

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika



**Kutya zsírszöveti eredetű őssejtek izolálása,
karakterizálása, *in vitro* tenyésztése és differenciáltatása –
előzetes eredmények**

Készítette: Dulka Bettina

Témavezető: dr. Thuróczy Julianna,

egyetemi docens, klinikavezető

dr. Balogh Lajos,

OSSKI, főigazgató-helyettes főorvos

Kovács-Haász Veronika,

OSSKI kutató

Budapest

2013

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék.....	1
Rövidítések.....	3
1.Bevezetés	4
2. Irodalmi áttekintés	5
2.1. A mezenchimális őssejtek	5
2.2. Állatorvosi megközelítés.....	5
2.2.1. Állatok az őssejt kutatásban	6
2.2.2. Terápiás célpont.....	6
2.3. Az MSC zsírszövetből történő szeparálása	6
2.4. Zsír-irányú differenciáltatás	7
2.4.1. Tápfolyadék összetétele.....	7
2.5. Porc-irányú differenciáltatás	8
2.5.1. Tápfolyadék összetétele.....	8
2.5.2. Kimutatási eljárás és eredmény	8
2.6. Csont-irányú differenciáltatás	9
2.6.1. Tápfolyadék összetétele.....	9
2.6.2. Kimutatási eljárások	9
2.6.2.1. von Kossa-féle festés	9
2.6.2.2. ALP aktivitás mérése	9
2.6.2.3. Alizarin vörös festés	10
2.6.2.4. Kimutatási eredmények	10
2.7. Autológ és allogén transzplantáció	10
2.8. Fiatal és idős állatból származó MSC összehasonlítása.....	11
2.9. További célok.....	12
2.9.1. <i>In vivo</i> ektopikus csontformáció.....	12
2.9.2. Hordozóanyag.....	12
2.9.3. Beültetések eredménye	13
3. Anyag és módszer	14
3.1. Zsírszöveti minták gyűjtése.....	14
3.2. Vegyes sejtüledék és a zsír, stróma elemek szeparálása	15
3.3. <i>In vitro</i> tenyésztés.....	16

3.4. MSC-k morfológiai és sejtfelületi antigének jelenléte szerinti karakterizálása	17
3.4.1. CD markerek kifejeződése kutya MSC-ken	17
3.5. Differenciálódás 3 irányba	18
3.5.1. Zsír-irányú differenciáltatás	18
3.5.2. Porc-irányú differenciáltatás.....	18
3.5.3. Csont-irányú differenciáltatás.....	18
3.6. Zsír-, porc-, csont-irányú differenciálódás bizonyítása.....	19
3.6.1. Zsír-irányú differenciálódás bizonyítása	19
3.6.2. Porc-irányú differenciálódás bizonyítása	19
3.6.3. Csont-irányú differenciálódás bizonyítása	19
3.6.3.1. Immuncitokémiai jelölés (RUNX2).....	20
3.6.3.2. ALP aktivitás kimutatása	20
3.6.3.2.1. ALP hisztokémia	20
3.6.3.2.2. ALP enzimes mérése	21
3.6.3.3. Alizarin vörös festési eljárás	22
3.6.3.4. Kalcium kiválás mérése	22
3.6.4. Mikroszkópos vizsgálatok	22
4. Eredmények	23
4.1. Zsír-szövetből szeparált MSC-k <i>in vitro</i> tenyésztése	23
4.2. MSC-k morfológiai és sejtfelületi antigének jelenléte szerinti karakterizálása	24
4.2.1. CD markerek kifejeződése kutya MSC-ken	24
4.3. Zsír-irányú differenciálódás bizonyítása	25
4.4. Porc-irányú differenciáltatás bizonyítása	25
4.5. Csont-irányú differenciálódás bizonyítása	25
4.5.1. Immuncitokémiai jelölés	26
4.5.2. ALP aktivitás mérése.....	26
4.5.3. Alizarin vörös festés	28
4.5.4. Kalcium kiválás mérése.....	29
5. Megbeszélés.....	30
6. Összefoglalás.....	31
7. Summary.....	32
8. Irodalomjegyzék.....	33
9. Köszönetnyilvánítás	39
10. Függelék	40

Rövidítések

AD-MSC	Adipose-Derived-Mesenchimal Stem Cell
ALP	Alkalikus foszfatáz
Asc2P	L-aszkorbinsav-2-foszfát
BCIP	5-bromo-4-kloro-3'-indolil-foszfát
bFGF	basic Fibroblast Growth Factor
BM-MSC	Bone Marrow-Mesenchimal Stem Cell
BSA	Bovine Serum Albumin
DAPI	4',6-diamidino-2-fenilindol-dihidroklorid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle's Medium
DMEM-HG	DMEM-High Glucose
DMSO	dimetil-szulfoxid
FACS	Fuorescence-Activated Cell Sorting
FBS	Fetal Bovine Serum
ITS	Insuline Transferrin Selenium
MSC	Mesenchimal Stem Cell
NBT	Nitro Blue Tetrazolium
PBS	Phosphate Buffered Saline
PFA	Paraformaldehid
PNPP	p-nitro-fenilfoszfát
RUNX2	Runt-related transcription factor
SVF	Stromal Vascular Fraktion
TCP	Trikalcium-foszfát
TGF β -1	Transforming Growth Factor beta 1
TGF β -3	Transforming Growth Factor beta 3
TRIS	2-amino-2-hidroximetil-propén-1,3-diol
UCB-MSC	Umbilical-Cord-Mesenchimal Stem Cell
WJ-MSC	Wharton Jelly-Mesenchimal Stem Cell

1.Bevezetés

Az őssejtek a fejlődő embrióban, valamint a felnőtt szervezetben is megtalálható, korlátlan számú osztódásra és önmegújulásra képes, de meghatározott szövet-irányú differenciálódásra nem elkötelezett sejtek. Aszimmetrikus osztódásuk révén nemcsak saját magukhoz hasonló sejteket hoznak létre, hanem olyan utódsejteket is, amelyek képesek a szervezet, különböző funkciót ellátó, szomatikus (testi) sejtjeivé alakulni.

Saját (autológ) MSC-k alkalmazásának lehetősége mind a humán, mind az állati betegségek terápiás alkalmazásában intenzíven kutatott téma. Célunk olyan módszer kidolgozása, mely lehetővé teszi a zsírszövetből származó MSC-k optimális szeparálását, *in vitro* tenyésztését és zsír-, porc-, csont-irányú differenciáltatását.

A jövőben további célunk a csont-irányú differenciáltatáson keresztül ment őssejtek biokompatibilis és biodegradábilis hordozón (ún. scaffoldon) való kitapasztása, majd *in vitro* és *in vivo* csontosítása. Mindez lehetővé tenné az MSC terápiás alkalmazását olyan állatorvosi betegek részére, akik traumás behatás vagy sebészeti beavatkozás után igénylik nagyobb szövethiányos területek rekonstrukcióját.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. A mezenchimális őssejtek

A megtermékenyített petesejt totipotens sejtekből épül fel. A totipotens sejtek képesek embrionális és extraembrionális szövetek és szervek létrehozására egyaránt. Az embrió esetében jelenlévő pluripotens sejtek vagy más néven embrionális őssejtek, melyeket blasztociszták belső sejtsomójából nyertek ki sikeresen, extraembrionális képletek felépítésében már nem vesznek részt, viszont mindhárom csíralemez kialakítására és ivarsejtek képzésére is alkalmasak [1].

A multipotens sejtek részlegesen elköteleződtek valamelyik szöveti differenciálódás irányába, de az ivarsejtek létrehozásában nincs szerepük. Ezekből a sejtekből az adott szervre, szövetre jellemző sejtípus alakulhat ki a későbbiek során.

A mezenchimális őssejtek, más néven felnőtt kötőszöveti őssejtek, minden szervben előforduló multipotens őssejtek, melyek megfelelnek három alapvető kritériumnak:

- Standard tenyésztési körülmények között letapadnak a plaztik tenyésztő edény aljára.
- Meghatározott felületi antigénekkal rendelkeznek (CD105, CD73, CD90), de egyes felületi antigéneket pedig nem expresszálnak (CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19, HLA-DR).
- Különböző mezoderális eredetű sejté, szövétté alakulhatnak át, így képesek zsír-, porc- és csont-irányú differenciálódásra is [2].

Az MSC laboratóriumi körülmények közötti izolálása már számos szövetből sikerült: csontvelőből, zsírszövetből, köldökzsinórvérből, izom-, ideg-, csontszövetből, periosteumból, peridontális ligamentumból, fogbélből, tejfogból, hasnyálmirigy és máj szövetéből, hajhagymából és bőrből [1][3-15].

2.2. Állatorvosi megközelítés

Az MSC terápiás alkalmazása ígéretes jövőnek néz elébe mind a humán, mind az állatorvosi klinikumban. Az őssejtek számos kedvező tulajdonsága ad okot erre a következtetésre, így többek között az egyszerű izolálás, a sejt kultúrák gyors növekedése, multipotens jellegük, parakrin, immunmoduláló hatásuk és migrációs viselkedésük [16].

2.2.1. Állatok az összejt kutatásban

Az összejt kutatások területén kísérleti állatként elsősorban kutyákat alkalmaznak köszönhetően annak, hogy megfelelő modellként szolgálnak különböző betegségek tanulmányozásához [17]. Az MSC kutatások főként Beagle kutyafajtaival dolgoznak, kis-közepes termetük, könnyű kezelhetőségük és egységes genetikai hátterük által alkalmasak laboratóriumi körülmények között zajló kísérletekben való részvételre, mint spontán beteg állat, terápiás célpont és kísérleti állatmodell [18-20].

A kutya mellett gyakori alanya az összejtekkel kapcsolatos kutatásoknak a nyúl, az egér, illetve a juh és a ló is [21-24].

2.2.2. Terápiás célpont

Az állatorvosi MSC kísérletek különböző betegségek kezelését is megcélozták. Lovak ín és ínszalag sérülésének kezelése során csökkent a kiújulás veszélye, és a versenylovak újra versenyezhettek [25]. Kutyák osteoarthritis kezelése után a fájdalom csökkent, az esetek 80%-ában szabadabbá vált a mozgás [26]. Vizsgálták az összejt terápia hatását gerincvelő sérülés, csont-deformáció és periodontitis előfordulásakor is [18][27][28]. Jelentős terápiás cél még a traumás, valamint sebészeti beavatkozást követően kialakult nagyobb csonthiányos területek pótlása hordozóanyagba ültetett, csont-irányú differenciálódáson keresztül ment vagy oszteogenezisre indukált MSC-vel [22][29][30].

2.3. Az MSC zsírszövetből történő szeparálása

A szervezet valamennyi szövetéből kinyerhető összejt, a kísérletek során előnyben részesítik a zsírszövetből történő szeparálását. Ennek oka, hogy a zsírszövet sok MSC-t tartalmaz, nagy mennyiségben kinyerhető, minimálisan invazív a kinyerése például a csontvelőével szemben és nagy az *in vitro* növekedési potenciálja [19][22][31][32][33][34]. 1 g humán zsírszövetből 70 ezer összejt tenyészthető ki egy nap alatt [35]. A passzálások során a zsírszövetből származó mezenchimális összejtek rendelkeznek a legmagasabb proliferációs képességgel összehasonlítva a köldökzsinórvérből, Wharton kocsonyából és csontvelőből nyert összejtekkel [20]. A későbbi oszteogenezis során is az AD-MSc jobban festődik Alizarin vörössel, mint a csontvelőből szeparált összejtek [27].

A zsírszövet gyűjtése általános anesztéziában, steril műtéti úton történik hasi, háti, ágyéki vagy a far bőr alatti területéről [17][19][22][27][36-38].

A levett mintát feldarabolják, 2-3-szor PBS-sel átmosják, majd 15, 30 vagy 60 percig kollagenáz enzim (1 mg/ml) emésztésnek vetik alá 37 °C-on, folyamatos rázogatás közben [19][27][38].

Az oldatot ezután 100 µm pórus átmérőjű nejlon hálón átszűrik, majd 200 xg fordulatszámon 10 perc alatt vagy 1200 xg fordulatszámon 5 perc alatt centrifugálják [1][9][11][15][18][19]. A felülúszó leöntését követően PBS-sel átmosják a sejteket, melyek ez után egy olyan médiumba kerülnek, ami általában az alábbi összetevőket tartalmazza (különböző laborokban eltérő protokollokat követnek):

- DMEM,
- 10% FBS,
- 0,2 mM Asc2P [17][19][22][36].

A sejteket 5%-os CO₂ koncentráción, 37°C-on tenyésztik. 48-72 óra elteltével a nem letapadó sejteket eltávolítják PBS-es mosással [17][27][36]. A passzálást 2-3 alkalommal szükséges megismételni, hogy a sejt kultúra minél homogénebb legyen.

Amikor a sejt kultúrák eléri a 70-80 %-os konfluenciát (konfluencia=szubjektív becslése annak, hogy a sejtek milyen mértékben nőnek be a rendelkezésre álló felületet százalékosan), akkor tripszin segítségével felszedik a letapadt sejteket, majd a differenciálathoz szükséges tápfolyadékba kerülnek át a sejtek.

A sejteket úgy osztják szét, hogy 5000 sejt/cm² kerüljön egy plate-be [38].

