

Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Fogpótlástani és Bioanyagtan Tanszék\*  
 Debreceni Egyetem, Általános Orvostudományi Kar, Biofizikai és Sejtbiológiai Intézet\*\*  
 Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Gyermekfogászati és Fogszabályozási Tanszék\*\*\*  
 Debreceni Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Konzerváló Fogászati Tanszék\*\*\*\*  
 Semmelweis Egyetem, Fogorvostudományi Kar, Orálbiológiai Tanszék\*\*\*\*\*

## Fogból eredetű őssejtek fluoreszcens és mágneses válogatásának összehasonlító vizsgálata

KERÉNYI FARKAS\*, TARAPCSÁK SZABOLCS\*\*, DR. HRUBI EDIT\*,  
 BARÁTHNÉ SZABÓ ÁGNES\*, DR. HEGEDŰS VIKTÓRIA\*\*\*, DR. BALOGH SÁRA\*,  
 DR. BÁGYI KINGA\*\*\*\*, DR. VARGA GÁBOR\*\*\*\*\*, DR. HEGEDŰS CSABA\*

Munkánk során humán bölcsességfog pulpájából izoláltunk őssejteket. A pulpából származó heterogén sejtpopulációból ezeket az őssejteket fluoreszcensen vagy mágnesesen jelölt, valamilyen őssejt specifikus sejtfelszíni marker ellen termeltetett ellenanyaggal lehet kiválogatni. Munkánk célja az volt, hogy a fluoreszcens (fluorescent activated cell sorting – FACS) és a mágneses (magnetic activated cell sorting – MACS) sejtszeparálást összehasonlítsuk hatékonyságuk és a sejtekre gyakorolt hatásai alapján. Eredményeink azt mutatták, hogy a válogatás hatékonysága hasonló (MACS 79,53 ± 5,78%, FACS 88,27 ± 3,70%) mindkét általunk használt módszer esetén, a MACS azonban sokkal kíméletesebbnek bizonyult, az abból származó sejtpopulációk gyorsabban növekedtek.

**Kulcsszavak:** DPSC, FACS, MACS

### Bevezetés

Az őssejt kifejezést Ernst Haeckel vezette be, és az összes élőlény közös őst jelentette [9]. Később kibővítette értelmét arra a sejtre is, amelyből szervezetünk összes sejtje származik: a megtermékenyített petesejtre [8]. Ma olyan sejteket értünk alatta, melyek különlegessége, hogy aszimmetrikus mitotikus sejtosztódással képesek önmagukat megújítani és a szervezet speciális funkciót ellátó testi sejtjeivé differenciálódni [14]. Ilyen őssejtek a legtöbb, ha nem az összes többsejtű élőlényben megtalálhatók. Az emlősök őssejtjei két fő típusra oszthatók: az embrionális őssejtek a blasztocisztákban (hólyagcsíra állapotban lévő embrió), a felnőtt őssejtek (vagy szöveti őssejtek) pedig a felnőtt szövetekben találhatók meg. A fejlődő embrióban az őssejtek az összes specializált magzati szövetre képesek átalakulni. A felnőtt szervezetben az őssejtek és az előd (progenitor) sejtek a test javító mechanizmusaként szolgálnak, a specializált sejteket felfrissítve, ugyanakkor a folyamatosan megújuló szerveknek – mint a vér, bőr vagy az emésztőrendszer szövetei – normális megújulásában is közreműködnek [1]. A mai molekuláris biológiai módszerek lehetőséget adnak arra, hogy sejt kultúrában tenyésztett őssejteket különböző szövet típusoknak (izmok, idegek) megfelelő specializált sejtekké transzformáljunk, ezért a kutatások egyre inkább a terápiás felhasználás lehetőségeit keresik.

Őssejteket bárhol találhatunk testünkben, így szájüregünk különböző szöveteiben is (összefoglalva: [4]). Fogból először Gronthos és mtsai izoláltak őssejteket 2000-ben [7]. A fogból eredetű őssejtek (dental pulp stem cells – DPSC) egyik előnye, hogy egyébként is eltávolításra kerülő bölcsességfogakból könnyen kinyerhetők, így az őssejtek izolálásához nincs szükség külön beavatkozásokra. A másik, hogy számos irányba differenciálthatók, ennek megfelelően a terápiás felhasználás lehetőségei is szinte korlátlanok (összefoglalva: [3]).

