

The possibility of using
mesenchymal stem cells
for veterinary research
and medicine

Part 2

Own examinations

Kovács-Haász Veronika^{1*},
Dulka Bettina², Pöstényi Zita¹,
Polyák András¹, Matula Zsolt³,
Szigeti Anna³, Ana Ivanovska⁴,
Thuróczy Julianna², Uher Ferenc⁵,
Német Katalin⁶, Balogh Lajos¹

V. Kovács-Haász^{1*}, B. Dulka²,
Z. Pöstényi¹, A. Polyák¹,
Zs. Matula³, A. Szigeti³,
A. Ivanovska⁴, J. Thuróczy²,
F. Uher⁵, K. Német⁶, L. Balogh¹

1. OKK Országos Sugárbiológiai és
Sugáregészségügy Kutató
Igazgatóság
1221 Budapest, Anna u. 5.

* e-mail: haaszvera@yahoo.com

2. SZIE ÁOTK
Budapest

3. MTA TTK
Budapest

4. University of Parma
Olaszország

5. Országos Vérellátó Szolgálat
Budapest

6. Creative Cell Kft.
Budapest

A mesenchymalis őssejtek felhasználásának lehetőségei az állatorvosi kutatásokban és gyógyításban

II. rész

Saját vizsgálatok

ÖSSZEFOGLALÁS

A szerzők e közleménysorozat első felében ismertették a mesenchymalis őssejtek orvosi, de főként állatorvosi hasznosíthatóságáról szóló ismereteket. Ebben a részben bemutatják saját eredményeiket, amelyeket különböző korú kutyák zsírszövetéből izolált mesenchymalis őssejtek (MSC) *in vitro* szaporodási és csontirányú differenciáltatása során nyertek. Kísérleteikhez beagle kutyák bőralatti zsírszövetéből nyert MSC-készítményeket hoztak létre, amelyeket szaporítottak, a nemzetközi előírásoknak megfelelően jellemeztek, differenciáltattak, majd későbbi felhasználás céljára lefagyasztottak. Megfigyeléseik azt mutatták, hogy az idős és fiatal beagle kutyákból izolált MSC-k *in vitro* körülmények között jól szaporodnak, az MSC-kre jellemző morfológiát mutatják, valamint képesek zsír-, porc- és csontirányba is differenciálódni. A csontirányú differenciálódást az alkalikus foszfatáz enzimaktivitásával és a kalciumfelhalmozás mennyiségével mérték. A fiatalabb állatokból nyert sejtek differenciáltatása során mindkét meghatározott paraméter jelentősebb emelkedést mutatott, mint az idősebb kutyából származó MSC-k esetén.

SUMMARY

In the first part of the two-part article series the authors introduced the possibility of the application of mesenchymal stem cell (MSC) in the field of human and principally veterinary medicine. In this second article they present their own results of the *in vitro* proliferative capacity and osteogenic differentiation potential of adipose tissue MSCs isolated from dogs of different ages. MSC cells were isolated from canine subcutaneous adipose tissue which were proliferated, characterized according to the international standard, differentiated and frozen for following experiments. Their observation revealed that MSCs from old and young donor Beagle dogs proliferated properly *in vitro* and they were able to show the required fibroblast-like morphology and differentiated into adipo-, chondro- and osteogenic lineages. The osteogenic differentiation of MSCs was followed by the measurement of alkaline phosphatase activity and calcium accumulation. Both of the determined parameters were higher in the case of younger donors compared to the old donor dog.

KISÁLLAT

Munkacsoportunk e kétrészes közleménysorozat második részében fiatal és idős kutyákból származó mesenchymalis őssejtek csontirányú differenciáltatásával kapott saját eredményeiket foglalják össze.

ANYAG ÉS MÓDSZER

SEJT- ÉS SZÖVETMINTÁK

Zsírszövetminták gyűjtése és az MSC-k izolálása

Kísérleteinket beagle (testtömeg: 14 ± 2 kg) kutyákon végeztük az OKK Országos Sugárbiológiai és Sugáregészségügyi Kutató Igazgatóságon (OKK OSSKI). Az állatokat *ad libitum* víz és táp, normál, ill. 12 órás fény-sötét ciklusú standard (hőmérséklet: $22\text{--}24$ °C; páratartalom: $55 \pm 6\%$) körülmények között tartottuk az állatvédelmi és tartási szabályok betartásával (etikai engedély száma: 22.1/4200/003/2009).

A zsírshövetmintákat három 6 hónapos és egy 12 éves egészséges beagle kutya mellkasi területének bőr alatti zsírshövetéből nyertük steril sebészeti beavatkozás során. Az MSC-szeparálást már korábban ismertetett módon végeztük (75), kisebb módosításokkal.

A szövetdarabokat 1% penicillin/sztreptomocint (DE17-602E, Lonza) tartalmazó szobahőmérsékletű PBS-sel (BE17-516F, Lonza) 2–3 alkalommal átmostuk, míg a folyadék feltisztult. Ezt követően a zsírshövetet szikével és ollóval 1–2 mm-es darabokra feldaraboltuk és 1 mg/ml kollagenáz- (C 1-22, Biochrom) oldattal megemésztettük. Centrifugálás (5 perc, $300 \times g$) után eltávolítottuk a felülúszót, a visszamaradt sejtes üledéket, az ún. stromalis vascularis frakciót szobahőmérsékletű PBS-sel többször mostuk, majd DMEM-HG-t (32430, Gibco), 10% FBS-t (A15-151, PAA) és penicillin/sztreptomocint tartalmazó tápfolyadékban tenyésztettük őket 5% CO_2 -koncentráción, 37 °C-os termosztátban. 48–72 órás inkubációt követően PBS-sel lemostuk a tenyészetet, ekkor szabadultunk meg a vörösvérsejtektől, a le nem tapadt sejtektől és törmeléktől.

IN VITRO TENYÉSZTÉS OPTIMALIZÁLÁSA

A tenyésztőedény (4420200N, Orange Sci) aljára letapadt sejteket Tripszin-EDTA-val (L11-002, PAA) szedtük fel. A passzálások során egy flaskába 5000 sejt/ cm^2 sűrűségben helyeztük el a sejteket.

Az első passzálást követően a sejtek egy részét DMEM-HG/10%DMSO (A3672, Applichem)/ 20% FBS-t tartalmazó, jéghideg médiumban felfuszpendáltuk, $1 \times 10^6/\text{ml}$ koncentrációban és fagyasztócsövekbe (Z353353, Sigma-Aldrich) pipettáztuk. A csöveget izopropilént tartalmazó fagyasztódobozba (55710-200, Thermo Sci,) helyeztük -70 °C-ra, majd egy hét elteltével, további felhasználásig folyékony nitrogént tartalmazó tartályban tároltuk.

A megfelelő sejtenyésztési feltételek kidolgozása érdekében vizsgáltuk a passzálások során a bFGF hatását a populáció megkettőződésének számításával. 1 ng/ml koncentrációjú humán, bázikus fibroblast növekedési faktorral (bFGF) (130-093-837, Miltenyi Biotec) egészítettük ki a DMEM-HG (10% FBS/penicillin/sztreptomocin) tápoldatot.

