

——— Országos Tudományos Diákköri Dolgozat ———

***In vitro* sejtenyésztés poli(aminosav) alapú géleken**

Készítette:

Sipos Evelin

Témavezető:

Dr. Zrínyi Miklós

Egyetemi tanár, Akadémikus

Konzulens:

Juriga Dávid

PhD hallgató

SE, Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet



——— Eötvös Loránd Tudományegyetem ———

——— Természettudományi Kar ——

— Budapest, 2014/2015 —

Köszönetnyilvánítás

Elsősorban szeretnék köszönetet mondani témavezetőmnek, Dr. Zrínyi Miklósnak, aki helyet adott nekem a kutatócsoportjában, felkeltette érdeklődésemet a téma iránt, valamint hasznos tanácsokkal látott el munkám során.

Köszönet illeti Juriga Dávidot, aki konzulensemként segítséget nyújtott a kísérleti munkában, és útmutatással szolgált munkám elvégzésében.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Biofizikai és Sugárbiológiai Intézet Nanokémiai Kutatócsoport minden tagjának hogy tanácsaikkal hozzájárultak munkám sikeréhez.

Köszönöm a Semmelweis Egyetem Orálbiológia Tanszékén dolgozó kutatók segítségét a sejtes kísérletek lebonyolításában.

Köszönöm a családom minden térre kiterjedő támogatását.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	5
2.	Irodalmi áttekintés.....	7
2.1.	Új lehetőségek a sejttenyésztésben: 2D-ből 3D-be váltás	7
2.2.	<i>In vitro</i> sejttenyésztésben használt szövettámaszok tulajdonságai	8
2.3.	Polimer gélek.....	8
2.3.1.	Polimer géleket jellemző mennyiségek és fogalmak	10
2.3.2.	Polimer gélek duzzadási egyensúlya.....	11
2.4.	Biopolimerek és Poli(aminosav)-ak	13
2.4.1.	Poli(aminosav)-ak szintézise.....	14
2.4.1.1.	<i>N-karboxianhidrides módszer (NCA)</i>	14
2.4.1.2.	<i>Pszeudo-poli(aminosav) előállítása</i>	15
2.4.1.3.	<i>Poli(aminosav) előállítása termikus polikondenzációval</i>	15
2.5.	Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) előállítása.....	15
2.5.1.	Poli(szukcinimid) reaktivitása.....	16
2.5.1.1.	<i>Poli(szukcinimid) reakciója O-nukleofilekkel</i>	16
2.5.1.2.	<i>Poli(szukcinimid) reakciója N-nukleofilekkel</i>	17
3.	Célkitűzés.....	19
4.	Kísérleti rész.....	20
4.1.	Felhasznált anyagok	20
4.2.	Poli(szukcinimid) (PSI) előállítás.....	20
4.3.	Poli(szukcinimid) tulajdonságainak vizsgálata	21
4.3.1.	Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása viszkozitás méréssel ...	21
4.3.2.	Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR).....	22
4.3.3.	Mágneses magrezonancia mérés (NMR)	22
4.4.	Cisztaminnal és lizinnel egyidejűleg keresztkötött poli(szukcinimid) gélek (PSI-CYS-LYS) szintézise.....	23
4.5.	Poli(aszparaginsav) alapú gél előállítása	24
4.6.	Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek vizsgálata.....	25
4.6.1.	Gélek duzzadáskinetikájának vizsgálata hidrolízis során	25
4.6.2.	Hálóláncok sűrűségének meghatározása rugalmassági modulusz mérésével	26
4.6.3.	Gélek duzzadásfokának változása az alkalmazott DTT mennyiségének függvényében	28
4.6.4.	Duzzadásfok pH-függésének vizsgálata.....	29

4.6.5.	Sejtek életképességének vizsgálata PASP géleken (WST-1).....	29
5.	Eredmények.....	31
5.1.	Poli(szukcinimid) tulajdonságainak vizsgálata	31
5.1.1.	Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása viszkozitás méréssel ...	31
5.1.2.	Fourier transzformációs infravörös mérés (FTIR)	32
5.1.3.	Mágneses magrezonancia mérés (NMR)	33
5.2.	Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek vizsgálata.....	34
5.2.1.	PSI-CYS-LYS gélek duzzadáskinetikájának vizsgálata hidrolízis során	35
5.2.2.	Hálóláncok sűrűségének meghatározása rugalmassági modulusz mérésével	36
5.2.3.	Gélek duzzadásfokának változása az alkalmazott DTT mennyiségének függvényében	39
5.2.4.	Duzzadásfok pH-függésének vizsgálata.....	41
5.2.5.	PDLSC sejtek életképességének vizsgálata a gélek felületén	42
6.	Összefoglalás.....	44
7.	Irodalomjegyzék.....	45

1. Bevezetés

Sejtek két dimenzióban történő *in vitro* tenyésztése a mai napra már rutin technikává vált. Ezen vizsgálatok segítségével rálátást kaptunk, hogy a sejtek hogyan reagálnak a különböző környezeti hatásokra, növekedési faktorokra és kis molekulás anyagokra (pl.: gyógyszerek). Hátránya azonban, hogy így csak egy sejtréteg hozható létre, illetve a sejtek komplex, natív struktúrája nem képes kialakulni. Natív, többrétegű szerkezettel bíró szerveződés létrehozását csak háromdimenziós sejttenyésztéssel tudnánk megoldani. Háromdimenziós sejttenyésztés segítségével előállíthatóak mesterséges szövetek, melyekben tanulmányozható a sejtek közötti kommunikáció, valamint orvos-biológiai felhasználáshoz akár a beteg saját reprodukcióra képes sejtjeiből készíthetőek implantátumok. Ezáltal elkerülhetővé válna az implantátum beültetése során esetlegesen jelentkező immunreakció. Természetes körülmények között a sejtek szaporodásának környezete az extracelluláris mátrix (ECM). Ezáltal *in vitro* sejttenyésztéshez is olyan tulajdonságokkal rendelkező anyag szükséges, amely a legnagyobb mértékben hasonlít a sejtek ezen természetes környezetéhez [1, 2].

A mesterséges mátrixoknak a természetes ECM-hez hasonló mechanikai, diffúziós tulajdonságokkal kell rendelkeznie valamint a sejtek adhéziójához és szaporodásához ideális körülményeket kell biztosítani. Ehhez a sejtek és a szövetámasz között egy kölcsönös kommunikációnak kell megvalósulnia, tehát a mesterséges ECM-nek tudnia kell a változásokra reagálni és nem csak egy inert támaszként viselkedni. Ezt még inkább nehezíti az a tény, hogy a különböző sejt típusok más-más környezetet részesítenek előnyben. Éppen ezért egy olyan anyagot kell létrehoznunk, amelyben a fent említett tulajdonságok igény szerint változtathatóak. Ilyen anyagok lehetnek például a polimer gélek.

A polimer gélek polimer térhálóból és folyadék elegyből állnak, így rugalmasak és a kis molekulás anyagok diffúziója is megvalósul bennük. Emellett a környezet körülményeinek megváltozására válaszreakciót mutatnak, így a sejt-szövetámasz kommunikáció is kialakulhat. A polimer láncok módosítása nyomán a gél fent említett tulajdonságai megváltoztathatók, amellyel növelhető a sejtek adhéziója és proliferációja. A polimer térhálónak emellett biokompatibilisnek kell lennie.

Ilyen típusú polimerek a poli(aminosav)-ak, melyek építőelemei megtalálhatók az élő szervezetben, ebből kifolyólag biokompatibilisek, vagyis nem váltanak ki immunreakciót. Poli(aminosav)-ak fizikai-kémiai tulajdonságai változtathatók az őket felépítő aminosavak

változtatásával, azonban laboratóriumi körülmények között nagy molekulatömegű előállításuk nehézkes [18].

Az aszparaginsav termikus polikondenzációjával nagy molekulatömegű polimer, poli(szukcinimid) (PSI) állítható elő, amely a poli(aszparaginsav) (PASP) anhidridje. A PSI könnyedén reakcióba lép nukleofilekkel, például amin csoportot tartalmazó molekulákkal, így a kémiai-fizikai tulajdonságai változtathatók. Több primer amin csoportot tartalmazó vegyülettel keresztkötés alakítható ki a polimer láncok között, így az előzőekben említett polimer gél szintetizálhatunk. A PSI gélek enyhe lúgos hidrolízisével PASP géleket kaphatunk.

Dolgozatomban bemutatom a fent említett poli(szukcinimid) előállítását, valamint azon szerkezetvizsgálati módszerek eredményeit (FTIR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR), amelyekkel igazoltam a polimer tényleges szerkezetét. Ismertetem az általam alkalmazott keresztkötési eljárást, valamint az ehhez felhasznált molekulákat (cisztamin, lizin-metilészter). Bemutatom a PSI alapú gélek méretváltozását lúgos hidrolízis hatására; a gélek duzzadásának hatását a mechanikai tulajdonságaira; valamint a környezet redoxpotenciáljának, illetve pH értékének hatását a gél duzzadásfokára. Továbbá ismertetem humán eredetű őssejtekkel (PDLSC) végzett *in vitro* életképességi (WST-1) kísérletek eredményeit. Ezen eredmények alapján átfogó képet kaphatunk, hogy a poli(aszparaginsav) alapú gélek mely kémiai és fizikai tulajdonságai lehetnek meghatározó fontosságúak *in vitro* sejtenyésztési eljárásokban.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Új lehetőségek a sejtenyésztésben: 2D-ből 3D-be váltás

Az orvostudomány egyik legfontosabb problémája a beteg, illetve károsodott szövetek vagy szervek helyreállítása, pótlása. E probléma megoldását jelentheti sejtek *in vitro* (élő szervezeten kívüli) szaporítása, mely során a beteg saját sejtjeit felhasználva reprodukálják a pótolni kívánt szövetet/szervet. Így elkerülhető a beültetett szövet/szerv által kiváltott immunreakció, illetve ennek kilökődése [3].

Az élő szervezetekben a sejtek szaporodása speciális tulajdonságokkal rendelkező környezetben, az úgynevezett extracelluláris mátrixban játszódik le (ECM). Az extracelluláris mátrix egy kollagén szálakból álló polimer térháló, amely nagy mennyiségű folyadékot foglal magában és kis molekulák számára átjárható. A kollagén mellett más típusú fehérjék, növekedési faktorok, hormonok is találhatók benne, amelyek elősegítik a sejtek megtapadását (adhézióját), differenciálódását és szaporodását. Az ECM-re dinamikus egyensúly jellemző, a sejtek folyamatosan lebontják és újraépítik. Ezáltal az ECM nem csak támasztó szerepet tölt be, hanem biztosítja az információ- és anyagáramlást (tápanyag, anyagcsere termékek) a sejtek között. A sejtosztódás során keletkező enzimek és különböző faktorok megemésztetik a kollagén szálakat, így megváltoztatva az extracelluláris mátrix mechanikai tulajdonságait, és ezzel a sejtek esetleges mozgását teszik lehetővé [4]. E folyamatok következtében az ECM mechanikai tulajdonságai is befolyással vannak a sejtek szaporodására, differenciálódására.

Az *in vitro* sejtenyésztések során az elsődleges feladat, mind strukturális, mind mechanikai tulajdonságaiban az eredetire legjobban hasonlító mesterséges extracelluláris mátrix létrehozása [5].

A sejtek *in vitro* szaporítását kezdetekben egyszerű műanyag felületeken végezték, így azonban csak egy sejtréteg létrehozására van lehetőség. Így vizsgálhatjuk a sejtek szerkezetét, a különböző faktorokra kiváltott reakciójukat, valamint tanulmányozható az ECM-ből izolált összetevők hatása. Azonban a sejtek nem tudják felvenni a natív szerkezetet, a szomszédos sejtek közötti kapcsolat korlátozott. Kétdimenziós körülmények között a sejtek mozgásképtelenek, és a tápoldattal is közvetlenül érintkeznek, így nem alakul ki a tápanyag koncentráció gradiense [2, 5].

Mivel a szervezetet komplex, több sejtrétegből felépülő szövetek alkotják, laboratóriumi létrehozásukhoz háromdimenziós sejtszaporításra van szükség. Ehhez olyan háromdimenziós

szövetátmaszt kell létrehozunk, amely sok olyan tulajdonsággal rendelkezik, amely a természetes ECM-t is jellemzi.

2.2. *In vitro* sejtenyésztésben használt szövetátmaszok tulajdonságai

Az ideális szövetátmasznak (mesterséges ECM-nek) tartalmaznia kell olyan anyagokat (pl.: hormonok, fehérjék), amelyek elősegítik a sejtek adhézióját és szaporodását. Biokompatibilisnek (sem a szövetátmasz, sem a bomlástermékei nem váltanak ki immunreakciót) és biodegradábilisnek (feladata végeztével a szervezet által lebonthatónak) kell lennie. Emellett létre kell jönnie a sejt-mátrix és a sejt-sejt közötti kommunikációnak, mely során megvalósulhat az információ-, a tápanyag- és az anyagcsere termékek áramlása. Mivel minden sejt típus más-más környezetet részesít előnyben, ezért ezeknek a tulajdonságoknak a sejtvonal szükségleteihez megfelelően hangolhatóknak kell lenniük [6].

Az utóbbi években megindultak a kutatások az ECM összetételének és tulajdonságainak leghitelesebb lemásolására, amely keretein belül igen változatos anyagokat állítottak elő. 2012-ben Atala és munkatársai poli(glikolsav)-at, poli(tejsav)-at és poli(tejsav-co-glikolsav) kopolimert is sikeresen alkalmaztak szövetátmaszként [1]. 2013-ban Gribova és társai RGD szubsztráttal módosított többrétegű polielektrolit filmekken vizsgálták a sejtek differenciálódását [7]. Ugyanebben az évben Liu és Feng plazma polimerizált filmekben tanulmányozta a felszínhez kapcsolt funkciós csoportok hatását a sejtek adhéziójára [8]. Azonban a természetes ECM komplexitását még nem sikerült teljesen lemásolni, így újabb polimerek használata mesterséges ECM létrehozásához áttörést eredményezhet.

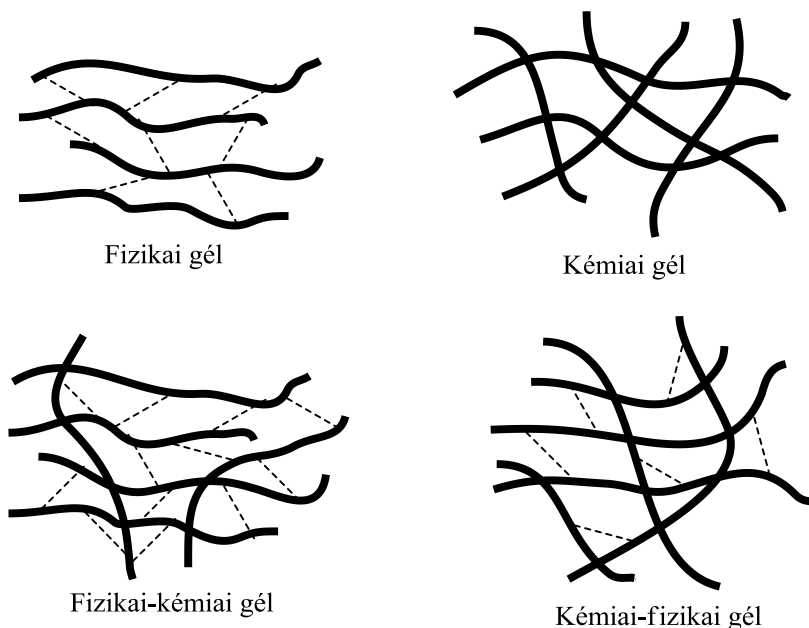
2.3. Polimer gélek

A polimer gélek olyan kétkomponensű rendszerek, amelyek polimer térhálóból és a térhálóba zárt folyadékból állnak. A térháló magába zárja a folyadékot (duzzasztószert), megakadályozza annak spontán kifolyását, míg a duzzasztószer a térhálót kifestítve megakadályozza annak összeomlását. A gél akár a térháló tömegének többszörösét is képes befogadni a duzzasztószerből, amely nem kötődik kémiaiilag a térháléhoz. Ezáltal a polimer gélek rendelkeznek mind az oldat, mind a szilárd anyag tulajdonságaival [9].

