

<sup>1</sup>Semmelweis Egyetem Orálbiológiai Tanszék, Budapest, <sup>2</sup>Semmelweis Egyetem Konzerváló Fogászati Klinika, Budapest, <sup>3</sup>Semmelweis Egyetem Parodontológiai Klinika, Budapest, <sup>4</sup>Pécsi Tudományegyetem Klinikai Központ, Fogászati és Szájsebészeti Klinika

## Patkány fogbél eredetű őssejtek tenyésztése és differenciáltatása szövetépítési kutatások megalapozására

KÁLLÓ KAROLA<sup>1</sup>, DR. GÁNTI BERNADETT<sup>2</sup>, DR. KERÉMI BEÁTA<sup>1</sup>, DR. STIEDL PÉTER<sup>3</sup>, DR. NAGY ÁKOS<sup>4</sup>,  
DR. VARGA GÁBOR<sup>1</sup>, DR. NAGY KRISZTINA<sup>1</sup>

Bár a humán fogpulpa eredetű őssejtek létezése 2000 óta ismert, és ezeket már részletesen jellemezték, a patkány fogbélből izolálható sejt kultúrákról még kevés adat áll rendelkezésünkre. A szerzők kísérleteinek célja patkány pulpából őssejt tulajdonságokkal bíró primer sejtenyészet létrehozása, fenntartása és differenciáltatása volt. A sejtek életképességét WST-1 teszttel határozták meg. A csont irányú differenciálódást Kóssa- és alizarinvörös festéssel, az idegi irányú differenciálódást pedig morfológiai vizsgálatokkal, immuncitokémiai eljárással, valamint kvantitatív polimeráz láncreakciós módszerrel detektálták. Különböző felületkezelések hatását is vizsgálják a neurogén differenciálódásra. Sikeresen izoláltak őssejteket tartalmazó sejt populációkat patkányok alsó metszőfogának pulpaszövetéből, és optimalizálták tenyésztési körülményeiket. Bebizonyították, hogy ezek a kultúrák mind oszteogén, mind neurogén irányba képesek differenciálódni. Kifejlesztettek egy, a korábbinál hatékonyabb neurogén differenciációs protokollt, és megállapították, hogy a patkány pulpa eredetű őssejtenyészetek esetében a legkedvezőbb felület a lizin-laminin, illetve ornitin-laminin kombináció. Mivel az eredmények alátámasztják, hogy a fogpulpa eredetű őssejtek alkalmasak lehetnek az elpusztult csont- és idegszövetek regenerációjára, a modell megalapozza a fogbél eredetű őssejtek szövetépítés céljából történő klinikai felhasználását.

Kulcsszavak: patkány, pulpa, őssejt, oszteogén, neurogén, differenciálódás, tenyésztés, szövetépítés

### Bevezetés

Az őssejtkutatás az elmúlt évtizedben számos biztató eredményt mutatott fel a szövetregeneráció lehetőségeivel kapcsolatban, így a regenerációs orvoslás ígéretes területévé vált. Az őssejtek definíció szerint korlátlan osztódásra, valamint differenciált utódsejt létrehozására egyaránt képesek. Fejlődési és differenciációs képességük alapján totipotens, pluripotens, multipotens és unipotens típusokba sorolhatók, míg eredetük szerint megkülönböztethetünk embrionális, magzati, posztnatális (vagy felnőtt) és indukált pluripotens őssejt kategóriákat. Mivel az embrionális őssejtek alkalmazása komoly etikai problémákkal és a tumorképződés kockázatával járna, jelenleg a kutatások középpontjában a posztnatális őssejtek állnak. Mióta 1997-ben felfedezték és jellemezték a csontvelő eredetű multipotens mesenchymalis őssejteket (BMSC, bone marrow stromal cell) [28], számos más szövetben is találtak hasonló sejt populációkat. Többek között agyból, bőrből és vázizomszövetből, valamint a gasztrointesztinális traktusból is izoláltak posztnatális őssejteket [10, 20, 23]. Jelenleg a regenerációs terápia céljaira legígéretesebb jelölt a felnőtt őssejtek közül a mesenchymalis őssejtek csoportja (mesenchymal stem cell, MSC), ahova multipotens sejtek tartoznak. A nagyfokú fejlődési flexibilitásuk, valamint az a tény, hogy fel-

nőtt emberekben is jelen vannak, nagyon vonzó jelöltté teszi őket a klinikai alkalmazásra. Azonban ehhez szükség van megbízható, standardizált protokollok kifejlesztésére, melyek segítségével ezeket a sejteket nagy mennyiségben lehetséges célszövetévé differenciáltatni [4, 13, 31].

Korábbi tanulmányok (köztük a kutatócsoportunk által publikáltak is) kimutatták az MSC-k jelenlétét emberi fogbélben és gyökérhártyában is [11, 15, 16, 18, 26, 27, 29]. Ezeket az őssejteket röviden DPSC-nek (dental pulp stem cell), illetve PDLSC-nek (periodontal ligament stem cell) nevezik. A felnőtt szöveti őssejtek rendkívüli plaszticitására is fény derült. Példaként említhetjük a csontvelő eredetű őssejteket, melyek közreműködhetnek izom-, máj- és idegszövet létrehozásában [12], valamint az idegi őssejteket, melyek részt vehetnek a vér és a vázizom regenerációjában [5, 8]. Ahhoz, hogy kihasználhassuk ezt a potenciált, szükség van a mesenchymalis őssejtek tulajdonságainak mélyebb feltárására és teljes differenciációs potenciáljuk vizsgálatára először *in vitro*, majd *in vivo*.