A fogból azonban kevert sejtpopuláció található, ebből kell kinyernünk az őssejteket. Ezt őssejt specifikus sejtfelszíni fehérjék ellen termeltetett ellenanyagok segítségével tehetjük meg. Ha ezeket az ellenanyagokat fluoreszcensen vagy mágnesesen jelöljük, akkor különböző módszerekkel a jelölt sejteket, melyek kifejezik felszínükön a specifikus sejtfelszíni fehérjét, izolálhatóvá válnak. Az egyik ilyen, fogból eredetű őssejtekre jellemző fehérje a STRO-1 [10].

Fluoreszcens molekulával kapcsolt ellenanyaggal jelölt sejtek szeparálására áramlási citométert használhatunk (Fluorescence Activated Cell Sorting – FACS) [2], ami adott hullámhosszúságú lézer segítségével detektálja a fluoreszcensen jelölt sejteket. Ha a lézer útját fluoreszcensen jelölt sejt keresztezi, azt töltéssel látja el, ez alapján különíti el a jelölt sejteket a jelöletlen (és így töltés nélküli) sejtektől.

Mágneses mikrogönggyel kapcsolt ellenanyaggal jelölt sejteket mágneses oszlopon izolálhatjuk (Magnetic Activated Cell Sorting – MACS) [12]. Ebben az esetben egy erős mágnesre helyezett mágnesezhető oszlopra visszük föl a sejtszuspenziót. A jelölt sejtek az oszlopon kitapadnak, míg a jelöletlenek lemoshatók. Az oszlopot eltávolítva a mágnesről, mágnesesség hiányában a jelölt sejtek is lemoshatók válnak az oszlopról.

Munkánk célja az volt, hogy bölcsességfog pulpájából életképes primer STRO-1 pozitív őssejteket izoláljunk, valamint összehasonlítsuk az izolálásra használatos, irodalomból ismert két módszer (MACS, FACS) hatását a sejtekre.

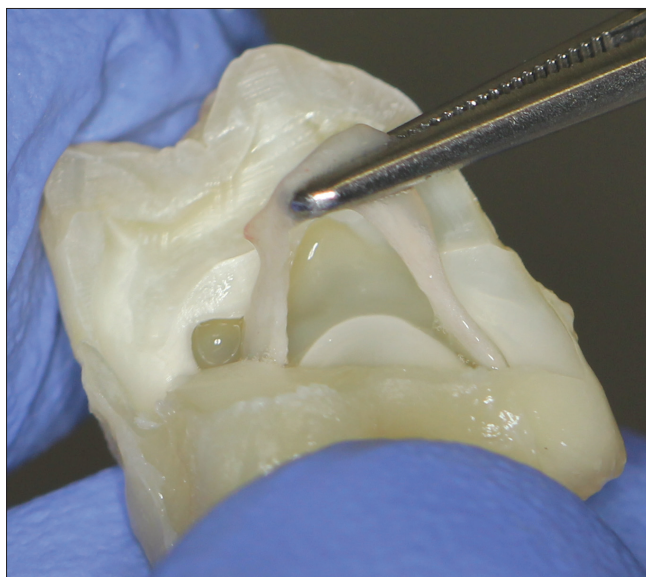
### Vizsgálati anyagok és módszerek

#### Szövetminták

Munkánkhoz a Debreceni Egyetem Fogorvostudományi Karán ellátott páciensekből sebészi úton eltávolított, impaktált bölcsességfogakat használtunk, ügyelve arra, hogy olyan fogakat válasszunk, melyek nem közlekedtek a szájüreggel, illetve amelyek az eltávolítás alatt nem sérültek. A páciensek a Beleegyező nyilatkozat (FO321/1.C) aláírásával járultak hozzá eltávolított szöveteik felhasználásához.