2.4. Zsír-irányú differenciáltság

2.4.1. Tápfolyadék összetétele

A zsírszövetből szeparált MSC-k továbbtenyésztése történhet adipogenezis irányába is. A differenciáló DMEM-hez ebben az esetben hozzáadnak még (különböző laborokban eltérő protokollokat követnek):

- 10% FBS-t,
- 10 µM inzulint,
- 1 µM dexametazont,
- 200 µM indometacint,
- 0,5 mM izobutil-metil-xantint [22][38].

Három nap után lecserélik a tápoldatot olyan DMEM-re, ami csak 10% FBS-t és 10 μ M inzulint tartalmaz. Ezt a tápfolyadékot 4. napot követően cserélik. A folyamatot még kétszer megismétlik [27].

0,2%-os Oil-Red O festékkel 14 nap után kimutatható a zsírfelhalmozódás.

2.5. Porc-irányú differenciáltatás

2.5.1. Tápfolyadék összetétele

Az MSC-k chondrogenéziséhez olyan DMEM-re van szükség, ami tartalmaz (különböző laborokban eltérő protokollokat követnek):

- 1% antibiotikumot/antimikotikumot,
- 1mM dexametazont,
- 50 μ M Asc2P-ot vagy 17 mM aszkorbinsavat,
- 10 ng/ml TGF- β 1-et,
- 1% vagy 10% ITS,
- 35 mM L-prolint,
- 0,1 M nátrium-piruvátot [38].

A passzálon átesett őssejteket a tripszines emésztést követően reszuszpendálják a fent leírt médiummal, majd 800 xg fordulatszámon 5 percig centrifugálják. A felülúszó leöntése után a sejtek ismét a porc-irányú differenciálódást elősegítő tápoldatba kerülnek. A tápoldatot heti kétszer célszerű cserélni [36]. A porcosodás kimutatható Toulidinkék, Alcainkék, dimetil-metilénkék festéssel és immunfluoreszcenciával, ahol II-es típusú antikollagén antitestet használnak [17][38].

2.5.2. Kimutatási eljárás és eredmény

Először a sejteket 4%-os pufferolt formaldehid oldattal fixálják, PBS-sel átmosják, paraffinba ágyazzák és feldarabolják. A metszeteket hematoxin-eozinnal megfestik, majd a porcszöveti mukopoliszacharidok és glükózaminoglikánok kimutatásához 1% Toulidinkék, 0,1% Safranin O és 1% Alcainkék festéket alkalmaznak. Desztillált vízzel átmosják és 100%-os etil-alkohollal víztelenítik a mintákat. Egy éjszaka leforgása alatt a metszetek megszáradnak, és fénymikroszkóppal vizsgálhatóvá válnak. 21 napos tenyésztés eredményeként a porcsejtekre jellemző metakromázia mutatható ki [38].

2.6. Csont-irányú differenciáltatás

2.6.1. Tápfolyadék összetétele

A sejtek csont-irányú differenciáltatásához szükséges tápfolyadék általában a következő összetevőkből épül fel (különböző laborokban eltérő protokollokat követnek):

- DMEM,
- 10% FBS,
- 10 nM dexametazon,
- 10 nM 1,25-dihidroxi-vitamin D₃,
- 50 nM Asc2P,
- 10 mM β -glicerofoszfát,
- 1% antibiotikum/antimikotikum [17][22][36].

A médium három naponkénti cseréje szükséges, az inkubáció 14 vagy 21 napot vesz igénybe [20][22][27][36][38].

2.6.2. Kimutatási eljárások

A csontosodás mértékének meghatározására a von Kossa-féle festést, az alkalikus foszfatáz (ALP) aktivitásának mérését és az Alizarin vörös festést használják.

2.6.2.1. von Kossa-féle festés

A von Kossa-féle festési eljárás során az 1%-os AgNO₃ oldatot 45 percig, UV-fény alatt a sejteken hagyják, ezután 5 percig nátrium-trifoszfáttal átöblítik és van Gieson kontrasztfestést alkalmaznak [38]. A kalcium lerakódás helyén fekete csapadék keletkezik a festést követően, ezt fénymikroszkóppal ellenőrzik.

2.6.2.2. ALP aktivitás mérése

Az ALP aktivitás mérésekor először extraháló oldattal feloldják a sejteket, ezt követi a centrifugálás 1600 xg fordulatszámon, 4°C-on 10 percig, majd a felülúszót összegyűjtik és összekeverik PNPP szubsztrát oldattal. Az inkubáció 37°C-on 30 percig tart, a végén nátrium-hidroxiddal felfüggesztik a folyamatot, és 405 nm hullámhosszúságú fényvel, spektrofotométerrel meghatározzák a színelváltozás abszorbanciájának mértékét.

2.6.2.3. Alizarin vörös festés

Az Alizarin vörös festés első lépéseként a sejteket fixálják 4%-os formalinnal vagy 70%-os jéghideg etanol oldattal, majd PBS-es és desztillált vizes atmoszféra következik. Szobahőmérsékleten, 4,1-4,3-as pH-án, 10 percig 2%-os Alizarin vörössel megfestik a mintákat, majd desztillált vízzel ismét atmoszféra alá helyezik őket [20][36]. A megfestett mintákat inverziós vagy fénymikroszkóp segítségével vizsgálják. A színezék oldatával a kalciumvegyületek narancsvörösre színeződnek.

2.6.2.4. Kimutatási eredmények

A sejtek alakja poligonál formát vesz fel az 5. vagy 7. napot követően [22][38]. A mineralizáció 14, 28 nap után válik láthatóvá von Kossa-féle festéssel [22][38]. Alizarin vörös festéssel 21 nap után észlelhető jelentős meszesedés [36]. A csontosodást elősegítő médiumban lévő sejtek a 14. napon már kifejezett ALP aktivitást mutatnak [22].

2.7. Autológ és allogén transzplantáció

Az őssejt terápia alkalmazása során felmerülő kérdések közé tartozik az is, hogy az autológ, saját vagy az allogénikus, azonos faj, fajta más egyedéből származó sejtekkel érhető el jobb eredmény. Az allogénikus sejtek, szövetek felhasználása magában rejti különböző betegségek átvitelét a donorról a recipiensre, következménye lehet kilökődés, beágyazódásbeli problémák [29]. Ugyanakkor a sérült állatból történő saját sejtek levétele nem szerencsés, előfordulhat, hogy a beteg állapota nem is engedi ilyen típusú beavatkozás végrehajtását.

Egy tanulmány során 30 Beagle kutyánál idéztek elő gerincvelő-sérülést lumbális szakaszon. Az állatokat három csoportra osztották. Az első csoport kontrollként nem részesült kezelésben, míg a második csoport tagjaiba autológ, a harmadik csoport tagjaiba pedig allogén csontvelő eredetű őssejteket fecskendeztek a sérülés helyére. Az első hetet követően végzett MRI vizsgálat nem hozott látható eredményt egyik csoportnál sem. Öt hét elteltével viszont jelentős javulás állt be a második csoport egyedeinél, és kisebb mértékben, de a harmadik csoport betegeinek is jobbá vált az állapota [39].

Autológ és allogén csontvelő eredetű őssejtek terápiás alkalmazásának összehasonlítását elvégezték nyulak sípcsontján kialakított csonthiány pótlásakor is. Három csoportot alakítottak ki 54 nyúlból. Az „A” csoport egyedeibe szimpla hidroxipatit hordozóanyagot

ültettek be, a „B” és „C” csoport tagjaiba pedig hidroxipapatitba ültetett autológ és allogén csontvelő eredetű őssejteket. A „B” és „C” csoportnál a 30. napot követően már látható volt az új csont kialakulása, a 60. napon már jelentősen csökkent a csonthiány mértéke, a 90. napon már teljesen kitöltötte az új csont az anyaghiányt. A csontosodás mértéke szignifikánsan magasabb volt a „B” és „C” csoportnál összehasonlítva a kontrol „A” csoporttal [21].

Kutyák esetében szintén elvégeztek egy, az előbbihez hasonló kísérletet. Tizenkét Beagle kutyán alakítottak ki a koponyacsonton kétoldali nagymértékű csonthiányt. Korall hordozóanyagra ültettek rá autológ és allogén zsírszövet eredetű, csont-irányú differenciáltatáson átesett őssejteket. A jobboldali csonthiányba került az allogén, a baloldaliba pedig az autológ (1. csoport) vagy a sima hordozóanyag (2. csoport). A 24. hét végére a csontosodás gyulladás és lymphocytá infiltráció nélkül ugyanolyan mértékben ment végbe a saját és allogén sejtek esetében egyaránt. A szimplán beültetett hordozóanyag esetében csak egy vékony, fibrózus szövet jelent meg. A kezelés során nem alkalmaztak immunszuppresszív terápiát [31].

2.8. Fiatal és idős állatból származó MSC összehasonlítása

Több alkalommal végeztek olyan kísérletet, mely során megvizsgálták, hogy a donor állatok életkora befolyásolja-e az MSC-k kinyerhetőségét, szaporíthatóságát és a különböző szövet-irányú differenciálhatóságát. Patkányoknál előidézett szívinfarktust követően a myocardium sérült részének pótlására használtak fel fiatal és idős állatokból származó MSC-eket. *In vitro* a fiatal MSC-k jobban tolerálták az apoptotikus folyamatokat, és *in vivo* is előbb alakították ki a szívizomra jellemző tubuláris szerkezetet [40]. Míg egyes tanulmányok azt írják, hogy szervezeten belül zajló valamennyi öregedési folyamat hatással van az őssejtek állapotára, addig a kutatók másik csoportja azt állítja, hogy az *in vivo* folyamatok nem változtatják meg az őssejtek potenciáját, azonban *in vitro* körülmények között fontos, hogy megóvjuk a sejteket az oxidatív stressztől [41-43]. Kutyáknál előidézett csonthiány pótlásakor arra jutottak, hogy nem befolyásolja számottevően az őssejtek kora a csontosodás mértékét [19]. Fiatal patkányok fogpulpájából izolált MSC-k nagyobb mértékű proliferációs és gyengébb csont-irányú differenciálódási képességgel rendelkeztek összehasonlítva az idősebb egyedekből származó MSC-vel [44]. Humán területen is ellentmondásos eredmények születtek: egyes kutatócsoportok nem találtak különbséget a fiatal és idős donorokból nyert MSC-k csontosodási potenciálja között, míg más vizsgálatoknál a fiatal donorokból származó

MSC-k nagyobb csontosodási hajlamot mutattak. Fontos megjegyezni, hogy azoknál a kísérleteknél, ahol nem találtak eltérést a korosztályok között, ott a fiatal donorok életkora 18-29 év és 18-42 év közé esett. Ahol különbséget találtak, ott 0-18 év és 7-18 év közötti fiatal korosztályokat vizsgáltak [45-48].

2.9. További célok

2.9.1. *In vivo* ektopikus csontformáció

Az MSC-k zsírszövetből történő szeparálása, majd eredményes csont-irányú differenciáltatása csak az első lépés afelé, hogy csonthiányos területek pótlását sikeresen hajtsák végre össejt terápia segítségével. A sikeres beültetésnek alapvető kritériuma az előbb említett oszteogenezisre hajlamos sejttenyészet és a már létrejött csontsejteknek vázat adó hordozóanyag.

2.9.2. Hordozóanyag

A traumás sérülés vagy sebészeti beavatkozást követően kialakult nagyobb csonthiányok pótlására nem elegendő a csontosodáson átment MSC beinjektálása. A folyamat elején a differenciáltotott sejtek hordozóanyagba történő beültetése szükséges. A hordozóanyag lehet korall, kerámia, β -trikálcium-foszfát és kitozán alapú [19][30][31][44][49][50]. A természetes korall főösszetevője kalcium-karbonát, homogén szerkezettel rendelkezik, pórus mérete $195\pm 75\ \mu\text{m}$ [19]. A β -trikálcium-foszfát pórus mérete ezzel szemben nagyobb, $450\pm 50\ \mu\text{m}$. A kitozán N-acetil-D-glükózaminból épül fel és gyárilag a kitin lúgos hidrolízisével állítják elő [48]. A kerámia alapú hordozóanyag 65%-ban hidroxipatitból és 35%-ban β -trikálcium-foszfátból épül fel. A sejtek ráhelyezését a fent leírt hordozókra autoklávós, besugárzásos vagy alkoholos lemosással történő sterilizálás előzi meg [49].

A már steril hordozóanyagra rápipettázzák a sejt-szuszpenziót, ezt 37°C -on 4 óras inkubáció követi, hogy elősegítsék a sejtek megtapadását. Ezután a csontosodást elősegítő médiumot helyezik a sejtekre és 7 napig tartó inkubáció alatt 3 naponként cserélik a tápfolyadékot [19][31]. Már a harmadik napon elkezdenek kitapadni a sejtek a kiválasztott anyagon, a 7. napon valamennyi pórust kitöltik [19][30].

2.9.3. Beültetések eredménye

Kutyák koponyájának parietális részen kialakított csonthiányra ültettek be korall hordozóanyagot AD-MSK-vel. Tizenkét hét elteltével CT-vel látható volt az új csont formálódása, 24. hetet követően pedig $84,19 \pm 6,45\%$ -os kitöltöttség [19].