Jelenleg laboratóriumunk legfőbb érdeklődési területe a fogeredetű őssejtek differenciációs és regenerációs potenciáljának vizsgálata. Mivel a fogeredetű őssejt kultúrák a mesenchymalis őssejtek jellegzetességeit mutatják [11, 26, 29], ezen sejtek egyik legkézenfekvőbb

differenciáltatási és felhasználási iránya az oszteogén irány. Megfelelő farmakológiai indukcióra válaszolva az emberi fogból származó MSC-k valóban differenciálthatók *in vitro* körülmények között oszteogén/odontogén irányba. Az ilyen módon kapott sejtek polarizált sejttel rendelkezők és kalcium-tartalmú mineralizációs csomókat halmoznak fel [11, 15, 16, 18, 26, 27, 29].

A humán fogeredetű őssejtekkel végzett kutatásaink folytatásaként most a patkány metszőfogakból izolált sejt-kultúrák vizsgálatával kapcsolatos legújabb eredményeinkről számolunk be. Kísérleteink elsődleges célja az volt, hogy patkányok alsó metszőfogának pulpaszövetéből olyan primer sejtenyészetet hozunk létre, amely őssejt (vagy progenitor sejt) tulajdonsággal rendelkező sejteket tartalmaz. Továbbá célul tűztük ki a sejt-kultúrák *in vitro* differenciálását oszteogén és neurogén irányba. Ezenkívül a korábbinál hatékonyabb neurogén differenciációs protokollt kívántunk kifejleszteni a tenyésztőedények előzetes felületkezelése révén.

### Vizsgálati anyag és módszerek

#### Sejtizolálás és sejtenyésztés

Hím Wistar patkányok (120–180 g) mandibulájának eltávolítása után a mandibula bázisát feltárva nyertük ki a pulpaszövetet az alsó metszőfogakból, majd azonnal steril PBS-be (Gibco) helyeztük. Az őssejtek izolálását a kutatócsoportunk által humán őssejtek esetében korábban publikált módszer [15, 16, 27] kisebb módosításával végeztük. A pulpaszövetet óraüvegen steril körülmények között szikével felaprítottuk, majd a kollagenáz I enzim (Sigma) 1 mg/ml-es koncentrációjú oldatában emésztettük 1 órán át 37 °C-on, és közben 10 percenként vortexeltük. Az emésztett szövetdarabokat 250 g-vel 5 percig centrifugáltuk, a felülúszót eltávolítottuk, és a sejteket tápoldattal a tenyésztőedénybe mostuk. 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint (Sigma), valamint 2 mM L-glutamint (Sigma) tartalmazó αMEM (Gibco) tápoldatban tenyésztettük az izolált sejteket 10%-os FBS (fetal bovine serum, Gibco) koncentráció mellett. Hetente kétszer cseréltük a tápoldatot, és hetente egyszer passzáltuk a tenyészeteket 0,05% tripszin-EDTA (Gibco) oldat segítségével. A sejteket standard körülmények között 37 °C hőmérsékleten, 5%-os CO<sub>2</sub>-tartalmú levegőn tenyésztettük.

#### Sejtproliferáció vizsgálata WST-1 teszttel

A sejtproliferáció vizsgálatát egy korábban leírt protokoll [16] alapján végeztük, csak a hagyományos MTT-teszt helyett a nagyobb érzékenységű WST-1 tesztet alkalmaztuk. A 96 lyukú szövettenyésztő tálka üregeibe kiültetett sejtekről másnap a tenyésztő médiumot eltávolítottuk, helyette szérumentes tápoldatot adtunk a sejtekhez a tenyészetek szinkronizálása céljából. A szérumentes tápoldatot 24 óra elteltével különböző szérumentartalmúra cseréltük, majd újabb 24 óra elteltével vizsgáltuk a sejtek életképességét a vízdoldékony

tetrazóliumsót tartalmazó WST-1 (4-[3-(4-iodofenil)-2-(4-nitrofenil)-2H-5-tetrazolio]-1,3-benzene diszulfonát) reagens (Roche) segítségével. A 2 órás inkubációt követően a minták abszorbanciáját 450 nm hullámhosszon mértük le, 655 nm referencia hullámhossz mellett.

#### Oszteogén irányú differenciáltatás

Az oszteogén irányú differenciálódást az irodalomban már leírt módon váltottuk ki [15–17]. Az indukciós médium a tenyésztő tápoldathoz hasonlóan 100 U/ml penicillint és 100 µg/ml streptomycint, valamint 2 mM L-glutamint tartalmazott, viszont csak 1% szérumot (FBS). Emellett az αMEM médium még 10<sup>-8</sup> M dexametazonnal, 50 µg/ml L-aszkorbinsav-2-foszfáttal és 10 mM β-glicerofoszfáttal is ki lett egészítve. Ebben az oszteogén médiumban tenyésztettük a sejteket 3 héten át passzáls nélkül, miközben hetente kétszer tápcserét végeztünk. A 3. hét végén a kalcium-vegyületek lerakódását kimutató Kossa festéssel (a nemzetközi irodalomban von Kossa festésként ismert a magyar kutató által kifejlesztett módszer) [19], valamint alizarinvörös festéssel azonosítottuk a mineralizációs göccokat.

#### Neurogén irányú differenciáltatás

A már korábban publikált háromlépéses protokollunk felhasználásával indukáltuk a sejtek neurogén differenciálódását [18]. A DPSC-k kiültetéséhez használt DMEM/F12 (Gibco) tápoldatot 2,5% FBS-sel (Gibco), 100 U/ml penicillinnel és 100 mg/ml streptomycinnel (Sigma) egészítettük ki. A kiültetést követő napon a fenti médiumot lecseréltük 2,5% FBS-t, 10 ng/ml bFGF-et (Sigma) és 10 µM 5-azacitidint (Sigma) tartalmazó DMEM/F12 tápoldatra, amiben a differenciáció első lépéseként 48 órán keresztül inkubáltuk a sejteket. PBS-sel történő mosást követően a második, vagyis indukciós fázisban 72 órán át DMEM/F12 médiumban tenyésztettük a sejteket 250 µM IBMX (Sigma), 50 µM Forskolin (Sigma), 1 mM db cAMP, 0,2 µM TPA (Sigma), 10 ng/ml bFGF, 10 ng/ml NGF (Sigma), 1 mM dbcAMP (Sigma), 30 ng/ml NT-3 (Sigma) és 1% ITS (Sigma) hozzáadásával. Az érési fázisban 3-10 napig 1 mM dbcAMP, 1% N2, 1% B27, és 30 ng/ml NT-3 tartalmú *Neurobasal A* médiumban tartottuk a sejteket.

