Transzplantált neuroektodermális és indukált pluripotens őssejtek támogatják a kontúziós gerincvelő-sérülést követő felépülést: a sérülés mikrokörnyezetének módosítása

Ph.D. tézis

Bellák Tamás, M.Sc.

Szeged

2021

A tézis alapjául szolgáló közlemények:

I. Pajer K, **Bellák T**, Redl H, Nógrádi A. Neuroectodermal Stem Cells Grafted into the Injured Spinal Cord Induce Both Axonal Regeneration and Morphological Restoration via Multiple Mechanisms.
J Neurotrauma. 2019 Nov 1;36(21):2977-2990.
Impakt faktor: 4,056 (Q1)

II. **Bellák T**, Fekécs Z, Török D, Táncos Z, Nemes C, Tézsla Z, Gál L, Polgári S, Kobolák J, Dinnyés A, Nógrádi A, Pajer K. Grafted human induced pluripotent stem cells improve the outcome of spinal cord injury: modulation of the lesion microenvironment.
Sci Rep. 2020 Dec 29;10(1):22414.
Impakt faktor: 3.998 (2019, D1)

Bevezetés

A gerincvelő sérülése visszafordíthatatlan szövetkárosodást okoz, mely általában nagyon kis mértékű morfológiai és funkcionális felépüléssel jár együtt. A sérülés következtében motoros, szenzoros és vegetatív funkcióvesztés következik be, mely mind a beteg, mind a családja számára drasztikus életminőség romlást eredményez. A gerincvelő-sérülés hatással van a társadalomra is a munkából való kiesés és az állandó orvosi ellátás költségei következtében. Számítások szerint mindennek mértéke 1,5-3 millió dollárra tehető sérültenként. A gerincvelő-sérülés gyakorisága 30-70/millió fő/év, így több mint fél millió új esettel számolhatunk minden évben világszinten.

A gerincvelő sérüléseit traumás és nem traumás típusokra lehet felosztani. A sérülések körülbelül 90%-a a traumás csoportba sorolható és mindössze a fennmaradó 10%-ot okoznak születéskor, illetve később kialakuló kórképek (daganatok, a csigolyaközti porckorong degenerációja, artritisz, műtét következtében létrejövő oxigénhiányos állapotok). A traumás sérülések elsősorban közlekedési balesetekhez vagy sportsérülésekhez köthetőek, de erőszakos cselekmények is kiválthatják (pl. lövési sérülések).

A gerincvelő sérüléseit kiterjedés alapján teljes vagy részleges sérülésekre oszthatjuk. A komplett sérülés a motoros és szenzoros funkciók teljes hiányát jelenti a sérülés szintje alatt. Inkomplett

sérülés esetén a motoros, illetve szenzoros funkciók részlegesen megmaradnak vagy helyreállnak a sérüléstől disztálisan.

A sejttranszplantáció az egyik legelterjedtebb és legígéretesebb lehetőség a morfológiai és funkcionális felépülés elősegítésére a gerincvelő sérülését követően. Számos multipotens vagy pluripotens sejttípust, illetve azok származékait vizsgálták már a gerincvelő-sérülés kísérleti modelljeiben. A terápiás hatás a sejtek gazdaszövetben történő viselkedésétől, túlélésétől és osztódási képességétől, valamint az egyedi differenciációs képességétől függ. A transzplantációtól azt várjuk, hogy a beültetett sejtek és származékaik képesek integrálódni a gazdaszövetbe vagy módosítani a sérülés mikrokörnyezetét, úgy változtatva azt, hogy az axonok regenerációjának kedvezőbb feltételeket teremtsenek. A transzplantált sejtek ezen kívül képesek részt venni a mielinhüvely borításukat vesztett idegrostok újbóli behüvelyezésében, illetve különböző faktorok termelésével támogatást nyújtani a sérült szövetnek.

