

**Csontvelő-eredetű sztrómális sejtekből származó anyagok véredények
kialakítására és angiogén, illetve serkentő faktorok előállítására
történő alkalmazása**

5

K I V O N A T

A találmány tárgya terápiás készítmény angiogenesis és vasculogenesis indukálá-
sában történő alkalmazására, amely terápiás készítmény gyógyászatilag elfogadható sejtte-
rápiával kapcsolatban őssejtekből izolált, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló fakto-
10 rokat tartalmaz. A találmány tárgya továbbá eljárás angiogenesisist és vasculogenesisist indu-
káló faktorok amplifikálására, amely eljárásban őssejteket ^{nek}tesztünk ki és ^{amuk}tenyésztünk együtt
angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok termelődését serkentő vegyülettel. A
találmány tárgyát továbbá őssejtekből izolált és tisztított, terápiás alkalmazásra szolgáló,
angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok képezik. A fentiekben ismertetett,
15 angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok előállítására szolgáló eljárásban diffe-
renciálódás előtt álló szövetből emberi mezenchimális őssejteket izolálunk ^{nek}és tisztítunk ^{amuk} és
a mezenchimasejteket neurológiai és a vázizomzat terápiájára szolgáló eszköz előállítására
expandáltatjuk ^{ik}. A mezenchimális őssejteket szövetek helyreállításához szükséges kívánt
sejtfenotípus differenciálódására és előállítására alkalmas, megfelelő vegyület hatása alatt
20 izoláljuk ^{ak}és tenyésztjük ^{ak}.

Jellemző a' la d

Berger

7.

**Csontvelő-eredetű sztrómális sejtekből származó anyagok véredények
kialakítására és angiogén, illetve serkentő faktorok előállítására
történő alkalmazása**

5 A találmány tárgyát terápiás anyagként alkalmazható készítmények, valamint eljárások képezik. Előnyösebben, a találmány tárgya angiogenesis létrehozása terápiás úton és angiogén illetve serkentő faktorok előállítására.

Az Egyesült Államok felnőttkorú népességének körében az elhalálozás harmadik legáltalánosabb oka, és a rokkantság legfőbb kiváltója a szélütés (stroke). Szélütés akkor jelentkezik, ha az agy valamelyik részében infarktus lép fel, melynek eredményeként az agyi vérellátás megszakadása folytán az agyszövet egy része elhal. Az agyi infarktusokkal járó akut szélütés hirtelen és drámai mértékben bekövetkező neurológiai károsodást vált ki. Más neurológiai betegségek is eredményeznek szövetpusztulást és neurológiai károsodást.

Farmakológiai beavatkozások már történtek a szélütés által befolyásolt, és esetleg túlélésre képes agyrészek vérellátásának maximalizálására, de a klinikai hatékonyság alacsonynak bizonyult. A „Harrison's principles of internal medicine,„ című kiadványban (9. kiadás, 1980, 1926. old.) az alábbiakat írták le: „annak ellenére, hogy kísérletes bizonyítékok igazolják, hogy - nitrogénoxid eljárással történt mérés szerint - (az agyi értágítók) fokozzák a véráramlást az agyban, ezen anyagok a tranziens ischaemiás rohamok, trombózis-
kialukulási, vagy már bekövetkezett hűdési stádiumban lévő emberi szélütéses esetekben végzett körültekintő kísérletekben nem bizonyultak hasznosnak. E megfigyelés igaz a nikotinsavra, priszkolinra, alkoholra, papaverinre, és 5%-os széndioxiddal végzett belélegeztetésre... Ezen eljárások alkalmazásával ellentétben az a felvetés, mely szerint az értágítók inkább károsak mint hasznosak, mivel a szisztémikus vérnyomás csökkentésével csökkentik a koponyán belüli anasztomozisos áramlást, vagy pedig az agy normális részén lévő erek tágításával vért vonnak el az infarktus helyétől.”

Eszerint, a szív- és érrendszer betegségei az elhalálozás és a morbiditás legfőbb kiváltói világszerte. Például, a szívelégtelenség egyre gyakoribb. Szívelégtelenség esetében a vér nem képes megfelelő mennyiségű vért szállítani a test különböző szerveibe. Jelenlegi becslések szerint, több mint 5 millió amerikaiban diagnosztizálták a szívelégtelenséget, évente közel 500000 új eset fordul elő, és évente 250000 elhalálozással hozható kapcsolatba ez a betegség. Az elmúlt 20 évben történt jelentős gyógyászati eredmények ellenére, a

szívelégtelenség előfordulása folyamatosan nő gyakran epidémikus mértékeket elérve és a fejlett államokban jelentős gazdasági terhet jelent.

A szívelégtelenséget elkülönült, a szív teljesítményében bekövetkezett zavarokból és a vénákon belüli fokozott nyomás által kiváltott szimptómák és jelekből álló klinikai szindróma jellemzi. Ezenfelül, a szívelégtelenség olyan progresszív elváltozás, amelyben a szív működés – ártalmas jelenségek hiánya ellenére is - időben folyamatosan romlik. A szívelégtelenség nem megfelelő szívteljesítményt eredményez.

A szívelégtelenség általában két típusba sorolható. A jobb oldali szívelégtelenség esetén a szív jobb oldala nem képes a vénás vért a tüdő vérkeringésébe pumpálni. A vér visszaáramlik a testbe és duzzadást, illetve ödémát okoz. A bal oldali szívelégtelenség jelentkezésekor a szív nem képes a vért a szisztémikus keringésbe pumpálni, így a vér visszaáramlik a bal szívkamrába, melynek következtében folyadék gyűlik fel a tüdőkben.

A szívelégtelenség főként vérbőséget eredményez. Ha a szív nem elég hatékonyan pumpálja a vért, a test, például hormonok vagy idegi szignálok alkalmazásával megpróbálja ezt kompenzálni.

A szívelégtelenséget számos ok képes kiváltani. Például, a szív szövetállományának betegsége szívizom-sejtek pusztulását váltja ki. A bal kamra rendellenes működésének progressziója, részben, közreműködik a szívizom-sejtek folyamatos elvesztésében.

Számos eljárás ismert a szívelégtelenség kezelésére és megelőzésére. Például, állatmodelleken, akut szív-ischaemia és/vagy infarktusz vagy sérülés esetében őssejteket alkalmaztak szívsejtek regenerálására. Az egyik konkrét példában, donor lábszontok csontvelő-állományából izolált életképes sztrómális sejteket tenyésztetben felszaporítottak, jelölték, és izogén, felnőtt patkány-befogadók miokardiumába injektáltak. Az implantáció után 4-12 nappal gyűjtött szívekben megvizsgálták az implantációs helyeket és úgy találták, hogy az implantált sztrómális sejtek szaporodási potenciált mutattak a miokardiális környezetben [Wang és mtsai.].

A szívizom-sejtekről már kimutatták, hogy képesek D3 sejtvonalból származó pluripotens embrionális (ES) sejtekből, embriószerű aggregátumok (embrionid testek) útján differenciálódni. A sejteket a teljes differenciálódási periódus alatt a teljessejt-elvezetési „patch-clamp” eljárással, morfológiailag és génexpresszió-analógia segítségével jellemezték [Maltsev és mtsai., (1994)]. Továbbá, egérszövetű pluripotens ES sejtek képesek voltak az emlős szívre jellemző főbb tulajdonságokat expresszáló szívizom-sejtekké differenciálódni [Maltsev és mtsai., (1993)].

Az őssejteknek, eredetüktől függetlenül (embrionális, csontvelő-eredetű, váz-izomzatból származó, stb.), megvan az a képességük, hogy a test különböző sejttípusaivá, vagy akár bármely sejttípusává differenciálódjanak. Az őssejtek képesek működő szív-izom-sejtekké differenciálódni. Így, a szívelégtelenség kezelésére szolgáló, őssejteken alapuló terápiák számos előnyt nyújtanak a már meglévő terápiás eljárásokhoz képest.

Az alábbiakban röviden összefoglaljuk a találmány szerinti megoldást.

A találmány szerint, a találmány tárgya terápiás szer angiogenesis és vasculogenesis indukálására. A terápiás szer tartalmazhat őssejtekből izolált, angiogenesis és vasculogenesis indukáló faktorok mellett angiogenesis és vasculogenesis indukálására szolgáló, gyógyászatilag elfogadható sejterápiás terápiás anyagot. A találmány tárgya továbbá, eljárás az angiogenesis és vasculogenesis indukáló faktorok termelődésének amplifikálására, amely során az ilyen faktorokat termelő sztrómális sejteket az angiogenesis és vasculogenesis indukáló faktorok termelődését fokozó vegyületnek tesszük ki és ilyen vegyület jelenlétében tenyésztjük. Továbbá, a találmány tárgyát képezik az őssejtekből izolált és tisztított, angiogenesis és vasculogenesis indukáló faktorok alkalmazása terápiában. A találmány tárgya eljárás a fentiekben ismertetett, angiogenesis és vasculogenesis indukáló faktorok előállítására, amely eljárásban differenciálódás előtt álló szövetből emberi mezenchimaeredetű őssejteket izolálunk és tisztítunk és a mezenchima-sejteket neurológiai és az izmok és csontváz terápiájára szolgáló eszköz előállítására expandáltatjuk, majd a mezenchimális őssejteket szövetek helyreállításához szükséges kívánt sejt-fenotípus differenciálódására és előállítására alkalmas, megfelelő vegyület hatása alatt izoláljuk és tenyésztjük.

Az alábbiakban röviden ismertetjük a találmányhoz tartozó ábrákat.

A találmány egyéb előnyei könnyen felismerhetők, és jobban érthetőbbek lesznek, ha az alábbi részletes leírást a kísérő ábrákkal együtt értékeljük.

1A.-1E. ábra. A BDNF (1A. ábra), NGF (1B. ábra), bFGF (1C. ábra), VEGF (1D. ábra) és HGF (1E. ábra) növekedési faktorainak szekrécióit mutató fotók.

2A. és 2B. ábra: A középső agyi artéria okklúzióját megelőzően és utána, illetve intravénásan beadott MSC-vel kezelt, vagy kezeletlen patkányokon végzett viselkedési tesztek eredményei.

3A. és 3B. ábra: A patkányeredetű szaruhártya neovaszkularizációs modell alkalmazása annak vizsgálatára, hogy MSC-szekréció indukál-e angiogenesis *in vivo*. A 3A. ábra kontroll operált szaruhártyát mutat be, ahol a neovaszkularizációra nincs bizonyíték,

míg a 3B. ábrán az látható, hogy ha MSC-felülúszóval bevont kollagén ostyát illesztünk a szaruhártya-résbe, akkor a szaruhártyában erőteljes neovaszkularizáció megy végbe.

4. ábra: A találmány alátámasztására végzett kísérletek bemutatása, ahol csontvelőt vontunk ki egy adott állatból, az MSC-t elkülönítettük és 3-5 passzázsolásban tenyésztettük, az MSC-t idegi károsodást szenvedett állatba injektáltuk és a sejtek szelektíven a sérült szövetbe vándoroltak és a sérülés határterületére lokalizálódtak, az MSC ekkor egy sorozat, az MSC által közvetített erősítő eseményt, parenchimasejtek általi szekréciókat, növekedési és serkentő faktorokat aktivál, javítva ezzel a neurológiai működést.

5. ábra: A patkány agyának elülső varratának szintjén azonosított, standard koronális szekció, amely a jobb oldali féltekét három alrégióra és nyolc mezőre osztja.

6A. és 6B. ábra: A középső agyi artéria okklúzióját megelőzően és azt követően végzett funkcionális viselkedési teszt eredményeit bemutató grafikon.

8A. és 8B. ábra: Patkányeredetű lépsejtek és hMSC közötti kevert limfocita-reakciót bemutató grafikon.

9. ábra: Exogén, emberi csontvelő-eredetű sztrómális sejtek (hMSC) és patkány-agyból származó endogén agysejtek morfológiai jellemzőit bemutató mikrofotók.

Az alábbiakban leírjuk a találmány szerinti megoldást.

Általában, a találmány tárgya csontvelő-eredetű sztrómális sejtek vagy más őssejtekből származó, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok alkalmazása angiogenesis és vasculogenesis indukálására irányuló sejterápia részként. Előnyösebben, a találmány tárgya eljárás sztrómális vagy más őssejtek által szekretált, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok (például, angiogén, serkentő, és növekedési faktorok) termelésének amplifikálására, ahol a termelődött faktorokat beadva a terápia során angiogenesisist vagy más előnyös növekedést indukálunk. Ez az amplifikáció akkor történik, ha a sejteket az agyi sejtekkel és/vagy kalciummal érintkeztetjük és tenyésztjük együtt.

A leírás szerinti értelemben, az „angiogenesis” (vagy másnéven *neovascularisatio*) kifejezés olyan szöveti vascularizációs folyamatot jelent, amely új és/vagy fejlődő vérerek növekedésével jár együtt. A folyamatot az endotél sejtek és simaizom-sejtek beszűrődése közvetíti. A folyamat az alábbi három út egyikével mehet végbe: az erek sarjadhatnak a már korábban meglevő erekből, új erek fejlődhetnek prekursor-sejtekből (vasculogenesis), és/vagy kis erek átmérőjének növekedése útján.

A leírás szerinti értelemben, a „fokozódik” vagy „fokozódás” kifejezésekbe tartozik – minden korlátozás nélkül – a feldúsítás vagy dúsabbá tétel bizonyos kívánt minőségű vagy mennyiségű anyag hozzáadásával vagy az anyag minőségének vagy mennyiségének fokozásával.

5 A leírás szerinti értelemben, az „agykivonat” kifejezésbe tartoznak - minden korlátozás nélkül – agyi eredetű sejtek vagy az agyból nyert más hasonló sejtek. E sejtek tenyésztethetők tápoldatban és a felülúszót agykivonatként alkalmazhatjuk.

A leírás szerinti értelemben, a „sérülés” kifejezésbe tartoznak - minden korlátozás nélkül – fizikai vagy biológiai sérülések, így genetikai elváltozások, betegségek, és korhoz
10 kötött betegségek. Például, a páciensek hűdés, CNS sérülése, és neurodegeneratív betegségek következtében szenvedhetnek neurológiai vagy funkcionális elégtelenségtől.

A leírás szerinti értelemben, a „sejtterápia” kifejezésbe tartozik - minden korlátozás nélkül – az őssejtek terápiás alkalmazása. Az őssejt olyan általános anyasejt, amelynek utódjai különféle sejttypussá specializálódnak. Az őssejtek különféle eredetűek lehetnek,
15 így például származhatnak – minden korlátozás nélkül – embrióból, csontvelőből, májból, sztrómából, zsírszövetből, és az őssejtek szakember által ismert más előfordulási helyeiről. Így, különféle génszabályozási eljárásokkal, például - minden korlátozás nélkül – transzfekcióval, delécióval és hasonlókkal, az őssejteket meg lehet változtatni abból a célból, hogy fokozzuk azok túlélésének valószínűségét vagy bármely más kívánt célból.

20 Emberi alanynak történő *in vivo* beadás esetén az őssejtek képesek önmagukat regenerálni és egy meghatározott sejtvonala korlátozódó progenitor sejté válni, amely aztán specifikus sejtvonallá differenciálódik és szaporodik. A leírás szerinti értelemben, az „őssejtek” kifejezés emberi csontvelőből származó sztrómális sejtet és nem pedig más sejt-típusok őssejtjeit jelenti. Előnyös, ha az „őssejtek” emberi csontvelőből származó
25 sztrómális sejteket jelentenek.

A leírás szerinti értelemben, az „őssejt” vagy „pluripotens” őssejt kifejezéseket egymással felcserélhetően alkalmazzuk, és ezek olyan őssejtet jelentenek, amely (1) bármelyik meghatározott hematopoietikus sejtvonala utódsejtjévé képes alakulni, és (2) amely őssejt önmegújulással képes egy adott súlyosan károsodott immunrendszerű gazda minden
30 vérsejttypusát és annak utódjait, így a pluripotens hematopoietikus őssejtet, újraképezni.

A csontvelő a hosszú csontok velőüregeit, bizonyos Havers-csatornákat, és a lika-csos vagy szivacsos csontok trabeculái közötti teret elfoglaló lágyszövet. Kétféle csontvelőt ismerünk: a vöröset – amely a élet korai szakaszában az összes csontban megtalálható és amelynek jelenléte meghatározott helyekre (azaz a szivacsos csont) korlátozódik a

felnőttkorban és a vörösvértestek (azaz a hematopoiesishez) és a hemoglobin (innen a vörös szín) termelődéséhez van köze; és a sárgát, amely főként zsírtesteket (innen a sárga szín) és kötőszövetet tartalmaz.

Mint egész, a csontvelő olyan komplex szövet, amely hematopoietikus őssejteket, 5 vörös- és fehérvérsejteket és ezek prekursorait, mezenchimális őssejteket, sztrómális sejteket és ezek prekursorait, és a „sztrómá”-nak nevezett kötőszöveti hálózatot alkotó, fibroblasztokból, retikulocitákból, adipocitákból és endotél sejtekből álló sejtcsoportot tartalmaz. A sztrómából származó sejtek a sejtfelszíni fehérjék és a növekedési faktorok közötti közvetlen kölcsönhatás révén morfológiailag szabályozzák a hematopoietikus sejtek 10 differenciálódását és résztvesznek a csont szerkezetének megalapozásában és támogatásában.

Állatmodellek alkalmazásával történt kísérletek felvetették annak lehetőségét, hogy a csontvelő olyan „pre-sztrómális” sejteket tartalmaz, amelyeknek megvan a kapacitása porccá, csonttá és más kötőszöveti sejtté való differenciálódásra [Beresford, Clin. 15 Orthop. 240, 270 (1989)]. Jelen bizonyítékok jelzik, hogy ezek a pluripotens sztrómális őssejteknek vagy mezenchimális őssejteknek nevezett sejtek, aktiválás esetén képesek számos, különféle sejtvonal-típust (azaz, csontsejtek, kondrociták, zsírsejtek, stb.) generálni. Azonban, a mezenchimális őssejtek csak igen kis mennyiségben, különféle más sejtekkel együtt (azaz eritrocitákkal, vérlemezkékkel, neutrofilekkel, limfocitákkal, 20 eozinofilekkel, bazofilekkel, zsírsejtekkel, stb.) van jelen a szövetben, és – a kor előrehaladtával fordított arányban – e sejtek, különféle bioaktív faktorok hatásától függően, képesek különféle kötőszövetekké differenciálódni.

A találmány célja a csontvelőből származó sztrómális sejtek, csontvelőből származó sztrómális sejtek felülúszójának, vagy a csontvelőből származó sztrómális sejtek és 25 más őssejtek közötti kölcsönhatás eredményeként keletkező szekréciók alkalmazása a betegség kezelésére. E szekréciók közé tartozik - minden korlátozás nélkül – egy sorozat növekedési, serkentő és angiogenetikus faktor. A találmány szerinti eljárás idegi sérülésből, vagy más sérülésből történő felépülést segíti elő oly módon, hogy fokozza a kezelés hatásait, például az angiogenezist, és fokozza a még nem létező vagy korábban már létező 30 erezetből a vérerek kialakulását. A találmány alkalmazható továbbá, CNS-t ért károsodást vagy degeneráció után, az agynak az agyműködés javítására irányuló kompenzációs mechanizmusának fokozására. Ezenfelül, a találmány szerinti eljárások és készítmények fokozhatják a sejterápia hatékonyságát.

A sérült sejtek kieséséből eredő hiány, a sérült sejteket pótló sejtekké differenciálódó transzplantált őssejtek útján történő feldúsítása és/vagy a sejtek felszaporítása révén javítja a működést. Például, ha ezt a terápiát a szívben alkalmazzuk, a terápia fokozhatja a szívben az összehúzódó elemek számát. Emellett, az őssejtek felelősek lehetnek különféle anyagok, így serkentő faktorok, felszabadításáért. Így például, a serkentő faktorok felszabadulása angiogenezist indukál (növeli a véredények számát) azért, hogy fokozza a szív működését és/vagy hogy kezelje a szívelégtelenséget. Ezért, az őssejtek nemcsak úgy működnek, hogy funkcionális szívizom-sejtekké differenciálódnak, hanem különböző mechanizmusok útján fokozzák a szív működést és/vagy kezelik a szívelégtelenséget.

A serkentő faktorok, növekedési faktorok és angiogén faktorok előállítása költséges és bonyolult folyamat. A találmány szerinti eljárás és készítmény olcsó és egyszerű eljárást biztosít tiszta serkentő faktorok, növekedési faktorok és más rokon faktorok előállítására egyszerűen a találmány szerinti terápia alkalmazásával. E faktorokat paciensek kezelésére alkalmazhatjuk. Például, a faktorokat alkalmazhatjuk angiogenesis, vasculogenesis indukálására és szövetek működésének és helyreállításának *in vivo* és *in vitro* fokozására. Ezért előnyös annak meghatározása, hogy a csontvelő milyen sztrómális sejtjei alkalmazhatók serkentő, növekedési és angiogén faktorok termelésére és szekretálására szolgáló sejtgyárként. E faktorok - minden korlátozás nélkül – az alábbiak: VEGF, HGF, BDNF, NGF, bFGF, stb. A találmány szerinti eljárás lehetővé teszi, hogy e faktorok termelését a sejttenyésztés körülményeivel manipulálni lehessen. Például, a tenyésztés körülményeit manipulálni lehet valamilyen szövettel való együtt-tenyésztéssel és/vagy úgy, hogy a tápoldathoz kalciumot adunk különböző koncentrációban.

A találmány a sejtterápia betegségek kezelésére történő alkalmazásán alapul. Bár az őssejtek különböző eredetűek (embrióból, csontvelőből, májból, zsírszövetből, stb.), mindegyiküknek megvan az a közös tulajdonsága, hogy a test különböző sejttypusává, akár bármelyik sejttypusává, képesek differenciálódni. Ahogyan a fentiekben említettük, az őssejtekről kimutatták, hogy képesek szívizom-sejtekké differenciálódni [Maltsev és mtsai., (1993; 1994)].

Neurológiai és izom-vázrendszeri terápia számára hasznos eszköz előállítása céljából eljárást fejlesztettünk ki differenciálódás előtti mezenchimális őssejtek emberi szövetből történő izolálására és tisztítására, majd ezt követően a mezenchimális őssejtek tenyésztésben való felszaporítására. Az ilyen manipuláció célja az, hogy nagymértékben megnöveljük a mezenchimális őssejtek számát és hogy e sejteket a test normális reparatív kapacitásának átirányítására és/vagy felerősítésére hasznosítsuk. A nagy számban begyűj-

tött mezenchimális össejteket bizonyos szövetek sérült területeire alkalmazzuk abból a célból, hogy a regeneráció és/vagy rendbehozatal céljából fokozzuk vagy serkentsük az *in vivo* szaporodást, implantáció utáni aktiválás és differenciáltatás révén javítsuk egyes implantátumok adhézióját különböző protézisekhez, fokozzuk a hematopoietikus sejtek

5 termelődését, stb.

