

Ph.D. értekezés tézisei

A TEGDMA hatása a pulpális sejtek működésére

Dr. Lovász Bálint Viktor

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola
Doktori Iskola vezetője: Prof. Dr. Bogár Lajos
Programvezető: Dr. Nagy Ákos Károly

**Témavezetők: Dr. Szalma József
Dr. Berta Gergely**



Pécsi Tudományegyetem Általános Orvostudományi Kar
Fogászati és Szájsebészeti Klinika, Pécs

2021

Rövidítésjegyzék

| | |
|---------|---------------------------------------|
| AIF | apoptózist-indukáló faktor |
| Bis-GMA | bisphenol a-glycidil metakrilát |
| ER | Endoplazmás retikulum |
| ERK | Extracellular szignál-regulálta kináz |
| HEMA | Hydroxyetil metakrilát |
| HRP | tormaperoxidáz |
| JNK | c-Jun N-terminál kináz |
| MAPK | mitogén-aktivált fehérje kináz |
| MMP | Matrix matelloproteáz |
| PVDF | polyvinylidin fluorid |
| SDS | Nátrium dodecil szulfát |
| TEGDMA | Trietilén glycol dimetakrilát |
| WST-1 | water-soluble tetrazólium só-1 |

Bevezetés

Műgyanta alapú tömőanyagok immár 50 éve elérhetőek a destruált fogak újraépítéséhez. Kitűnő anyagtani és esztétikai tulajdonságaik miatt a kompozit alapú anyagok rendkívül sokrétűen alkalmazhatóak és a klinikai gyakorlatban is széles indikációs területtel bírnak. Konvencionális fog és onlay tömések mellett ideális anyagnak tekinthetőek csapos fogfelépítésre, korona, bracket felragasztásra, valamint alkalmazhatóak cementként és üreg linerként is. Amalgámmal összevetve, legelőnyösebb adottságuk a fogak élethű esztétikájának visszaadása. Ezen felül, megfelelően képesek helyreállítani a destruált fogakat mechanikai szempontból is. Mindezek eredményeként népszerűségük a fogorvosok körében töretlen, és a jövőben várhatóan még tovább fog nőni.

Az imént leírt előnyök, továbbá számos anyag-kémiai fejlesztés ellenére mai napig megoldatlan probléma a kompozitok elégtelen polimerizációja, amely szabad monomerek felszabadulásához vezethet. Ennek köszönhetően sok közlemény foglalkozik a kompozitok és a különféle összetevőik biokompatibilitásával. Számos -gyakran alkalmazott- monomerek (mint például a Bis-GMA, HEMA, TEGDMA) sejtkárosító hatása már bizonyított pulpa- és ínyszteken, azonban sok mechanizmus tisztázatlan maradt eddig a részletesebb sejtszintű válaszokat illetően. Ezeknek részletes ismerete elengedhetetlen a biztonságosabb kompozitok fejlesztéséhez.

Célkitűzések

A fentiek alapján doktori értekezésemnek 2 fő célja volt:

1. Két *in vitro* vizsgálatunk közös célja a TEGDMA monomer által kiváltott pulpasejten belüli specifikus válaszok ismeretének továbbfejlesztése volt. A TEGDMA toxicitása pulpasejteken egy sok irányból feltérképezett és dokumentált téma, azonban számos aspektusa a mai napig tisztázatlan maradt. Vizsgálatok leírták már a TEGDMA monomerek apoptózis-indukáló hatását ezekben a sejtekben, azonban csupán kettő vizsgálta részletesebben, hogy vajon ez belső (intrinsic) avagy külső (extrinsic) úton keresztül valósul-e meg, melyek ellentmondásos eredményekre jutottak. Nem találtunk irodalmat, amely a TEGDMA monomerek esetleges hatását vizsgálta volna kaszpáz-független, illetve ER stressz okozta sejthalálutakra. Így, első vizsgálatunk fő célja a TEGDMA monomerek által elsősorban aktivált – belső vagy külső – apoptotikus út meghatározása volt. Továbbá, vizsgáltuk a monomerek lehetséges hatását kaszpáz-12, illetve kaszpáz-független (AIF) programozott sejthalál irányában is.
2. A második vizsgálat célja a TEGDMA monomerek hatásának felderítése volt a pulpasejten belüli proteáz szintézisre. Mátix-metelloproteázok (MMP-k) szerepe jól ismert számtalan fogpatológiai folyamatban, mint például a fogszuvasodás, pulpitisz és a periapikális gyulladás. Klinikai és szövettani megfigyelések azt bizonyítják, hogy a monomer tartalmú tömő, valamint adhezív anyagok alkalmazása gyakran vezet átmeneti fogbélgyulladásához. Bár ennek pontos folyamata tisztázatlan, a monomer tartalmat fontos tényezőnek tartják. A pulpán belül termelt MMP-k lehetséges szerepe az imént említett

gyulladásban, valamint esetleges összefüggésük a tömésből a pulpába áramló monomerekkel eddig nem vizsgált. Ezért, második vizsgálatunk célja a TEGDMA monomerek esetleges hatásának felderítése volt a pulpasejten belüli MMP aktivitásra és/vagy szintézisre. További célkitűzésként szerepelt a monomerek hatásának vizsgálata p38, ERK, valamint JNK jelátviteli utakra.

