabályozása

3.4.1 Porcdifferenciáció *in vivo* körülmények között

A porcfejlődés a mezenchymális sejtek gyors osztódásával veszi kezdetét, melyek porctelepeket hoznak létre. A sejtek maguk körül nagy mennyiségű porcmátrixot termelnek. Még legfeljebb háromszor osztódnak a chondrocyták, azonban a sejteket körülvevő porcudvar már nem engedi a sejteket eltávolodni egymástól, így kialakulnak a chondronok. Ezt az növekedést interstitialis növekedésnek nevezik (4.ábra). Appositionalis növekedésnek nevezzük azt a porcképződési folyamatot, amikor porcszövet növekedhet még a porcfelszín felől. Ekkor a porchártya kevésbé differenciált sejtei chondroblastokká differenciálódnak majd tovább chondronokká [14]. Ezt a fajta növekedés befejeződését követően a szövet regenerációra csupán alig képes.



4. ábra: Chondrogenesis sematikus ábrája. A chondrogenesis mestergénjeként emlegetett Sox9 transzkripciósfaktor magi transzlokációjának hatására a sejtek elkezdik a fokozott extracelluláris matrixtermelést, továbbá a porcspecifikus II-es típusú kollagéntermelést. A sejtek megtöltik maguk körül a rendelkezésre álló teret, majd legfeljebb még 2-3 osztódási fázist követően kialakulnak a posztmitotikus állapotú chondrocyták. BioRender

A mezenchymális sejtek egy bonyolult, összetett folyamat során differenciálódnak chondrocytákká. A kezdetben megnyúlt, mezenchymális sejthez hasonló alakú sejtek - melyek jelentős mennyiségben hialuronsavat és fibronectint termelnek - egymáshoz képest lazán helyezkednek el, majd gyors proliferációba kezdenek. Ennek eredményeképpen egy tömör sejthalmazt, ún. nodulust hoznak létre. Ez a folyamat a kondenzáció. Az aggregátumok kialakításában számos morfogén (BMP, TGF β , FGF) összehangolt működése játszik szerepet [15]. A sejt-sejt és a sejt-matrix kapcsolatok kialakulásának, egyes citokinek hatásának, és a citoszkeleton szerkezetének átalakulásával párhuzamosan észlelhető sejthalak-változásoknak egyaránt kiemelkedő fontosságot tulajdonítunk, mivel bármelyik tényező kiesése vagy működési zavara a porcképződés hiányát vagy csökkenését eredményezi [16].

3.4.2 A Sox9 és a CREB a porcdifferenciáció mestergénjei

A chondrogenesis szabályozását tekintve ismert az SRY kapcsolt HMG-box fehérjecsald, melynek elemei számos különböző szövetben fontos szereppel bírnak, sok esetben pedig a vázrendszert alkotó sejtek differenciációjához van közüük [17]. A SoxE alcsald tagjai közül a Sox5, a Sox6 és a Sox9 nélkülözhetetlenek a porc mátrix specifikus elemek kódoló gének kifejeződésében. A Sox9 a chondrogenesis mestergénjeként ismert, ilyen módon az aggregánt [18] és kollagént kódoló géneket (Col2a1, Col9a1, Col11a2) aktiválja [19-21], ezáltal van hatással a porc specifikus mátrixtermelésre és a porcdifferenciációra. A jelátviteli kaszkádot tekintve a Sox9-et a cAMP függő PKA foszforilálja [22], mely aktivációja szoros kapcsolatban áll a hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid-del (PACAP) a PAC1 receptorán keresztül.

Fontos megemlíteni továbbá a CREB transzkripciós faktort mely foszforilálását szintén a PKA végzi és a Sox9-hez hasonlóan a nukleuszba transzlokálódik [23]. Ezen utóbbi transzkripciós faktor bonyolult funkcióját és jelátviteli kapcsolatait jellemzi, hogy aktivációja a MAPK útvonalon keresztül is megtörténhet. Hasonló módon a Sox9-hez az aggregánt és a II-es kollagént kódoló DNS szakaszok promóter régióihoz kötődhet be és ezen mátrixalkotók transzkripcióját indukálhatja [18]. A CREB és a Sox9 nukleáris jelenléte egymással párhuzamosan is megtörténhet, de hiányuknak vagy aktivitásuknak csökkenése egymástól függetlenül is porcképződés csökkenéshez vezethet [24].

3.5 Hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid (PACAP)

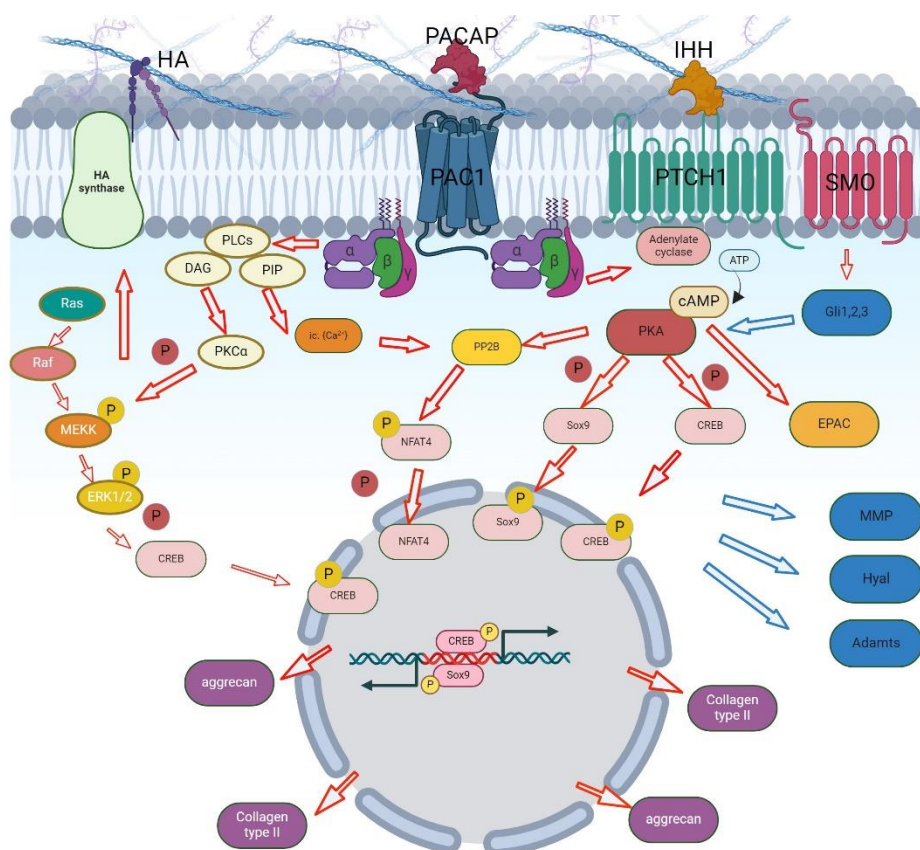
A hipofízis adenilát cikláz aktiváló polipeptid elsőként a központi idegrendszerben került kimutatásra [25], azonban mára tudjuk, hogy számos perifériás szövetben is jelen van [26], valamint több fejlődéstani folyamatot is pozitív irányba befolyásol, ilyen módon a chondrogenesist és az osteogenesis is [27]. Ez a neuropeptid mindössze 38 aminosavból áll, a VIP/Secretin/GHRH/Glukagon szupercsald tagjaként ismert. Ugyanezen szupercsald tagja a VIP, melyet első sorban az emésztőszervrendszer specifikus sejtjei, valamint az immun- és endokrin sejtek termelik [28]. Evolúciósan jól konzervált a neuropeptid N-terminális régiója, mely meglehetősen nagy hasonlóságot mutat a VIP-pel [26]. A PACAP-nak két *in vivo* formája ismert, a 38 aminosavból álló PACAP 1-38, valamint a sokkal kisebb mennyiségben jelen lévő PACAP 1-27 [26]. Az antagonista tulajdonságokkal rendelkező trunkált forma a PACAP 6-38 mesterségesen létrehozott neuropeptid, melyről azonban az elmúlt években bebizonyították,

hogy nem minden szövetben és fajban rendelkezik antagonistá tulajdonságokkal [29]. A mesterségesen előállított PACAP analógok közül a maxadilan ismertetjük [30]. A PACAP bármilyen jellegű módosítása, vagy egy aminosav cseréje az N-terminális régióban a neuropeptid funkciójának elvesztésével jár. Féléletideje szekundumokban mérhető a periférián, mert olyan általános fehérjebontó enzim, mint a DPP4 gyorsan degradálja a neuropeptidet [31]. Ebből adódóan *per os* adagolása nem lehetséges, vagy nagyon kis hatásfokkal, ezért a legtöbb kísérleti felállásban lokálisan juttatják a neuropeptidet a célhelyre. Jelen pillanatban több olyan gyógyszerkészítmény van a különböző klinikai fázisban, mely PACAP-ot tartalmaz így pl. olyan szemcsepp, amely így leginkább corneán fejti ki hatását.