Combsonton sebészi úton kialakított szegmentális csonthiányt pótoltak porózus hidroxipatit kerámiára szuszpendált BM-MSK-vel, 4 hónap elteltével a hordozó pórusainak $39,9\%$ -át töltötték ki csontsejtek [51].

Tibia proximalis csonthiányos részére beültetett kerámia hordozóanyag BM-MSK-vel 6 hónap után már beépült, 7 év után teljesen gyógyult, bár a hordozó csak részlegesen szívódott fel [52][53].

Állkapocs β -trikálcium-foszfáttal és BM-MSK-vel történő rekonstrukcióját követően már a 4. héten észleltek csontosodást, a 32. héten kialakult új csontállomány [30].

Kutya ulna sérülését kezelték β -TCP-be ágyazott AD-MSK-vel, 16 hét után a csontdefektus nagymértékű gyógyulását figyelték meg [22].

Radiuson lévő csonthiányba ültetett β -TCP UCB-MSK-vel a 12. héten már röntgennel is jól látható, egységesen radiolucens területet hozott létre [54].

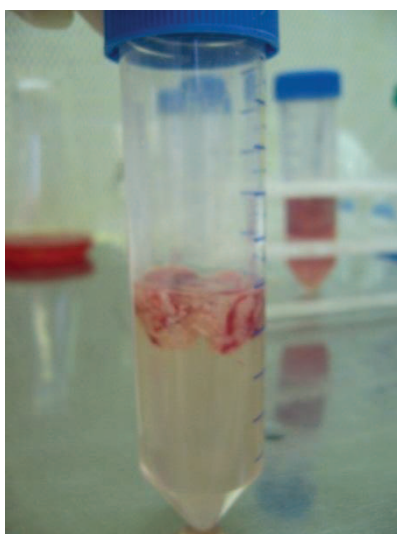
Csontvelőből nyert MSC-vel már sikeresen állítottak helyre csontdefektust juhokkal végzett kísérletben is [55].

3. Anyag és módszer

3.1. Zsírszöveti minták gyűjtése

A zsírszöveti mintákat három 6 hónapos és egy 12 éves Beagle kutya nyakának ventralis részéről, a toka tájék bőr alatti zsírszövetéből nyertük ki steril sebészeti beavatkozás során.

A mintákat 1% penicillin/sztreptomicint tartalmazó PBS-sel (14190-136, Lonza, Belgium) 2-3 alkalommal átmostuk, míg a folyadék feltisztult (**1. ábra**).



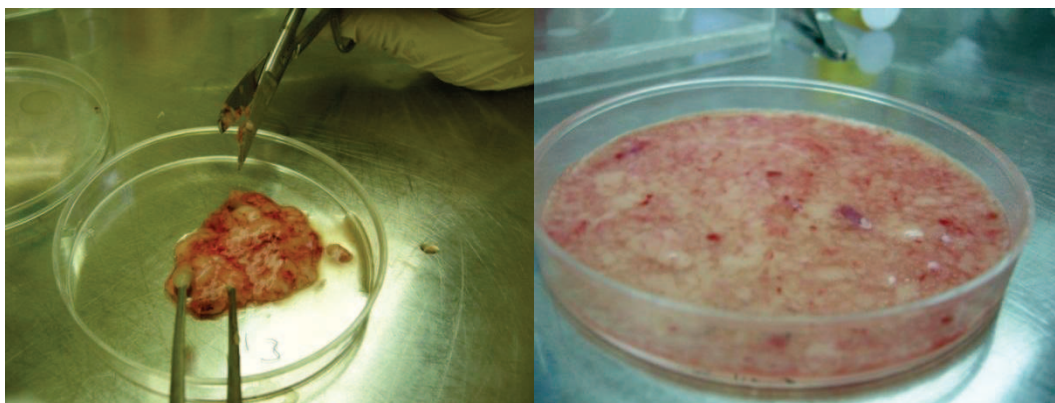
1. ábra Zsírszöveti minta.

A PBS a puffer oldatok közé tartozik, jelenléte biztosítja az állandó semleges (7,4-es) pH-t. Ozmolaritása és ionkoncentrációja megegyezik az emberi szervezetben jelenlévővel (**1. táblázat**).

1. táblázat PBS összetevői.

Só	Koncentráció (mmol/L)	Koncentráció (g/L)
<i>NaCl</i>	137	8,01
<i>KCl</i>	2,7	0,20
<i>Na₂HPO₄ x 2 H₂O</i>	10	1,78
<i>KH₂PO₄</i>	2,0	0,27

1 mg/ml kollagenáz (CI-22, Biochrom, Németország) enzimes oldatot négyszeresére hígítottunk, ebben a folyadékban, egy-egy Petri-csészében steril ollóval és szikével feldaraboltuk a letisztított zsírszövet darabkákat (**2. ábra**).



2. ábra Darabolás és összedarabolt minta.

A feldarabolt mintákat 50 ml-es centrifugacsövekben, 37°C-on termosztátban emésztettük 1-2 órán keresztül. Rendszeresen összeráztuk, és ellenőriztük az emésztés folyamatát (**3. ábra**).



3. ábra Kollagenáz enzimes emésztés.

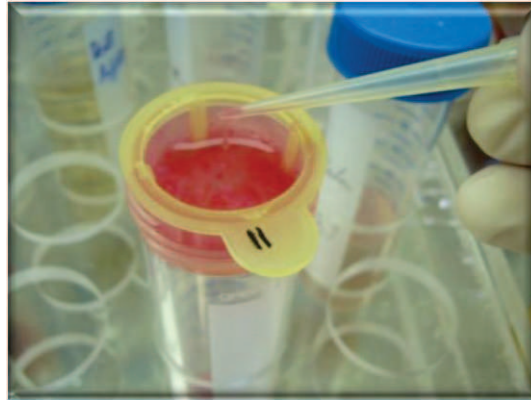
Amikor a zsírszöveti minták simává, folyóssá váltak, az emésztést befejeztük, a kollagenáz enzimet centrifugálással és többszöri PBS-es mosási lépésekkel eltávolítottuk.

3.2. Vegyes sejtüledék és a zsír, stróma elemek szeparálása

Az előbb leírt módszerrel előkészített mintákat 300 xg fordulatszámon, szobahőmérsékleten centrifugáltuk 5 percig, majd ismét jól összeráztuk, hogy az adipocyták és a stróma sejtek teljesen elszeparálódjanak egymástól. Ismételt centrifugálás után (300 xg, 5 perc) pipettával leszívtuk a felülúszót. Az így visszamaradt sejtet üledéket SVF-nek

nevezzük, melyben az őssejtek mellett még, a passzálások során eltávolításra kerülő zsírsejtek, vörösvérsejtek, mononukleáris sejtek és sejtörmelékek is megtalálhatóak.

A SVF-t 5 ml PBS-sel felszuszpendáltuk, majd 100 µm-es pórusú szűrőn átszűrtük (4. ábra).



4. ábra Szűrés.

Következő lépésként 5 ml, DMEM-HG-t (32430-027, Gibco, Anglia), 10% FBS-t (A15-151, PAA, Ausztria) és antibiotikumot tartalmazó tápoldattal mostuk át a mintákat.

3.3. *In vitro* tenyésztés

A tápfolyadék cseréje után, a zsírszövet mennyiségétől függően 1 vagy 2 db 75 cm²-es műanyag edényben szélesztettük szét az őssejteket tartalmazó szuszpenziókat. A tenyészeteket 5% CO₂ koncentráción, 37°C-os termosztátba helyeztük, és 48-72 óra inkubációt követően PBS-sel lemostuk, ennek köszönhetően szabadultunk meg a vörösvérsejtektől és a le nem tapadt törmelékektől.

Megközelítőleg 1 hét után a sejtenyészetek elérték a mikroszkóppal látható 80-90%-os konfluenciát, a sejtek fibroblaszt jellegű morfológiát mutattak.

A passzálásnak nevezett, ezt követő folyamat során a sejtekről leöntöttük a tápfolyadékot, PBS-sel mostuk, hogy a maradék médiumot is eltávolítsuk, majd Tripszin-EDTA (211-002, PAA, Ausztria) emésztő folyadékot pipettáztunk a sejtekre. A flaskákat visszahelyeztük a termosztátba, és 10 perc múlva mikroszkóppal megvizsgáltuk, hogy sikerült-e felszedni a plasztik-adherens sejteket. A folyamatot a flaska gyengéd kézi ütögetésével segítettük. Amennyiben a sejtek elváltak a flaska aljáról, akkor mikroszkópos képük fibroblaszthoz hasonló alak helyett már lekerekedett morfológiát mutatott. FBS-t tartalmazó tápfolyadékot

pipettáztunk a sejtekre, hogy az emésztés folyamatát leállítsuk, mivel a FBS olyan proteáz inhibitorokat tartalmaz, amelyek gátolják a tripszin működését.

A tenyésztő edények tartalmát centrifugacsőbe pipettáztuk, centrifugáltuk, a felülúszó leszívása után a sejteket ismét DMEM-t, FBS-t és antibiotikumot tartalmazó médiumban felfuszpendáltuk, és Bürker-kamra segítségével megszámoltuk. A passzálás folyamatát addig ismételtük, míg a tenyészetünk a szeneszcencia jeleit nem mutatta és tovább már nem tudtuk *in vivo* fenntartani. Egy edénybe 5000 sejt/cm^2 sűrűségben helyeztük el a sejteket.

Az első passzálást követően a sejteket 10 percig jégen hűtöttük, majd a szintén jéghideg fagyasztó médiumban felfuszpendáltuk, cryocsövekbe pipettáztuk, csövenként 1 ml-t, 1×10^6 /ml koncentrációban. -80°C -on fagyasztottuk izopropilént tartalmazó fagyasztó dobozban, majd nitrogénes tartályba helyeztük további felhasználásig.

A megfelelő sejtenyésztési feltételek kidolgozása érdekében vizsgáltuk a passzálások során a bFGF hatását a populáció megkettőződésének számításával. 1 ng/ml koncentrációjú bFGF-ral (13256-029, Miltenyi Biotec, Franciaország) egészítettük ki a DMEM-es tápoldatot.

A populáció megkettőződésére a következő formulát használtuk: $pd = \ln(N_f/N_i) \ln 2$, ahol N_f az egy passzálás során nyert sejtszám, N_i a kiindulási sejtszám, \ln a természetes alapú logaritmus. A populáció megkettőződési idejét pedig a $pdt = CT/pd$ képlettel számoltuk, ahol CT a kiültetés és a passzálás között eltelt időt jelöli.

3.4. MSC-k morfológiai és sejtfelületi antigének jelenléte szerinti karakterizálása

3.4.1. CD markerek kifejeződése kutya MSC-ken

Egy fiatal és egy idős kutya zsírszövetéből szeparált MSC-k második passzálást követően 1×10^5 sejtet helyeztünk egy FACS csőbe, 1 ml puffer oldattal feltöltöttük, 10 percig $300 \times g$ -n centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után 50 μl CD90-PE (130-097-932, Miltenyi Biotec, Franciaország) /mCD44-PE (553134, BD Pharmingen, Ausztria) /hCD105-PE (130-094-941, Miltenyi Biotec, Franciaország) /hCD73-PE (130-095-182, Miltenyi Biotec, Franciaország) antitestet (Miltenyi Biotec, Franciaország) és 50 μl puffer oldatot adtunk a sejtekhez. Harminc percig hűtőben, sötétben inkubáltuk, majd 1 ml puffer oldattal átmostuk a szuszpenziót. Ismét centrifugáltuk a mintákat, a felülúszó eltávolítása után 200 μl pufferben felvéve, a mérésig hűtőben tároltuk a megjelölt sejteket. A puffer oldat a következő összetevőkből állt: PBS, 0,5% BSA (9048-46-8, Sigma, Kína), 2 mM EDTA.

A méréseket áramlási citométer segítségével végeztük el. Izotípus kontrollként a humán antitestek esetében mlgG1-PE antitestet, az egér CD44-PE antitestnél pedig patkány IgG2a-PE antitestet használtunk.