A tenyészetben felszaporított, tisztított mezenchimális össejteknek a helyreállítás, implantáció, stb. helyére történő transzferére, immobilizálására és aktiválására különböző eljárásokat vettünk számba, így a sejtek injektálása a váz károsodott helyére, a sejtek inkubálása egy adott protézissel és a protézis implantálása, stb. Eszerint, a sejtek differen-

10 ciálódás előtti izolálásával, tisztításával és tenyészetben történő felszaporításával, majd pedig a differenciálódási folyamatnak - a szövetkárosodás helyére történő vitelével vagy a transzplantáció előtti *in vitro* előkezeléssel történő - aktív szabályozásával a tenyészetben felszaporított, differenciálatlan mezenchimális össejteket különféle terápiás célokra – például számos neurológiai betegség, idegi sérülés, metabolikus csontbetegségek, csontváz

15 diszpláziák, porckárosodások, szalag- és ínbetegségek és más izom-vázrendszeri és kötőszöveti elváltozások esetén különféle terápiás célokra – alkalmazhatjuk.

A mezenchimális össejteknek vagy progenitor sejteknek a helyreállítás, implantáció, stb. helyére történő transzferálására, immobilizálására és aktiválására a különböző porózus kerámiai vivőanyagokon vagy hordozókon át, különféle eljárásokat vettünk számba, így a sejteknek a sérülés helyére történő injektálását is.

20

Az emberi mezenchimális össejteket számos különféle forrásból nyerhetjük, így például degeneratív ízületi betegségben szenvedő páciensektől csípő- vagy térdpótlásos sebészeti beavatkozás során a combcsont feji részének likacsos részéből származó csontdaraboknál alkalmazott tamponokból, jövőbeli csontvelő-transzplantáció céljából normális

25 donorokból és rákos páciensekből leszívással gyűjtött csontvelőből. Bár a begyűjtött csontvelő a sejtenyészetben történő izolálás céljából különféle mechanikai izolációs eljárásokon megy keresztül a begyűjtött csontvelő eredetétől függően (azaz, a például csontszilánkok, perifériális vér, stb. jelenléte), az izolációs folyamat kritikus lépése annak a speciálisan előállított tápoldat alkalmazása, amely nemcsak a mezenchimális össejtek differenciálódás nélküli szaporodását teszi lehetővé, de irányítja azt is, hogy csak a mezenchimális

30 össejtek tapadjanak le a tenyésztedény műanyag- vagy üvegfelszínére. A csontvelőmintákban csak igen kis mennyiségben jelenlevő, kívánt mezenchimális össejtek szelektív kitapadását lehetővé tevő tápoldat előállításával lehetséges volt a mezenchimális össejtek

elválasztása a csontvelőben jelenlévő többi sejttől (azaz vörös- és fehérvérsejtektől, más, már differenciálódott mezenchimális sejtektől, stb.).

Ahogy a fentiekben jeleztük, a kiindulási gyűjtőeljárás konkrét típusától függően a komplett tápoldatot számos különböző izolációs folyamatban alkalmazhatjuk a begyűjtött csontvelő sejtenyésztésre történő preparálása céljából. Ha likacsos csontból származó csontvelődugókat alkalmazunk, a csontvelőt hozzáadtuk a teljes tápoldathoz, majd vortexeléssel diszperziót képeztünk, amelyet lecentrifugálva választottuk el a csontvelősejteket a csontdaraboktól, stb. A csontvelősejteket (amely főként vörös- és fehérvérsejtekből, is igen kis mennyiségű mezenchimális őssejtekből, stb. álltak) egyedülálló sejtekre disszociáltattuk úgy, hogy a csontvelő-sejteket tartalmazó komplett tápoldatot 16-os, 18-as és 20-as méretű tűkön átnyomtuk. Szerintünk, bármely enzimatis elválasztási eljárással szemben, a mechanikai szeparációs folyamatok által nyújtott előny az, hogy a mechanikai eljárás kismértékű változást okoz a sejtekben, míg bármely enzimatis folyamat sejtkárosodást okoz különösen a tenyésztéskor a letapadáshoz és szelektív elválasztáshoz szükséges fehérjekötő-helyekben, és/vagy a kérdéses mezenchimális őssejtekre specifikus monoklonális antitestek előállításához szükséges fehérjehelyeken. A különálló sejteket tartalmazó szuszpenziót (amely körülbelül $50-100 \times 10^6$ sejtmagot hordozó sejtet tartalmaz) 100 mm-es csészékbe lemezeltük ki abból a célból, hogy a mezenchimális őssejteket a szuszpenzióban visszamaradt sejtektől való szelektív elválasztáshoz és/vagy izoláláshoz.

Ha az emberi mezenchimális őssejtek forrásaként aspirált csontvelőt alkalmazunk, a csontvelő-eredetű őssejteket (amelyek csak kevés csontszilánkot, de nagy mennyiségű vért tartalmaznak) a komplett tápoldathoz adjuk és az alábbiakban részletesen leírt Percoll (Sima, St. Louis, MO.) gradiensen frakcionáljuk. A Percoll gradiens a vörös vértetek és a mononukleáris hematopoietikus sejtek nagy százalékát elkülönítette a csontvelőből származó mezenchimális őssejteket tartalmazó, alacsony sűrűségű vérlemezke-frakciótól. A vérlemezke-frakció – amely körülbelül $30-50 \times 10^6$ sejtet tartalmazott – meghatározatlan mennyiségű vérlemezket, $30-50 \times 10^6$ sejtmagot tartalmazó sejtet, és csak körülbelül 50-500 mezenchimális őssejtet tartalmaz a csontvelő-donor korától függően. Az alacsony sűrűségű vérlemezke-frakciót ekkor a sejt-kitapadáson alapuló szelektív elválasztáshoz Petri-csészére lemezeltük ki.

A szivacsos csontból vagy csípő-aspirátumból nyert csontvelő-eredetű sejteket (azaz a primer tenyészetet) komplett tápoldatban tenyésztettük és az alábbiakban leírt körülmények szerint 1-7 napon át lehetővé tettük, hogy a sejtek a Petri-csészék felszínére kitapadjanak. Mivel 3 nap elteltével a kitapadt sejtek száma nem növekedett, három nap-

nak határoztuk meg azt a standard időt, amelynél a nem kitapadt sejteket az eredeti komplett tápoldat friss komplett tápoldatra való cseréjével eltávolítottuk a tenyészetből. Ezt követően négy naponként cseréltük a tápoldatot egészen addig, amíg a tenyésztésre alkalmazott csészékben a sejtek összefolyásig nem szaporodtak (amihez normális esetben 14-21 napra volt szükség). Ez a differenciálatlan, emberi mezenchimális őssejtek számának 10^3 - 10^4 -szeres növekedésének felelt meg.

A sejteket ekkor leválasztási ágenssel – például, tripszin-EDTA (etiléndiamin-tetraecetsav) (0,25% tripszin, 1 mM EDTA (1-szer), Gibco, Grand Island, NY) - vagy kelátképző ágenssel – például, EGTA (etilénglikol-bis-(2-aminoetiléter)-N,N'-tetraecetsav) (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO) leválasztottuk a tenyésztésben alkalmazott csészéről. A kelátképző alkalmazása azért előnyösebb, mint a tripsziné, mert a tripszin esetleg lehasíthatja a mezenchimális őssejtek kötőfehérjéinek egy részét. Mivel e kötőfehérjék felismerési helyeket tartalmaznak, amikor monoklonális antitestek előállítását terveztük, tripszinnel szemben kelátképző ágenszt (például EGTA-t) alkalmaztunk leválasztási ágensként. A leválasztási ágenszt ezután inaktiváltuk és a leválasztott, tenyésztett, differenciálatlan mezenchimális őssejteket komplett tápoldattal mostuk a felhasználás előtt.

Bizonyos körülmények között, tenyésztésben felszaporított mezenchimális őssejteknek megvan az a képességük, hogy csonttá differenciálódjanak, ha átültetésre kerülő élő szövetként porózus kalciumfoszfát-kerámiákkal inkubáljuk. Bár azok a faktorok, amelyek a mezenchimális őssejteket abban az irányban befolyásolják, hogy e sejtek porc helyett csonttá differenciálódjanak nem teljesen ismertek, úgy tűnik, hogy ha közvetlenül lehetővé tesszük a mezenchimális őssejtek szaporodását és a porózus kalciumfoszfát-kerámiákhoz adott, érrendszerből származó tápláló faktorok (a diffúziós kamrával szemben) befolyásolta a mezenchimális őssejtek csonttá történő differenciálódását. Továbbá, az agyi kivonatok arra készítetik az őssejteket, hogy további serkentő faktorokat állítsanak elő ezzel tovább fokozva az őssejtek hatását. Ennek eredményeként, az izolált és tenyészetben felszaporított mezenchimális őssejtek - specifikus körülmények között és/vagy bizonyos faktorok befolyása alatt – alkalmazhatók a szövet-helyreállításához szükséges, kívánt sejt-fenotípussá történő differenciálódásra és a kérdéses sejt-fenotípus előállítására.

Egyetlen dózisban beadott mezenchimális őssejtek hatékonyan csökkenthetik vagy eliminálhatják a T-sejtekre nézve allogén szövetre vagy „nem saját” szövetre adott T-sejt választ, különösen abban az esetben, ha – a mezenchimális őssejtektől való elkülönítésük után - a T-limfociták megtartják azt a tulajdonságukat, hogy allogén sejtekkel szemben érzéketlenek maradnak (azaz, tolerancia vagy anergia).

Az őssejtek agykivonattal együtt, a miokardiumba történő transzplantációjának általános eljárása az alábbi. Az őssejteket és az agykivonatot beadjuk a páciensnek. A beadás lehet szubkután, parenterális, így intravénás, intraarteriális, intramuszkuláris, intraperitoneális, és intranazális, mellett intrathecális és infúziós eljárással kivitelezett beadás.

A mezenchimális őssejtek dozírozása széles határok közé esik és illeszkedik az egyes konkrét esetekben az egyedi szükséglethez. Általában, a parenterális beadás esetén, testtömeg-kilogrammonként körülbelül 0,01 és körülbelül 5 millió közötti sejtet szokás beadni. Az alkalmazott sejtszám függ a befogadó tömegétől és állapotától, a beadások számától és gyakoriságától, és a szakember által ismert egyéb változóktól. A mezenchimális őssejtek beadhatók a szövetnek, szervnek vagy a transzplantálni kívánt sejtnek alkalmas módon. Beadhatók szisztémásan, azaz parenterálisan, intravénás injekcióval vagy a konkrét szövetre vagy szervbe – például csontvelőbe – irányíthatók. Az emberi mezenchimális őssejtek beadhatók a sejtek szubkután implantációjával vagy az őssejtek kötőszövetbe, például izomba, történő injektálásával.

A sejteket megfelelő diluensben, körülbelül 0,01 sejt/ml és körülbelül 5×10^6 sejt/ml közötti koncentrációban felfuszpendálhatjuk. Injektálható oldatokhoz alkalmas adalékanyagok közé tartoznak azok, amelyek biológiailag és fiziológiailag kompatibilisek a sejtekkel és a befogadóval (például, puffereelt sóoldatok vagy más alkalmas adalékanyagok). A beadásra szolgáló készítményt a megfelelő sterilitást és stabilitást biztosító standard eljárások szerint kell formulázni, előállítani és tárolni.

Bár a találmány nem erre korlátozódik, mezenchimális őssejtek izolálhatók, előnyösen csontvelőből, tisztíthatók, és tenyészetben – azaz *in vitro* - felszaporíthatók, a megfelelő számú sejtek előállítására a fentiekben leírt eljárásokban történő alkalmazásra. A csontban található pluripotens blaszt sejteket kialakító mezenchimális őssejtek normális esetben igen alacsony gyakorisággal (1:100.000) fordulnak elő a csontvelőben és más mezenchimális szövetekben [lásd: Caplan és Haynesworth, US 5.486359 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat]. Mezenchimális őssejtek géntranszdukciója az irodalomban ismert [Lásd: Gerson és mtsai., US 5.591.625 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi irat].

Hacsak másként nem jeleztük, a genetikai manipulációkat a Sanbrook és Maniatis, Molecular Cloning: A laboratory manual, 2. kiad., kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989) című kiadványban leírtak szerint végeztük.

A találmány értékes, mivel eléggé egyértelmű, hogy a bármilyen eredetű szívelégtelenség esetén a szívműködés rosszabbodásának egyik mechanizmusa – részben – szív-izom-sejtek folyamatos elhalásán alapul [Sabbah (2000)]. E probléma megoldása a miokardium feldúsítása és/vagy újratelepítése új szívsejtekkel, amelyek átveszik az elvesztett sejtek helyét vagy a már működő szívsejteket tovább erősítik, így javítva a gyengülő szív pumpáló működését.

A találmány az összes eddigi kezelésnél előnyösebb, mivel nincs ismert mellékhatása és a kezelés kevésbé invazív. Például, a szívelégtelenség jelenlegi kezelése a neurohormonális rendszereket befolyásoló drogokon alapul. Ezenfelül, a létező sebész beavatkozások közé tartozik szívátültetés és szívkamra vagy mindkét szívkamra működését segítő eszközök alkalmazása. A találmány által biztosított előny az a képesség, hogy a kezelés közvetlenül a szívelégtelenséget a betegség elsődleges okára, nevezetesen az összehúzódó egységek elvesztésére, irányul. A miokardium, az elégtelenül működő szív általános funkciójában résztvevő összehúzódó egységekké differenciálódó, összejtekkel történő újratelepítése újszerű és a probléma központjára irányul. Más előnyök közé a farmakológiai kezelés alkalmazásával járó mellékhatások hiánya és a szívátültetést vagy más szervátültetést megnehezítő immun-kilökődés hiánya, és az összejtek által termelt serkentő faktorok fokozása tartozik.

A találmánynak meg van az a képessége, hogy számos jelenlegi sebészeti terápiát és feltehetően akár farmakológiai terápiát is helyettesítsen. Az összejtek és ezekkel együtt az agykivonat elégtelenül működő szívbe katéteren alapuló megközelítés alkalmazásával történő bevitelét lehetővé tevő eszközök jelenleg is léteznek, így elkerülhető a nyitott mellkassal történő sebész beavatkozás szükségessége. Továbbá, a találmány alkalmazható az emberi gyógyászati környezet mellett az állatgyógyászatban is.

A találmány szerinti eljárást és készítményt az alábbi „Példák” című részben írjuk le. Bár specifikus megvalósítási módokat ismertetünk, e megvalósítási módok nem részletek és magukban foglalhatnak olyan más alkalmas módokat is, amelyek a szakember számára ismert módok és módszertan tekintetében eltérnek. Alapjában véve, a találmány alap gondolatától való eltérés nélkül bármely, a szakember által ismert eltérő mód, eljárás, szerkezet és anyag alkalmazható.

PÉLDÁK

Eljárások

A molekuláris biológiában alkalmazott általános eljárások: Az általunk követett, technikában ismert, de konkrétan nem részletezett, standard molekuláris biológiai eljárások az irodalomban le vannak írva [Sanbrook és mtsai., Molecular Cloning: A laboratory manual, kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY (1989); Ausubel és mtsai., Current protocols in molecular biology, kiad.: John Wiley and Sons, Baltimore, Maryland (1989); Watson és mtsai., Recombinant DNA, Scientific American Books, New York; Genome analysis: A laboratory manual series, szerk.: Birren és mtsai., 10 kiad.: Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (1998); és az US 4.666.828 sz., US 4.683.202 sz., US 4.801.531 sz., US 5.192659 sz. és US 5.272.057 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokban ismertetett metodológia; amely publikációk a kitanítás részét képezik]. Polimeráz-láncreakciókat (PCR) az irodalomban ismertek szerint [PCR protocols: A guide to methods and applications, kiad.: Academic Press, San Diego, CA 15 (1990)] végeztünk. Specifikus DNS- és RNS-szekvenciákat tartalmazó sejtek kimutatására *in situ* (a sejten) PCR-t kombináltunk áramlási citometriával [Testoni és mtsai., Blood 87, 3822 (1996)].

Az immunológiában alkalmazott általános eljárások: Az általunk követett, technikában ismert, de konkrétan nem részletezett, standard immunológiai eljárások az irodalomban le vannak írva [Basic and clinical immunology, szerk.: Stites és mtsai., kiad.: 20 Appleton and Lange, Norwalk, CT (1994); Selected methods in cellular immunology, szerk.: Mishell és Shiigi, kiad.: W. H. Freeman and Co., New York (1980)].

Terápiás szerek bevitele

A találmány szerinti sejteket a jó laboratórium gyakorlat szerint adhatjuk be és 25 dozírozhatjuk, figyelembe véve az egyedi páciens klinikai állapotát, a beadás helyét és a beadási eljárást, a beadás ütemezését, a páciens korát, nemét, testtömegét és a gyakorló orvos által ismert más faktorokat. A leírás szerinti értelemben, a célra alkalmas, gyógyászatilag „hatékony mennyiség” így meghatározható a technikában ismert ilyen körülmények alapján. A mennyiségnek hatékonynak kell lennie a javulás (így például - minden 30 korlátozás nélkül – túlélési arány vagy sokkal gyorsabb felépülés, a tünetek javulása vagy megszűnése, és a szakember számára ismert megfelelő fokmérőknek kiválasztott jelzők) eléréséhez.

A találmány szerinti eljárásban, a találmány szerinti sejteket különféle módokon adhatjuk be. Meg kell jegyeznünk, hogy beadhatók sejtekként vagy gyógyászatilag elfogadható sóként és beadhatók önmagukban vagy hatóanyagként, gyógyászatilag elfogadható hordozókkal, diluensekkel, adjuvánsokkal és vivőanyagokkal kombinálva. A sejteket beadhatjuk orálisan, szubkután vagy parenterálisan, így intravénásan, intraarteriálisan, intramuszkulárisan, intraperitoneálisan, és intranazális beadás mellett intratékális és infúziós eljárásokkal. A sejtek implantálása is lehetséges. A kezelni kívánt páciens melegvérű állat és előnyösen emlős, pl. ember. A gyógyászatilag elfogadható hordozók, diluensek, adjuvánsok és vivőanyagok, akár csak az implantátum-hordozók, általában, a találmány szerinti hatóanyaggal nem reagáló, inert, nem toxikus szilárd vagy folyékony töltőanyagokat, diluenseket vagy kapszulázó anyagot jelentenek.

Megjegyezzük, hogy az embereket általában hosszabb ideig kezeljük, mint az egeret vagy a példaként felhozott más kísérleti állatokat, amely kezelés a betegség folyamata hosszával és a drog hatékonyságával arányos. A dózis lehet több napon át beadott egyetlen dózis vagy többszörös dózis, de előnyösek az egyetlen dózisok.

A dózis lehet több napon át beadott egyetlen dózis vagy többszörös dózis. A kezelés a betegség folyamata hosszával, a drog hatékonyságával arányos és a kezelni kívánt páciensnek megfelelő.

Ha a találmány szerinti sejteket parenterálisan adjuk be, a sejteket általában egysejtnyi dózisként injektálható formába (oldat, szuszpenzió, emulzió) formulázzuk. Az injektálható gyógyászati formulációk közé vizes oldatok vagy diszperziók és steril injektálható oldatokká vagy diszperziókká alakítható steril porok tartoznak. A hordozó lehet oldat vagy diszperziós közeg, amely – például – vizet, etanolt, poliolt (például, glicerint, propilén-glikolt, folyékony polietilén-glikolt, és hasonlókat), ezek alkalmas keverékeit, és zöldségolajokat tartalmaz.

A megfelelő folyékonyság például bevonattal, például lektinnel, diszperzió esetében a megfelelő szemcsemérettel és felületaktív-anyagok alkalmazásával tartható fenn. A sejt-készítményeknél, bizonyos oldószer-rendszerekként, nem vizes hordozók, mint amilyen a gyapotmag-olaj, szezámolaj, olívaolaj, szójaolaj, kukoricaolaj, napraforgóolaj, vagy mogyoróolaj, illetve észterek, így például izopropil-mirisztát, is alkalmazhatók. Továbbá, a készítmény stabilitását, sterilitását, és izotonikusságát fokozó adalékanyagok, így például antimikrobiális tartósítószer, antioxidánsok, kelátképzők és pufferek, is adhatók a készítményhez. A mikroorganizmusok működésének megakadályozását különféle antibakteriális és gomba elleni szerekkel – például, parabének, klórbutanol, fenol, szorbinsav, és

hasznosítók – biztosíthatjuk. Sok esetben kívánatos lehet az, hogy a készítmény izotonikusságot biztosító ágenseket, például cukrokat, nátriumkloridot, és hasonlókat, is tartalmazzon. Az injektálható gyógyászati formák elhúzódó abszorpcióját úgy érhetjük el, ha abszorpciót késleltető ágenseket – például alumínium-monosztearátot vagy zselatint – adunk a készítményhez. A találmány szerint, azonban, bármilyen vivőanyagot, diluens

vagy adalékanyagot is alkalmazunk, annak kompatibilisnek kell lennie a sejtekkel. Steril, injektálható oldatok készíthetők a találmány gyakorlatba vételében hasznosított sejtek beépítésével – kívánság szerint - különböző más összetevőket is tartalmazó, megfelelő oldószer szükséges mennyiségébe.

A találmány szerinti farmakológiai formulációk a páciensnek beadhatók bármilyen kompatibilis hordozót – mint például, különféle vivőanyagot, adjuvánsokat, adalékanyagokat és diluenseket – tartalmazó, injektálható formulációban; vagy a találmány gyakorlatba vételében hasznosított sejtek beadhatók parenterálisan a páciensnek lassú felszabadulást biztosító, szubkután implantátum vagy irányított beviteli rendszerek – mint például monoklonális antitestek, vektoron alapuló bevitel, iontoforézis, polimer mátrixok, liposzómák és mikroszférák – formájában. A találmányban hasznosítható beviteli rendszerek közé tartoznak például az alábbi szabadalmi iratokban ismertetett rendszerek: US 5.225.182 sz., US 5.169.383 sz., US 5.167.616 sz., US 4.959.217 sz., US 4.925.678 sz., US 4.487.603 sz., US 4.486.194 sz., US 4.447.233 sz., US 4.447.224 sz., US 4.439.196 sz. és US 4.475.196 sz. amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratok. A szakember sok más ilyen implantátumot, beviteli rendszert és modult ismer.

A sejteknek a találmányban hasznosított farmakológiai formulációja beadható orálisan is a páciensnek. Hagyományos eljárások, mint például a sejtek tablettaként, szuszpenziókként, oldatokként, emulziókként, kapszulákként, porokként, szirupokként és hasonló formájában történő beadása alkalmazható. Előnyök az olyan ismert eljárások, amelyek orális vagy intravénás beadásra alkalmasak és amelyek alkalmazása során a biológiai aktivitás megmarad.

A találmány egyik megvalósítási módjában, a találmány szerinti sejtek kezdetben intravénás injekcióval beadhatók abból a célból, hogy a vérben a sejtek szintjeit alkalmas szintre emeljük. A páciensben lévő szinteket ekkor orálisan beadható dózisok formájában tartjuk fenn, bár más beadási formák is alkalmazhatók a páciens állapotától függően és a fentiekben jelzettek szerint. A beadandó mennyiség a kezelni kívánt páciensről függően változik, és körülbelül naponta 100 ng/testtömeg kg-tól körülbelül 100 mg/testtömeg kg-ig, előnyösen 10 mg/testtömeg kg-tól körülbelül 10 mg/testtömeg kg-ig terjed.

