

A mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitása

Doktori értekezés

Kudlik Gyöngyi Andrea

Semmelweis Egyetem

Klinikai Orvostudományok Doktori Iskola



- Témavezető: Dr. Uher Ferenc, D.Sc., kutató professzor
- Hivatalos bírálók: Dr. Pállinger Éva, Ph.D., egyetemi docens
Dr. László Lajos, C.Sc., egyetemi docens
- Szigorlati bizottság elnöke: Dr. Buzás Edit, D.Sc., egyetemi tanár
- Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Tóth Sára, Ph.D., egyetemi docens
Dr. Molnár Kinga, Ph.D., egyetemi adjunktus

Budapest

2017

TARTALOMJEGYZÉK

Tartalomjegyzék	2
Rövidítések jegyzéke	5
1. Bevezetés	8
1.1. Össejtek	8
1.2. Mesenchymalis össejtek	9
1.3. A mesenchymalis össejtek immunológiai sajátosságai	11
1.4. A mesenchymalis össejtek immunszuppresszív aktivitásának főbb mediátorai	16
1.5. A makrofágok különböző aktivációs állapotai	19
2. Célkitűzések	23
3. Módszerek	24
3.1. Kísérleti állatok	24
3.2. A mesenchymalis össejtek izolálása és tenyésztése	24
3.3. T-sejtek tisztítása	25
3.4. Peritoneális- és csontvelői makrofágkultúrák alapítása	26
3.5. A mesenchymalis össejtek karakterizálása	26
3.6. T-sejtek és makrofágok karakterizálása	28
3.7. Aktivált T-sejtek osztódásának gátlása	28
3.8. Sejtfelülűszókba szekretált citokinek mérése	29
3.9. Az MSC-k PGE-2-termelésének vizsgálata	29
3.10. Makrofágok különböző aktivációs profilba történő indukciója	29
3.11. M ϕ -ok élesztő- és apoptotizáló timocita fagocitózisának vizsgálata	30
3.12. A Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességének vizsgálata MSC-eket és T-sejteket tartalmazó kultúrákban	32
3.13. A különböző T-sejt alpopulációkban bekövetkező változások vizsgálata	32
3.14. A sejtkontaktus szerepének vizsgálata BM-M ϕ és MSC kokultúrákban	33
3.15. A prosztaglandin-E2 szerepének vizsgálata BM-M ϕ kultúrákban	33
3.16. Statisztikák	33
4. Eredmények	34
4.1. A csontvelői eredetű mesenchymalis össejtek karakterizálása	34

4.2. Csontvelői MSC-k immunszuppresszív aktivitásának vizsgálata T-sejtes rendszerekben.....	37
4.2.1. Az MSC-k T-sejtosztódást gátló hatásában szerepet játszó mediátorok vizsgálata	39
4.2.2. A proszttaglandin E2 termelésének vizsgálata aktivált T-sejtek és MSC-k kokultúráiban	40
4.2.3. A mesenchymalis őssejtek proszttaglandin E2-termelésének hatásmechanizmusa gyulladáshoz vezető citokinek jelenlétében	42
4.3. Mesenchymalis őssejtek és peritoneális makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata.....	45
4.3.1. A peritoneális makrofágok karakterizálása	45
4.3.2. A peritoneális makrofágok élesztő- és apoptotizáló timocita-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében	46
4.3.3. A gyulladáshoz vezető környezet hatása a peritoneális makrofágok és MSC-k kölcsönhatására.....	51
4.3.4. Az MSC-k hatása a makrofágok antigénbemutató képességére.....	52
4.4. Mesenchymalis őssejtek és „naiv” makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata	56
4.4.1. A csontvelői eredetű makrofágok karakterizálása.....	56
4.4.2. A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok élesztő-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében	57
4.4.3. A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok citokin-termelése MSC-k jelenlétében.....	58
4.4.4. A csontvelői eredetű makrofágok repolarizációs képessége	61
4.4.5. A proszttaglandin-E2 szerepe a csontvelői eredetű makrofágok és MSC-k kölcsönhatásában	63
5. Megbeszélés	66
6. Következtetések.....	75
7. Összefoglalás.....	77
8. Summary.....	78
9. Irodalomjegyzék	79
10. Saját publikációk jegyzéke	93

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk	93
10.2. A disszertációtól független publikációk.....	94
11. Köszönetnyilvánítás	95

RÖVIDÍTÉSEK JEGYZÉKE

Ang-1: angiopoietin-1

BM-Mφ: (bone marrow macrophage) csontvelői eredetű makrofág

BSA: (bovine serum albumin) borjú szérum albumin

CFSE: karboxifluoreszcein- diacetátszukcinimidil-észter

CFU-F: (colony forming unit-fibroblast) fibroblaszt kolóniaformáló egység

ConA: concanavalin A

COX: ciklooxygenáz enzim

DC: (dendritic cell) dendritikus sejt

DMEM: Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium

ECM: extracelluláris mátrix

EGF: (epidermal growth factor), epidermális növekedési faktor

ELISA: (enzyme-linked immunosorbent assay) enzimhez kapcsolt immunszorbens analízis