3.5. Differenciálódás 3 irányba

3.5.1. Zsír-irányú differenciáltatás

A megtisztított MSC-eket 24-es plate-re helyeztük 40 000 sejt/lyuk arányban. 100%-os konfluenciánál a tenyésztő tápot differenciálódást indukálóra váltottuk, a sejteket 2 hétig 5% CO₂ koncentráción, 37°C-os termosztátban inkubáltuk, a több összetevőből álló médiumot hetente kétszer cseréltük:

- DMEM
- 10% FBS
- 0,1 µM dexametazon (D49-02, Sigma, Kína)
- 0,5 mM izobutil-metil-xantin
- 10 µg/m inzulin
- penicillin/sztreptomycin (DE17-602E, Lonza, Belgium)

3.5.2. Porc-irányú differenciáltatás

A porcosítás során $2,5 \times 10^5$ sejtet helyeztünk 96 lyukú U-alakú nem letapadó plate-be, 200 µl differenciáltató médium került egy lyukba. A chondrogenezist indukáló tápfolyadék, amit szintén három hétig hetente kétszer cseréltünk, a következő összetevőket tartalmazta:

- 1 ml DMEM/gentamicin
- 10 ng/ml TGFb-3 (100-21C, Peprotech, Anglia)
- 100 nM dexametazon
- 50 µ/ml aszkorbinsav (49752, Sigma, Németország)
- 40 µg/ml prolin (PO380, Sigma, Kína)
- 10 µl ITS (51300-044, Gibco, Németország)

3.5.3. Csont-irányú differenciáltatás

A 3. passzálást követően a sejteket ismét felszedtük, centrifugáltuk, majd 24 lyukú plate-re helyeztük, 40 000 sejt került egy lyukba. Az immuncitokémiai festéshez 96 lyukú plate-et

használtunk, lyukanként 3 000 sejtet helyeztünk el. A csontosodást elősegítő tápfolyadékot három héti kétszer cseréltük. A DMEM steril tápfolyadékot az alábbi összetevőkkel egészítettük ki:

- 10% FBS
- 0,1 mM 2-merkaptoetanol (ES-007-E, Millipore, USA)
- 10 mM β -glicerofoszfát (G9422, Sigma, USA)
- 50 μ g/ml aszkorbinsav (A-4544, Sigma, Kína)
- 100 nM dexametazon
- penicillin/sztreptomycin

3.6. Zsír-, porc-, csont-irányú differenciálódás bizonyítása

3.6.1. Zsír-irányú differenciálódás bizonyítása

A zsír-irányú differenciálódást indukáló tápfolyadékot 2 hét inkubáció után pipettával leszívtuk a sejtenyészetekről, 4%-os paraformaldehid (1581274, Sigma, Kína)/PBS-sel fixáltuk, majd PBS-sel átmostuk a sejteket. 0,2 %-os Oil Red O festékkel (1320-06-5, Sigma, Kína) 10 percig festettük, ezután ismételt PBS-es öblítés következett. 10 percig metilénkék oldattal festettük és újra PBS-sel átmostuk a sejteket. A liláskékre festődő sejtekben a zsírcseppek vörös színűre festődtek.

3.6.2. Porc-irányú differenciálódás bizonyítása

Porc-irányba differenciáltatott kutya AD-MSK kompakt csomókat képez. Fagyasztva metszett szeletének festése dimetil-metilénkéssel metakromáziát mutat.

3 hét tenyésztés után pipetta segítségével leszívtuk a differenciáló tápoldatot, 4%-os paraformaldehiddel fixáltuk, majd PBS-sel átmostuk a sejteket. A mintákat lefagyasztottuk, kriosztáttal metszettük, dimetil-metilénkéssel 10 percig festettük, majd ecetsavval lemostuk. A dimetil-metilénkék festéket 0,1%-os koncentrációban 3%-os ecetsavban oldva használtuk.

3.6.3. Csont-irányú differenciálódás bizonyítása

A csontképzés lépéseinek nyomon követésére, valamint a csontosodás mértékének meghatározására szolgáló méréseket a differenciálódás kezdetekor, 1 hét után és a kísérlet lezárásakor végeztük el. A kalcium-felhalmozódást Alizarin vörös festékkel detektáltuk. Ezen felül a sejteken immuncitokémiai jelölést végeztünk a RUNX2 fehérjére, amely a

csontosodási folyamatok beindításának fő szabályozó faktora, továbbá hisztokémiai módszerrel, BCIP/NBT reagenssel mutattuk ki az ALP enzim aktivitását.

3.6.3.1. Immuncitokémiai jelölés (RUNX2)

RUNX2 a csont irányú differenciálódás egyik kulcsfaktora. A RUNX2 fehérje jelenlétét a differenciálódás első napján, az első héten és a harmadik hét végén vizsgáltuk immuncitokémiai módszerrel.

Első lépésként fixáltuk a sejteket 4% PFA/PBS-sel, ami 10 percig állt rajta, majd kétszer ismét átmostuk a sejtenyészeteket PBS-sel. Ezt követően permeabilizáló és blokkoló oldatot helyeztünk rá: 1%-os BSA/PBS-be 4% kecske szérum és 0,1% Triton-X.

A blokkoló oldatban oldottuk az anti-h/mRUNX2/CBFA1 Purified Rat Monoclonal IgG_{2B} antitestet (R&D, MAB 2006) 50x hígításban.

Eppendorf fugán 5000 xg fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk, hogy ne legyen szemcsés a festés. A 96 lyukú plate egy lyukába 40-50 µl-t pipettáztunk óvatosan. Éjszakára 4 C°-on hagytuk állni. Következő nap 1 %-os BSA/ PBS-sel mostuk 2x10 percig billegtetve, szobahőmérsékleten. A blokkolóban oldottuk az Alexa Fluor 568, goat anti-rat IgG (H+L), (A11077, Invitrogen, Németország) antitestet 250x-es hígításban. Eppendorf centrifugán 5000 xg fordulatszámon 1 percig centrifugáltuk, hogy ne legyen szemcsés. Egy órán át szobahőmérsékleten, fénytől védve, állni hagytuk. Az utolsó 10 percre DAPI-t tettünk bele (D8417-1MG, Sigma, Kína) 10 000x hígításban, mely a sejtmagokat fluoreszcensen festette meg. Ezután újra mosás következett: 0,5 %-os BSA/ PBS-sel mostuk 2x10 percig billegtetve, szobahőmérsékleten. Végül PBS-t tettünk rá.

3.6.3.2. ALP aktivitás kimutatása

3.6.3.2.1. ALP hisztokémia

Az ALP hisztokémia során a következő összetevőket oldottuk 450 ml desztillált vízben:

- 6,05 g TRIS (100 mM)
- 2,9 NaCl (100 mM)
- 0,51 g MgCl₂ (5 mM)

A pH-t 9,5-re állítottuk be 1 N-os HCl-dal, utána 500 ml-re feltöltöttük az oldatot. A kész puffer oldatba 100x-ra hígítva kerültek bele a szubsztrátok:

- 2% BCIP 20 mg/1 ml DMSO
- 3% NBT 30 mg/1 ml 70%-os DMSO (700 µl DMSO + 300 µl H₂O)

Az oldatot 10 percig, 37°C-on a sejteken hagytuk, majd PBS-sel átmostuk a tenyészeteket.

3.6.3.2.2. ALP enzimes mérése

70 ml desztillált vízbe 0,605 g TRIS bázist (T-1378, Sigma, Kína) és 0,876 g NaCl-t (30423, Lach-Ner, Csehország) raktunk. A pH-t 9,5-re állítottuk be 1 N HCl-dal, az így kapott oldatot 100 ml-ig feltöltöttük desztillált vízzel. Az oldat kettéosztása után az egyik feléből 101,5 mg MgCl₂ x 6 H₂O (13007-1-30, Reanal, Magyarország) hozzáadásával készítettük el az ALP puffert, a másik feléből pedig 500 µl 10%-os Triton X-100 hozzáadásával a lízis puffert.

A sejteket a 24 lyukú plate-ből 100 µl lízis pufferrel a pipettahegy segítségével felkapartuk, háromszor 5 másodpercig jégben szonikáltuk, majd Eppendorf centrifugában 10 percig 12000 xg fordulatszámon centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót használtuk a továbbiakban, valamint a Lowry módszer során.

96 lyukú plate-be mértük a következőket: 1. lyukba 10 µl minta + 90 µl lízis puffer + 100 µl ALP puffer + 5 µl Sigma 104 20x-os törzsoldat (1,36 ml ALP pufferben feloldott 71,5 mg Sigma 104 foszfátáz szubsztrát (121H-50301, Sigma, Kína)), 2. lyukba 20 µl minta + 80 µl lízis puffer + 100 µl ALP puffer + 5 µl Sigma 104 20x-os törzsoldat. Vak lyukat is készítettünk: 100 µl lízis puffer+ 100 µl ALP puffer + 5 µl Sigma 104 20x-os törzsoldat. 37°C-os termosztátban egy órán át inkubáltuk a mintákat, majd minden lyukba 50 µl 1 N NaOH-ot tettünk. A mérést Victor X3 Multilabel Reader-rel (Perkin Elemér) 405 nm hullámhosszúságon végeztük.

A Lowry módszernél használt reagensek: Folin A = 5 g Na₂CO₃ x 10 H₂O + 0,1 N NaOH (100 ml), Folin C = 1. 1 ml K-Na-tartarát (1,49 g 100 ml desztillált vízben oldva), 2. 1 ml CuSO₄ x 5 H₂O + 98 ml Folin A. 10 µl mintához 1,5 ml Folin C-t adtunk, majd azonnal vortexeltük, 10 percig szobahőmérsékleten pihentettük. A fenol reagenst (0,1 N NaOH) (F9252, Sigma, Kína) 1:1 hígítottuk desztillált vízzel, ebből 10 perc elteltével 150 µl-t beletettünk minden csőbe, ezután vortexeltünk. A mintákat szobahőmérsékleten 40 percig inkubáltuk, utána fotométeren 660 nm-en fehérjemérést végeztünk. Kalibrációs görbét 1 mg/ml standard BSA-ból készítettünk. (A kapott abszorbancia értékekből kivontuk a vak minta értékét, és normalizáltuk az adatokat összfehérjére.)

3.6.3.3. Alizarin vörös festési eljárás

Az Alizarin vörös festés első lépéseként PBS-sel átmostuk, 4%-os paraformaldehid oldattal fixáltuk, majd PBS-sel ismét átöblítettük a sejteket. Két percig a sejteken hagytuk az Alizarin vörös festéket (A-3757, Sigma, Kína). A festék előállítása során 2 g Alizarin Red S-t 100 ml desztillált vízben oldottunk fel, a pH-t 10%-os NH_4OH hozzáadásával 4,3-ra állítottuk be.

A két perc leteltével leszívtuk pipettával a felesleges festék oldatot a sejtenyészetről. PBS-sel történő többszöri mosás után mikroszkóppal megvizsgáltuk a tenyészetet, a kalcium lerakódás narancs-vörös színben festődött meg.

3.6.3.4. Kalcium kiválás mérése

A sejteket a 24 lyukú plate-ről 100 μl 0,5 N HCl-dal szedték fel. A méréshez Calcium (CPC) liquicolor kit-et (0150-250, Stanbio, USA) használtunk. Tíz percig 12000 xg fordulatszámon centrifugáltuk a mintát, majd a felülúszót egy tiszta csőbe pipettáztuk át. A kit A és B reagensét egyenlő arányban összemértük és 500 μl -t adtunk 5 μl mintához. Egy kalibrációs sort is készítettünk a kitben található 10 mg/dl standardból. Mikrotiter plate egy lyukába 200 μl -t mértünk be a mintákból és a kalibrációs sor mintáiból. A mérést Victor X3 Multilabel Reader-rel (Perkin Elmer) 540 nm-en végeztük.

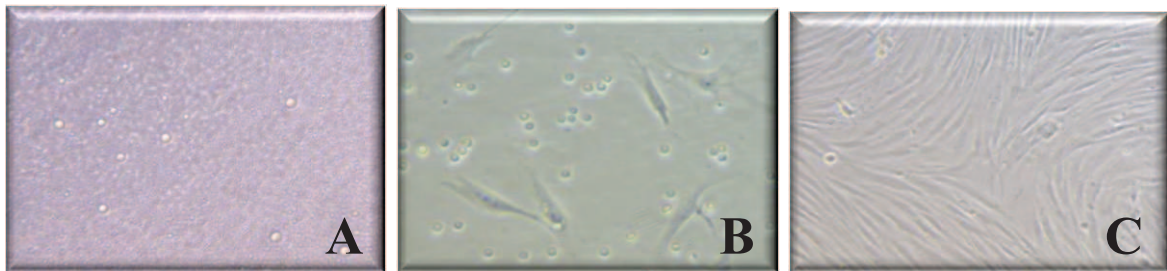
3.6.4. Mikroszkópos vizsgálatok

A fénymikroszkópos és fluoreszcens mikroszkópos vizsgálatokat IX51 INVERTED MICROSCOPE (Olympus) mikroszkóppal végeztük, illetve SPOT RT3TM kamerával rögzítettük a felvételeket.

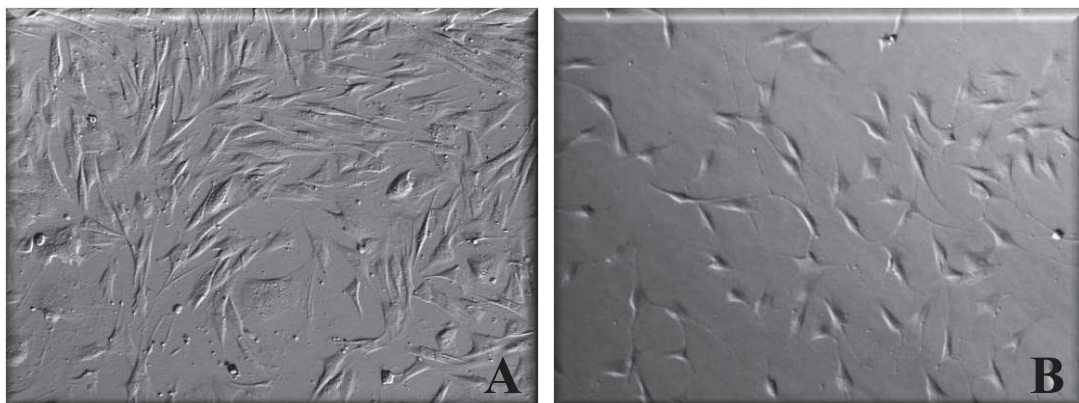
4. Eredmények

4.1. Zsírszövetből szeparált MSC-k *in vitro* tenyésztése

Mind a fiatal, mind az idősebb kutyákból sikerült MSC-eket izolálnunk, *in vitro* szaporítanunk. 10% FBS-sel és bázikus fibroblaszt növekedési faktorral (bFGF) kiegészített DMEM-ben az idősebb kutya MSC-k is hasonlóan jól szaporodtak, mint a fiatalabb állatokból kinyertek, 1 hét tenyésztés után elérték a 80-90%-os konfluenciát, és fibroblaszt jellegű morfológiát mutattak (5. ábra; 6. ábra).