Kétféle típust, fizikai és kémiai gélkülönböztetünk meg az alapján, hogy a polimer láncok között milyen összetartó erők működnek. A fizikai gélekben a polimer láncokat másodrendű kötések kapcsolják össze, melyek hő hatására felbomlanak. Ilyen típusú gél a

kocsonya. A kémiai gélek esetében a polimer vázat kémiai kötések tartják össze. Ezek a kötések kialakíthatók keresztkötő molekulákkal (pl.: poli(vinil-alkohol) keresztkötése glutáraldehiddel), vagy a polimerizációs folyamat során kialakuló elágazásokkal (pl.: poli(etilén-imin)).

Vannak olyan gélek is, amelyekben mind a két kötéstípus megtalálható. Ezeket attól függően, hogy melyik kötés a meghatározó, fizikai-kémiai illetve kémiai-fizikai géleknek nevezzük (1. ábra).



1. ábra: Polimer gélek fajtái

A polimer gélek kémiai, mechanikai, reológiai és diffúziós tulajdonságai hasonlóságot mutatnak az élő szervezeteket felépítő szövetekkel, és a sejt közötti állománnyal. Mindkettő fontos jellemzője, hogy a tömegük nagy százalékát folyadék alkotja. A gélek válaszolnak az őket érő külső ingerekre, így a sejt-ECM kommunikáció megvalósulhat. A mesterségesen előállított gélek tulajdonságai a polimer láncon végzett módosításokkal széles határok között változtathatók, mellyel növelhető az ECM-hez való hasonlóság. Kialakíthatunk olyan csoportokat a polimer láncon, amelyek még inkább hozzájárulnak a sejtek adhéziójához [8 10]. Ilyenek például a karboxil csoportok [8] vagy az RGD peptidszekvencia [7], amelyek elősegítik a sejtek megtapadását és szaporodását a szövevényes felületén. A felületen kialakított amin csoportok pedig a sejtek differenciálódására vannak hatással [8].

2004-ben Matsumura és társai már végeztek sejtenyésztési kísérleteket poli(etilén-co-vinil alkohol) gél felületén, melynek keretein belül vizsgálták a felszíni módosítások hatását a sejtek differenciálódására [10]. 2014-ben Deepthi munkatársaival

kétretegű szövettámaszt, kitozán-hialuronsavval bevont poli(kaprolakton)-t alkalmazott sejtek tenyésztéséhez [11].

A sejtvonal típusától függően eltérő mechanikai jellemzővel rendelkező gélek lehetnek alkalmasak a sejt tenyésztésére. A keményszöveti sejtek a merevebb, míg a lágy szöveti sejtek a lágyabb táptalajt részesítik előnyben [12]. Emellett hosszú távú tenyésztés során meghatározó lehet a szövettámaszként használt polimer gél duzzadási tulajdonságai. Ezeket a polimer gélekre jellemző mennyiségeket a következő fejezetben ismertetem.

2.3.1. Polimer géleket jellemző mennyiségek és fogalmak

Hálópont: Olyan pont a gélen belül, amely legalább három elágazással rendelkezik.

Hálópont sűrűség: A gél egységnyi térfogatába eső hálópontok anyagmennyisége. Ezen fogalomkörbe a kémiai és a fizikai kapcsolódásokból származó hálópontok is beletartoznak. Az előállított reális gélek mérése során nagyobb értéket fogunk kapni, mint az ideális gél elméletével becsült érték, mivel az elméletben nem vesszük figyelembe a polimer láncok hurkolódásából származó hálópontokat.

Keresztkötő: Legalább két funkciós csoporttal rendelkező molekula, amely kémiai kötésekkel köti össze a polimer láncokat.

Térhálósítási fok (ψ): Megmutatja, hogy hány monomer egységenként található keresztkötés a polimer térhálóban.

$$\psi = \frac{n_{\text{monomer}}}{n_{\text{keresztkötő}}} \quad (1)$$

,ahol n_{monomer} a polimer lánc monomer egységeinek, $n_{\text{keresztkötő}}$ a keresztkötő molekula anyagmennyisége.

Abszolút duzzadásfok: A duzzadt gél tömegének vagy térfogatának, és a száraz gél tömegének vagy térfogatának a hányadosa.

$$\text{Tömeg szerinti abszolút duzzadásfok: } Q_m = \frac{m_{\text{duzzadt gél}}}{m_{\text{száraz gél}}} \quad (2)$$

$$\text{Térfogat szerinti abszolút duzzadásfok: } Q_v = \frac{V_{\text{duzzadt gél}}}{V_{\text{száraz gél}}} \quad (3)$$

$$\text{A két mennyiség közötti összefüggés: } Q_v = Q_m \frac{\rho_{\text{száraz gél}}}{\rho_{\text{duzzadt gél}}} \quad (4)$$

,ahol $\rho_{\text{száraz gél}}$ a száraz, $\rho_{\text{duzzadt gél}}$ a duzzadt gél sűrűsége.

Polimer gél térfogati törtje (Φ): A térfogat szerinti abszolút duzzadásfok reciproka.

$$\Phi = \frac{1}{Q_v} \quad (5)$$

Relatív duzzadásfok: Relatív duzzadásfokról akkor beszélünk, ha a gélünk tömegét vagy térfogatát egy előző állapotában mért tömegéhez vagy térfogatához viszonyítjuk.

2.3.2. Polimer gélek duzzadási egyensúlya

Egy termodinamikai rendszer akkor van egyensúlyban, amikor a rendszer és a környezete között az intenzív fizikai, és kémiai mennyiségek, mint a hőmérséklet, nyomás, kémiai potenciál stb. megegyeznek. Neutrális, tehát töltött csoportokat nem tartalmazó polimer gélek esetén az egyensúlyi térfogatot két egymással ellentétesen ható erő határozza meg. Az ozmotikus hatás a térháló duzzadását segíti elő, míg a polimer térháló a duzzadás okozta deformáció ellen dolgozik. Az egyensúly beállításának feltétele a két erő kiegyenlítődése.

A gélek méretváltozásának leírásához a rendszer szabadenergia és a kémiai potenciál változását kell megvizsgálnunk. A szabadenergia változásának leírásában figyelembe kell venni a gél térfogatváltozását, amely a rendszer rugalmas szabadenergiáját növeli; valamint a polimer-folyadék kölcsönhatást, amely a rendszer ozmotikus szabadenergiáját csökkenti. Tehát a rendszer teljes szabadenergiája (A):

$$A = A_{\text{elasztikus}} + A_{\text{elegyedési}} \quad (6)$$

,ahol $A_{\text{elasztikus}}$ a polimer hálóláncainak deformációját, $A_{\text{elegyedési}}$ a polimer-folyadék kölcsönhatást jelöli [13].

A térfogat szerinti parciális derivált értéke megadja a rendszer szabadenergia változását:

$$\left(\frac{\partial A}{\partial V}\right)_{T, V_{\text{tot}}} = \left(\frac{\partial A_{\text{elasztikus}}}{\partial V}\right)_{T, V_{\text{tot}}} + \left(\frac{\partial A_{\text{elegyedési}}}{\partial V}\right)_{T, V_{\text{tot}}} \quad (7)$$

,ahol V_{tot} a gél-folyadék rendszer teljes térfogata, T a hőmérséklet, V pedig a gél térfogata.

Az egyenletben látható elasztikus tag kapcsolatban áll a hálóláncok rugalmasságával (G), míg az elegyedési tag az ozmózisnyomással (π). A teljes szabadenergia változás ellentettje a duzzadási nyomással (ω) áll összefüggésben. Ezáltal az egyenlet az alábbi alakba írható át:

$$\omega(\phi) = G(\phi) + \pi(\phi) \quad (8)$$

Amikor a duzzadási nyomás zérus, a gél egyensúlyi állapotban van. Ilyenkor:

$$|G(\phi_e)| = \pi(\phi_e) \quad (9)$$

,ahol ϕ_e a gél egyensúlyi térfogati törtje.

A gél egyensúlyi állapota felírható a duzzasztószer kémiai potenciáljának segítségével is [14]:

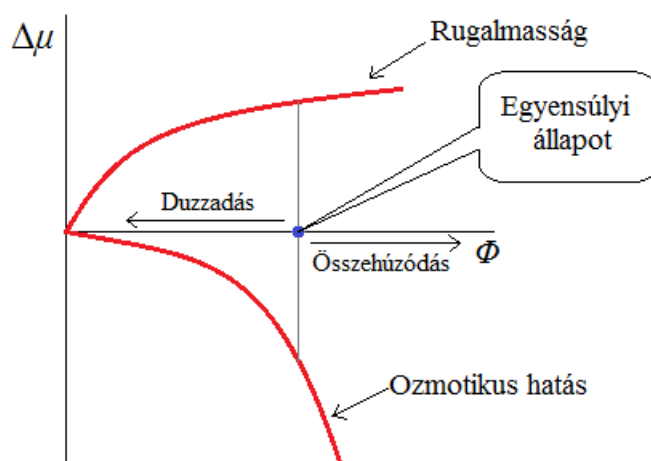
$$\Delta\mu = \Delta\mu_{\text{elasztikus}} + \Delta\mu_{\text{elegyedési}} \quad (10)$$

$$\Delta\mu_{\text{elasztikus}} = RTv^*q_0^{-2/3}\phi^{1/3} \quad (11)$$

$$\Delta\mu_{\text{elegyedési}} = RT[\ln(1 - \phi) + \phi + \chi\phi^2] \quad (12)$$

,ahol $\Delta\mu$ a duzzasztószer gélen belüli és kívüli kémiai potenciáljának különbsége, T a hőmérséklet, R az egyetemes gázállandó, v^* a hálóláncok koncentrációja, q_0 a memória faktor, és χ a Huggins-féle kölcsönhatási paraméter.

Ha az elasztikus és az elegyedési kémiai potenciálok különbsége nulla, tehát a $\Delta\mu$ zérus, a gél egyensúlyi állapotban van.



2. ábra: A duzzasztószer kémiai potenciáljának változása a polimer térfogati törtjének függvényében [15]

Polielektrolitok esetében az ozmotikus hatást a térhálón belüli monomer koncentráció mellett a gélben lévő ionkoncentráció is befolyásolja. Az egyensúlyi állapot analitikai leírása igen bonyolult, mert amíg a monomerek anyagmennyisége független a környezeti paraméterektől, addig az ellenionok anyagmennyisége nagymértékben függ a pH-tól, a gél térfogatától, az ionerősségtől, valamint az ionok és a monomerek anyagi minőségétől. A sok változó miatt egyszerűsítéseket kell alkalmaznunk, amik csökkentik a számítás pontosságát [16].

2.4. Biopolimerek és Poli(aminosav)-ak

Az előző fejezetekben leírtak alapján a polimer térháló meghatározó szereppel bír a polimer gél végső tulajdonságait tekintve. Polimer gélek szövetámaszként való alkalmazásában a duzzasztószer valamilyen, a sejtek szaporodásához szükséges tápoldat, így a polimer megfelelő megválasztása kulcsfontosságú lehet.

A polimereket kezdetben csak a természetben található élő szervezetekből tudták izolálni, ezért biopolimereknek nevezték őket. A kémia fejlődése egyre több eljárással tette lehetővé ezen polimerek mesterséges szintézisét, így felmerült a kérdés, hogy lehet-e a mesterségesen szintetizált másolataikat is biopolimereknek nevezni. Napjainkban az előállítási módtól függetlenül a biopolimer kifejezést használjuk minden olyan polimerre, amely biokompatibilis és biodegradábilis tulajdonságot mutat. Szövetámaszként történő alkalmazásnál elengedhetetlen e két jellemző megléte.

Napjainkra lehetővé vált a természetben előforduló polimerek mesterséges szintézise, valamint olyan új típusú, biológiai felhasználásra alkalmas makromolekulák készítése, amelyek tulajdonságai széles határok között változtathatók. Ezáltal a belőlük szintetizálható gélek szövetámaszként való alkalmazása nagy fejlődésnek indult [1, 4, 5]. Mivel a természetes ECM alapja az aminosav egységekből felépülő kollagén, így aminosav alapú polimer gélek megfelelőek lehetnek mesterséges ECM-ként [17].

Az aminosavak nagy mennyiségben fordulnak elő a természetben, mint a fehérjék építőelemei. A XIX. század végén Emil Fischer felfedezte, hogy a fehérjéket aminosavak alkotják, amelyek peptid kötéssel kapcsolódnak egymáshoz. Ezt követően megindultak a kutatások fehérjék, illetve poli(aminosav)-ak mesterséges előállítására. Fischer elsőként kapcsolt össze két aminosav molekulát amid kötés segítségével, majd később Leusch-al közös munkájuk nyomán elkezdődhettek a polipeptid szintézisek. A kísérletek során kiderült, hogy a peptid kötés kialakításához speciális körülmények szükségesek, és szinte minden aminosav esetén eltérően működnek az alkalmazott módszerek. Az előállított polimerek nem rendelkeztek nagy molekulatömeggel, ráadásul többségük toxicitást mutatott, így humán felhasználásra alkalmatlannak bizonyultak [18].

A kémiai eljárások fejlődésével a polipeptidek alkalmazása egyre nagyobb teret hódított a gyógyászatban. Az orvostudományban való alkalmazhatóságukat az is segíti, hogy a feladatuk végeztével a szervezetben is megtalálható aminosavakra bomlanak. Ebből kifolyólag készítenek belőlük hatóanyag szállító rendszereket, melyek képesek kontrollált és

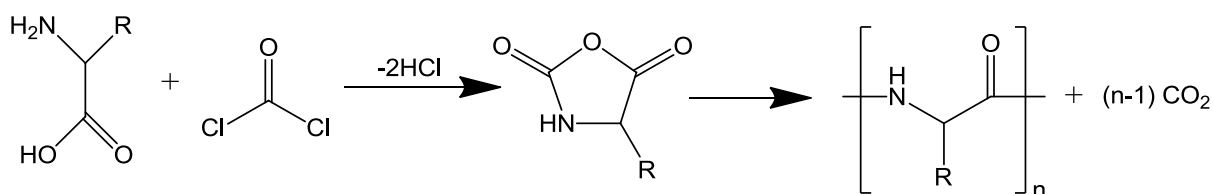
lassított hatóanyag leadásra [19]; valamint implantátumokat, mint például mesterséges bőr, keményszöveti protézisek, vagy membránok mesterséges vesébe [19, 20].

2.4.1. Poli(aminosav)-ak szintézise

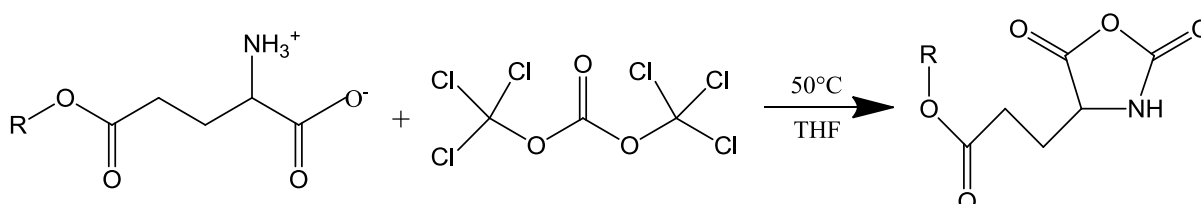
Az alábbi fejezetben bemutatom azokat a történetileg fontos eljárásokat, amelyekkel nagy molekulatömegű poli(aminosav) állítható elő.