#### Sejtizolálás és sejtenyésztés

Az irodalomban fellelhető, többféle módszer adaptálásával, kombinálásával és továbbfejlesztésével végeztük a sejtek izolálását és tenyésztését [7, 11, 13]. A bölcsességfogakat műtéti eltávolításuk után azonnal steril Hank-féle sóoldatba helyeztük. A bölcsességfogakat turbinába fogható gyémánt físzúra fúróval vízűtés mellett hossz tengelyének megfelelően szeparáltuk, ügyelve a sterilítésre, illetve a pulpakamra és a gyökércsa-



1. ábra: A pulpa eltávolítása.

A pulpát steril fülkében távolítottuk el a hosszában körbevágott, majd szétrepesztett fog pulpakamrájából.

torna sértetlenségére, majd a fogakat azonnal szobahőmérsékletű streptomycin-penicillinnel kiegészített steril Hank-féle sóoldatba helyeztük és a laboratóriumba szállítottuk. Lamináris fülkében steril körülmények között a vágás mentén kettérepesztettük a fogakat, majd a pulpát eltávolítottuk (1. ábra). A pulpát steril szikével földaraboltuk és egy órán át emésztettük 37°C-on, mintaként 1,5 ml, 3 mg/ml kollagenáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 4 mg/ml diszpáz (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) enzimet tartalmazó Hank-féle sóoldatban. A mintákat emésztés közben 15-20 percenként vortexeltük, majd ezt követően 5 percig centrifugáltuk 1200 rpm-en. A felülúszót eltávolítottuk, a sejteket 10% fetal bovine serum (FBS), 1% penicillin-streptomycin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) és 1% GlutaMAX (Gibco, Life Technologies, Grand Island, NY, USA) kiegészítést tartalmazó Minimum Essential Medium Eagle Alpha modification (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tenyésztőmédiumban szuszpendáltuk, és 25 cm<sup>2</sup>-es sejtenyésztő flasksba ültettük ki. Az izolált heterogén sejtpopulációt 37°C-os 100%-os páratartalom és 5%-os CO<sub>2</sub>-tartalom mellett tenyésztettük. A sejtenyésztő médiumot hetente háromszor cseréltük.

#### A sejtek válogatása és immuncitokémia

A sejteket a második passzálskor válogattuk. Tripszin-EDTA (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) oldattal választottuk le a sejteket a tenyésztőedényről, majd öt percig centrifugáltuk 1200 rpm-mel, végül 1% HEPES, 10% FBS tartalmú Hank-féle sóoldatban (HHF) reszuszpendáltuk. Mouse  $\alpha$ -STRO-1 IgM (Millipore, Billerica, MA, USA) ellenanyaggal 40 percen keresztül 4°C-on jelöltük, majd háromszor mostuk HHF-fel. A másodlagos ellenanyagok Rat  $\alpha$ -mouse IgM MicroBeads (Milenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország) valamint Alexa Fluor 488 goat  $\alpha$ -mouse IgG, IgM (H+L) (Molecular Probes, Eugene, OR, USA) voltak, ezekkel szintén 40 percig, 4°C-on jelöltük a sejteket. Kísérleteinkhez három, különböző páciensektől származó fogat használtunk föl. A méréseket a három biológiailag független mintán mindhárom válogatási módszerrel egy-egy alkalommal végeztük. Az elemszám így minden válogatási módszer esetében  $n = 3$ . A MACS-hez mágnessel kapcsolt másodlagos ellenanyaggal jelölt sejteket megjelöltük fluoreszcensen jelölt másodlagos ellenanyaggal is, így három különböző csoportot vizsgáltunk: FACS, MACS és MACS-FACS. A mágneses válogatást MACS Manual Separatorral (Milenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Németország), a fluoreszcens válogatást BD FACS Aria III áramlási citométerrel (BD Biosciences, San Jose, CA, USA) végeztük. A FACS válogatási kaput a csak másodlagos ellenanyaggal jelölt kontroll alapján állítottuk be. A kiválogatott STRO-1 pozitív sejteket a korábban említett médiumban és körülmények között tenyésztettük. A válogatást megelőzően és azt követően, valamint egy héttel később Bürker-kamra segítségével határoztuk meg a sejtek számát.

