

**Transzplantált neuroektodermális őssejtek hatása sérült gerincvelői motoneuronokra
mellső gyökér avulzió és reimplantációt követően: betekintés a molekuláris
mechanizmusba**

PhD tézis

Pajer Krisztián



Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

2014

Szeged

**Transzplantált neuroektodermális őssejtek hatása sérült gerincvelői motoneuronokra
mellső gyökér avulzió és reimplantációt követően: betekintés a molekuláris
mechanizmusba**

PhD tézis

Pajer Krisztián

Szegedi Tudományegyetem
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet

2014

Szeged

Bevezetés

A gerincvelősérülések gyakran visszafordíthatatlan funkcióvesztéssel járnak. Az egyik ilyen típusú sérülés a mellső gyökér avulzió, mely során a motoros ideggyök kiszakad. Avulzió esetén a motoros axonok degenerálódnak és a sérült motoneuronok túlnyomó része elpusztul. Ez a folyamat köszönhető egyrészt a mikroglia és asztrociták aktiválódásának, másrészt a nagy mennyiségben felszabaduló glutamátnek tudható be, ez utóbbi excitotoxicitáshoz vezet. A sérült motoneuronok túlélését segítheti a kiszakadt mellső gyökér reimplantációja, azonban a denervált izmok reinnervációja csekély mértékű és a motoros funkció számottevő visszatérése nem tapasztalható.

A mikroglia sejtek és az asztrociták kulcsszereplői a sérülést követő pozitív és negatív folyamatoknak, amelyek jelentőse befolyásolják a sérült motoneuronok túlélését. A központi idegrendszer ezen két sejtpopulációja fontos szerepet játszik a gyulladáshoz vezető reakciók szabályozásában, aktiválásában, esetleges elcsendesítésében. A reaktív asztrociták nagy mennyiségben termelnek olyan gátló extracelluláris molekulákat, amelyek gátolják a regenerációt. Ugyanakkor számos neurotrofikus faktort is expresszálnak, amelyek előmozdíthatják a sérült idegsejtek túlélését. A mikroglia sejtek a központi idegrendszer 15-20%-át teszik ki és nyúlványaik segítségével folyamatosan monitorozzák környezetüket. Központi idegrendszeri sérülést követően ezek a sejtek osztódásba kezdenek és különböző citokineket, chemokineket és neurotrofikus faktorokat expresszálnak.

A mikroglia sejtek és asztrociták által termelt neurotrofikus faktorok, pro- és anti-inflammatorikus fehérjék a poszttraumás reakciók molekuláris szintű kulcsszereplői. Az Neurotrofikus faktorok közreműködnek a motoneuronok túlélésének szabályozásában és képesek indukálni az endogén regeneratív folyamatokat. Ugyanakkor a felszabaduló anti- és proinflammatorikus citokinek szintén jelentős befolyással vannak a károsodott neuronok túlélésére.

A különböző terápiás megközelítések célja, hogy kezelje és enyhítse, vagy kivédje a gerincvelői sérülések következményeként fellépő szövetkárosodást. Kiemelendő a neurotrofikus faktorok közül is a glial cell line-derived neurotrophic factor (GDNF) és a *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF). Ezen faktorok folyamatos alkalmazásával a kísérletes avulziós sérüléseket követően elő lehet mozdítani a sérült motoneuronok túlélését, de a denervált izmok funkcionális reinnervációja nem következik be.

Célkitűzés

Jelen munka során meg kívántuk vizsgálni, hogy

- 1) az NE-GFP-4C neuroektodermális őssejtek képesek-e előmozdítani a sérült motoneuronok túlélését és regenerációját,
- 2) a különböző transzplantációs paradigmák milyen hatással bírnak a sérült gerincvelői szegmentumra motoneuronjaira, és
- 3) melyek azok a transzplantált sejtek által termelt humorális faktorok, amelyek részt vesznek a sérült motoneuronok megmentésében.