Vizsgálati módszerek

A TEGDMA-monomerek citotoxicitásának, valamint hatásának vizsgálata a specifikus halálutakra, pulpasejteken

Fogbéliszövetet öt fogszabályzási okból eltávolított egészséges fog pulpájából izoláltunk a páciensek írásos egyetértésével és a PTE-ÁOK Regionális Kutatás-Etikai Bizottságának engedélyével. Majd a szöveteket az ezzel foglaltatos irodalomban előzőleg leírt módszer szerint, kontrollált *in vitro* körülmények között tenyésztettük Alpha-MEM (Lonza, Basel, Svájc) sejttalajon mindaddig, amíg el nem értük a vizsgálathoz szükséges sejtpopulációt. A kísérletekhez a sejteket azonos technikával Petri csészékbe ültettük ki 2×10^4 sejt/cm² denzitást elérve.

A sejteket először 5 napon keresztül 0,75, 1,5, valamint 3 mM koncentrációjú TEGDMA monomerek hatásának tettük ki. A toxicitás mértékét kétfajta sejszámolási módszerrel, valamint WST-1 (water soluble tetrazolium-1) reagens alkalmazásával vizsgáltuk az első, második, illetve ötödik napon.

A WST-1 reagens egy sejtpemeábilis tetrazolium só, mely a mitokondriális dehidrogenáz enzimrendszerek segítségével egy spektrofotometriával mérhető formázán terméké konvertálódik. Csak vitális sejtek mitokondriuma képes ezt a reakciót katalizálni. Tehát a mért színváltozás mértéke a tenyészetben jelenlévő élő sejtek számával arányos. A gyártó javaslatait követve, TEGDMA exponálás után a mediumot 200 µl WST-reagensre (Hoffmann-La Roche, Basel, Switzerland, 1:9 WST:Alpha MEM medium) cseréltük, majd 37°C fokon 4 órán át inkubáltuk. Az inkubációt követően 100 µl-t tartalmazó mintákat 96-lyukú ELISA lemezekre vittük fel, majd az egyes minták fényelnyelési képességét (abszorbanciáját) egy FluoStar Optima plate reader (BMG Labtech, USA) segítségével 440 nm hullámhosszon határoztuk meg.

Ezek mellett az élő sejtek számát Bürker-kamrával, valamint hagyományos sejt számolással szintén megállapítottuk. A Bürker-kamrához a sejteket TEGDMA exponálás után tripszin hozzáadásával a lemezek aljáról leválasztottuk, majd 10% FBS tartalmú Alpha MEM mediumba szuszpendáltuk. A mintákat Bürker-kamrába töltöttük majd az élő sejtek számát fáziskontraszt mikroszkóp alatt számoltuk meg. A hagyományos sejt számoláshoz a 6-lyukú lemezek mindegyik lyukának alján három területet definiáltunk, majd a mérési napokon ugyanazzal a mikroszkóppal, ugyanazokban a területekben számoltuk meg az élő sejteket.

Az 5 napos kísérletben mutatott sejthalál-kinetika alapján a további vizsgálatokhoz, melyek segítségével a specifikus halálutakat kívántuk beazonosítani, a sejteket 24 órán át 0,1, 0,2, 0,75, 1,5, illetve 3 mM koncentrációjú monomerekkel kezeltük. Ezt követően Western blot segítségével detektáltuk a hasított kaszpáz-3, kaszpáz-8, kaszpáz-9 és kaszpáz-12 koncentrációk változásait. Ezen túl, vizsgáltuk az apoptosishoz vezető faktor (AIF) szintjének változását is, mely egy kaszpáz-független halálút aktiválására utal. A fehérje meghatározáshoz a monomerekkel történő inkubálás után a mintákat először hideg lízispufferbe (50 mM Tris-base, pH 7,4, 10% glycerol, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM Na-ortovanadát, 100 mM NaF, 5 μ M ZnCl₂, 10 μ g/mL aprotinin, 1 μ g/mL leupeptin, 1 mM PMSF, 1% Triton X-100) gyűjtöttük, homogenizáltuk 20 másodpercig, majd centrifugáltuk 30 percig, 4°C fokon. (RCE=40,000x g) Ezt követte a felülúszó fehérjekoncentrációjának meghatározása Lowry-technikával (Lowry's method, Detergent Compatible Protein Assay Kit, Bio-Rad, Hercules, CA, USA) majd a minták egységes hígítása 30 μ g fehérjetartalom eléréséig. A Laemmli-puffer hozzáadása, valamint denaturálás után a fehérjéket a mintákból SDS (nátrium dodecil szulfát) -tartalmú poliakrilamid gélben molekulásúly alapján szeparáltuk, majd a gél tartalmát PVDF membránra transzferáltuk. A nem-specifikus kölcsönhatásokat zsírmentes

tejporoldattal (3%) blokkoltuk. A fehérjék megjelöléséhez nyúl poliklonális elsődleges, valamint tormaperoxidázzal (HRP)-konjugált szekunder antitesteket használtunk. A mintákat egy G:Box géldokumentációs rendszer (Syngene International Ltd., Bangalore, India) segítségével analizáltuk. A denzitometriához ImageJ-szoftvert használtunk (National Institutes of Health, Bethesda, USA).