A PACAP-nak három receptora ismert, a PAC1, a VPAC1 és a VPAC2, melyekből az utóbbi kettő körülbelül azonos affinitással képes VIP-t [32] is kötni. A PAC1 egy 7 transzmembrán doménnel rendelkező receptor, mely ezerszer nagyobb affinitással köti a PACAP-ot mint az előbb említett másik két receptora. A PACAP kötődését követő PAC1 receptor konformációváltozás az AC aktivitásának fokozását eredményezi, melyen keresztül, többek között a PKA-t aktiválja. A PKA-n keresztül induló jelátviteli kaszkádot a PACAP szignalizáció kanonikus útvonalának tekintjük [26], mindamellet, hogy számos más jelátviteli útvonalat is pozitívan befolyásol, pl. PLC. A PKA olyan Ser/Thr specifikus protein kináz, mely számos transzkripció faktor, többek között a Sox9 és a CREB foszforilálását eredményezheti [26] (5. ábra).

Bizonyított tény, hogy a PACAP a fogfejlődés során az örlőfogak megfelelő zománctermelésében kulcsszerepet játszik [33], valamint fontos szerepet tölt be a szkeletális elemek fejlődésében és regenerációjában [34]. Ezen folyamatokat olyan jelátviteli kaszkádrendszerek összehangolásán és irányításán keresztül is szabályozhatja, melyek így egy speciális jelátviteli balansz kialakulásához vezetnek [35]. A központi idegrendszerben betöltött védő szerepe is több kísérletben is részletesen bizonyított, így pl. Parkinson- és Alzheimer-kórban, valamint ischemiás állapotokban is védő szerepe van [26], továbbá retinopátiában is pozitív hatásait írták le [36].

Kísérletek bizonyítják az öregedési folyamatok során betöltött szerepét a PACAP-nak. Ezen kísérletekben PACAP KO egereken kimutatták, hogy pl. az osteogenesis zavart szenved [37]. Ebben az esetben a femur kortikális csontszövetének változását írták le, valamint a PACAP hiányában a kalluszképződés időben való eltolódását és az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának emelkedést is megállapították [38]. A laboratórium munkatársai azt is kimutatták, hogy az 1 évnél idősebb, öreg PACAP KO egerek térdízületének hialinporc vastagsága jelentősen csökken és osteoarthritisre jellemző tüneteket mutatnak [39]. A PACAP védő hatásairól ismert, hogy a PACAP képes védeni az *in vitro* porctenyészeteket érő oxidatív stressz hatásait [40], valamint az ekkor aktiválódó matrix metalloproteinázok aktivitását is redukálja [41]. Ezen túlmenően a túlzott mechanikai inger hatásait a hedgehog útvonalon keresztül kompenzálja [41]. A PACAP chondrogenesisben és osteogenesisben betöltött szerepéről viszonylag sokat tudunk, azonban az összeget differenciációs mechanizmusaira gyakorolt hatásairól hiányos a tudásunk.



5. ábra: Chondrogenesist szabályozó jelátviteli kaszkád. A hét transzmembrándoménból álló PAC 1 receptor konformációváltozásán keresztül a PKA aktiválódik, melyen keresztül többek között a Sox9 a porcspecifikus gének átírását serkenti. Hasonló útvonalon, a PKA-n keresztül aktiválódhat a CREB transzkripciós faktor is, mely szintén a hialinporcra jellemző gének átírását szabályozza. BioRender

4. Célkitűzés

Korábbi kísérletek alapján tudjuk, hogy a PACAP az *in vitro* chondrogenesist pozitív irányba befolyásolja [27], azonban nem rendelkezünk adatokkal a CPC sejtekre gyakorolt hatásairól.

- Kísérleteink során fontos kérdés volt, hogy megtudjuk van-e bármilyen citotoxikus hatása a neuropeptidnek a chondroprogenitor sejtekre, továbbá változtatja-e a proliferációs aktivitásukat.
- Ezen túlmenően kíváncsiak voltunk, hogy változik-e a PACAP 1-38 kezelések hatására a CPC sejtek morfológiája, valamint extracelluláris matrix termelése.
- Továbbá fontos kérdés lehet, hogy a CPC sejtek kifejezik-e a P-Sox9 és P-CREB transzkripció faktorokat, valamint ezek expressziója és lokalizációja hogyan változik a neuropeptid jelenlétében.

5. Anyagok és módszerek

5.1 Sejtenyésztés

Kísérleteinkhez a synoviális térből izolált, humán eredetű CPC sejteket monolayer kultúraként tenyésztettük 200 ezer sejt/ml-es kiindulási sejtszámban, T75 típusú sejtenyésztő flaskában (Eppendorf, Ausztria), majd 70%-os konfluencia elérésekor passzáltuk. Táptalajként Low-Glucose DMEM táptalajt alkalmaztunk (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) 10% FBS-sel (Gibco, Gaithersburg, MD, USA) kiegészítve, hiszen a porcra jellemző sejtek alacsonyabb metabolikus aktivitással rendelkeznek és *in vivo* körülmények között alacsonyabb oxigéntenzió jellemző a környezetükre. A sejt kultúrákat 37°C-on 5% CO₂, valamint 80%-os páratartalom mellett sejtenyésztő termosztátban inkubáltuk.

Mintáinkon szintetikus PACAP 1-38 kezeléseket alkalmaztunk, a liofilizált PACAP-ot Prof. Dr. Tóth Gábortól (Szegedi Tudományegyetem) kaptuk. A neuropeptideket steril vízben oldottuk és a PACAP 1-38 esetén 1 µM koncentrációt alkalmaztunk. Ezen hatékony neuropeptid jelenlét meghatározását korábban végeztük el koncentrációsorokat alkalmazva. A sejteken a passzálástól számított második napon alkalmaztuk a kezeléseket, kontrolként pedig kezeletlen sejteket használtunk. Minden kísérletet legalább háromszor ismételtük a kultúrákon.

5.2 Sejtek életképességének vizsgálata MTT tesztel

A PACAP esetleges citotoxikus hatásait MTT életképességi tesztel követtük nyomon. A CPC sejteket 6 well-plate-ben tenyésztettünk a PACAP kezeléseket követően 50 µl MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólium-bromid)) oldatot adtunk a tenyésztő médiumhoz és 2 órán át inkubáltuk a sejtenyésztő termosztátban. Az MTT egy sárga színű, vízben oldódó tetrazólium-bromid só, melyből a mitokondrium reduktáz enzimeinek hatására oldhatatlan, lila színű formazán kristályok képződnek. Az inkubációt követően a sejteket kétszer 1× hígítású PBS-ben mostuk, majd 1500 µl MTT szolubilizáló oldatot (10% Triton X-100, 90% 2-propanol) adagoltunk, majd szuszpendáltuk. A kioldódott lila színű terméket 24 well-plate-be 500 µl-ként pipettáztuk, majd 570 nm hullámhosszon vizsgáltuk az abszorbanciát Chameleon (Hidex, Turku, Finnország) készülékkel, ahol a kapott abszorbanciaérték arányos az élő sejtek számával.

5.3 Proliferáció vizsgálata tríciált timidin beépülésével

A sejtek proliferációs képességének vizsgálatához a tríciált timidin beépülését követtük nyomon. Ez az eljárás az egyik legpontosabbnak tekinthető, stabil, reprodukálható mérés. Kísérleteink során a sejtekhez 1 mCi koncentrációban adagoltuk a tríciált timidint. A mintáinkat egy napra visszahelyeztük a normál tenyésztési körülmények közé. Másnap kétszer mostuk a mintákat 1× hígítású PBS oldatban, 1 ml 5%-os TCA (triklórecetsav) oldatban fixáltuk 5 percig, majd további kétszeri 1× hígítású PBS mosást követően sejteinkhez 600 µl/well arányban tripszint adagoltunk. A sejtek felemésztése után 200 µl-ként szétosztottuk a fehér aljú 96 well-plate-be. Legalább egy hétig 37°C-on hagytuk kiszáradni a mintákat. A méréshez 100 µl Aqualight detekciós oldatot adagoltunk, majd Chameleon szcintillációs detektorral mértük a beütésszámot, 1 perc időintervallumban wellenként (Chameleon Hidex Turku, Finnország).