Anyag és módszer

Kísérletes avulzió és transzplantáció

Kísérleteinkben Sprague-Dawley nőstény patkányokon feltártuk a L4 gerincvelői szegmentumot, a L4 mellső gyökeret kihúztuk, majd 3×10^5 NE-GFP-4C őssejtet a gerincvelőbe (intraspinális, ARG csoport), a visszaültetett mellső gyökérbe (intraradikuláris, ARG-IR) vagy fibrinbe ágyazva a gyökér köré (periradiculáris, ARG-PR) ültettünk be. A beültetés után a kihúzott gyökeret laterálisan visszaültettük. Kontroll állatokban (AR) csupán a L4 mellső gyökeret húztuk ki és helyeztük vissza őssejtek beültetése nélkül. A műtétet követően az állatok 2, 5, 10, 14 napig ill. 1, 3 vagy 6 hónapig éltek túl. Retrográd jelöléses kísérleteinkben három hónappal a műtét után a L4 nervus spinalis ventralis ágát átmetsztük és a proximális csonkra Fast Blue (FB) kristályokat helyeztünk, hogy tanulmányozzuk és megszámoljuk a reinnerváló sejteket.

Immunhisztokémia

Immunfluoreszcens festési módszerekkel feltérképeztük az M6- (egér neuronális sejtfelszíni marker) és az M2-pozitív (egér asztrocita sejtfelszíni marker) őssejt-eredetű neuronokat és asztrocitákat, a MOG-pozitív (egér oligodendrocita marker) oligodendrocitákat, illetve SSEA-1-et alkalmaztunk a differenciálatlan őssejtek azonosítására. Egér és egér/patkány-specifikus anti-IL-1- α , az anti-IL-6, az anti-IL-10, anti-TNF-alfa, és az anti-MIP-1-alfa kimutatására alkalmas antitesteket használtunk, hogy meghatározzuk az egyes faktorok eredetét.

Szemikvantitatív PCR

Szemikvantitatív PCR-rel meghatároztuk a különböző immunfaktorok (IL-1-alfa, IL-1-béta, az IL-6, IL-10, MCP-1, MIP-1-alfa, M-CSF, TNF-a és alfa) és neurotrofikus faktorok mRNS mennyiségét (BDNF, GDNF, NT-3, NT-4, a PDGF-alfa, a PDGF-béta, PTN, és a TGF-béta) 2, 5, 10 és 14 nappal az őssejt transzplantációt követően.

Lézer mikrodisszekció és qPCR

A sérült ventrális mellső szarvat és az őssejt graftokat lézer mikrodisszektor (Arcturus) segítségével kivágtuk a metszetekből 5 és a 10 nappal az őssejt transzplantációt követően. Kvantitatív PCR-eket végeztünk, hogy meghatározzuk az MIP-1, a TNF-alfa, IL-1-alfa, IL-6 és IL-10 mRNS mennyiségét.

Az asztrocita és mikroglia immundenzitásának vizsgálata

A GFAP-pozitív asztrociták és a GSA-B4-pozitív mikroglia sejtek immundenzitását vizsgáltuk a sérült ventrális szarvban, 0,5, 1, 1,5 és 2 mm-re rostralisán és caudalisán a beültetés helyétől ImageJ képanalizáló szoftver (NIH) segítségével.

Neutralizáló antitestek alkalmazása

MIP-1a, IL-1a, IL-6, TNF-alfa és IL-10 ellen termeltetett neutralizáló antitestekkel töltöttünk meg mini ozmotikus Alzet pumpákat és az antitesteket vékony szilikon csövön vezettük be a sérült gerincvelői szegmentumba. Egy másik kísérletsorozatban az ozmotikus pumpákat csak az IL-10 elleni neutralizációs antitestekkel használtuk. A kontroll állatok azonos térfogatú ellenanyag-specifikus IgG-izotípusokat kaptak. Az állatok 3 hónapot éltek túl majd ezt követően a reinnerváló sejteket FB alkalmazásával térképeztük fel.