A válogatott sejtek karakterizálására az  $\alpha$ -STRO-1

ellenanyaggal történt mágneses szeparálás után a sejtek egy részét 24 lyukú plétbe helyeztük (30000/lyuk) és mezenchimális ( $\alpha$ -STRO-1 IgM,  $\alpha$ -CD44 IgG), illetve haematopoietikus őssejtekre ( $\alpha$ -CD14 és  $\alpha$ -CD19) specifikus ellenanyagokkal jelöltük a gyártó (Millipore, Billerica, MA, USA) utasításai szerint. A jelölt sejteket AxioVert A1 (Zeiss, Jena, Németország) típusú inverz fluoreszcens mikroszkóppal vizsgáltuk.

#### Osteoblast irányú differenciálódási képesség vizsgálata

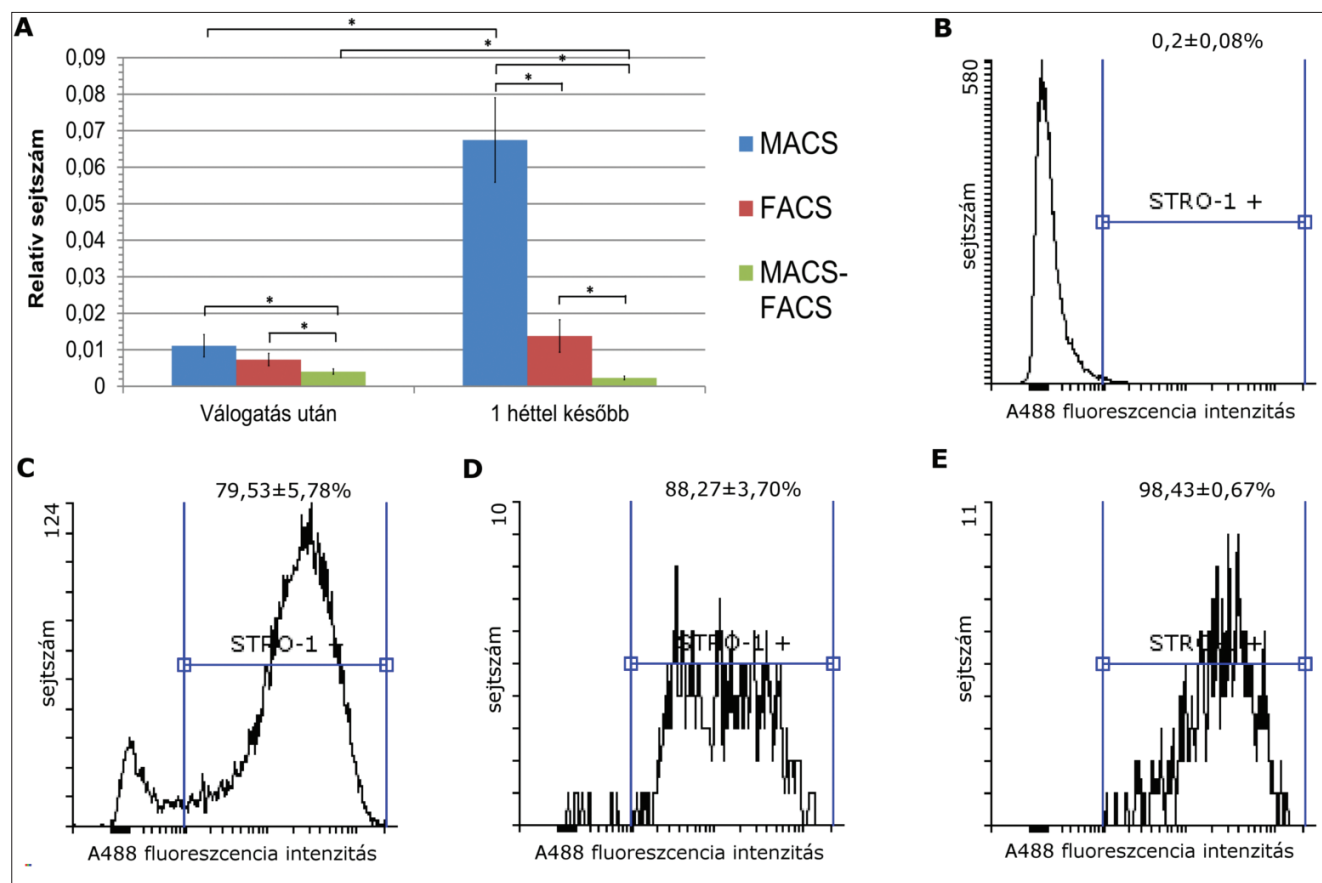
A kiválogatott őssejtek egy részét osteoblast irányba differenciáltató, 100 nM dexametasont, 0,2 nM aszkorbinsavat, 10 mM  $\beta$ -glycerophosphatot (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) tartalmazó és a már említett módon kiegészített  $\alpha$ -MEM médiumban tenyésztettük, majd három hét elteltével a sejtközötti állományban a kalciumlerakódást Alizarin Red S (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) festéssel vizsgáltuk, az alábbiak szerint. A sejteket háromszor PBS-ben mostuk, majd 30 percig metanolban fixáltuk, a metanolt leszívtuk, és öt percig szárítottuk. Ezt követően 2%-os Alizarin Red S oldattal (pH 7,0) két órán keresztül inkubáltuk. Desz-