1. PÉLDA

Traumás agysérülés (TBI) kezelése csontvelőből származó sztrómális sejtekkel (MSC-k) patkányokban funkcionális javulást eredményezett. A sejtranszplantációs terápiában nemcsak a szövethelyettesítés az egyetlen kompenzációs mód. Mivel számos növekedési faktorról kimutatták, hogy segíti a károsodott szövet javulását és helyettesítését, az MSC-k olyan serkentő támogatást biztosítanak, amely szerepet játszik a károsodott szövet kezelésében. Az emberi MSC-k (hMSC-k) TBI-ből származó cerebrális szövetkivonatra adott válaszát vizsgáltuk és teszteltük annak meghatározására, hogy a TBI környezet indukál-e hMSC differenciálódást és növekedési faktor szekréciót. HMSC-ket tenyésztettünk TBI kivonatokkal in vitro és immuncitokémiát és kvantitatív, szendvics, enzimvel kapcsolt immunszorbens vizsgálatot (ELISA) végeztünk. Az eredmények szerint a TBI-vel feljavított hMSC-k az alábbi specifikus sejtfehérje-markereket expresszálták: az idegsejtek magjára specifikus NeuN (a teljes hMSC-k 0,2-0,5%-a), korai idegsejt-differenciálódásra és neurit-kinövésre specifikus Tuj-1 (6-10%), asztrocitára specifikus GFAP (4-7%), és az oligodendrocitákra specifikus MBP (3-5%). Ezenfelül, a TBI kivonatokkal kezelt hMSC-k az agyból származó neurotróf faktor (BDNF), idegi növekedési faktor (NGF), bázikus fibroblaszt-növekedési-faktor (bFGF), vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) és hepatocita-eredetű növekedési faktor (HGF) szekréciójának fokozó szabályozásával válaszoltak (időtől függően). Ezen adatok demonstrálják, hogy a TBI kivonatok serkentik a hMSC-ket az agyszövetre fenotípusos neurális morfológia és fehérjék expresszáására. Továbbá, az ELISA adatok szerint, a transzplantált hMSC-k terápiás hasznot hajtanak azaz, hogy egy sorozat olyan faktor szekretálnak, amely támogatja az idegi védelmet és angiogenezist.

Ha csontvelőből származó sztrómális sejteket (MSC-k) traumás agysérüléses (TBI) patkánynak transzplantálunk intravénás úton, az MSC-k elősegítik az idegi működés helyreállítását [Lu és mtsai., (2001a)]. Transzplantáció esetén, az MSC-k migráció szempontjából előnyben részesítik a károsodott szöveti helyszínt, és bizonyos sztrómális sejtek az agy endogén-szerű sejtjeire fenotípusos fehérjéket expresszálnak [Lu és mtsai., (2001b); Lu és mtsai., (2001a); Mahmood és mtsai., (2001)]. Bár a károsodott szövet összegettel történő helyettesítésének hosszú távú stratégiája a neurális sérülések kezelésének direkt megközelítése, a TBI modell akut és rövid távú terápiás transzplantációja az MSC differenciálódásának alacsony szintje miatt nem valószínű, hogy biztosítaná a várt funkcionális hasznot [Lu és mtsai., (2001b); Lu és mtsai., (2001a); Mahmood és mtsai., (2001)] és a haszon biztosításának mechanizmusa még mindig ismeretlen.

Az MSC-k természetes körülmények között különféle citokineket és növekedési faktorokat termelnek [Takai és mtsai., (1997); Labouyrie és mtsai., (1999); Bjorklund és Lindvall, (2000); Dormady és mtsai., (2001)], amelyek szekréciós tulajdonságait azok mikrokörnyezete befolyásolja [Dormady és mtsai., (2001)]. A neurotrofinok, mint például az agyi neurotróf faktor (BDNF) és idegi növekedési faktor (NGF, a sérül CNS-szövet túlélését *in vivo* és *in vitro* egyaránt serkentik [Hefti, (1986); Kromer, (1987); Koliatsos és mtsai., (1993); Bullock és mtsai., (1999); Gage, (2000)]. Előzetes klinikai vizsgálatokban széleskörben tanulmányozott növekedési faktor a bázikus fibroblasztnövekedési-faktor (bFGF) [Az és mtsai., (1999)]. A vaszkuláris endotéliális növekedési faktor (VEGF) expressziója szintén segíti az angiogenezist és az idegi helyreállítást [Papavassiliou és mtsai., (1997)]. A szélütés VEGF-el történő kezelése működésbeli javulást eredményez [Zhang és mtsai., (2000b)]. A hepatocita-eredetű növekedési faktor (HGF) expressziója az agyat ért sérülésen belül természetesen fokozólag szabályozott és az apoptózist gátló hatásokat mutat a cerebrális neuronokon [Zhang és mtsai., (2000a)].

Anyagok és eljárások

Reagensek

Hank-féle kiegyenlített sóoldatot (*Hank's balanced salt solution*, HBSS), Dulbecco által módosított Eagle-féle tápoldatot (*Dulbecco's modified Eagle's medium*, DMEM), *knock-out* DMEM-et, *knock-out* szérum-pótlót, foetális borjúból származó szérumot (FBS), tripszint és etiléndiamin-tetraecetsavat (EDTA) a GIBCO-tól (Grand Island, NY) szereztünk be. A Ficoll a Pharmacia-tól (Piscataway, NJ) származott. Neuronális sejtmag-antigén (NeuN) elleni monoklonális, β -tubulin 1-es izotípus (Tuj-1) elleni poliklonális, gliából származó fibrilláris savas fehérje (GFAP) elleni poliklonális és bázikus mielinfehérje (MBP) elleni poliklonális antitesteket a CHEMICON-tól (Temecula, CA) vásároltuk. BDNF, bFGF, VEGF és HGF kimutatására szolgáló, szendvics, enzimmel kapcsolt immunszorbens vizsgálathoz (ELISA) szükséges készleteket az R&D Systems-től (Minneapolis, MN) szereztük be. Az NGF elleni ELISA-készletet a laboratóriumban állítottuk elő. A $\beta(2,5S, 7S)$ NGF elleni monoklonális antitest, $\beta(2,5S, 7S)$ NGF- β -gal elleni antitest, NGF- β standard a Roche Molecular Biochemicals-tól (Indianapolis, IN) származott. Hacsak másként nem jeleztük, a reagenseket a Sigma Chemical Co.-tól (St. Louis, MO) vásároltuk.

Elsődleges hMSC-tenyészet

Az elsődleges csontvelőt három normális emberi donor csípőcsontjának tarajából vett 15-16 ml aspirátumból nyertük. Az egyes aspirátumokat 1:1 arányban HBSS-sel hígítottuk és körülbelül 10 ml Ficoll-ra rétegeltük. Centrifugálás (2.500 x g, 30 perc) után, az egysejtmagú sejtréteget a réteghatárról eltávolítottuk és HBSS-ben felfuszpendáltuk. A sejteket centrifugáltuk (1000 x g, 10 perc) és szövettenyésztő csészénként (100 mm, Falcon, Becton-Dickinson, NJ) 5×10^6 sejtet 10% FBS-sel kiegészített, komplett DMEM-ben felfuszpendáltunk. A sejteket 37°C-on, 5%-os CO₂-ben 3 napig inkubáltuk és a fel nem tapadt sejteket a tápoldat cseréjével eltávolítottuk. Amikor a tenyészet elérte az összefolyást (általában 2-3 hét), a sejteket 0,05% (w/v) tripszint és 0,02% (w/v) EDTA-t tartalmazó, foszfáttal puffertelt sóoldattal 5 percig 37°C-on végzett inkubálással összegyűjtöttük, újra lemeztük és további 2 hétig tenyésztettük, majd összegyűjtöttük. A sejteket a későbbi felhasználásig lefagyasztva tároltuk. Az e kísérletekben alkalmazott sejteket 3-5 passzázsolás során gyűjtöttük össze.

Traumásan sérült agyból készült kivonatok

Kísérleteket végeztünk hím Wistar patkányokon (250-300 g, n=21). A patkányokat intraperitoneálisan beadott klorálhidráttal (35 mg/100 g testtömeg) érzéstelenítettük. A végbélben mért hőmérsékletet visszacsatolással szabályozott, vizes melegítő rendszer alkalmazásával 37°C-on tartottuk a sebészi beavatkozás során. A patkányokat sztereotaxis keretbe helyeztük. Sérülést idéztünk elő a bal félteke (ipsilateral cortex) pneumatikus dugattyúval (6 mm-es csúcs, 4 m/sec ráta, 2,5 mm-es sűrítés) végzett ütésével [Dixon és mtsai., (1991)]. A kontroll állatok kraniotómián estek át, de sérülést nem okoztunk az agyukban. A patkányokat a műtét után 1, 4 és 7 nappal elöltük. A kísérleti és normális kontroll (n=3) patkányokból azonnal agyszövet-kivonatokot készítettünk. A kísérleti és kontroll patkányok agyának bal féltekéjéből vett szegmentumokat jégre helyeztük és nedves tömegüket (grammokban) gyorsan megmértük. Ezt követően, a szövetdarabokat DMEM hozzáadásával (150 mg szövet/ml DMEM) elhomogenizáltuk és 10 percig jégen inkubáltuk. A homogenátumot centrifugáltuk (10 perc, 10.000 x g, 4°C). A felülúszót összegyűjtöttük és a hMCS-ek kezeléséig -80°C-on tároltuk.

Sejtdifferenciálódás

A fehérje-fenotípusos kísérleteket úgy végeztük, hogy $1,0 \times 10^6$ sejtet 35 mm-es csészébe transzferáltunk és friss, 20% *knock-out* szérumpótlót, 10%, 20% vagy 40% TBI szövetkivonat-felülúszót tartalmazó *knock-out* DMEM-mel kezeltük. Az összes sejtet 7

napig inkubáltuk. Az immunreaktív, idegsejt-szerű sejtek számának becslése azon alapult, hogy 10, véletlenszerűen kiválasztott látómezőben (10x objektív), minimum 3 különböző kísérletben a sejteket megszámláltuk. A fenotípusos sejtek arányát a teljes sejtszámból számítottuk ki.

5 Kétszeres és háromszoros festéssel végzett immuncitokémia

HMSC-ket 35 mm-es csészékben, üveg tárgylemezfedő-lemezekre (18 x 18 mm²) transzferáltuk $1,0 \times 10^6$ sűrűségben, a fentiekben ismertetett különböző kezelések alkalmazásával. Az üveg tárgylemezfedő-lemezeken lévő sejteket alkalmaztuk immuncitokémiára. A tápoldat felülúszóját kvantitatív ELISA-mérésekre alkalmaztuk az alábbiak leírtak szerint. A sejteket PBS-sel (pH 7,4) mostuk és 4%-os paraformaldehiddel 10 percig fixáltuk. A nem specifikus kötőhelyeket 4%-os lószérummal, 2%-os borjúszérum-albuminnal és 0,1%-os Triton X-100-al 1 órán át blokkoltuk. A fedőlemezeket PBS-sel mostuk és Tuj-1, GFAP vagy MBP elleni primer antitestekkel 1 órán át inkubáltuk. A lemezeket PBS-sel ismét mostuk és fluoreszcein-izotiocianáttal (FITC) konjugált, egér elleni, kecskeeredetű antitesttel vagy nyúl elleni IgG másodlagos antitesttel 1 órán át inkubáltuk. A Tuj-1-re festett hMSC-fedőlemezeket ismét mostuk és második primer NeuN antitesttel 12 órán át inkubáltuk, PBS-sel mostuk és cianin-5,18-el (Cy5) konjugált egérelleni IgG másodlagos antitesttel 1 órán át inkubáltuk. 4'B-diamidin-2-fenilindol-diklorohidrid (DAPI) festéket alkalmaztunk a sejtszámok, a látómezőben a sejtmagok számolásával történő meghatározására. A fedőlemezeket glicergel befoglaló anyaggal kasíroztuk.

15 ELISA

ELISA-t alkalmaztunk a BDNF, NGF, bFGF, VEGF és HGF hMSC-k általi szekréciójának mérésére TBI-vel és normális agykivonat felülúszójával kiegészített tenyészetben az 1., 4. és 7. napon. Röviden, az összes reagenst és munka standardot a gyártó útmutatása szerint készítettük el, és 50-150 µl standardot vagy vizsgálatra hígított oldatot adtunk egy 96-lyukú lemez egyes lyukaihoz. A lyukakban lévő oldatot óvatosan összekevertük és 2-4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. Az egyes lyukakban lévő folyadékot leszívtuk és a lyukakat mostuk, a folyamatot háromszor megismételve. Az utolsó mosást követően, az összes puffert leszívással vagy dekantálással eltávolítottuk a lyukakból, és a különböző növekedésifaktor-konjugátumokból 200 µl-t adtunk az egyes lyukakhoz. A lemezt 2-4 órán át szobahőmérsékleten inkubáltuk. A leszívást és mosást megismételtük. Az egyes lyukakhoz 200 µl szubsztrátumoldatot adtunk és szobahőmérsékleten 15-30 percig inkubáltuk. Ehhez 50 µl stop oldatot adtunk és óvatosan összekevertük. Az egyes lyukakban az optikai

sűrűséget 30 percen belül, 450-620 nm-re beállított mikrolemes-leolvasóval határoztuk meg.

Statisztikai analízis

Student-féle t-tesztet alkalmaztunk a serkentett minták és a megfelelő kontrollok közötti morfológiai különbségek értékelésére. Az idő szerepének tisztázása a varianciaanalízis mértékének ismételt megállapításával (ANOVA) történt. Az ELISA-adatokat linearizáltuk a különböző növekedési faktor koncentrációk logaritmusának az optikai sűrűség logaritmusának függvényében történő ábrázolásával, és regresszió-analízissel legjobb illesztést (best-fit) készítettünk. A standardokra, kontrollra, és mintákra átlagosan két leolvasást végeztünk, és ebből levontuk az átlagos nulla standard optikai sűrűséget. Minden értéket átlag $\pm$ SD értéként ábrázoltunk (statisztikusan szignifikáns a $p < 0,05$).

Eredmények

A hMSC-k morfológiai differenciálódása idegsejt-szerű sejtekké

Fáziskontraszt mikroszkópos elemzés normális fibroblaszt-szerű morfológiájú hMSC-k mutattuk ki 10% FBS-sel kiegészített komplett DMEM-ben történt tenyésztést követően. Hét napos expozíció után, a 20% *knock-out* szérumpótlóval kiegészített *knock-out* DMEM-ben bizonyos refraktív sejten rövid kinövéseket figyeltünk meg. A normális agyszövetből készült kivonat felülúszójában tenyésztett hMSC-k közül néhány sejt (az összes sejt körülbelül 2-3%-a) idegsejtszerű morfológiát mutatott. Azonban, a 20% *knock-out* szérumpótlóval kiegészített *knock-out* DMEM-ben tenyésztett hMSC-khez képest ($1,24 \times 10^4 \pm 0,5 \times 10^4/\text{ml}$) a normális agyszövetből készült kivonat hMSC-proliferációt indukált ($1,56 \times 10^4 \pm 0,2 \times 10^4/\text{ml}$) ($p < 0,05$). A 20% ~ 40% TBI kivonatból származó felülúszóban tenyésztett hMSC-kben diverz morfológiájú, de jellemzően refraktív, hosszú elágazó kinövéseket (kinövések hossza: $> 10 \mu\text{m}$) és növekedési kónusz-szerű terminális szerkezeteket hordozó sejteket (az összes sejt körülbelül 13%-30%-a idegsejt-szerű sejt), illetve kis és multipoláris nyúlványokat hordozó, csillag alakú sejteket mutattunk ki. A TBI kivonatot tartalmazó tenyészetben az összes sejtszám csökkenését tapasztaltuk ($1,08 \times 10^4 \pm 0,3 \times 10^4/\text{ml}$), de ez nem érte el a statisztikai szignifikancia határát. A különféle koncentrációban alkalmazott TBI szövetkivonatok mindegyike indukálta a hMSC-ket arra, hogy idegsejtszerű sejtekre morfológiailag hasonlítsanak.

Neurális markerek expressziója hMSC-kkel

A 20% *knock-out* szérumpótlóval kiegészített és 10%, 20% vagy 40% TBI-szövetkivonatot tartalmazó *knock-out* DMEM-ben végzett 7 napos tenyésztést követően, a

hMSC-ket immun-citofluoreszcenciás vizsgálatnak vetettük alá. A vizsgálat lehetővé tette a hMSC-k DAPI-val (bíorkék színnel festi a sejtmagot) és FITC-el (zöld) történő dupla, vagy CYT5-tel (vörös) történő tripla jelzését annak meghatározására, hogy a csontvelő-eredetű sejtek expresszálnak-e idegsejtre (NeuN, Tuj-1), asztrocitákra (GFAP), és oligodendrocitákra (MBP) specifikus markereket. A sejtmagokat DAPI-val festettük. Immunreaktivitásra festett tenyészetekben, a hMSC-k 0,2-0,5%-a expresszált NeuN fehérjét, és a hMSC-k 6-10% jelződött a Tuj-1 fenotípussal. A NeuN és Tuj-1 immunreaktivitás ugyanazokon a sejteken együttesen fordult elő (rózsaszín). A hMSC-kból származó sejtek 4-7%-a GFP immunreaktivitást expresszált. A hMSC-kból származó sejtek 3-5%-a MBP immunreaktivitást expresszált. Az alkalmazott különböző TBI-kivonatok mindegyik koncentrációja a hMSC-ket neurális fenotípusra jellemző immunreaktivitás indukálta.

Növekedési faktorok TBI-szövetkivonatból származó felülúszóval kezelt hMSC-k általi szekréciója

A 20% *knock-out* szérumpótlóval kiegészített és 20% TBI-szövetkivonat-felülúszót tartalmazó *knock-out* DMEM-ben végzett 1, 4 és 7 napos tenyésztést követően, a hMSC-k növekedési faktor szekrécióit az 1. ábrán mutatjuk be. A normális agyból és TBI-szövetből készült kivonatok befolyásolták a hMSC BDNF (1a. ábra), NGF (1b. ábra), bFGF (1c. ábra), VEGF (1d. ábra) és HGF *in vitro* szekrécióját (1e. ábra). A „táplolat önmagában” kontrollhoz képest a normális agyból származó kivonat fokozta az összes kimutatott növekedési faktor *in vitro* szekrécióját. Az egyes kísérleti csoportokban, a kiegészített TBI-kivonatokban a BDNF, NGF és HGF szekréciója fokozódott az 1-7 napon. A VEGF szekréciója hasonló a normális agykivonatos és TBI utáni agykivonatos csoportokban. A VEGF szekréciója következetesen nagyobb volt a 4 és 7napos tenyészetben, mint az 1 napos tenyészetben. A bFGF szekréció profiljai különböztek a többi serkentő faktortól. Az 1 napos tenyészetben a bFGF szekréciós értékei – a többi növekedési faktortól eltekintve – a 4 napos és 7 napos értékeket meghaladta vagy azokkal azonos volt. Ezek az adatok jelzik, hogy a TBI elősegíti az NGF és BDNF hMSC-k általi *in vitro* szekrécióját, és az összes neurotrofin, illetve tesztelt növekedési faktor hMSC-k általi szekréciója, a szérumpótlós táploldatban mért értékekhez képest, szignifikáns növekedést mutatott a normális agyban.

Eredmények értékelése

TBI-kivonatokkal kezelt, emberi csontvelőből származó sztrómális sejtek idegsejt-szerű sejtekké képesek differenciálódni és az agyi parenchimális sejtekre fenotípusos fehérjéket expresszálni. A hMSC-k BDNF-et, NGF-et, bFGF-et, VEGF-et, HGF-et

szekretálnak, és a szekréciós szintek függnnek a tápoldatban a TBI-nek való kitétség időtar-
tamától és attól az időtől, amikor a TBI-szövetből kivonat készült.

Az adatok demonstrálják, hogy TBI szövetkivonatokkal végzett *in vitro* kezeléssel
a hMSC-k irányíthatók arra, hogy idegsejtre morfológiailag hasonló sejtek szub-
populációihoz hasonlókká alakuljanak. A kezelt hMSC-k specifikus agyi markereket, pél-
dául NeuN-t (idegsejtekre specifikus), Tuj-1 (korai idegsejt-differenciálódásra és neurit-
kinövésre), GFAP (asztrocitára), és MBP (oligodendrocitákra), expresszálnak. Így, a
hMSC-k képesek többszörös sejtvonal mentén képes differenciálódni. Kísérleti eredmé-
nyek szerint, a hMSC-k meghajthatók arra is, hogy reagensek hatására [Sanchez-Ramos és
10 mtsai., (2000); Woodbury és mtsai., (2000); Deng és mtsai., (2000)] és sérült CNS-ben
idegsejt-szerű sejteké differenciálódjanak [Azizi és mtsai., (1998); Kopen és mtsai.,
(1999); Chopp és mtsai., (2000); Li és mtsai., (2000); Chen és mtsai., (2001); Lu és mtsai.,
(2001b); Lu és mtsai., (2001a); Mahmood és mtsai., (2001)]. Az adatok elsőként mutatják
be, hogy ha bizonyos hMSC-ket specifikus, TBI szövetkivonatot tartalmazó mikrokörnye-
15 zetbe helyezünk *in vitro*, akkor erre a hMSC-k cerebrális parenchimasejtekre morfológiailag
és fenotípusosan jellemző tulajdonságok kialakításával válaszolnak. Terápiás transz-
plantáció esetén, e sejtek a TBI által károsodott agyban képesek a sejtek pótlására forrás-
ként szerepelni.

A normális hematopoiesishez csontvelő-eredetű sztrómális sejtek szükségesek. Az
20 MSC-k által szekretált, számos olyan oldható faktor jellemzésére került más sor, amely
faktorok közvetítik a hematopoiesist [Berezovskaya és mtsai. (1995); Majumdar és mtsai.,
(1998); Majumdar és mtsai., (2000)]. Az MSC-k egyrészt termelnek IL-6-ot, -7-et, -8-at, -
11-et, -12-t, -14-et, -15-öt és Flt-3 ligandumot, és az M-CSF, G-CSF, GM-CSF és SCF
megfelelő alapszintjeinek fenntartását indukálják. Azonban nem valószínű, hogy e fakto-
25 rok önmagukban képesek biztosítani a TBI MSC-vel történő kezelésének terápiás előnyét
fokozó mechanizmust. Feltehetően léteznek más, de még ismeretlen sztrómális faktorok is.
A leírásban bemutatott kísérletekben, a kvantitatív ELISA-adatok demonstrálták, hogy TBI
szövetkivonatokkal kezelt hMSC-k egyidejűleg szekretálnak BDNF-et, NGF-et, bFGF-et,
VEGF-et és HGF-et, és ez a szekréció függ a tenyésztési időtől és attól az időponttól, ami-
30 kor a TBI-kivonat előállításra került. Patkányokon végzett traumás agysérülés után, az int-
ravénásan beadott BDNF csökkenti a sérülés méretét és segíti a BDNF agysérülésben kifej-
zett neuroprotektív szerepét [Koliatsos és mtsai., (1993); Bullock és mtsai., (1999)]. NGF-
injekciót, vagy NGF-et termelő fibroblasztok implantációját követően, illetve NGF-re
transzgénikus egerekben neuroprotektív potenciált mutattak ki a kísérletes agysérülés kü-

lönféle paradigmáiban [Hefti, (1986); Kromer, (1987); Caneva és mtsai., (1995); Gage, (2000)]. Patkányok, egerek és macskák fokális agyi ischaemiás modelljében, az intravénásan beadott bFGF csökkentette az infarktus térfogatát [Sugimori és mtsai., (2001)]. A VEGF, az angiogenesis erős promótere, szintén serkentette az axonok kinövését, az idegsejtek túlélését és a Schwann sejtek proliferációját [Sondell és mtsai., (1999)]. Az ülőideg roncsolási lézióját követően a VEGF mennyiségének növekedése felveti azt, hogy a VEGF szerepet játszik az idegek regenerációjában [Sondell és Kanje, (2001)]. Patkányokban a kísérletes szélülés VEGF-fel történt kezelése szignifikáns mértékben csökkentette a működésbeli veszteségeket [Zhang és mtsai., (2000b)]. A hMSC-k konstitutívan HGF-t is termelnek [Takai és mtsai., (1997)], és a HGF a szövetjavításban résztvevő fontos molekula [Mizuno és mtsai., (2000)]. Ezért, az eredmények határozottan rámutatnak arra, hogy a hMSC-k érzékenyek a normális agyban lévő és a TBI környezetre, és ezekre számos faktor lényeges mértékben megnövekedett termelésével válaszolnak. Mivel adott az, hogy a transzplantált MSC-k a traumásan sérült idegszövetben képesek túlélni [Lu és mtsai., (2001b); Lu és mtsai., (2001a); Mahmood és mtsai., (2001)], a neuroprotektív és angiogén faktorok MSC-k általi folyamatos és a mikrokörnyezetnek megfelelő szekréciója az érintett szövet helyi szintjén, kulcsszerepet tölt be az MSC-k transzplantációjával elért funkcionális előnyök között.