5.4 Tríciált prolin beépülésének vizsgálata

Ez a kísérleti módszer kivitelezését tekintve meglehetősen hasonlít a tríciált timidinnel történő vizsgálatra. A tríciált prolin a kollagén molekulákba képes beépülni, a tríciumot tartalmazó -OH csoportnak köszönhetően jól detektálható. A tríciált prolint 1 mCi koncentrációban adtuk a Petri-csészékhez, majd 1 napot hagytuk tenyésztési körülmények között. A következő lépésekben mostuk mintáinkat kétszer 1× hígítású PBS-sel, majd 5 percig fixáltuk 5%-os TCA (triklórecetsav) oldattal, majd ismét mostuk egyszer 1x hígítású PBS-sel a sejteket. A kultúrákhoz 600 µl/well mennyiségben adtunk tripszint, majd 200 µl szuszpenziót helyeztünk a fehér aljú 96 well-plate-be. Legalább egy hétig 37°C-on inkubáltuk a plate-eket. A mérés előtt 100 µl Aqualight detekciós oldatot mértünk a well-ekbe, majd Chameleon szcintillációs detektorral vizsgáltuk (Chameleon, Hidex Turku, Finnország).

5.5 Sejtmorfológia vizsgálata

A sejteken hematoxin-eosin szövettani festést végeztünk, melyhez a sejteket formalin:alkohol 4:1 arányú elegyében fixáltuk 30 percig, melyet háromszor 10 perc 80%-os etil-alkoholos és egyszer 70%-os etil-alkoholos mosás követ. Elsőként a hematoxin komponenssel festettük, csapvíz alatt kékítettük, majd ezt követően alkalmaztuk az eosin komponenst. Fedéshez DPX tárgylemezlefedő ragasztóanyagot használtunk. A hematoxin komponens a negatív töltésű sejtszerveket festi, mint például a sejtmag, az eosin komponenssel

a pozitív töltésű molekulák láthatók, így az egyes fehérjéket lehet láthatóvá tenni. Olympus BX53 (Olympus, Tokió Japán) mikroszkóp segítségével vizsgáltuk a kultúrákat és DP47 kamerával készítettünk felvételeket a mintákról, majd ImageJ szoftver segítségével sejtmorfológiai analízist végeztünk. Ehhez a szoftverben a festés színének komplementerét vettük, majd a sejtek rövidebb és hosszabb átmérője mentén sejttátmérőt határoztunk meg. Szignifikanciaszint meghatározásához kétmintás t próbát alkalmaztunk. Egy látótérben legalább 20 random módon kiválasztott sejten végeztünk méréseket, egy kísérleten belül legalább három eltérő Petri csészében és 5 független kísérletet vizsgáltunk a megfelelő elemszám eléréséhez. A sejttátmérő meghatározásokat 3 független kutató végezte, mellyel így a hibázási lehetőségeinket minimalizáltuk.

5.6 vDMMK festés

A porcmátrix festődési tulajdonságaiért a negatív tulajdonságokkal rendelkező glükózaminoglikán (GAG) molekulák a felelősek, mivel anionként disszociálnak a szulfát- és karboxil-csoportok, ezáltal a bázikus tulajdonságú festékeket képesek kötni. Ezeken a GAG molekulákon szabályosan elhelyezkedő negatív csoportok okozzák egyes festékek esetén a metakromáziát, azaz a megfestett szövet eltérő színét a festék eredeti színétől, azáltal, hogy a fény abszorpciós tulajdonságait képes megváltoztatni. Esetünkben a magas GAG-ot tartalmazó porc lila színnel fog festődni, míg ortokromáziás területek GAG tartalma nem detektálható. A festési eljárás előtt a sejteket elsőként fixáltuk formalin:alkohol 4:1 arányú elegyében 30 percig, majd háromszor 10 perc 80%-os etil-alkoholos és egyszer 70%-os etil-alkoholos mosást végeztünk. Ezt követte a vizes dimetil-metilénkék (vDMMK) (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) festés, mellyel 5 percig festettük a mintákat, majd szobahőmérsékleten történő szárítást követően fedtük a mintákat DPX-el (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA). BX53 fénymikroszkópban (Olympus, Tokió Japán) vizsgáltuk a festett mintákat azonos beállítások mellett.

5.7 Picrosirius vörös festés

A mintákat formalin:alkohol 4:1 arányú elegyében fixáltuk, háromszor 10 percig 80%-os etil-alkoholban és egyszer 70%-os etil-alkoholban mostuk, majd desztillált vizes öblítést követően Picrosirius vörös festéssel (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) 1 órát festettük és

alkohollal mostuk, majd DPX-szel lefedtük. Picrosirius vörös festéssel a polarizált fény síkját $\lambda/4$ -el elforgatva a kettősen fénytörő struktúrájú kollagénrostok válnak láthatóvá. A kollagént tartalmazó területek erősen világító területekként láthatók. A fényerősség intenzitása egyenesen arányos a kollagénexpresszióval. A vastag és vékony kollagénrostok között is különbség tehető ezzel a módszerrel, oly módon, hogy a vastag kollagénrostok vörös színnel láthatók, míg a vékony kollagénrostok zöld színnel figyelhetők meg. A színintenzitás meghatározásával számszerűsíthető a vékony és vastag kollagénrostok aránya.

5.8 Immunhisztokémia

Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az általunk vizsgálni kívánt P-Sox9 és P-CREB expresszióját és lokalizációját követhetjük nyomon. Az immunhisztokémiai vizsgálatok során az antigén-antitest kötéseket használjuk a lokalizáció meghatározására. A mintákat a 3×10 percig mostuk PBS-ben, majd blokkoltuk 1%-os BSA-ban. Primer antitestként poliklonális P-Sox9 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és P-CREB antitesteket (Millipore, USA) használtunk 1:800 hígításban, ezt követően inkubáltuk a mintákat 4°C -on egy éjszakán át. Alexa-555 anti-nyúl fluoreszcens antitestet (Life Technologies Corporation, Carlsbad, CA, USA) alkalmaztunk szekunder antitestként 1:1000 hígításban. Háttérfestésnek DAPI-t használtunk a sejtmagok kimutatására. Eredményeink ellenőrzéséhez negatív kontrollt használtunk, mely során primer antitest nélkül alkalmaztuk az Alexa-555 szekunder antitestet. Konfokális mikroszkóp segítségével határoztuk meg a transzkripciós faktorok pontos lokalizációját, melyhez $60\times$ objektívet használtunk, 543 nm hullámhosszúságú lézerrel megvilágítva, azonos lézerintenzitást használva és $1\text{ }\mu\text{m}$ -es virtuális szeleteket pásztáztunk és fotókat készítettünk.

5.9 Western blot

A PACAP receptorok, a P-Sox9, valamint a P-CREB kimutatására Western blot analízist alkalmaztunk. Mintáinkat $100\text{ }\mu\text{l}$ RIPA pufferbe tettük. A sejtsuszpenziók fehérjekoncentrációját BCA protein assay-t (Pierce™, MA, USA) segítségével határoztuk meg. A mintákat Laemmli elektroforézis-pufferben (4% SDS, 10% 2-merkaptotanol, 20% glicerín, 0,004% brómfenolkék, 0,125 M Tris-HCl, pH 6,8) 10 perces forralással feltártuk, majd egyenként $20\text{ }\mu\text{g}$ fehérjemennyiséget 7%-os SDS-poliakrilamid gélben futtattunk. A fehérjéket elektroforézissel nitrocellulóz membránra vittük át 10 perc alatt, TransTurbo blot (Bio-Rad

Laboratories, CA, USA) segítségével, majd a membrán szabadon maradó kötőhelyeit 5%-os, PBST-ben oldott sovány tejporral blokkoltuk. Ezt követően a membránokat mostuk és egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a primer antitestekkel (1. táblázat). Másnap 3×10 perces, PBST-ben történő mosás után anti-nyúl Alexa-555 szekunder antitestekkel (1:1000) szobahőmérsékleten rázattuk a mintákat 1 órán keresztül, majd géldokumentációs rendszerrel fotókat készítettünk. Kontrollként aktint használtunk. Az egyes sávok optikai denzitását lemértük és az aktinra normáltuk.

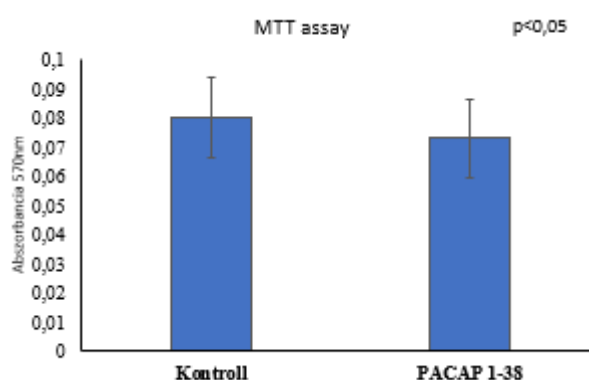
Antitest	Típus	Hígítás	Gyártó
Sox9	anti-nyúl, poliklonális	1:600	Abcam, Cambridge, UK
P-Sox9	anti-nyúl, poliklonális	1:800	Sigma-Aldrich MO, USA
CREB	anti-nyúl, poliklonális	1:600	Millipore, MO, USA
P-CREB	anti-nyúl, poliklonális	1:800	Millipore, MO, USA
PAC1	anti-nyúl, poliklonális	1:500	Sigma-Aldrich MO, USA
Aktin	anti-egér, monoklonális	1:10000	Sigma-Aldrich MO, USA

1. táblázat: Western blot-hoz használt antitestek hígítása és gyártója.