A később prezentált eredmények négy független kísérlet eredményeiből adódtak össze. A statisztikai analízist Graphpad Prism szoftver segítségével végeztük. A normál eloszlás meglétét Kolmogorov–Smirnov teszttel, az átlagok közti eltérést ANOVA (analysis of variance), valamint, több minta esetében Tukey post hoc próbával vizsgáltuk.

A TEGDMA monomer hatása az MMP-2, -8, -9 termelésre, illetve az össz-kollagenáz aktivitásra pulpasejtekben

Pulpaszövetet a fent leírt módon izoláltunk és tenyésztettünk. Ún. „pilot study-ként” a sejteket először 0,1, 0,2, 0,75, 1,5, illetve 3 mM TEGDMA hatásának tettük ki azzal a céllal, hogy megtaláljuk azt a vizsgálati körülményt, ami még nem pusztítja el a sejteket, de elegendő ahhoz, hogy stresszreakciót váltson ki. Kezdeti eredményeink azt igazolták, hogy az egy napos kezelési idő maximum 0,75 mM koncentrációjú TEGDMA-val még nem okoz szignifikáns pulpasejt halált. Következésképpen ebben a vizsgálatban a pulpasejteket egy napig 0,1, 0,2, 0,75 mM-os TEGDMA-val kezeltük. A sejtek életképességét WST-1 reagens alkalmazásával a fent leírt módon néztük. Az MMP, valamint kollagenáz aktivitásra való hatást pedig Western blottal, direkt immunofluoreszcenciával és egy specifikus EnzCheck kollagenáz/zselatináz-assay (Molecular Probes; Eugene, OR, USA) segítségével határoztuk meg.

Az EnzCheck kollagenáz/zselatináz-assay nagy mértékben tartalmaz fluoreszcein konjugált zselatint, aminek következtében a fluoreszcencia elfojtott. A zselatin megfelelő szubsztrátként szolgál a legtöbb zselatináz illetve kollagenáz enzim számára, emésztésük során fluoreszens peptidek szabadulnak fel. Ebből következően a fluoreszcencia intenzitás emelkedése arányos a proteolitikus aktivitással és speciális spektrofotométerrel követhető. Az assay kontrollként *Clostridium histolyticum*-ból kivont kollagenázt tartalmaz.

A gyártó instrukciói szerint, TEGDMA inkubáció után a fluoreszcein-zselatin szubsztrátot reakciós pufferrel összekevertük, majd a lízis-pufferben szuszpendált sejtmintákhoz vagy mechanikusan homogenizált sejt-extraktumokhoz hozzáadtuk. Végül a mintákat egy 96-lyukú lemezre vittük át, amelyekben a proteolízis mértékét egy Promega Glo Max plate olvasó (Madison, Wisconsin, USA) segítségével határoztuk meg, külön a sejteket tartalmazó mintákból, és külön a sejt kivonatokból.

A Western blot lépései azonosak voltak az előző vizsgálatban leírtakkal. A fehérjék megjelöléséhez MMP-8, -9, p-p38, p-JNK, p-ERK1 és 2 specifikus nyúl poliklonális, illetve MMP-2 elleni nyúl monoklonális elsődleges antitesteket, valamint tormaperoxidázzal (HRP) konjugált anti-nyúl poliklonális másodlagos antitestet használtunk. Hasonlóan az előbbiekhöz, a mintákat egy G:Box géldokumentációs rendszerrel analizáltuk, a denzitometriát pedig az ImageJ software segítségével végeztük.

Az enzimek pontos sejten belüli lokalizációját immunocitokémiával is megvizsgáltuk. Ehhez a sejteket először PBS mosás után 4% paraformaldehiddel fixáltuk. További mosásokat követően a permeabilizáláshoz 0,1% Triton X-100-t használtunk TBS-ben (50mM Tris-HCl, pH 7,4, 150mM NaCl) 4°C fokon. A nem specifikus kötési helyeket 5%-os sovány tejporoldattal blokkoltuk. Majd a mintákat jelöletlen MMP-2, MMP-8, valamint MMP-9 specifikus primer antitestekkel inkubáltuk.

Szekunder antitestként Cy3-konjugált kecske anti-nyúl antitestet használtunk. A minták analizálása előtt a sejtmagokat Hoechst 33342 reagenssel is megfestettük (Calbiochem, La Jolla, CA, USA). Végül a felvételeket egy Olympus FV-1000 lézer-pásztázó konfokális fluoreszcencia mikroszkóppal (Olympus Europa, Hamburg, Germany) készítettük.

A prezentált eredmények ezúttal is négy független kísérlet eredményeiből adódtak össze. A statisztikai analízist Graphpad Prism szoftver segítségével végeztük el. Az átlagok közti eltérést ANOVA (analysis of variance), valamint több minta esetében Tukey post hoc próbával kiegészítve elemeztük.