#### Neurogén differenciációs protokoll módosítása

Az intenzívebb proliferáció elősegítésére a tenyésztő tápoldatba az izolálástól fogva 10 ng/ml bFGF-et is tettünk. A neurogén differenciáltatás második fázisából kihagytuk a dbcAMP-t, továbbá a harmadik (érési) fázist kettébonítottuk az *Arthur és munkatársai* által publikált protokoll [2] szerint. Az érés első hetében a DMEM/F12 médium az antibiotikumok mellett 1% ITS-t és 40 ng/ml bFGF-et tartalmazott, míg a második héten ezt még 50 nM retinsavval is kiegészítettük. A tápoldatot hetente kétszer cseréltük.

#### Felületkezelés

Mivel az irodalomban a neurogén differenciáltatás során számos különféle felületen tenyésztik a sejteket,

a patkány pulpa sejtjeink számára kerestünk alkalmas felületet neurogén differenciálódáshoz hat különböző felület alkalmazásával. Korábbi protokollunk szerint [18] a poly-L-lizin (PLL, Sigma) kezelést 15 percen át szobahőn, a lamininnel történő kezelést (LA, Sigma, 5 µg/ml) pedig 2 órán át 37°C-on végeztük. Ezenkívül PLL és LA kombinációjával (LILA) [32] valamint ornitin (Sigma) és laminin kombinációjával (ORLA, ornitin 10 µg/ml, 1 óra inkubáció) [2] is kezeltük a tenyésztőedények felületét. Mindezek mellett az FBS-sel történő előkezelés (30 percen át, 37°C-on) hatását is megvizsgáltuk, kontrollként pedig NTC-n („non tissue culture”), vagyis kezeletlen felületen differenciáltattuk a sejteket.

#### Immuncitokémiai vizsgálatok

Az immuncitokémiai festéshez a 8 kamrás tárgylemezen (8 chamber slide, Lab-Tek) tenyésztett sejteket 20 percig fixáltuk szobahőmérsékleten paraformaldehid (PFA, Sigma) 4%-os oldatában. Ezután 0,1% Triton X-et (Reanal) tartalmazó PBS-sel permeabilizáltuk a sejtek plazmamembránját és 5%-os kecskeszérummal 60 percig blokkoltuk a fehérjék aspecifikus kötőhelyeit. A primer antitestek oldatát 2,5% kecskeszérumot tartalmazó PBS-sel hígítottuk (VIM (1:200), N-TUB (1:150), GFAP (1:3000), NFM (1:300)), és ezzel egy éjszakán át 4°C-on inkubáltuk a sejt kultúrákat. A PBS-sel történő mosást követően az Alexa fluor 488 fluoreszcens festékkel konjugált (anti-egér, illetve anti-nyúl IgG típusú) szekunder antitesteket szintén 2,5% kecskeszérumot tartalmazó PBS-sel hígítottuk, és ezekkel 60 percig szobahőn, sötétben inkubáltuk a fixált tenyészeteket. Desztillált vízzel történő mosást majd szárítást követően DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol) tartalmú Prolong Gold reagenssel (Molecular Probes) fedtük le a tárgylemezeket, majd sötétben, 4°C-on tároltuk a felvételek elkészüléséig.

#### Kvantitatív polimeráz láncreakció

A neurogén differenciáltatás végén a tenyészeteket 1% β-merkaptó-etanol tartalmú lízispufferrel lizáltuk, majd NucleoSpin RNA II kit (Macherey-Nagel) segítségével, DNáz-os emésztés alkalmazásával RNS-t izoláltunk. A kapott minták RNS-koncentrációját Nanodrop készüléken mértük. Az RNS tisztaságát 1%-os agaróz gélen történő elektroforézissel ellenőriztük, majd mintánként 500 ng RNS-ből High Capacity RNA to cDNA Master Mix (Applied Biosystems) felhasználásával végeztük a reverz transzkripciót. A valós idejű PCR vizsgálatokhoz TaqMan Universal Mastermix-et (Applied Biosystems) és az alábbi próbákat használtuk: Vimentin (Rn00579738\_m1), nestin (Rn00564394\_m1), N-TUB (Rn01431594\_m1), NFM (Rn00566763\_m1), NSE (Rn00595017\_m1), belső kontrollként pedig az RPLP0-t (Rn00821065\_g1) alkalmaztuk. Az amplifikáció során a ciklusok végén detektálható fluoreszcens jelet Step One Real-time System (Applied Biosystems) készülékkel mértük a következő beállítások mellett: DNS szintézis 50 °C 2 perc, denaturáció 95 °C 10 perc, majd

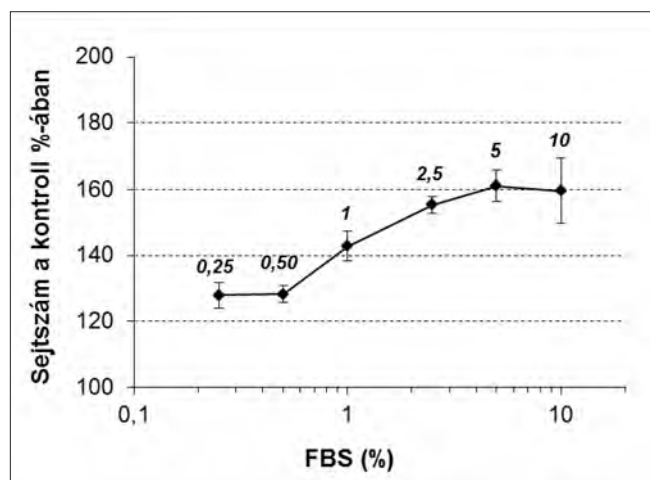
40 cikluson keresztül 95 °C 20 s és primer kötődése 60 °C 1 perc. A génexpressziós szintek változását a mintákban konstitutívan kifejeződő, belső kontrollként használt RPLP0 háztartási gén expressziós szintjére való normalizálással követtük nyomon.