Laboratóriumunk korábban leírta, hogy az immortalizált, egér előagyi-eredetű neuroektodermális őssejtek (NE-GFP-4C sejtvonal) képesek megakadályozni a károsodott motorneuronok pusztulását a gerincvelő avulziós sérülését követően. Bizonyítást nyert, hogy a beültetett sejtek bioaktív anyagokat (szekretom) termelnek, mely jótékony hatású volt a motoneuronok túlélésére nézve. Jelen tanulmányunkban célul tűztük ki a sejtek hatásának felderítését a gerincvelő kontúziós (zúzódásos) sérülését követően.

További kísérleteinkben humán eredetű indukált pluripotens őssejteket (SB5 sejtvonal) vizsgáltunk a gerincvelő kontúziós sérülése után. Az SB5 sejtek in vitro körülmények között képesek voltak mindhárom csíralemez irányába differenciálódni, mely alkalmassá tette őket a sérült központi idegrendszeri környezetbe történő beültetésre.

Célkitűzések

Célul tűztük ki, hogy

1. felderítsük a beültetett NE-GFP-4C egér neuroektodermális és SB5 humán differenciálatlan őssejtek hatását a funkcionális felépülésre nézve.
2. nyomon kövessük a sejtek sorsát és differenciációs tulajdonságait, valamint a sérülés mikrokörnyezetére kifejtett hatásaikat.

3. meghatározzuk a transzplantált sejtek által termelt faktorokat, melyek felelősek lehetnek a morfológiai és funkcionális javulásért.

Anyagok és módszerek

A gerincvelő kontúziós sérülésmodellje

Összesen 90 nőstény Sprague-Dawley (Animal Research Laboratories, Bécs, Ausztria; 180-220 gramm testsúly) és 80 nőstény Fischer 344 patkányt (Szegedi Tudományegyetem, Szeged, Magyarország; 180-220 gramm testsúly) használtunk kísérleteink során.

A laminektómiát a 11-es hátcsigolya szintjében végeztük el, majd Infinity Horizon impaktorral (IH-0400, PSI Services LLC, USA), 150 kdyn erőhatást alkalmazva kontúziós sérülést váltottunk ki. Ezt követően 2, 3 vagy 8 hét (Sprague-Dawley patkányok), illetve 2, 3, 5 vagy 9 hét (Fischer 344 patkányok) túlélési időt biztosítottunk.

Az NE-GFP-4C neuroektodermális és a SB5 humán indukált pluripotens őssejtek kontúziós sérülést követő transzplantációja

Azonnal vagy egy héttel a sérülés kiváltását követően intravénásan, vagy intraspinálisan (a kísérleti csoporttól függően) NE-GFP-4C sejteket ültettünk be Sprague-Dawley nőstény patkányokba (speciálisan kialakított Hamilton fecskendővel). Intravénásan $1x10^6$ (250 µL tenyésztőmédiumban), instrapinálisan $5x10^5$ (2 µL tenyésztőmédiumban) őssejtet injektáltunk az állatok farokvénájába vagy a léziós üregbe. Külön kísérleti csoportban az őssejteket human fibrinnel (Baxter Healthcare Corporation, USA, 500 I.U./mL) juttatunk be intraspinálisan. A kontroll állatok tenyésztőmédiumot vagy fibrint kaptak egy héttel a sérülés kiváltását követően intraspinálisan (2 µL), illetve tenyésztőmédiumot intravénásan (250 µL) azonnal a sértés után vagy egy héttel később.

Egy héttel a kontúziót követően SB5 humán indukált pluripotens őssejteket ültettünk be intravénásan vagy intraspinálisan (a kísérleti csoporttól függően) Fischer 344 nőstény patkányokba. Intravénás alkalmazás során $1x10^6$ őssejtet (250 µL tenyésztőmédiumban) injektáltunk a farokvénába, míg az intraspinális transzplantáció során $5x10^5$ sejtet (2 µL tenyésztőmédiumban) juttattunk be a léziós üregbe. A kontroll állatok tenyésztőmédiumot kaptak intravénásan (250 µL) vagy intraspinálisan (2 µL).