Az adatok azt mutatják, hogy a felnőttkori MSC-ket indukálni lehet arra, hogy saját mezenchimális elkötelezettségüket legyőzzék és a különböző neurológiai betegségek kezelésére, elterjedt és elérhető agyi eredetű sejt- és molekulaforrást képezzenek. Az eredmények bemutatják azt is, hogy TBI esetén a transzplantált MSC-k funkcionális előnyöket biztosítanak [Lu és mtsai., (2001b); Lu és mtsai., (2001a); Mahmood és mtsai., (2001)]. Előnyösen, az MSC-k könnyen előállíthatók a páciens saját csípőtarajából származó csontvelőből, majd tenyészetben felszaporíthatók. Ezért, az MSC-k a transzplantációra szolgáló autológ sejtek könnyen elérhető és megújuló forrását biztosítják. Sérült szövetben e sejtek a sérült agy javítására és plaszticitására szolgáló vitális növekedési faktorok folyamatos forrásai lehetnek.

Az 1. ábrán a BDNF (1A. ábra), NGF (1B. ábra), bFGF (1C. ábra), VEGF (1D. ábra) és HGF (1E. ábra) növekedési faktorok TBI szövetkivonatból származó felülszóval kezelt hMSC-k általi szekrécióját mutatja be. A szekretált faktorok mennyiségét ELISA-val mértük. Önmagában a tápoldathoz képest, a normális agyszövetből készült kivonat fokozta az összes kimutatott növekedési faktor *in vitro* szekrécióját. Az egyes kísérleti csoportokban a kondicionált TBI-kivonatokban a BDNF, NGF és HGF szekréciója az 1

naptól kezdve a 7. napig növekedett. A VEGF szekréciója hasonló volt a normális agykivonattal és a TBI kivonattal kezelt csoportokban. A VEGF szekréciója a 4 és a 7 napos tenyészetben következetesen nagyobb volt, mint az 1 napos tenyészetben. A bFGF szekréció profilja eltért a többi serkentő faktorétól. A többi vizsgált faktorhoz képest, a bFGF szekréciós értéke az 1 napos tenyészetben meghaladta a 4 és 7 napos tenyészetben mért értékeket.

2. PÉLDA

Eljárások

Patkányokon, tranziens okklúziót hajtottunk végre az agyi középső artérián és a szélütés után 3×10^6 hMSC-t injektáltunk i.v.. A szélütés előtt és 1, 7, illetve 14 nappal később működésbeli következményt mértünk. Kevert limfocitareakciót és a citotoxikus T-limfociták kialakulásával mértük a hMSC immun-kilökődését. Emberi sejtmagra specifikus monoklonális antitestet (mAb1281) alkalmaztunk a hMSC azonosítására és a neurális fenotípus mérésére. ELISA-val analizáltuk a neurotrofinok szintjeit a hMSC-vel kezelt és nem kezelt patkányok agyszövetében. Brómdeoxiuridint injektáltunk az újonnan kialakult sejtek azonosítására.

Eredmények

A 14. napon, a kontroll, ischaemiás patkányokhoz képest a hMSC-vel kezelt patkányokban a működés jelentős mértékű helyreállítódását találtuk. Néhány (1-5%) hMSC agyi parenchimális sejtekre fenotípusos fehérjéket expresszált. Az agyból származó neurotróf faktor és az idegi növekedési faktor mennyisége szignifikánsan megnőtt, és az ischaemiás határzónában jelentős mértékben lecsökkent az apoptózisos sejtek száma; szignifikánsan több, brómdeoxiuridinra reaktív sejteket mutattunk ki a hMSC-vel kezelt patkányok ischaemiás féltekéjének szubventrikuláris zónájában. A hMSC a citotoxikus T-limfociták indukálása nélkül indukált limfocita-proliferációt.

Következtetések

Patkányokban, a szélütés hMSC-vel végzett kezelése eredményeként kapott neurológiai előny származhat a növekedési faktoroknak az ischaemiás szövetben bekövetkezett növekedéséből, az apoptózis csökkenéséből a lézió penumbrális zónájában, és a szubventrikuláris zónában az endogén sejtek proliferációjából.

A csontvelőből származó sztrómális sejtek (MSC; másnéven mezenchimális őssejt és progenitor sejt) multipotens sejtek és képesek elősegíteni a szövetek *in vivo* és *in vitro* helyreállítódását. Normális esetben az MSC csont-, porc-, és mezenchimális sejtek keletkezését idézi elő, és az MSC miocitákká, hepatocitákká, gliasejtekké, és neuronokká képes

differentiálódni. Az MSC képes áthaladni a vér-agy gáton és átvándorolni az előagyon és a cerebellumon. Ha hímekből származó, szisztémikus infúzióval nőstény ischaemiás patkányokba juttatott csontvelő-sejtek migráció szempontjából előnyben részesítik az ischaemiás agykérget. Ha hím egerekből származó, besugárzott nőstény egereknek beadott csontvelő-sejtek belépnek az agyba és napok vagy hetek alatt mikroglivá és asztroglivá differenciálódnak.

Nincs olyan neuroprotektív ágens, amely javította volna a szélütés utáni állapotot. Az emberi MSC (hMSC) terápiás előnye patkányokban a miokardiális ischaemia és szívbetegség esetén a szövet helyettesítéséből, illetve az angiogenesis és vasculogenesis indukálásából ered. Az MSC számos növekedési faktort és citokint szekretál, amelyek normális esetben elősegítik a hematopoietikus progenitor sejtek proliferációját és differenciálódását. A csontvelő különféle primitív sejteket tartalmaz, amelyek számos angiogén növekedési faktort, így VEGF-et és bFGF-et, szekretálnak. Így, az MSC-ből neurológiai betegségek kezelésére alkalmas terápiát lehet kifejleszteni. Az agyi középső artéria okklúziójának (MCAO) patkánymodelljén szignifikáns funkcionális helyreállítódást mutattak ki rágcsalóból származó MSC-vel történt kezelést követően.

Anyagok és eljárások

HMSC előállítás és *in vitro* szaporodási kinetika

A sejtszaporodás kinetikájának és a hMSC *in vitro* expansziójának vizsgálatához – helyi érzéstelenítéssel - csontvelő-aspirátumot gyűjtöttünk három egészséges emberi donor csípőcsontjának hátulsó tarajából. A csontvelő-mintákból (személyenként 15-16 ml) mononukleáris sejteket választottuk el Ficoll sűrűséggradiens (Ficoll-Paque, 1,073-as sűrűség, Pharmacia, CA). A hMSC-k izolálását és tenyésztésbe vitelét a Digirolamo és mtsai. által leírtak szerint végeztük. Röviden, mononukleáris sejteket 1×10^6 sejt/ 75 cm^2 szövettenyésztő flaska koncentrációban, 20 ml alacsony glükóztartalmú, 20% foetális borjúsérummal (Gibco BRL), 100 E/ml penicillinnel, 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomocinnel, és 2 mmol/l L-glutaminnal kiegészített, Dulbecco-által módosított Eagle-féle tápoldatban (Gibco BRL, Grand Island, NY) kilemeztük. Hetvenkét órás inkubálás után, a le nem tapadt sejteket a tenyészetből eltávolítottuk, és friss tápoldatot adtunk a flaskákhoz. A műanyaghoz tapadt hMSC-ket a 14. napon (90%-os összefolyás) szétválasztottuk és ezt követően 7 naponként értékeltük a sejtszaporodást és a sejthozamot. A transzplantációhoz megfelelő számú sejt biztosítására, a sejtmagot hordozó csontvelősejteket citométer alkalmazásával megszámoltuk. Az egyes patkányoknak 3×10^6 hMSC-t tartalmazó dózist adtunk be. Öt passzázsolásból gyűjtött, és 20% *knock-out* sérumpótlóval kiegészített Dulbecco-által

módosított, *knock-out* Eagle-táplódatban (Gibco BRL) továbbtenyésztett hMSC-t alkalmaztunk ELISA mérésekre (n=6). Az agyi eredetű neurotróf faktor (BDNF) és idegi növekedési faktor (NGF) hMSC-általi szekrécióját Dulbecco-által módosított, szérummentes Eagle-táplódatban mértük.

5 Patkányeredetű lépsejtek és hMSC közötti kevert, *in vitro* limfocita-reakció

Antigénnel indukált limfocita proliferáció tanulmányozására, egészséges patkányok vagy két héttel korábban 3×10^6 hMSC-vel injektált patkányok lépéből nyert 2×10^5 sejtet besugárzással (20 Gy) kezelt vagy nem kezelt hMSC-vel 96 órán át inkubáltuk (1:10 a serkentőre (hMSC) választ adó (lépsejt) arányban) háromszoros ismétlésben. A kevert sejteket 16 órán át ^3H -timidinnel kezeltük (0,25 $\mu\text{Ci/lyuk}$). A léperedetű limfociták proliferációjának hMSC-általi indukcióját a ^3H -timidin replikálódó lépsejtekbe történő beépülésével mértük. A tenyészeteket automata készülékkel begyűjtöttük, és a ^3H -timidin beépülését folyadékszintillációval mértük.

15

Egyenlet beillesztése

HMSC-re adott, patkányeredetű, citotoxikus *in vitro* T-limfocita-válasz

20 A T-limfocitákról úgy vélik, hogy azok a végzetes graft-versus-host iatrogén betegség beindítói. Ezért, emberi graft-versus-patkány gazda T-sejtválaszt mértünk a litikus hatás meghatározására szolgáló ^{51}Cr vizsgálattal. Egészséges patkányokból vagy két héttel korábban 3×10^6 hMSC-vel injektált patkányok lépéből nyert 2×10^5 sejtet besugárzással kezelt vagy nem kezelt hMSC-vel 96 órán át inkubáltuk (1:10 a serkentőre (hMSC) választ adó (lépsejt) arányban). Az inkubációs idő végén, a tenyészetekből életképes sejteket gyűjtöttünk és ^{51}Cr -felszabadulás vizsgálatban ^{51}Cr -rel jelzett hMSC-vel citotoxicitásra nézve teszteltük.

25

Állati MCAO modell

30 Felnőtt, hím (270-300 g-os) Wistar patkányokat a Charles River Breeding Company-tól (Wilmington, MA) szereztünk be. A patkányokat először 3,5%-os halotánnal bódítottuk el és a bódulatot 1,0-2,0% halotánt tartalmazó, 70% N_2O -ból és 30% O_2 -ből álló eleggyel arcmaszk alkalmazásával tartottuk fenn. A végbélben mért hőmérsékletet visszacsatolással szabályozott, vizes melegítő rendszer alkalmazásával 37°C -on tartottuk a sebészeti beavatkozás során. Tranziens MCAO-t indukáltunk a laboratóriumban módosított,

intraluminális vaszkuláris okklúziós eljárás alkalmazásával. A jobboldali közös nyaki verőeret, a külső nyaki verőeret és a belső nyaki verőeret kezeltük. Az állat testtömege alapján meghatározott hosszúságú, egyszálú nylon sebészecsnát (4-0, 18,5-19,5 mm), amelynek végét lánghoz közel tartással eltompítottuk, a külső nyaki artéria felől a belső nyaki verőér lumenébe vezettünk addig, amíg az nem blokkolta az MCA kezdetét. Az MCAO után két órával, az állatokat halotánnal újra elbódítottuk, és a sebészecsná kivételével reperfüziót végeztünk.

Kísérleti csoportok

1. csoport

10 A neutrofinek mérésére, patkányokon MCAO-t végeztünk kezelés nélkül (n=3) vagy a szélütés után 1 nappal a farokvénába 1 ml, 3×10^6 MSC-t (n=3) vagy 3×10^6 máj-fibroblasztot (n=3) tartalmazó folyadékot injektáltunk. A máj-fibroblasztal végzett vizsgálat volt az a „kontroll”, amelyben a fibroblasztot azonos Wistar patkánytörzsből gyűjtöttük a kontroll sejtek gazda patkányokra gyakorolt nem várt immunválaszának elkerülésére. Az MCAO után 7 nappal a patkányokat elöltük a neutrofinek mérése céljából. Kontrollként három egészséges patkányt is alkalmaztunk.

2. csoport

20 Patkányokon MCAO-t végeztünk, majd az 1. napon 3×10^6 MSC-t (n=9) vagy 3×10^6 máj-fibroblasztot (n=9, kontroll) injektáltuk vagy MCAO-t végeztünk sejt donorok nélkül (n=10, kontroll). Az MCAO utáni 14. napon a patkányokat elöltük a sejtmorfológia meghatározása céljából. Mivel az MCAO indukálja az endogén idegi őssejtek és progenitor sejtek proliferációját az endimában és a szubependimális zónában (másnéven, a ventrikuláris zóna/szubventrikuláris zóna, VZ/SVZ), a sejtproliferáció meghatározása céljából a 2. csoportban 17 patkányt brómdeoxiuridinnel (BrdU, az újonnan szintetizált DNS-t megjelölni képes timidin analóg, 50 mg/kg) naponta intraperitoneálisan injektáltunk az MCAO utáni 14 napon át donor sejtek i.v. injektálásával vagy anélkül. Kontrollként további két egészséges állatnak adtunk be 50 mg/kg BrdU-t intraperitoneálisan 14 napon át naponta, egészen az állatok elöléséig.

Viselkedési tesztek

30 Az MCAO előtt és 1, 7 illetve 14 nappal utána az összes állattal viselkedési teszteket végzett egy kutató, aki a kísérleti csoportokat nem ismerte. A mellső láb szomatoszenzorikus asszimetriáinak mérésére kisméretű, ragacsos hátú papírkorongokat (113,1 mm²) alkalmazott kétoldalú tapintási stimulusként és az egyes mellső lábak csuklórészének radiális helyezte fel az állat ketrecében végzett napi 5 próba során. Feljegyzésre került az

az időpont, amikor az állat érintkezésbe került a stimulussal és az, amikor azt az állat eltávolította. Az egyedi vizsgálatok között legalább 5 perc szünet volt. Az állatokat a ragacsos korong eltávolítási tesztre trenírozta a sebészi beavatkozás előtt 3 napon át. Amikor a patkányok képesek voltak a korongokat 10 másodpercen belül eltávolítani, az állatokat MCAO-nak vettettük alá. Módosított neurológiai súlyossági pontozást (mNSS) alkalmaztunk a neurológiai funkció különböző aspektusainak kategóriákba sorolására. Az mNSS motoros (izomállapot és abnormális mozgás), szenzoros (vizuális, tapintási és proprioceptív), és reflex tesztekkel tevődik össze.

10

1. táblázat

Módosított neurológiai súlyossági pontszám teszt

Motorikus teszt	Pontszám
A patkány felemelése a farkánál fogva 1 = a mellső láb begörbítése 1 = a hátsó láb begörbítése 1 = a fej a függőleges tengely körül $>10^\circ$ -t mozdul	3
Mászkalás a padozaton (normális = 0, maximum = 3) 0 = normális mozgás 1 = képtelen egyenesen járni 2 = a hűdékes oldal felé köröz 3 = a hűdékes oldal felé eldőlni	3
Szenzorikus teszt 1 = helyezékes teszt (vizuális és tapintási) 2 = proprioceptív teszt (mély érzés, a mancs nyomása az asztal széléhez a láb izmainak serkentése végett)	2
Mérlegkaron való egyensúlyozási teszt (normális = 0, maximum = 6) 0 = biztos helyzetű egyensúlyozás 1 = fogások a kar oldalán 2 = a kar átölelése és az egyik láb leesése a karról 3 = a karról két láb is leesik vagy a kar körüli átperdülés (>60 s) 4 = hiábavaló kísérletek az egyensúly visszanyerésére és leesés (>40 s) 5 = hiábavaló kísérletek az egyensúly visszanyerésére és leesés (>20 s) 6 = leesés, nincs kísérlet az egyensúly visszanyerésére vagy a kar átölelésére (>20 s)	6
Reflexek és abnormális mozgások 1 = cimpa reflex (a fejét rázza, ha megérintik a)	4

Módosított neurológiai súlyossági pontszám teszt

Kivonat készítése az ischaemiás agyból

MCAO után 7 nappal, az 1. csoport patkányait halotánnal elbódítottuk, az agyikat eltávolítottuk, és az ischaemiás féltekéket jégen kimetszettük. A mintákat -80°C-on tároltuk. Ezt követően, az egyes szövetmintákat grammonként 1 ml homogenációs pufferben elhomogenizáltuk, majd a homogenátumot centrifugáltuk (10.000 x g, 10 perc, 4°C) és a felülúszót összegyűjtöttük a szekrénumok mérése céljából.

Növekedési faktorok szekréciójának mérése szendvics ELISA alkalmazásával

A BDNF készletet az R&D Systems-től (Minneapolis, MN) szereztük be, és az ELISA eljárást a gyártó útmutatásai szerint végeztük. Az ELISA oldatot készítettünk NGF-re. A $\beta(2,5S, 7S)$ NGF elleni monoklonális antitest, $\beta(2,5S, 7S)$ NGF- β -gal elleni antitest, NGF- β standard a Roche Molecular Biochemicals-tól (Indianapolis, IN) származott. Röviden, az ischaemiás szövetből származó felülúszót vagy a hMSC tenyésztésében alkalmazott szérummentes tápoldatot 100-200 μ l-es mintákra osztottuk (háromszoros ismételtes). BDNF és NGF elleni monoklonális antitesteket alkalmaztunk a gyártó útmutatásai szerint. Ezt követően, az egyes primer antitestekre specifikus második poliklonális antitestet adtuk a vizsgálati keverékekhez. Kromogén szubsztrátummal történő inkubálás után fejlődő szín megfelel a növekedési faktorok mennyiségének, és ezt a szint mikrolemez-leolvasó berendezésben (450-620 nm) mértük.

Szövetteni, immunhisztokémiai és apoptózis értékelés

Lemezek készítése

A 2. csoportba tartozó, az MCAO után még 14 napig életben tartott patkányokat alkalmaztunk morfológiai analízisre. Az MCAO utáni 14. napon a patkányokat ketaminnal (44-80 mg/kg intraperitoneálisan) vagy xylazinnal (13 mg/kg intraperitoneálisan) elbódítottuk, és a keringési rendszert heparinizált, foszfáttal pufferezt sódoldattal, majd 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-sel a szíven keresztül átmostuk. Az agyikat 4% paraformaldehidet tartalmazó PBS-be merítettük 2 napra, majd az agyszövetet hét, egyenlő vastagságú (2 mm) koronális blokkra szeleteltük. A szöveteket feldolgoztuk, és az egyes blokkokból 100 μ m vastag metszeteket (blokkonként öt metszet) készítettünk szabad mozgású vibratóm alkalmazásával. A blokkból visszamaradt agyi szövetet paraffinba ágyaztuk, és ebből 6 μ m vastag metszetekből álló sorozatokat készítettünk.

Az infarktus térfogatának mérése

Hét blokkból származó, koronális részből készített (6 μ m vastag) metszetek egyikét hematoxilin-eozinnal (H-E) festettük. A hét agyi metszetet a Global Lab Image analízis

rendszerrel (Data Translation, Malboro, MA) átmásoltuk. A közvetett lézióterületet, amelyben az azonos oldali félteke érintetlen területét levontuk az ellentétes oldali félteke területéből, kiszámítottuk. A lézió térfogatát a lézió százalékos térfogataként, az ellentétes oldali féltekével összehasonlítva, adtuk meg.

5 Immunhisztokémiai festés

Normális szérumban történt blokkolás után, az összes vibratóm metszetet emberi sejtmagra specifikus, PBS-ben 1:100 arányban hígított, monoklonális antitesttel (mAb1281, Chemicon, Temecula, CA) inkubáltuk 3 napon át 4°C-on. Ezután, fluoreszcein-izotiocianáttal konjugált, egér elleni, nyúlban termelt antitesttel (1:100 hígítás, Dakopatts, CA) inkubáltunk, minek következtében a szekunder antitest a primer mAb1281 antitesthez kötődött. A hMSC-ből származó sejteket morfológiai kritériumok szerint és a donor sejtekben jelenlévő, de a parenchimális sejtekből hiányzó mAb1281-re végzett immunhisztokémiai festéssel azonosítottuk. Az mAb1281 és a sejtspecifikus markerek ugyanabban a sejtben való jelenlétének celluláris lokalizációjára, kettős festést alkalmaztunk az ischaemiás központra (koordináták a koponyatetőn: -1,0, 1,0 mm) irányított referencia vibratóm-metszesorozaton. Az egyes koronális metszetet a primer mAb1281 antitesttel kezeltük a fentiekben leírtak szerint, majd pedig a sejtre specifikus második, cianin-5.18-al konjugált primer antitesttel (Calbiochem, CA) inkubáltuk 3 napon át 4°C-on: idegsejtmag-antigén (NeuN – idegsejtmag, 1:200 hígítás, Chemicon), mikrotubulussal asszociált 2-es fehérje (MAP-2 – idegsejt-dedritek, 1:200 hígítás, Sigma), gliából származó fibrilláris, savas fehérje (GFAP – asztrociták, 1:1000 hígítás, DAKO, Carpiteria, CA) és vWF (endotél sejtek, 1:400 hígítás, DAKO). Az egyes állatokra vonatkozó negatív kontrollokat az immunhisztokémiai festéssel azonosan kezeltük, de nem alkalmaztuk a primer antitesteket.

25 Lézeres pásztázó konfokális mikroszkópia

A koponya elülső részén fekvő agyterületből készült vibratóm-metszeteket Zeiss mikroszkópra (Bio-Rad, Cambridge, MA) szerelt Bio-Rad MRC 1024 (argon és kripton) lézer-szkenning konfokális leképező rendszerrel analizáltuk. Az immunfluoreszcens úton jelzett lemezeknél, a lemezeken kimutatható zöld (fluoreszcein-izotiocianát) és vörös fluorokróموkat (cianin-5.18) 488 és 647 nm-es lézersugárral excitáltuk, és emissziókat regisztráltunk egymás után, fotonsokszorozó csövön, 522 nm-es és 670 nm-es emissziós szűrőkön keresztül. Mind a hét blokk esetében, az egyes blokkokra vonatkozóan, öt egymást követő (100 µm vastag) metszeten (sejtszámolásra az XYZ stádium-kódolás alkalmaz-

zásával) meghatároztuk az mAb1281-re pozitív sejtek teljes számát. 26 A teljes előagy mAb1281-re pozitív összes sejteinek számát a hét blokkból származó mAb1281-re pozitív sejtek számának összegzésével számítottuk ki. Állatonként összesen 500, mAb1281-re pozitív sejtet számoltunk meg a sejt típusra specifikus markereket (NeuN, MAP-2, vWF, és GFAP) hordozó, mAb1281-re pozitív sejtek arányának, kettős festéssel történt megállapításához.