tillált vízzel háromszor mostuk, majd fényképezőgép (Canon EOS 60D) segítségével dokumentáltuk a kapott eredményt. Kontrollként kezeletlen sejteket használtunk.

#### Eredmények

##### Őssejtválogatás és válogatás utáni populációméret-változás

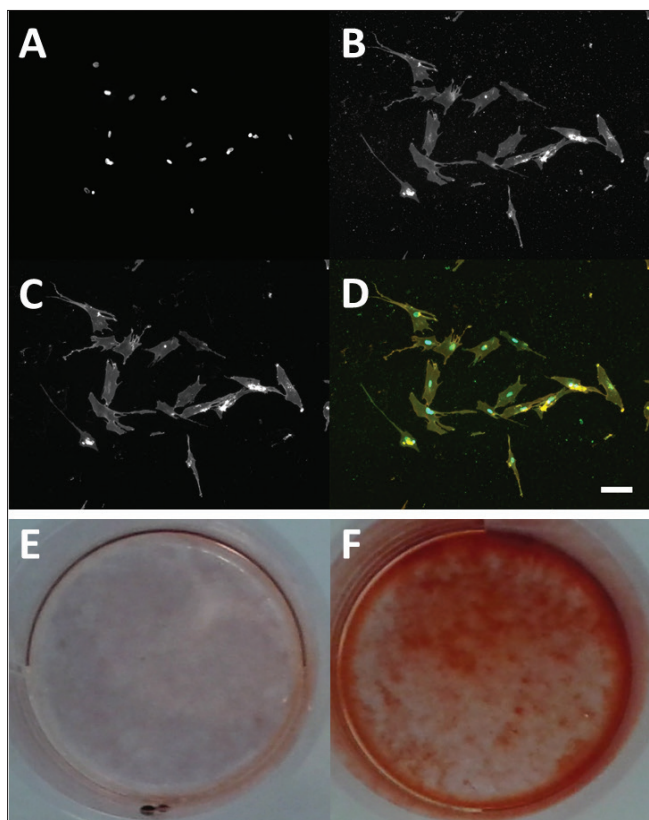
A fogból kitenyésztett sejtek a szövetből származó sejtekre jellemző fibroblaszt fenotípust mutattak. A sejteket második passzáskor jelöltük MACS-hez és FACS-hez is. A háromszor elvégzett válogatási kísérlet alapján a mágneses oszlop a kiindulási sejtmennyiségnek  $1,2 \pm 0,2\%$ -át válogatta ki, ami valamivel több, mint a fluoreszcensen válogatott  $0,9 \pm 0,2$  százalék, de a különbség nem szignifikáns ( $p \geq 0,05$ ). A mágnessel már leválogatott majd fluoreszcensen újra válogatott sejtek aránya a kiindulási sejtmennyiséghez képest  $0,5 \pm 0,02\%$ , a MACS és a FACS csoportokhoz képest is szignifikánsan kevesebb ( $p \geq 0,05$ ) (2. ábra A). A mintákban a válogatással feldúsított őssejtek aránya



2. ábra: Az őssejtválogatás eredménye.