## Eredmények

### Sejtizolálás és sejttenyésztés

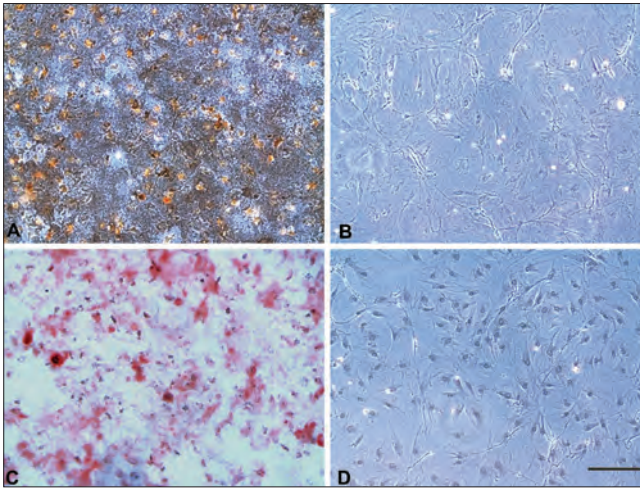
A patkány metszőfogak pulpájából származó sejtek izolálás után 24 órán belül letapadtak a tenyésztőedény műanyag felületére, majd elkezdtek osztódni. Egy hét múlva ezek a primer sejt kultúrák egy T25-ös tenyésztőflaskában elérték a konfluens állapotot. Az első néhány passzázs során (mindig szubkonfluens tenyészetet passzázva) a sejtek magas duplázódási rátát mutattak, azonban az osztódás sebessége az ötödik passzázs után lecsökkent. A tenyészetben megváltozott a sejtek morfológiája is, míg kezdetben a sejtek többsége fibroblaszt-szerű morfológiát mutatott (3A. ábra), a későbbiekben a nagy felületen szétterülő, kerekded morfológia vált uralkodóvá. A további kísérleteinkhez emiatt alacsony passzázs számú tenyészeteket használtunk.

Elsőként arra voltunk kíváncsiak, hogy milyen szérumkoncentráció biztosítja a patkány DPSC-k esetében a legintenzívebb proliferációt, vagyis a differenciálatlan (progenitor) jelleg hogy marad fenn a legtovább. Megfigyeltük, hogy már 0,25% szérum hozzáadása is közel 30%-kal megnövelte a sejt számot 24 óra alatt. Az 5, illetve 10%-os szérumkoncentráció pedig 60%-os sejt szám növekedést okozott a szérummentes körülményekhez képest. Eredményeink alapján a patkány DPSC tenyészetek fenntartásához a legideálisabb az 5–10%-os szérumkoncentráció (1. ábra).



1. ábra: A szérum hatása a patkány DPSC-k életképességére.

A WST-1 proliferációs reagens alkalmazásával mért abszorbancia érték arányos az életképes sejtek számával. Az eredményeket a szérummentes kontrollra vonatkoztattuk. Az értékek 8-8 független kísérlet átlagát mutatják, a hibaszávok az átlag hibatarományát (SEM) jelzik.



2. ábra: Az oszteogén médium hatása patkány DPSC kultúrákra. A háromhetes kezelés végén a kalcium-tartalmú göccs lerakódásokat Kóssa- (A) és alizarinvörös (B) festéssel tettük láthatóvá. A kezeletlen kontroll tenyészetekben sem Kóssa- (C), sem alizarinvörös festéssel (D) nem tudtunk mineralizációs göccsokat kimutatni. A mérce hossza 200  $\mu\text{m}$ .

### Oszteogén irányú differenciáltatás

Az oszteogén médium hatására a patkány DPSC tenyészeteken 3 hét után kalcium-tartalmú lerakódások képződtek, melyek mind Kóssa-, mind alizarinvörös festéssel pozitívan festődtek. A szintén csökkentett (1%-os) szérumszintű, de oszteogén indukciós szereket nem tartalmazó kontroll tápoldatban tartott sejt kultúrák viszont nem mutattak mineralizációra utaló jeleket (2. ábra).

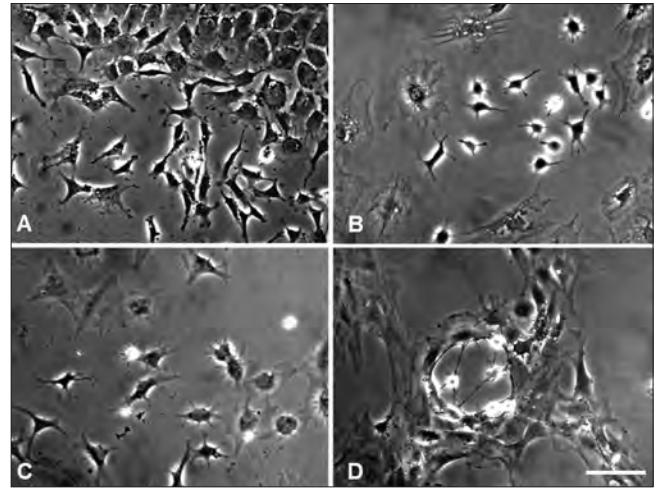
### Neurogén irányú differenciáltatás

A humán DPSC tenyészetekre korábban kifejlesztett protokollunkat [18] alkalmazva teszteltük a patkány pulpa eredetű sejttenyészet idegi irányú differenciálódási potenciálját. Az előkezelés 2. napjára a patkány tenyészetben is felkerekedtek a sejttestek, és vékony nyúlványokat növesztettek. Az indukciós fázis során a hasonló morfológiájú sejtek közeledtek egymás felé és elkezdtek nyúlványaik révén hálózatba rendeződni, majd az érési fázis végére komplex hálózatok alakultak ki a többnyire csillag alakú sejtekből (3. ábra).