A populáció megkettőződésére a következő formulát használtuk (48): $pd = \ln(N_f/N_i) / \ln 2$, ahol N_f az egy passzálás során nyert sejtszám, N_i a kiindulási sejtszám, \ln a természetes log. A populáció megkettőződési idejét pedig a $pdt = CT/pd$ képlettel számoltuk, ahol CT a kiültetés és a passzálás között eltelt időt jelöli.

MSC-K SEJTFELSZÍNI ANTIGÉNEK SZERINTI JELLEMZÉSE

A kutyák zsírshövetéből szeparált MSC-eket a második passzálást követően vizsgáltuk. 1×10^5 sejtet helyeztünk a FACS csőbe, 1 ml PBS-t, 0,5% BSA-t (9048-46-8, Sigma-

Az MSC-tenyészetekhez a zsírshövetmintákat beagle kutya mellkasi területének bőr alatti zsírshövetéből nyerték steril sebészeti beavatkozás során

Aldrich) és 2 mM EDTA-t tartalmazó pufferoldattal feltöltöttük, 10 percig 300× g-n centrifugáltuk. A felülúszó leöntése után 50 µl hCD90-PE (130-097-932, Miltenyi Biotec), mCD44-PE (553134, BD Pharmingen, Ausztria), hCD105-PE (130-094-941, Miltenyi Biotec) és hCD73-PE (130-095-182, Miltenyi Biotec) antitestet használtunk. 37 C°-os vízfürdőben harminc percig történő inkubálás után pufferes mosást alkalmaztunk.

A méréseket áramlási citométer (FACSCalibur, BD) segítségével végeztük el. Izo típuskontrollként a humán antitestek esetében mIgG1-PE antitestet (130-092-212, Miltenyi Biotec), a CD44-PE esetében patkány IgG2b-PE (553989 BD Pharmingen) egérelles antitestet használtunk.

DIFFERENCIÁLTATÁS ZSÍR-, PORC- ÉS CSONTIRÁNYBA

A kinyert őssejteket zsír-, porc-, ill. csontirányba differenciáltatták

ZSÍRIRÁNYÚ DIFFERENCIÁLTATÁS

Az MSC-eket a zsírszövetből történt kivonás után háromszor passzáltuk a differenciáltatás előtt, hogy homogén MSC-kultúrákat kapjunk, majd 24 lyukú sejtenyésző lemezre (5530300, Orange Sci.) helyeztünk 40 000 sejt/cm² sűrűségben. Amikor a sejtek elérték a 90–100%-os konfluenciát, differenciáltató médiumot helyeztük rájuk: DMEM-HG, 10% FBS, 10 µM inzulin (12643, Sigma-Aldrich), 0,1 µM dexametazon (D49-02, Sigma-Aldrich), 0,5 mM izobutil-metil-xantin (I5879, Sigma-Aldrich) és penicillin/sztreptomycin. 14 napig hetente 2× cseréltük a differenciáltató tápot a sejteken, majd 4% paraformaldehid- (PFA) (158127, Sigma-Aldrich)/PBS oldattal fixáltuk, és 0,2%-os Oil-red-O (O0625, Sigma-Aldrich) festéssel mutattuk ki a sejtekben felhalmozódó zsírcseppeket, a sejtek morfológiáját 1,9-dimetilén-metilénkéssel (341088, Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá.

PORCIRÁNYÚ DIFFERENCIÁLTATÁS

2,5 × 10⁵ sejtet 96 lyukú, U alakú, nem letapadó tenyésztőedényben (M8060, Sigma-A) centrifugálással „mikromass”-kultúrát hoztunk létre, és differenciáltató médiumot helyeztünk rá. A chondrogenezist indukáló tápfolyadékot három hétig hetente kétszer cseréltünk teljes egészében, ami a következő összetevőket tartalmazta: DMEM-HG, 10 ng/ml humán TGFβ-3 (100-36E, Peprotech), 100 nM dexametazon, 50 µg/ml aszkorbinsav (49752, Sigma-A), 40 µg/ml prolin (PO380, Sigma-A), 10 µl ITS (51300-044). Három hét tenyésztés után a mintákat kriosztáttal metsztük, 0,1%-os dimetilén-metilénkéssel 10 percig festettük.

CSONTIRÁNYÚ DIFFERENCIÁLTATÁS

A csontirányú differenciációt több módszerrel is bizonyítottuk. Az immuncitokémiai festéshez 96 lyukú sejtenyésző lemezt (M0187, Greiner) használtunk, lyukanként 3000 sejtet helyeztünk el. Az ALP kvalitatív és kvantitatív méréséhez, valamint a kalciumkiválás kvalitatív és kvantitatív méréséhez 24 lyukú sejtenyésző lemezt használtunk, amire 40000 sejt/cm² sűrűségben helyeztük ki a sejteket. A csontosodást elősegítő tápfolyadékot három hétig heti kétszer cseréltük. A DMEM-HG tápfolyadékot az alábbi összetevőkkel egészítettük ki: 10% FBS, 0,1 mM 2-merkaptóetanol (ES-007-E, Millipore), 10 mM β-glicerofoszfát (G9422, Sigma-Aldrich), 50 µg/ml aszkorbinsav, 100 nM dexametazon, penicillin/sztreptomycin. Hetente 2× cseréltük teljes egészében a tápfolyadékot. A csontképzés lépéseinek nyomon követésére, valamint a csontosodás mértékének meghatározására szolgáló méréseket a differenciálódás kezdetekor, 1 hét után és a kísérlet lezárásakor végeztük el.

IMMUNCITOKÉMIAI JELÖLÉS (RUNX2)

A RUNX2 transzkripció faktor a csontirányú differenciálódás beindulásának „vezérlőgénje”. A RUNX2 fehérje megjelenését a sejtmagban, a differenciálódás

első napján, az első héten és a harmadik hét végén vizsgáltuk immuncitokémiai módszerrel. 4% PFA/PBS-sel fixáltuk a tenyészetet, majd permeabilizáló és blokkolóoldatot (1%-os BSA/PBS, 4% kecskeszérum (G9023, Sigma-A), 0,1% Triton-X-100 (T8787, Sigma-A) helyeztünk rá.

A festéshez anti-h/mRUNX2/CBFA1 Purified Rat Monoclonal IgG2B antitestet (MAB0061, R&D System), Alexa Fluor 568, goat anti-rat IgG (H+L) (A11077, Invitrogen) antitestet és végül 4',6-diamidino-2-fenilindol (DAPI) (D8417, Sigma-A) használtunk. A jelölt sejteket 0,5%-os BSA/PBS-sel mostuk szobahőmérsékleten.

ALKALIKUS FOSZFATÁZ HISZTOKÉMIAI KIMUTATÁSA

Az ALP-aktivitás hisztokémiai kimutatásához 2% BCIP (5-bromo-4-kloro-3'-indolil-foszfát) (B6149, Sigma-A) és 70% DMSO- (dimetil-szulfoxid) oldatban 3% NBT (nitro blue tetrazolium) (11585029001, Roche) használtunk, amit 100-szorosára hígítottuk ALP-pufferben [100 mM TRIS bázis (T-1378, Sigma-A), 100 mM NaCl (30423, Lach-Ner), 5 mM MgCl₂ (13007-1-30, Reanal)]. Az oldatot 10 percig, 37 °C-on a sejteken hagytuk, majd PBS-sel átmostuk a tenyészeteket. Az oldat enzim jelenlétében kékesfekete színreakciót ad.