2.4.1.1. *N*-karboxianhidrides módszer (NCA)

Az *N*-karboxianhidrides módszer volt az első olyan eljárás amellyel poli(aminosav)-akat sikerült szintetizálni. A Leuchs által kifejlesztett módszerhez az *N*-karboxi-aminosavanhidridet foszgén és aminosav származék közvetlen reakciójával állították elő [18]. A későbbiekben a foszgént difoszgénre, majd trifoszgénre cserélték [21].



3. ábra: *N*-karboxi-aminosavanhidrid előállítása foszgénnel



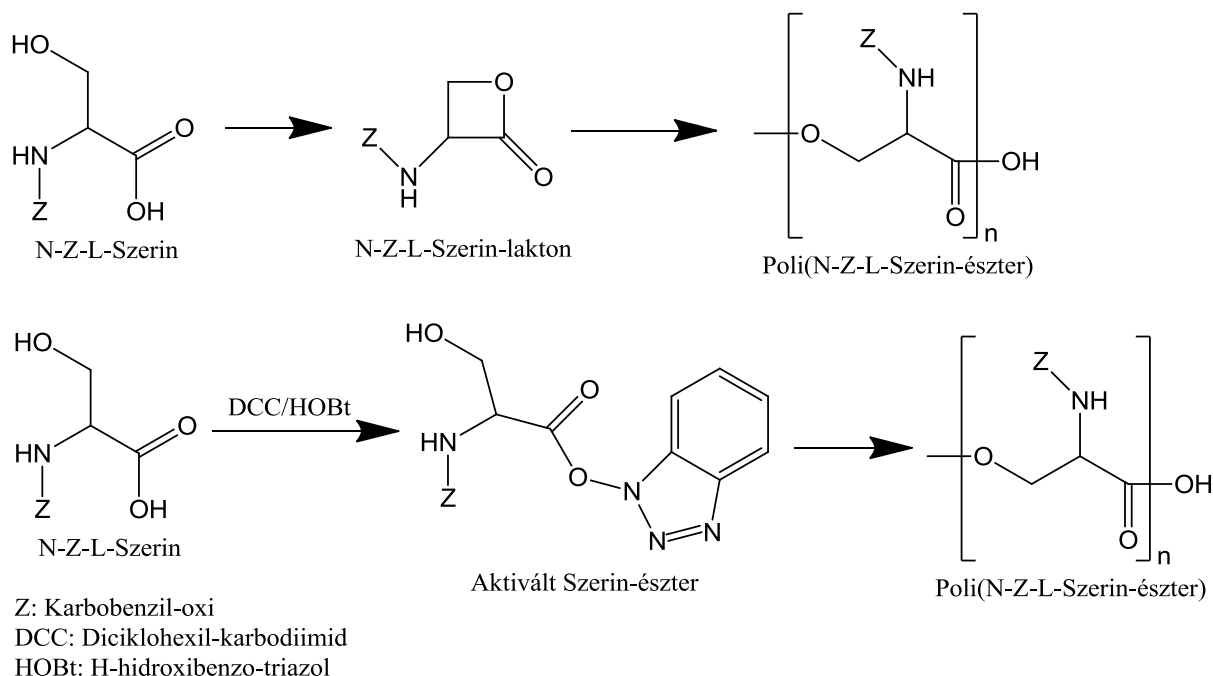
4. ábra: *N*-karboxi-aminosavanhidrid előállítása trifoszgénnel

A gyűrűs szerkezet kialakulása folytán a molekula reakcióképessége és stabilitása növekszik, ezáltal könnyedén lejártszódik a polimerizáció.

Az 1940-es években sikerült ezzel a módszerrel poli(aminosav)-akat előállítani, melynek során arra is fényt derítettek, hogy az aktivált aminosavak képesek reakcióba lépni nukleinsavakkal, baktériumokkal és vírusokkal [22]. Ezt követően indult meg ezen polimerek orvos-biológiai alkalmazása, melynek keretein belül mesterséges bőrt, és egyéb szöveteket hoztak létre, illetve 1985-től hatóanyag leadó rendszerként is felhasználásra kerültek (pl.: poli(aszparaginsav), poli(glutaminsav)) [19].

2.4.1.2. Pszeudo-poli(aminosav) előállítása

Pszeudo-poli(aminosav)-nak nevezzük azokat a polipeptideket, amelyekben az aminosavakat nem amidkötés, hanem más kötések (uretán, észter, karboxil) kapcsolják össze. Ilyen módon szerin, treonin, tirozin és hidroxiprolin polymerizációja hajtható végre [19].



5. ábra: Pszeudo-poli(szerin) előállításának módjai

2.4.1.3. Poli(aminosav) előállítása termikus polikondenzációval

Termikus polymerizáció során a monomer egységek összekapcsolódásából, két mol víz kilépésével, öt- vagy hattagú gyűrűből felépülő polymer lánc keletkezik. A reakció lejátszódásához sav-katalizátorra és magas hőmérsékletre van szükség. A módszer nagy előnye, hogy nem kell védőcsoportot alkalmazni. Ilyen eljárással aszparaginsav alapanyagból nagy molekulatömegű poli(szukcinimid) állítható elő, melyet egyszerű hidrolízissel poli(aszparaginsav)-vá alakíthatunk [24].

2.5. Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) előállítása

Már a XIX. század második felében tettek sikeres kísérleteket aszparaginsav alapú polimerek előállítására. Az első szintézist Schaal végezte el 1871-ben, aki termikus úton kapcsolt össze aszparaginsav molekulákat [25], majd 1897-ben Schiff állított elő tetra- és oktaaszparaginsavat, amelyeket már poli(aszparaginsav)-nak nevezett [26]. Később Frankel és Berger szintetizált α -poli(aszparaginsav)-at N-karboxianhidrides módszer segítségével [27].

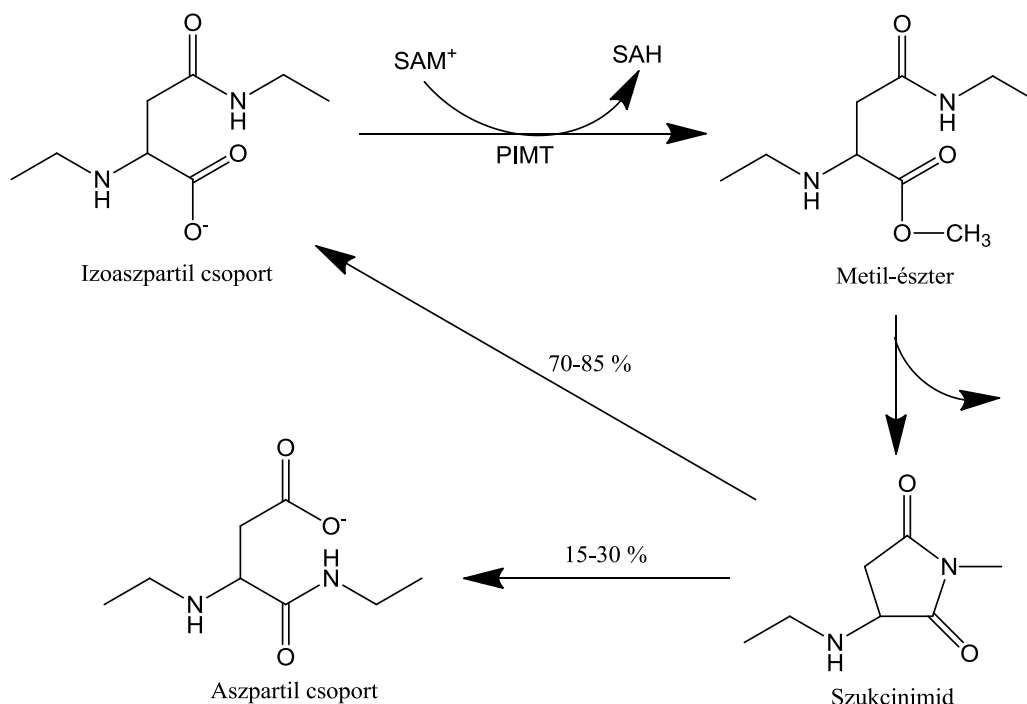
Kovács József, Könyves Imre és Pusztai Árpád 1953-ban elsőként állítottak elő poli(aszparaginsav)-at poli(szukcinimid)-en keresztül, termikus eljárással [24]. 1950-es években Harada több eljárást is kidolgozott poli(aszparaginsav) szintetizálására. Először maleinsavamin és maleinsav kopolimerizációjával, majd monoammónium-fumársav és almasav elegyből sikerült előállítani kis polimerizációfokú poli(aszparaginsav)-at [28]. A sok kidolgozott eljárás ellenére nagy molekulatömeggel rendelkező polimert csak az 1990-es években Tomidának és Nakatonak sikerült elsőként szintetizálni mind oldószeres, mind oldószer mentes környezetben [29]. Oldószerként szulfolán/mezitolén elegyet alkalmaztak és vizsgálták a hőmérséklet, a reakcióidő és a savkatalízis hatását a polimerizációfokra.

2.5.1. Poli(szukcinimid) reaktivitása

A poli(szukcinimid)-et felépítő szukcinimid gyűrű képes addíciós reakcióba lépni erősebb nukleofilekkel. A reakció során savamid kötés jön létre a polimer és a módosító molekula között.

2.5.1.1. *Poli(szukcinimid) reakciója O-nukleofilekkel*

Kis reaktivitása miatt a poli(szukcinimid) alkoholokkal nem reagál, viszont hidroxid-ionnal könnyen reakcióba lép. A hidrolízis során α - és β -aszparaginsav monomer egyaránt képződhet, így végül poli(α -aszparaginsav-co- β -aszparaginsav) kopolimert kapunk. A szervezetben a Protein L-izoaszpartil (D-aszpartil) O-metiltranszferáz (PIMT) enzim képes a két monomert egymásba alakítani (6. ábra) [30].

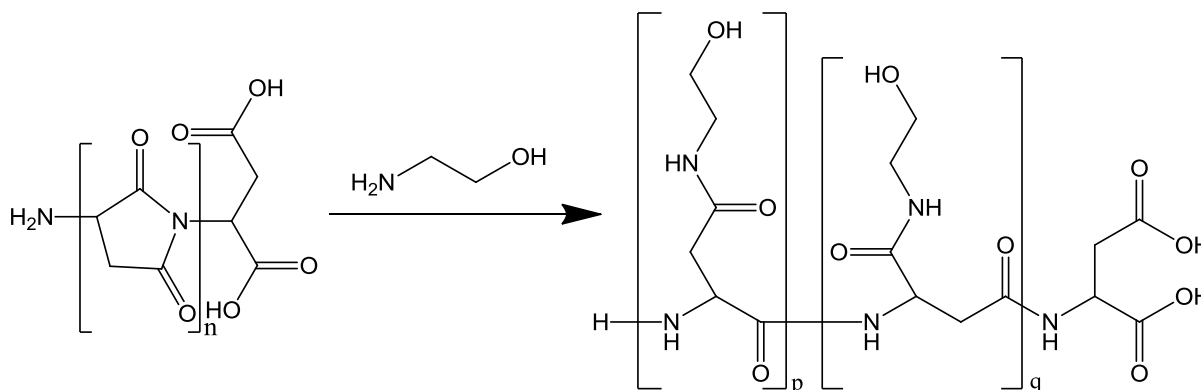


6. ábra: Az α - és β -aszparaginsav egymásba alakulásának mechanizmusa a szervezetben

2.5.1.2. Poli(szukcinimid) reakciója N-nukleofilekkel

A poli(szukcinimid) lánc módosítása könnyedén elvégezhető primer amin csoportot tartalmazó molekulákkal. A reakció lejátszódásának feltétele, hogy az amin csoport nitrogénje ne legyen protonált állapotban, mivel ekkor elvesztené nukleofil jellegét.

Aminoalkoholokkal végzett funkcionizálás során hidrofíl karakterű poli(aminosav)-at állíthatunk elő, mivel kizárólag az amin csoport reagál a szukcinimid gyűrűvel. A reakció már szobahőmérsékleten végbemegy és a poli(aszparaginsav)-hoz hasonlóan α illetve β konstitúciójú monomerekből felépülő poli(hidroxialkil-aszparagin)-t (PHEA) eredményez (7. ábra) [31].



7. ábra: Poli(hidroxialkil-aszparagin) (PHEA) előállítása

A lánchoz kapcsolódó aminoalkohol szénláncának hossza hatással van a polimer tulajdonságára. Hosszabb szénláncú módosító esetén a polimer hidrofób, míg rövidebb szénlánc esetén hidrofil jelleget mutat [32].

Amennyiben a poli(szukcinimid)-et több primer amin csoportot tartalmazó molekulával visszük reakcióba keresztkötéseket hozhatunk létre a polimer láncok között, melynek következtében háromdimenziós polimer térháló keletkezik [33].

Mivel ezek a polimerek eleget tesznek a szövettámaszoknál említett kritériumoknak, valamint módosításokkal diverzitásuk tovább növelhető, ebből kifolyólag az előállított gélek megfelelőek lehetnek sejtek *in vitro* tenyésztéséhez.

3. Célkitűzés

Munkám fő célja olyan homogén, biokompatibilis polimer gélek előállítása volt, amelyekben a polimer térháló kizárólag aminosavból épül fel, és ezen gélek alkalmazhatóságának vizsgálata szövettámaszként sejtek *in vitro* tenyésztéséhez. Ennek megvalósításához először nagy polimerizáció fokkal rendelkező poli(szukcinimid) előállítására volt szükség. A polimer molekulatömegének meghatározása viszkozitás méréssel, pontos szerkezetének igazolása szerkezet analitikai módszerekkel (FTIR, ^1H -NMR, ^{13}C -NMR) történt.

Céлом volt olyan poli(szukcinimid) alapú gélek előállítása, amelyekben a polimer térháló kizárólag aminosavakat tartalmaz, és a környezet redoxpotenciál változására méretük megváltoztatásával reagálnak. Ehhez keresztkötőként cisztamint és lizin-metilésztet használtam különböző arányban.

Vizsgáltam a hidrolízis során a PSI gélek duzzadásfok változásának kinetikáját.

A gél mechanikai tulajdonságai hatással vannak a sejtek életképességére [12]. Ezért meghatároztam a térhálósítás mértékét a gélek egyensúlyi méretének, valamint a rugalmassági moduluszának mérésén keresztül. Különböző koncentrációjú DTT/pH=8-oldatokban vizsgáltam a diszulfid hidak felnyílásának hatását a duzzadásfok változására, melyből következtetni lehetett a térhálóba beépült cisztamin mennyiségére.

Az általam előállított gélek a környezeti hatásokra, mint a pH érték megváltozására, nagymértékű méretváltozással reagáltak. Mivel e tulajdonság hatással lehet a sejtek életképességére, ezért vizsgáltam a pH változtatása során a gélek duzzadásfokát, állandó koncentráció és ionerősség mellett, különböző összetételű PSI és PASP gélek esetén.

A különböző összetételű PASP gélek szövettámaszként történő alkalmazhatóságát *in vitro* körülmények között a Semmelweis Egyetem Orálbiológia Tanszékével együttműködve végeztük. WST-1 mérés segítségével meghatároztuk, hogy a PASP gélek összetétele milyen hatással van a sejtek életképességére.