Apoptózisos sejtek festése

Öt, a koponya elülső részén fekvő agyterületből, a fentiekben hivatkozott blokkból (koordináták a koponyatetőn: -1,0, 1,0 mm) készült paraffinos metszetet (6 µm vastag, 25 µm intervallum) alkalmaztunk az apoptózisos sejtek analízisére. Ezeket a metszeteket a terminális deoxinukleotidil-transzferáz által közvetített dUTP nick végjelöléses (TUNEL) eljárással festettük az apoptózis *in situ* kimutatására (ApopTag kit, Oncor, Gaithersburg, MD). Miután az endogén peroxidáz-aktivitást PBS-ben oldott H₂O₂-vel leállítottuk, a metszeteket terminális deoxinukleotidil-transzferázba helyeztük. Digoxigenin ellen készített, peroxidázzal konjugált antitestet vittünk fel a lemezekre, és a peroxidázt 3,3'-diaminobenzidinnel kimutattuk. A TUNEL festés után, a lemezeket Mayer-féle hematoxilinnal ellenfestettük. Az egyes blokkokból negatív kontroll metszeteket is futtatunk. A TUNEL preparátumokban, csak a sötétbarna apoptózisos testeket (>2) tartalmazó sejteket tekintettük apoptózisos sejteknek.

A 2. ábra bemutatja a patkányagy elülső kommisszurájának szintjén azonosított, standard koronális szekciót, amely a jobb féltekét három szubrégióra (ischaemiás centrum, ischaemiás határzóna, és VZ/SVZ) osztja. Exogén hMSC-t (mAb1281), sejt típusra pozitív sejteket (NeuN, MAP-2, GFAP és vWF) és apoptózisos sejteket (TUNEL-pozitív sejtek) határoztunk meg az azonos oldali (ipsilaterális) és ellentétes oldali (contralaterális) féltekék ezen régióiban. Rutin H-E festés után, a három régió – az ischaemiás lézióban az ischaemiás centrum (az eozinofil háttér diffúz halványsága) és a belső (a neutrofil vakuolizációja vagy szivacsossága) illetve a külső határzónának (a szivacsosságtól a teljesen érintetlen szövetig) [a legtöbb sejt intakt volt, azonban szétszórta sérült vagy elpusztult sejteket is megfigyeltünk] - azonosítása és a sejtek alakjában bekövetkezett változások és festhetőség meghatározása hisztológiai sajátságokon alapult. A 2. ábra bemutatja a patkányagy elülső kommisszurájának szintjén azonosított, standard koronális szekciót, amely a jobb féltekét három szubrégióra (ischaemiás centrum [IC], ischaemiás határzóna [IBZ], és ventrikuláris zóna/szubventrikuláris zóna [VZ/SVZ]) és nyolc mezőre osztja (1 – kéreg

az IC-ben, 2 – striatum az IC-ben, 3-4 – kéreg az IBZ-ben, 5-6 – striatum az IBZ-ben, és 7-8 – striatum a VZ/SVZ-ben) a kezelésre adott válasz analízise céljából.

Statisztikai analízis

Az összes mérést „vakon” végeztük. A viselkedési pontszámokat (a ragadós korong eltávolítási tesztből és az mNSS-ből) normalizáltuk. Ismételt mérési analízist végeztünk a kezelésnek a viselkedési pontszámra gyakorolt hatásának tesztelésére. Az analízis a kezelés – idő kölcsönhatás 0,1 szignifikancia szinten történt tesztelésével kezdődött; a teljes kezelés hatásának tesztjét akkor kezdtük el, ha a 0,05 szignifikancia szinten nem volt kimutatható kölcsönhatás. A kezelés egyes viselkedési pontszámokra az egyes időpontokban gyakorolt hatásának alcsoport analízisét 0,05 szignifikancia szintnél végeztük, ha a kezelés – idő kölcsönhatás 0,1 szignifikancia szinten vagy a teljes kezelés hatása 0,05 szignifikancia szintnél megállapítható volt. Máskülönben, az alcsoport-analíziseket kísérletnek tekintettük. A lézió térfogata és a sejtek száma tekintetében, a kezelt csoport és kontroll csoport közötti különbségek értékelésére a Student-féle t-tesztet alkalmaztuk. Az ELISA-adatokat linearizáltuk a BDNF és NGF koncentrációk logaritmusának az optikai sűrűség logaritmusának függvényében történő ábrázolásával, és regresszió-analízissel legjobb illesztést (best-fit) készítettünk. A standardokra, kontrollra, és mintákra átlagosan két leolvasást végeztünk, és ebből levontuk az átlagos nulla standard optikai sűrűséget. Bemutattuk az átlagokat (SD) és a kezelt és kontroll csoportok közötti különbségek tesztelésére szolgáló p értéket is.

Eredmények

A hMSC *in vitro* szaporodási kinetikája

Három egészséges emberi donor csontvelőjéből származó hMSC-t teszteltünk tenyésztésben való felszaporítással. Az elsődleges tenyészetekben, a hMSC fibroblaszt-szerű sejtek morfológiailag homogén populációjaként szaporodott. Az egymást követő – általában 7 naponként történt - passzázsok során, a hMSC tömött, orsó alakú sejtekként, íves alakzatban szaporodott. Az 5. hét (4 passzázs) végén, a hMSC $5,4-6,6 \times 10^7$ sejtet eredményezett (2. táblázat).

2. táblázat

A hMSC szaporodási kinetikája

HMSC (10^6) (7 napos passzázsok)						
Donor Sz.	Csontvelő (ml)	Mononukleáris sejtek (10^6)				
1. passzázs	2. passzázs	3. passzázs	4. passzázs	5. passzázs	6. passzázs	7. passzázs
1	16	100	1,65	9,0	18,9	53,6
2	16	130	3,21	14,3	35,8	64,3
3	15	160	10,8	18,9	28,8	66,0

hMSC = Emberi csontvelőből származó sztrómális sejtek.

5 Patkányeredetű lépsejtek és hMSC közötti *in vitro* kevert limfocita-reakció és citotoxikus T-limfocita-válasz

A nem serkentett lépsejtekhez képest a hMSC szignifikáns mértékben fokozta az egészséges patkányok lépsejtjeinek proliferációját (serkentési index = 18,8) (2A. ábra). A hMSC-vel injektált patkányokból származó lépsejtek proliferációja szintén fokozódott a hMSC-vel történt *in vitro* újraserkentést követően (serkentési index = 15,6); azonban, a sejtekben a proliferatív válasz nem különbözött szignifikánsan az egészséges patkányok lépsejtjeivel mértéktől. Ezek az adatok jelzik, hogy bár a hMSC képes proliferatív választ indukálni a patkánylépből származó limfocitákban, a hMSC patkányoknak történő beadása *in vivo* nem érzékenyítette a limfocitákat egy másodlagos proliferatív válaszra.

15 A 8A. ábra patkányeredetű lépsejtek és emberi csontvelőből származó sztrómális sejtek (hMSC) közötti kevert limfocita reakciót mutat be: 2 héttel korábban, egészséges patkány lépéből származó 2×10^5 sejtet (N-Spl) vagy hMSC-vel i.v. kezelt patkányokból származó 2×10^5 lépsejtet (T-Spl) tenyésztettünk besugárzott (20 Gy) hMSC-vel vagy anélkül 96 órán át, háromszoros ismétlésben (10:1 válaszoló: stimulátor arányban). A te-
20 nyészeteket 16 órán át ^3H -timidinnel kezeltük (0,25 $\mu\text{Ci/lyuk}$), majd a sejteket automata berendezéssel begyűjtöttük. A ^3H -timidin beépülését folyadékszintillációval mértük.. Nem találtunk különbséget a hMSC-vel kezelt illetve nem kezelt patkányokból nyert lépsejtek között. SI = serkentési index. (B) Patkánylépből származó sejteket (1×10^7) 5 napon át 1×10^6 , besugárzott (20 Gy) hMSC-vel tenyésztettünk. Az inkubációs idő végén, a te-
25 nyészetekből életképes sejteket gyűjtöttünk és 8 órás ^{51}Cr -felszabadulási vizsgálatban (effektor:cél, E:T arányok mellett) azokat ^{51}Cr -rel jelzett hMSC-vel citotoxicitásra nézve teszteltük. Patkánylépből származó sejtek nem generálnak citotoxikus T-limfocita-választ a

hMSC ellen. Minden értéket átlag $\pm$ SD formában fejeztünk ki. A 8B. ábra szerint a célsejt (hMSC) <4%-os lízise figyelhető meg a serkentőkkel (hMSC) vagy anélkül inkubált, egészséges patkányok lépéből származó sejteknél. Hasonlóképpen, a lépsejtek hMSC beadásával történt *in vivo* elsődleges aktiválása, majd azt követően a tenyésztésben hMSC-vel 5 napig történt újraserkentés a lépsejtekben nem váltott ki citotoxikus választ, ami jelzi, hogy a patkánylépből származó sejtekben a hMSC nem indukál citotoxikus T-limfocita-választ.

Neurológiai funkcionális tesztelés

A csak MCAO-nak kitett kontroll patkányokhoz és patkánymájából származó 3 x 10⁶ fibroblasztal injektált kontroll patkányokhoz képest, a szélütés után 14 nappal, az MCAO után 1 nappal, 3 x 10⁶ hMSC-vel injektált patkányokban funkcionális helyreállítódást mutattunk a ragacslap eltávolítási tesztben (3A. ábra, $p < 0,05$) és az mNSS tesztben (3B. ábra, $p < 0,05$).

A 3. ábra a viselkedési funkcionális tesztek (A. ragacslap eltávolítási teszt, B: módosított neurológiai súlyossági pontszám (mNSS) a középső agyi artéria okklúzióját (MCAO) megelőzően és az után. Patkányokat 2 órás MCAO-nak vettünk alá ($n=10$) vagy MCAO után 1 nappal, tenyésztett, emberi csontvelőből származó sztrómális sejtekkel (hMSC) (LC, $n=9$) vagy patkánymájából származó fibroblaszt-sejtekkel injektáltunk. A kontrollokhoz képest, szignifikáns helyreállítódást tapasztaltunk a hMSC-vel kezelt patkányokban. Üres körök = MCAO, teli körök = +LC, háromszög = + hMSC.

Mennyiségi meghatározás szendvics ELISA-val

Szendvics ELISA-val történt meghatározás szerint, a BDNF (969 ± 198 pg/ml vs 434 ± 59 pg/ml és 498 ± 76 pg/ml) és NGF (1.227 ± 111 pg/ml vs. 834 ± 123 pg/ml és 980 ± 55 pg/ml) szekréciós szintjei sejtkezelés nélküli és májeredetű fibroblasztokkal kezelt, az MCAO után 7 nappal vizsgált patkányokban mértekhez képest a hMSC-vel kezelt patkányokban növekedtek ($p < 0,05$). *In vitro* adatok szerint, a hMSC-k - időtől függően - BDNF-et és NGF-et szekretálnak. A szérumtól mentes tápoldatban a tenyésztés 1. napjához képest a 4. és 7. napon a BDNF és NGF mennyiségében jelentős mértékű emelkedést mutattunk ki (3. táblázat).

3. táblázat

A hMSC-k neurotrofin szekréciója tenyészetben

Neurotrofin idő (nap)	Átlagos fehérjeszint $\pm$ SD (pg/ml)
BDNF	
1	0 $\pm$ 0
4	57 $\pm$ 12*
7	141 $\pm$ 28*
NGF	
1	162 $\pm$ 22
4	321 $\pm$ 74*
7	581 $\pm$ 147*

A szérumtól mentes tápoldatban a tenyésztés 1. napjához képest a 4. és 7. napon a BDNF és NGF mennyiségében jelentős mértékű emelkedést mutattunk ki.

* $p < 0,05$.

HMSC = emberi csontvelőből származó sztrómális sejtek, BDNF = agyi eredetű neurotróf faktor, NGF = idegi növekedési faktor.

Morfológiai analízis

Két órás MCAO-nak kitett patkányokba, az ischaemia után 1 nappal, infúzióval 3×10^6 hMSC-t juttattunk, majd az állatokat az MCAO után 14 nappal morfológiai analízis céljából elöltük. A H-E-vel festett koronális metszeteken belül sötét és vörös neuronokat figyeltünk meg az MCAO-nak kitett, hMSC-injekcióval vagy anélkül kezelt, összes patkány ischaemiás központjaiban. Önmagában az MCAO-nak kitett (lézió mérete, 36,3% $\pm$ 10,5%) vagy az MCAO után 14 nappal, patkánymájából származó fibroblasztokkal injektált patkányokhoz képest (34,6% $\pm$ 9,1%) a hMSC-vel kezelt patkányokban az ischaemiás károsodás méretén nem figyeltünk meg lényeges csökkenést (33,3% $\pm$ 7,6%).

Az agyszöveten belül, a hMSC-ből származó sejteket az emberi sejtmagra specifikus mAb1281 antitesttel azonosított, kerek-ovális sejtmagok jellemzik. A hMSC ($124 \times 10^3 \pm 46 \times 10^3$; a 3×10^6 hMSC 4%-a) a befogadó patkányok ischaemiásan károsodott agyában túlélte és elterjedt. Bár az azonos oldali félteke több területében, így a cortexben és striatumban, mAb1281-re reaktív sejteket figyeltünk meg, az mAb1281 antitesttel jelölt hMSC legnagyobb része (az összes $124 \times 10^3 \pm 46 \times 10^3$ sejt 60%-a) az ischaemiás határ-

zónában helyezkedett el. Néhány ($9 \times 10^3 \pm 2 \times 10^3$ a 3×10^6 hMSC 3%-a) sejtet megfigyeltünk az ellentétes oldali féltekében is.

Kettős festéssel végzett immunfluoreszcencia rávilágított arra, hogy néhány, mAb1281-re pozitív sejt reaktív az alkalmazott neurális markerekre. A NeuN, MAP-2
5 GfAP és vWF markereket expresszáló, mAb1281 antitesttel jelzett sejtek 1%-ban, 1%-ban, 5%-ban és 2%-ban (megfelelően) fordultak elő. Lézer-szenning konfokális mikroszkóppal készült képek kimutatták az emberi sejtmagokra specifikus mAb1281 monoklonális antitest (a hMSC azonosításánál zöld szín) és a NeuN, MAP-2, GFAP, vagy vWF (sejttípusra specifikus markereknél vörös színű) markerek együttes előfordulását a befogadó
10 patkányagyban (4a-h. ábrák). A legtöbb mAb1281-re pozitív sejt véredények körül, néhány sejt pedig a parenchimában volt látható.

A 9. ábrán bemutatott mikrofotók az exogén, emberi csontvelőből származó, sztrómális sejtek (hMSC) és a patkányagyban lévő endogén agysejtek morfológiai jellemzőit ábrázolják. Kettős immunfluoreszcens festés alkalmazásával kimutattuk, hogy az
15 mAb1281-re (az emberi sejtmagokra specifikus monoklonális antitest) pozitív sejtek az agy károsodott régiójában vannak jelen. Lézer-szenning konfokális mikroszkóppal készült képek mAb1281-et (a hMSC-re zöld; a, c, d, f-h), idegsejt-eredetű sejtmag-antigént (NeuN) (b, c), mikrotubulussal asszociálódott 2-es fehérjét (MAP-2), gliából származó fibrilláris, savas fehérjét (GFAP) (g) és vWF-et (sejttípusra specifikus markereknél vörös
20 színű) mutattak ki a befogadó patkány agyában (skálaoszlop=50 μ m).

TUNEL (7c., a., és d. ábrák) és H-E festés alkalmazásával (7b. ábra) jellemzően sötétbarna, kerek vagy ovális apoptózis testeket tartalmazó, apoptózis sejtet meg
számoltuk az ischaemiás határzónában. A referenciának alkalmazott koronális 6 μ m-es metszetben, az apoptózis sejtet mért száma alacsonyabb volt a hMSC-vel kezelt patkányok
25 ischaemiás határzónájában ($38,5 \pm 3,4$) mint önmagában az MCAO után 14 nappal vizsgált állatokban ($82,6 \pm 3,8$) vagy a máj-fibroblasztokkal kezelt ischaemiás patkányokban ($76,4 \pm 6,8$) ($p < 0,05$).

A 7. ábra középső agyi artéria okklúzióját (MCAO) követően az ischaemiás zónában jelenlevő apoptózis sejtet mutat be (a: terminális deoxinukleotidil-transzferáz által
30 közvetített dUTP-biotin nick végjelöléssel [TUNEL] pozitívnak talált sejtek [nyilak]; b: hematoxilin-eozin [H&E] festés). A máj-fibroblasztokkal injektált patkányokkal összehasonlítva kevesebb számú apoptózis sejt (d: kék – hematoxilinnal visszafestett sejtek; nyílhegyek) volt kimutatható az emberi csontvelőből származó sztrómális sejtekkel

(hMSC) injektált patkányokban (c). Az egészséges agyban néhány, brómdeoxiuridinra (BrdU; újonnan szintetizálódott DNS kimutatására alkalmas marker) pozitív sejt volt jelen a ventrikuláris/szubventrikuláris zónában (VZ/SVZ). A csak MCAO kezelést kapott patkányok (f) és máj-fibroblasztokkal injektált patkányok (g) azonos oldali féltekéjének VZ/SVZ zónájában megnövekedett számú, BrdU-ra pozitív sejtet mutattunk ki. Az MCAO-kezelést önmagában vagy MCAO-kezelést kapott és májsejtekkel injektált patkányokhoz képest, a hMSCvel kezelt patkányok esetében a BrdU-ra pozitív sejtek száma jelentősen megnőtt a VZ/SVZ zónában (skálaoszlop=15 μ m).

A VZ/SVZ-ben néhány, BrdU-ra pozitív sejt volt jelen (lásd 7e-h. ábrák). Sokkal több, BrdU-ra pozitív sejtet mutattunk ki az MCAO és hMSC kezelésnek egyaránt kitett patkányok azonos oldali féltekéjében (lásd 7h. ábra), mint a csak MCAO-kezelést (lásd 7f. ábra) vagy MCAO-kezelést kapott és májsejtekkel injektált patkányokban (lásd 7g. ábra). Öt, a koponya elülső részén fekvő agyterületből, a fentiekben hivatkozott blokkból (koordináták a koponyatetőn: -1,0, 1,0 mm) készült paraffinos metszetet (6 μ m vastag, 25 μ m intervallum) alkalmaztunk a BrdU-ra pozitív sejtek analízisére. Az MCAO és hMSC kezelésnek egyaránt kitett patkányok VZ/SVZ zónájából készült metszeteken a BrdU-ra pozitív sejtek száma metszetenként ($95,3 \pm 24,1$) lényegesen nagyobb volt, mint a csak MCAO-kezelést kapott ($27,5 \pm 18,5$) vagy a máj-fibroblasztokkal injektált ischaemiás patkányok VZ/SVZ zónájában ($37,8 \pm 11,2$). Az MCAO és hMSC kezelésnek egyaránt kitett patkányok agyából készült metszeteken nagyobb számú, BrdU-ra pozitív sejt expresszált NeuN-et ($2,5 \pm 0,4$) és GFAP-ot ($4,4 \pm 2,3$), mint a csak MCAO-kezelést ($0,5 \pm 0,6$ és $1,4 \pm 1,1$) vagy a szélütés után 14 nappal máj-fibroblasztokkal injektált patkányok ($0,6 \pm 0,4$ és $1,7 \pm 0,5$, megfelelően) ($p < 0,05$).

Megvitatás

A szomatoszenzorikus pontszám és az mNSS szerint, a csak MCAO-kezelést kapott vagy a máj-fibroblasztokkal injektált patkányokkal összevetve, a szélütés után 1 nappal i.v. injektált hMSC jelentős mértékben fokozta a működésbeli javulást. Ez az előnyös hatás a növekedési faktorok – így a károsodott parenchimasejtek javulását elősegítő neutrofinok – termelődésében, az ischaemiás határzónában az apoptózis csökkenésében, és szélütés után a patkányok VZ/SVZ-jében az endogén, neurális őssejtek és progenitor sejtek proliferációjának és differenciálódásának fokozódásában jelentkezik

Az átültetett élő idegszövetek visszafordították az agysérüléssel kapcsolatos funkcionális hiányokat. A jelen, ember-versus-patkány gazdára vonatkozó adatok egybeesnek más eredményekkel, amelyek szerint, besugárzott állatokban 7 órás permanens MCAO jelentkezése után, nem besugárzott állatokban pedig 2 órás MCAO után, az i.v. transzplantált, allogén csontvelő-sejtek migráció szempontjából előnyben részesítik a sérülés helyét. Morfológiai analízis szerint, a hMSC-nek megvan az a képessége, hogy a patkányagy ischaemiásan károsodott részébe vándoroljon szelektíven. A hMSC képes túlélni, és közülük néhány pedig parenchimális agysejtekre jellemző fehérjemarkereket expresszál.

Bár a hMSC-nek megvan az a képessége, hogy pótolja az elveszett neuronokat, valószínű, hogy a jótékony terápiás hatást biztosító mechanizmusok szerteágazók. Az adatok kimutatták, hogy a kezeletlen patkányokkal összehasonlítva, a szélütés után beinjektált 3×10^6 hMSC - a szomatoszenzorikus pontszám és az mNSS szerint - a beadás után 7 és 14 nappal fokozta a működésbeli javulást ($p < 0,01$). Azonban, a hMSC-knek csak 1%-a, 5%-a, és 2%-a expresszált idegi, asztrocita-eredetű és endotél sejtre jellemző fehérjéket lévén, hogy ekkor még nem történt meg a sejtes differenciálódás és szövetbe való integrálódás. Ezért, sokkal valószínűbb, hogy a rövid távú jótékony hatás azért következett be, mert a hMSC a károsodott szöveteket egy sor, a visszamaradt neuronok funkcionális helyreállítódását elősegítő és az ischaemiás határzónában az apoptózist csökkentő növekedési faktorról látja el. Az MSC közvetlenül is részt vehet az ischaemiásan károsodott neuronok plaszticitásának előmozdításában vagy úgy, hogy a gliasejteket neurotrofinok (például, BDNF és NGF) szekretálására serkenti. A hMSC és a gazda agya közötti kölcsönhatás résztvehet a működés lézió miatt bekövetkezett elvesztésének helyreállításában ^{30, 31}. Szendvics ELISA alkalmazásával e tanulmányban kimutattuk, hogy a BDNF és NGF szekréciós szintjei szignifikánsan megnöttek a hMSC-vel kezelt patkányok ischaemiás féltekéjében ahhoz képest, amilyen értékeket a kezelés után 7 nappal mértünk csak MCAO kezelést kapott patkányokban vagy az MCAO kezelést és patkánymájából származó sejteket is kapott patkányokban. Bár az ischaemiás agyban a BDNF és NGF jelenlétét mértük, nem zártuk annak lehetőségét, hogy más növekedési faktorok (mint például a VEGF³² és HGF³³ angiogén faktorok) is képesek elősegíteni – az angiogenesis fokozásával legalábbis részben – a funkcionális felépülést. Az angiogenesis kapcsolatban áll a hűdéből való fokozott, neurológiai felépüléssel.

