

A NEUROEKTODERMÁLIS ÖSSEJTEK ELŐMOZDÍTJÁK  
A GERINCVELŐ KONTÚZIÓS SÉRÜLÉSÉT KÖVETŐ  
REGENERÁCIÓT ÉS REKONSTRUKCIÓT

SZTE Eötvös Loránd Kollégium

A gerincvelő sérülése visszafordíthatatlan szövetskárosodást, valamint a motoros, a szenzoros és vegetatív funkciók kiesését eredményezi a sérülés szintje alatt. A spontán helyreállítás csak igen kismértékű lehet és hosszú idő után valósul meg. A sérülés környezete kulcsszerepet játszik az axonális regenerációban: a gliaheg képződése és a gátló faktorok erőteljes kifejeződése egyaránt csökkenti a sérült axonok újránövését. Számos tanulmány számolt be arról, hogy neuronális progenitor sejtek, illetve őssejtek transzplantálása kedvező körülményeket teremthet a regenerálódó axonoknak, segíthet kivédeni a másodlagos károsodást, valamint hozzájárulhat a sérült rostok remielinizálásához.

Bár a kísérletes kezelési módok és eredmények bizakodásra adnak okot, jelenleg még nem rendelkezünk hatékony terápiás eljárásokkal, melyek a humán gerincvelő-sérülések kedvezőtlen kimenetelét megváltoztathatnák.

Munkánk során célul tűztük ki, hogy felderítsük a klonális neuroektordermális őssejtek hatását a gerincvelő kontúziós sérülésének kimenetelére nézve. Kísérleteinkben azt vizsgáltuk, hogy a sérült gerincvelőbe transzplantált, 9 napos egérembrióból származó NE-GFP-4C sejtek [1] védelmet nyújtanak-e a másodlagos szövetskárosodással szemben, képesek-e integrálódni a sérült szövetbe, elősegítik-e az axonális regenerációt, valamint hatásukra hogyan változik az extracelluláris környezet. Továbbá felderítettük az őssejtek által termelt, a regenerációt előmozdító molekulák expresszióját és bizonyítottuk azok szerepét.

Az általunk használt sejtvonala számos neuronális őssejtekre jellemző tulajdonsággal rendelkezik; retinsavval történő kezelés hatására neuronális, illetve gliális differenciálódását jegyezték le [2].

A kontúziós sérülés kiváltása Infinity Horizon típusú impaktorról (Model IH-0400, PSI LLC) történt, a 11. háti csigolya szintjében. A kísérleti állatokat több csoportba osztottuk az őssejtek beadási módja és ideje szerint. Intravénás kezelés esetén rögtön a sérülés kiváltását követően, illetve egy héttel később végeztük el

az őssejt-beültetést. Az intraspinalis csoportba tartozó állatok 1 héttel a sérülés után részesültek őssejt-kezelésben. Egy további kísérleti csoportban az őssejteket fibrinnel együtt jutattuk be a léziós üregbe, ugyanis úgy gondoltuk, hogy a fibrin térháló szerkezete révén elősegítheti a sejtek megtapadását. Intravénás alkalmazás esetén  $10^6$ , az intraspinalis csoportokban  $5 \cdot 10^5$  őssejtet ültettünk be. Kontrollként fiziológiás sóoldatos, illetve fibrines kezelésben részesülő csoportokat állítottunk fel.

Az állatok 2, 3, illetve 9 hétig maradtak életben, mely során rendszeres időközönként funkcionális tesztekkel követtük a felépülést. A BBB tesztet [3] és a CatWalk automatikus lépésanalízist [4] használtunk a sérülés utáni funkcionális javulás monitorozására. A túlélési időt követően pedig részletes morfológiai elemzéseket végeztünk; immunhisztokémiai és hisztológiai módszereket alkalmazva vizsgáltuk a sejtek sorsát, a corticospinalis pálya regenerációját, az extracelluláris környezet változásait és az őssejtek által termelt molekulák kifejeződését.

A kontrollcsoportokhoz képest gyorsabb és nagyobb mértékű funkcionális javulást tapasztaltunk azokban a kísérleti csoportokban, ahol az őssejteket intravénásan vagy intraspinalisan alkalmaztuk. A fibrinnel együtt transzplantált őssejtek hatására nem javult számottevően a funkcionális tesztek eredménye, sőt ezen állatok teljesítménye később fokozatosan romlott.

A kontúziós üreg hossza és a cisztikus terület nagysága szignifikánsan kisebb, a megmaradt szürke- és fehérállomány pedig nagyobb volt az őssejttel kezelt állatokban. Eredményeink bizonyítják, hogy az őssejtek más mechanizmusok révén fejtették ki kedvező hatásukat intravénás és intraspinalis alkalmazás során. Míg az intravénásan bejuttatott őssejtek nem épültek be a gerincvelő szövetébe, csupán néhány őssejt eredetű sejtet találtunk a kontúziós üreg falához tapadva, ugyanakkor az intraspinalisan transzplantált őssejtekből differenciálódott asztrociták, neuronok és oligodendrociták jelentős számban integrálódtak a gerincvelői üreg falába, ezáltal is csökkentve annak méretét. Az őssejtek fibrinnel együtt történő bejuttatása esetén a másodlagos károsodás kivédése nem valósult meg, sejtjeink nem differenciálódtak, sőt integrálódásukat sem sikerült kimutatni. Mindezek fényében úgy tűnik, hogy az őssejtek és a fibrin együttes alkalmazása kerülendő.

A kortikospinalis pálya regenerációja a kezelt csoportokban kifejezettebb volt a kontrollokkal összehasonlítva, ugyanis az őssejtek beültetése csökkentette az axonnövekedést gátló molekulák (CS-56, GFAP, Ephrin-A4 és -B2) kifejeződését és a mikroglia aktiváció mértékét. Retrográd jelölési eredményeink szerint transzplantált sejtjeink támogatták a leszálló szupra- és intraspinalis pályák fennmaradását és regenerációját is. A kedvező folyamatok mögött elsősorban az ő-

sejtek által termelt faktorok (IL-6, IL-10, MIP-1 alfa és GDNF) kifejeződése állhatott; ezen faktorok szerepét neutralizáló antitestekkel végzett kísérleteink is megerősítették. Kísérleteink ezen részében ozmotikus pumpa segítségével egérspecifikus anti-GDNF, anti-IL-6, anti-IL-10 és anti-MIP-1 alfa antitesteket juttatunk be az őssejt-transzplantációval egy időben. A BBB funkcionális teszt eredményei szerint az azonosított faktorok blokkolása a funkcionális javulás elmaradásával járt, ami bizonyította azok regenerációban betöltött fontos szerepét.

Eredményeink szerint a klonális neuroektodermális őssejtek részt vettek a másodlagos sérülés kivédésében, valamint az extracelluláris környezet módosítása és az azonosított faktorok termelése révén elősegítették a sérült axonok regenerációját. Differenciálódásuk és gazdaszövetbe történő integrálódásuk révén pedig jelentős funkcionális javulás következett be.

#### IRODALOMJEGYZÉK

- [1] Schlett K., Madarász E.; *Journal of Neuroscience Research* **47**, 405–415., 1997
- [2] Demeter K., Herberth B., Duda E., Domonkos A., Jaffredo T., Herman J. P., Madarász E.; *Experimental Neurology* **188**, 254–267., 2004
- [3] Basso D., Beattie M., Bresnahan J.; *Journal of Neurotrauma* **12**, 1–21., 1995
- [4] Hamers F., Lankhorst A., van Laar T., Veldhuis W., Gispen W.; *Journal of Neurotrauma* **18**, 187–201., 2001