Eredmények

A TEGDMA-monomerek citotoxicitásának, valamint hatásának vizsgálata a specifikus sejthalál utakra, pulpasejtekben

Mindkét sejtszámolási technika, valamint WST-1 színezés a TEGDMA monomerek idő és koncentráció függő toxicitását igazolta fogbél sejteken. 24 óra elteltével mindössze az 1,5 és a 3 mM koncentrációjú TEGDMA kezelés növelte szignifikánsan a pusztult sejtek számát a kezeletlen sejtekhez képest. Eredményeink szerint a 0,1, 0,2, valamint 0,75 mM-os TEGDMA-val való kezelés nem vezetett jelentős sejtpusztuláshoz 24 óra elteltével. A második, illetve ötödik napos mérések a sejtek további pusztulását mutatták különösen a 3 mM-os TEGDMA expozíció hatására.

Az egy napos monomer expozíció növelte az összes általunk vizsgált hasított, azaz aktivált kaszpáz koncentrációját. Az intrinsic, illetve extrinsic apoptotikus utakban egyaránt résztvevő aktivált kaszpáz-3 koncentrációja 1,5 mM-os TEGDMA koncentráció felett mutatott szignifikáns növekedést.

Jelentős emelkedést az extrinsic útban résztvevő hasított kaszpáz-8 koncentrációjában 0,2 mM felett, míg az intrinsic apoptotikus útban közreműködő hasított kaszpáz-9 koncentrációjában pedig 0,1 mM-os TEGDMA kezelés felett mértünk.

További eredményeink az ER stresszre utaló aktivált kaszpáz-12 szintjében 0,75 mM felett, amíg a kaszpáz-független halálútban fontos szerepet játszó AIF koncentrációjában pedig 0,2 mM-os TEGDMA inkubáció felett mutattak jelentős emelkedést.

A TEGDMA monomer hatása az MMP-2, -8, -9 termelésre, illetve az össz-kollagenáz/zselatináz aktivitásra pulpasejtekben

Az 5 napos előzetes kísérletünk, melyet azzal a céllal végeztünk, hogy megtaláljuk a proteáz szintézis/aktivitás méréséhez a megfelelő kezelési körülményt, ebben a független vizsgálatban is igazolta a TEGDMA monomerek koncentráció-, illetve idő-függő toxicitását a pulpasejteken. Előbbiekhez hasonlóan 24 óra exponálás után csupán a 1,5 és a 3 mM monomer koncentrációjú kezelés vezetett szignifikáns sejtpusztuláshoz a kezeletlen sejtekhez viszonyítva. Az 5. napos méréseink a sejtek közel teljesmértékű megsemmisülését mutatta. Ebből kifolyólag a vizsgálat további fázisaihoz a sejteket mindössze 24 órán keresztül, valamint maximum 0,75 mM koncentrációjú TEGDMA-val kezeltük.

A kollagenáz/zselatináz assay alkalmazásával kapott eredményeink az enzimaktivitás emelkedését mutatták TEGDMA hatására a fogbél sejtekben. Egyaránt a sejt lizátumokból és a sejtek médiumából szignifikáns aktivitás emelkedést mértünk 0,1, valamint 0,2 mM-os monomer kezelés hatására.

Az egynapos TEGDMA kezelés szintén növelte a mátrix-metalloproteázok termelését a pulpasejtekben. Mindegyik monomer kezelés szignifikáns

MMP-2 emelkedéshez vezetett. Az MMP-8 szintje 0,2, illetve 0,75 mM-os, míg az MMP-9 szintje mindössze 0,2 mM-os monomer hatására növekedett jelentősen. Az indirekt immunfluoreszcenciával nyert felvételeink az előbbi eredményeket alátámasztva, szintén jelentős proteáz emelkedést igazoltak monomer expozíció hatására. A mikroszkópos képeken az MMP-2 és a némileg szemcsésebb megjelenésű MMP-8 főleg a sejt plazmába lokalizálódott, miközben az MMP-9 a sejt plazmában és a sejt membránhoz közelebb egyaránt megtalálható volt. Előbbi lokalizációban szemcsésebb, utóbbiban szálasabb megjelenést mutatott.

A TEGDMA kezelés ugyancsak indukálta az összes vizsgált jelátviteli fehérje aktivációját. Míg a p-ERK 1 és 2, valamint p-JNK szintje jelentősen emelkedett az összes TEGDMA kezelés hatására, a p38 foszforilált/aktivált variánsa csak a 0,1 mM koncentrációjú monomer kezelés esetében mutatott szignifikáns növekedést a pulpasejtekben.

Megbeszélés

A fogászatban manapság forgalomban lévő kompozit alapú tömőanyagok három fő fázisból épülnek fel, melyek specifikus hullámhosszú kék fény megvilágításának hatására egy megerősített polimer rendszert eredményeznek. Ez a három fő alkotóelem: a szerves mátrix, anorganikus töltőanyag, valamint az organo-szilán kapcsoló fázis. Ezeken kívül a modern kompozitok tartalmaznak még a kémia reakció késleltetését szolgáló inhibitor-t, a reakció katalizását eredményező iniciátor-akcelerátor rendszert, illetve pigmenteket az élethű megjelenés eléréséhez.