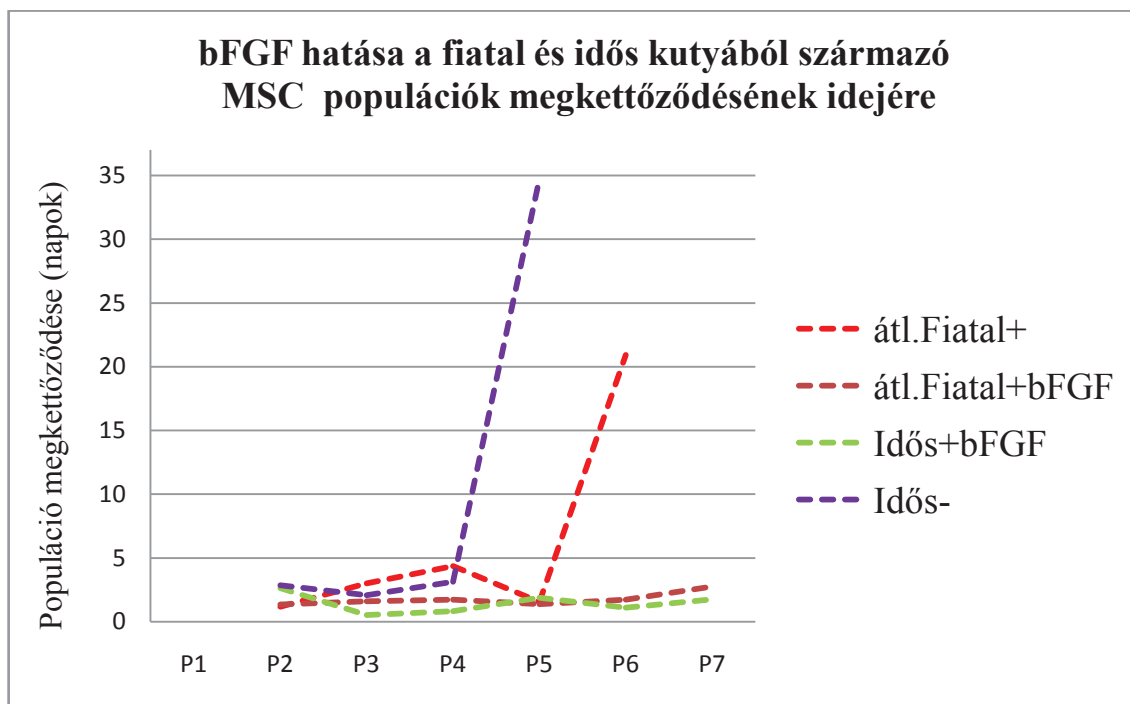


5. ábra Kutya zsírszövetéből származó MSC-k szeparálás (A), lemosás utáni képe (48 óra) (B), passzálása 1 hét után (C).



6. ábra Fibroblaszt-szerű őssejtek fiatal (A) és idős (B) kutya zsírszövetéből.

A populáció megkettőződésének ideje a passzálások során egyre növekszik mind a fiatal, mind az öreg állatból kivett MSC-k esetében. A sejtek növekedése jelentősen lelassult, több esetben megállt a negyedik passzálásnál. Azonban a tenyésztőtáphoz adagolt bFGF –fel gyorsabb szaporodást figyeltünk meg és mind a fiatal, mind az öreg állatból származó MSC-k tovább fenntarthatóak voltak *in vitro* körülmények között (7. ábra).



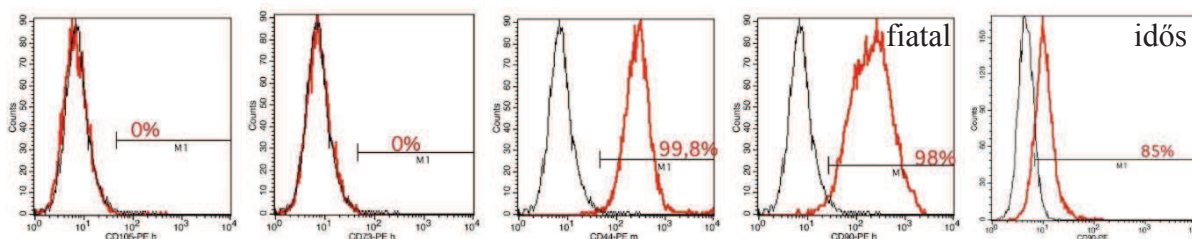
7. ábra bFGF hatása az MSC-k tenyésztése során.

4.2. MSC-k morfológiai és sejtfelületi antigének jelenléte szerinti karakterizálása

4.2.1. CD markerek kifejeződése kutya MSC-ken

Az áramlási citométerrel végzett mérések során, a hCD73-PE és hCD105-PE antitesttel történő jelölés negatív eredményt hozott. Ez nem jelenti azt, hogy ez a két sejtfelületi marker nincs rajta az MSC-ken, hanem azt feltételezzük, hogy a rendelkezésünkre álló humán antitestek nem voltak elég specifikusak a kutya MSC-kre.

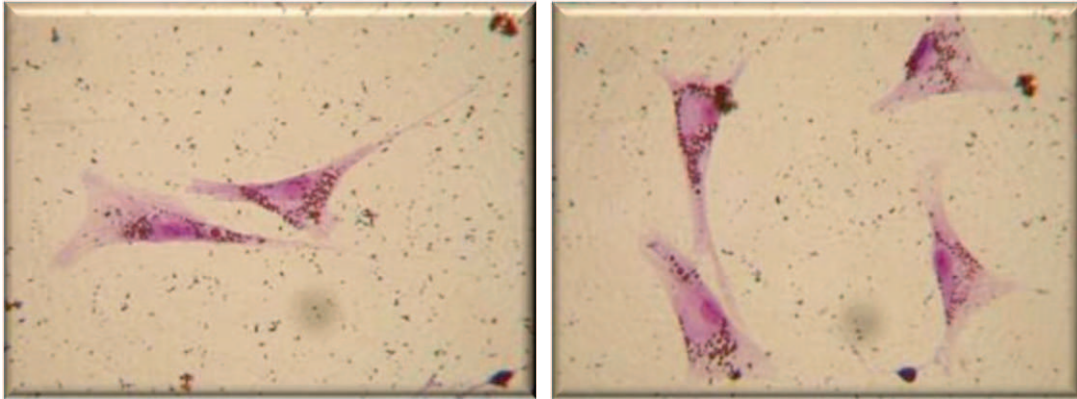
A mCD44-PE antitest 99,8%-ban hozott pozitív eredményt fiatal és idős kutyánál egyaránt. A hCD90-PE antitest a fiatal kutyákból származó MSC-ken 98%-ban volt pozitív, míg az idősebb kutyából származón csak 85%-ban (8. ábra).



8. ábra Az MSC-ken található sejtfelületi antigének.

4.3. Zsír-irányú differenciálódás bizonyítása

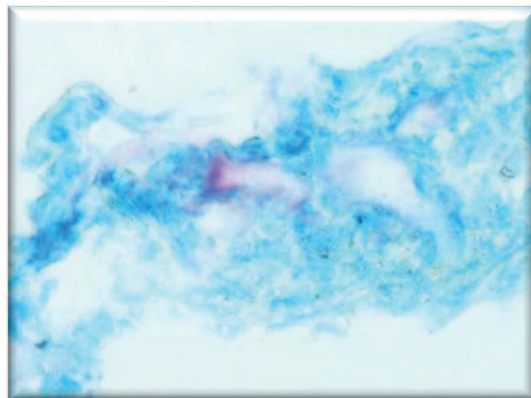
Két hét inkubációt követően Oil Red O festési eljárással mutattuk ki a sejtenyészetekben felhalmozódott zsír jelenlétét (**9. ábra**).



9. ábra Oil Red O festéssel piros cseppekben látható a zsírfelhalmozódás (400X): kutya MSC zsír irányú differenciáltatása.

4.4. Porc-irányú differenciáltatás bizonyítása

Sikeresen differenciáltattunk fiatal és idős kutya zsírszövetéből szeparált MSC-eket chondrogenesis irányába. Dimetil-metilénkékkel festett fagyasztva metszett mintán metakromázia figyelhető meg (**10. ábra**).



10. ábra A rózsaszín festődés porcsejtek jelenlétére utal: kutya MSC (400X).

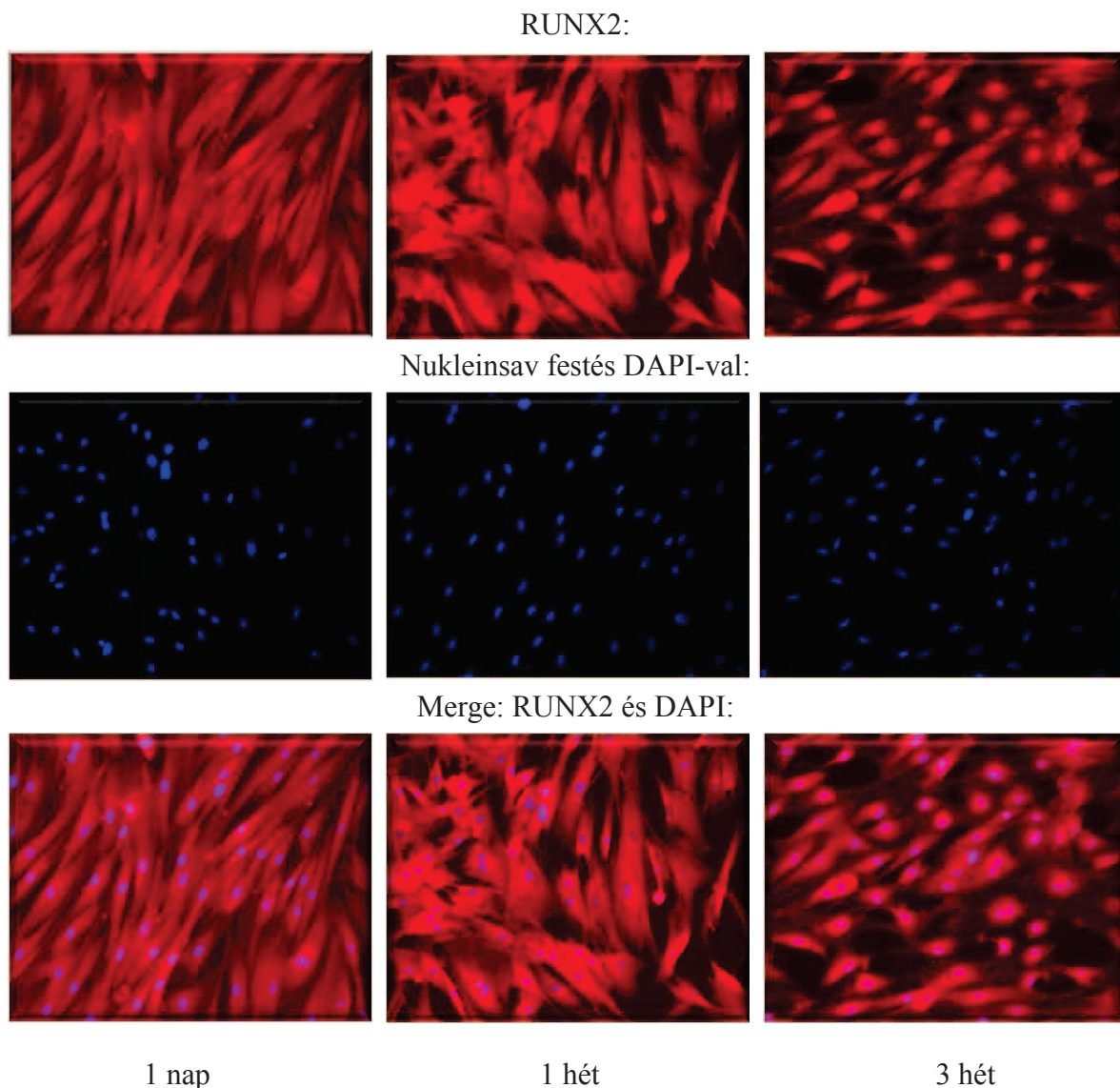
4.5. Csont-irányú differenciálódás bizonyítása

Csont-irányba sikerült mind a fiatal, mind az idős állatok MSC sejtjeit differenciáltatnunk, azonban a fiatal állatok esetében robusztusabb kalcium kiválást és ALP aktivitást észleltünk. A csont-irányú differenciálódás beindulásának indikátoraként alkalmazott RUNX2

szignálfehérje 1 hét differenciáltatás után még nem, csupán 3 hét után mutatott specifikus, sejtmagi festődést.