ALKALIKUS FOSZFATÁZ ENZIMAKTIVITÁSÁNAK MÉRÉSE

A sejteket lízispuffer (pH 9,5) (50 mM TRIS bázis, 150 mM NaCl, 0,1% Triton X-100) segítségével felszedtük, és a mérésig -20 °C-on tároltuk. Kiolvasztás után háromszor 5 másodpercig jégben szonikáltuk, majd 10 percig 12000× g fordulatszámra centrifugáltuk. Az így kapott felülúszót használtuk a továbbiakban. 96 lyukú plétbe mértük a következőket: 10 µl mintához 90 µl lízispuffert, 100 µl ALP-puffert és 5 µl Sigma 104 2×-os foszfatáz szubsztrátot (121H-50301, Sigma-A).

37 °C-os termosztátban egy órán át inkubáltuk a mintákat, majd 50 µl 1 N NaOH-oldattal állítottuk le a reakciót. A mérést Victor X3 Multilabel Readerrel (PerkinElmer) 405 nm hullámhosszúságon végeztük. A kapott abszorbanciaértékeket egy mg fehérjére normalizáltuk, amit Lowry-módszerrel számítottunk ki.

KALCIUM MINŐSÉGI ÉS MENNYISÉGI KIMUTATÁSA

A különböző időpontokban 4%-os PFA/PBS-sel fixált sejtenyészeteket szobahőmérsékleten PBS-sel átmostuk, 10 percig a sejteken hagytuk a 2% alizarinvörös festéket (pH 4,3) (A-3757, Sigma-A), majd PBS-sel történő többszöri mosás után mikroszkóppal megvizsgáltuk a tenyészetet. A kalciumlerakódás narancsvörös színben festődött. A kalciumkiválás mennyiségi méréséhez a sejteket 0,5% HCl-oldattal felszedtük, majd Calcium liquicolor kit-et (0150-250, Stanbio) használtunk a használati utasításnak megfelelően. A mérést Victor X3 Multilabel Readerrel 540 nm-en végeztük.

MIKROSKÓPOS VIZSGÁLATOK

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

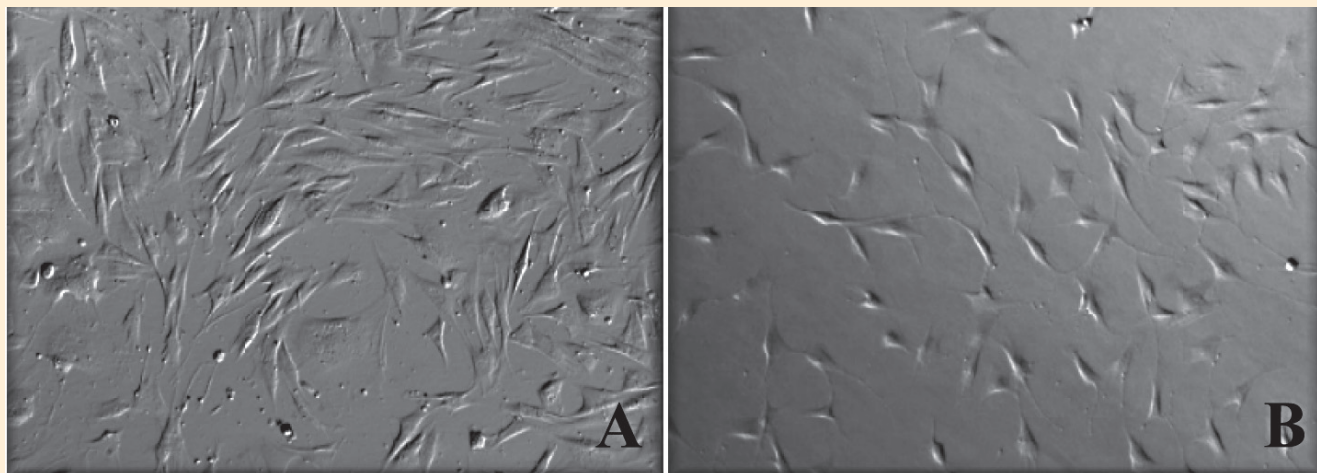
EREDMÉNYEK

ZSÍRSZÖVETBŐL SZEPARÁLT MSC-K IN VITRO TENYÉSZTÉSE

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

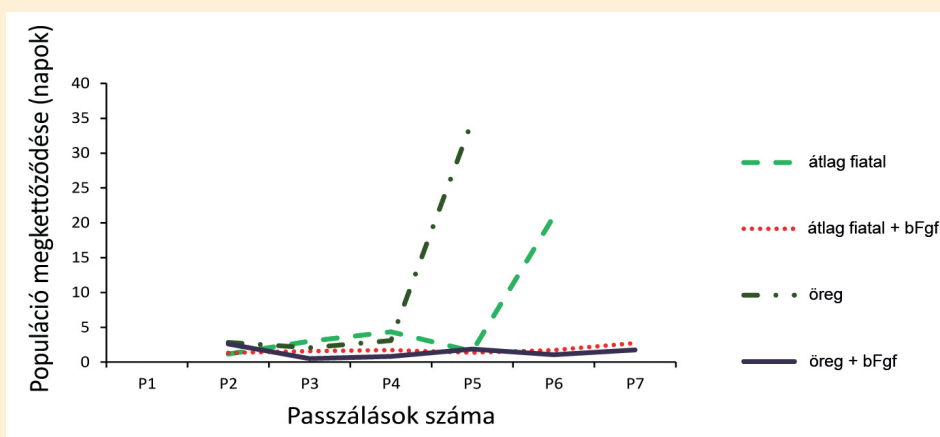
1. ÁBRA. Fibroblastszerű őssejtek fiatal (A) és idős (B) kutya zsírszövetéből
Fáziskontraszt-mikroszkópos felvétel, 100×

FIGURE 1. MSCs from young (A) and old (B) canine adipose tissue show fibroblast-like morphology
Phase contrast microscopy, 100×



2. ÁBRA. Bázikus fibroblast növekedési faktor (bFGF) hatása a fiatal és idős kutyaiból származó MSC-k populációjának megkettőződési idejére (P1, P2 ... Pn: passzálások száma)

FIGURE 2. Effect of bFGF on population doubling time of old and young canine MSC (P1, P2 ... Pn: number of passages)



Néhány passzálás után az öregebb állatból származó sejtek ellapultak, méretük megnövekedett és szaporodásuk lelassult

Az öreg és a fiatal kutyaiból nyert sejtkészítmények mikroszkópos megfigyeléssel hasonló morfológiát mutattak a tenyésztés kezdetén, majd néhány passzálás után az öregebb állatból származó sejtek ellapultak, méretük megnövekedett és szaporodásuk lelassult.