Klinikai obszervációk szerint a monomer tartalmú kompozitok, valamint adhezív anyagok behelyezése képes átmeneti pulpagyulladásához vezetni mely hosszabb ideig tart, mint amit csupán az üregalakítás mechanikai irritációjának lehetne tulajdonítani. Vizsgálatok immár bebizonyították, hogy tulajdonképpen a polimerizált kompozit tömés bármely komponense képes „kimosódni” és kölcsönhatásba lépni a határos élő szövetekkel. A különböző összetevők esetleges káros hatásaival foglalkozó irodalom leginkább a szabad monomerek szövetekben kifejtett hatásait vizsgálta eddig. Annál is inkább, mivel a jelen anyagfejlettség szerint, a modern kompozitok legfeljebb maximálisan 60-70%-ig polimerizálódnak. Ezen túl egyes nyálban megtalálható enzimek, valamint a rágás okozta állandó mechanikai behatások a létrejött polimer lebontásához és ezáltal újabb szabad monomerek felszabadulásához vezethet. Több sejt kultúrát is alkalmaztak eddig a monomerek káros hatásainak bemutatására, azonban azon megfigyelés óta, miszerint a monomerek képesek a dentintubulusokon át a pulpába jutni, így fizikális kapcsolatba lépni a fogbél szövettel, a pulpa sejtek használata jelentősen gyakoribbá vált.

A jelenlegi irodalom a monomer kimosódást bifázisosként írja le. A polimerizálatlan monomerek legnagyobb hányada az első 24 órában mosódik

ki ezt követve egy lassabb fázissal mely akár éveken át folytatódhat. A kioldódott monomerek azonosításával foglalkozó vizsgálatok a TEGDMA-t mutatták ki, mint a kioldott folyadékban legnagyobb arányban jelen lévő összetevőt. Ez többek között a monomerek kémia szerkezetével magyarázható. A TEGDMA egyenes molekuláris gerinccel rendelkezik, amiből adódóan a BisGMA-val szemben az egyes TEGDMA molekulák között nem alakulnak ki hidrogén kötések, ezzel segítve a kémiai kioldódást. A kompozit keverékek relatív monomer tartalmán, valamint a dentin feltételezett dilúciós hatásán alapuló elméleti számítások szerint a pulpában elért monomer koncentráció elérheti akár a 4 mM-t is. Ugyan a TEGDMA monomerek sejt-károsító hatása részletesen tárgyalt az ezzel foglalkozó irodalomban, számos specifikus, sejten belüli mechanizmus még a mai napig tisztázatlan, melyeknek ismerete elengedhetetlen az anyagok további fejlesztéséhez. Ezért, vizsgálatunk alapvető célja a pulpasejteken belüli stressz reakciók további feltérképezése volt.

Első vizsgálatunk a TEGDMA monomerek idő és koncentráció függő toxicitását igazolta pulpasejteken. A 1,5, valamint 3 mM-os monomer koncentráció gyors sejtpusztuláshoz vezetett az 5 napos kezelés mindegyik mérőpontjánál. Ezzel szemben a 0,75 mM-os TEGDMA még nem növelte jelentős mértékben az elpusztult sejtek számát 24 óra elteltével. Ez a megfigyelés lehetővé tette azon kísérleti körülmény meghatározását, amely szubletálisnak mondható, így ideális a további stresszreakciók vizsgálatához. A jelenlegi szakirodalom alapján különféle sejtek, különböző szenzitivitást mutathatnak a monomerekkel szemben. Továbbá, többféle assay alkalmazható az életképesség mérésére melyek különböző érzékenységeknek köszönhetően kissé eltérő értékeket eredményezhetnek. Mindezeket figyelembe véve az eredményeink egyezést mutatnak az eddigi vizsgálatokkal, a megfigyelt toxikus érték tekintetében.

A TEGDMA monomerek legfőbb sejtkárosító mechanizmusának az oxidatív egyensúly felborítását tartják, melyet elsősorban a reaktív oxigénszármazékok és számos citokin termelésének növelésével, valamint az antioxidáns glutation koncentrációjának csökkentésével hoz létre. Ennek legfontosabb, többnyire sejtpusztulást eredményező következményei lehetnek az oxidatív DNS károsodás, fragmentáció és végsősoron a mikronukleusz képződés. Továbbá számos vizsgálat ugyancsak beszámolt antioxidáns enzimek, mint például hemi-oxigenáz és kataláz erőteljes aktiválásáról TEGDMA expozíció jelenlétében, mely szintén az oxidatív egyensúly felborulásának jelentőségét támasztja alá.

Az első vizsgálat második megállapítása az apoptózis, mint domináns sejthalál forma volt klinikailag releváns monomer koncentráció kezelés hatására. Ennek jelentősége abban rejlik, hogy az apoptózis, a másik fő sejthalál formával – a nekrozissal- szemben, egy kontrollált önmegsemmisítő folyamat mely ennek következtében ritkábban okoz szöveti gyulladást. Több vizsgálat foglalkozott eddig a TEGDMA monomerek által aktivált specifikus sejthalál utak beazonosításával. Néhányan leírtak egy apoptózisról nekrozisra történő váltást pulpasejtekben 2 mM feletti TEGDMA expozíció esetén. Két vizsgálat kísérelte meg tovább jellemezni az elsősorban aktivált apoptotikus utat, azonban ezek némileg ellentmondásos eredményre jutottak. Míg az egyik vizsgálat az extrinsic utat, a másik mind a két klasszikus apoptotikus út egyidejű aktiválását találta TEGDMA monomer kezelés hatására pulpasejtekben. Az utóbbi megállapítást alátámasztva, a jelen vizsgálat eredményei emelkedést mutattak mind a három hasított kaszpáz (kaspáz-3,-8,-9) koncentrációjában ezzel szintén azt mutatva, hogy a monomerek mindkét apoptotikus utat egyaránt stimulálják. Az eddigi irodalom alapján az előbb említett emelkedés a reaktív oxigénszármazékok termelésében képes mind az intrinsic, illetőleg extrinsic apoptotikus utat aktiválni. Továbbá a TEGDMA bizonyítottan egyidejűleg növeli a TNF- α citokin és ugyanakkor