- A) A sejtszám változása a különböző mintákban a kiindulási sejtszámhoz viszonyítva (\* – szignifikáns különbség,  $p \geq 0,05$ ).  
 (MACS – mágnesesen válogatott csoport; FACS – fluoreszcensen válogatott csoport;  
 MACS-FACS – mágnesesen és fluoreszcensen is válogatott csoport).  
 B–E) Egy-egy jellemző hisztogram a jelölt és jelöletlen sejtek fluoreszcenciaintenzitás-eloszlásáról a kontroll mintában, illetve az egyes műveletek után: csak másodlagos ellenanyaggal jelölt kontroll (B), MACS válogatás után (C), FACS válogatás után (D), valamint MACS és FACS válogatás után (E).





3. ábra: A leválogatott sejtek karakterizálása és osteoblast irányú differenciálása.  
A–D) Leválogatott sejtek immunofluoreszcens festés után. Sejtmag (A),  $\alpha$ -CD44 (B),  $\alpha$ -STRO-1 (C), egyesített (D).  
E–F) A sejtközötti állományban a kalcium lerakódást kimutató Alizarin Red festés tenyésztőmédiumban (E) és differenciáltató médiumban (F) 3 hétig tenyésztett sejteken. A pozitív festődés osteoblast irányú differenciációra utal.

a következőképpen alakult: MACS  $79,53 \pm 5,78\%$ , FACS  $88,27 \pm 3,70\%$ , MACS-FACS  $98,43 \pm 0,67\%$  (2. ábra B–E). A MACS és FACS válogatott mintákban az őssejt-feldúsulások közötti különbség nem szignifikáns ( $p \geq 0,05$ ), míg a MACS–FACS válogatás során szignifikánsan nagyobb mértékben dúsultak föl az őssejtek a sejtpopulációban a MACS-hoz és a FACS-hoz képest is ( $p \geq 0,05$ ). Míg a mágneses válogatásból nyert sejtek száma egy héttel a válogatás után több mint négyszeresére nőtt, ugyanezen idő alatt a citométeres válogatásból nyerteké csak alig duplájára, de nem szignifikánsan nőtt ( $p \geq 0,05$ ), míg a MACS–FACS válogatásból származóké szignifikánsan csökkent ( $p \geq 0,05$ ) (2. ábra A). A FACS tehát valamelyest nagyobb tisztaságú sejtpopulációt eredményez, különösen MACS-szel kombinálva, viszont a válogatás utáni sejtpopuláció kisebb és lassabban vagy egyáltalán nem indul növekedésnek.

#### A leválogatott sejtek tulajdonságai

A mezenchimális őssejt markerek elleni ellenanyagokkal ( $\alpha$ -STRO-1,  $\alpha$ -CD44) festődtek a sejtek (3. ábra A–D),

míg a negatív kontrollként használt, haematopoietikus őssejtekre specifikus  $\alpha$ -CD14 és  $\alpha$ -CD19 ellenanyagokkal nem.

A válogatott sejtpopuláció osteoblast irányú differenciálódási képességét háromhetes kezelés után vizsgálva azt tapasztaltuk, hogy a tenyésztőmédiumban tartott sejtenyészetek nem, míg a differenciáltató médiumban tartott sejtenyészetek festődtek Alizarin Reddel (3. ábra E–F).

#### Megbeszélés

Tulajdonságaik vizsgálatához az őssejteket el kell különíteni a szöveti sejtektől. A szakirodalomban változatos módszereket alkalmaznak: szeparálják a sejteket sűrűség, méret és morfológia, valamint kolonizációs képesség alapján, ám ezek a módszerek sokszor nem alkalmazhatók kellő hatékonysággal és megbízhatósággal. A sejtfelszíni fehérjék között vannak olyanok, amelyek csak bizonyos sejtípusokra jellemzőek, így vannak őssejt-specifikus sejtfelszíni markerek is. Ezek alapján általában nagy hatékonysággal és megbízható pontossággal lehet az őssejteket elkülöníteni: FACS-szel körülbelül 95% tisztaságú, MACS-szel körülbelül 75% tisztaságú sejtpopulációt lehet elérni. Ugyanakkor MACS-szel nagyságrendekkel több sejtet lehet azonos idő alatt leválogatni, mint FACS-szel ( $\sim 10^{11}$ , illetve  $10^7$  sejt óránként) [17].