4. Kísérleti rész

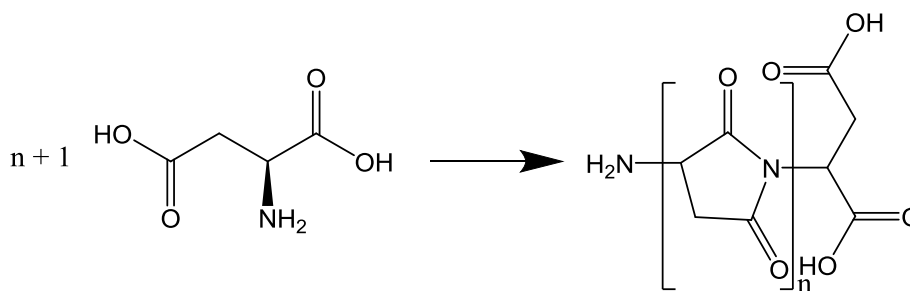
4.1. Felhasznált anyagok

L-aszparaginsav (Aldrich, $\geq 98\%$); *o*-foszforsav (Aldrich, $\geq 99\%$); Dimetilformamid (VWR, $\geq 99,9\%$); Cisztamin-dihidroklorid (Fluka, $\geq 98\%$); Lizin-metilészter-dihidroklorid (Bachem); Dimetil-szulfoxid (VWR, $\geq 99\%$); Dibutilamin (Aldrich, $\geq 99,5\%$); Citromsav-hidrát (VWR, 100 %, normapur); Imidazol (Sigma-Aldrich, $\geq 99,5\%$, puriss); Nátrium-klorid (Sigma-Aldrich, puriss); Nátrium-hidroxid (Reanal, puriss); Bórax (Hungaropharma); Dinátrium-hidrogén-foszfát (Sigma-Aldrich, $\geq 98\%$); Trinátrium-foszfát; Foszfát puffer (PBS) (Sigma); D,L-Ditiotreitol (Sigma, $\geq 99\%$).

A vegyszereket további tisztítás nélkül használtam.

4.2. Poli(szukcinimid) (PSI) előállítás

A poli(szukcinimid)-et L-aszparaginsavból (20 g) állítottam elő *o*-foszforsav (20 g) katalizátor jelenlétében termikus polikondenzációval (8. ábra). Csepp lombikban összekevertem a reakcióelegyet, majd a lombikot rotációs vákuumbepárlóra helyeztem. A reakció beindítását követő egy órában a nyomást 5-10 mbar-ig lecsökkentettem, a hőmérsékletet pedig 180 °C-ig növeltem. A 7 órás szintézist követően a keletkezett sárgásbarna anyagot dimetilformamidban feloldottam, majd vízben kicsaptam. A kivált világosbarna csapadékot vízzel, semleges pH eléréséig mostam, majd 40 °C-on szárítottam. A száraz poli(szukcinimid) fehér színű por.



8. ábra: Poli(szukcinimid) szintézise

4.3. Poli(szukcinimid) tulajdonságainak vizsgálata

Megfelelő mechanikai tulajdonságokkal rendelkező polimer gél előállításához nagy molekulatömegű polimerre van szükség, ezért viszkozitás méréssel meghatároztam a PSI molekulatömegét. Emellett a PSI tényleges szerkezetének igazolását fourier transzformációs infravörös (FTIR) és mágneses magrezonancia (NMR) spektroszkópiával végeztem.

4.3.1. Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása viszkozitás méréssel

0,1 M LiCl, DMSO-s oldatával különböző koncentrációjú (5-50 mg/dm³) poli(szukcinimid) oldatokat állítottam elő, melyek viszkozitását AND SV-10 vibrációs viszkoziméter segítségével határoztam meg. A mérés során 24 °C-on termosztált küvetát használtam.

A 0,1 M LiCl, DMSO-s oldat szolgált referenciaként, amely felhasználásával a többi mért adatból kiszámítottam az oldatok relatív viszkozitását (η_{rel}):

$$\eta_{rel} = \frac{\eta}{\eta_0} \quad (13)$$

,ahol η a mért polimer oldat, η_0 pedig az oldószer viszkozitása.

A relatív viszkozitásból számítható az oldatok fajlagos viszkozitása (η_{sp}):

$$\eta_{sp} = \eta_{rel} - 1 \quad (14)$$

A fajlagos viszkozitás és az oldat koncentrációjának (c) hányadosából megkaptam a redukált viszkozitást (η_{red}):

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{sp}}{c} \quad (15)$$

Ezen értékeket ábrázolva a koncentráció függvényében egy egyenest kapunk, amely a $c = 0$ pontban megadja a határviszkozitás ($[\eta]$) értékét:

$$[\eta] = \lim_{c \rightarrow 0} \left(\frac{\eta_{sp}}{c} \right) \quad (16)$$

Ezt behelyettesítve a Kuhn-Mark-Houwink egyenletbe meghatározható a polimer számátlag szerinti molekulatömege (M):

$$[\eta] = KM^a \quad (17)$$

,ahol K és a anyagi minőségtől függő állandók, melyek PSI esetén $K = 1,32 \cdot 10^{-2}$, $a = 0,76$ [34].

4.3.2. Fourier transzformációs infravörös spektroszkópia (FTIR)

A molekulán belül az atomok egymáshoz képest elmozdulhatnak, kötéseik mentén foroghatnak, megnyúlhatnak, rezeghetnek. Minden ilyen elmozduláshoz meghatározott energiaszintek tartoznak, melyek megegyeznek valamely hullámhosszúságú infravörös fény energiájával. Ezen mozgások energiatartalma és frekvenciája függ a molekulában jelenlévő kötések típusától, a részecskéket összetartó erők milyenségétől, valamint az atomok tömegétől. Ezáltal az infravörös spektrum a molekula rezgési állapotairól ad információt, amely segítségével szolgál a molekulában található funkciós csoportok azonosításához [35].

Az infravörös spektrumokat $400\text{--}4000\text{ cm}^{-1}$ hullámhossz között vettük fel gyengített teljes reflexiós fejjel (ATR) ellátott Brucker IFS 55 készülékkel. A mérések során szárított, elporított mintát használtunk. A vizsgálatban $0,5\text{ cm}^{-1}$ lépésközzel, GLOBAL infravörös fényforrással és MCT, DTGS detektorral dolgoztunk.

4.3.3. Mágneses magrezonancia mérés (NMR)

Minden atommag rendelkezik spinimpulzus momentummal és magspinnel, amely a magot felépítő nukleonok mozgásából származik. NMR spektroszkópiai mérések során azon atommagokat tekintjük aktívnak, ahol a nukleonok kvantumszámainak összege nullától eltérő magspint eredményez. Amennyiben az atommagot több proton és neutron alkotja, a nukleonok hatása összegződik, így ha a protonok illetve neutronok száma páros a mérés szempontjából inaktívnak tekintjük. A mérés során a magspinnel rendelkező atommagok (^1H , ^{13}C , ^{15}N , ^{31}P , stb.) a külső mágneses térben polarizálódnak. Az NMR spektroszkópia a rádiófrekvenciás tartományba eső elektromágneses hullámoknak az atomok magjával kialakuló kölcsönhatását vizsgálja. Az egydimenziós ^1H és ^{13}C spektrumokból megállapítható a molekulát alkotó különböző hidrogén és szén atomok kémiai környezete a molekulán belül [35].

A vizsgálatához 5-25 mg közötti PSI mintát oldottunk fel 500 μl deuterált DMSO-ban, melyet egy Varian 500 MHz-es spektrométerbe helyeztünk. A készülékhez pulzusforma generátor, pulzus térgradiens meghajtó, valamint két mag egyidejű manipulálására alkalmas inverz szélessávú mérőfej csatlakozott.

A ^1H -NMR spektrumot 3,2 s relaxációs idővel, 8 ismétléssel, 500 MHz-en vettük fel.

A ^{13}C -NMR spektrumot 1,3 s relaxációs idővel, 2000 ismétléssel, 125 MHz-en vettük fel.

4.4. Cisztaminnal és lizinnel egyidejűleg keresztkötött poli(szukcinimid) gélek (PSI-CYS-LYS) szintézise

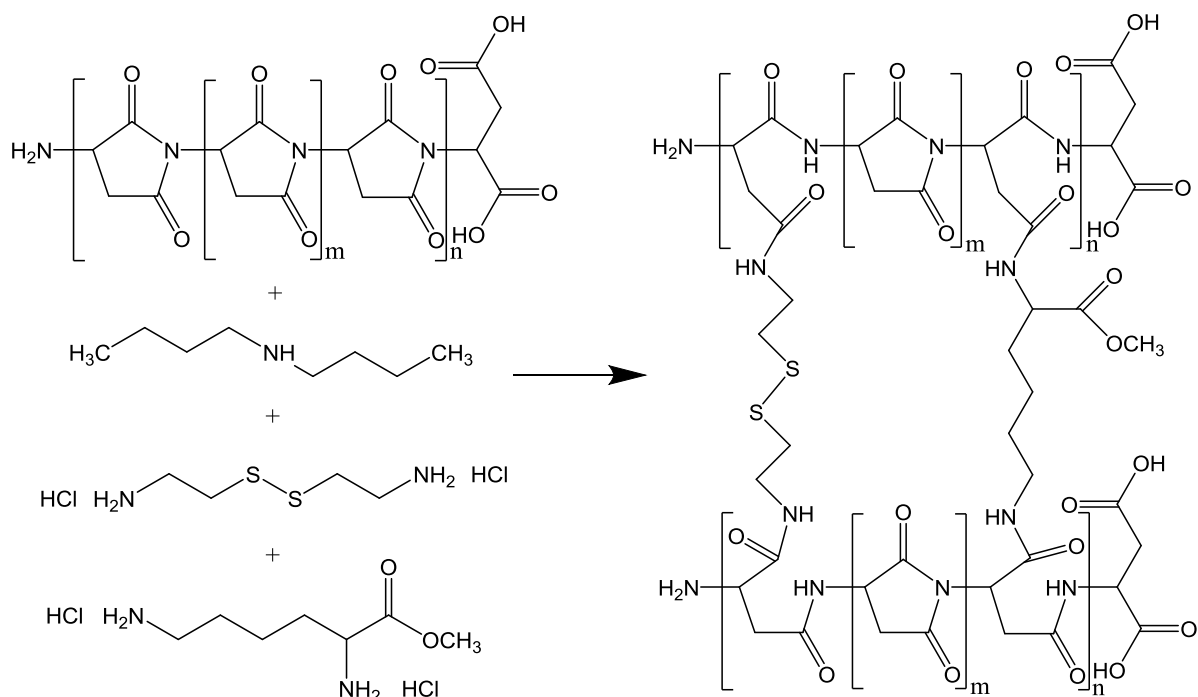
A gélek előállításához PSI 25 m/m%-os DMSO-s oldatát használtam. Adott mennyiségű cisztamin-dihidrokloridot (CYS·2HCl) és lizin-metilészter-dihidrokloridot (H-LYS-OMe·2HCl) tartalmazó keverékhez dibutilamint (DBA) adtam, majd DMSO-ban feloldottam. A két oldatot összekevertem és formába öntöttem, majd 2 napig hagytam gélesedni. Az elkészített gélek 15 m/m%-osak PSI-re nézve, és 20-as térhálósítási fokúak, ami azt jelenti, hogy statisztikailag a polimer lánc minden huszadik monomer egységére esik egy keresztkötés. A formából kivett géleket DMSO-ban egyensúlyi térfogatig duzzasztottam. Az 1 g gél előállításához szükséges anyagok mennyiségét, és az így létrejött gélekben alkalmazott keresztkötők molarányát az 1. táblázat tartalmazza.

1. táblázat: A PSI-XCYS-LYS gélek pontos összetétele

Gél	PSI-oldat (mg)	CYS·2HCl (mg)	H-LYS-OMe·2HCl (mg)	DMSO (μl)	DBA (μl)	CYS/ (CYS+LYS) molarány
PSI-100CYS-LYS	600	17,4	0,0	325,5	26,1	1,00
PSI-80CYS-LYS	600	13,9	3,6	325,4	26,1	0,80
PSI-60CYS-LYS	600	10,4	7,2	325,3	26,1	0,60
PSI-40CYS-LYS	600	7,0	10,8	325,1	26,1	0,40
PSI-20CYS-LYS	600	3,5	14,4	325,0	26,1	0,20
PSI-0CYS-LYS	600	0,0	18,0	324,9	26,1	0,00

A gélek megnevezésében látható szám megmutatja, hogy az összes keresztkötő anyagmennyiségének hány százaléka cisztamin. Így a PSI-100CYS-LYS gél csak cisztamin, míg a PSI-0CYS-LYS gél kizárólag lizin keresztkötőt tartalmaz. Minden további kísérlethez ezen összetételű géleket használtam.

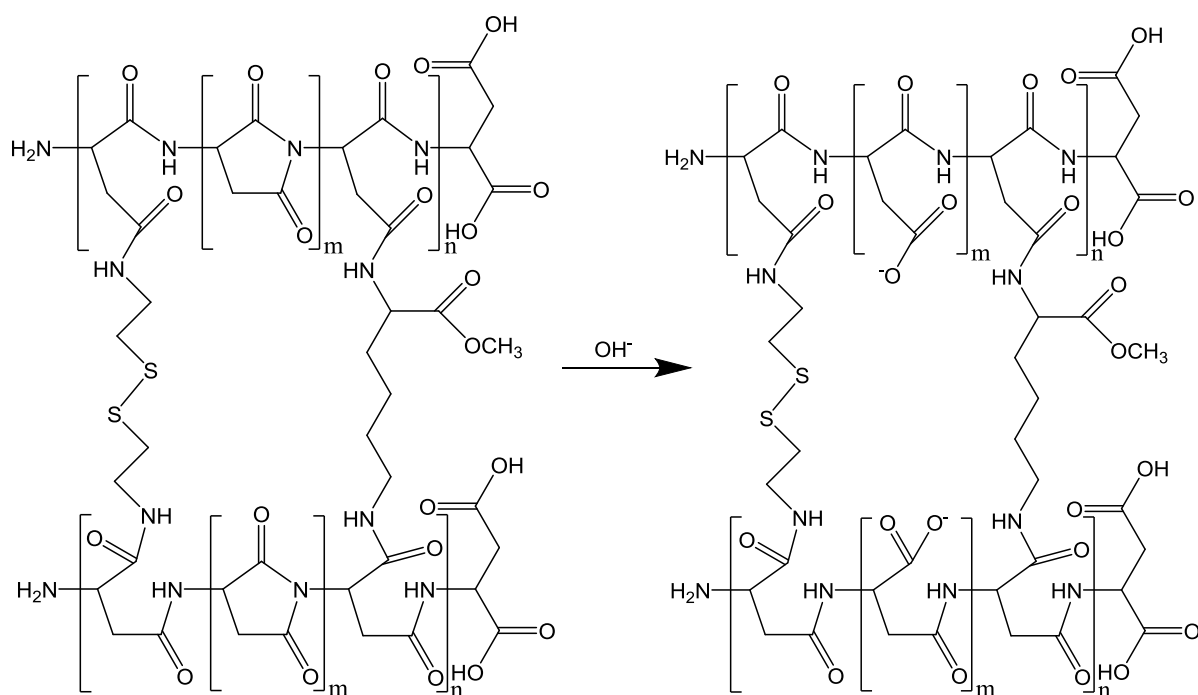
A gélek szintézisének általános egyenletét a 9. ábra mutatja.



9. ábra: Cisztaminnal és lizin-metilészterrel keresztkötött poli(szukcinimid) gélek szintézise

4.5. Poli(aszparaginsav) alapú gél előállítása

A PASP géleket az előző pontban leírt PSI gélek lúgos hidrolízise során kaptam. Ehhez a DMSO-ban egyensúlyi térfogatra duzzasztott PSI géleket 8-as pH-jú imidazol pufferbe ($c = 0,1 \text{ M}$, $I = 0,25 \text{ M}$) helyeztem 4 napra. Ezen a pH értéken a cisztaminban található diszulfid hidak még nem bomlanak fel, illetve a metil-észter csoport sem hidrolizál. A puffert minden nap lecseréltem, hogy a polimer térháló teljes hidrolízise végbemenjen és az összes DMSO-t eltávolítsam a gélekből. A hidrolízis reakcióegyenlete a 10. ábrán látható.