csökkenti a BCL-xL antiapoptotikus fehérje szintjét a pulpasejtekben melyek további mechanizmusként szolgálhatnak mindkét apoptotikus út aktiválására. Legjobb tudomásunk szerint nincs vizsgálat a jelenlegi irodalomban mely a két klasszikus halálúton túl alternatív apoptotikus mechanizmusok TEGDMA által való aktiválását tanulmányozta volna. Fent részletezett eredményeinken túl, vizsgálatunk szintén igazolta az AIF és a hasított kaszpáz-12 szintjének emelkedését TEGDMA kezelés hatására pulpasejtekben. Az endoplazmás retikulum (ER) stressz szerepe sejthalál előidézésében egy nem is oly régóta tárgyalt téma. A sejten belül az ER-ben történik a fehérjék posztranzlációs módosításának túlnyomó része. Ennek az úgynevezett oxidatív fehérje csomagolásnak legfontosabb feltétele a megfelelő intraluminális redox egyensúly, mely főként a glutation peptid és oxidált variánsa relatív arányának szigorú szabályzásával biztosított. Bár az oxidált környezet alapján véve kedvez a fiziológias fehérje módosításnak, a reaktív oxigénszármazékok kontrollálatlan termelése, valamint a glutation peptidek kimerítése, melyek egyaránt ismert következményei TEGDMA monomerrel történő expozíciónak, így megboríthatják ezt a kritikus egyensúlyt melynek következménye az úgynevezett ER stressz. Ez csomagolatlan vagy helytelenül csomagolt fehérjék aggregálásához vezethet. Az aggregátumok sikertelen megemésztése pedig komplex jelátviteli utak révén az ER membránjához kapcsolt kaszpáz-12 hasítását (aktiválását) eredményezi. Végül a sejtmagba illetőleg sejtplazmába transzlokált kaszpáz-12 a prokaspáz-9 és -3 direkt aktiválásán keresztül kapcsolja az ER stresszt az apoptózishoz.

Az apoptosis-inducing factor (AIF) egy olyan fehérje mely fiziológias körülmények között a mitokondrium intermembrán terében található meg, azonban sejt-stressz folyamán rendelkezhet kaszpáz-független apoptózis effektor funkcióval. Az oxidatív energiakrízis a mitokondriális membrán potenciál megszűnéséhez, illetve permabilitás fokozódáshoz vezethet. A

következésképp felszabadult AIF a sejt plazmában elsősorban a cyclophillin-A fehérjéhez asszociál. Ezek után a fehérjekomplex a sejt magba transzlokálódik, ahol jelentős DNS fragmentáció, illetőleg kondenzáció révén kaszpáz-független apoptózist okoz.

Az ER stressz és AIF szerepét TEGDMA kezelés okozta sejthalálban új hozzájárulásnak véljük a szakirodalomhoz.

Előkísérleteink alapján a második vizsgálatunkban a sejteket mindössze 24 óráig és maximum 0,75 mM-os TEGDMA-val kezeltük. Ez volt az a kondíció mely még nem okozott túlzott sejtpusztulást, ezáltal megfelelő körülménynek tűnt az enzim szint és aktivitás vizsgálatához. Korábbi vizsgálatok szintén hasonló kísérleti feltételeket alkalmaztak sikeresen különböző fehérjék termelésének vizsgálatához pulpasejtekben. Eredményeink emelkedést mutattak MMP-2, -8, -9 termelésben, valamint összkollagenáz/zselatináz aktivitásban monomer kezelés hatására. Kevesen vizsgálták eddig a TEGDMA monomerek hatását pulpasejten belüli proteáz szintézisre/aktivításra. Nem találtunk vizsgálatot mely a fogpatológiai folyamatokban releváns MMP-2, -8, -9 szintjeit illetőleg aktivitásuk változását tanulmányozta volna. A pontos molekuláris mechanizmus mely a TEGDMA monomerek MMP indukciós hatását eredményezné eddig nem ismert. A monomernek elsősorban a mitogén-aktivált protein kináz (MAPK) jelátviteli kaszkádokra kifejtett hatását tanulmányozták. ERK, JNK, valamint p38 indukciós hatása MMP-1, illetve -13 termelésre pulpasejtekben egy korábbi vizsgálatban dokumentált. Azonban az imént felsorolt jelátviteli molekulák és a jelen vizsgált MMP-k közti esetleges összefüggés eddig tisztázatlan. Jelen Western blot eredményeink az ERK, JNK, valamint p38 jelátviteli molekulák MMP szintézis növekedéssel egyidejű aktiválását igazolták. Specifikus inhibitorok használatának hiánya miatt azonban okozati összefüggés nem vonható. Tekintettel a jelátviteli molekulák általános sejtreakciókban játszott szerepére, a jelen megfigyelt egyidejű MMP és p-

ERK, p-JNK, p-p38 emelkedés egy párhuzamos stresszreakció aktiválását is mutathatják. További vizsgálatokra lenne szükség a lehetséges összefüggés tisztázásához.