Funkcionális tesztek

Három hónappal a műtét után lépésmintázat elemzést végeztünk a transzplantált és kontroll állatok esetében egyaránt. Izomerőmérés segítségével meghatározásra került az extensor digitorum longus (EDL) és a tibialis anterior (TA) esetében a motoros egységek száma az ARG és AR csoportokban.

Eredmények

Funkcionális javulás

Az őssejtek intraspinalis transzplantációját követően a L4 szegmentumban eredetileg található motoneuronok közel 70% képes volt reinnerválni a visszaültetett mellső gyökeret. A morfológiai reinnervációt jelentős funkcionális helyreállítás is kísérte (motor egységek száma a tibialis anteriorban: 21 ± 1 [ARG] vs 4 ± 1 [AR], az extensor digitorum longusban: 14 ± 1 [ARG] vs 4.5 ± 1 [AR]). Az őssejtek intraradikuláris alkalmazása az intraspinalis csoporthoz hasonló eredményeket hozott (retrográdan jelölt sejtek száma: 671 ± 26 [ARG-IR] ill. 711 ± 14 [ARG]). Kontroll állatok esetében és az őssejtek perineurális alkalmazása után gyenge morfológiai és funkcionális reinnervációt tapasztaltunk (retrográdan jelölt sejtek száma: 42 ± 10 [AR] ill. 65 ± 2.5 [ARG-PR]). A lépésmintázat elemzés során mért, a lépésciklusra jellemző paraméterek (lendítési fázis, súlyviselési fázis jellemzői) alátámasztották az izomerőmérés és a morfológia vizsgálatok eredményeit.

Neuroektodermális sejtek sorsa a különböző kísérleti csoportokban

A transzplantációt követő 5. napon mindegyik kísérleti elrendezésben a beültetett őssejtek jelentős része a differenciálatlan sejtekre jellemző SEEA-1 antigént expresszált. Tíz nappal a beültetés után az ARG-PR csoportban az őssejtek kerekded M2+ asztrocitákká és M6+ neuronokká differenciálódtak. Az ARG-IR csoportban a transzplantált őssejtek csoportokat alakítottak ki a beültetés helyén. A sejtek jelentős része a visszaültetett mellső gyökér mentén bevándorolt a sértett mellső szarvba és gliális vagy neuronális fenotípust vett fel. Az ARG csoportban a transzplantált sejtek szintén egy jelentősebb sejtcsoportot formáltak a beültetés követő első 10 napban. A ezt követő napokban az őssejtek elvándoroltak a transzplantáció helyéről és a sértett L4 szegmentum teljes hosszában telepedtek le. Három hónappal a beültetést követően az ARG-PR csoportban csak elszórtan lehetett őssejt-eredetű neuront vagy asztrocitát detektálni. Az ARG-IR csoport esetében számos M2+ asztrocita és M6 + neuron telepedett le a sértett L4 ventrális szarvban és a visszaültetett gyökér környékén. Az intraspinalisan (ARG csoport) kezelt állatok esetében jellemző volt, hogy viszonylag jól differenciált őssejt-eredetű neuronokat és asztrocitákat, és néhány MOG+ oligodendrocitát találtunk szétszórva a L4 szegmentumban.

Glia reakció vizsgálata a sértett mellső szarvban

Jelentős glia reakciót észleltünk a kontroll állatok L4 gerincvelői szegmentumában az avulziót

követő első 10 napon. Ugyanakkor az őssejtek intraspinalis alkalmazása hatékonyan csökkentette a mikroglia / makrofág és asztroglia reakciót a sértett mellső szarvban az 5 és 10. napon a L4 szegmentumban.

A szekretált faktorok meghatározása

A műtétet követő 2. 5. 10. és 14. napon a L4 gerincvelői szegmentumok szemikvantitatív PCR elemzését végeztük el kontroll állatok (AR) és intraspinalis transzplantáción átesett állatok (ARG) esetében. A neurotrofikus faktorok mRNS szintjében nem volt különbség az AR és ARG állatok között. Ugyanakkor az 5. és 10. napon az IL-1-alfa, IL-6 és IL-10, TNF-alfa és MIP-1-alfa mRNS szintjei szignifikánsan magasabbak voltak az ARG állatok L4 gerincvelői szegmentumában, mint az AR állatokéban. Ezen faktorok mRNS szintje lecsökkent a műtétet követő 14. napra.