10. ábra: PSI-XCYS-LYS gél hidrolízise PASP-XCYS-LYS géllé

4.6. Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek vizsgálata

A poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek duzzadási és mechanikai tulajdonságainak feltérképezése céljából vizsgáltam a hidrolízis során a PSI gélek duzzadásfok változásának kinetikáját, és a rugalmassági modulusz változását a gélek méretváltozásának hatására.

Tanulmányoztam még a környezet redoxpotenciáljának, valamint pH értékének megváltozásának hatását a keresztkötőket különböző arányban tartalmazó gélek duzzadására.

4.6.1. Gélek duzzadáskinetikájának vizsgálata hidrolízis során

A vizsgálathoz 1 mm vastag gél filmet öntöttem, melyet 2 nap gélesedés után DMSO-ban egyensúlyi térfogatra duzzasztottam, majd különböző méretű korongokat vágtam ki. A PSI gél korongokra 8-as pH-jú imidazol puffert ($c = 0,1 \text{ M}$, $I = 0,25 \text{ M}$) tettem nagy feleslegben. A feleslegben való alkalmazásra azért van szükség, mert az oldószer párolgása folyamán az oldat koncentrációja megnő. A gélről Alpha ScopeTek STO-3 mikroszkóppal 5 percenként készítettem felvételt 1 napon keresztül. A képeken a korongok átmérőjét ScopePhoto program segítségével határoztam meg.

Az egyes gél korongok kezdeti és végső átmérőjének felhasználásával kiszámítottam a relatív duzzadásfokot (Q_{rel}):

$$Q_{rel} = \left(\frac{d_{végső}}{d_{kezdeti}} \right)^3 \quad (18)$$

,ahol $d_{végső}$ a gél korong átmérője a hidrolízist követően, $d_{kezdeti}$ pedig az egyensúlyi PSI alapú korong átmérője.

4.6.2. Hálóláncok sűrűségének meghatározása rugalmassági modulusz mérésével

A rugalmassági modulusz méréséhez 1 cm magasságú és átmérőjű gél hengereket készítettem. A mérést Instron 5942 egyoszlopos mechanikai tesztelővel (11. ábra), egyirányú összenyomással végeztem. 1 mm/min összenyomási sebességet alkalmazva a vizsgálatot 3 N nyomóerő vagy 2 mm összenyomás eléréséig folytattam 25 °C-on, légköri nyomáson és levegő atmoszférán.



11. ábra: Instron 5942 egyoszlopos mechanikai tesztelő

A mérés előtt megmértem a hengerek magasságát és átmérőjét. A mérés során a nyomóerőt (F) detektáljuk a deformáció (Δh) függvényében. A nyomóerőből a következő egyenlet segítségével számítottam ki a nominális feszültséget (σ):

$$\sigma = \frac{F}{\frac{d_0^2 \cdot \pi}{4}} \quad (19)$$

,ahol d_0 a gél henger kezdeti átmérőjét jelöli.

A deformáció értékéből az alábbi képlettel határoztam meg a deformációarányt (λ):

$$\lambda = 1 - \frac{\Delta h}{h_0} \quad (20)$$

,ahol h_0 a gél henger kezdeti magasságát, Δh pedig a deformáció mértékét jelenti abban az esetben, ha a $\Delta h = h_0 - h$ feltétel teljesül.

A deformáció arány felhasználásával kiszámítottam a D értéket, melynek függvényében ábrázoltam a nominális feszültséget. A kapott pontokra illesztett egyenes meredekségéből határoztam meg a rugalmassági moduluszt (G):

$$\sigma = -G \cdot (\lambda - \lambda^{-2}) = -G \cdot D \quad (21)$$

A gélek tömegadataiból kiszámítottam a tömeg szerinti duzzadásfokokat (Q_m) a 2. egyenlet segítségével, majd ennek felhasználásával meghatároztam a gélben lévő polimer térfogati törtjét (Φ) az 5. egyenlet alapján.

A rugalmassági modulusz ismeretében az egységnyi térfogatba eső hálóláncok mennyiségét (ν^*) a Neo-Hooke törvény segítségével számítottam ki:

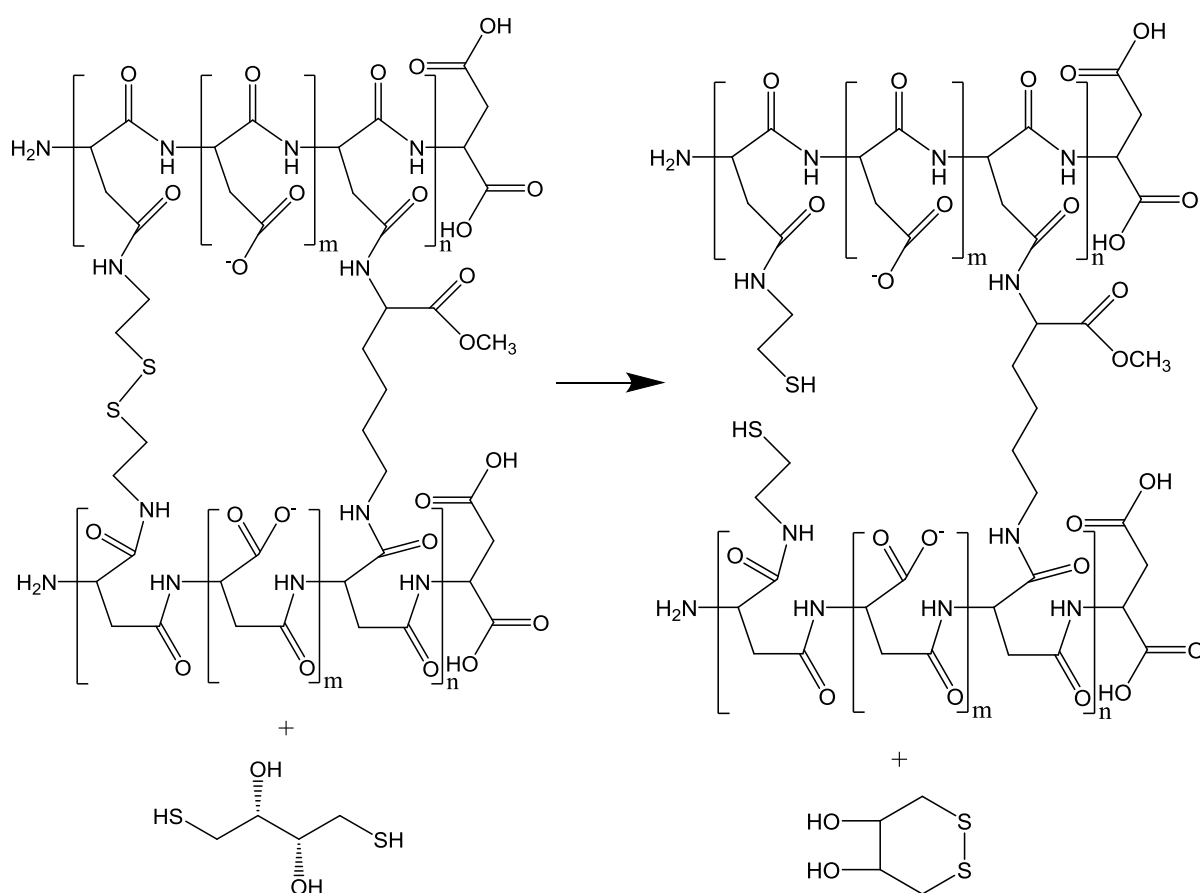
$$G = RTAv^*q_0^{-2/3}\phi^{1/3} \quad (22)$$

,ahol T a hőmérséklet, R az egyetemes gázállandó, melynek értéke 8,314 kJ/(mol*K), A a modell paraméter, amely a Flory elmélet értelmében 1, míg a James-Guth és Staverman elmélet szerint 1/2, Φ a polimer térfogati törtje a gélben, q_0 a memória faktor, amely megmutatja, hogy a polimer térháló mennyire „emlékszik” a kiindulási állapotára. Ebből kifolyólag ez a gél anyagi minőségétől függ. [36, 38]. A kiértékelés során a Flory elmélet szerinti modell paramétert használtam.

A formából kivett gél hengereknek megmértem a magasságát, az átmérőjét, a tömegét, valamint a rugalmassági moduluszát, majd DMSO-ban való duzzasztást követően az egyensúlyi térfogatú mintákon megismételtem a vizsgálatot. A méréseket elvégeztem még 8-as pH-jú imidazol pufferben ($c = 0,1$ M, $I = 0,25$ M) elhidrolizált, és PBS pufferben duzzasztott PASP gélekkel is. Minden gél típusból egy mintát 0,1 M-os DTT/pH=8-oldatba helyeztem 5 napra, majd vissza az eredeti pH=8, és PBS pufferbe, hogy megvizsgáljam a diszulfid hidak felszakításának hatását a rugalmassági modulusz illetve a ν^* értékére. A méréssorozat végeztével a géleket 40 °C-on kiszárítottam, és meghatároztam a száraz tömegüket.

4.6.3. Gélek duzzadásfokának változása az alkalmazott DTT mennyiségének függvényében

A cisztaminban található diszulfid hidak érzékenyek a környezet redoxpotenciáljának megváltozására, így a redukáló közegbe helyezett gélben ezek a diszulfid hidak felbomlanak és tiol csoportok jönnek létre. A DTT a cisztaminhoz képest negatívabb redoxpotenciállal rendelkezik, ezáltal képes felszakítani a diszulfid hidakat, melynek során intramolekuláris gyűrűzáródási reakció játszódik le a DTT molekulákban (12. ábra).



12. ábra: Cisztaminnal és lizin-metilészterrel vegyesen keresztkötött PAAm gél reakciója DTT-vel

A vizsgálatokhoz PAAm-20CYS-LYS géleket készítettem. Tömegmérésük után minden mintára más-más koncentrációjú DTT/pH=8-oldatot tettem, melyet a DTT oxidációjának elkerülése érdekében nitrogén gázzal átbuborékolattam. 5 nap elteltével lecseréltem a DTT-oldatot pH=8-as pufferre. Az egyensúlyi térfogatú, és a száraz gélek tömegének ismeretében meghatároztam az egyes DTT anyagmennyiségekhez tartozó

duzzadásfok változást (ΔQ), melyből következtetni lehet a gélben lévő diszulfid hidak mennyiségére.

$$\Delta Q = \frac{Q_{m,DTT \text{ után}}}{Q_{m,DTT \text{ előtt}}} \quad (23)$$

,ahol ΔQ a duzzadásfok változást, $Q_{m,DTT \text{ után}}$ a diszulfid hidak felnyílását követően, $Q_{m,DTT \text{ előtt}}$ pedig a reakció előtt mért tömegek alapján számított tömeg szerinti duzzadásfokot jelöli. A tiol csoportot tartalmazó géleket PASP-20CYSE-LYS névvel jelöltem, ahol a CYSE a tiol csoportot tartalmazó ciszteaminra utal.

4.6.4. Duzzadásfok pH-függésének vizsgálata

PASP gélek térfogatuk megváltoztatásával válaszolnak az őket érő környezeti hatásokra, mint például a pH-érték megváltozása [37]. A legnagyobb mértékű változás abban az esetben tapasztalható, amikor ezen hatás kémiai változást indukál a mintában, amely a PSI alapú gél esetében meg is történik (hidrolízis). Így összehasonlítás gyanánt a vizsgálatot elvégeztem mind PSI, mind PASP alapú géleken.

Különböző pH-jú puffereket készítettem rendre 0,1 M-os koncentrációval és 0,25 M-os ionerősséggel, melyekből 5-5 cm³-t pipettáztam mindegyik, ismert tömegű, egyensúlyi állapotú gél korongra. Minden gél típusból 3 párhuzamos mérést végeztem, melyhez 3 különböző átmérőjű (3, 5, 7 mm-es) korongot használtam. A minták 2 napot töltöttek a pufferben, melyet egyszer lecseréltem. Ezután megmértem a tömegüket, majd a mérést megismételtem 40 °C-on történő szárítást követően is. A tömegadatok segítségével kiszámítottam az egyes gélfajták tömeg szerinti duzzadásfokát (2. egyenlet) az adott pH-jú pufferben.

4.6.5. Sejtek életképességének vizsgálata PASP géleken (WST-1)

A munkám során készített gélek szövettámaszként való alkalmazhatóságát *in vitro* sejtenyésztés során vizsgáltuk.

A 4.4. és 4.5. fejezetekben leírtak alapján 0,75 mm vastag PASP-XCYS-LYS gél filmeket készítettem, PBS pufferben duzzasztottam, majd 3 mm átmérőjű korongokat vágtam ki belőlük. PASP-20CYS-LYS gélből készítettem olyan változatot is, amelyben felszakítottam a diszulfid kötéseket (4.6.3 fejezetben leírtak szerint). A korongok ezt követően a SE Orálbiológiai Tanszékére kerültek, ahol Hegedűs Orsolya végezte a sejtenyésztési vizsgálatokat. A korongokat rázatás mellett 3 órán át SC tápoldatban duzzasztotta, melyet 1,5

óra után lecserélt. A mintákat 1 órán át UV-lámpa alatt sterilizálta, és úgynevezett low cell binding plate-be helyezte őket, amelyekben a lyukak alja olyan bevonattal van ellátva, amelyre a sejtek nem képesek letapadni. A gélekre 20000 PDLSC (emberi bölcsességfogból izolált periodontal ligament stem cell) sejtet pipettázott 20 µl tápoldatban szuszpendálva, majd 30 perc elteltével még 180 µl tápoldatot adott a mintákhoz. A sejtek életképességét 24 illetve 72 óra elteltével vizsgálta. Ehhez a mintákról lepipettázta a tápoldatot, kétszer átmosta PBS pufferrel, hogy eltávolítsa a gélhez nem kötődött sejteket. A mintákat 200 µl WST-1 reagens oldatába helyezte 2 órára, majd a lepipettázott oldatoknak mérte az abszorbanciáját 450 nm-en spektrofotométerrel. A halványsárga színű WST-1 reagenst az életképes sejtek sötét sárga formazánná redukálják, amely abszorbancia értéke arányos a gélen megkötődött sejtek mennyiségével.

A kísérlethez kétféle egészséges foggyökérhártya összejtet használtak, melyek között annyi a különbség, hogy más páciensből származtak. Minden gél típus esetén 5 párhuzamos, valamint egy vak mérést végeztek. A vak mintára nem kerültek sejtek, így ez a gélre és a felhasznált anyagokra jellemző abszorbancia értéket adja, melyet levonva a sejtes mérésekből megkapható a sejtpopulációval arányos abszorbancia érték.