Megfigyeléseink részben egyezést mutatnak azokkal a vizsgálatokkal melyek a fogászati gyakorlatban használt, monomerekben gazdag, adhezív anyagok hatását elemezték MMP-2 és MMP-9 szintézisre pulpasejtekben. Egyik vizsgálat a monomer tartalomnak míg másik a készítmények savasságának tulajdonította a megfigyelt MMP-2, illetve -9 emelkedést.

Vizsgálatunk második megállapítása a monomerek összkollagenáz/zselatináz aktivitást növelő hatása volt. Mivel MMP-k teszik ki az iménti enzimek túlnyomó hányadát, a mért enzimaktivitás reprezentatív az össz-mátrix-metalloproteáz aktivitásra. Ezek a fehérjék transzkripció, szintézis, illetve pro-enzim aktiváció szinteken szigorú szabályzás alatt állnak. Kevés teória létezik, amely a proMMP-k aktivációs mechanizmusát tárgyalja, azonban az úgynevezett „cisztin konformációs váltás” kulcsfontosságú lépésnek tartott. A savas pH-val bíró közeg MMP indukciós hatása ugyancsak jól ismert. Utóbbi elmélet alapján felvetődött az a teória mely az MMP-k aktivációját az adhezív anyagok gyengén savas monomerjeinek tulajdonítja. További faktor lehet még a monomer okozta esetleges változás az MMP-k természetes szöveti inhibitorjaként számon tartott, TIMP (tissue inhibitor of matrix metalloproteinases), valamint katepszin koncentrációiban. Nem találtunk közleményt mely a TEGDMA esetleges hatását vizsgálta volna ezekre a fehérjékre. Ezenkívül, a jelen vizsgálatban megfigyelt ERK, JNK, p38 molekulák egyidejű aktivációja összkollagenáz/zselatináz aktivitás növekedéssel együtt a jelátviteli utak szerepét is valószínűsítheti. Szintén további vizsgálatokra lenne szükség ennek tisztázására. Érdekes módon megfigyeléseink ellentétben vannak egy korábbi vizsgálat eredményeivel melyek MMP-2, illetve -9 gátló funkciót tulajdonítottak a TEGDMA monomereknek pulpa sejtenyészeten. A szerzők magyarázata szerint a

TEGDMA éter, valamint karbonil molekulái komplexet képeznek az MMP-k bivalens cink, illetve nukleofil csoportjaival ezáltal fizikailag korlátozva a katalitikus régiót.

A fent tárgyalt eredményeink ismeretében azonban fontos azt is figyelembe venni, hogy egy élő fogban számos olyan tényező van jelen mely a fent említett toxikus hatásokat mérsékelné, mint például a fogbélben belüli nyomás mely a dentinális folyadékot a zománc irányába áramoltatja és ezzel korlátozza a toxikus bomlástermékek pulpális áramlását. A fogbél szintén dús erekben, melyek a káros termékek gyors elszállításával szintén redukálná a káros hatás időtartalmát. Továbbá vizsgálatainkban a pulpasejt-tenyészeteket nyugalmi állapotban kezeltük a monomerekkel. A valóságban töméseket destruált fogakba helyezünk melyekben a szuvasodási folyamat nagy valószínűséggel már valamely káros hatást a kezelés előtt kifejtett a fogbélre. Elképzelhető, hogy a stressz alatt lévő pulpasejtek némileg máshogy reagálnának a monomer jelenlétére. Végezetül a jelen vizsgálatokban mindössze a TEGDMA monomerek hatását néztük, azonban a manapság használatban lévő kompozit készítmények egyszerre többféle monomert tartalmaznak. Monomer kombinációs vizsgálatok alkalmazásával nemcsak egy másik monomerről kaptunk volna információt, hanem esetleges szinergista hatásokról is melyek az *in vivo* szituációt jobban jellemzik.

Az értekezés tézisei

- 1. TEGDMA-monomerek citotoxicitásának, valamint hatásának vizsgálata specifikus halál utakra, pulpasejtekben*

Eredményeink igazolták a TEGDMA koncentráció és idő függő toxicitását pulpasejtekben. Klinikailag releváns koncentrációjú monomer kezelés mindkét klasszikus apoptotikus út aktiválását egyaránt eredményezte. Továbbá, az irodalomhoz való új hozzájárulásnak számít a TEGDMA hatásának dokumentálása kaszpáz-12, valamint AIF fehérjékre melyek az ER stressz, valamint kaszpáz-független halálpályák szerepét valószínűsítik monomer-okozta pulpa sejthalálban.

- 2. TEGDMA monomer hatása MMP-2, -8, -9 termelésre, illetve össz-kollagenáz/zselatináz aktivitásra pulpa sejtekben.*

Eredményeink jól mutatják, hogy a tömésekből kimosódó monomerek képesek a fogpatológiában releváns MMP-knek a termelését és aktivitását növelni a pulpában, mely részben magyarázatként szolgálhat a fogtömések után gyakran megfigyelt átmeneti fogbélgyulladásra, valamint a tömések hosszú idő utáni kilazulására.