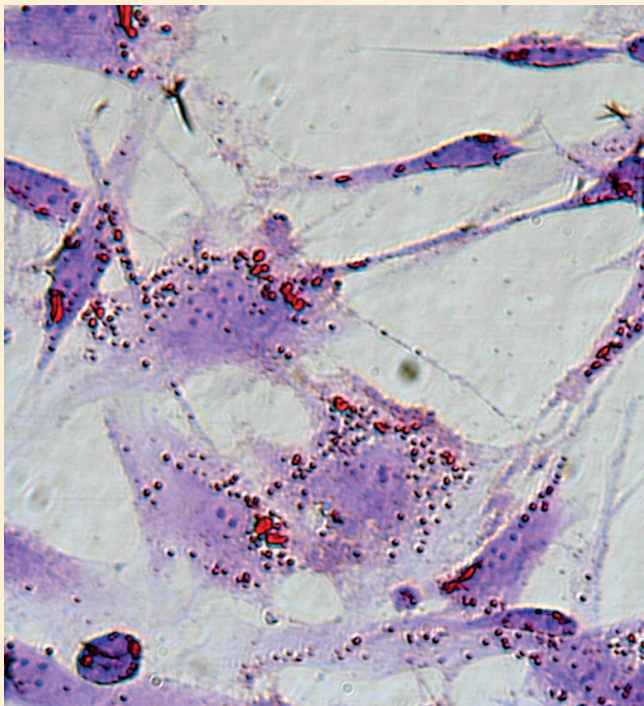
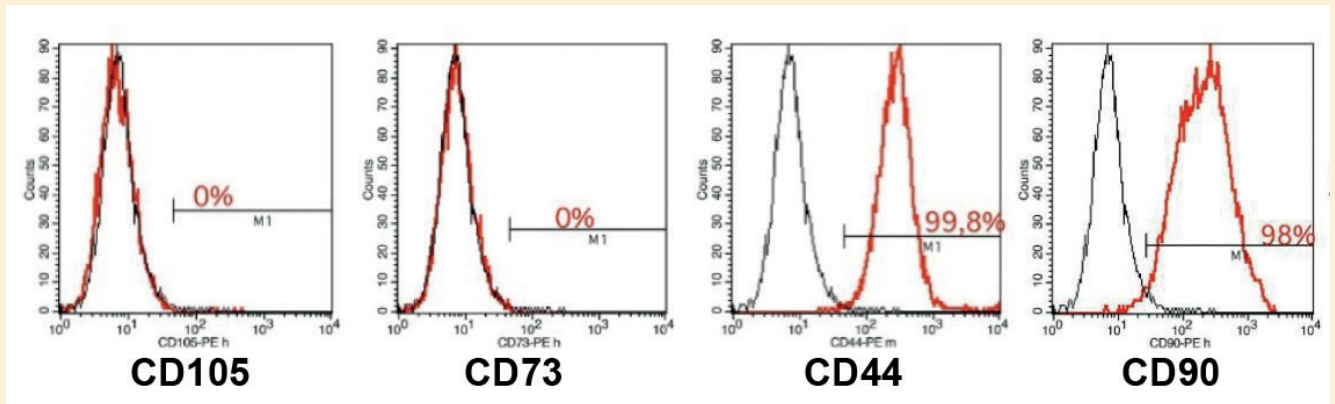
A fiatal és öreg donor állatokból származó MSC-populációk megkettőződésének ideje az átoltások során egyre növekedett mind a fiatal, mind az öreg állatból kivett MSC-k esetében. A sejtek növekedése jelentősen lelassult, több esetben megállt a negyedik passzálásnál. A tenyésztőtáphoz adagolt bFGF-fel azonban gyorsabb szaporodást figyeltünk meg, és mind a fiatal, mind az öreg állatból származó MSC-k tovább fenntarthatóak voltak *in vitro* körülmények között, valamint tovább megtartották fibroblastszerű alakjukat is a 7–8. passzálásig (2. ábra).

MSC-K SEJTFELSZÍNI ANTIGÉNEK JELENLÉTE SZERINTI JELLEMZÉSE

Az áramlási citométerrel végzett mérések során az egérellenes CD44-PE antitest 99,8%-ban hozott pozitív eredményt, az anti-humán CD90-PE antitest pedig 98%-ban (3. ábra). Az anti-humán CD73-PE és anti-humán CD105-PE antitesttel történő jelölés negatív eredményt hozott. Véleményünk szerint ez nem feltétlenül

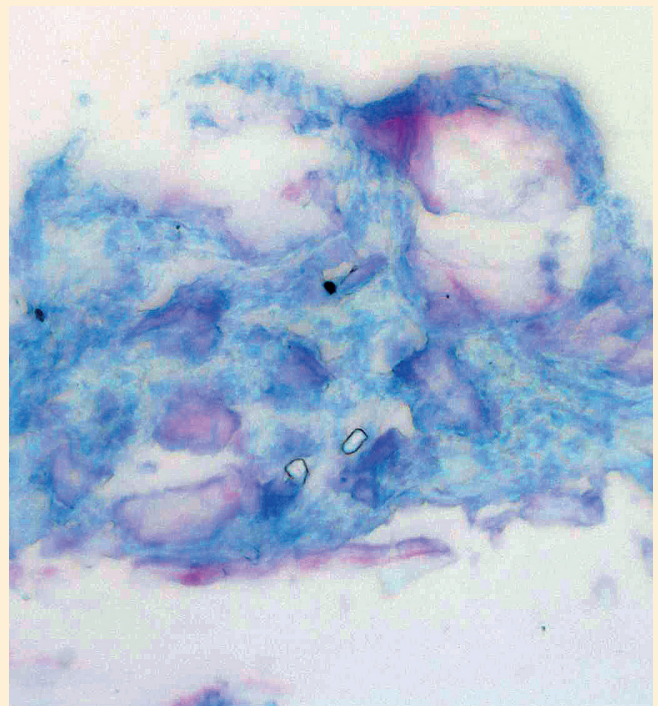
3. ÁBRA. Kutya-*MSC*-k sejtfelszíni antigénprofil kimutatása áramlási citométerrel (FACS): a *CD105* és *CD73* antigén nem volt kimutatható, míg a *CD44* és *CD90* antigének a sejtek közel 100%-án jelen voltak (balról jobbra: *CD105*, *CD73*, *CD44* és *CD90*)

FIGURE 3. Profile of cell surface antigens on *cAD-MSCs* by FACS measurement (from left to right: *CD105*, *CD73*, *CD44*, and *CD90*). The cells were negative for *CD105* and *CD73* antigens but for *CD44* and *CD90* they were almost 100% positive



4. ÁBRA. Zsírsejtek kimutatása Oil Red O festéssel: a kutya zsírszövetből izolált *MSC*-k két hét zsírirányú differenciálása után
A festék a citoplazmában felhalmozódó zsírcseppeket pirosra festi (400×), a sejtek morfológiáját dimetil-metilénkék festéssel tettük láthatóvá

FIGURE 4. *MSCs* separated from canine adipose tissue differentiated into adipose lineage show red coloured fat droplets in the cytoplasm by Oil Red O staining (400×), cells were stained with dimethyl methylene blue dye to show cell morphology



5. ÁBRA. Porc kimutatása kutya zsírszövetéből izolált *MSC*-k háromheti porcirányú differenciálása után
A porcirányba differenciálódott kutya-*MSC* dimetil-metilénkékkel metakromáziát mutat, a rózsaszín-lila színű festődés porcsejtek jelenlétére utal (200×)