5. Eredmények

5.1. Poli(szukcinimid) tulajdonságainak vizsgálata

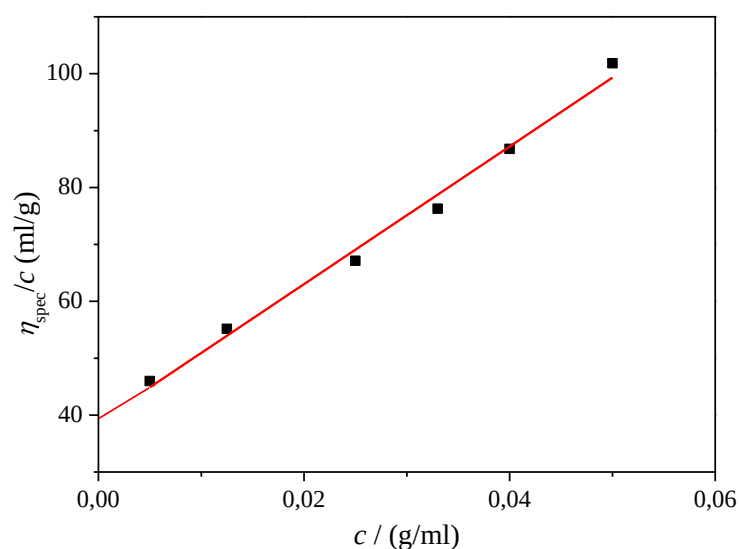
Homogén, megfelelő mechanikai tulajdonságokkal rendelkező poli(aminosav) gélek előállításához nagy polimerizációfokkal rendelkező polimer előállítása szükséges. A 4.2. fejezetben ismertetett szintézis során alkalmazott felfűtési szakasz időtartama, az elért végső hőmérséklet és nyomás nagysága befolyással van a PSI molekulatömegére. Ezen három paraméter megfelelő irányú változtatásával nagy polimerizációfokkal bíró poli(szukcinimid)-et (30-35 kDa) állítottunk elő, és így javítottuk a belőle készült gélek mechanikai tulajdonságait [38].

5.1.1. Poli(szukcinimid) molekulatömegének meghatározása viszkozitás méréssel

A 4.3.1. pontban leírtak alapján kiszámítottam a redukált viszkozításokat az egyes oldatok esetében, melyeket a koncentráció függvényében ábrázolva (2. táblázat), az egyenes tengelymetszetéből (13. ábra) megkaptam a PSI oldat határviszkozítását.

2. táblázat: Különböző koncentrációjú PSI oldatokra mért viszkozitás értékek

c (g/100ml)	η (mPa*s)
oldószer	0,87
0,5	1,07
1,25	1,47
2,5	2,33
3,3	3,06
4	3,89
5	5,3



13. ábra: PSI redukált viszkozitásának változása a koncentráció függvényében

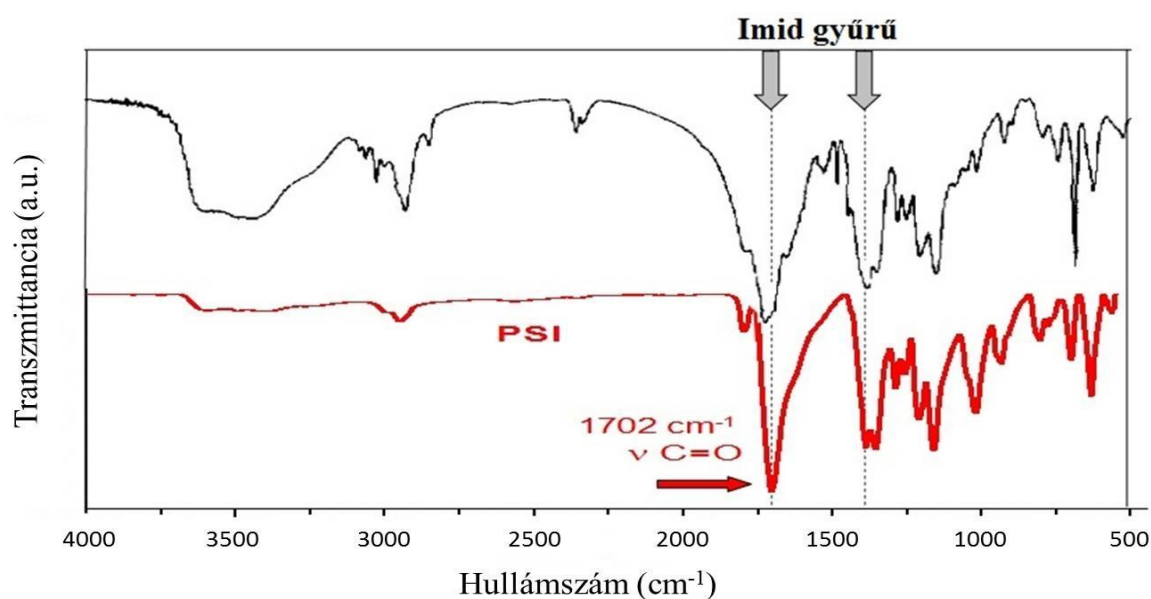
A kapott határviszkozitás értékéből a 17. egyenlet alapján számítottam a molekulatömeget:

$$M = 36,65 \pm 2,3 \text{ kDa}$$

A gélek készítése során ezen mintát használtam.

5.1.2. Fourier transzformációs infravörös mérés (FTIR)

Az 14. ábrán látható a PSI FTIR spektruma:

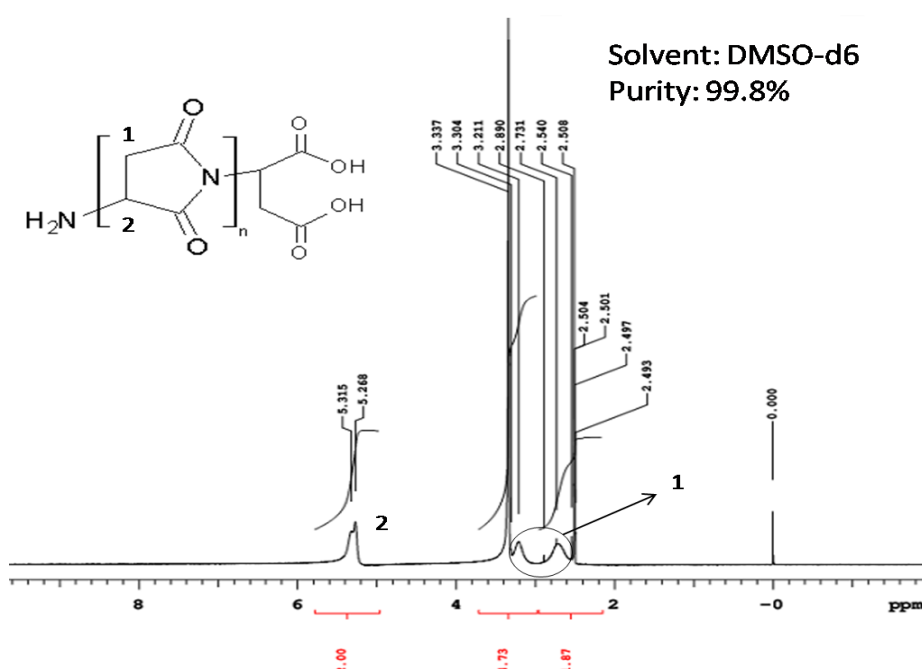


14. ábra: Poli(szukcinimid) FTIR spektruma

A fekete színű spektrum az irodalomban fellelhető [29], míg a piros színű az általunk szintetizált PSI mintáról készített FTIR spektrum (14. ábra). Az 1702 cm^{-1} -nél látható csúcs a ν_{CO} aszimmetrikus rezgésére jellemző az $-(\text{OC})_2\text{N}-$ csoportban. 1386 cm^{-1} -nél található a $\text{C}=\text{O}$ csoport delta rezgése. 1355 cm^{-1} -nél jelenik meg a ν_{CN} rezgése a $-(\text{OC})_2\text{N}-$ csoportban, és 1216 cm^{-1} -nél látható a $(\text{C}=\text{O})-\text{NH}$ csoport $\text{C}-\text{N}$ rezgése. Az 1160 cm^{-1} -nél megjelenő csúcs a $(\text{C}=\text{O})-\text{NR}-(\text{C}-\text{O})$ csoportot mutatja. Ezek alapján bizonyítható az imid gyűrű jelenléte a poli(szukcinimid) molekulában.

5.1.3. Mágneses magrezonancia mérés (NMR)

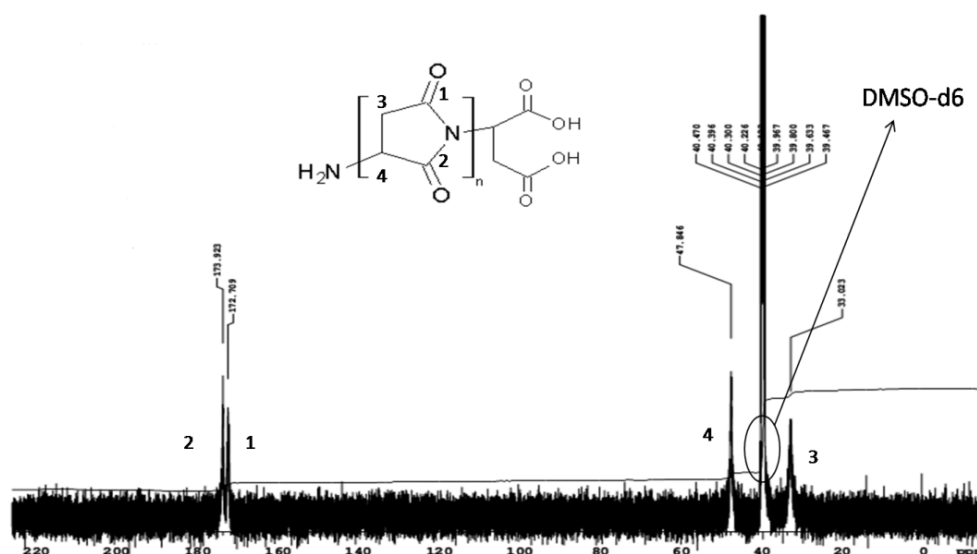
A 15. ábrán látható a PSI ^1H -NMR spektruma:



15. ábra: Poli(szukcinimid) ^1H -NMR spektruma

A PSI ^1H -NMR spektrumán 3 csúcs látható (15. ábra). 5,3 ppm-nél található a monomer gyűrűk kapcsolódási pontjában lévő metin csoport H atomjának a jele. A metilén csoport két protonja két külön helyen, 2,5 ppm-nél, és 3,2 ppm-nél jelenik meg, a metin csoport királis szénatomja miatt. Mivel a polimer nem ad 6 ppm fölötti jelet, ahol az amid proton csúcsa foglalna helyet, arra lehet következtetni, hogy a PSI nem tartalmaz felnyílt gyűrűket.

A 16. ábrán a PSI ^{13}C -NMR spektruma látható:



16. ábra: Poli(szukcinimid) ^{13}C -NMR spektruma

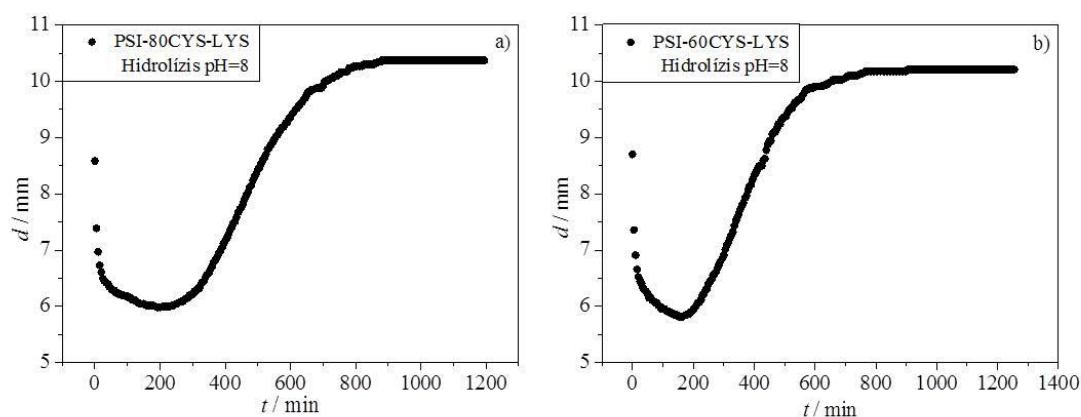
A PSI ^{13}C -NMR spektrumában 4 csúcs figyelhető meg (16. ábra), amelyek a szukcinimid gyűrű 4 szénatomjához tartoznak. A két $\text{C}=\text{O}$ csoportban lévő C atom jele 173,9 ppm-nél és 172,7 ppm-nél látható, melyek közül a monomer egységek kapcsolódási pontjában lévő szénatom értéke a nagyobb. A metin és a metilén csoport csúcsa különböző helyen jelenik meg a spektrumban, mivel a bennük található szénatom kémiai környezete is eltérő. A metin csoport C atomjának a jele 47,8 ppm-nél, míg a metil csoport C atomjának a jele 33 ppm-nél látható. 40 ppm-nél jelenik meg a DMSO- d_6 -ban található metil csoport C atomjának a jele. A ^{13}C -NMR spektrum is igazolja, hogy a PSI lánc nem tartalmaz elágazásokat illetve felnyílt gyűrűket.

5.2. Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek vizsgálata

A poli(szukcinimid) alapú gélek előállításához cisztamin és lizin-metilészter keresztkötő molekulát alkalmaztam különböző arányban. Ezután a környezet megváltozására (kémiai összetétel, pH) adott válaszreakciókat a gélek tömegének és méretének változásával vizsgáltam.

5.2.1. PSI-CYS-LYS gélek duzzadáskinetikájának vizsgálata hidrolízis során

A kísérlet során a 4.4. pontban ismertetett géleknek vizsgáltam a hidrolízis hatására bekövetkező méretváltozását az idő függvényében (17. ábra).



17. ábra: a) PSI-80CYS-LYS és b) PSI-60CYS-LYS gél korongok átmérőjének változása hidrolízis hatására az idő függvényében

A PSI alapú gélekben a szukcinimid gyűrű felhasad a hidrolízis során, és egy α - és β -aszparaginsav monomeregységekből felépülő poli(aszparaginsav) kopolimer térháló jön létre. A gyűrűk felnyílása során polielektrolit keletkezik, így megnő a duzzasztószer-polimer kölcsönhatás. Ez az ozmotikus hatás növekedésén keresztül (2.3.2. fejezet) a gél duzzadásához vezet. A méretváltozást két szakaszra osztjuk az első a duzzasztószer kicserélődése a második pedig a poli(szukcinimid) hidrolízise. Mivel az első szakasz gyorsabban játszódik le, ezért a gél először összehúzódik, szinerizál. Ezt az okozza, hogy a folyadékok kicserélődését követően a polimer-duzzasztószer rendszerre jellemző Huggins-féle kölcsönhatási paraméter értéke megnő. A hidrolízis beindulása után, az elegyedési szabadentalpia csökkenésének hatására a gél elkezd duzzadni. A 17. ábra és a 3. táblázat eredményei alapján következtethetünk arra, hogy a keresztkötők kémiai szerkezete nem változik meg a hidrolízis során. Azaz a lizin-metilészter észter csoportján nem következik be hidrolízis illetve a cisztaminban található diszulfid hidak sem szakadnak fel.

Az egyes gél korongok kezdeti és végső átmérőjének felhasználásával kiszámítottam a relatív duzzadásfokot (Q_{rel}) (18. egyenlet). A 3. táblázat tartalmazza a mért ($d_{kezdeti}$, $d_{végső}$) és számított (Q_{rel}) értékeket.