Retrográd jelölés

8 héttel a sérülés kiváltását követően mély altatásban a Th13-L1 csigolyák szintjében (L2-L4-es gerincvelői szelvények) laminektómiát végeztünk. Az L3-as gerincelői szelvény jobb oldalán kialakított hemiszekciós résbe Fast Blue (FB; Dr. Illing Plastics GmbH, Groß-Umstadt, Németország) kristályokat helyeztünk, majd egy hetet biztosítottunk a fluoreszcens festék retrográd transzportjára.

BBB nyílt mezős, többparaméteres, pontozásos teszt

A Basso, Beattie, Bresnahan (BBB) tesztet alkalmaztunk a funkcionális változások nyomon követésére a harmadik posztoperatív napon, majd azt követően heti gyakorisággal a 8. hétig. A hátsó végtag és a törzs lokomotoros javulását, valamint a mellső és hátsó végtagok koordinációját követtük nyomon. Az állatok megfigyelését és értékelését két független vizsgálószemély végezte.

Lokomotoros funkciók az NE-GFP-4C tanulmányban – CatWalk lépésanalízis

A mozgásparaméterek vizsgálatát a CatWalk automatikus lépésanalízis rendszerrel végeztük (Noldus, Wageningen, Hollandia), 8 héttel a sérülés kiváltását követően. Az alábbi paramétereket elemeztük: talplenyomat területe, talplenyomat szélessége, talplenyomat hosszúsága, lépés hossza, hátsó végtagok közötti távolság. Az eredményeket a CatWalk programmal értékeltük ki.

Kinematikai analízis az SB5 tanulmányban

Különböző kísérleti csoportokba tartozó állatokat a sérülés kiváltása után négy héttel, majd azt követően hetente vizsgáltuk a laboratóriumunk által kifejlesztett videóalapú mozgásanalízis rendszerrel. A rendszer alapja egy plexiüvegből álló futópad, egy tükörrendszer, valamint két nagy felbontású kamera (GoPro Hero 3+ Black Edition, GoPro; San Mateo, USA; DFK 22AUC03, The Imaging Source, Brema, Németország) együttes alkalmazása. A módszer segítségével több különböző mozgásparamétert vizsgálhattunk egyszerre, melyek a metatarsus-talaj szög, a tibia-talaj szög, a talp hossztengelyének laterális deviációja, a térdflexió mértéke, a tarsus talaj szög és a bokaflexió voltak.

Eredmények

Az NE-GFP-4C sejtek alkalmazása elősegítette a funkcionális és morfológiai felépülést

A funkcionális tesztek (BBB, Catwalk) eredményei

Rendszeres időközönként BBB nyíltmezős tesztet alkalmaztunk a lokomotoros javulás nyomon követésére. A kontúziós sérülés következtében minden állat erős motoros károsodást mutatott. Négy héttel a sérülés után az intraspinális és intravénás (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv és NE4C-1w-isp) állatok hasonló értékekkel rendelkeztek, majd a 4. és 8. hét között szignifikánsan jobban teljesítettek, mint kontrolljaik. Az őssejtek intraspinális alkalmazása plató fázist okozott a javulásban, ami a transzplantálási mód invazív jellegével állhatott kapcsolatban. Érdekes módon azon állatnál, melyek esetén az őssejteket fibrinnel együtt juttattuk be (NE4C-fibrin) a kontroll állatokéinál (fibrin-1w-isp) is alacsonyabb értékeket tapasztaltunk.

A CatWalk automatikus lépésanalízis megerősítette a BBB teszt eredményeit. A funkcionális felépülés mértéke szignifikánsan kedvezőbb volt az intravénásan vagy intraspinálisan őssejttel kezelt csoportokban (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv and NE4C-1w-isp) a kontroll állatok eredményeivel összevetve.

Az őssejtek elősegítették az eredeti szövetállomány megőrzését

A sérülés területén nagyméretű, középponti helyzetű üreg alakult ki, mely sejttörmeléket tartalmazott. A morfológiai kiértékelés során megmértük a megmaradt szürke- és fehérállomány nagyságát 8 héttel a sérülés kiváltását követően. Mind az őssejtek intravénás, mind az intraspinális alkalmazása (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv, NE4C-1w-isp) szignifikánsan nagyobb mértékű szövetmegmaradást eredményezett. A legnagyobb mértékű éppen maradt szövetállományt az intraspinális csoportban (NE4C-1w-isp) mértük. Ezzel ellentétben az őssejtek fibrinnel együtt történő alkalmazása (NE4C-fibrin) esetén a megmaradt szürke- és fehérállomány nagysága még a kontroll állatoknál is alacsonyabb értékeket mutatott.