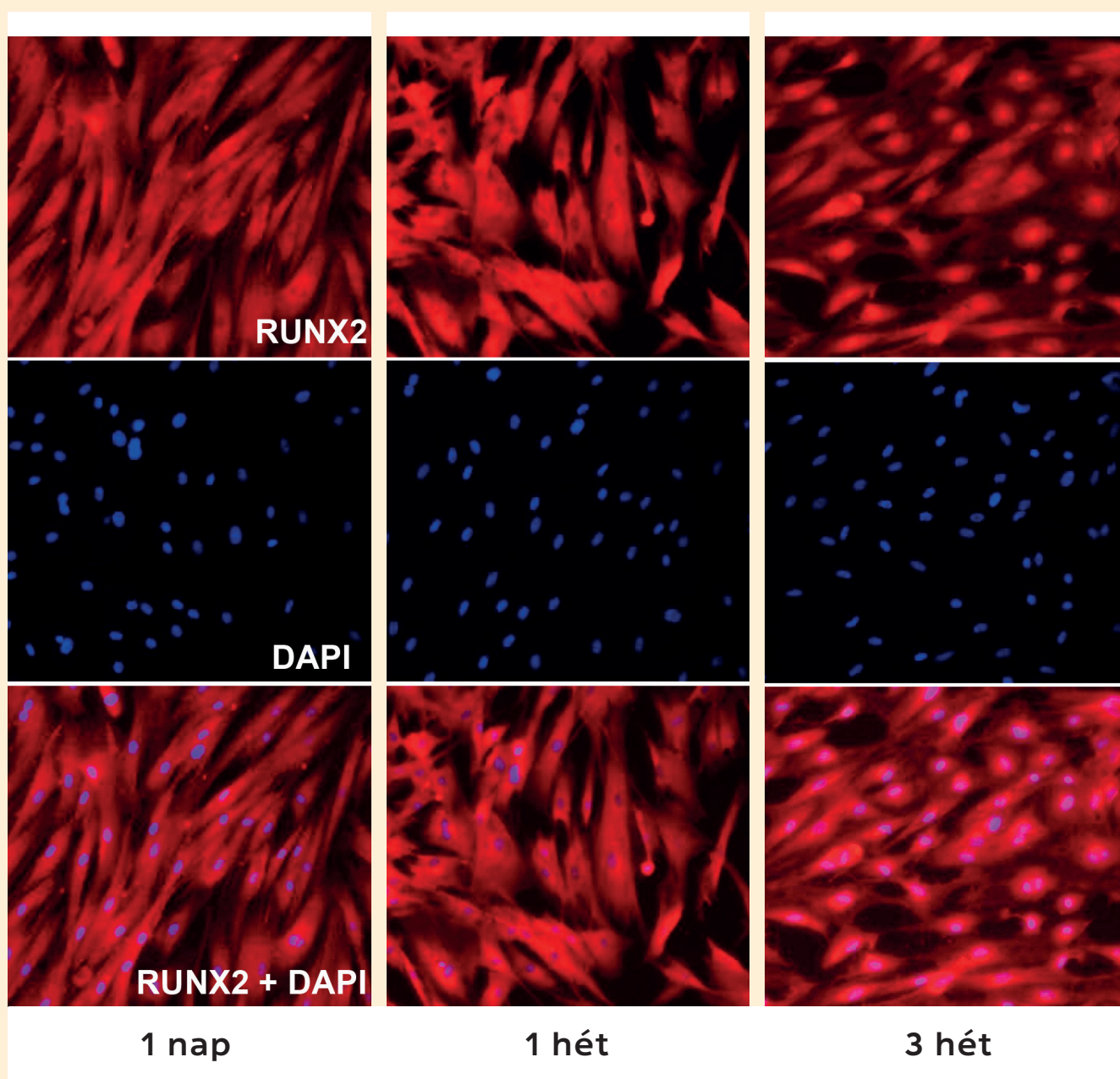
FIGURE 5. Cartilage detection of canine adipose derived *MSCs* after three weeks of chondrogenic differentiation
The differentiated *cAD-MSCs* show metachromasia staining with dimethyl methylene blue. The pink-violet staining is cartilage specific (200×)

6. ÁBRA. Csontirányú differenciálódás követése a „vezérlőgén” termékeként jellemzett RUNX2 kimutatásával, immuncitokémiai eljárással

Első oszlop egynapos, második oszlop egyhetes, harmadik oszlop háromhetes osteogen tápban való tenyésztés után. RUNX2 festés: 1. antitest: anti-h/mRUNX2/CBFA1, 2. antitest: Alexa Fluor 568, Rat IgG2B, a DAPI festés a sejtmagokat jelöli. Első sor RUNX, második sor DAPI, harmadik sor RUNX + DAPI. Az első napon és az első héten a RUNX2 fehérje főleg a citoplazmában található, a 3. hétre főként a sejtmagban és a sejtmagok körül lokalizálódik

FIGURE 6. Immunocytochemical labelling of RUNX2, the key regulatory gene of osteogenic differentiation

CAD-MSCs were differentiated into osteo lineage in one day (first column), one week (second column) and three weeks (third column). Staining with RUNX2 (first row), DAPI (second row) and RUNX2 + DAPI (third row). RunX2 staining: primary antibody: anti-h/mRUNX2/CBFA, secondary antibody: Alexa Fluor 568, rat IgG2B, DAPI: nuclei staining. During osteogenic differentiation, the localization of RUNX2 protein has changed: in early stage, the protein can be found in cytoplasm but from the third week, RUNX2 is mainly visible in nuclei and perinuclei



jelenti azt, hogy ez a két sejtfelületi marker nincs rajta az általunk izolált MSC-ken, hanem azt feltételezzük, hogy a rendelkezésünkre álló anti-humán antitestek nem voltak elég specifikusak a kutya-MSK-re.

Az irodalmi adatokban is találunk hasonló eredményeket: VIERA és mtsainak amellet, hogy a kutya zsír eredetű MSC-ken CD29, CD44, és CD90 pozitivitást sikerült kimutatniuk, addig az anti-humán antitestekkel (CD13, CD73 és CD105) történő jelölés negatív maradt (75). Egy másik kísérletben a kutya köldökzsinórvérből izolált MSC-k esetében anti-kutya antitesteket használva a CD29, CD33, CD44, CD105, CD184 és Oct4 markerek voltak pozitívak, míg a CD90 és CD73 nem mutatott pozitivitást (57). KANG és mtsai összehasonlító vizsgálatot végeztek kutya zsír, csontvelő, köldökzsinórvér és Wharton-kocsonyából származó MSC-k sejtfelszíni markereinek expressziójára vonatkozóan áramlási citométerrel. A vizsgált markerek közül valamennyi mintában sikerült pozitivitást találni a CD44, CD73, CD90 és CD105-ös markerekre (35). Ezen kísérleti eredményeket is figyelembe véve feltételezzük, hogy a cAD-MSK-ken jelen van a CD90 és CD105-ös marker is, hasonlóan a humán eredetű MSC-khez, azonban az eredményeket sokkal inkább a megfelelő kutyaellenes antitest kiválasztása befolyásolja.