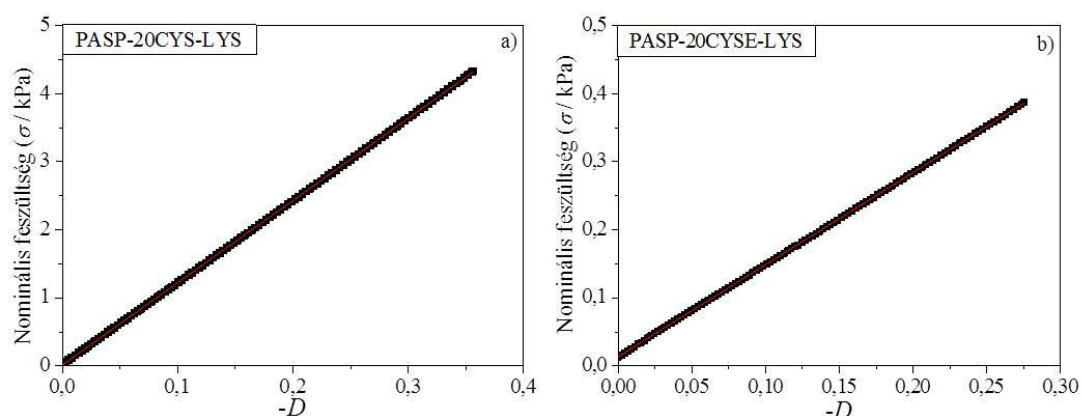
3. táblázat: A gélek kezdeti és végső átmérője, valamint az ezekből számított relatív duzzadásfok értékek

Gél	d_{kezdeti} (mm)	$d_{\text{végső}}$ (mm)	Q_{rel}
PSI-100CYS-LYS	8,54	10,54	1,88
PSI-80CYS-LYS	8,58	10,37	1,77
PSI-60CYS-LYS	8,70	10,21	1,62
PSI-40CYS-LYS	8,78	10,78	1,85
PSI-20CYS-LYS	8,66	10,43	1,75
PSI-0CYS-LYS	8,21	10,15	1,89

A 17. ábra görbéinek lefutásából illetve a 3. táblázatban feltüntetett eredményekből arra következtethetünk, hogy a polimer térháló kémiai összetétele nem befolyásolja a duzzadásfok változást hidrolízis során. A duzzadás során a gélek nem deformálódtak, így a térfogat szerinti relatív duzzadásfok közelíthető az átmérő változásának 3-dik hatványával (18. egyenlet).

5.2.2. Hálóláncok sűrűségének meghatározása rugalmassági modulusz mérésével

A poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek kismértékű deformációjával meghatározható a rugalmassági modulusz (18. ábra), melyből a duzzadásfok ismeretében kiszámítható az egységnyi térfogatba eső hálóláncok mennyisége a Neo-Hooke törvény segítségével (lásd 4.6.2. pontban).



18. ábra: a) PASP-20CYS-LYS és b) PASP-20CYSE-LYS gél rugalmassági moduluszának meghatározása

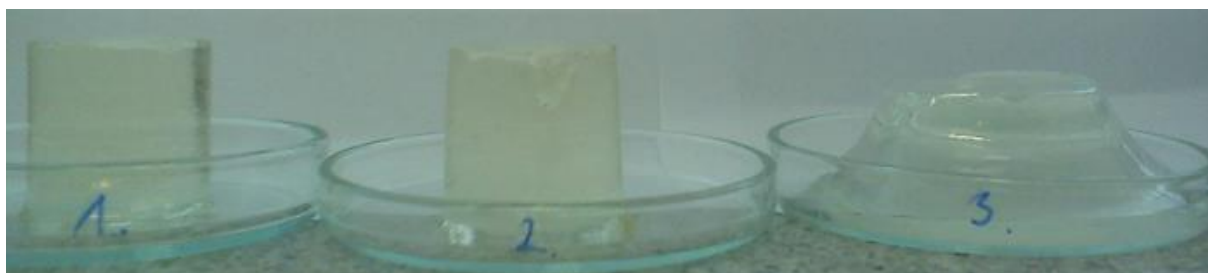
4. táblázat: A különböző állapotú XCYS-LYS gélek rugalmassági modulusza, tömeg szerinti duzzadásfoka, és az egységnyi térfogatba eső hálóláncok mennyisége

Gél		Nem egyensúlyi	DMSO	pH=8	PBS	DTT/pH=8
100CYS-LYS	G (kPa)	$79,65 \pm 5,00$	$73,42 \pm 7,50$	$74,85 \pm 5,71$	$75,90 \pm 0,09$	Feloldódott
	Q_m	3,76	5,84	11,23	12,25	
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	49,8	50,9	69,7	72,1	
80CYS-LYS	G (kPa)	$70,64 \pm 2,56$	$70,43 \pm 1,35$	$63,45 \pm 6,95$	$69,23 \pm 3,04$	Feloldódott
	Q_m	4,00	5,95	11,39	12,43	
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	49,4	55,3	65,0	68,6	
60CYS-LYS	G (kPa)	$50,15 \pm 1,39$	$46,08 \pm 0,71$	$43,63 \pm 1,88$	$43,82 \pm 1,55$	Feloldódott
	Q_m	3,88	6,60	13,06	14,43	
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	33,7	37,8	44,6	45,1	
40CYS-LYS	G (kPa)	$31,27 \pm 1,71$	$28,81 \pm 0,97$	$24,69 \pm 1,15$	$23,36 \pm 1,02$	
	Q_m	3,76	7,11	15,79	17,55	36,48
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	19,6	22,8	25,2	23,9	
20CYS-LYS	G (kPa)	$17,44 \pm 0,29$	$14,80 \pm 0,99$	$12,43 \pm 0,72$ 1,79	$11,86 \pm 0,73$ 1,68	1,35
	Q_m	3,71	9,41	19,05 32,34	21,25 34,24	34,33
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	11,8	12,6	12,9 2,4	12,5 2,4	1,9
0CYS-LYS	G (kPa)	$3,65 \pm 0,30$	$2,22 \pm 0,32$	$1,48 \pm 0,23$ 1,48	$1,26 \pm 0,63$ 1,37	1,57
	Q_m	3,24	13,63	30,36 33,31	34,20 36,67	32,27
	$\nu^* q_0^{-2/3}$ (mol/m ³)	2,2	2,3	2,0 2,0	1,9 1,9	2,1

A q_0 a memória faktort jelöli, amely minden minta esetében megegyezik, így nem befolyásolja az értékek összehasonlítását. A nem egyensúlyi állapot azt jelenti, hogy a gél vizsgálatát közvetlenül a formából való kivételt követően hajtottam végre. A DTT/pH=8-as mérés kivételével minden vizsgálat esetén 3 párhuzamos mérést végeztem. A piros színnel írt értékek a diszulfid hidak felszakítása utáni adatok.(4. táblázat)

A táblázatból látható, hogy egy adott gél típuson belül a különböző oldatokból kivett gélek rugalmassági modulusza kis mértékben csökken, míg a duzzadásfokban nagyobb léptékű növekedés tapasztalható. Ez abból adódik, hogy a pH=8-as pufferben a szukcinimid gyűrűk hidrolízisét követően polielektrolitot kapunk, megnő a polimer-duzzasztószer kölcsönhatás, így több folyadék áramlik be a gél belsejébe. A Neo-Hooke törvény szerint a rugalmassági modulusz a duzzadásfok reciprokának $1/3$ -dik hatványával arányos (4.6.2. fejezet). A v^* növekedés annak tudható be, hogy a duzzadásfok növekedés nagyobb mértékű, mint a rugalmassági modulusz csökkenése.

Megfigyelhető, hogy a gélben lévő cisztamin keresztkötő mennyiségének csökkenésével az azonos oldatokból kivett gélek rugalmassági modulusza, és az egységnyi térfogatba eső hálólánc mennyiségei egyenletes csökkenést, míg a duzzadásfokok növekedést mutatnak. Mivel a gélhez adott lizin-metilészter mennyiségének csak egy bizonyos hányada alakít ki keresztkötéseket a polimer láncok között, a lizin-metilészter arányának növelésével az előállított gélek valós térhálósítási foka egyre nagyobb lesz. Ebből kifolyólag a gélek több folyadékot tudnak magukba zárni, így lágyabbak lesznek.



19. ábra: Balról jobbra haladva a 1.) 0CYS-LYS, 2.) 20CYS-LYS, és 3.) 40CYS-LYS gél hengerek láthatók DTT/pH=8-as kezelés után

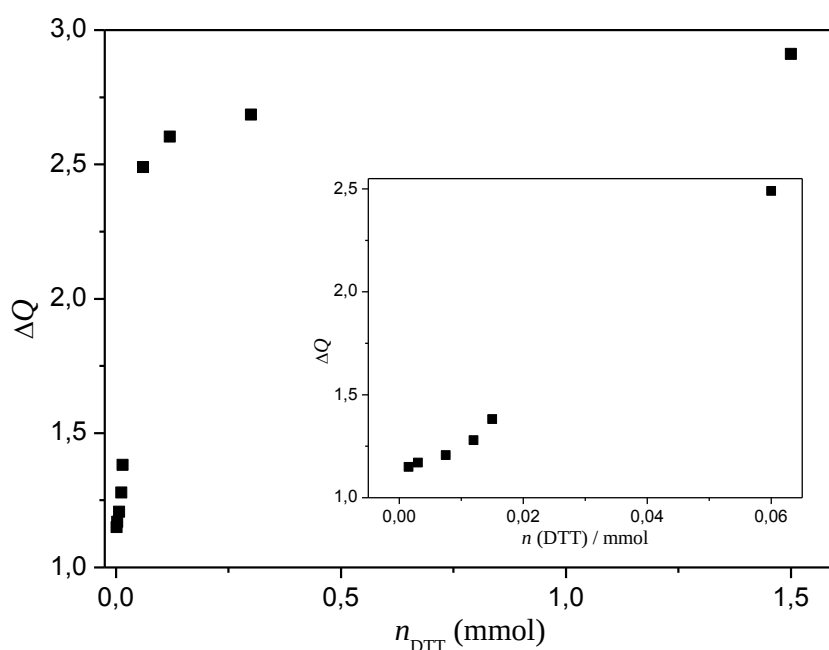
A 0,1 M-os DTT/pH=8-oldatban a cisztamint nagyobb mennyiségben (100, 80, 60 mólarányban) tartalmazó gélek feloldódtak. A 40CYS-LYS gél egészben maradt, de duzzadásfoka igen nagymértékben megnőtt. A megmaradt keresztkötések mennyisége még nem volt elég ahhoz, hogy a gél megtartsa eredeti alakját, saját súlya alatt deformálódott (19. ábra, 3. minta). A 0CYS-LYS gélben cisztamin hiányában nem következett be minőségi

változás (19. ábra, 1. minta). Egyedül a 20CYS-LYS gélben van jelen annyi lizin-metilészter keresztkötés, amennyi még meg tudja őrizni a kiindulási alakot (19. ábra, 2. minta). A diszulfid hidak felszakításának következtében a hálóláncok mennyisége, így rugalmassági modulusza lecsökken (18. ábra), míg a duzzadásfok nagymértékben megnő (4. táblázat). A változások az eredeti pH=8-as pufferbe visszahelyezve szinte teljes mértékben megmaradtak. Mivel a mechanikai tulajdonságok befolyásolják a sejtek proliferációját [12], így ezek ismerete fontos a megfelelő szövetámasz készítésénél.

5.2.3. Gélek duzzadásfokának változása az alkalmazott DTT mennyiségének függvényében

Az előállított gélekben lévő cisztamin keresztkötő diszulfid hidat tartalmaz, amely érzékeny a környezet redoxpotenciáljának változására. A felszakított hidak száma függ az alkalmazott DTT mennyiségétől, így a különböző koncentrációjú DTT/pH=8-oldatokban mért duzzadásfok változásokból következtethetünk a gélben található diszulfid hidak mennyiségére. Tehát az elméleti cisztamin tartalom ismeretében meghatározható a ténylegesen keresztkötést kialakító cisztamin molekulák mennyisége.

Az 5.2.2. pontban látható, hogy a PASP-20CYS-LYS gél az egyetlen, ahol a reakciót követően úgy tapasztalható duzzadásfok változás, hogy megmarad az eredeti alak, így ezen a gél típuson végeztem el a kísérletet. A PASP gélek duzzadásfok változását vizsgáltam az alkalmazott DTT anyagmennyiségének függvényében (20. ábra).



20. ábra: PASP-20CYS-LYS duzzadásfok változásának ábrázolása a DTT anyagmennyiségének függvényében

5. táblázat: Az alkalmazott DTT anyagmennyisége, és a számított duzzadásfok értékek

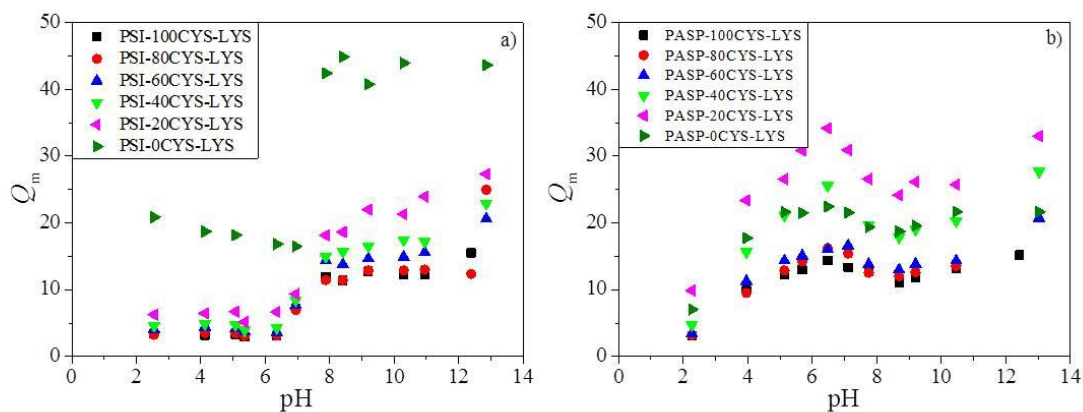
n_{DTT} (mmol)	$Q_{\text{m,DTT előtt}}$	$Q_{\text{m,DTT után}}$	ΔQ
1,5	9,29	27,04	2,91
0,3	10,22	27,43	2,69
0,12	9,39	24,44	2,60
0,06	9,86	24,55	2,49
0,015	13,36	18,45	1,38
0,012	14,44	18,47	1,28
0,0075	14,58	17,59	1,21
0,003	14,70	17,20	1,17
0,0015	15,08	17,33	1,15

Az 5. táblázat adataiból látszik, hogy kezdetben olyan kicsi a DTT mennyisége, hogy a kevés felnyílt diszulfid híd még nem okoz nagymértékű duzzadásfok növekedést. A 0,015-0,06 mmol DTT tartományon belül tapasztaltam a legnagyobb változást. A jobb megfigyelhetőség érdekében a diagramnak ezt a részét kinagyítottam (20. ábra). 0,06 mmol DTT mennyiség felett a méretváltozások között ismét csekély eltérés tapasztalható, a DTT

menyiségének nagymértékű növelése ellenére. Ez arra utal, hogy 0,06 mmol DTT hatására a diszulfid hidak nagy százaléka felszakad. Az adatok alapján a telítési görbe inflexiós pontja 0,04 mmol körülire tehető, ami a gélben lévő diszulfid hidak fele. Ebből arra lehet következtetni, hogy a gél korong 0,08 mmol diszulfid hidat tartalmazott, azonban a meghatározáshoz a 0,02-0,06 mmol tartomány részletesebb vizsgálata szükséges.

5.2.4. Duzzadásfok pH-függésének vizsgálata

A környezet pH értékének hatását vizsgáltam a különböző gél fajták duzzadási tulajdonságaira.



21. ábra: a) PSI és b) PASP alapú gélek tömeg szerinti duzzadásfokának ábrázolása a pH függvényében

PSI gélek esetében (21. ábra a)) látható, hogy 8-as pH alatt a gélek nagyon kis duzzadásfok értéket vesznek fel és ez szinte minden gél esetében azonos, kivéve a 0CYS-LYS mintát. Ennek oka, hogy a PSI térháló hidrofób, így a Huggins-féle kölcsönhatási paraméter értéke vizes közegben magas lesz. Látható, hogy 8-as pH felett a duzzadásfok minden minta esetében megnő, amely a polimer térháló lúgos hidrolíziséből adódik. Az is megfigyelhető, hogy 12-es pH felett egy újabb duzzadásfok növekedés következik be, ami a diszulfid hidak felnyílásának valamint a lizin-metilészter észter kötésének hidrolízisének köszönhető. 0CYS-LYS minta esetében a kiugró értéket az előzőekben említett, az elméletinél jóval kisebb térhálósító molekula jelenléte okozza.