Az üreg paraméterei (léziós terület nagysága, üreg hossza) az őssejttel kezelt állatokban (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv, NE4C-1w-isp) kedvezőbb értékeket mutattak, mint a nekik megfelelő kontrollok esetében. Az NE4C-finrin kísérleti csoport a kontroll állatokhoz hasonló értékekkel rendelkezett.

A retrográdan jelölt sejtek számának meghatározása, valamint a szerotonerg innerváció mértéke

Ezt követően felderítettük a beültetett sejtek axonális regenerációra, illetve megőrzésére kifejtett hatását is. A retrográd jelölési eredmények szignifikánsan több Fast Blue-pozitív propriospinális idegsejtet mutattak a Th5, Th2, C6 and C2 gerincvelői szelvényekben a kizárólag őssejttel kezelt

állatok (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv and NE4C-1w-isp) esetében, mint a kontrollokban. Az őssejteket fibrinnel együtt alkalmazva nem volt szignifikáns eltérés a kontroll állatok sejtszámaival összevetve.

Az agytörzsben, illetve kitüntetett agyi régiókban (formatio reticularis, nucleus vestibularis lateralis, nucleus oliva inferior) szignifikánsan több jelölt sejtet jegyeztünk le a kezelt állatokban, mint a kontrollokban. Hasonló volt a helyzet az agykéreg jelölt sejtjeit tekintve, bár itt az intraspinálisan kezelt állatok (NE4C-1w-isp) kiugróan magas értéket mutattak az intravénásan transzplantált, illetve kontroll állatokhoz viszonyítva.

A fentiekkel ellentétben a raphe magokban szignifikánsan több jelölt sejtet írtunk le az intraspinálisan őssejttel kezelt állatokban, mint az intravénásan őssejttel kezelt (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv) vagy kontroll csoportokban.

A szerotonerg rostok bizonyítottan nagy szerepet játszanak a mozgás szupraspinális szabályozásában, ezért meghatároztuk a rostok denzitását a kontúziós sérüléstől disztálisan. Eredményeink szerint az őssejttel kezelt csoportokban szignifikánsan kisebb mértékű volt a rostok burjánzása az intravénásan kezelt, illetve kontroll állatokkal összevetve, mely összhangban állt a funkcionális tesztek eredményeivel.

A sérülés mikrokörnyezetének módosítása

Következő lépésként felderítettük azt, hogy a beültetett sejtek képesek-e módosítani a léziós mikrokörnyezetet, így téve kedvezőbbé azt a sérült axonok regenerációjához. Két és három héttel a sérülést követően megmértük az asztrocitózis és a mikroglia/makrofág aktiváció mértékét, valamint meghatároztuk a Eph-A4 and ehprin-B2 molekulák és a kondroitin-szulfát proteoglikánok (CSPG) kifejeződését.

Az őssejtek intravénás és intraspinális alkalmazása szignifikánsan csökkentette az asztrocitózis mértékét, mely a kondroitin-szulfát (CS-56) csökkent kifejeződésével párosult. Az őssejtek fibrinnel együtt történő alkalmazása (NE4C-fibrin) erős asztrocita reakciót és kifejezett kondroitin-szulfát (CS-56) lerakódásokat okozott. A mikroglia/makrofág aktiváció mértéke hasonló tendenciát mutatott.

Korábbi tanulmányok leírták az EphA receptor alcsoportok és a nekik megfelelő ligandok erőteljes kifejeződését a gerincvelő sérülését követően. Mindez hozzájárul az axonális regenerációt gátló környezet kialakulásához. Az EphA4-ephrinB2 kapcsolat a neuronális növekedési kúpok

károsodását és reaktív asztrocitózist eredményez. Az EphA4 expresszió nem mutatott szignifikáns különbséget a kezelt csoportokban, de az ephrinB2 szintje lecsökkent az őssejtkezelés hatására.