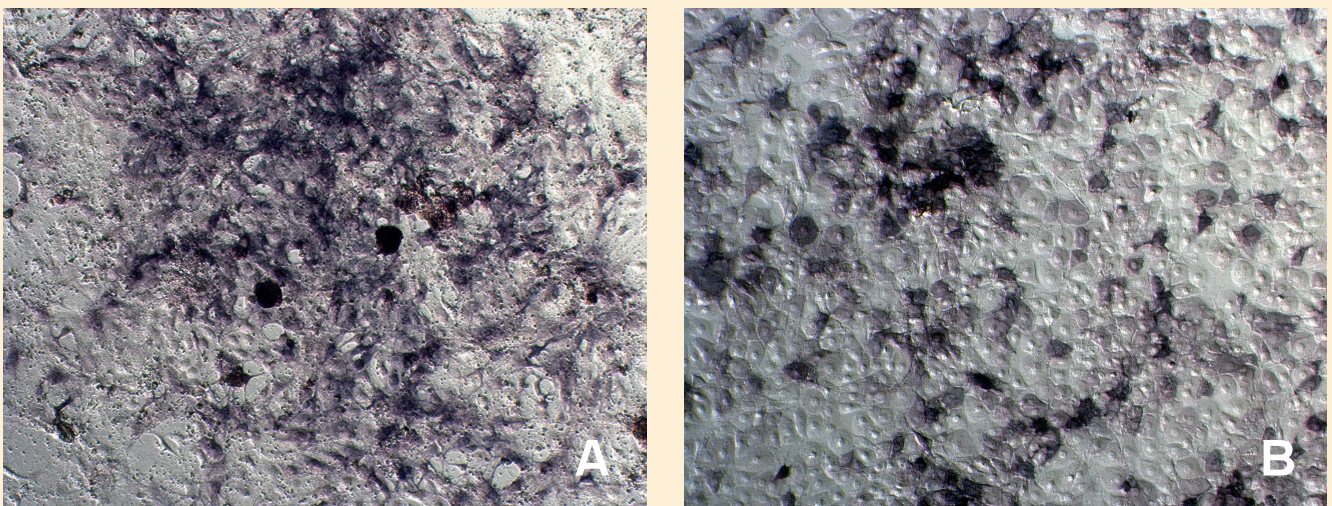
MSC-K DIFFERENCIÁLTATÁSA

A zsírirányú differenciálódás bizonyítására használt Oil Red O festéssel már 2 hét elteltével sikerült kimutatnunk a sejtek citoplazmájában vörös cseppekben megjelenő zsírfelhalmozódást (4. ábra). A sejtek morfológiáját dimetil-metilénkék festéssel tettük láthatóvá.

A porcirányú differenciációt dimetil-metilénkék festéssel bizonyítottuk, 2 hét elteltével a festés metakromáziát mutatott, ami a porcszövetre jellemző szulfátált glükóz-amino-glikánok jelenlétét mutatta (5. ábra).

Csontirányba sikerült mind a fiatal, mind az idős állatok MSC-it differenciáltatnunk, azonban a fiatal állatok esetében nagyobb ALP-aktivitást és kalciumkiválasztást észleltünk, bár ez a kisszámú minta miatt nem tekinthető szignifikánsnak.

A zsír-, a porc-, és a csontirányú differenciációt is bizonyították a megfelelő festésekkel, ill. reakcióval



7. ÁBRA. Alkalikus foszfatáz hisztokémiai kimutatása: fiatal (A) és idős (B) kutya-MSK-n három hét csontirányú differenciáltatás után. BCIP (5-bromo-4-kloro-3'-indolil-foszfát) és NBT (nitro blue tetrazolium) az enzim jelenlétében kékesfekete színreakciót ad

FIGURE 7. Detection of alkaline phosphatase activity by histochemistry from young (A) and old canines (B) MSCs differentiated into osteo lineages for 3 weeks. BCIP/NBT (5-bromo-4-chloro-3'-indoly-phosphate / nitro blue tetrazolium) reagent gives blue-black colour reaction in the presence of alkaline phosphatase (ALP)

IMMUNCITOKÉMIAI JELÖLÉS

A csontirányú differenciáltatás során a RUNX2 transzkripció fehérje sejten belüli lokalizációjában változás történt: míg kezdetben a citoplazmában volt megfigyelhető, a 3. hét végére főként sejtmagi és perinukleáris lokalizációt észleltünk (6. ábra).

ALP-AKTIVITÁS MÉRÉSE

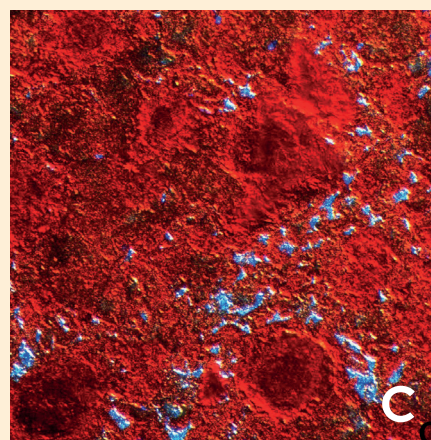
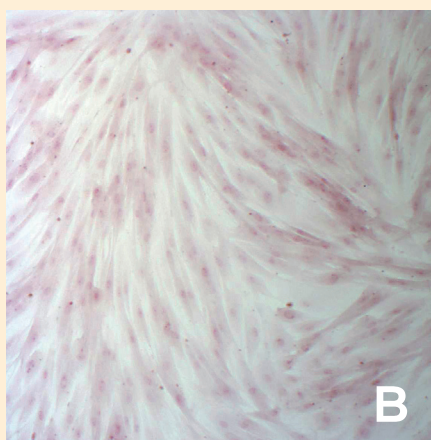
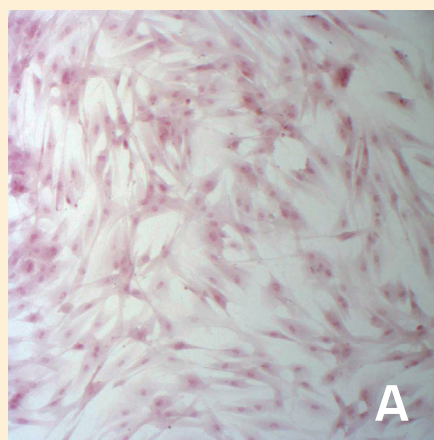
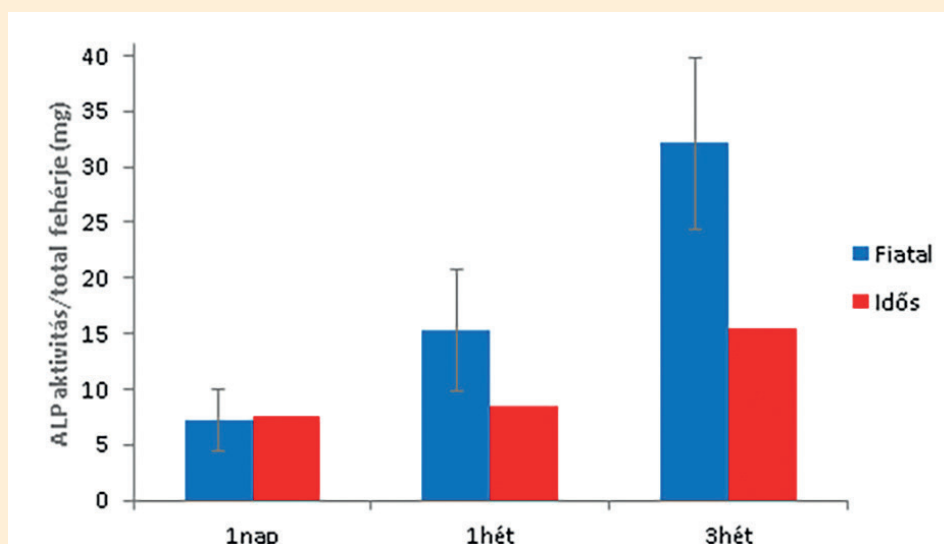
A fiatal és öreg kutyák esetében az ALP-enzimaktivitás mértéke a csontirányú differenciáltatás során emelkedett, a harmadik héten mértük a legintenzívebbnek. Az öreg kutya ALP-enzimaktivitás értékei mindvégig a fiatal kutyákból származó, csontirányba differenciálódó MSC-k ALP-enzimaktivitása alatt maradt (7. és 8. ábra).