A MACS nemcsak gyorsabb, hanem egyszerűbb és olcsóbb eljárás, nem igényel drága műszert, hordozható, ezért gyakorlatilag bárhol használható, ahol a sejtek számára szükséges steril körülményeket biztosítani lehet. Hátránya ugyanakkor, hogy csak sejtfelszíni fehérjék alapján lehet válogatni vele [6]. Arra is vannak adatok a szakirodalomban, hogy a válogatás hatékonysága függhet a sejtek származási helyétől és típusától, a választott sejtfelszíni markertől, illetve annak expressziós intenzitásától [5, 15, 16].

Munkánkban összehasonlítottuk a két módszert az általunk használt sejteken. A mágneses válogatáshoz jelölt sejteket fluoreszcensen is megjelöltük, egyrészt hogy meg tudjuk mérni a mágneses válogatás hatékonyságát, másrészt hogy megvizsgáljuk, javítja-e a két módszer kombinálása (MACS-FACS) a külön-külön alkalmazott módszerek hatékonyságát. Eredményeink azt mutatják, hogy az őssejtek feldúsulása a sejtpopulációban csaknem olyan hatékony MACS-szel ( $79,53 \pm 5,78\%$ ), mint FACS-szel ( $88,27 \pm 3,70\%$ ), a mágneses válogatás hatékonysága nem szignifikánsan gyengébb a FACS-nél. Háromszor megismételt méréseink eredményei azt mutatják, hogy FACS technikával történt válogatás után a populációnövekedés szignifikánsan és jelentősen gyengébb, mint MACS-szel történő szeparálás után. Ezzel ellentétben a két módszer kombinálása nem hatékony, mert az így leválogatott sejtpopulációk már nagyon kicsik, és az általunk vizsgált időszak alatt nemhogy nem indult meg a növekedésük, hanem még

csökkent is a populációk mérete. Összességében megállapítható, hogy a MACS hatékonyságában hasonló a FACS-hez, ám annál kíméletesebb módszer.

A mágneses válogatásból származó sejtek karakterizálása  $\alpha$ -STRO-1,  $\alpha$ -CD44 ellenanyagokkal bizonyította, hogy a válogatásból származó sejtek valóban őssejtek. Ezt megerősítette a sejtközi állomány Alizarin Red-del történt festődése, ami azt mutatja, hogy a sejtközi állományban megkezdődött a kalciumlerakódás, azaz a sejtek elindultak az osteoblast irányú differenciálódás útján. Eredményeink alapján megállapítható, hogy a MACS válogatás után kapott őssejt populáció alkalmas további kísérletek elvégzésére.

### Köszönetnyilvánítás

A kutatómunka és az ahhoz szükséges infrastruktúra a TAMOP-4.2.2.A-11/1/KONV-2012-0036 projekt támogatásával valósult meg.