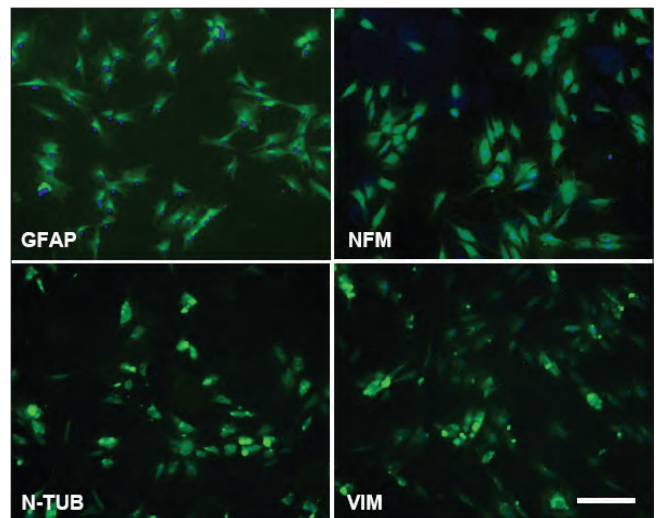
A neurogén differenciáltatás végére a sejtek nagy része expresszált a gliasejtekre jellemző GFAP fehérjét, valamint idegsejtekre jellemző vázfehérjéket is, mint az NFM (neurofilament médium), illetve az N-TUB (vagyis neuro-tubulin). A mesenchymalis jellegre utaló vimentin továbbra is látható maradt, bár az expressziója a sejtek nagy részében lecsökkent (4. ábra).

### Neurogén differenciációs protokoll módosítása és a felületkezelés

Mivel a patkány tenyészet esetében úgy tűnt, nem sikerül reprodukálni a humán tenyészetek 50%-hoz közeli differenciálódási rátáját [18], ezért módosítottunk a

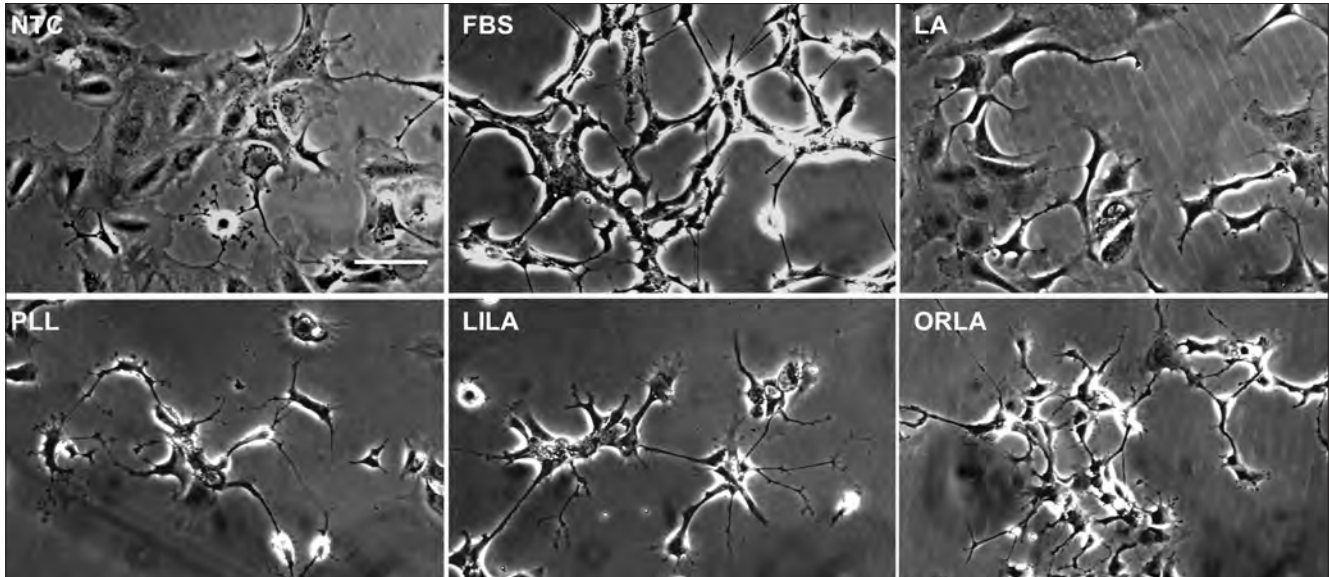


3. ábra: Neurogén differenciáltatás során változó morfológia fáziskontraszt mikroszkópiával követve. A: Kezeletlen tenyészet 3 nappal az izolálást követően. B: Az előkezelés 2. napjára a sejttestek felkerekedtek és vékony nyúlványokat növesztettek. C: Az indukció 3. napjára a sejtek nyúlványaikkal hálózatokba kezdtek rendeződni. D: Az érési fázis 7. napjára komplex hálózatok alakultak ki. A mérce hossza 100  $\mu\text{m}$ .