KALCIUMKIMUTATÁS

Mind a fiatal, mind a beagle kutyákból származó MSC-k esetében a 3. héten detektáltunk jelentősebb kalciumkiválást mind az alizarinvörös festéssel, mind

8. ÁBRA. Alkalikus foszfatáz enzimaktivitásának mérése három fiatal (kék oszlop) és egy öreg kutya (vörös oszlop) csontirányba differenciáltatott MSC-tenyészetének egy nap, egy hét és három hét után

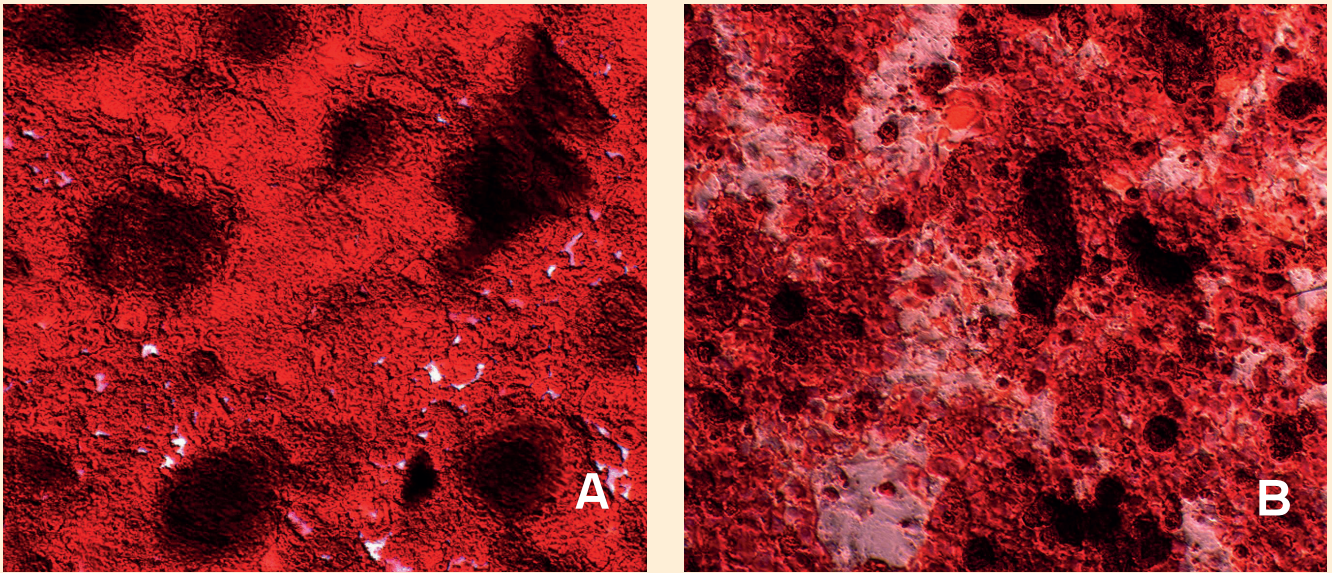
FIGURE 8. Measurement of ALP enzyme activity of MSCs from three young (blue columns) and one old (red columns) canines one day, one week and three weeks osteogenic post-differentiation



9. ÁBRA. Fiatal kutya zsírszövetéből származó MSC-tenyészet differenciáltatása csont irányba.

A kalcium lerakódás kimutatása Alizarin-vörös festéssel egy nap (A) (40×), egy hét (B) (40×) és három hét (C) (100×) elteltével

FIGURE 9. Osteogenic induction of MSCs from a young dog with Alizarin Red staining after one day (A) (40×), one week (B) (40×) and three weeks (C) (100×) post-differentiation

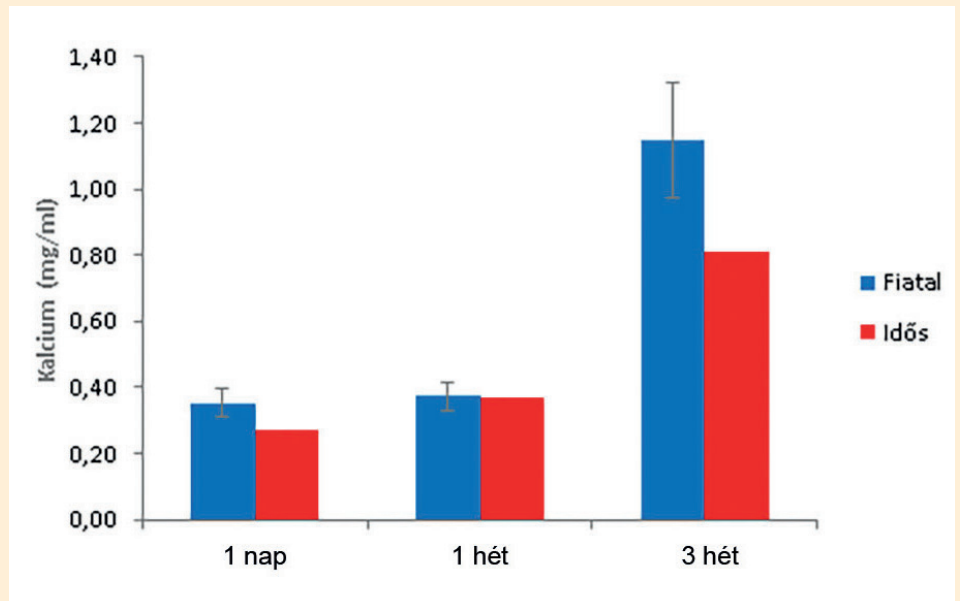


10. ÁBRA. Alizarinvörös festés: fiatal kutyából (A) és öreg kutyából (B) származó MSC-k három hét csontirányú differenciáltság után (100×)

FIGURE 10. Alizarin Red staining of MSCs prepared from young (A) and old (B) dogs after three weeks of osteogenic differentiation (100×)

11. ÁBRA. Kalciumkiválás mérése három fiatal (kék oszlopok) és egy öreg kutyából (vörös oszlopok) származó, csontirányba differenciált MSC-ken egy nap, egy hét és három hét után

FIGURE 11. Quantitative measurement of the calcium content of osteogenically induced MSCs from three young (blue columns) and one old dogs (red columns) after one day, one week and three weeks



pedig a kalcium mennyiségi mérésével. Az osteogen tápfolyadékkal kezelt sejtenyészetben az első napon (9. ábra A), ill. az első héten (9. ábra B) az alizarinvörös festés sötétvörösre színezte a tenyésztőedényben letapadt sejteket. A kalciumlerakódásra utaló, csontirányú differenciálódást jelző élénk narancsvörös elszíneződést azonban csak a 3. héten sikerült kimutatnunk (9. ábra C). A fiatalabb kutyák esetében valamivel nagyobb mértékű kalciumfelhalmozódást sikerült kimutatnunk a 3. héten, bár ez statisztikailag nem értékelhető a kis mintaszám és az ismétlések hiánya miatt (10. és 11. ábra).