### Irodalom

- AVASTHI S, SRIVASTAVA RN, SINGH A, SRIVASTAVA M: Stem Cell: Past, Present and Future – A Review Article. *IJMU* 2008; 3: 22–30.
- BODGER MP, IZAGUIRRE CA, BLACKLOCK HA, HOFFBRAND AV: Surface antigenic determinants on human pluripotent and unipotent hematopoietic progenitor cells. *Blood* 1983; 61: 1006–1010.
- BOJIC S, VOLAREVIC V, LJUJIC B, STOJKOVIC M: Dental stem cells – characteristics and potential. *Histol Histopathol* 2014; 29: 699–706.
- DZIUBIŃSKA P, JASKÓLSKA M, PRZYBOROWSKA P, ADAMIAK Z: Stem cells in dentistry – Review of literature. *Pol J Vet Sci* 2013; 16: 135–140.
- FONG CY, PEH GSL, GAUTHAMAN K, BONGSO A: Separation of SSEA-4 and TRA-1-6a labelled undifferentiated human embryonic stem cells from a heterogeneous cell population using magnetic-activated cell sorting (MACS) and fluorescence-activated cell sorting (FACS). *Stem Cell Rev and Rep* 2009; 5: 72–80.
- GERASCHENKO BI: Choosing cell sorting option to study the fate of bystander cells: FACS or MACS? *Cytometry A* 2011; 79: 179–180.
- 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: 13625–13630.
- HAECKEL, E: *Anthropogenie*. (3rd ed) Wilhelm Engelmann, Leipzig; 1877.
- HAECKEL, E: *Natürliche Schöpfungsgeschichte*. Georg Reimer, Berlin; 1868.
- JO YY, LEE HJ, KOOK SY, CHOUNG HW, PARK JY, CHUNG JH ET AL.: Isolation and characterization of postnatal stem cells from human dental tissues. *Tissue Eng* 2007; 13: 767–773.
- KÁDÁR K, PORCSALMY B, KIRÁLY M, MOLNÁR B, JOBBÁGY-ÓVÁRI G, SOMOGYI E ÉS MTSAI: Humán fogból eredetű őssejtek izolálása, tenyésztése és jellemzése. *Fogorv Sz* 2009; 102: 175–181.
- KATO K, RADBRUCH A: Isolation and Characterization of CD34<sup>+</sup> Hematopoietic Stem Cells From Human Peripheral Blood by High-Gradient Magnetic Cell Sorting. *Cytometry* 1993; 14: 384–392.
- KIRÁLY M, PORCSALMY B, PATAKI A, KÁDÁR K, JELITAI M, MOLNÁR B ET AL.: Simultaneous PKC and cAMP activation induces differentiation of human dental pulp stem cells into functionally active neurons. *Neurochem Int* 2009; 55: 323–332.
- MORRISON SJ, SHAH NM, ANDERSON DJ: Regulatory Mechanisms in Stem Cell Biology. *Cell* 1997; 88: 287–298.
- ROLF HJ, KIERDORF U, KIERDORF H, SCHULZ J, SEYMOUR N, SCHLIEPHAKE H ET AL.: Localization and characterization of STRO-1<sup>+</sup> cells in the deer pedicle and regenerating antler. *Plos ONE* 2008; 3: e2064.
- VALLI H, SUKHWANI M, DOVEY SL, PETERS KA, DONOHUE J, CASTRO CA ET AL.: Fluorescence- and magnetic-activated cell sorting strategies to isolate and enrich human spermatogonial stem cells. *Fertil Steril* 2014; 102: 566–580.
- ZHU B, MURTHY SK: Stem cell separation technologies. *Curr Opin Chem Eng* 2013; 2: 3–7.

KERÉNYI F, TARAPCSÁK SZ, HRUBI E, BARÁTHNÉ SZABÓ Á, HEGEDŰS V,  
BALOGH S, BÁGYI K, VARGA G, HEGEDŰS CS

### Comparison of sorting of fluorescently and magnetically labelled dental pulp stem cells.

Stem cells are present in many tissues, such as dental pulp. Stem cells can be easily isolated from dental pulp because third molars are often removed from patients. Stem cells could be separated from the tissue derived heterogeneous cell population. There are two main methods to separate a cell type from the other ones: the fluorescence activated cell sorting (FACS) and the magnetic activated cell sorting (MACS). The aim of this study was to compare these methods' effect on cell surviving and population growth after sorting on dental pulp cells. The anti-STRO-1 antibody was used as primary antibody to specifically label stem cells. Two secondary antibodies were used: magnetic or fluorescent labelled. We sorted the cells by MACS or by FACS or by combination of both (MACS-FACS). Our results show that the effectivity of MACS and FACS sorting are comparable while of MACS-FACS was significantly higher (MACS 79,53  $\pm$  5,78%, FACS 88,27  $\pm$  3,70%, MACS-FACS 98,43  $\pm$  0,67%). The cell surviving and the post-sorting population growth, on the contrary, are very different. The cell population is growing on first week after MACS but after FACS did not. Moreover, after MACS-FACS, on first week the cell number of population decreased. Taken together, our results suggest to use MACS instead of FACS, at least in case of sorting dental pulp stem cells with anti-STRO-1 antibody.

**Keywords:** DPSC, FACS, MACS.