6. Eredmények

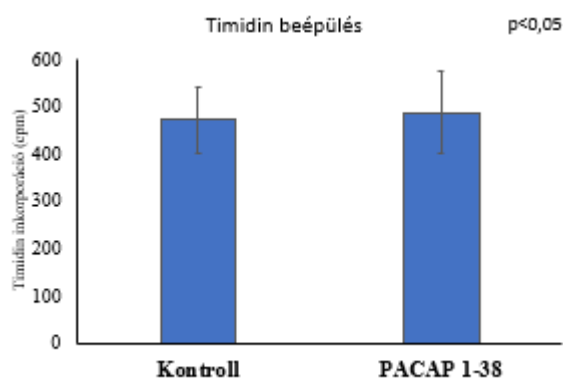
6.1 MTT teszt és proliferáció

A PACAP 1-38 kezelés hatására a sejtek metabolikus aktivitása valamelyest csökkent azonban ez nem érte el a szignifikancia küszöbértékét. Ez az enyhe csökkenés a chondrogenikus differenciáció előjele lehet, hiszen a chondroprogenitor sejtek magasabb metabolikus aktivitással rendelkeznek, mint a chondroblastok. Ez alapján az is kijelenthető, hogy a neuropeptid jelenléte nem indukált citotoxikus folyamatokat és nekrozisra vagy apoptózisra jellemző mitokondriális aktivitás csökkenést sem tapasztaltunk (6. ábra).



6. ábra: CPC tenyészetek életképessége. A CPC sejtek mitokondriális aktivitása nem változott. A szignifikanciérték $p < 0,05$. Statisztikai próba: kétmintás t próba

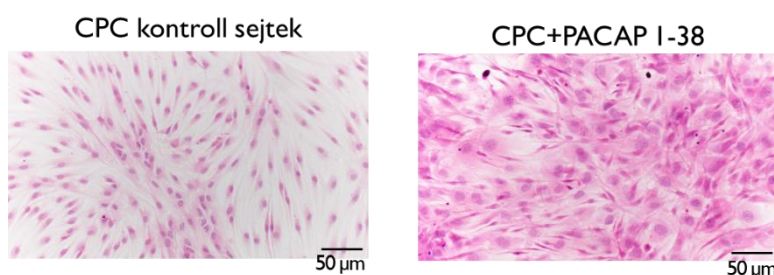
A PACAP proliferációra adott hatásai akár ellentétes irányúak is lehetnek sejttypustól függően, azonban proliferáció a neuropeptid hatására nem változott meg a CPC sejteken (7. ábra). Ez részben adódhat abból, hogy PACAP hatására nem a teljes populáció osztódik, hanem csak bizonyos fázisban lévő sejtek osztódnak jobban, míg mások akár meg is állhatnak az osztódás egy adott fázisában, de kumulatív érték esetén ez nem látható. Ennek részletesebb vizsgálatára más kísérleteket is tervezünk.



7. ábra: CPC tenyészetek proliferációja. A CPC sejtek osztódása nem változott. A szignifikanciérték $p < 0,05$. Statisztikai próba: kétmintás t próba

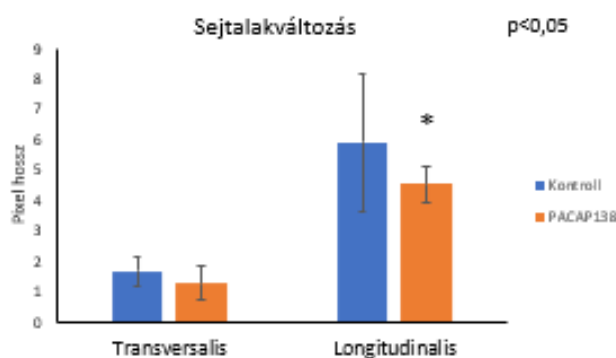
6.2 Sejtmorfológiai analízis

A hematoxin-eosin festést követően megvizsgáltuk a sejtek morfológiáját. Az általunk készített fénymikroszkópos képeken jól megfigyelhető, hogy kontroll körülmények között ezek a sejtek fuziform, orsó alakú sejtek, hosszú, nagyon vékony nyúlványokkal. A sejtek közötti tér, azaz ECM nem mutat specifikus festődést, sem eosinofil, sem basofil struktúrák nem figyelhetők meg. PACAP 1-38 kezelések hatására a sejtek alakja megváltozik, a nyúlványok hossza csökken és a citoplazma enyhe basofiliát mutat, bár ennek pontos megítélése nem feltétlenül precíz ezzel a festéssel (8. ábra).



8. ábra: HE festést követően a hosszú nyúlványos sejtek száma csökken. Lépték 50 µm.

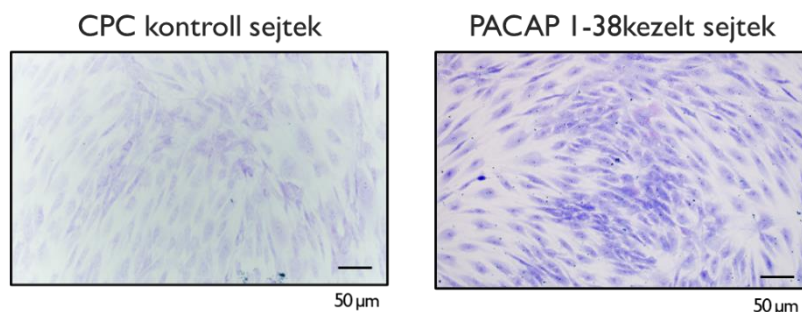
Annak érdekében, hogy a nyúlványok számának csökkenését számszerűsítsük, lemértük a sejtek hosszanti és haránt átmérőjét. PACAP hatására a CPC sejtek longitudinális átmérője szignifikánsan csökkent, ez arányos a nyúlványok számának csökkenésével. Ugyanakkor a transzverzális átmérők esetén csak enyhe csökkenést tapasztaltunk, ami nem érte el a szignifikancia szintet (9. ábra). A sejtek ilyen irányú változása a lekerekedésnek a jele, mely akár utalhat a chondroblast irányú differenciációra.



9. ábra: A sejtek longitudinális irányú átmérőjének csökkenése szignifikáns mértékű PACAP 1-38 kezelés hatására. A szignifikancia $p < 0.05$. Statisztikai próba: kétmintás t próba

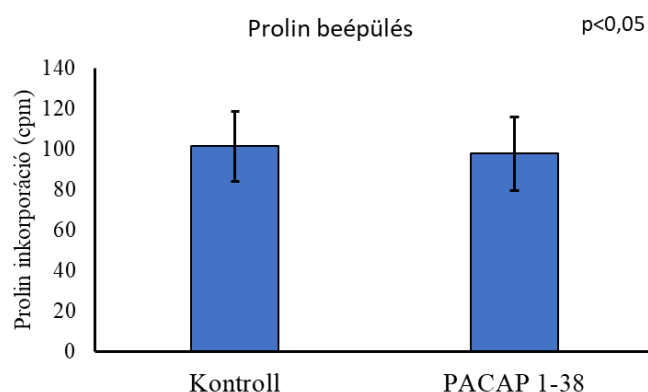
6.3 A CPC sejtek ECM termelésének változásai

A chondrogenikus differenciáció mértékének megítéléséhez vDMMK festést alkalmaztunk. Kontroll körülmények között a CPC sejtek nagyon halvány metakromatikus színt mutatnak közvetlen a sejtek környezetében. Ez a jelenség arra utal, hogy a sejtek a pericelluláris matrixba termelnek alacsonyabb mennyiségű GAG-okat, de ez még nem elegendő a sejtek aktív differenciációjához. Azonban PACAP 1-38 hatására, a CPC sejtek egy lényegesebben erősebb metakromáziát mutató ECM-szal veszik magukat körül. Mindemellett az is megfigyelhető, hogy a sejtek kisebb nodulusokat képeznek, ahol a sejtek körül lévő pericelluláris matrix metakromáziája erősebb, valamint a CPC sejtektől kissé távolabb elhelyezkedő matrix is enyhé metakromáziát mutat (10. ábra).