A sértett mellső szarv és a graft mRNS expressziója

Lézer mikrodisszekcióval kimetszettük a graftot és a sértett mellső szarvat a metszetekből, hogy meghatározzuk, a gazdaszövetnek vagy a graftnak tudható-e be a fenti faktorok emelkedett mRNS szintje. Ennek pontos meghatározásához qPCR elemzést végeztünk. Az ARG állatok esetében elmondható volt, hogy az őssejt graftok és a sértett mellső szarv is nagy mennyiségben termelte a vizsgált citokinek mRNS-ét 5 és 10 nappal a sértést követően. Az IL-10 azonban kivételnek bizonyult, mert azt nagyobb mennyiségben csak a beültetett sejtek termelték. Ezzel szemben a AR állatok sértett mellső szarvában csupán a műtétet követő 5 napon volt jelentősebb mRNS emelkedés a vizsgált pro-inflammatorikus citokinek esetében.

Citokinek expressziós mintázata a graftolt sejtekben és a gerincvelőben

Egér-specifikus antitestek erős immunreaktivitás mutattak a graftban mind az öt faktor esetében 5 nappal a transzplantációt követően. Figyelemre méltó volt, hogy a legtöbb, de nem minden graftolt sejt volt immunpozitív a citokinekre. Tíz nappal a műtét után csak az IL-6, TNF-alfa és MIP-1-alfa mutatott erős expressziós mintázatot. Az IL-1-alfa és IL-10 immunfluoreszcencia inkább a graft perifériáján elhelyezkedő őssejtekre korlátozódott.

Másrésről, anti-patkány / egér specifikus antitestek alkalmazásával kiderült, hogy az ARG állatok sértett mellső szarvi neuronjai és gliasejtjei csak az IL-6, IL-10 és a MIP-1-alfára mutattak immunreakciót. Az előbb említett faktorok expressziós mintázatai egységesek voltak mind az 5. mind 10. napon is. Konfokális mikroszkóppal végzett vizsgálataink felderítették, hogy az IL-6, IL-10 és a MIP-1-alfa reaktivitás az asztrocitákra korlátozódott, noha az

asztroglíózis mértéke az ARG állatokban csekély volt. Hasonló expressziós mintázat volt megfigyelhető az AR állatok esetében is, de az asztroglia reakció ebben a csoportban megnőtt. Annak ellenére, hogy viszonylag magas mRNS szintek jellemezték az IL-1-alfat és a TNF-alfat is, immunreaktivitást nem tudtunk kimutatni a biológiai pozitív kontrollokhoz képest.

Neutralizáló antitestek semlegesítik a beültetett őssejtek neuroprotektív hatását

Annak a felvetésnek az igazolására, hogy ezek a citokinek felelősek-e a sérült motoneuronok túléléseért, 2 hétig ozmotikus pumpák segítségével egér-specifikus neutralizáló antitesteket juttattunk a sértett gerincvelői szegmentumba. A neutralizáló antitestek teljesen megszüntették az őssejtek motoneuronok megmentésére és regenerációra gyakorolt hatását (retrográdan jelölt sejtek száma: 57 ± 5). Önmagában az IL-10 semlegesítése inkább a motoneuronok túléléseire gyakorolt negatív hatást és kevésbé befolyásolta a reinnervációt (retrográdan jelölt sejtek száma: 195 ± 10). A kontroll kísérletekben használt izospecifikus IgG-ok nem befolyásolták a motoneuronok túlélését és a visszaültetett mellső gyökér reinnervációját (retrográdan jelölt sejtek száma: 695 ± 44).