A beültetett NE-GFP-4C sejtek differenciálódása

Immunhisztokémiai módszerrel derítettük fel sejtjeink sorsát és differenciálódását a transzplantációt követően. Ehhez egér specifikus neuronális és gliális markereket használtunk.

Egy héttel az intravénás alkalmazást követően (NE4C-immed-iv, NE4C-1w-iv) graft-eredetű (M2-pozitív) asztrocitákat azonosítottunk, melyek GFAP expressziót mutattak. Hosszú túlélési idő esetében már nem tudtunk graft-eredetű sejteket kimutatni.

Ezzel ellentétben az intraspinális alkalmazás (NE4C-1w-isp) graft-eredetű neuronok (M6+) és asztrociták (M2+) megjelenését eredményezte egy héttel a beültetést követően. Ebben az időpontban graft-eredetű oligodendrocitákat nem sikerült azonosítanunk. A graft-eredetű sejtek többsége klasszikus neuronális (beta(III)-tubulin/TUBB3) és gliális (GFAP) markereket fejezett ki. A beültetett sejtek és származékaik elsősorban az üreget töltötték ki vagy annak falában helyezkedtek el. Későbbi időpontban graft-eredetű neuronok, asztrociták és oligodendrociták (MOG+) voltak jelen. A MOG és NF200kD kettős festés eredményei arra utalnak, hogy a graft-eredetű oligodendrociták részt vehettek a sérült idegrostok mielinhüvelyének újbóli kialakításában.

Az intraspinálisan beültetett sejtek által termelt bioaktív molekulák

Az őssejtek intraspinális alkalmazása során is csak kis számban találtunk graft-eredetű sejteket az üreg falában vagy annak közvetlen környezetében. Mindez arra engedett következtetni, hogy elsősorban nem a graft-eredetű sejtek integrálódása állt a funkcionális javulás hátterében, hanem a sejtek által termelt anyagok bírhattak kedvező hatással. Egy héttel a beültetést követően 10 faktor kifejeződését vizsgáltuk meg (BDNF, GDNF, IL-1 alpha, IL-6, IL-10, TNF-alpha, MIP-1 alpha, NT-4/5, VEGF, PDGF-A). Szakirodalmi adatokra és korábbi tanulmányainkra alapozva úgy gondoltuk ezeknek szerepe lehet a javulásban. Eredményeink szerint egy neurotrofikus faktor (GDNF) és három citokin (IL-6, IL-10 és MIP-1 alfa) kifejeződése köthető sejtjeinkhez. A GDNF erős immunreaktivitást mutatott a graftban és a gazdaszövetben is. Az IL-6 erős kifejeződését írtuk le a graftban, de gyengébb expressziót mutatott a gazdaszövetben. IL-10 és MIP-1 alfa mintázata a GDNF-hez volt hasonló, de a gazdaszövetben korlátozottabb volt a jelenléte. A kontroll állatok (medium-1w-isp) esetében egyik faktor expresszióját sem tudtuk bizonyítani.

Transzplantált SB5 humán indukált pluripotens őssejtek elősegítik a gerincvelő kontúziós sérülését követő javulást

Az őssejtek intraspinális alkalmazása támogatta a funkcionális felépülést

A BBB teszt során kezdetben hasonló értékeket figyelhettünk meg a kísérleti csoportokban, majd az őssejtkezelésben részesült állatok (SB5-iv, SB5-isp) eredményei emelkedésbe kezdtek és elkülönültek a kontroll csoportokéitól (medium-iv, medium-isp). A hatodik héttől kezdve szignifikáns különbséget figyelhettünk meg az intraspinálisan transzplantált csoport (SB5-isp) és kontrollja (medium-isp) között.