PASP gélek esetében (21. ábra b)) a gél minták két csoportra oszthatóak a duzzadásfok pH függése szerint. Azokban a mintákban, amelyekben kevesebb lizin keresztkötő van (100, 80, 60 mólarányú), alacsonyabb értékeket vesznek fel minden pH-n, mint a lizint

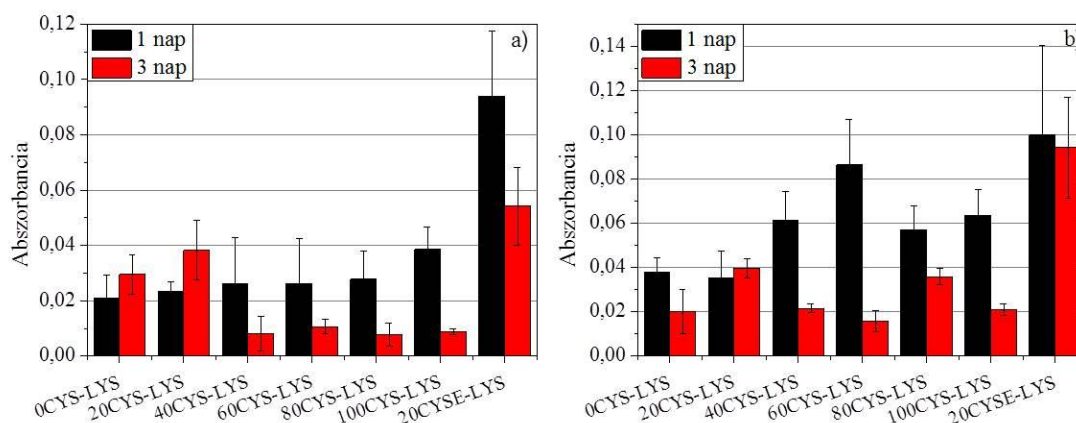
nagyobb mennyiségben tartalmazóak (40, 20, 0 mólarányú). Ez abból következhet, hogy a tényleges keresztkötők mennyisége kisebb. Megfigyelhető, hogy a gélek duzzadásfoka pH=6 környékén veszi fel a legnagyobb értéket, mivel az aszparaginsav oldalláncában lévő karboxil csoportok itt már teljesen ionos formában vannak. A 10-as pH körüli kismértékű csökkenés a szabad amino csoportoknak illetve a savamid csoportok deprotonálódásának a következménye. Az utána következő duzzadásfok növekedés hasonló okok következménye, mint a PSI gélek esetében.

Az eredmények alapján elmondható, hogy mind a PSI mind a PASP gélek duzzadásfoka jelentős mértékben függ a környezet pH-jától. Ezen tulajdonság meghatározó lehet sejtek hosszú távú *in vitro* tenyésztése közben.

5.2.5. PDLSC sejtek életképességének vizsgálata a gélek felületén

A korábbi fejezetekben jellemzett géleken összejtek életképességének vizsgálatát is elvégeztük.

A 22. ábra diagramjain az 5 párhuzamos mérésből származó abszorbancia értékek átlaga és szórása látható 1 és 3 nap elteltével az egyes gél típusok esetében. Az eredmények közötti eltérést a kétféle páciensből származó sejtek okozzák. Fontos megjegyezni, hogy a sejtes kísérletek esetében a daganatos sejtvonalakkal végzett kísérletek sokkal reprodukálhatóbbak az összejtekhez képest. Az egészséges sejtvonalak tenyésztése és magának a vonalnak a fenntartása sokkal nagyobb erőfeszítést igényel, mint a daganatos sejtek esetében. Míg a daganatos sejtek esetén egy azonos őstől szaporított sejteket tenyésztene a világ minden táján a megfelelő sejtbankokon keresztül történő vásárlást követően, addig az összejtek gyűjtése egy-egy páciensből származik, ezáltal a sejtvonalak, amennyiben beszélhetünk sejtvonalról, nagymértékű különbségeket mutathatnak egyes tulajdonságait tekintve.



22. ábra: *In vitro* sejtenyésztés eredményei 1 és 3 nap elteltével a két különböző PDL sejtvonalon esetén (a és b ábra)

A 22. ábrán látható, hogy egy nap elteltével a legtöbb életképes sejt a tiol csoportokat tartalmazó gél felületén volt mindkét minta esetében (PASP-20CYSE-LYS). Mivel a PDLSC sejtek fogeredetű őssejtek így differenciációjuk legegyszerűbben csontszöveti sejtjé játszódik le. Irodalomból ismert tény, hogy a keményszöveti sejtek a keményebb, míg a lágy szöveti sejtek a lágyabb szövettámaszokon „érzik jobban magukat” [12]. A 22. ábraán is megfigyelhető, hogy az első sejt minta esetében a nagyobb rugalmassági moduluszal rendelkező, csak cisztaminnal keresztkötött gélen kétszer annyi sejt található, mint a lágy, lizinnel térhálósított gélen. A 2. minta (22. ábra b)) esetében ez a tendencia nem figyelhető meg, de a keményebb géleken itt is nagyobb a sejtpopuláció. 3 nap elteltével látható, hogy szinte minden minta esetében csökken az életképes sejtek mennyisége, azonban ez a csökkenés a tiol tartalmú géleknél a szóráson belül van. A több diszulfid hidat tartalmazó géleknél a csökkenés annak tudható be, hogy a kísérlet során használt tápoldat a diszulfid hidakat felbontja, így a gélek rugalmassági modulusza nagymértékben csökken 3 nap után. A PASP-20CYS-LYS gélen bekövetkező növekedés azért játszódtott le, mert a diszulfid hidak felbomlásával tiol csoportok jöttek létre, amelyek javították a sejtek megtapadását a gél felületén.

Ezen eredmények alapján elmondható, hogy a gélek rugalmassági moduluszának és tiol csoport tartalmának növelésével, alkalmas PASP géleket hozhatunk létre *in vitro* sejtenyésztéshez.

6. Összefoglalás

Munkám során sikeresen állítottam elő poli(szukcinimid)-et, melynek átlagos molekulatömegét viszkozitás méréssel határoztam meg ($M=35\text{kDa}$). Analitikai módszerek (FTIR, $^1\text{H-NMR}$, $^{13}\text{C-NMR}$) segítségével igazoltam a polimer szerkezetét, melyek alapján a polimer nem tartalmaz felnyílt szukcinimid gyűrűket illetve elágazásokat.

Homogén géleket hoztam létre a poli(szukcinimid) láncok bifunkciós primer aminokkal (cisztamin, lizin) történő térhálósításával.

Vizgáltam a gélek méretváltozását a poli(szukcinimid) hidrolízise közben, melynek során poli(aszparaginsav) alapú gél keletkezik. A duzzadási kinetika vizsgálata alatt megtapasztaltam, hogy a hidrolízis során a gélek duzzadásfoka megnő, és ennek relatív változása független a térhálósító molekulák arányától.

Mérem a különböző összetételű gélek rugalmassági moduluszának változást eltérő közegekben (DMSO, $\text{pH}=8$, PBS, DTT), melyből a Neo-Hooke törvény segítségével kiszámítottam az egységnyi térfogatba eső hálóláncok mennyiségét. Az eredményekből megállapítható, hogy hidrolízis hatására kismértékű csökkenés következik be a gélek rugalmassági moduluszában. A diszulfid hidak felnyitására a cisztamint nagy mennyiségben (100, 80, 60 molarány) tartalmazó gélek feloldódtak. PASP-20CYSE-LYS esetén nagymértékű rugalmassági modulusz és egységnyi térfogatba eső hálólánc mennyiség csökkenést tapasztaltam. Cisztamint nem tartalmazó gél minta ezen változásra érzéketlen.

Vizgáltam a PASP-20CYS-LYS gél duzzadásfokának változását az alkalmazott DTT redukálószer mennyiségének függvényében. Az adatokból arra a következtetésre jutottam, hogy a vizsgált minták körülbelül $0,08\text{ mmol}$ diszulfid hidat tartalmaztak.

Tanulmányoztam a PSI és a PASP alapú gélek méretváltozását a környezet pH értékének hatására, mely eredmények egyértelműen mutatják, hogy mindkét gél duzzadásfoka nagymértékben függ a környezet pH -jától.

Vizgáltam a különböző összetételű gélek alkalmazhatóságát szövettámaszként *in vitro* sejtenyésztés során. Az eredmények alapján a polimer térhálóban jelenlévő tiol csoportok elősegítik a sejtek megtapadását illetve szaporodását a gél felületén. Kísérleti eredményekből látható, hogy a nagyobb rugalmassági modulusssal rendelkező géleken, nagyobb az életképes sejtek száma.

Összefoglalva elmondható, hogy az előállított PASP gélek további változtatásával megfelelő szövettámaszt hozhatunk létre sejtek *in vitro* tenyésztéséhez.

7. Irodalomjegyzék

1. A. Atala: Tissue engineering of reproductive tissues and organs. *Fertility and sterility*, **2012.** 98, 21.
2. E. Santos et al.: Novel advances in the design of three-dimensional bio-scaffolds to control cell fate: translation from 2D to 3D. *Trends in biotechnology*, **2012.** 30, 331.
3. A. Acharya, S. Shetty, V. Deshmukh: Periodontal Ligament StemCells: An Overview. *Journal of OralBiosciences*, **2010.** 52, 275.
4. Galler M. K. et al.: Self-assembling multidomain peptide hidrogels: Designed susceptibility to enzymatic cleavage allows enhanced cell migration and spreading. *J. Am. Chem. Soc.*, **2010.** 132, 3217.
5. Tibbitt, M. W. and Anseth, K. S.: Hydrogels as extracellular matrix mimics for 3D cell culture. *Biotechnol. Bioeng*, **2009.** 103, 655–663.
6. M. P. Lutolf: *Integrative Biology*, **2009.** 1, 235
7. V. Gribova et al.: Effect of RGD functionalization and stiffness modulation of polyelectrolyte multilayer films on muscle cell differentiation. *Acta biomaterialia*, **2013.** 9, 6468.
8. X. Liu et al.: Surface chemical functionalities affect the behavior of human adipose-derived stem cells in vitro. *Applied Surface Science*, **2013.** 270, 473.
9. Zrínyi M.: *Intelligens anyagok. Magyar Tudomány*, **1999.** 6. sz.
10. K. Matsumura et al.: Surface modification of poly(ethylene-co-vinyl alcohol): hydroxyapatite immobilization and control of periodontal ligament cells differentiation. *Biomaterials*, **2004.** 25, 4817.
11. S. Deepthi et al.: Chitosan-hyaluronic acid hydrogel coated poly(caprolactone) multiscale bilayer scaffold for ligament regeneration. *Chem. Eng. J.*, **2014.** 260, 478.
12. Barreto S., Perrault C. M., Lacroix D.: Structural finite element analysis to explain cell mechanics variability. *Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials*, **2014.** 38, 219.
13. F. Horkay, M. Nagy: Elasticity of swollen polyvinylalcohol and poly(vinyl-acetate) networks. *Polym. Bull.*, **1980.** 3, 457.
14. Vicsek T.: *Fractal growth Phenomena. World Scientific, Singapore*, **1989.**
15. Juriga D.: Poli(szukcinimid) és poli(aszparaginsav) alapú gélek mechanikai, duzzadási és degradációs tulajdonságainak vizsgálata. *diplomamunka*, **2013.**
16. Ozmen M.M., Okay O.: Swelling behavior of strong polyelectrolyte poly(N-t-butylacrylamide-co-acrylamide) hydrogels. *European Polymer Journal*, **2003.** 39, 877.
17. Lei Cai, Sarah C. Heilshorn: Designing ECM-mimetic materials using protein engineering. *Acta Biomaterialia*, **2014.** 10, 1751.
18. Balázs L.: *A kémia története I. Nemzeti Tankönyvkiadó, Budapest*, **1996.**
19. S. W. Shalaby: *Biomedical polymers: Designed-to-degrade systems. Hanser Publisher, New York*, **1994.**
20. G. Pitaressi et al.: Cross linked hyaluronan with a protein-like polymer: Novel bioresorbable films for biomedical applications. *J. Biomed. Mat. Res. Part A*, **2007.** 84A, 2, 413.
21. Oya M., Katakai R., Nakai H., Iwakara Y.: A Novel Synthesis of N-Carboxy- α -Amino Acid Anhydride. *Chem. Lett.*, **1973.** 11, 1143.
22. Katchalski E., Sela M.: Synthesis and chemical properties of poly-alpha-amino acids. *Advances in Protein Chemistry*, **1958.** 13, 243.
23. Borbély M., Nagasaki Y., Borbély J., Fan K., Bhogle A., Sevoian M.: Biosynthesis and chemical modification of poly(γ -glutamic acid). *Polymer Bulletin*, **1994.** 32, 127.

24. Kovács J., Könyves I., Pusztai A.: Darstellung von Polyasparaginsäuren (Polyaspartsäuren) aus dem thermischen Autokondensationsprodukt der Asparaginsäure. *Experientia*, **1953.** 12, 459
25. Schaal E.: Über einige aus Asparaginsäure entstehende Producte. *Ann. Chem.*, **1871**, 157, 24-34
26. Schiff H.: Über Polyaspartsäuren. *Ber. dtsch. Chem.*, **1897.** 30, 2449.
27. Frankel M., Berger A.: Synthesis of Polyaspartic Acid. *J. Org. Chem.*, **1951.** 16, 1513.
28. Harada K.: Polycondensation of Thermal Precursors of Aspartic Acid. *J. Org. Chem.*, **1959.** 24, 1662.
29. Tomida M., Nakato T., Matsunami S., Kakuchi T.: Convenient synthesis of high molecular weight poly(succinimide) by acid-catalysed polycondensation of IMAGE-aspartic acid. *Polymer*, **1997.** 38, 4733.
30. Zhu J. X., Doyle H. A., Mamula M. J., Asward D. W.: Protein repair in the brain: proteomic analysis of endogenous substrates for protein L-isoaspartylmethyl transferase in mouse brain. *J. Biol. Chem.*, **2006.** 44, 33802.
31. Neri P., Antoni G., Benvenuti F., Colola F., Gazzei G.: Synthesis of alpha beta-poly((2-hydroxyethyl)-DL-aspartamide), a new plasma expander. *J. Med. Chem.*, **1973.** 16, 893.
32. Tachibana Y. et al.:Thermoresponsive Hydrogels Based on Biodegradable Poly(amino acid)s. *Chem. Lett.*, **2003.** 32, 374.
33. Zhao Y. et al.: Superabsorbent hydrogels from poly(aspartic acid) with salt-, temperature- and pH-responsiveness properties. *Polymer*, **2005.** 46, 5368.
34. J. Vlasák et al.: Properties and reactivity of polysuccinimide, *J. of Pol. Sci.: Polymer Symp*, **1979.** 66, 59.
35. Tóth G., Balázs B.: Szerves vegyületek szerkezetfelderítése. *Műegyetemi Kiadó*, Budapest, **2005.**
36. Flory P. J., Rehner Jr. J.: Statistical Mechanics of Cross-Linked Polymer Networks II. Swelling. *J. Chem. Phys.*, **1943.** 11, 521.
37. Gyenes T.,Torma V., Gyarmati B., Zrínyi M.: Synthesis and swelling properties of novel pH-sensitive poly(aspartic acid) gels. *Acta Biomaterialia*, **2008.** 4, 733.
38. Zrínyi M., Gyenes T., Juriga D., Ji-Heung Kim: Volume change of double cross-linked poly(aspartic acid) hydrogels induced by cleavage of one of the crosslinks. *Acta Biomaterialia*, **2013.** 9, 5122.