4.5.1. Immuncitokémiai jelölés

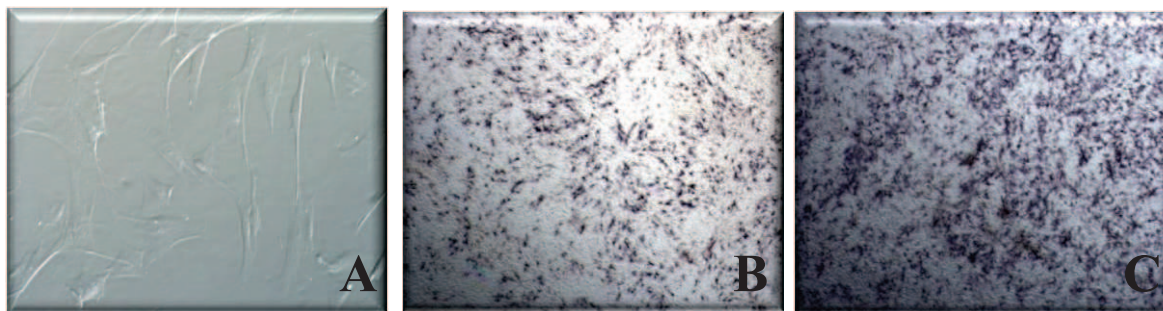
A differenciáltatás során a RUNX2 sejten belüli lokalizációjában változás történt: míg kezdetben a citoplazmában volt megfigyelhető, a 3. hét végére főként sejtmagi lokalizációt észleltünk (**11. ábra**).



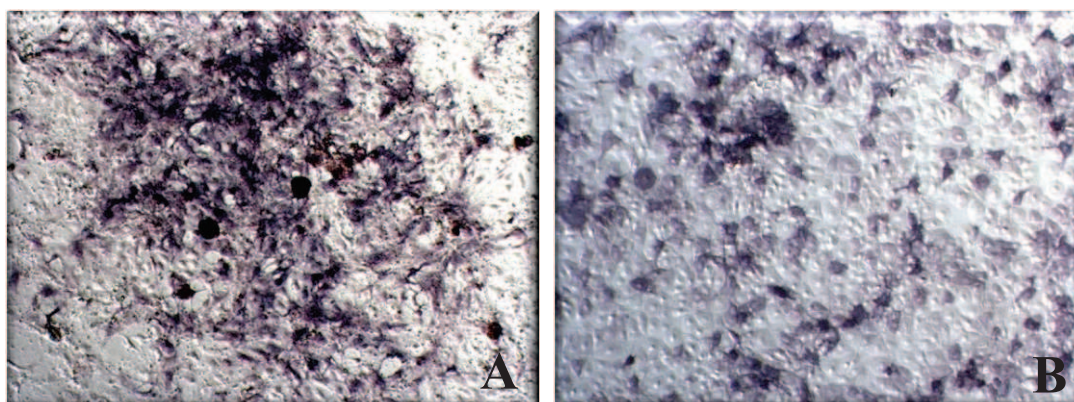
11. ábra Immuncitokémiai jelölés: RUNX2.

4.5.2. ALP aktivitás mérése

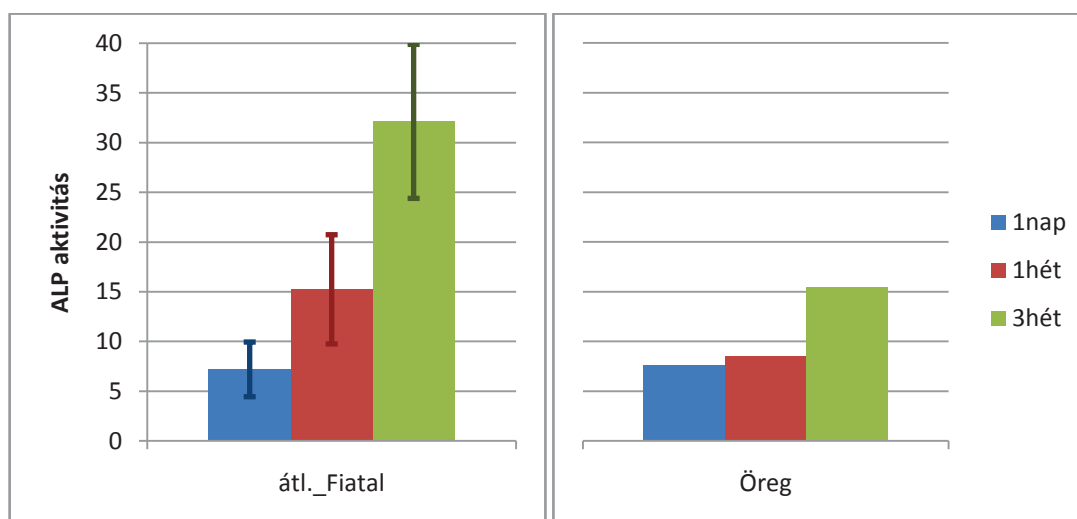
Fiatal kutya esetében nagyobb ALP aktivitást mértünk (**12. ábra**; **13. ábra**; **14. ábra**).



12. ábra Kutya zsírszövetéből szeparált, csont-irányú differenciáltatáson keresztül ment MSC-k ALP aktivitása 1 nap (A), 1 hét (B) és 3 hét (C) után.



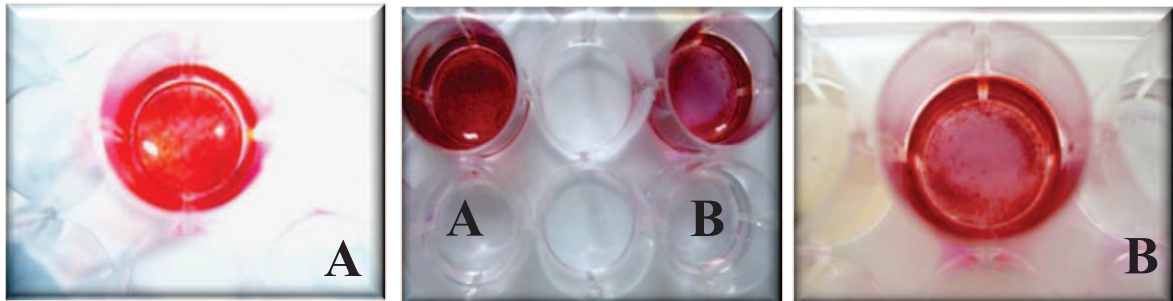
13. ábra ALP aktivitás kimutatása: fiatal (A) és idős (B) kutya (100X).



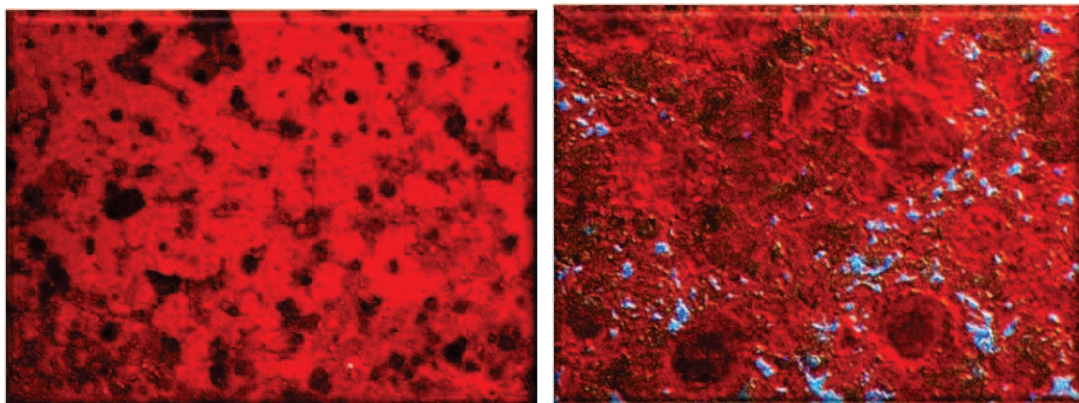
14. ábra ALP aktivitás enzimes mérése: fiatal és idős kutyából származó MSC-k esetében (összefehérjére normalizált ALP aktivitás).

4.5.3. Alizarin vörös festés

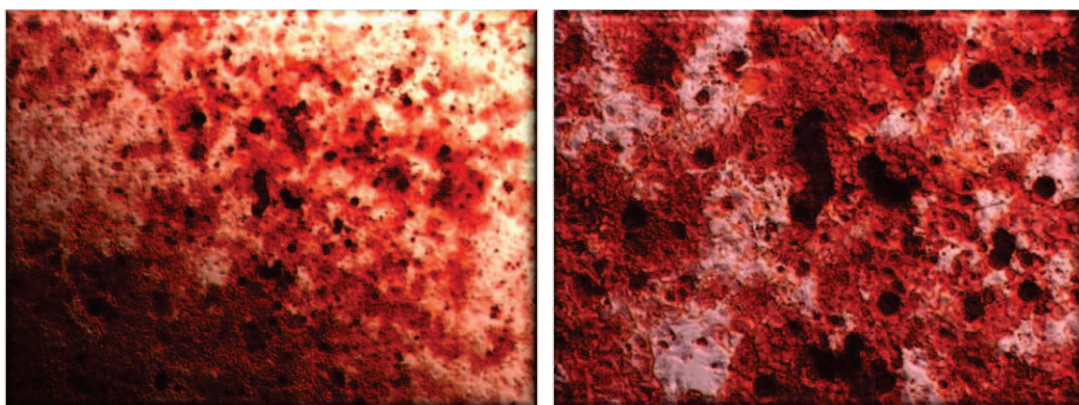
Fiatal Beagle kutyából származó MSC-k nagyobb mértékű kalcium kiválást mutatottak az idősebb kutyából származó MSC-vel szemben (15. ábra; 16. ábra; 17. ábra; 18. ábra).



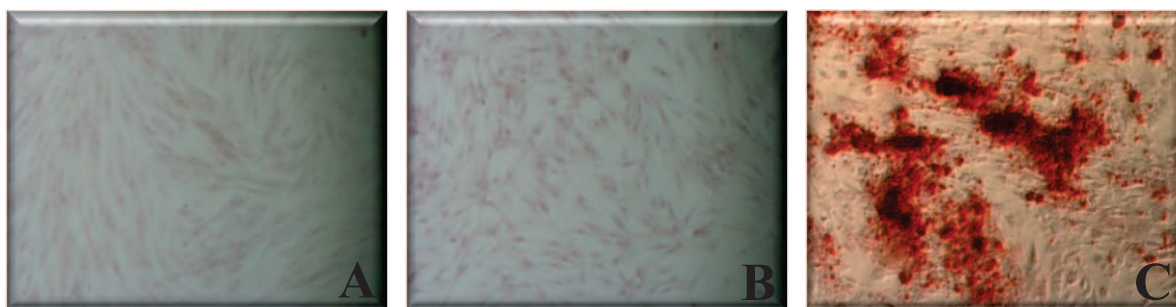
15. ábra 24 lyukú plate-ben fiatal (A) és idős (B) kutyából származó MSC-k Alizarin vörös festése.



16. ábra Alizarin vörös festés: fiatal kutyából származó minta (40X és 100X).



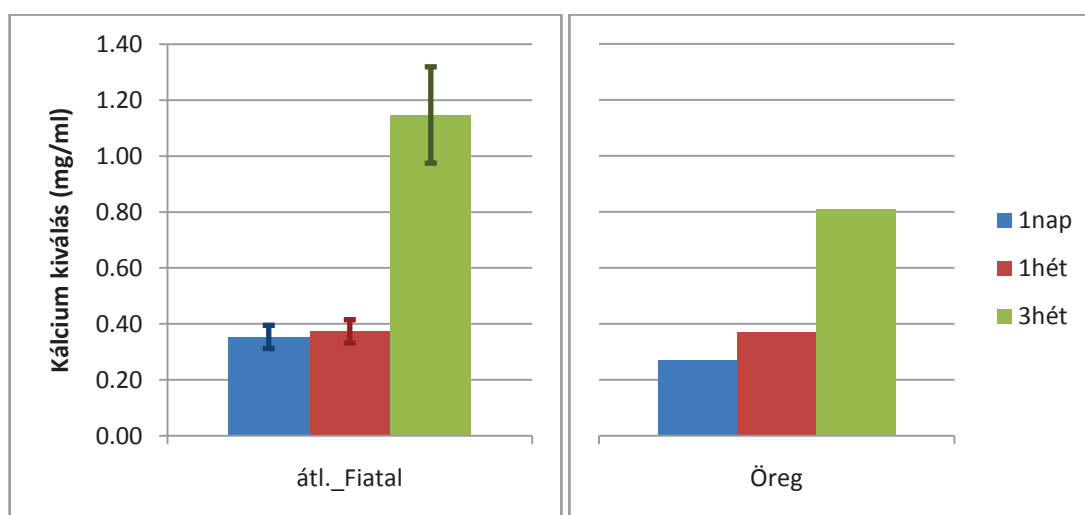
17. ábra Alizarin vörös festés: idős kutyából származó minta (40X és 100X).



18. ábra Fiatal kutya zsírszövetéből származó MSC tenyészet Alizarin vörös festése 1 nap (A), 1 hét (B), 3 hét (C) elteltével.

4.5.4. Kalcium kiválás mérése

A fiatal kutyák esetében erőteljesebb kalcium kiválást detektáltunk (**19. ábra**).



19. ábra Kalcium kiválás mérése: fiatal és idős kutyából származó MSC-k összehasonlítása.