Az MSC kismolekulákat gyártó „gyárként” viselkedik. E sejtek egy sor citokint és serkentő faktort termelnek. E sejtek e faktorokat kiterjedt időtartam alatt is szekretálják és nem egyetlen bolus dózisban. Az MSC a hematopoiesisben szerepet játszó számos citokin

expresszálása mellett olyan autokrin, parakrin és juxtakrin faktorokat is szolgáltat, amelyek csontvelő mikrokörnyezetében önmagukban jelenlevő sejtekre befolyást gyakorolnak. Valószínű, hogy az agyszöveten belül a MSC expresszálja e faktorokat, és e citokinek és serkentő faktorok agyszövetre gyakorolt hatása az, amely gyorsan és hatékonyan mozditja elő a funkciók helyreállítódását. Ha e sejteket eltérő ionos (például kalciumot tartalmazó) mikrokörnyezetben tenyésztjük a sejtek az ionos mikrokörnyezet hatására a növekedési faktorok expresszálásának átállításával reagálnak. Ez felveti annak valószínűségét, hogy a sérült szöveten belüli sejtek a szövet igényeinek megfelelően beállított serkentő és növekedési faktorokat expresszálnak. Az agyban, a szélütés MSC-vel végzett kezelése különféle serkentő faktorok és citokinek anatómiailag elosztott, szövetre érzékeny, és időlegesen működő módon történő termelését eredményezi, éles ellentétben egy adott specifikus faktor egyetlen lokalizált injektálásával.

Neurális őssejtek a VZ/SVZ-n belül helyezkednek el, és e sejtek a fejlődő agyban migrálnak a végső helyükre. Az egészséges felnőtt agyban, az előagy idegsejt-termelésének hiánya nem a megfelelő, idegi prekursor sejtek hiányát, hanem a mitózis utáni trofikus és migrációs támogatás alapállapotú gátlását és/vagy hiányát tükrözi vissza. E tanulmányban, a BrdU-ra reaktív sejtek száma az MCAO és hMSC együttes kezelést követően – a csak MCAO kezelést kapott állatokhoz képest – megnőtt a VZ/SVZ-ben, amely azt a lehetőséget veti fel, hogy az i.v. injektált hMSC serkenteni tudja az endogén agysejtek proliferációját és részvételét az ischaemiásan károsodott agyak helyreállítódását. E felismerések egybevágnak a patkányból származó MSC i.v. beadásával kapott adatokkal.

A kevert limfocita reakcióval in vitro meghatározottak szerint, a hMSC i.v. transzplantációja nem teszi hMSC-re érzékennyé a patkányokat. Hasonlóképpen, az egészséges patkányokból vagy hMSC-vel injektált patkányokból származó lépsejtek nem tudtak citotoxikus T-sejtválaszt (az idegen szerv/sejt-transzplantátum kilökődésében szerepet játszó funkcionális immunválasz) generálni a hMSC ellen. Ezek az adatok felvetik azt, hogy a hMSC patkányokban tapasztalt, immunológiai kilökődése nem érinti a hMSC tesztelését a szélütés kezelésére. Lehetséges, és fontosabb, az is, hogy a patkánylép alacsony érzékenységet mutatnak az injektált hMSC-vel szemben, vagy arra egyáltalában nem is érzékenyek. Az a sajátság, hogy a hMSC nem képes erős immunválaszt kiváltani kapcsolatba hozható e sejtek gyenge immunogenitásával, ami annak köszönhető, hogy e sejtek a fő hisztokompatibilitási komplexet (I. és II. osztály) és az ezzel kapcsolatos serkentő molekulákat (CD40, CD80, és CD86) nem vagy csak alacsony szinten expresszálják. Ezenfelül, a hMSC olyan oldható mediátorokat is szekretál, amelyek csökkentő módon szabályozzák

egy adott xenograft kilöködésében résztvevő immunválaszok kialakulását. Ezek az adatok tisztázása további kísérleteket igényel az MSC sejthez kötődő populációi immunogenitásának vizsgálata terén.

Az adatok jelzik, hogy az i.v. beadott hMSC elősegíti a neurológiai funkcionális felépülést 2 héttel a szélütés után. A hMSC és az ischaemiás agy közötti kölcsönhatás fokozza az ischaemiás határzónában az idegsejtek apoptózisát csökkenteni képes és a viszonylag intakt SVZ-ből a sejtek proliferációját előmozdító neurotrofinok szekrécióját az ischaemiás agyban. Azonban az még nincs meghatározva, hogy az SVZ-ből származó sejtek migrálnak-e és épülnek-e be az ischaemiás agyba. A CNS-ben, a neurális sérülések hatékony kezeléséhez szükség lehet az endogén kompenzációs mechanizmus aktiválására, így az agyi körforgások átalakítására. A neurológiai károsodások MSC-által kiváltott csökkenését megerősítő mechanizmus, és a hosszú távú terápiás javulás demonstrálásának tisztázásával, a hMSC hatékony molekuláris és celluláris lehetőséget biztosít a szélütés és feltehetően sok, emberi neurológiai elváltozás terápiás kezelésére.

3. PÉLDA

Neurális sérülés kezelése: előzetes klinikai protokollok

Annak vizsgálatára, hogy az MSC elősegíti-e a szélütés utáni funkcionális felépülést, különféle, sejteken alapuló előzetes klinikai protokollokat hasonlítottunk össze. Az érintendő kívánt témák között volt az, hogy mikor és hová implantáljuk a sejteket. Mivel minket elsősorban az erősítő terápia érdekelt – és feltételeztük azt, hogy az ischaemiás lézió méretét a hatékony erősítő terápia nem változtatja meg – kezdetben az állatokat a szélütés után 1 vagy több nappal kezeltük^{31, 32}. Ez az időzítés klinikai szempontból megfelelő. Ha hiányosságok a szélütés után egy nappal még léteztek, az esetet hűdésnek és nem tranziens ischaemiás rohamnak minősítettük. Az első napon, amikor a páciensek stabilizálódni látszanak a neurológiai károsodások könnyen felmérhetők.

A sejteket sebészi transzplantációval helyezhetjük legközvetlenebbül az agyba. A kérdés az, hogy a sejteket a lézió belülré, egészséges, nem ischaemiás szövetbe vagy pedig a határzónába helyezzük. Az agyon, különösen a fejlődési stádiumban lévő lézió határzónáján végzett megfigyeléseket szem előtt tartva, a kezdeti kísérletekben a naiv teljes csontvelő-sejteknek a határzóna szövetállományába történő behelyezését választottuk³². Így, donor patkányokból sejteket vontunk ki és sebészileg térben meghatározott helyre, az agykéreg alá és a kéregszövetben, az ischaemiás lézió határzónájába implantáltuk^{31, 33}. Elsősorban azt akartuk tesztelni, hogy e sejtek elősegítik-e a funkcionális felépülést, és ennek megfelelően neurológiai és funkcionális tesztekkel végeztünk az állatokon. Komplet

neurológiai vizsgálatot végeztünk (1. táblázat). Ebben a vizsgálatban, a módosított neurológiai súlyossági pontszám (mNSS) a motorikus, szenzorikus reflex és az izomállapot egyik indexe ³⁴⁻³⁸. Ezenfelül, egy ragacslapnak a mancsról történő eltávolítását mérő szomatoszenzorikus tesztet ³⁹ és egy forgórúd tesztet ⁴⁰ alkalmaztunk, amely mérte azt az időt, amit a patkány egy gyorsuló taposómalomban eltöltött. A méréseket a szélütés előtt és 7 nappal illetve 14 nappal utána végeztük. Az állatokat a 14. napon elöltük, és hisztológiai vizsgálattal az agyszövetben transzplantált sejteket figyeltünk meg. E hisztológiai analízissel kapcsolatos egyik kérdés az volt, hogy az MSC differenciálódik-e agyi parenchimális sejtekké. Hasonló kísérleteket végeztünk olyan egereken, amelyeken a középső agyi artérián embóliás okklúziót végeztünk, majd pedig donor egerekből származó, naiv teljes csontvelő-sejtek agyon belülré történő transzplantációjával kezeltük. A transzplantáció után 28 nappal funkcionális méréseket végeztünk. E sejteknek az ischaemiás lézió határvonalába történt behelyezése után jelentős és gyors működésbeli felépülést figyeltünk meg. MSC-nek striatumba történő intraparenchimális transzplantációja olyan egerekbe, amelyekben 1-metil-4-fenil-1,2,3,6-tetrahidropiridinnel Parkinson-szerű léziót indukáltunk, a motorikus funkció jelentős visszanyerését eredményezte ⁴². Hasonlóképpen, a gerincoszlop zúzódásos sérüléséhez közel implantált MSC, jelentős funkcionális javulást okozott.

E kísérletek változatai megmutatták, hogy az MSC és serkentő faktorok – mint például agyi idegi eredetű növekedési faktor - együttes beadása elősegíti a funkcionális felépülést, és e sejtek növekedési faktorokkal történt előzetes együtt-tenyésztése előmozdítja a funkcionális javulást és növeli az agysejtre fenotípusosan jellemző fehérjéket expresszáló sejtek számát. Úgy tűnik, hogy a tenyésztett sejteknek az agyi mikrokörnyezethez való akklimatizációja megkönnyíti az *in vitro* tenyészetből *in vivo* környezetbe történő tranzíciót. Sok transzplantált csontvelő-sejt apoptózison megy keresztül az ischaemiás agyban. Ezért, a csontvelő-sejteket Z-Val-Ala-DL-Asp-fluorometilketon (Z-VAD) kaszpázinhibitorral együtt adtuk be. Az elképzelés igazolódott: az apoptózisos sejtek száma jelentős mértékben csökkent és a forgórúd teszttel mért funkció növekvő javulást mutatott. Így, a sejtes terápia mellett, még a járulékos terápia is képes fokozni a kívánt hatást.

Hasonló terápiás beavatkozások szintén hatásosak voltak a traumás agysérülés, gerincvelő-sérülés, és Parkinson kór állatmodelljeiben; mindhárom modellben az MSC sebészi implantációjával a neurológiai károsodások szignifikáns csökkenése volt tapasztalható. A terápiás javulás a transzplantációs napokon belül egyértelművé vált. Azonban, csak a sejtek 1-3%-a expresszált parenchimasejtekre fenotípusos fehérjéket. Bár az ilyen fehérjéket expresszáló fehérjék aránya előtenyésztéssel növelhető, a transzplantált sejtek számai

elenyésznek a félteke agyszövetének a középső agyi artéria okklúziója után infarktust kapott részéhez képest (durván 40%). Az okklúzió után 14 nappal, körülbelül 50.000 sejt (SE 18 000) azaz a 400.000 transzplantált sejt 12,5%-a túlélte; csak egy kis százalékuk expresszált neurális fehérjéket – túl kevés ahhoz, hogy az infarktust kapott szövetet helyettesítse.

E sejtek közvetlenül az agyba történő transzplantációjának sikere fellendítette a beadás kevésbé invázív, vaszkuláris módjának tesztelésére irányuló kísérleteket. Patkányok középső agyi artériáján okklúziót végeztünk, és az ischaemiás léziót kapott féltekével azonos oldali nyaki artériát bekanüleztük a sejtek injektálása céljából. A szélütés után 1 nappal körülbelül 2 millió MSC-t injektáltunk. Neurológiai tesztek sorozatát végeztük el a kezelés előtt és után. Szövettani analízis kimutatta, hogy csekély számú sejt expresszált parenchimális sejtekre fenotípusos fehérjéket. Azonban, jelentős működésbeli javulás volt tapasztalható. A traumás agysérülés kezelésére teszteltük az MSC artériás módon történő beadásának lehetőségét. Annak ellenére, hogy a nyaki artérián át beadott sejtek bejutottak az agyba, nem tapasztaltunk működésbeli javulást, feltehetően azért, mert a beadási módhoz szükség volt a belső nyaki verőér ligációjára, és ez a traumás agysérülést súlyosbító hipoperfúziót okoz.

Ezután teszteltük a beadás klinikailag relevánsabb, intravénás módját. E megközelítés egyértelműen kevésbé invázív és kevesebb káros hatással jár, mint nyaki vagy közvetlen szövetbe történő injekció. A vénás mód lehetővé teszi a többszörös és hosszú időtartamú sejtkeléseket.

Mások már kimutatták, hogy az intravénásan injektált sejtek megtalálják a módját annak, hogy milyen úton jussanak az agyba. Azonban, nem történtek kísérletek annak kimutatására, hogy a sérülés – mint például szélütés vagy trauma – esetén, az intravénásan injektált sejtek szelektíven migrálnak-e az ischaemiás sérülés helyére, és elősegítik-e a funkcionális javulást. Így teszteltük ezt az elképzelést is vizsgáltuk olyan patkányokon, amelyek középső agyi artériáján okklúziót végeztünk. A szélütés után egy vagy több nappal, 1-3 millió MSC-t injektáltunk az állatok farki vénájába, majd egy sorozat neurológiai következményt vizsgáltunk (1. táblázat). A szélütés után egy nappal sejtekkel kezelt állatokat a szélütés után 14 nappal (1. ábra), a szélütés után 7 nappal kezeltet pedig a szélütés után 35 nappal öltük el. A megelőző kísérleteknek megfelelően, a sejteket brómdeoxiuridinnel (az újonnan szintetizált DNS markere) jelöltük az újonnan létrejött sejtek azonosítása céljából. Emellett, hím patkányokból származó MSC-t injektáltunk nőstény állatokba, és a sejteket az Y kromoszómához történt *in situ* hibridizációval azonosítottuk.

tuk. A kezelt állatokon a kezelés hatására jelentős mértékű funkcionális javulást tapasztaltunk (2. ábra). Kontroll sejtpopulációt is alkalmaztunk annak tesztelésére, hogy sejtek a javult működés elősegítésében mennyire specifikusan működnek közre. Elpusztult MSC, májból és tüdőből származó fibroblaszt (mint nem mezenchimális eredetű kontroll) nem mutatott terápiás előnyt és nem volt jobb, mint a foszfáttal puffereelt sóoldattal kezelt kontroll. Így, a szélütés és trauma után, az intravénás mód jelentős funkcionális javulást biztosít. Ez a megfigyelés igaz volt a szélütés után 7 nappal indított kezelésre, és a funkcionális javulás hasonló volt a hím és nőstény patkányokban.

Az emberi testben fennálló körülmények jobb megközelítése végett, a patkány-eredetű MSC helyett inkább emberi csontvelőből származó sejteket alkalmaztunk donor sejtpopulációként. Helyi érzéstelenítés mellett, emberi sejteket vontunk ki egészséges donorokból a csípőcsont hátsó tarajának punkciójával. A csontvelő-kivonatokból (15-16 ml) mononukleáris sejteket különítettünk el. Okklúzió vagy traumás agysérülés után 1 nappal, az egyes patkányokba 3 millió emberi MSC-t tartalmazó dózist injektáltunk intravénásan. Erős funkcionális javulást figyeltünk meg a szélütés és a trauma után egyaránt. Az emberi sejtek donorokból könnyen előállíthatók, könnyen szaporíthatók, és az áramlási citometriával vagy mágneses sejtosztályozással történő elválasztáshoz vannak megfelelő antitestek. Emberi MSC-t már alkalmaztak rákos vagy sclerosis multiplexes páciensek kezelésére. Így elérhetők az emberekre vonatkozó biztonsági adatok.

Vizsgálataink során nem tapasztaltuk az immunkilökődés egyetlen jelét sem (nem közölt megfigyelés). A kezeletlen patkányok és emberi MSC-vel kezelt állatok lépeit eltávolítottuk és emberi MSC-vel tenyésztettük. Az emberi MSC-vel injektált patkányok lépsejtjeinek proliferációja fokozódott az MSC-vel végzett *in vitro* újraserkentés után; azonban, a proliferatív válasz nem különbözött lényeges mértékben a kezeletlen patkányok lépsejtjeinél tapasztaltakhoz képest. Így, bár az emberi MSC képes elsődleges proliferációs válaszokat indukálni a patkánylépből származó limfocitákban, az MSC *in vivo* beadása patkányoknak nem érzékenyíti a limfocitákat egy második, *in vitro* proliferatív válaszra. A T-limfocitákról úgy vélik, hogy graft-versus-host betegséget indítanak be. Ezért, a patkányeredetű gazda T-sejtek emberi graftra adott válaszát standard króm-51 vizsgálattal mértük a lítikus hatás megállapítása céljából. Az emberi MSC nem indukált citotoxikus T-limfocita választ a patkány lépsejtjeiben. Nem tudjuk kizárni azt a lehetőséget, hogy a rágcsálók és az emberi lények különbözően reagálnak az MSC-kezelésre. Azonban, egy másik lehetőség az, hogy univerzális sejtek, allogén sejtek, és nem pedig autológ sejtek alkalmazhatók páciensek kezelésére. Egyértelmű, hogy ezen elképzelés tesztelésére több, embe-

ri alanyokból származó adatra van szükség. A kezdeti klinikai alkalmazás autológ transzplantációval jár.

Még mindig van számos megválaszolatlan kérdés, így az, hogy hogyan lehet e sejteket a sérülés helyére irányítani, és hogy hogyan fejtik ki jótékony hatásukat. Honnan tudják a sejtek, hogy hová kell migrálniuk? Milyen mechanizmus irányítja e sejteket specifikusan a sérülés helyére? A legérdekesebbek, azonban, a sejtek agyra kifejtett hatásai és az, ahogy e hatások terápiás javulásra fordítódnak.

Az MSC irányítása az agyi sérülés helyeire

Hová migrálnak az intravénásan injektált sejtek? Először, az injektált sejteket meg kell jelezni, hogy azok a szövetben azonosíthatók legyenek. Az MSC könnyen azonosítható a különféle jelölésekre reaktív antitestekkel. Az MSC-t jelezhetjük brómdeoxiuridinnel; hímekből származó sejteket nőstény állatokba injektálhatjuk és az Y kromoszómákat *in situ* hibridizációval azonosíthatjuk; vagy emberi sejteket injektálhatunk patkányokba és emberi antigének elleni antitesteket alkalmazhatunk. Intravénásan injektált sejteket megtalálhatjuk a májban vesében, lépben és csontvelőben. Azonban, a legtöbb azonosított MSC e szervek hajszálereiben cirkulál, és néhány sejt pedig a parenchimában lokalizálódott. Igen kevés sejtet (a kezelés után 14-35 nappal, a 3 millió injektált MSC 1,5-3,0%-a) mutatunk ki az agyszövet parenchimájában. A szélütés vagy trauma után, a sérült agyban a sejtek legnagyobb része a sérülés helyét vette célba. Például, szélütés után, a sejtek több mint 80%-a a érintett féltekén belül volt, és e sejtek nagyobb része a léziót körülvevő területeken gyűlt össze. Sok sejt az erek közvetlen közelében vagy az erekben volt jelen. Hogyan veszik célba a sejtek a sérült szövetet, és lényeges-e, hogy e sejtek a hajszálerekben helyezkednek el?

Az MSC-nek a sérülés helyére való irányítása a gyulladásos sejteknek a sérült szövetre adott válaszára emlékeztet. Összerendezett, keringési és celluláris molekuláris szignálok sorozata révén a neutrofilek és monociták célbaveszik a sérült és gyulladásos szövetet. A gyulladt sejteken és a keringésen expresszált adhézios molekulák és azok receptorai irányítják a sejteket a sérült szövetre és átranzsportálják e sejteket az erezet határfelületén, általában a vér-agy gáton keresztül is. E célbairányító és adhézios molekulák együttműködnek a kemokinekkel. Boyden-kamrát (két, egymástól permeábilis membránnal elválasztott kamra közötti sejtmigráció vizsgálatára szolgáló teszt) alkalmaztunk. Az MSC koncentrációját 5×10^5 sejt/migrációs közeg (Iscoe-által módosított, 5% borjúsérum-albumint tartalmazó, Dulbecco-féle tápoldat) értékre állítottuk be. Az egyes felső lyukakba 50 μ l sejtszuspenziót mértünk. Az alsó felszínre migrált MSC-k számát öt optikai

mezőben ($0,12 \text{ mm}^2$ terület) számoltuk meg. Mivel az ischaemiás agyszövet kemotaktikus fehérjét, például 1-es monocita-kemoattraktáns fehérjét és makrofágokból származó 1-es gyulladáshoz fehérjét, expresszál, ezeket az anyagokat az alsó kamrába helyeztük a migráció dózistól függő fokozása céljából. Hasonló válaszokat kaptunk akkor is, ha adhéziós molekulákat, mint például 1-es adhéziós molekulát helyeztünk az alsó kamrába. A fokozott migrációt hatékonyan lehetett blokkolni úgy, ha az alsó kamrába adhéziós molekulák vagy a kemokinek elleni antitesteket adtunk. Jelentősen csökkent a sejtmigráció akkor is, ha traumás sérülésnek vagy hűtésnek kitett agyból származó szövetet helyeztünk az alsó kamrába. E megfigyelések betekintést nyújtanak abba, hogy a sejt hogyan vesz fel gyulladáshoz sejtekre jellemző identitást, és hogy hogyan „tudja” specifikusan a sérült szövetet célbavenni. Így, bármely olyan sérülés, amely gyulladáshoz választ – így neurodegeneratív folyamatokat, például Parkinson kórt és sclerosis multiplexet – vált ki, irányíthat MSC-t az érintett helyekre. Az, hogy az irányítás függ a sérülés mértékétől, a sejtek „hatékony” dózisának titrációs formáját biztosítja. Minél súlyosabb a sérülés és az azzal jelentkező gyulladáshoz válasz, annál nagyobb számú sejt irányul a sérült helyre.

Hatásmechanizmus

Hogyan gyakorolnak hatást e sejtek az agyra és segítik elő így a sérülésből és patológiai folyamatokból történő funkcionális felépülést? Annak lehetősége, hogy az MSC agysejteké váló átalakulása révén gyakorol jótékony hatást az agyszövetre, igen csekély.

Intravénás injekcióval beadott néhány százezer intraparenchimális sejt igen kevés ahhoz, hogy - ha egyáltalán be is következik - néhány köbmilliméternél nagyobb szövetterefogatot helyettesítsen. Azonban, sok esetben javulás tapasztalható a kezelés után néhány nappal. Legtöbbször a sejteknek csak egy kis hányada expresszál parenchimasejtekre fenotípusos fehérjét. E fehérjék expressziója nem jelez valódi differenciálódást és idegi vagy gliasejtre jellemző működést. Rövid idő után, még a differenciálódott sejtek sem valószínű, hogy igazából integrálódtak volna a szövetbe, és komplex kapcsolatokat képeztek volna (ami a működést javítaná). Így, a szövethelyettesítés, mint az a mechanizmus, amivel az MSC esetleg kifejtene jótékony hatásait, igen valószínűtlen. A jótékony hatásra sokkal valószínűbb magyarázat az, hogy az MSC agyi szöveteket indukál az agy endogén helyreállító hatásainak aktiválására. Az MSC be tud kapcsolni bizonyos reakciókat, és kölcsönhatásba képes lépni az aggyal abból a célból, hogy helyreállító és feltehetően regenerációs mechanizmusokat aktiváljon.