4. ábra: Immunfestés a neurogén differenciáltatás végén. Az érés 10. napján a patkány DPSC-k expresszálták a gliasejtekre jellemző GFAP fehérjét, valamint az idegsejtekre jellemző NFM és N-TUB fehérjéket. Ezeken kívül a mesenchymalis vimentin kismértékben továbbra is kifejeződött (VIM). A mérce 200  $\mu\text{m}$ -t jelez.

differenciáltató protokollon. Azonban nemcsak a médium összetétele van hatással a sejtek differenciálódási potenciáljára, hanem a monolayer-ben történő tenyésztés esetén a tenyésztőedény felülete is [9]. Ezért hat különböző felületen differenciáltattuk a pulpa eredetű sejtjeinket. A módosított differenciáltatási protokoll végére (a második érési fázis 7. napján) a LA és PLL felületen hálózatokba kapcsolódó idegi morfológiájú elemek jelentek meg. Amennyiben a laminint lizinnel, vagy



5. ábra: A felületkezelés hatása az idegi irányba differenciáltított patkány DPSC tenyészetek morfológiájára. A fáziskontraszt mikroszkópos felvételek a második érési fázis 7. napján készültek. A NTC felületen alig látható idegsejtre emlékeztető sejt, míg a LA és PLL felületen hálózatokba kapcsolódó idegi morfológiájú elemek jelentek meg. Ha LILA vagy ORLA felületen differenciáltattuk a tenyészeteket, több idegi morfológiát mutató sejt kapcsolódott hálózatba. Az FBS-sel kezelt felületen is hálózatokba rendeződtek a sejtek, de kevésbé mutattak idegi morfológiát. A mérce 100  $\mu\text{m}$ -t jelez.

módosulatával, az ornitinnel (aminek R-oldalláncán egy szénatommal kevesebb található) kombinálva kezeltük a tenyésztőedények felületét, több sejt kapcsolódott olyan hálózatba, amely idegi morfológiát mutat. Az FBS-sel kezelt felületen is hálózatokba rendeződtek a sejtek, de kevésbé mutattak idegi morfológiát. A NTC felületen pedig csak elvétve találtunk neuronális morfológiájú sejtet (5. ábra).

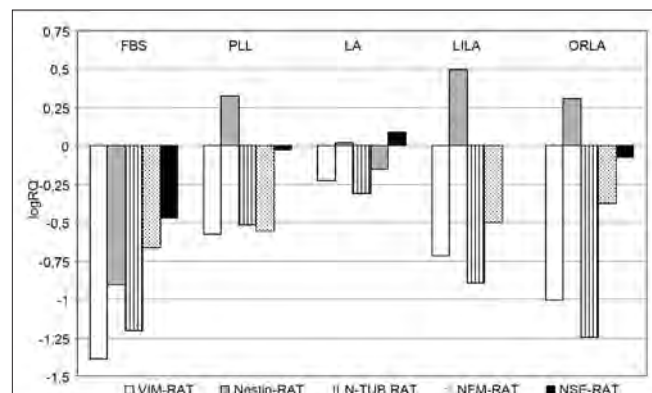
A kvantitatív PCR segítségével vizsgált markerek expressziója is változott a felületkezelés függvényében. Az axonnövekedésért felelős intermedier filamentumfehérje, a nestin kifejeződése nőtt a PLL, valamint a LILA és ORLA kombinációjával kezelt felületen. Az NSE mennyisége egyedül a lamininnel kezelt felületen emelkedett. A mesenchymalis vimentin, valamint az idegi markerek közül az NFM és az NSE expresszióját mindegyik felületkezelés csökkentette. Az FBS-sel kezelt felületen minden vizsgált marker expressziója csökkent (6. ábra).

### Megbeszélés

Munkánk során patkány metszőfogak pulpaszövetéből izoláltunk sejteket, melyekből sikerült több passzázsra keresztül fenntartható sejtenyészeteket rutinszerűen létrehozni. A korai passzázsok döntően fibroblaszterű morfológiát és intenzív sejtproliferációt mutattak, ami progenitor, illetve őssejt tulajdonságú sejtek jelenlétére utal. Megfigyeltük, hogy a passzázsok számának növekedésével a sejtpopulációk duplázódási sebessége lecsökkent. Humán őssejtenyészetek esetében is leírtak már hasonló jelenséget [14, 15, 24], melyet feltehetően

a passzázs során alkalmazott tripszin vált ki, mivel aktiválja a  $\text{Ca}^{2+}$ -indukálta jelátviteli útvonalakat, és ezáltal a sejtek elkezdnek spontán differenciálódni [1, 33]. A hosszú ideig történő passzázs során tehát a sejtek nagy része elveszíti osztódási képességét, illetve kiszелеktálódik egy nem-osztódó, már differenciált populáció. Erre utal a passzázsok következtében fellépő morfológiai változás is.

A patkány pulpasejtek izolálásán túl a tenyésztési körülményeiket is optimalizáltuk. Megállapítottuk, hogy 5-10% szérumkoncentráció a legkedvezőbb a patkány DPSC-k számára a legintenzívebb proliferáció és a dif-



6. ábra: A felületkezelés hatása az idegi irányba differenciáltított patkány DPSC tenyészetek génexpressziójára. Az ötféle felületkezelés (FBS, PLL, LA, LILA, ORLA) esetében a vimentin (VIM), nestin, neurotubulin (N-TUB), neurofilament medium (NFM), neurospecifikus enoláz (NSE) mRNS szintű expressziója. A Q-PCR vizsgálat során kapott eredményeket a kezeltelen (NTC) felület értékeire vonatkoztatva adjuk meg.

ferenciálatlan (progenitor) jelleg minél hosszabb távú fenntartása érdekében.

A korábbi publikációkból ismert, hogy a humán DPSC-k képesek csont irányba differenciálódni [2, 7, 18, 22]. Eredményeink igazolják, hogy az általunk kialakított izolálási és tenyésztési körülmények között előállított patkány pulpa sejt kultúrák is alkalmasak mineralizált szövet létrehozására megfelelő farmakológiai stimululus hatására. Ez a tulajdonságuk alátámasztja potenciális felhasználhatóságukat a fogstruktúrák megújításának *in vitro* modellezésére, valamint *in vivo* modell kifejlesztésére [6, 11, 18].