Megbeszélés

A tanulmányban bizonyítást nyert, hogy a neuroektodermális őssejtek képesek megmenteni a sérült motoneuronok túlnyomó részét. Azonban a sérült motoneuronok megmentése csak akkor sikeres, ha az őssejteket intraradikulárisan vagy intraspinárisan alkalmazzuk. Az őssejtek periradikuláris alkalmazása nem mozdította elő a károsodott motoneuronok túlélését és a visszaültetett mellső gyökér reinnervációját.

A transzplantált őssejtek röviddel a beültetést követően neuronokká vagy asztrocitákká differenciálódnak, de hosszú távon nem képesek integrálódni a gazdaszövetbe.

Korábbi tanulmányokban már kimutatták, hogy neurotrofikus faktorok alkalmazásával, embrionális idegszövet vagy progenitor sejtek transzplantációjával elősegíthető a sérült motoneuronok túlélése és bizonyos esetekben a funkcionális reinnerváció is létrejön. Azonban nem tisztázott, hogy a transzplantált sejtek milyen mechanizmus révén mentik meg a károsodott motoneuronokat.

Kísérleteinkben bizonyítottuk, hogy az asztroglia és mikroglia reakció jelentősen kisebb volt az őssejtek intraspináris alkalmazását követően a sértést követő első 10 napban. Ez a szűk időablak kritikus a motoneuronok túléléseire nézve, mert ez az a rövid intervallum, amíg a

motoneuronok megmenthetők. Továbbá azonosítottunk az őssejtek által termelt 5 citokint, amelyek felelősek a motoneuronok túléléséért és a visszaültetett mellső gyökér reinnervációjáért. Az általunk feltérképezett mechanizmus bizonyítja, hogy az anti- és proinflammatorikus citokinek jelentős moduláló hatással bírnak a sérült központi idegrendszerben. A megismert mechanizmus lehetőséget teremt a sérült motoneuronok túlélésének növelésére és a nagyobb mértékű funkcionális reinnervációra.

A tézis alapjául szolgáló közlemények

I. Pajenda G, **Pajer K**, Márton G, Hegyi P, Redl H, Nógrádi A. Rescue of injured motoneurons by grafted neuroectodermal stem cells: Effect of the location of graft. *Restor Neurol Neurosci*. 2013 Jan 1;31(3):263-74. doi: 10.3233/RNN-120294. Impact factor: 4,179

II. **Pajer K**, Feichtinger GA, Márton G, Sabitzer S, Klein D, Redl H, Nógrádi A. Cytokine signaling by grafted neuroectodermal stem cells rescues motoneurons destined to die. *Exp Neurol*. 2014 Jun 5;261C:180-189. Impact factor: 4,617 (2013)



SZEGEDI TUDOMÁNY EGYETEM
Általános Orvostudományi Kar
Anatómiai, Szövet- és Fejlődéstani Intézet
6724 Szeged, Kossuth Lajos sgt. 40.
Tel: 62/283-455 e-mail: nogradi.antal@med.u-szeged.hu

Társszerzői nyilatkozat

A doktorjelölt neve: Pajer Krisztián

Társszerzőként nyilatkozom, hogy nevezett értekezését ismerem.

Az abban hivatkozott (közleménybe foglalt) eredmények

- a jelölttel közös munkánk eredménye,
- az eredmény elérésében a jelölt meghatározó munkát végzett.

Nem ellenzem, hogy a közlemény anyagát értekezésében felhasználja.

Kijelentem továbbá, hogy a közlemény anyaga más fokozatszerzési eljárásban felhasználásra nem kerül.

Közlemény címe:	Rescue of injured motoneurons by grafted neuroectodermal stem cells: Effect of the location of graft.
Szerzők:	Pajenda Gholam, Pajer Krisztián , Márton Gábor, Hegyi Péter, Redl Heinz, Nógrádi Antal
Folyóirat, év, kötet, oldaltól /-ig	2013 Jan 1;31(3):263-74

Szeged, 2014. november 18.

Tisztelettel:

Dr. Nógrádi Antal
egyetemi tanár