A kinematikai elemzés során az ötödik hétig nem mértünk szignifikáns különbséget a csoportok között. A hatodik héttől kezdve az őssejt kezelésben részesült csoportok (SB5-iv, SB5-isp) értékei esetében folyamatos javulást figyelhettünk meg. Az intraspinálisan transzplantált (SB5-isp) csoportba tartozó állatok értékei szignifikánsan kedvezőbbek voltak a kontroll állatokhoz (medium-isp) viszonyítva, minden egyes vizsgált paramétert tekintve. Az intravénás csoport és kontrollja között nem állapítottunk meg szignifikáns különbséget egyik paraméter esetében sem.

Az intraspinálisan beültetett SB5 sejtek hatása a megmaradt gazdaszövet nagyságára

A 9 hetes túlélési idő után meghatároztuk a megmaradt szövetállomány nagyságát a különböző kísérleti csoportokban. A legnagyobb mennyiségű intakt fehérállomány a gerincvelő ventrális és ventrolaterális részén helyezkedett el, minden egyes csoport esetében. A léziós terület nagysága kisebb volt az őssejtkezelésben részesült állatoknál, a kontroll csoportok mért értékeivel összehasonlítva. A megmaradt szövetállományt szignifikánsan nagyobbnak írtuk le az instrapinálisan kezelt állatokban a kontrollokkal összevetve (SB5-isp vs. medium-isp).

Retrográd jelölési eredmények

A továbbiakban meghatároztuk a retrográdan jelölt sejtek számát a gerincvelő kiválasztott szegmentumaiban, az agytörzsben, valamint a szomatomotoros kéreg területén. Mindez a propriospinális, illetve szupraspinális pályák megmaradásáról/regenerációjáról adott tájékoztatást. Szignifikánsan több FB-pozitív neuront írtunk le a gerincvelő Th5, Th1, C6 és C2 szegmentumaiban az őssejttel kezelt állatokban (SB5-iv és SB5-isp) a kontroll csoportokkal összevetve. Intraspinális alkalmazás esetén szignifikánsan nagyobb volt a jelölt sejtek száma a különböző agyi régiókban (agytörzs, szomatomotoros kéreg). A szisztémás beültetés (SB5-iv) esetén is nagyobb számú jelölt sejtet találtunk a kontroll állatokkal összehasonlítva.

Az SB5 őssejtek alkalmazása módosítja a sérülés mikrokörnyezetét

A túlélési idő (9 hét) után felderítettük az asztrocita és a mikroglia/makrofág reakció mértékét, valamint a kondrotin-szulfát proteoglikánok kifejeződését az egyes kísérleti csoportokban. Az őssejtek intraspinális vagy intravénás alkalmazása (SB5-iv, SB5-isp) lecsökkentette az asztrocitózis mértékét a kontroll állatokkal összevetve. A CS-56 kifejeződés, valamint a mikroglia/makrofág reakció esetében hasonló változásokat figyeltünk meg. Az intraspinálisan transzplantált csoport (SB5-isp) szignifikánsan alacsonyabb mikroglia/makrofág reakciót mutatott az intravénás csoporthoz (SB5-iv) képest.

Az intraspinálisan beültetett SB5 sejtek neuronális irányba differenciálódtak

A transzplantációt követő első, második, negyedik és nyolcadik héten immunhisztokémiai módszerrel derítettük fel a sejtek sorsát és differenciációs tulajdonságait. A humán indukált pluripotens őssejtek azonosítására anti-SC-121 (humán citplazmatikus marker) és anti-SC-101 (humán sejtmagi marker) antitesteket alkalmaztunk.

Egy héttel a beültetést követően a sejtek erős SSEA-4 kifejeződést mutattak, valamint csoportokat formáltak a sérült gerincvelőben. Mindezek mellett számos sejt Ki-67-pozitivitással rendelkezett, mely mitotikus aktivitásukat jelezte. Az SC-121 expresszió mértéke kifejezettebb volt a csoportokon belül, mint azok környezetében. Az osztódó sejtek többsége elsősorban az őssejtek által képzett csoportok közelében helyezkedtek el. A mennyiségi analízis szerint egy, illetve két héttel a beültetést követően a sejtek közel 30%-a osztódási fázisban volt. A transzplantált sejtek többsége (60-70%) neuronális irányba differenciálódott, amit beta(III)-tubulin/TUBB3 pozitivitásuk támasztott alá. Érdekes módon a beültetett sejtek gliális irányba történő elköteleződését nem észleltük.