MEGVITATÁS

Az MSC-k *in vitro* proliferációs képessége jóval inkább függ a tenyésztési körülményektől, a passzálások számától, mint a donorok életkorától

A fiatalabb kutyák MSC-i jobb csontosodási képességet mutatnak, de a különbség nem volt szignifikáns

Megfigyeléseink igazolták, hogy mind a fiatal, mind az idősebb állatok zsírszöveve alkalmas MSC-k kinyerésére. A fiatal és idős állatokból kinyert letapadó sejtek egyaránt mutatták az MSC-kre jellemző fibroblastszerű sejtalakot, képesek voltak zsír-, porc- és csontirányba differenciálódni, valamint a sejteken kimutattuk a CD44 és CD90 antigének jelenlétét. Egyes irodalmi adatok azt mutatják, hogy idős emberekből izolált csontvelő-eredetű MSC-knél nem sikerült fibroblastszerű sejteket kinyerni (4). Saját megfigyeléseink azt mutatják, hogy az öreg kutyadonortól származó zsírereditű MSC-k az első 3 átoltás során klasszikus fibroblastszerű morfológiát mutatnak, amelyek a passzálások során egyre inkább elvesztik alakjukat. A mikroszkópos megfigyelések azt mutatták, hogy a passzálások során mind a fiatal, mind az idősebb donortól vett MSC-k egyre laposabbak és nagyobbak lesznek, amely az *in vitro* sejtöregedés egyik jele (34). Megfigyeléseink arra engednek következtetni, hogy az MSC-k *in vitro* proliferációs képessége jelentősen függ a tenyésztési körülményektől, a passzálások számától, jóval inkább, mint a donorok életkorától. A tenyésztési feltételek optimalizálásával, a tenyésztőtáphoz adagolt bFGF hozzáadásával mind a fiatal, mind az idősebb donoroktól származó sejtek hosszabb időn keresztül megőrizték fibroblastszerű sejtalakjukat és proliferációs képességüket, így *in vitro* tovább fenntarthatóak voltak. A fagyasztás után tenyésztett sejtek hasonlóan viselkedtek, mint a frissen izolált és szaporított sejtek.

A csontirányú differenciálódás bizonyítására többfajta módszert is alkalmaztunk; az immuncitokémiai kimutatás során a RUNX2 fehérje – ami a csontosodási folyamatok egyik fő transzkripciós faktora – kezdetben főként a citoplazmában, a 3. héten főként a sejtmagban és körülötte lokalizálódik. Mindez egybevágg azzal a megfigyeléssel, hogy a kalciumkiválás szintén a 3. héten a legintenzívebb, amit az alizarinvörös festési eljárással és a kalciumkoncentráció mérésével is bizonyítottunk. Már az első héttől kezdve emelkedett ALP-aktivitást észleltünk mind az enzimatis méréssel, mind a hisztokémiai eljárással, ami a harmadik hétre további növekedést mutatott.

Az általunk vizsgált három fiatal és egy öreg kutya esetében az alkalmazott módszerek alkalmasak a különféle sejttípusok létrehozására. Különbség mutatkozik a csontosodási képességben a fiatal kutyák előnyére, azonban hangsúlyozni szeretnénk, hogy ez a kisszámú minta és az ismétlések hiánya miatt statisztikailag nem kiértékelhető és általános következtetések nem vonhatóak le belőle.

Eddigi eredményeink alapján úgy gondoljuk, hogy idősebb kutyákból is érdeemes lehet MSC-sejteket izolálni és azt autológ terápiákban felhasználni. Olyan kutyák esetében azonban, amelyeknél a zsírszövet levétele akadályozott, vagy MSC-i korlátozott csontosodási kapacitással rendelkeznek, megfontolandó egy esetleges allogén transzplantáció lehetősége. Kezdeti eredményeink megerősítése érdekében tervezzük a kísérletbe további kutyák bevonásával a mintavételek számát megnövelni a statisztikailag releváns mintaszám eléréséhez. Továbbá kísérleteket folytatunk az MSC-k biokompatibilis és biodegradábilis hordozón (ún. scaffoldon) *in vitro* és *in vivo* csontirányú differenciáltatásával. Mindez lehetővé tenné az MSC terápiás alkalmazását olyan állatorvosi betegek részére, amelyek traumás behatás vagy sebészeti beavatkozás után igénylik nagyobb szövethiányos területek rekonstrukcióját.

KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Köszönetünket kívánjuk kifejezni a Creative Cell Kft.-nek és az Országos Vérelátó Szolgáltatnak, hogy ötleteikkel, szellemi kapacitásukkal jelentős mértékben

hozzájárultak e munka létrejöttéhez, valamint megosztották velünk eszközparkjukat, a tárgyi és mérési feltételeket biztosították. A mikroszkópos felvételek szintén a Creative Cell Kft. laboratóriumában készültek. Külön köszönet a sok segítségért BAKKI ATTILÁNÉnak és BÁTKA LÁSZLÓNÉnak. Valamint köszönettel tartozunk a Frank Diagnosztika Kft.-nek, akik a megfelelő sejtfelületi markerek megtalálásához többfajta antitestet is biztosítottak számunkra. 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.

IRODALOM

Az irodalmi hivatkozásokat lásd cikkünk 1. részében (MÁL 2016. június).

RENDEZVÉNY

A Magyar Zoonózis Társaság és a Nemzeti Élelmiszerlánc-Biztonsági Hivatal Budapesten május 23-án közösen rendezte a **Rudnai-Kemenes Tudományos Ülését**.

Az ülés fő témái „A migráció egészségügyi veszélyei”, valamint „A szúnyogok által terjesztett betegségek a klímaváltozásban”.

DR. MELLES MÁRTA főigazgató, az MZT elnökének megnyitója után, az első témakörben:

- A migráció zoonotikus veszélyei (TUBOLY SÁNDOR),
- A más földrészekon felkerekedő embertömegek átvonulásának parazitológiai kockázatai (MERÉNYI LÁSZLÓ),
- Tularaemiától botulizmusig (MÉSZÁROS ENDRE)
- Tularaemia és botulizmus: járványügyi információk (KRISZTALOVICS KATALIN)

című előadások szerepeltek.

A második részben:

- A Zika-vírussal kapcsolatos legújabb információk (BOGNÁR ZSÓFIA).
- A magyarországi invazív szúnyog-surveillance rendszer elindítása és első eredményei (SZTIKLER JÁNOS, ZÖLDI VIKTOR)

című előadások hangzottak el.

Az ülésen mintegy 200 fő vett részt. A tudományos ülést élénk vita követte és a résztvevők újfent hangsúlyozták a humán és az állat-egészségügyi szolgálat együttműködésének fontosságát a zoonózisok megelőzésében és felszámolásában.

Budapest 2016. jún. 9.

Korzenszky Emőd dr.

Tuboly Sándor dr.

további információk:

www.zoonozistarsasag.hu