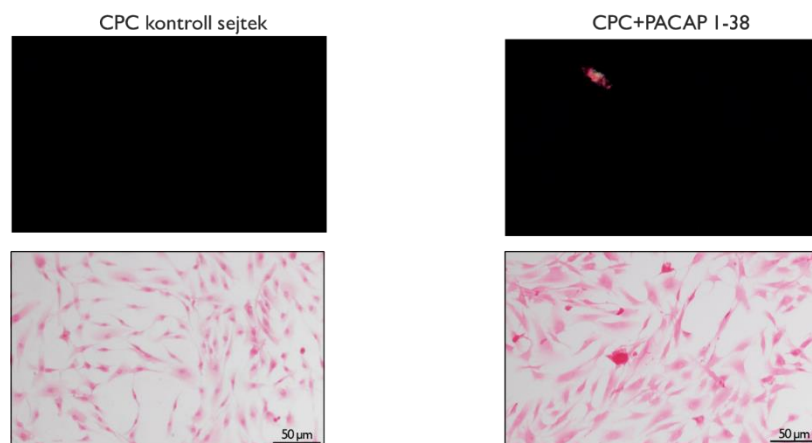
10. ábra: PACAP 1-38 kezelt CPC sejtekben a metakromatikus festődést mutató területek nagysága nő. Lépték 50 µm.

Alapvetően a porcmatrix másik lényeges alkotóeleme a kollagén, melynek esetleges termelődését triciált prolin beépülésével vizsgáltuk. Kontroll körülmények között a CPC sejtek rendelkeznek egy alap kollagéntermelési képességgel, azonban a méréseink alapján ezt a termelést nem változtatja meg a PACAP 1-38 neuropeptid jelenléte (11. ábra). Ez a látszólagos ellentmondás könnyen feloldható, ha elfogadjuk azt a tényt, hogy a korai differenciáció első szakaszában a GAG-ok termelése kezdődik, melyet időben eltolva követ a II-es típusú kollagén megjelenése. Ugyanakkor azt is el kell mondani, hogy a chondroprogenitor sejtek aktívan termelnek I-es típusú kollagént, mely így prolin beépüléssel nem különíthető el a II-es típusú kollagéntól.



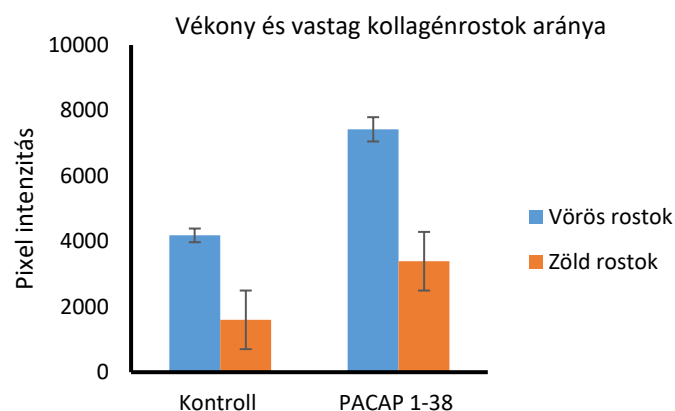
11. ábra: CPC tenyészetek kollagéntermelése. A CPC sejtek kollagéntermelése nem változott. A szignifikanciérték $p < 0,05$. Statisztikai próba: kétmintás t próba

A korábban tapasztalt kérdések felmerülésének tisztázására picosirius vörös festéssel a kollagénrostok orientációját vizsgáltuk polarizációs mikroszkópban. A II-es típusú kollagén megjelenése vastagabb és rendezett kollagénrostokat eredményez, melyek így polarizációs mikroszkóppal láthatóvá tehetők. Amennyiben polarizált fényben vizsgáljuk a kultúrákat a kollagéntartalmú struktúrák enyhén pirosas-narancssárgás színben jelennek meg, még abban az esetben is, ha ez kollagén előalakot jelent. A kontroll körülmények között tartott CPC sejtek citoplazmájában erős vörös színt láthatunk, hasonlóan a PACAP 1-38-al kezelt sejtekhez. Azonban a neuropeptid jelenlétében kisebb erősen festődő extracellulárisan elhelyezkedő struktúrák jelennek meg, melyek nem voltak láthatóak vDMMK festéssel, azaz metakromáziát nem mutattak. Amennyiben a polarizált fény síkját $\lambda/4$ -el elforgatjuk, akkor a sejtek körül, között megfelelő orientációban elhelyezkedő kollagén tehető láthatóvá. Kontroll körülmények között ilyen jellegű piros struktúra nem látható, enyhe zöldes sávok alkalmanként előfordulnak, ami inkább a vékonyabb kollagénrostokra jellemző. PACAP kezelések azonban vörösen világító struktúrált képleteket eredményeztek, mindamellett, hogy enyhe zöldes szín itt is látható volt (12. ábra).



12. ábra: CPC tenyészetek kollagéntermelése. Picosirius vörös festést követően, majd a polarizált fény síkját elforgatva. Lépték 50 μm

Annak érdekében, hogy ezen utóbbi eredményeket számszerűsítsük, lemértük a piros és zöld pixelek számát, mellyel következtetni lehet az alig látható kisebb rostok arányára is. Megállapítható, hogy PACAP 1-38 jelenlétében a pirosan megjelenő vastagabb és rendezettebb rostok aránya szignifikánsan emelkedik. Ugyanakkor a vékonyabb zölden sejlő rostok aránya is emelkedik, bár az lényegesen alacsonyabb mértékben (13. ábra)

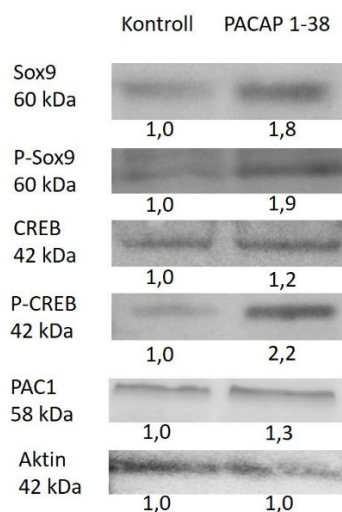


13. ábra: CPC sejtekben a vastag és vékony kollagénrostok aránya. A CPC sejtek PACAP hatására rendezettebb kollagénmatrixot expresszálnak. A szignifikanciérték $p < 0,05$. Statisztikai próba: kétmintás t próba

6.4 A transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálata

A CPC sejteken kimutattuk a legfontosabb PACAP receptor, a PAC1 expresszióját, melyen keresztül a neuropeptid kifejtheti hatását. A Sox9 transzkripciós faktor expressziója kontroll körülmények között elég alacsony, de majdnem kétszeres expresszió emelkedést tapasztaltunk PACAP jelenlétében. A CREB expressziója jól kimutatható viszonylag magas

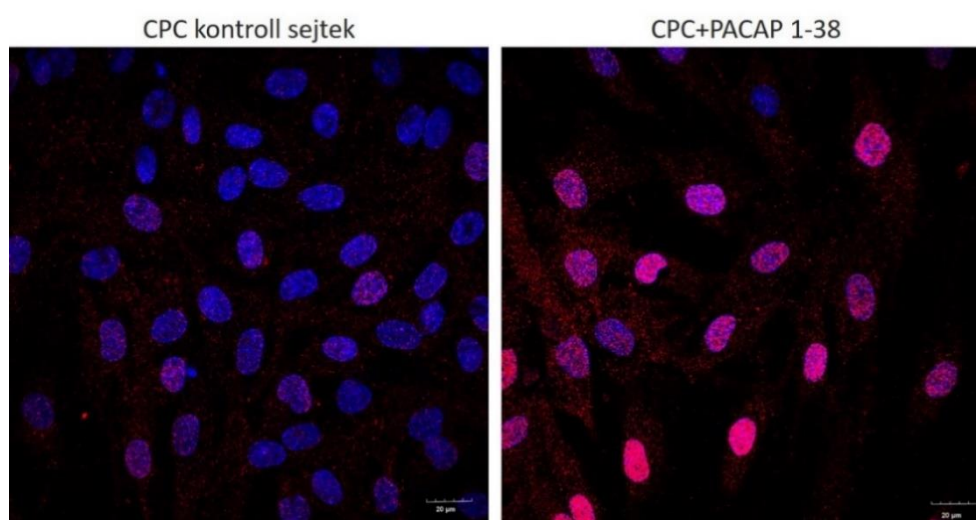
expressziós szinten, ami nem változik nagy mértékben PACAP jelenlétében. Azonban a P-CREB expressziója duplájára emelkedik a neuropeptid jelenlétében (14. ábra).