Az MSC kismolekulákat gyártó „gyárként” viselkedik, és sok különféle citokint és serkentő faktort termel. Valószínű, hogy az agyszövetben vagy a sérült agy hajszálereiben az MSC expresszálja ezeket a faktorokat, és a serkentő faktorok agyszövetre gyakorolt hatása az a mechanizmus, amely gyorsan és hatékonyan segíti elő a működés helyreállítódását. Kimutattuk, hogy az MSC – sok más serkentő és növekedési faktor mellett - hepatocita-eredetű növekedési faktort, VEGF-et, idegi növekedési faktort (NGF), és agyi eredetű neurotróf faktort (BDNF) is termel. Ezek a változatos faktorok, és nem egy adott növekedési faktor egyetlen adagja, teszi lehetővé a jótékony hatást. E megfigyelés felveti azt, hogy a sérült szöveten belüli sejtek, a szövet igényeihez igazított, serkentő és növekedési faktorokat expresszálnak. Különböző környezetek befolyásolják e faktorok szekrécióját. Így, a szöveti sérülés mértéke és ennek megfelelően az ionos környezet szétesése szabályozza a serkentő faktorok szekrécióját. Ezt az elképzelést számos környezeti feltétel mellett teszteltük. Ha hűdéssel vagy sérült agyból kivont szövetekben MSC-t tenyésztettünk, a serkentő faktorok szekréciója jelentősen megnőtt. E kísérleteket a növekedési faktorok MSC-vel kezelt agyban történő expressziójának mérésével folytattuk. Az agyban expresszált növekedési faktorok immunjelzéses eljárásokkal történő mérésére kvantitatív, szendvics-ELISA-t alkalmaztunk. A serkentő faktorok expressziója szignifikánsan nagyobb a hűdéssel vagy traumás állatokban, az MSC-vel történt kezelés után, mint az MSC-vel nem kezeltben.

Mivel adott az, hogy az MSC szelektíven képes belépni a sérült agyba és a szövetben - visszacsatolási szabályozással – növekedési és serkentő faktorokat szekretálni, vajon hogyan változtatják meg e faktorok az agyat az ilyen terápiás javulás elősegítésére? A működési hipotézisünk az volt, hogy a terápiás javulást az agy plaszticitásával kapcsolatos események sorozata indukálja; e folyamatok - minden korlátozás nélkül – az alábbiak: angiogenesis, neurogenesis, szinapszisképzés, dendritikus abortizáció, és a szövet határzónájában a stratégiai fontos szövetben az apoptózis csökkenése.

A VEGF és a fibroblaszt-eredetű bázikus növekedési faktor hatékony angiogén ágens. Teszteltük az MSC-t vagy az MSC-ről származó felülűszó angiogenesis indukálására kifejtett hatását. Méréseket végeztünk egy sor emberi agyból származó endotél sejten, amelyek felülűszóiban az MSC-ről származó felülűszókról már kimutattuk, hogy azok a tubulusok gyors kialakulását indukálják (ami szerkezeti és angiogén folyamatra utal). Az *in vivo* alkalmazott vizsgálati eljárás a klasszikus vaszkuláris szaruhártya-vizsgálat volt. Sebési úton zsebet (rést) készítettünk a szaruhártyán és MSC-felülűszóval bevont kollagén ostyát vagy MSC-t önmagában illesztettünk a szaruhártya-résbe. A kontrollban elvégeztük

a sebészi bemetszést és csak kollagén vizet vagy közvetlenül VEGF-et helyeztünk a szaruhártya-résbe. Az MSC-felülúszóval bevont ostyával kezelt szaruhártyában gyors és erőteljes neovaszkularizációt figyeltünk meg. Bár a szaruhártya-bemetszésbe közvetlenül behelyezett sejtek legnagyobb hányada eldiffundált a helyről, az angiogenesis világosan kimutatható volt. A kontroll állatokban nem tapasztaltunk angiogenesisist (2. ábra). Az MSC felülúszóval indukált angiogenesis sokkal erőteljesebb volt, mint ami a VEGF közvetlen alkalmazása után volt megfigyelhető, és ez jelzi, hogy a felülúszó az angiogén faktorok igen hatékony forrása. Angiogenesis agyszövetek MSC-kezelésével történő indukálásán folytatott előzetes tanulmányok is az új véredények fokozott mértékű kialakulására utalnak (nem közölt megfigyelés). Bár az angiogenesis indukálása közvetlenül nem okozza a működés előmozdítását, korábban már kimutattuk, hogy a szélütés után egy vagy több nappal, a szélütés VEGF-fel történt kezelése szignifikánsan javítja a funkcionális javulást és fokozza az angiogenesisist.

A szélütés utáni funkcionális javulásában részt vesz az is, hogy az MSC neurogenesisist is indukál. A neurogenesis egyik fontos helye az oldalsó agykamrákhoz közel található szubventrikuláris zóna. Neurogenesis történik még a *bulbus olfactoricus*-ban és a patkányok agyának fogazott agytekervényében. Agysérülés, például hűdés, az agy bizonyos régióin belül felerősíti a neuronok termelődését. Funkcionális javulás, különösen a szélütés utáni hosszabb időtartam alatt, kapcsolatba hozható az új agysejtek keletkezésével. Az ilyen sejtek termelődését elősegítő mechanizmusok javíthatják a felépülést. Teszteltük a szélütés MSC-vel történő kezelésének neurogenesis indukálására gyakorolt hatását. Méréseink szerint, a szélütés után a sejtszám jelentős mértékben nőtt a szubventrikuláris zónában. E sejtek közül sok hordozott az újonnan képződött progenitor-szerű sejtekre jellemző markereket (például specifikus molekulamarkerek, így a Tuj-1, expresszáldtak). Az azonos oldali félteke agyszöveiben szintén tapasztaltuk a nestin – az őssejtek markere - expressziójának masszív növekedését, amely az agyszövet progenitor vagy fejlődési állapotba történő aktiválódását jelzi. Az MSC-vel transzplantált agyszövet szövettani analízise szintén kimutatta az ischaemiás szöveteken belül elhelyezkedő neuroszféra rozetták jelenlétét. Ezek az idegsejtekből álló rozetták hasonlóak ahhoz, amit a fejlődő agyban találhatunk. E sejtrendszer agyszövetbe történő migrációját irányíthatják az agykamrák alkotta zónából származó asztrocita-szerű nyúlványok, amely szintén a fejlődő agyban zajló eseményekre emlékeztet. Így, a csontvelő-sejtek jelenléte úgy tűnik, hogy elősegíti az új sejtek gyors indukálását és az agykamra alkotta zónából és az érfonatból, mint primer forrásból, a sérült agyrészbe történő gyors migrációját. E sejtek résztvehetnek a funkcionális

javításban, bár a neurogenesis indukálása és e sejtek a funkció helyreállításának helyére történő migrációja közötti kapcsolatot közvetlenül még nem tesztelték.

Az MSC által termelt növekedési és serkentő faktorok befolyásolhatják a szinapszisok kifejlődését és a sérült és ischaemiás agyban fokozhatják az dendritikus elágazásokat. A szélütés MSC-vel történő kezelésének a dendritikus elágazások kialakulására kifejtett közvetlen hatása további vizsgálatokra vár. Előzetes kísérleteinkben kimutattuk a szinaptofizin elnevezésű szinaptikus fehérje fokozott expresszióját a szélütés utáni ischaemiás lézió határzónájában.

Neurális sérülés után, a gliosis gátolhatja a neuritek kinövését és elágazódását. Transzformációs növekedési faktor fehérjék a sebgyógyulásban fő szerepet játszanak, és jelentőségük van a bőrben és szívizomban a hegeképződés gátlásában és a foetusban megfigyelt, hegesezés nélküli sebgyógyulásban. Mivel az MSC termeli ezt a növekedési faktort, a terápiás haszon származhat a hegeképződés csökkenéséből és ezt követően a szinapszisok fejlődésének és a dendritikus elágazódások kialakulásának javulásából.

A citokinek és serkentő faktorok mellett, az MSC a csontok kialakulásával kapcsolatos faktorokat, például osteoblasztra specifikus 2-es faktort és csont-morfogenetikus 1-es fehérjét, expresszál. Az MSC expresszál még neurofillint (idegi sejtadhéziós molekulát) és neurotróf faktorokat, így NGF-et és BDNF-et. Újkeletű vizsgálatok már kimutatták, hogy a csontvelőből származó morfogeneikus fehérjék, Sonic sündisznó gén ("Sonic hedgehog"), paratiroid hormon, és fibroblaszt-eredetű 8-as növekedési faktor - a mezodermális és neuroektodermális útvonalak módosításával - szabályozó szerepet töltenek be az embrionális sejtek differenciálódása során. Annak eldöntése, hogy e citokin-kaskád MSC-általi szekréciója a sérült agyban funkcionális javulással jár-e vagy sem, alapos megfontolást és további kísérleteket igényel.

A lézió előtti terület az apoptózisos sejtpusztulásra igen fogékony. Az apoptózis a szélütés vagy agyi trauma után még hónapokig fennáll. A gyógyulásra gyakorolt hatás ismeretlen. Kimutattuk, hogy szélütés és agyi trauma MSC-vel történt kezelése jelentősen lecsökkentette az e területen belüli apoptózist. A hatást közvetítheti a növekedési faktorok – például NGF – termelődése a sérült agyban. Úgy véljük, hogy ha e régió belül az apoptózist szelektíven csökkentjük, akkor megtörténhet az agyi idegsejt-hálózat újraépülése.

A mechanizmus, amellyel az agy újramodellez, a neurogenesis és a neuroprotektív mechanizmusok által a sérülés után kiváltott funkcionális javulás bizonytalan és fontos tudományos kérdés. Az, hogy ezek az események, amelyeket az MSC-vel végzett kezelés-

sel amplifikálunk, valóban résztvesznek-e a szélütés és trauma utáni fokozott javulásban még vizsgálat alatt állnak.

Ekkor még nem tudtuk izolálni azokat a specifikus eseményeket, amelyek elősegítik a neurológiai funkciók helyreállítódását. Azonban, kigondoltuk, hogy a működés helyreállítódását elősegítő folyamat nem egyszerűen szöveti módosítás (például neurogenesis),
 5 hanem valószínű, hogy egy sorozat esemény, angiogenesis, neurogenesis, szinapszis-képzés, és a hegesedés csökkenése a határreszen és apoptózis összeszővődésének kombinációja, ha nem is szinergista módon, a működés javítása céljából. Bár e hipotézis tesztelése és a javult neurológiai funkcióban résztvevő specifikus faktorok azonosítása megéri a
 10 fáradozást, csak korlátozott mértékben voltunk képesek szelektíven fokozni az apoptózist a határzónában, és csökkenteni az angiogenesis a neurogenesis befolyásolása nélkül.

A sérült agyszövet számos módon összegzi az egyedfejlődést. Szélütés vagy sérülés után, az agyszövet visszatér a fejlődés egy korábbi stádiumába és így igen érzékenyvé válik a beadott MSC-ből származó citokinek, serkentő és növekedési faktorok által kiváltott serkentésre. Az MSC feltehetően serkentő hatást fejt ki a látszólag fejlődő agyszövetben és serkenti a regeneratív változásokat, így az angiogenesis, vasculogenesis, neurogenesis és a dendritikus elágazások fejlődését. Inkább a szövet primitív stádiuma, amely különböző serkentőkre és növekedési faktorokra igen érzékeny, mint az MSC primitív stádiuma az, ami előmozdítja a terápiás választ. Az MSC egyszerűen csak biztosítja az
 20 ontogén agyszövetnek szükséges forrásokat az agyi újramodellezés serkentésére. Nem zárjuk ki annak lehetőségét, hogy más sejtek vagy citokinek és növekedési faktorok meghatározott mennyiségű infúziójának sorozata képes serkenteni a károsodott agysejteket a válaszra és helyreállítani a működést. Hasonlóképpen, nem zárhatjuk annak valószínűségét, hogy az MSC egy adott alpopulációja összejt-szerű vagy progenitor-szerű, és szinergista
 25 módon reakcióba léphet a sérült szövetrel. Bizonyosnak véljük viszont azt, hogy az agyban az MSC nem helyettesít szövetet, és nem differenciálódik működőképes idegsejteké és támogató asztrocitákká, legalábbis azon az időtartamon belül, mikor a funkcionális javulást láttuk. Az elsődleges előny a sérült szövetek újra-felépülésének és a sérülés kompenzációjának aktiválásában rejlik. A 3. ábra mutatja be a jelenlegi elképzelésünket arról a folyamatról, amellyel az MSC begyűjthető és alkalmazható sérült agyszövet kezelésére.
 30

Páciensekbe történő transzplantálás

Egyértelmű, hogy mielőtt a sejterápia e formáját páciensekben alkalmazhatnánk, biztonsági vizsgálatokat kell végezni. Bár a csontvelő-transzplantáció általánosan eljárás a rákkezelésben és a sclerosis multiplex-es páciensekben is alkalmazták már kiegészítő terá-

piaként, szükség van a biztonságot érintő I. fázisú vizsgálatokra a szélütés kezelése terén. Az eddig mintegy 2000 szélütéses állaton végzett kísérletben, nem tapasztaltuk a terápia egyetlen káros hatását sem és nem tapasztaltunk daganat-kialakulásra utaló jeleket sem. A pácienseket a saját sejtjeikkel, HLA-egyeztetett sejtekkel, vagy univerzális donor populációból származó sejtekkel kellene-e kezelni? Az előzetes klinikai adatok eddig azt vetik fel, hogy lehetséges a donor sejtekkel történő kezelés. Azonban, az előzetes és I. fázisú klinikai vizsgálatoknak e kérdésre kell irányulniuk. A leírásban ismertetett előzetes klinikai és alapkísérletek jelzik, hogy a szélütés MSC-vel történő kezelése életképes és igen hatékony helyreállítási terápiát biztosít. Így szükség van klinikai kísérletekre.

A leírásban különféle közleményekre – így amerikai egyesült államokbeli szabadalmi iratokra – hivatkoztunk szerző, évszám és szabadalmi iratszám alapján. A közlemények teljes listáját az alábbiakban mutatjuk be. E közlemények és szabadalmak teljes egészükben a kitanítás részét képezik, és a találmány jobb megértését szolgálják.

A találmányt illusztratív módon írtuk le, és egyértelmű, hogy az alkalmazott terminológia a leírási célokat szolgál és a találmányt semmiben sem korlátozza.

Nyilvánvaló, hogy a fenti kitanítások fényében a találmány sok módosítása és változata lehetséges, ezért egyértelmű, hogy csak a találmány oltalmi körén belül lehet a találmányt a specifikusan leírtaktól eltérően gyakorlatba venni.

Táblázat
hMSC-k differenciálódásának indukálása TBI szövetkivonatokkal

Csoportok	TBI kivonat (%)	Idegsejt-szerű sejtek (%)
<i>Knock-out</i> DMEM		0
Normális agyból készült kivonat	20	3,16±1,97
	40	2,08±1,19
TBI kivonat	10	2,07±0,49
	20	29,60±16,89*
	40	12,70±8,49*

TBI szövetkivonatokkal kezelt hMSC-k összehasonlítása a kontroll *knock-out* szérumpótlót tartalmazó *knock-out* DMEM és normális agyból készült kivonatokkal kezelt

kel. * p<0,01

HIVATKOZÁSOK

Burke and Olson, "Preparation of Clone Libraries in Yeast Artificial-Chromosome Vectors" in Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 17, pp. 251-270 (1991).

Capeocchi, "Altering the genome by homologous recombination" Science 244:1288-1292 (1989).

Davies et al., "Targeted alterations in yeast artificial chromosomes for inter-species gene transfer", Nucleic Acids Research, Vol. 20, No. 11, pp. 2693-2698 (1992).

Dickinson et al., "High frequency gene targeting using insertional vectors", Human Molecular Genetics, Vol. 2, No. 8, pp. 1299-1302 (1993).

Duff and Lincoln, "Insertion of a pathogenic mutation into a yeast artificial chromosome containing the human APP gene and expression in ES cells", Research Advances in Alzheimer's Disease and Related Disorders, 1995.

Huxley et al., "The human HPRT gene on a yeast artificial chromosome is functional when transferred to mouse cells by cell fusion", Genomics, 9:742-750 (1991).

Jakobovits et al., "Germ-line transmission and expression of a human-derived yeast artificial chromosome", Nature, Vol. 362, pp. 255-261 (1993).

Lamb et al., "Introduction and expression of the 400 kilobase *precursor amyloid protein* gene in transgenic mice", Nature Genetics, Vol. 5, pp. 22-29 (1993).

Pearson and Choi, *Expression of the human b-amyloid precursor protein gene from a yeast artificial chromosome in transgenic mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1993. 90:10578-82.

Rothstein, "Targeting, disruption, replacement, and allele rescue: integrative DNA transformation in yeast" in Methods in Enzymology, Vol. 194, "Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology", eds. C. Guthrie and G. Fink, Academic Press, Inc., Chap. 19, pp. 281-301 (1991).

Schedl et al., "A yeast artificial chromosome covering the tyrosinase gene confers copy number-dependent expression in transgenic mice", Nature, Vol. 362, pp. 258-261 (1993).



Strauss et al., "Germ line transmission of a yeast artificial chromosome spanning the murine $\alpha_1(I)$ collagen locus", *Science*, Vol. 259, pp. 1904-1907 (1993).

Gilboa, E, Eglitis, MA, Kantoff, PW, Anderson, WF: Transfer and expression of cloned genes using retroviral vectors. *BioTechniques* 4(6):504-512, 1986.

Cregg JM, Vedvick TS, Raschke WC: Recent Advances in the Expression of Foreign Genes in *Pichia pastoris*, *BioTechnology* 11:905-910, 1993

Culver, 1998. Site-Directed recombination for repair of mutations in the human ADA gene. (Abstract) Antisense DNA & RNA based therapeutics, February, 1998, Coronado, CA.

Huston et al, 1991 "Protein engineering of single-chain Fv analogs and fusion proteins" in *Methods in Enzymology* (JJ Langone, ed.; Academic Press, New York, NY) 203:46-88.

Johnson and Bird, 1991 "Construction of single-chain Fvb derivatives of monoclonal antibodies and their production in *Escherichia coli* in *Methods in Enzymology* (JJ Langone, ed.; Academic Press, New York, NY) 203:88-99.

Mernaugh and Mernaugh, 1995 "An overview of phage-displayed recombinant antibodies" in *Molecular Methods In Plant Pathology* (RP Singh and US Singh, eds.; CRC Press Inc., Boca Raton, FL) pp. 359-365.

AY H, AY I, KOROSHETZ WJ, et al. (1999) Potential usefulness of basic fibroblast growth factor as a treatment for stroke. *Cerebrovasc Dis* 9:131-135.

AZIZI SA, STOKES D, AUGELLI BJ, et al.. (1998) Engraftment and migration of human bone marrow stromal cells implanted in the brains of albino rats-similarities to astrocyte grafts. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95:3908-3913.

BEREZOVSKAYA O, MAYSINGER D, and FEDOROFF S (1995) The hematopoietic cytokine, colony-stimulating factor 1, is also a growth factor in the CNS: congenital absence of CSF-1 in mice results in abnormal microglial response and increased neuron vulnerability to injury. *Int J Dev Neurosci* 13:285-299.

BJORKLUND A, and LINDVALL O (2000) Cell replacement therapies for central nervous system disorders. *Nat Neurosci* 3:537-544.

BULLOCK MR, LYETH BG, and MUIZELAAR JP (1999) Current status of neuroprotection trials for traumatic brain injury: lessons from animal models and clinical studies. *Neurosurgery* 45:207-217; discussion 217-220.

CANEVA L, SOLIGO D, CATTORETTI G, et al. (1995) Immuno-electron

- microscopy characterization of human bone marrow stromal cells with anti-NGFR antibodies. *Blood Cells Mol Dis* 21:73-85.
- CHEN J, LI Y, WANG L, et al. (2001) Therapeutic benefit of intravenous administration of bone marrow stromal cells after cerebral ischemia in rats. *Stroke* 32:1005-1011.
- CHOPP M, ZHANG XH, LI Y, et al. (2000) Spinal cord injury in rat: treatment with bone marrow stromal cell transplantation. *Neuroreport* 11:3001-3005.
- DENG W, OBROCKA M, FISCHER I, et al. (2001) In vitro differentiation of human marrow stromal cells into early progenitors of neural cells by conditions that increase intracellular cyclic AMP. *Biochem Biophys Res Commun* 282:148-152.
- DIXON CE, CLIFTON GL, LIGHTHALL JW, et al. (1991) A controlled cortical impact model of traumatic brain injury in the rat. *J Neurosci Methods* 39:253-262.
- DORMADY SP, BASHAYAN O, DOUGHERTY R, et al. (2001) Immortalized multipotential mesenchymal cells and the hematopoietic microenvironment. *J Hematother Stem Cell Res* 10:125-140.
- GAGE FH (2000) Mammalian neural stem cells. *Science* 287:1433-1438.
- HEFTI F (1986) Nerve growth factor promotes survival of septal cholinergic neurons after fimbrial transections. *J Neurosci* 6:2155-2162.
- KOLIATSOS VE, CLATTERBUCK RE, WINSLOW JW, et al. (1993) Evidence that brain-derived neurotrophic factor is a trophic factor for motor neurons in vivo. *Neuron* 10:359-367.
- KOPEN GC, PROCKOP DJ, and PHINNEY DG (1999) Marrow stromal cells migrate throughout forebrain and cerebellum, and they differentiate into astrocytes after injection into neonatal mouse brains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96:10711-10716.
- KROMER LF (1987) Nerve growth factor treatment after brain injury prevents neuronal death. *Science* 235:214-216.
- LABOUYRIE E, DUBUS P, GROPPI A, et al. (1999) Expression of neurotrophins and their receptors in human bone marrow. *Am J Pathol* 154:405-415.
- LI Y, CHOPP M, CHEN J, et al. (2000) Intrastriatal transplantation of bone marrow nonhematopoietic cells improves functional recovery after stroke in adult mice. *J Cereb Blood Flow Metab* 20:1311-1319.
- LU D, MAHMOOD A, WANG L, et al. (2001a) Adult bone marrow stromal cells administered intravenously to rats after traumatic brain injury migrate into brain and improve neurological outcome. *Neuroreport* 12:559-563.
- LU D, LI Y, WANG L, et al. (2001b) Intraarterial administration of marrow stromal cells in a rat model of traumatic brain injury. *J Neurotrauma* 18:813-819.
- MAHMOOD A, LU D, YI L, et al. (2001) Intracranial bone marrow transplantation after traumatic brain injury improving functional outcome in adult rats. *J Neurosurg* 94:589-595.
- MAJUMDAR MK, THIEDE MA, MOSCA JD, et al. (1998) Phenotypic and



- functional comparison of cultures of marrow-derived mesenchymal stem cells (MSCs) and stromal cells. *J Cell Physiol* 176:57-66.
- MAJUMDAR MK, THIEDE MA, HAYNESWORTH SE, et al. (2000) Human marrow-derived mesenchymal stem cells (mscs) express hematopoietic cytokines and support long-term hematopoiesis when differentiated toward stromal and osteogenic lineages. *J Hematother Stem Cell Res* 9:841-848.
- MIZUNO S, MATSUMOTO K, KUROSAWA T, et al. (2000) Reciprocal balance of hepatocyte growth factor and transforming growth factor-beta 1 in renal fibrosis in mice. *Kidney Int* 57:937-948.
- PAPAVASSILIOU E, GOGATE N, PROESCHOLDT M, et al. (1997) Vascular endothelial growth factor (vascular permeability factor) expression in injured rat brain. *J Neurosci Res* 49:451-460.
- SANCHEZ-RAMOS J, SONG S, CARDOZO-PELAEZ F, et al. (2000) Adult bone marrow stromal cells differentiate into neural cells in vitro. *Exp Neurol* 164:247-256.
- SONDELL M, and KANJE M (2001) Postnatal expression of VEGF and its receptor flk-1 in peripheral ganglia. *Neuroreport* 12:105-108.
- SONDELL M, LUNDBORG G, and KANJE M (1999) Vascular endothelial growth factor has neurotrophic activity and stimulates axonal outgrowth, enhancing cell survival and Schwann cell proliferation in the peripheral nervous system. *J Neurosci* 19:5731-5740.
- SUGIMORI H, SPELLER H, and FINKLESTEIN SP (2001) Intravenous basic fibroblast growth factor produces a persistent reduction in infarct volume following permanent focal ischemia in rats. *Neurosci Lett* 300:13-16.
- TAKAI K, HARA J, MATSUMOTO K, et al. (1997) Hepatocyte growth factor is constitutively produced by human bone marrow stromal cells and indirectly promotes hematopoiesis. *Blood* 89:1560-1565.
- WOODBURY D, SCHWARZ EJ, PROCKOP DJ, et al. (2000) Adult rat and human bone marrow stromal cells differentiate into neurons. *J Neurosci Res* 61:364-370.
- ZHANG L, HIMI T, MORITA I, et al. (2000a) Hepatocyte growth factor protects cultured rat cerebellar granule neurons from apoptosis via the phosphatidylinositol-3 kinase/Akt pathway. *J Neurosci Res* 59:489-496.
- ZHANG ZG, ZHANG L, JIANG Q, et al. (2000b) VEGF enhances angiogenesis and promotes blood-brain barrier leakage in the ischemic brain. *J Clin Invest* 106:829-838.