5. Megbeszélés

Megfigyeléseink igazolták, hogy mind a fiatal, mind az idősebb állatok zsírszövege alkalmas MSC-k kinyerésére. A fiatal és idős állatokból kinyert sejtek egyaránt mutatták az irodalomban leírt morfológiát, sejtfelületi antigének közül kimutattuk a CD44 és CD90 meglétét, valamint az MSC-kre jellemző zsír-, porc- és csont- irányú differenciálódást.

A zsír-irányú differenciálódás bizonyítására használt Oil Red O festés a 14. napon mutatott jelentős zsírfelhalmozódás, a chondrogenézis során megjelenő porcsejtek jelenlétét dimetil-metilénkék festékkel 3 hét elteltével detektáltuk, mindez megegyezik az irodalmi adatokkal. A csont-irányú differenciálódás immuncitokémiai kimutatása során a RUNX2, ami a csontosodási folyamatok egyik fő transzkripciós faktora, kezdetben a citoplazmában, a 3. héten a sejtmagban lokalizálódott. Mindez egybe vág azzal a megfigyeléssel, hogy a kalcium kiválás szintén a 3. héten a legintenzívebb, amit az Alizarin vörös festési eljárással és a kalcium koncentráció mérésével is bizonyítottunk. Már az első héttől kezdve kifejezett ALP aktivitást észleltünk mind az enzimatis méréssel, mind a hisztokémiai eljárással, ami a harmadik hétre további növekedést mutatott.

A fiatal kutyák zsírszövetéből szeparált MSC-k nagyobb mértékű kalcium kiválást, és erőteljesebb ALP aktivitást mutattak az idős kutyából nyert MSC-vel összehasonlítva. Ugyanakkor az irodalmi adatok ellentmondásosak, valamint állatfajonként eltérőek: patkányok esetében a fiatal egyed jobb proliferációs, az idősebb egyed pedig nagyobb csontosodási képességgel rendelkezett; fiatal és idős emberekből származó MSC-k csontosodási potenciálja között egyes kutatócsoportok nem találtak különbséget, míg mások fiatalok és gyerekek MSC-i esetében erőteljesebb csontosodási hajlamot észleltek. Egy tanulmány szerint csontiány pótlásakor a kutyák életkora nem befolyásolta az autológ MSC-k csontosodásának mértékét.

Az általunk vizsgált három fiatal és egy öreg kutya esetében különbség mutatkozik a csontosodási képességben a fiatal kutyák előnyére, azonban ez a kisszámú minta miatt statisztikailag nem kiértékelhető. Eddigi eredményeink alapján az allogén transzplantáció lehetségesnek tűnik olyan kutyák esetében, akiknél a zsírszövet levétele korlátozott, vagy MSC-i korlátozott csontosodási kapacitással rendelkeznek. Kezdeti eredményeink megerősítése érdekében célunk, hogy a kísérletbe további kutyák bevonásával a mintavételek számát növeljük, illetve, hogy a már kísérletbe vont állatokból eltérő életkorokban is mintát vegyünk.

6. Összefoglalás

A multipotens tulajdonságokkal rendelkező mezenchimális őssejtek (MSC) valamennyi szervben megtalálhatóak, osztódásra, valamint zsír-, porc-, és csont-irányú differenciálódásra egyaránt képes, mezodermális eredetű sejtek. MSC-t számos differenciált szövettípusból izoláltak már: csontvelőből, zsírszövetből, és köldökzsinór Wharton kocsonyájából. Mivel a zsírszövet könnyen hozzáférhető, rendszerint nagy mennyiségben áll rendelkezésre, a humán és állatorvosi regeneratív orvoslás, illetve a szöveti helyreállító műtétek (pl. csont-, porcpótlás) egyik alternatív őssejt forrása lehet.

Céljaink között szerepelt kutyák zsíreredetű őssejt izolálásának, karakterizálásának, *in vitro* tenyésztésének és differenciálódásának módszertani kidolgozása és a lehetséges klinikai célú felhasználás bemutatása. Vizsgálataink során különböző korú Beagle kutyák *in vitro* osztódási és differenciálódási képességeit is összehasonlítottuk.

Beagle kutyák mellkasi bőr alatti régiójából steril műtéti beavatkozással gyűjtöttünk, alkalmanként 5-20 grammnyi zsírszövetet. A zsírszöveti mintákat feldaraboltuk, kollagenáz enzim emésztés után centrifugáltuk, majd a vegyes sejtüledéket tenyésztő flakákba helyeztük, és tápfolyadékban tenyésztettük. Amikor a letapadt, növekvő sejtek egységes fibroblaszt-szerű képet mutattak fénymikroszkópos vizsgálattal, a tápfolyadékot (10% borjúsavóval kiegészített DMEM táptalaj) csont-, és porc indukciós tápfolyadékokra cseréltük és ebben a közegben folytattuk a tenyésztést. A differenciálódás megkezdésekor, 1 és 3 héttel később ellenőriztük az oszteogenezist alizarin vörös festéssel (kálcium rögök kimutatása) és 5-bromo-4-kloro-3'-indolil-foszfát / kék nitro-tetrazolium reagenssel (alkalikus foszfatáz enzim aktivitás kimutatása). A porcosodás kimutatására dimetil-metilénkék festéket használtunk ugyanilyen időközökben.

A fiatal kutyákból származó őssejtek fokozott növekedési és differenciálódási tulajdonságokat mutattak az idősebb kutyákból nyert mintákhoz képest. Meggyőződésünk szerint a kutya zsírszöveti sejtekből előállított, *in vitro* differenciálódott vagy multipotens őssejtként *in vitro* tenyésztett sejtek, alkalmasak állatorvosi klinikai kipróbálásra. Módszerünk megfelelő modell lehet humán őssejt kutatások számára.

7. Summary

Isolation-, characterisation-, *in vitro* cultivation and differentiation of adipose tissue originated stem cells in dogs – preliminary results.

Mesenchymal stem cells (MSCs) also called as multipotent adult stem cells are present in almost all organs and tissues in dogs as well. MSCs are self-renewing, can differentiate toward adipogenic, osteogenic and chondrogenic lineages. The most available tissue sources of MSCs include the bone marrow, the adipose tissue, and the Wharton's jelly of the umbilical cord. Regenerative medicine both in the human and veterinary fields often use adipose tissue originated stem cells for bone and cartilage defect replacements.

Aims of our studies were to establish methods for MSCs isolation, characterisation and differentiation and to prove their therapeutical potentials for the veterinary use. Furthermore we compared the *in vitro* growing and differentiating abilities of MSCs originated from dogs at different age.

Five to 20 gramm adipose tissue (AT) samples were collected from subcutaneous fat depots from the thoracic region of Beagle dogs using standard sterile surgical procedures. The AT was cut into small pieces, digested by collagenase enzyme, and separated the fat from the mixed population cell pellet by centrifugation. Only the cells adhered the bottom of culture flasks, passed further in Dulbecco modified Eagle's medium (DMEM) supplemented with 10% Fetal Bovine Serum (FBS). The culture medium was replaced with osteo-inductive and chondro-inductive mediums, when the cells showed homogenous fibroblast-like morphology under light microscope. At the start, one and three weeks later the osteogenesis was detected by Alizarin red staining (calcium deposits) and 5-bromo-4-chloro-3'-indolyl phosphate / nitro blue tetrazolium test (BCIP/NBT, alkaline phosphatase production) while the chondrogenesis was tested by dimethyl-methylblue staining.

cAD-MSCs originated from young dogs show faster multiplication *in vitro* before and after induction of osteo- and chondrogenesis. We strongly believe that canine adipose tissue is an available source of MSCs also in dogs and these cells with or without *in vitro* differentiation theoretically available for veterinary regenerative medicine. The canine model could be a useful tool for human stem cell research.

8. Irodalomjegyzék

1. ZUK, P. A.: The Adipose-derived Stem Cell: Looking back and looking ahead. *Molecular Biology of the Cell*, 2010. 21. vol. p. 1783-1787.
2. DOMINICI, M., LE BLANC, K., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., KRAUSE, D. S., DEANS, R. J., KEATING, A., PROCKOP, D. J., HORWITZ, E. M.: Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*, 2006. 8. vol. 4. no. p. 315-317.
3. FRIEDENS, A. J., PETRAKOV, K. V., KUROLESO, A. I., FROLOVA, G. P.: Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation*, 1968. 6. vol. 6. no. p. 230–247.
4. HORWITZ, E. M., LE BLANC, K., DOMINICI, M., MUELLER, I., SLAPER-CORTENBACH, I., MARINI, F. C., DEANS, R.J., KRAUSE, D. S., KEATING, A.: Clarification of the nomenclature for MSC: the international society for cellular therapy position statement. *Cytotherapy*, 2005. 7. vol. 5. no. p. 393–395.
5. RADA, T., REIS, R. L., GOMES, M. E.: Adipose tissue-derived stem cells and their application in bone and cartilage tissue engineering. *Tissue Engineering Part B-Reviews*, 2009. 15. vol. 2. no. p. 113–125.
6. ZUK, P. A., ZHU, M., ASHJIAN, P., DE UGARTE, D. A., HUANG, J. I., MIZUNO, H., ALFONSO, Z. C., FRASER, J. K., BENHAIM, P., HEDRICK, M. H.: Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. *Molecular Biology of the Cell*, 2002. 13. vol. 12. no. p. 4279-4295.
7. KERN, S., EICHLER, H., STOEVE, J., KLUTER, H., BIEBACK, K.: Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. *Stem Cells*, 2006. 24. vol. 5. no. p. 1294–1301.
8. JANKOWSKI, R. J., DEASY, B. M., HUARD, J.: Muscle-derived stem cells. *Gene Therapy*, 2002. 9. vol. 10. no. p. 642–647.
9. GAGE, F. H., RAY, J., FISHER, L. J.: Isolation, characterization, and use of stem-cells from the CNS. *Annual Review of Neuroscience*, 1995. 18. vol. p. 159–192.
10. NÖTH, U., OSYCZKA, A.M., TULI, R., HICKOK, N. J., DANIELSON, K. G., TUAN, R. S.: Multilineage mesenchymal differentiation potential of human trabecular

- bone-derived cells. *Journal of Orthopaedic Research*, 2002. 20. vol. 5. no. p. 1060–1069.
11. NAKAHARA, H., GOLDBERG, V. M., CAPLAN, A. I.: Culture expanded human periosteal-derived cells exhibit osteochondral potential in vivo. *Journal of Orthopaedic Research*, 1991. 9. vol. 4. no. p. 465–476.
 12. SEO, B. M., MIURA, M., GRONTHOS, S., BARTOLD, P. M., BATOULI, S., BRAHIM, J., YOUNG, M., ROBEY, P. G., WANG, C. Y., SHI, S.: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet*, 2004. 364. vol. 9429. no. p. 149–155.
 13. GRONTHOS, S., MANKANI, M., BRAHIM, J., ROBEY, P. G., SHI, S.: Postnatal human dental pulp stem cells (DPSCs) in vitro and in vivo. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000. 97. vol. 25. no. p. 13625–13630.
 14. MIURA, M., GRONTHOS, S., ZHAO, M., LU, B., FISHER, L. W., ROBEY, P. G., SHI, S.: SHED—stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Journal of Dental Research*, 2002. 100. vol. 10. no. p. 5807-5812.
 15. LECHNER, A., HABENER, J. F.: Stem/progenitor cells derived from adult tissues: potential for the treatment of diabetes mellitus. *American Journal of Physiology-Endocrinology and Metabolism*, 2003. 284. vol. 2.no. p. E259–E266.
 16. BROOKE, G., COOK, M., BLAIR, C., HAN, R., HEAZLEWOOD, C., JONES, B., KAMBOURIS, M., KOLLAR, K., MCTAGGART, S., PELEKANOS, R., RICE, A., ROSSETTI, T., ATKINSON, K.: Therapeutic applications of mesenchymal stromal cells. *Seminars in Cell and Developmental Biology*, 2007. 18. vol. 6. no. p. 846-858.
 17. NEUPANE, M., CHANG, C. C., KIUPEL, M., YUZBASIYAN-GURKAN, V.: Isolation and characterization of canine adipose-derived mesenchymal stem cells. *Tissue Engineering*, 2008. 14. vol. 6. no. p. 1007-1015.
 18. TSUMANUMA, Y., IWATA, T., WASHIO, K., YOSHIDA, T., YAMADA, A., TAKAGI, R., OHNO, T., LIN, K., YAMATO, M., ISHIKAWA, I., OKANO, T., IZUMI, Y.: Comparison of different tissue-derived stem cell sheets for periodontal regeneration in a canine 1-wall defect model. *Biomaterials*, 2001. 32. vol. 25. no. p. 5819-5825.
 19. CUI, L., LIU, B., LIU, G., ZHANG, W., CEN, L., SUN, J., YIN, S., LIU, W., CAO, Y.: Repair of cranial bone defects with adipose derived stem cells and coral scaffold in a canine model. *Biomaterials*, 2007. 28. vol. p. 5477-5486.