14. ábra: A transzkripciós faktorok expressziójának vizsgálata. A CPC sejtekben PACAP hatására a foszforilált formájának expressziója emelkedik. Belső kontrollként aktint használtunk, melyre normalizáltuk a denzitást. A sávok alatti számok a kontrollra vonatkoztatott különbséget mutatják.

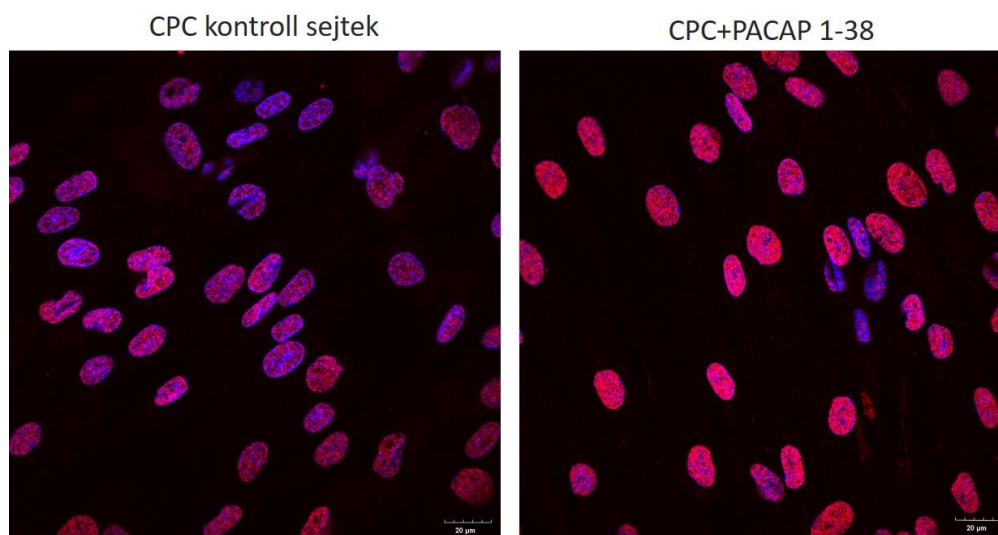
6.5 A transzkripciós faktorok nukleáris lokalizációja

Konfokális mikroszkóp segítségével immuncitokémiai eljárást követően követtük nyomon a P-Sox9 és P-CREB transzkripciós faktorok lokalizációját. Kontroll körülmények között a P-Sox9 nagyon alacsony mértékben detektálható a sejtmagban és a citoplazmában egyaránt. A sejtmagi lokalizáció nem egységesen jelenik meg a sejtekben, van ahol erősebben, van olyan sejt, ahol alig detektálható. Azonban a PACAP jelenléte fokozza a magban detektálható immunpozitivitást, valamint az intenzitást, azaz az expresszió is növekedést mutat (15. ábra).



15. ábra: P-Sox9 immuncitokémia. Alexa 555 vörös színnel a P-Sox9-et, illetve DAPI-val jelöltük a sejtmagokat. A lépték 20 µm.

A P-CREB esetében a kontroll körülmények között is erős a magi jelenlét és szinte minden sejt pozitivitást mutat. PACAP 1-38 hatására a magi jelenét fokozódik és az intenzitás is erősödik, habár ennek a szép elkülöníthetősége elmarad a P-Sox9-tól (16. ábra)



16. ábra: P-CREB immuncitokémia. Alexa 555 vörös színnel a P-CREB-et, illetve DAPI-val jelöltük a sejtmagokat. A lépték 20 μm.

7. Diszkusszió

A PACAP-ot a 80-as években történt izolálása óta [25] óta számos perifériás szövetben leírták már [26]. Számos publikáció jelent meg az elmúlt években, melyek különböző fejlődéstani folyamatokban betöltött direkt vagy indirekt szabályozó funkcióját írják le [34]. Több crosstalk útvonal is ismert, melyekben a PACAP fontos szerepet játszik, többek között a fogfejlődés során is [33]. PACAP KO állatokkal végzett kísérletek bizonyítják az öregedési folyamatokban betöltött szerepét a porcban [39]. PACAP hiányában a callusképződés zavart szenved [38], a PACAP pozitív irányba befolyásolja a chondrogenesist és osteogenesisist is [27]. *In vitro* porctenyészetekben leírták már védő hatásait az oxidatív stresszel szemben [40], továbbá a túlzott mechanikai ingerrel szemben kifejtett kompenzáló hatásait [41]. Ismert, hogy az öregedési folyamatok során csökken a PACAP receptorok expressziója PACAP KO egerekben [39].

Megoldatlan probléma az osteoarthritis hatékony kezelése, mely emberek millióit érinti szerte a világon. Az articulatio genus a terhelésnek legnagyobb mértékben kitett ízületünk, mely sérülése esetén a szövet aneurális és avascularis tulajdonságai miatt, valamint a chondrocyták posztmitotikus állapota miatt [2] regenerációra csak korlátozott mértékben képes. Azonban a betegség kialakulás során számos adat utal arra, hogy a szubkondrális térből összejtek vándorolnak a synoviális térbe, melyek funkciója eddig nem teljesen ismert. Illetve ezen sejtek differenciációja nehézkes és elég költséges speciális körülményeket kell ahhoz teremteni, hogy elinduljanak ezen az úton. Rengeteg próbálkozás van arra nézve, hogy összejtek beültetésével, vagy akár mesteréges scaffoldok beültetésével pótolják a degradálódott porcfelszínt [42]. Érdekes, hogy a mai génmódosítási technikák és farmakológiai aktiválhatóság mellett a legtöbb ilyen irányú kísérlet kudarcba fullad. A mai tudásunk szerint a porcdifferenciációt indukáló ágensek nem köthetők egy adott molekulához, ezért a leghasznosabb ilyen jellegű próbálkozások a kombinált faktorok adagolásában merülnek ki [43]. Ugyanakkor azt is meg kell jegyezni, hogy egy ilyen kemény és stabil szövet megfelelő kialakulásához elengedhetetlen a megfelelő időben alkalmazott mechanikai inger is [44]. A legegyszerűbb kísérletes felállás azonban arra utal, hogy a normál körülmények között is meglévő ágenseket, hormonokat, molekulákat kell lokálisan alkalmazni, melyek triggerelik a fiziológiásan is meglévő regenerációs folyamatokat.

Munkánk során humán eredetű osteoarthritisből izolált mesenchymalis eredetű chondroprogenitor összejteket tenyésztünk, majd szintetikus PACAP 1-38 kezeléseket

alkalmaztunk. Kísérleteink eredményei alapján elmondhatjuk, hogy a PACAP 1-38 kezelés nem eredményezett nekrotikus elváltozásokat a kultúráinkon, viszont valamelyest csökkent a chondroprogenitor sejtek metabolikus aktivitása a neuropeptid jelenlétében. Ezutóbbi eredmény arra utal, hogy az aktívan proliferáló és migráló sejtek metabolikus aktivitása megváltozott és inkább a chondroblastokra jellemző alacsonyabb metabolikus aktivitás irányába tolódott [45]. Ez a kis eredmény is arra utal, hogy a CPC sejtek elindultak a differenciáció útján. Ugyanakkor azt is el kell mondani, hogy a sejtek proliferációs aktivitása nem változott szignifikáns mértékben, melynek eltérő okai lehetnek, hiszen a PACAP hatásai az eltérő osztódási fázisban lévő sejtekre, vagy különböző szövetekben lévő sejtekre eltérő módon vagy akár ellentétes módon hathat a proliferáció tekintetében [46]. Előfordulhat az a jelenség is, hogy egyes sejtek a CPC populációban erőteljesebben osztódnak, míg más sejtek megakadtak az osztódás bizonyos fázisában. Azonban eredményeink szerint ezek a nyúlványos fuziform morfológiájú sejtek lekerekednek és nyúlványaikat elvesztik a neurohormon kezelés hatására. Ezen eredmények egybevágznak azzal a ténnyel, hogy mind az *in vitro*, mind az *in vivo* porcdifferenciáció kezdeti lépéseiben a mesenchymalis sejtek hasonlóan alakulnak át [15]. Ezek az eredmények erősen arra utalnak, hogy a chondroprogenitor sejtek chondroblast irányba differenciálódnak. Ennek bizonyításra megpróbáltuk megvizsgálni a sejtek matrixtermelésének momentumait és erősödő metakromáziát mutattunk ki, azonban alacsony kollagénexpressziót is detektáltunk. Ezek az eredmények korrelálnak azzal a korábban már kimutatott folyamattal, miszerint a chondroblastok először a korai differenciációs szakaszban GAG-kal veszik magukat körül [47], valamint a mesenchymalis sejtek is I-es típusú kollagénben gazdag matrixot termelnek, mely a chondroblastok differenciációja során lebontódik, és helyette II-es típusú kollagénben gazdag matrixtermelés kezdődik. Ezt a dinamikus átalakulást már korábban leírták a high density kultúrákban [41]. Ezen kísérletekben egy olyan fázisát vizsgáltuk a differenciációnak ahol a II-es és I-es típusú kollagén expressziója és lebontása egy egyensúlyi helyzetet mutathat, bár azt is igazoltuk, hogy PACAP hatására enyhén rendezett kollagénstruktúrák is megjelennek, ami a differenciáció erősödésére utal. A kollagéntermelésért felelős PACAP által regulált jelátviteli elemek expresszióját, így a P-Sox9-nek és a P-CREB-nek az expresszióját is igazoltuk a CPC sejteken. Ezen mestergének folyamatos aktivitása nélkülözhetetlen a megfelelő porcdifferenciációhoz, melyet már korábban igazoltak high density kultúrákon [48]. Ezen transzkripció faktorok nukleáris transzlokációja és aktivitása fontos marker a porcdifferenciáció megítélésére, valamint korábban már igazolt PACAP által indukált transzkripció faktorok [27]. A CPC sejtekben lévő nukleáris jelenlét emelkedése is arra utal, hogy a chondroprogenitor sejtek aktívan elkezdik a porcra jellemző matrixtermelést.