A fog- és fogkörnyéki szövetek ectomesenchymalis eredetűnek köszönhetően [30] képesek lehetnek nemcsak csont, hanem idegi irányba is differenciálódni. Az általunk izolált patkány DPSC-k neurogén differenciálódása során első lépésként az azacitidin segítségével a progenitor sejtek visszakerülnek egy kevésbé differenciált állapotba, így lehetővé válik az újraprogramozásuk [18]. Az azacitidin egy DNS-giráz gátló, a DNS metilációs mintázatát változtatja meg. A DNS metiláció felelős azért, hogy a sejtekben különböző gének aktiválódnak. A második lépésben, vagyis az indukciós fázisban adott intracelluláris cAMP koncentráció növelők, protein kináz A (PKA) és protein kináz C (PKC) útvonalak aktivátorai és idegi növekedési faktorok indítják be a visszadifferenciáltotott sejtek idegi irányú differenciálódását [3]. A differenciálódásra *in vitro* körülmények között a tenyésztő tápoldat mellett a tenyésztőedény felületének is fontos szerepe van [9]. A génexpressziós vizsgálataink azt mutatták, hogy a mesenchymalis őssejtek tenyésztésének kedvező FBS az idegi differenciálódás során minden általunk vizsgált marker expresszióját csökkentette, viszont az idegsejteknek kedvező felületeken (PLL, LILA, ORLA) differenciálódott tenyészetekben megnőtt az idegi progenitormarker [25], a nestin aránya. Ez arra utal, hogy a tenyésztőfelület is fontos jelátviteli útvonalakat indíthat be, és a sejtek differenciálódásában az őket körülvevő *niche*-nek jelentős szerepe van. A fent említett három felületkezelés elősegítette az idegi progenitorok túlélését a differenciálódás során. Az NSE csökkenése alapján azonban arra következtethetünk, hogy érett idegsejtek viszonylag kis arányban vannak jelen az idegi differenciálódáson túlesett patkány pulpa tenyészetekben.

Bár a rágcsálók metszőfoga folyamatosan nő, és a folyamatosan osztódó sejtek biztosítják a regenerációt [21], eredményeink igazolják, hogy a patkány pulpa a humán fogpulphoz hasonlóan tartalmaz olyan sejt populációt, amely potenciálisan alkalmas más szöveti struktúrák regenerálására is. A patkány pulpa eredetű sejtekkel végzett munkánk hosszú távú célja a humán alkalmazást megalapozó *in vitro* kísérletek kidolgozása, lehetővé téve a fogbél eredetű őssejtek felhasználását a különböző destruktív folyamatok modellezésére, valamint az elpusztult csont- és idegszövetek regeneratív terápia céljára.

## Köszönetnyilvánítás

A bemutatott kísérleti munkához az OTKA–NKTH CK80928, TAMOP-4.2.1-B-09-1-KMR-2010-0001 és TAMOP-4.2.2/B-10/1-2010-0013 kutatási támogatások nyújtottak fedezetet.

## Irodalom

1. APATI A, PASZTY K, ERDEI Z, SZEBENYI K, HOMOLYA L, SARKADI B: Calcium signaling in pluripotent stem cells. *Mol Cell Endocrinol* 2012; 353: 57–67.
2. ARTHUR A, RYCHKOV G, SHI S, KOBLAR SA, GRONTHOS S: Adult human dental pulp stem cells differentiate toward functionally active neurons under appropriate environmental cues. *Stem Cells* 2008; 26: 1787–95.
3. AUDESIRK G, CABELL L, KERN M: Modulation of neurite branching by protein phosphorylation in cultured rat hippocampal neurons. *Brain Res Dev Brain Res* 1997; 102: 247–60.
4. BIANCO P, RIMINUCCI M, GRONTHOS S, ROBEY PG: Bone marrow stromal stem cells: Nature, biology, and potential applications. *Stem Cells* 2001; 19: 180–92.
5. CLARKE DL, JOHANSSON CB, WILBERTZ J, VERESS B, NILSSON E, KARLSTROM H és mtsai: Generalized potential of adult neural stem cells. *Science* 2000; 288: 1660–3.
6. D'AQUINO R, GRAZIANO A, SAMPAOLESI M, LAINO G, PIROZZI G, DE ROSA A és mtsai: Human postnatal dental pulp cells co-differentiate into osteoblasts and endotheliocytes: A pivotal synergy leading to adult bone tissue formation. *Cell Death Differ* 2007; 14: 1162–71.
7. FAJNERMAN-MELNIKOVA M, NEZHADALI A, ROUNAGHI G, MCMURTRIE JC, KIM J, GLOE K és mtsai: Metal ion recognition via 'selective detuning'. The interaction of selected transition and post-transition metal ions with a mono-n-benzylated o2n3-donor macrocycle and its xylyl-bridged ring analogue. *Dalton Trans* 2004: 122–8.
8. GALLI R, BORELLO U, GRITTI A, MINASI MG, BJORNSON C, COLETTA M és mtsai: Skeletal myogenic potential of human and mouse neural stem cells. *Nat Neurosci* 2000; 3: 986–91.
9. GILBERT PM, BLAU HM: Engineering a stem cell house into a home. *Stem Cell Res Ther* 2011; 2: 3.
10. GOODELL MA: Multipotent stem cells and 'side population' cells. *Cytotherapy* 2002; 4: 507–8.
11. GRONTHOS S, MANKANI M, BRAHIM J, ROBEY PG, SHI S: Postnatal human dental pulp stem cells (dpSCs) *in vitro* and *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000; 97: 13625–30.
12. GROVE JE, BRUSCIA E, KRAUSE DS: Plasticity of bone marrow-derived stem cells. *Stem Cells* 2004; 22: 487–500.
13. HIPP J, ATALA A: Sources of stem cells for regenerative medicine. *Stem Cell Rev* 2008; 4: 3–11.
14. HUANG GT: Pulp and dentin tissue engineering and regeneration: Current progress. *Regen Med* 2009; 4: 697–707.
15. KADAR K, KIRALY M, PORCSALMY B, MOLNAR B, RACZ GZ, BLAZSEK J és mtsai: Differentiation potential of stem cells from human dental origin – promise for tissue engineering. *J Physiol Pharmacol* 2009; 60 Suppl 7: 167–75.
16. KADAR K, PORCSALMY B, KIRALY M, MOLNAR B, JOBBAGY-OVARI G, SOMOGYI E és mtsai: [isolating, culturing and characterizing stem cells of human dental pulp origin]. *Fogorv Sz* 2009; 102: 175–81.
17. KEMOUN P, LAURENCIN-DALICIEUX S, RUE J, FARGES JC, GENNERO I, CONTE-AURIOL F és mtsai: Human dental follicle cells acquire cementoblast features under stimulation by bmp-2/-7 and enamel matrix derivatives (emd) *in vitro*. *Cell Tissue Res* 2007; 329: 283–94.
18. KIRALY M, PORCSALMY B, PATAKI A, KADAR K, JELITAI M, MOLNAR B és mtsai: Simultaneous pkc and camp activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int* 2009; 55: 323–32.
19. KRUTSAY M: *Szövevényi technika*. Medicina Budapest, 1980; 114.