Publikációk

A PhD értekezés alapjául szolgáló publikációk:

1. Lovász BV, Berta G, Lempel E, Sétáló G Jr, Vecsernyés M, Szalma J (2021) TEGDMA (triethylene-glycol-dimethacrylate) induces both caspase-dependent and caspase-independent apoptotic pathways in pulp cells. *Polymers* 13(5): 699. doi: 10.3390/polym13050699 **IF₂₀₁₉ 3.426 Q1**
2. Lovász BV, Lempel E, Szalma J, Sétáló Jr. G, Vecsernyés M, Berta G (2021) Influence of TEGDMA monomer on MMP-2, -8, and -9 production and collagenase activity in pulp cells. *Clin Oral Investig.* 25(4):2269-2279 doi: 10.1007/s00784-020-03545-5. **IF₂₀₁₉ 2.812 D1**

A PhD értekezéssel összefüggő publikációk:

1. Lempel E, Lovász BV, Meszarics R, Jeges S, Tóth Á, Szalma J (2017) Direct resin composite restorations for fractured maxillary teeth and diastema closure: A 7 years retrospective evaluation of survival and influencing factors. *Dent Mater.* 33(4): 467-476. doi: 10.1016/j.dental.2017.02.001 **IF 4.039 D1**
2. Lempel E, Lovász BV, Bihari E, Krajczár K, Jeges S, Tóth Á, Szalma J (2019) Long-term clinical evaluation of direct resin composite restorations in vital vs. endodontically treated posterior teeth – Retrospective study up to 13 years. *Dent Mater.* 35(9): 1308-1318. doi: 10.1016/j.dental.2019.06.002 **IF 4.495 D1**
3. Lempel E, Őri Zs, Szalma J, Lovász BV, Kiss A, Tóth Á, Kunsági-Sándor M (2019) Effect of extended exposure time and pre-heating on the conversion degree of conventional, bulk-fill, fiber reinforced and polyacid-modified resin composites in 8 mm deep cavities. *Dent Mater.* 35(2): 217-228. doi: 10.1016/j.dental.2018.11.017 **IF 4.495 D1**
4. Lempel E, Németh KD, Lovász BV, Szalma J (2021) Adhesive management of anterior tooth wear in combination with the Dahl

concept. Observational case-series. *Oper Dent.*
(<http://real.mtak.hu/id/eprint/127280>) **IF₂₀₁₉ 2.213 D1**

5. Lempel E, Óri Zs, Kincses D, Lovász BV, Kunsági-Máté S, Szalma J (2021) Degree of conversion and in vitro temperature rise of pulp chamber during polymerization of flowable and sculpable conventional, bulk-fill and short-fibre reinforced resin composites. *Dent Mater.* 37(6):983-997. **IF₂₀₁₉ 4.495 D1**

Az értekezés témakörétől független publikációk:

1. Szalma J, Vajta L, Lovász BV, Kiss C, Soós B, Lempel E (2020) Identification of specific panoramic high-risk signs in impacted third molar cases where cone beam computed tomography changes the treatment decision. *J Oral Maxillofac Surg.* 78(7): 1061-1070. doi: 10.1016/j.joms.2020.03.012 **IF₂₀₁₉ 1.642 Q2**
2. Szalma J, Lovász BV, Vajta L, Soós B, Lempel E, Möhlhenrich SC (2019) The influence of the chosen in vitro bone simulation model on intraosseous temperatures and drilling times. *Sci Rep.* 9(1): 11871. doi: 10.1038/s41598-019-48416-6 **IF 3.998 D1**
3. Szalma J, Lovász BV, Lempel E, Maróti P (2019) Three-dimensionally printed individual drill sleeve for depth-controlled sections in third molar surgery. *J Oral Maxillofac Surg.* 77(4): 704.e1-704.e7. doi: 10.1016/j.joms.2018.11.028 **IF 1.642 Q1**
4. Szalma J, Klein O, Lovász BV, Lempel E, Jeges S, Olasz L (2018) Recommended drilling parameters of tungsten carbide round drills for the most optimal bone removals in oral surgery. *BioMed Res Int.* 2018:3108581. doi: 10.1155/2018/3108581 **IF 2.197 Q2**

Köszönetnyilvánítás

Hálás köszönettel tartozom témavezetőimnek, **Dr. Berta Gergelynek** és **Dr. Szalma Józsefnek**, akiknek segítsége és útmutatása felbecsülhetetlen volt a vizsgálatok tervezésétől a tézis létrejöttéig.

Továbbá, köszönetemet szeretném kifejezni szerzőtársaimnak, **Dr. Lempel Edinának** és **Ifj. Dr. Sétáló Györgynek** fáradhatatlan munkájukért, tanácsaikért mellyel a publikációimat segítették.

Különös köszönettel tartozom **Vecsernyés Mónikának**, akinek kitartó munkája elengedhetetlen volt a vizsgálatok időben való kivitelezéséhez.

Végül köszönöm **feleségemnek és családomnak**, hogy a nehéz pillanatokban biztattak és erőt adtak.