Kísérleteink tehát arra utalnak, hogy a PACAP egy olyan neuropeptid lehet, melynek jelenléte a porcregenerációban és differenciációban egyaránt fontos jelentőséggel bírhat. Osteoarthritis során megjelenő őssejtek a synoviális térben esetleges PACAP adagolás során akár gyorsabban rávehetők a porcmatrix aktív termelésére, ezáltal megállítható a degradációs folyamatok kialakulása, és a regeneráció egy természetes neuropeptiddel indukálható. Így kísérleteink felvetik annak a lehetőségét, hogy osteoarthritis esetén intraarticularis alkalmazott PACAP 1-38 kezelés javíthatna a porcregenerációs folyamatokban a synoviális térben található chondroprogenitor őssejtek differenciációjának fokozásán keresztül. Azonban arról nem szabad elfeledkeznünk, hogy a PACAP esetleges mellékhatásait is fel kell deríteni. Korábban már kimutatták, hogy a PACAP szignalizációs balansz megzavarása akár negatív irányba is eltolhat bizonyos fejlődési folyamatokat [35]. Valamint fontos kérdésként vetődhet fel, hogy az esetleges PACAP adagolás átjuthat-e a vér-placenta gáton és hogyan befolyásolhat egy emberi vagy akár egy adott végtag fejlődést.

Továbbiakban állatkísérleteket végzünk, mely során patkányokban mesterségesen osteoarthritiszt indukálunk, majd lokális PACAP 1-38 kezeléseket alkalmazunk bizonyítandó az *in vivo* pozitív hatásait a neuropeptidnek. Ugyanakkor azt elmondhatjuk, hogy a PACAP egy potenciális jelölt lehet az osteoarthritis kuratív kezelésében.

8. Irodalomjegyzék

1. Kurenkova, A. D.; Medvedeva, E. V.; Newton, P. T.; Chagin, A. S., Niches for Skeletal Stem Cells of Mesenchymal Origin. *Front Cell Dev Biol* **2020**, 8, 592.
2. Correa, D.; Lietman, S. A., Articular cartilage repair: Current needs, methods and research directions. *Semin Cell Dev Biol* **2017**, 62, 67-77.
3. Röhlich, P., *Szövektan*. 4. ed.; Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió: 2014; p 556.
4. Disease, G. B. D.; Injury, I.; Prevalence, C., Global, regional, and national incidence, prevalence, and years lived with disability for 354 diseases and injuries for 195 countries and territories, 1990-2017: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2017. *Lancet* **2018**, 392, (10159), 1789-1858.
5. Mobasheri, A.; Batt, M., An update on the pathophysiology of osteoarthritis. *Ann Phys Rehabil Med* **2016**, 59, (5-6), 333-339.
6. Kapoor, M.; Martel-Pelletier, J.; Lajeunesse, D.; Pelletier, J. P.; Fahmi, H., Role of proinflammatory cytokines in the pathophysiology of osteoarthritis. *Nat Rev Rheumatol* **2011**, 7, (1), 33-42.
7. Musumeci, G.; Loreto, C.; Carnazza, M. L.; Martinez, G., Characterization of apoptosis in articular cartilage derived from the knee joints of patients with osteoarthritis. *Knee Surg Sports Traumatol Arthrosc* **2011**, 19, (2), 307-13.
8. Basso, P. R.; Carava, E.; Protasoni, M.; Reguzzoni, M.; Raspanti, M., The synovial surface of the articular cartilage. *Eur J Histochem* **2020**, 64, (3).
9. Blagojevic, M.; Jinks, C.; Jeffery, A.; Jordan, K. P., Risk factors for onset of osteoarthritis of the knee in older adults: a systematic review and meta-analysis. *Osteoarthritis Cartilage* **2010**, 18, (1), 24-33.
10. Hawker, G. A.; Stewart, L.; French, M. R.; Cibere, J.; Jordan, J. M.; March, L.; Suarez-Almazor, M.; Gooberman-Hill, R., Understanding the pain experience in hip and knee osteoarthritis--an OARSI/OMERACT initiative. *Osteoarthritis Cartilage* **2008**, 16, (4), 415-22.
11. Punwar, S.; Khan, W. S., Mesenchymal stem cells and articular cartilage repair: clinical studies and future direction. *Open Orthop J* **2011**, 5 Suppl 2, 296-301.
12. Koelling, S.; Kruegel, J.; Irmer, M.; Path, J. R.; Sadowski, B.; Miro, X.; Miosge, N., Migratory chondrogenic progenitor cells from repair tissue during the later stages of human osteoarthritis. *Cell Stem Cell* **2009**, 4, (4), 324-35.

13. Schminke, B.; Miosge, N., Cartilage repair in vivo: the role of migratory progenitor cells. *Curr Rheumatol Rep* **2014**, 16, (11), 461.
14. Sadler, D. T. W., *Langman's Medical Embryology*. LWW: 2023; Vol. 15.
15. Goldring, M. B.; Tsuchimochi, K.; Ijiri, K., The control of chondrogenesis. *J Cell Biochem* **2006**, 97, (1), 33-44.
16. Kawakami, Y.; Rodriguez-Leon, J.; Izpisua Belmonte, J. C., The role of TGFbetas and Sox9 during limb chondrogenesis. *Curr Opin Cell Biol* **2006**, 18, (6), 723-9.
17. Kamachi, Y.; Kondoh, H., Sox proteins: regulators of cell fate specification and differentiation. *Development* **2013**, 140, (20), 4129-44.
18. Sekiya, I.; Tsuji, K.; Koopman, P.; Watanabe, H.; Yamada, Y.; Shinomiya, K.; Nifuji, A.; Noda, M., SOX9 enhances aggrecan gene promoter/enhancer activity and is up-regulated by retinoic acid in a cartilage-derived cell line, TC6. *J Biol Chem* **2000**, 275, (15), 10738-44.
19. Lefebvre, V.; Huang, W.; Harley, V. R.; Goodfellow, P. N.; de Crombrughe, B., SOX9 is a potent activator of the chondrocyte-specific enhancer of the pro alpha1(II) collagen gene. *Mol Cell Biol* **1997**, 17, (4), 2336-46.
20. Zhang, P.; Jimenez, S. A.; Stokes, D. G., Regulation of human COL9A1 gene expression. Activation of the proximal promoter region by SOX9. *J Biol Chem* **2003**, 278, (1), 117-23.
21. Bridgewater, L. C.; Lefebvre, V.; de Crombrughe, B., Chondrocyte-specific enhancer elements in the Col11a2 gene resemble the Col2a1 tissue-specific enhancer. *J Biol Chem* **1998**, 273, (24), 14998-5006.
22. Huang, W.; Zhou, X.; Lefebvre, V.; de Crombrughe, B., Phosphorylation of SOX9 by cyclic AMP-dependent protein kinase A enhances SOX9's ability to transactivate a Col2a1 chondrocyte-specific enhancer. *Mol Cell Biol* **2000**, 20, (11), 4149-58.
23. Lee, Y. S.; Chuong, C. M., Activation of protein kinase A is a pivotal step involved in both BMP-2- and cyclic AMP-induced chondrogenesis. *J Cell Physiol* **1997**, 170, (2), 153-165.
24. Zhao, L.; Li, G.; Zhou, G. Q., SOX9 directly binds CREB as a novel synergism with the PKA pathway in BMP-2-induced osteochondrogenic differentiation. *J Bone Miner Res* **2009**, 24, (5), 826-36.
25. Miyata, A.; Arimura, A.; Dahl, R. R.; Minamino, N.; Uehara, A.; Jiang, L.; Culler, M. D.; Coy, D. H., Isolation of a novel 38 residue-hypothalamic polypeptide which