20. KANG, B. J., RYU, H. H., PARK, S. S., KOYAMA, Y., KIKUCHI, M., WOO, H. M., KIM, W. H., KWEON, O. K.: Comparing the osteogenic potential of canine mesenchymal stem cells derived from adipose tissues, bone marrow, umbilical cord blood, and Wharton's jelly for treating bone defects. *Journal of Veterinary Science*, 2012. 13. vol. 3. no. p. 299-310.
21. UDEHIYA, R. K., AMARPAL, AITHAL, H. P., KINJAVDEKAR, P., PAWDE, A. M., RAJENDRA SINGH, R., SHARMA, G. T.: Comparison of autogenic and allogenic bone marrow derived mesenchymal stem cells for repair of segmental bone defects in rabbits. *Research in Veterinary Science*, 2013. 94. vol. 3. no. p. 743-752.
22. Li, H., Dai, K., Lou, J., et al. (2007). Bone regeneration by implantation of adipose-derived stromal cells expressing BMP-2. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 356, 836-842.
23. SHANG, Q., WANG, Z., LIU, W., SHI, Y., CUI, L., CAO, Y.: Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *The Journal of Craniofacial Surgery*, 2001. 12. vol. 6. no. p. 586–593.
24. RICHARDSON, L. E., DUDHIA, J., CLEGG, P., SMITH, R.: Stem cells in veterinary medicine – attempts at regenerating equine tendon after injury. *TRENDS in Biotechnology*, 2007. 25. vol. 9. no. p. 409-416.
25. URL: <http://www.vet-stem.com/horses.php> Letöltve: 2013.07.01.
26. BLACK, L. L., GAYNOR, J., ADAMS, C., DHUPA, S., SAMS, A. E., TAYLOR, R., HARMAN, S., GINGERICH, D. A., HARMAN, R.: Effect of intraarticular injection of autologous adipose-derived mesenchymal stem and regenerative cells on clinical signs of chronic osteoarthritis of the elbow joint in dogs. *Veterinary Therapeutics*, 2008. 9. vol. 3. no. p. 192-200.
27. RYU, H. H., KANG, B. J., PARK S. S., KIM, Y., SUNG, G. J., WOO, H. M., KIM, W. H., KWEON, O. K.: Comparison of mesenchymal stem cells derived from fat, bone marrow, Wharton's jelly, and umbilical cord blood for treating spinal cord injuries in dogs. *The Journal of Veterinary Medical Science*, 2012. 74. vol. 12. no. p. 1617-1630.
28. MEREDITH, C.M.: Adipose derived stem cell therapy in the treatment of canine degenerative joint disease secondary to conformational abnormalities. URL: https://www.vet-stem.com/uploads/casestudies/3154926_CanineCaseStudy-DegenerativeJointDisease.pdf Letöltve: 2013. 07.01.

29. ZOMORDIAN, E., ESLAMINEJAD, M. B.: Mesenchymal stem cells as a potent cell source for bone regeneration. *Stem Cell International*, 2012. 2012. vol. p. 1-9.
30. YUAN, J., CUI, L., ZHANG, W. J., LIU, W., CAO, Y.: Repair of canine mandibular bone defects with bone marrow stromal cells and porous β -tricalcium phosphate. *Biomaterials*, 2007. 28. vol. 6. no. p. 1005-1013.
31. LIU, G., ZHANG, Y., LIU, B., SUN, J., LI, W., CUI, L.: Bone regeneration in a canine cranial model using allogenic adipose derived stem cells and coral scaffold. *Biomaterials*, 2013. 34. vol. 11. no. p. 2655-2664.
32. MIZUNO, H.: Adipose-derived stem cells for tissue repair and regeneration: ten years of research and a literature review. *Journal of Nippon Medical School*, 2009. 76. vol. 2. no. p. 56-66.
33. BALOGH L., PÖSTÉNYI Z., HAASZ V., POLYÁK A., TÁTRAI P., NÉMET K., UHER F., THURÓCZY J., ANDOCS G., TOROK R., JÁNOKI G., JÁNOKI GY. A.: Isolation, identification, differentiation and radiolabelling of canine adipose tissue derived mesenchymal stem cells (cAD-MSC) - preliminary studies. *European Journal of Nuclear Medicine and Molecular Imaging*, 2011. 38. vol. 2. no. p. S339.
34. BALOGH L., HAÁSZ V., PÖSTÉNYI Z., POLYÁK A., NÉMET K., TÁTRAI P., UHER F., THURÓCZY J., JÁNOKI GY. A.: Comparison of canine and human adipose tissue derived mesenchymal stem cells (cAD-MSC) – isolation, identification, differentiation and radiolabelling. URL: <http://www.ivis.org/proceedings/iscfr/2012/9.pdf?LA=1> Letöltve: 2013.07.01.
35. GIMBLE, J., GUILAK, F.: Adipose-derived adult stem cells: isolation, characterization, and differentiation potential. *Cytotherapy*, 2003. 5. vol. 5. no. p. 362–369.
36. REQUICHA, J. F., VIEGAS, C. A., ALBUQUERQUE, C. M., AZEVEDO, J. M., REIS, R. L., GOMES, M. E.: Effect of anatomical origin and cell passage number on the stemness and osteogenic differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Stem Cell Reviews*, 2012. 8. vol. 4. no. p. 1211-1222.
37. TAKEMITSU, H., ZHAO, D., YAMAMOTO, I., HARADA, Y., MICHISHITA, M., ARAI, T.: Comparison of bone marrow and adipose tissue-derived canine mesenchymal stem cell. *BMC Veterinary Research*, 2012. 8. vol. 150. no. p. 1-9.
38. VIEIRA, N. M., BRANDALISE, V., ZUCCONI, E., SECCO, M., STRAUSS, B. E., ZATZ, M.: Isolation, characterization, and differentiation potential of canine adipose-derived stem cells. *Cell Transplantation*, 2010. 19. vol. p. 279-289.

39. JUNG, D. I., HA, J., KANG, B. T., KIM, J. W., QUAN, F. S., LEE, J. H., WOO, E. J., PARK, H. M.: A comparison of autologous and allogenic bone marrow-derived mesenchymal stem cell transplantation in canine spinal cord injury. *Journal of the Neurological Sciences*, 2009. 285. vol. 1-2. no. p. 67-77.
40. JIANG, S., HAIDER, H., AHMED, R. P., IDRIS, N. M., SALIM, A., ASHRAF, M.: Transcriptional profiling of young and old mesenchymal stem cells in response to oxygen deprivation and reparability of the infarcted myocardium. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2008. 44. vol. 3. no. p. 582-596.
41. ROOBROUCK, V. D., ULLOA-MONTOYA, F., VERFAILIE, C. M.: Self-renewal and differentiation capacity of young and aged stem cells. *Experimental Cell Research*, 2008. 314. vol. 9. no. p. 1937-1944.
42. FEHRER, C., LEPPERDINGER, G.: Mesenchymal stem cell aging. *Experimental Gerontology*, 2005. 40. vol. 12. no. p. 926-930.
43. KIM, M., KIM, C., CHOI, Y. S., KIM, M., PARK, C., SUH, Y.: Age-related alterations in mesenchymal stem cells related to shift in differentiation from osteogenic to adipogenic potential: Implication to age-associated bone diseases and defects. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2012. 133. vol. 5. no. p. 215-225.
44. MA, D., MA, Z., ZHANG, X., WANG, W., YANG, Z., ZHANG, M., WU, G., LU, W., DENG, Z., JIN, Y.: Effect of age and extrinsic microenvironment on the proliferation and osteogenic differentiation of rat dental pulp stem cells in vitro. *Basic Research-Biology*, 2009. 35. vol. 11. no. p. 1546-1553.
45. STENDERUP, K., JUSTESEN, J., CLAUSEN, C., KASSEM, M.: Aging is associated with decreased maximal life span and accelerated senescence of bone marrow stromal cells. *Bone*, 2003. 33. vol. 6. no. p. 919-926.
46. JUSTESEN, J., STENDERUP, K., ERIKSEN, E. F., KASSEM, M.: Maintenance of osteoblastic and adipocytic differentiation potential with age and osteoporosis in human marrow stromal cell cultures. *Calcified Tissue International*, 2002. 71. vol. 1. no. p. 36-44.
47. BAXTER, M. A., WYNN, R. F., JOWITT, S. N., WRAITH, J. E., FAIRBAIRN, L. J., BELLANTUONO, I.: Study of telomere length reveals rapid aging of human marrow stromal cells following in vitro expansion. *Stem Cells*, 2004. 22. vol. 5. no. p. 675-682.

48. STOLZING, A., JONES, E., MCGONAGLE, D., SCUTT, A.: Age-related changes in human bone marrow-derived mesenchymal stem cells: consequences for cell therapies. *Mechanisms of Ageing and Development*, 2008. 129. vol. 3. no. p. 163–173.
49. NASSIF, L., JURJUS, A., NASSAR, J., GHAFARI J., SABBAN, M. E.: Enhanced in vivo bone formation by bone marrow differentiated mesenchymal stem cells grown in chitosan scaffold. *Journal of Bioengineering and Biomedical Science*, 2012. 2. vol. 106. no. p. 1-6.
50. HAÁSZ V., PÖSTÉNYI Z., POLYÁK A., SZIGETI A., TÁTRAI P., NÉMET K., BALOGH L.: Osteogenic differentiation of canine adipose derived mesenchymal stem cells on chitosan scaffold. *Nuclear Medicine Review*, 2013. 16. vol. Supplement A.
51. KON, E., MURAGLIA, A., CORSI, A., BIANCO, P., MARCACCI, M., MARTIN, I., BOYDE, A., RUSPANTINI, I., CHISTOLINI, P., ROCCA, M., GIARDINO, R., CANCEDDA, R., QUARTO, R.: Autologous bone marrow stromal cells loaded onto porous hydroxyapatite ceramic accelerate bone repair in critical-size defects of sheep long bones. *Journal of Biomedical Materials Research*, 2000. 49. vol. 3. no. p. 328–337.
52. QUARTO, R., MASTROGIACOMO, M., CANCEDDA, R., KUTEPOV, S. M., MOUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KON, E., MARCACCI, M.: Repair of large bone defects with the use of autologous bone marrow stromal cells. *The New England Journal of Medicine*, 2001. 344. vol. p. 385–386.
53. MARCACCI, M., KON, K., MOUKHACHEV, V., LAVROUKOV, A., KUTEPOV, S., QUARTO, R., CANCEDDA, R., MASTROGIACOMO, M.: Stem cells associated with macroporous bioceramics for long bone repair: 6 to 7 year outcome of a pilot clinical study. *Tissue Engineering*, 2007.13. vol. 5. no. p. 947–955.
54. JANG, B-J., BYEON, Y-E., LIM, J-H., RYU, H-H., KIM, W. H., KOYAMA, Y., KIKUCHI, M., KANG, K-S., KWEON, O-K.: Implantation of canine umbilical cord blood-derived mesenchymal stem cells mixed with beta-tricalcium phosphate enhances osteogenesis in bone defect model dogs. *Journal of Veterinary Science*, 2008. 9. vol. 4. no. p. 387-393.
55. SHANG, Q., WANG, Z., LIU, W., SHI, Y., CUI, L., CAO, Y.: Tissue-engineered bone repair of sheep cranial defects with autologous bone marrow stromal cells. *Journal of Craniofacial Surgery*, 2001. 12. vol. p. 586–93.

9. Köszönetnyilvánítás

Szeretném megköszönni témavezetőimnek, dr. Thuróczy Juliannának, a Szülészeti és Szaporodásbiológiai Tanszék és Klinika egyetemi docensének, klinikavezetőjének, dr. Balogh Lajosnak, az OSSKI főigazgató-helyettes főorvosának és Kovács-Haász Veronikának, az OSSKI kutatójának segítségét, hasznos tanácsait és észrevételeit.

Valamint köszönöm Német Katalinnak (Creative Cell Kft.), Uher Ferencnek (OVSz) Tátrai Péternek (MTA-TTK), Szigeti Annának (MTA-TTK) és Matura Zsoltnak a technikai és szakmai segítségét.

A dolgozat alapjául szolgáló kísérleteket több hazai (KMOP-1.1.1-08/1-2008-0017 és KMOP-1.1.1-09/1-2009-0056, GOP-1.1.1-09/1-2010-0107) és nemzetközi pályázat (IAEA-CRP, EMIL NoE) támogatásával végeztük, amiért ezúton is köszönetünket fejezzük ki.

10. Függelék

DMEM-HG összetevői.

Összetevők:	Koncentráció mg/L
<i>Inorganikus sók:</i>	
CaCl ₂ x 2H ₂ O	200
Fe(NO ₃) ₃ x 9H ₂ O	0,1
KCl	400
MgSO ₄ x 4H ₂ O	96,67
NaCl	6400
NaHCO ₃	3700
NaH ₂ PO ₄ x H ₂ O	125
<i>Más összetevők:</i>	
Glükóz	4500
Fenol vörös Na	15
<i>Aminosavak:</i>	
L-arginin HCl	84
L-cisztin	48
L-alanin-L-glutamin	862
Glicin	30
L-hisztidin HCl x H ₂ O	42
L-izoleucin	105
L-leucin	105
L-lizin HCl	146
L-metionin	30
L-fenilalanin	66
L-szerin	42
L-treonin	95
L-triptofán	16
L-tirozin	104
L-valin	94
<i>Vitaminok:</i>	
D-Ca-pantotén	4
Kolin-klorid	4
Folsav	4
Myo-inozitol	7,2
Niacinamid	4
Piridoxin HCL	4
Riboflavin	0,4
Tiamin	4