Négy héttel a beültetést követően elszórtan figyelhettünk meg SC-121+ vagy SC-101+ sejteket. A túlélési idő végén (8 hét) már csak SC-121+ sejttörmelékeket tudtunk azonosítani a GSA-B4+ mikroglia/makrofág sejtekben.

Az SB5 sejtek által termelt biokatív molekulák egy héttel a beültetést követően

Annak érdekében, hogy meghatározzuk a beültetett sejtek által esetlegesen termelt bioaktív anyagokat 10 faktor (BDNF, GDNF, IL-1 alpha, IL-6, IL-10, TNF-alpha, MIP-1 alpha, NT-4/5, VEGF, PDGFA) kimutatását végeztük el.

Egy héttel a beültetést követően a neurotrofikus faktor GDNF és két citokin (IL-10 és MIP-1 alpha) kifejeződése volt köthető a sejtekhez. Ezen faktorok közül egyik sem volt jelen a gazdaszövetben.

Megbeszélés

A tanulmányban bizonyítást nyert, hogy a beültetett NE-GFP-4C neuroektodermális, illetve SB5 differenciálatlan humán indukált pluripotens őssejtek képesek elősegíteni a morfológiai és funckionális helyreállást a gerincvelő kontúziós sérülését követően. Ezen hatás elsősorban nem a sejtek differenciálódásának és a gazdaszövetbe történő integrációjának volt köszönhető, hanem a sejtek által termelt bioaktív anyagoknak.

Leírtuk, hogy a neurotrofikus faktor GDNF, illetve citokinek (IL-6, IL-10 és MIP-1 alfa) szekréciója köthető a transzplantált NE-GFP-4C és SB5 sejtekhez. Mindezen faktorok képesek a sérülés környezetének módosítására, így biztosítva kedvezőbb feltételeket a sérült axonok regenerációjához. Mindezek mellett hozzájárulhatnak a másodlagos szövetvesztés megakadályozásához is.

Korábbi tanulmányok már bizonyították a GDNF axonális növekedést elősegítő hatását, sőt az akut fázisban történő GDNF kezelés képes volt megmenteni a sérült idegsejteket. Az IL-6 neuroprotektív tulajdonságú, de axonnövekedést indukáló hatását is leírták. Az IL-10 alkalmazása széleskörűen tanulmányozott a gerincvelő-sérülés kísérletes kiváltását követően. Elsősorban gyulladáscsökkentő hatással rendelkezik, de neuroprotektív szereppel is bír. A MIP-1 alfa gyulladáskeltő citokin, így szerepe ellentmondásos. Hatásmechanizmusának felderítése további kísérleteket igényel.

Eredményeink az őssejtek beültetést követő funkcionális multipotenciáját bizonyítják, mely szerint a sejtek képesek a sérülésnek megfelelő választ adni a transzplantációt követően. Ezen tulajdonság szoros kapcsolatot tételez fel a beültetett sejtek és a sérült gazdaszövet között, mely végül a „lézió-indukált szekretom” megjelenéséhez vezet.

1.sz. melléklet

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott **Dr. Pajer Krisztián** (felelős társszerző) kijelentem, hogy **Bellák Tamás** (pályázó) PhD értekezésének tézispontjaiban bemutatott - közösen publikált - tudományos eredmények elérésében a pályázónak meghatározó szerepe volt, ezért ezeket a téziseket más a PhD fokozat megszerzését célzó minősítési eljárásban nem használta fel, illetve nem kívánja felhasználni.

Szeged, 2021. április 12. .....

dátum szerző

A pályázó tézispontjaiban érintett, közösen publikált közlemények:

Pajer K, Bellák T, Redl H, Nógrádi A. Neuroectodermal Stem Cells Grafted into the Injured Spinal Cord Induce Both Axonal Regeneration and Morphological Restoration via Multiple Mechanisms. J Neurotrauma. 2019 Nov 1;36(21):2977-2990.