- stimulates adenylate cyclase in pituitary cells. *Biochem Biophys Res Commun* **1989**, 164, (1), 567-74.
26. Vaudry, D.; Falluel-Morel, A.; Bourgault, S.; Basille, M.; Burel, D.; Wurtz, O.; Fournier, A.; Chow, B. K.; Hashimoto, H.; Galas, L.; Vaudry, H., Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide and its receptors: 20 years after the discovery. *Pharmacol Rev* **2009**, 61, (3), 283-357.
 27. Juhasz, T.; Matta, C.; Katona, E.; Somogyi, C.; Takacs, R.; Gergely, P.; Csernoch, L.; Panyi, G.; Toth, G.; Reglodi, D.; Tamas, A.; Zakany, R., Pituitary adenylate cyclase activating polypeptide (PACAP) signalling exerts chondrogenesis promoting and protecting effects: implication of calcineurin as a downstream target. *PLoS One* **2014**, 9, (3), e91541.
 28. Moody, T. W.; Hill, J. M.; Jensen, R. T., VIP as a trophic factor in the CNS and cancer cells. *Peptides* **2003**, 24, (1), 163-77.
 29. Lazar, Z.; Shahbazian, A.; Benko, R.; Toth, G.; Penke, B.; Bartho, L.; Holzer, P., PACAP-(6-38) inhibits the effects of vasoactive intestinal polypeptide, but not PACAP, on the small intestinal circular muscle. *Eur J Pharmacol* **2001**, 431, (2), 259-64.
 30. Moro, O.; Wakita, K.; Ohnuma, M.; Denda, S.; Lerner, E. A.; Tajima, M., Functional characterization of structural alterations in the sequence of the vasodilatory peptide maxadilan yields a pituitary adenylate cyclase-activating peptide type 1 receptor-specific antagonist. *J Biol Chem* **1999**, 274, (33), 23103-10.
 31. Li, M.; Maderdrut, J. L.; Lertora, J. J.; Arimura, A.; Batuman, V., Renoprotection by pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide in multiple myeloma and other kidney diseases. *Regul Pept* **2008**, 145, (1-3), 24-32.
 32. Gourlet, P.; Vandermeers, A.; Vertongen, P.; Rathe, J.; De Neef, P.; Cnudde, J.; Waelbroeck, M.; Robberecht, P., Development of high affinity selective VIP1 receptor agonists. *Peptides* **1997**, 18, (10), 1539-45.
 33. Sandor, B.; Fintor, K.; Felszeghy, S.; Juhasz, T.; Reglodi, D.; Mark, L.; Kiss, P.; Jungling, A.; Fulop, B. D.; Nagy, A. D.; Hashimoto, H.; Zakany, R.; Nagy, A.; Tamas, A., Structural and morphometric comparison of the molar teeth in pre-eruptive developmental stage of PACAP-deficient and wild-type mice. *J Mol Neurosci* **2014**, 54, (3), 331-41.
 34. Juhasz, T.; Helgadottir, S. L.; Tamas, A.; Reglodi, D.; Zakany, R., PACAP and VIP signaling in chondrogenesis and osteogenesis. *Peptides* **2015**, 66, 51-7.

35. Maunze, B.; Choi, S., Hypothalamic PACAP/PAC1R Involvement in Feeding and Body Weight Regulation. *Endocrinology* **2023**, 164, (5).
36. Kvarik, T.; Reglodi, D.; Werling, D.; Vaczy, A.; Kovari, P.; Szabo, E.; Kovacs, K.; Hashimoto, H.; Ertl, T.; Gyarmati, J.; Atlasz, T., The Protective Effects of Endogenous PACAP in Oxygen-Induced Retinopathy. *J Mol Neurosci* **2021**, 71, (12), 2546-2557.
37. Jozsa, G.; Szegeczki, V.; Palfi, A.; Kiss, T.; Helyes, Z.; Fulop, B.; Cserhati, C.; Daroczi, L.; Tamas, A.; Zakany, R.; Reglodi, D.; Juhasz, T., Signalling Alterations in Bones of Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Gene Deficient Mice. *Int J Mol Sci* **2018**, 19, (9).
38. Jozsa, G.; Fulop, B. D.; Kovacs, L.; Czibere, B.; Szegeczki, V.; Kiss, T.; Hajdu, T.; Tamas, A.; Helyes, Z.; Zakany, R.; Reglodi, D.; Juhasz, T., Lack of Pituitary Adenylate Cyclase-Activating Polypeptide (PACAP) Disturbs Callus Formation. *J Mol Neurosci* **2021**, 71, (8), 1543-1555.
39. Szegeczki, V.; Bauer, B.; Jungling, A.; Fulop, B. D.; Vago, J.; Perenyi, H.; Tarantini, S.; Tamas, A.; Zakany, R.; Reglodi, D.; Juhasz, T., Age-related alterations of articular cartilage in pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) gene-deficient mice. *Geroscience* **2019**, 41, (6), 775-793.
40. Juhasz, T.; Matta, C.; Somogyi, C.; Katona, E.; Takacs, R.; Soha, R. F.; Szabo, I. A.; Cserhati, C.; Szody, R.; Karacsonyi, Z.; Bako, E.; Gergely, P.; Zakany, R., Mechanical loading stimulates chondrogenesis via the PKA/CREB-Sox9 and PP2A pathways in chicken micromass cultures. *Cell Signal* **2014**, 26, (3), 468-82.
41. Szenteleky, E.; Szegeczki, V.; Karanyicz, E.; Hajdu, T.; Tamas, A.; Toth, G.; Zakany, R.; Reglodi, D.; Juhasz, T., Pituitary Adenylate Cyclase Activating Polypeptide (PACAP) Reduces Oxidative and Mechanical Stress-Evoked Matrix Degradation in Chondrifying Cell Cultures. *Int J Mol Sci* **2019**, 20, (1).
42. Liu, Y.; Du, L.; Zhang, H.; Li, G.; Luo, Y.; Hu, Z.; Xu, R.; Yao, J.; Shi, Z.; Chen, Y.; Zhang, C.; Jin, Z.; Zhang, C.; Xie, C.; Fu, J.; Zhu, Y.; Zhu, Y., Bioprinted biomimetic hydrogel matrices guiding stem cell aggregates for enhanced chondrogenesis and cartilage regeneration. *J Mater Chem B* **2024**.
43. van der Kraan, P. M.; van Caam, A. P. M.; Blaney Davidson, E. N.; van den Bosch, M. H. J.; van de Loo, F. A. J., Growth factors that drive aggrecan synthesis in healthy articular cartilage. Role for transforming growth factor-beta? *Osteoarthr Cartil Open* **2024**, 6, (2), 100459.

44. Jeyaraman, M.; Jeyaraman, N.; Nallakumarasamy, A.; Ramasubramanian, S.; Yadav, S., Critical Challenges and Frontiers in Cartilage Tissue Engineering. *Cureus* **2024**, 16, (1), e53095.
45. Juhasz, K. Z.; Hajdu, T.; Kovacs, P.; Vago, J.; Matta, C.; Takacs, R., Hypoxic Conditions Modulate Chondrogenesis through the Circadian Clock: The Role of Hypoxia-Inducible Factor-1alpha. *Cells* **2024**, 13, (6).
46. D'Amico, A. G.; Maugeri, G.; Rasa, D. M.; Reitano, R.; Saccone, S.; Federico, C.; Magro, G.; D'Agata, V., Modulatory role of PACAP and VIP on HIFs expression in lung adenocarcinoma. *Peptides* **2021**, 146, 170672.
47. Staubli, F.; Stoddart, M. J.; D'Este, M.; Schwab, A., Pre-culture of human mesenchymal stromal cells in spheroids facilitates chondrogenesis at a low total cell count upon embedding in biomaterials to generate cartilage microtissues. *Acta Biomater* **2022**, 143, 253-265.
48. Zakany, R.; Szucs, K.; Bako, E.; Felszeghy, S.; Czifra, G.; Biro, T.; Modis, L.; Gergely, P., Protein phosphatase 2A is involved in the regulation of protein kinase A signaling pathway during in vitro chondrogenesis. *Exp Cell Res* **2002**, 275, (1), 1-8.

9. Függelék

Önállóan végzett munka:

- sejtenyésztés
- MTT assay
- proliferáció vizsgálata
- triciált prolin beépülésének vizsgálata
- szövettani festések
- Westren blot
- Immuncitokémia

Segítséggel végzett munka:

- Konfokális mikroszkóp használata