SZABADALMI IGÉNYPONTOK

1. Terápiás szer angiogenesis és vasculogenesis indukálására, amely terápiás szer
 5 öss sejtekből izolált, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorokat és gyógyászatilag
 elfogadható sejterápiás szert tartalmaz, amely terápiás szer angiogenesis és vasculogenesis
 indukálására szolgál.
2. Az 1. igénypont szerinti terápiás szer, ahol az angiogenesisist és vasculogenesisist
 indukáló faktorok lényegében az alábbiakat tartalmazó csoportba tartoznak: angiogén, ser-
 kentő és/vagy növekedési faktorok.
- 10 3. Az 1. igénypont szerinti terápiás szer, ahol a sejterápiás szer összejt, amely lé-
 nyegében az alábbiak bármelyike: mezenchimális összejt sztrómális sejt és annak prekur-
 zorai, fibroblasztok, retikulociták, adipociták vagy endotél sejtek közül kiválasztott összejt.
4. Eljárás sztrómális sejtekből szekretálódó, angiogenesisist és vasculogenesisist in-
 dukáló faktorok előállításának amplifikálására *azzal jellemezve*, hogy sztrómális sejteket
 15 differenciálódást indukáló vegyületnek teszünk ki és azzal tenyésztjük együtt, miáltal fo-
 kozzuk angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok termelődését.
5. A 4. igénypont szerinti eljárás *azzal jellemezve*, hogy sztrómális sejteket diffe-
 renciálódást indukáló vegyületnek teszünk ki és azzal tenyésztjük együtt, miáltal fokozzuk
 az angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok termelődését, ahol a differenciáló-
 20 dást indukáló vegyület lényegében agyi kivonat vagy kalcium.
6. Össejtekből izolált és tisztított, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló fakto-
 rok terápiában való alkalmazásra.
7. A 6. igénypont szerinti, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok,
 amelyek képesek az ilyen kezelést igénylő pacienseknek történő beadás esetén angiogenesisist
 25 és vasculogenesisist indukálni.
8. A 6. igénypont szerinti, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok,
 amelyeket az össejtek akkor szekretálnak, ha azokat kiteszünk és együttenyésztünk egy
 adott, differenciálódást indukáló vegyülettel.
9. A 8. igénypont szerinti, angiogenesisist és vasculogenesisist indukáló faktorok,
 30 ahol a differenciálódást indukáló vegyület lényegében agykivonat vagy kalcium.

10. A 9. igénypont szerinti, angiogenesist és vasculogenesist indukáló faktorok, ahol az agykivonat lényegében az alábbiak bármelyike agysejtek, agyból nyert sejtek vagy tápoldatban tenyésztett sztrómális sejtek felülűszója.

5 11. Eljárás a 6. igénypont szerinti, angiogenesist és vasculogenesist indukáló faktorok előállítására, szolgáló eljárás *azzal jellemezve*, hogy differenciálódás előtti szövetből emberi mezenchimális őssejteket izolálunk és tisztítunk; és

a mezenchimális sejteket neurológiai és izom- és vázrendszer gyógyítására szolgáló eszköz előállítására tenyészetben felszaporítjuk.

10 12. Izolált és differenciálódást indukáló vegyület hatása alatt tenyésztett, mezenchimális őssejtek, amelyek képesek differenciálódni és a szövetjavításhoz szükséges, kívánt sejtfenotípust előállítani.

13. A 12. igénypont szerinti őssejtek, ahol a differenciálódást indukáló vegyület agykivonat vagy kalcium.

15 14. A 13. igénypont szerinti őssejtek, ahol az agykivonat lényegében az alábbiak bármelyike: agysejtek, agyból nyert sejtek vagy tápoldatban tenyésztett sztrómális sejtek felülűszója.

15. A 12. igénypont szerinti őssejtek a sejtek javítókapacitásának átirányításában való alkalmazásra.

20 16. Őssejtekből izolált, angiogenesist és vasculogenesist indukáló faktorok és gyógyászatilag elfogadható sejterápiás szer alkalmazása angiogenesis és vasculogenesis indukálására irányuló terápiában alkalmazható terápiás készítmény vagy készlet előállításában, ahol a terápiás szer a páciensben angiogenesis és vasculogenesis indukál.

25 17. A 16. igénypont szerinti alkalmazás, ahol a terápiás készítmény vagy készlet lényegében szubkután, parenterális, intravénás, intraarteriális, intramuszkuláris, intraperitoneális, intranazális, intrathecális vagy infúziós beadásra alkalmas.

18. Őssejtekből izolált, angiogenesist és vasculogenesist indukáló faktorokat és gyógyászatilag elfogadható, szövetjavítást indukáló sejterápiás szert tartalmazó készítmény vagy készlet szövetjavítás indukálásában való alkalmazásra

30 19. A 18. igénypont szerinti készítmény vagy készlet, *amely*, lényegében, szubkután, parenterális, intravénás, intraarteriális, intramuszkuláris, intraperitoneális, intranazális, intrathecális vagy infúziós beadásra alkalmas.

20. Terápiás szer sejtfunkciók fokozásában való alkalmazásra, amely összejtekből izolált, sejtfunkciót fokozó faktorokat és gyógyászatilag elfogadható sejterápiás szert tartalmaz, és a terápiás szer sejtfunkció fokozására szolgál.

5

A meghatalmazott:

DANUBIA

10

Szabadalmi és Védjegy Iroda Kft.

Dr. Svingor Ádám

szabadalmi ügyvivő

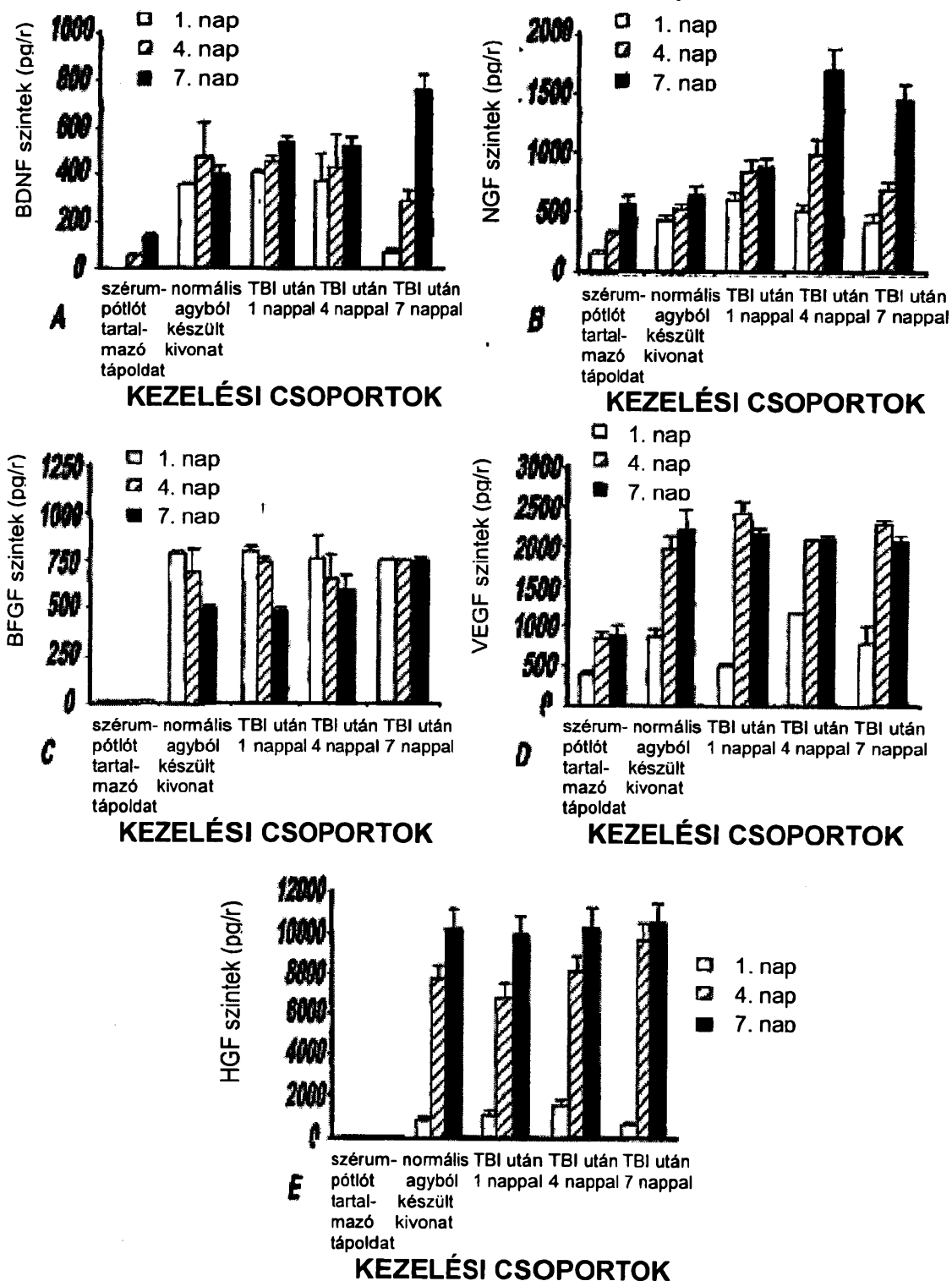
15

57 oldal
8 a'ra oldal

65 oldal

PCT/US03/01129

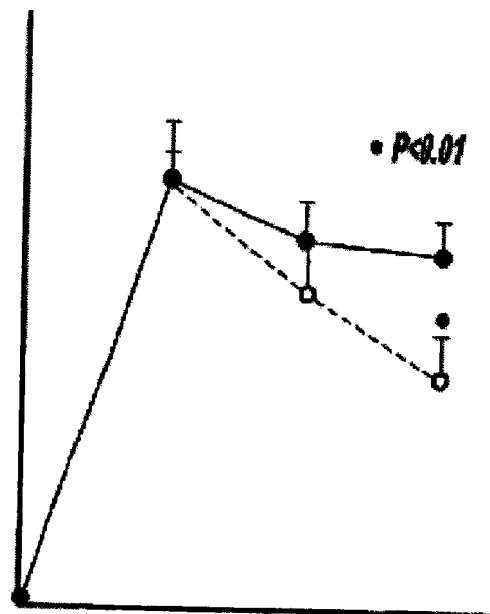
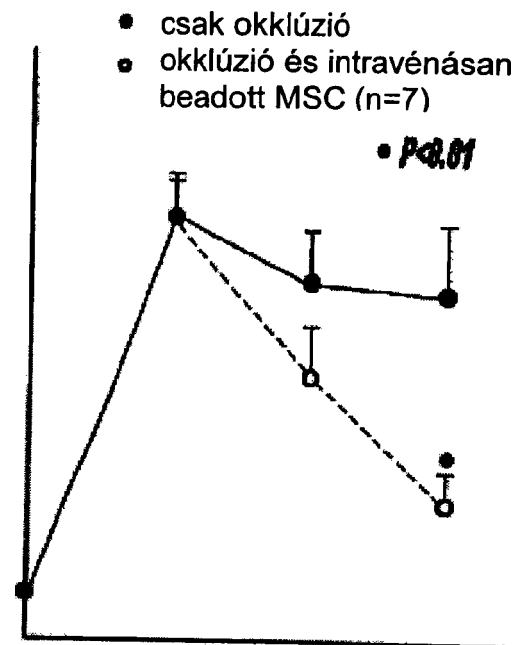
1/8



1. ábra

PCT/US03/01129

2/8



2. ábra

PCT/US03/01129

3/8



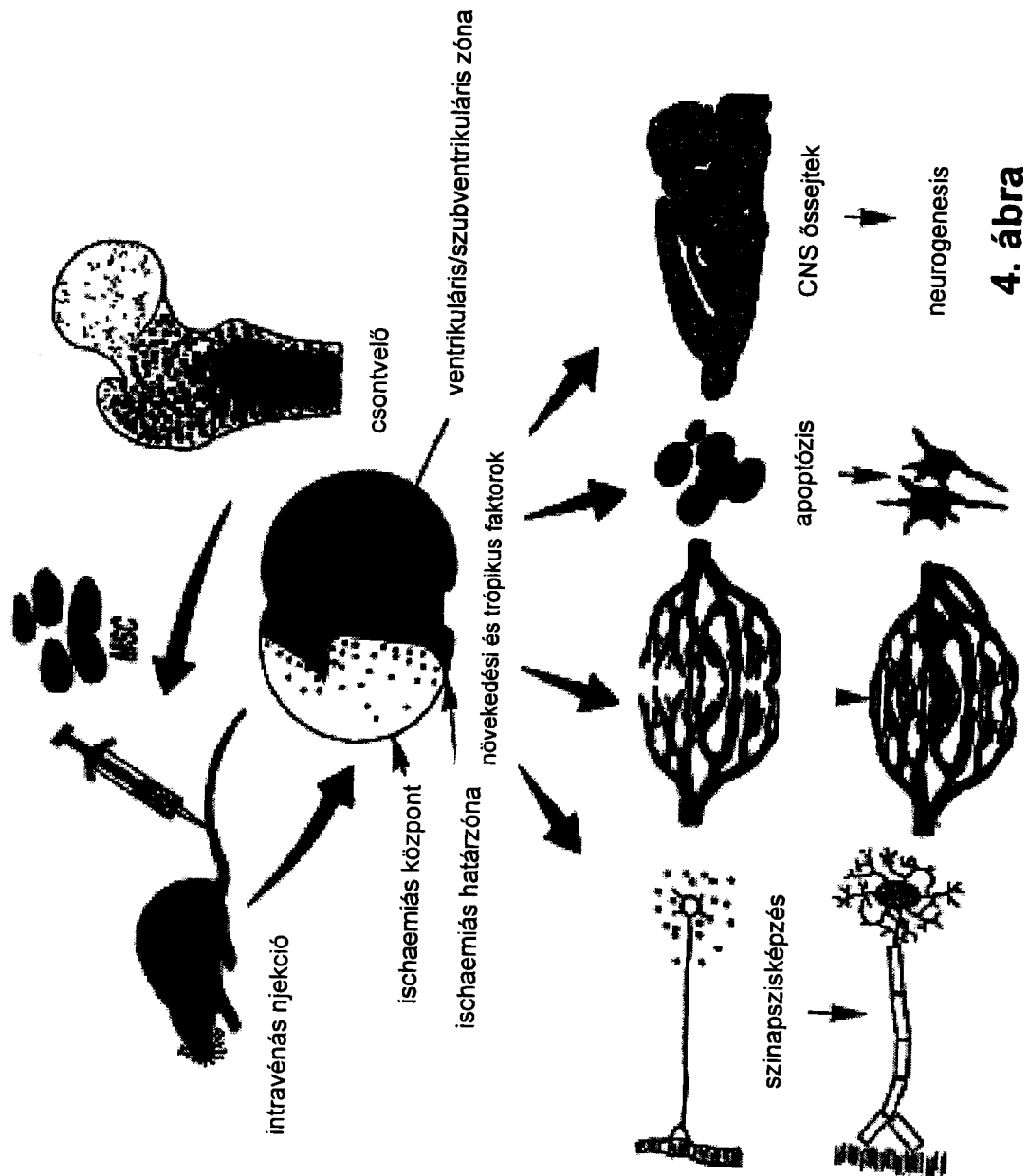
3b ábra



3a ábra

PCT/US03/01129

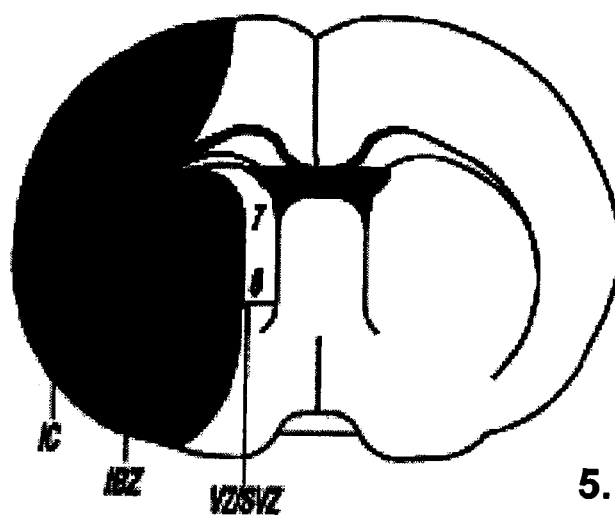
4/8



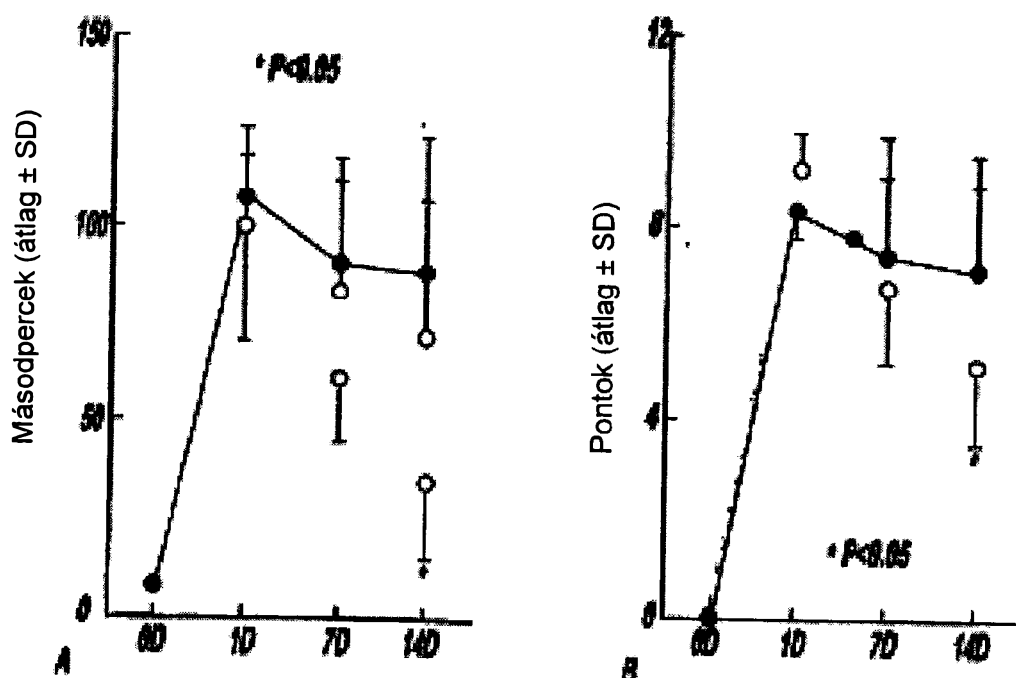
4. ábra

PCT/US03/01129

5/8



5. ábra



6. ábra

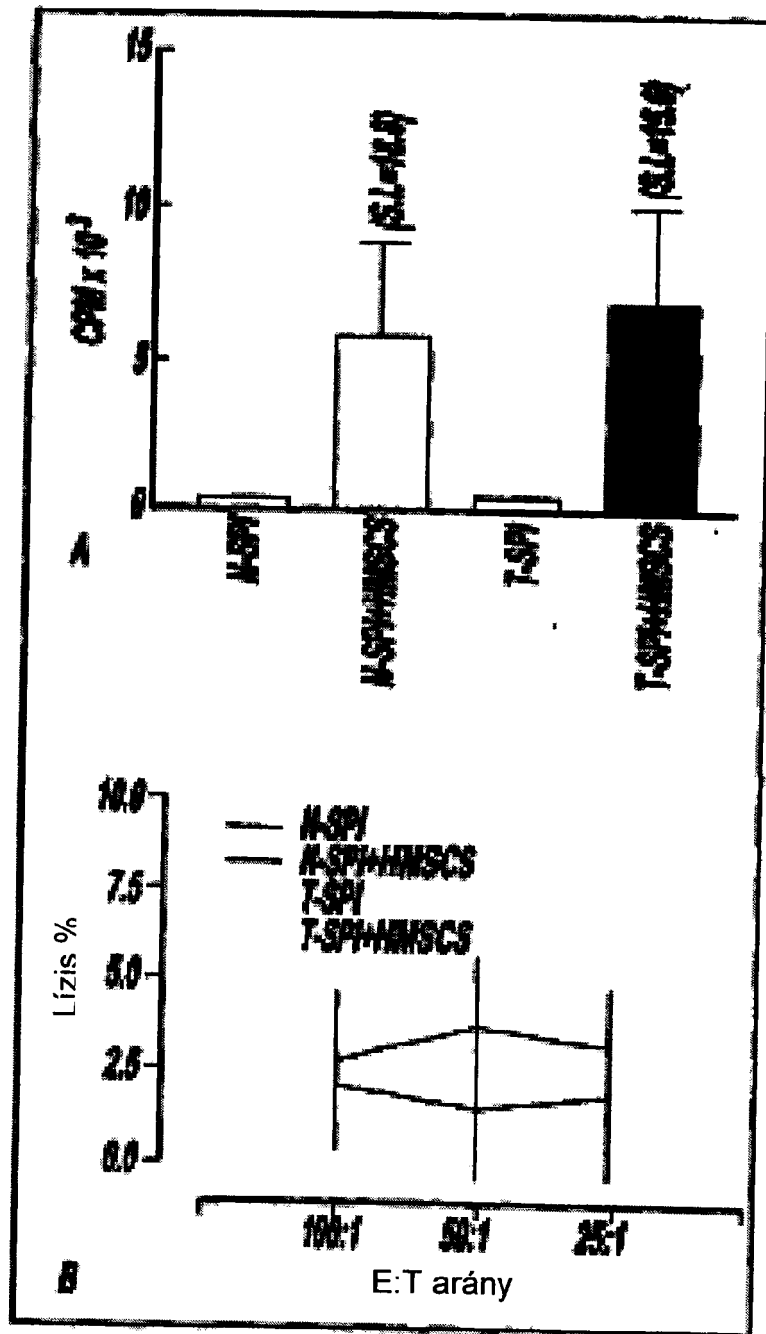
PCT/US03/01129

6/8



PCT/US03/01129

7/8



8. ábra