20. KUEHNLE I, GOODELL MA: The therapeutic potential of stem cells from adults. *BMJ* 2002; 325: 372–6.
21. KYRYLKOVA K, KYRYACHENKO S, BIEHS B, KLEIN O, KIOUSSI C, LEID M: Bcl11b regulates epithelial proliferation and asymmetric development of the mouse mandibular incisor. *PLoS One* 2012; 7: e37670.
22. LAINO G, D'AQUINO R, GRAZIANO A, LANZA V, CARINCI F, NARO F és mtsai: A new population of human adult dental pulp stem cells: A useful source of living autologous fibrous bone tissue (lab). *J Bone Miner Res* 2005; 20: 1394–402.
23. LE BLANC K, PITTENGER M: Mesenchymal stem cells: Progress toward promise. *Cytotherapy* 2005; 7: 36–45.
24. MA J, WANG Y, YANG J, YANG M, CHANG KA, ZHANG L és mtsai: Treatment of hypoxic-ischemic encephalopathy in mouse by transplantation of embryonic stem cell-derived cells. *Neurochem Int* 2007; 51: 57–65.
25. MICHALCZYK K, ZIMAN M: Nestin structure and predicted function in cellular cytoskeletal organisation. *Histol Histopathol* 2005; 20: 665–71.
26. MIURA M, GRONTHOS S, ZHAO M, LU B, FISHER LW, ROBAY PG és mtsai: Shed: Stem cells from human exfoliated deciduous teeth. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; 100: 5807–12.
27. MOLNAR B, KADAR K, KIRALY M, PORCSALMY B, SOMOGYI E, HERMANN P és mtsai: [isolation, cultivation and characterisation of stem cells in human periodontal ligament]. *Fogorv Sz* 2008; 101: 155–61.
28. PROCKOP DJ: Marrow stromal cells as stem cells for nonhematopoietic tissues. *Science* 1997; 276: 71–4.
29. SEO BM, MIURA M, GRONTHOS S, BARTOLD PM, BATOULI S, BRAHIM J és mtsai: Investigation of multipotent postnatal stem cells from human periodontal ligament. *Lancet* 2004; 364: 149–55.
30. TUCKER A, SHARPE P: The cutting-edge of mammalian development; how the embryo makes teeth. *Nat Rev Genet* 2004; 5: 499–508.
31. VEMURI MC, CHASE LG, RAO MS: Mesenchymal stem cell assays and applications. *Methods Mol Biol* 2011; 698: 3–8.
32. VOLLNER F, ERNST W, DRIEMEL O, MORSCZECK C: A two-step strategy for neuronal differentiation in vitro of human dental follicle cells. *Differentiation* 2009; 77: 433–41.
33. YU J, HE H, TANG C, ZHANG G, LI Y, WANG R és mtsai: Differentiation potential of stro-1+ dental pulp stem cells changes during cell passaging. *BMC Cell Biol*; 11: 32.

KÁLLÓ K, GÁNTI B, KERÉMI B, STIEDL P, NAGY Á, VARGA G, NAGY K.

#### Cultivation and Differentiation of Rat Dental Pulp Stem Cells for Tissue Engineering Purposes

Although existence of dental stem cells has been known since 2000, and these are already well characterized, hardly any data are available regarding rat dental pulp cells. The aim of our study was to isolate, cultivate and differentiate primary cell cultures, showing stem cell properties, from rat incisor pulp. Cell viability was determined using the WST-1 test. Osteogenic differentiation potential was examined by von Kossa and Alizarin Red staining, and the neurogenic potential by morphological studies, immunocytochemistry and quantitative PCR. Moreover, the effect of different surface coatings on neurogenic differentiation was also investigated. We have succeeded in isolating stem cell-containing cell cultures from the pulp tissue of rat lower incisors and optimized the culture conditions. We have provided evidence that these cell cultures are capable for differentiating towards both osteogenic and neurogenic lineages. We have developed a novel neurogenic differentiation protocol, which is more effective than the previous one. Lysine-laminin and ornithin-laminin coated surfaces were found to be better for rat pulp-cell differentiation. Our results confirm that dental-pulp stem cells are capable of regenerating injured bone and neural tissue. Our model provides the foundation for the clinical use of dental pulp stem cells for tissue engineering purposes.

Key words: rat, pulp, stem cell, osteogenic, neurogenic, differentiation, culture, tissue engineering