ESC: (embryonic stem cell) embrionális őssejt

FACS: (fluorescent-activated cell sorting/flow cytometry) áramlási citometria

FBS: (fetal bovine serum) főtális borjú savó

FGF: (fibroblast growth factor) fibroblaszt növekedési faktor

FITC: fluoreszcein-izotiocianát

GVHD: (graft-versus-host disease) graft versus host betegség

GM-CSF: (granulocyte-macrophage colony-stimulating factor) granulocita-makrofág kolóniastimuláló faktor

HGF: (hepatocyte growth factor) hepatocita növekedési faktor

HLA: (human leukocyte antigen) humán leukocita antigén

HS: (horse serum) lósavó

HSC: (hematopoietic stem cell) hematopoetikus őssejt

IDO: indolamin-2,3-dioxigenáz enzim

IFE-SC: (interfollicular stem cell) interfollikuláris őssejt

IFN γ : interferon-gamma

IgG: immunoglobulin G

IL-1 β , IL-17, IL-2, IL-4, IL-6, IL-8, IL-10: interleukin-1 β , -17, -2, -4, -6, -8 és -10

Indo: indometacin
iNOS: indukálható nitrogén-monoxid-szintáz enzim
iPSC: (induced pluripotent stem cell) indukált pluripotens őssejt
KM: komplett médium
L-NMA: N-metil-L-arginin-acetát
LPS: lipopoliszacharid
M0: „naiv”, aktiválatlan makrofág
M1: klasszikus, gyulladásoos makrofág
M2a: alternatív, sebgyógyító makrofág
M2b: regulátor makrofág
M-CSF: (macrophage colony-stimulating factor) makrofág kolóniasztimuláló faktor
MHC-I vagy -II: (main histocompatibility complex) fő hisztokompatibilitási génszomplexek
MLR: (mixed lymphocyte reaction) kevert limfocita reakció
MPS: (mononuclear phagocyte system) mononukleáris fagocitarendszer
MS: (multiple sclerosis) szklerózis multiplex
MSC: (mesenchymal stem cell) mesenchymalis őssejt
1-MT: metil-triptofán
NFκB: nukleáris faktor kappá B
NK-sejt: (natural killer cell) természetes ölösejt
NO: nitrogén-monoxid
NOC-18: nitrogén-monoxid donor
NOD: (non obese diabetes mouse) elhízással nem járó diabeteses egértörzs
NOS: nitrogén-monoxid-szintáz enzim
NSC: (neural stem cell) neurális őssejt
OVA: ovalbumin
PBS: (phosphate buffered saline) foszfáttal puffereelt sóoldat
PD1: (programmed cell death protein 1) programozott sejthalál receptor 1
PDGF: (platelet-derived growth factor) vérlemezke eredetű növekedési faktor
PDL: (programmed death-ligand 1) programozott sejthalál ligand-1
PE: (phycoerythrin) fikoeritrin
Pe-Mφ: peritoneális makrofág

PGE-2: prosztaglandin-E2

SC: (stem cell) őssejt

Sca-1: (stem cell antigen 1) őssejt-antigén-1

SLE: (systemic lupus erythematosus) szisztémás lupus erythematosus

TAM: tumorasszociált makrofág

TGF β : (transforming growth factor β) transzformáló növekedési faktor béta

Th1, Th17 és Th2: 1-es, 17-es és 2-es típusú helper T-sejtek

TLR: Toll-like receptor

TNF α : tumor nekrozis faktor alfa

Treg: regulátor T-sejt

TSG-6: (Tumor necrosis factor-inducible gene 6) TNF α indukálta gén 6 által kódolt fehérje

VEGF: (vascular endothelial growth factor) vascularis endothelialis növekedési faktort

Ym1: kitináz-3-szerű fehérje 3

1. BEVEZETÉS

1.1. Őssejtek

Az őssejtek (SC, stem cell) olyan specializálatlan sejtek, melyek korlátlan módon képesek aszimmetrikus osztódás révén önmegújulásra és – egyidejűleg – maguknál elkötelezettebb leánysejtek létrehozására. Továbbá szimmetrikus, önfenntartó osztódásokkal képesek megőrizni saját populációjuk állandóságát. Feladatuk egy részről biztosítani az adott szerv/szövet őssejt-populációjának fennmaradását, ugyanakkor megteremtik a szövetek kialakításához szükséges specializált sejteket, sejtfejlődési sorokat, valamint a homeosztázis fenntartásához szükséges vagy stresszhelyzet során sérült, kieső érett sejtek utánpótlását is lehetővé teszik (1).

Az őssejtek sokfélesége egyrészt differenciációs potenciájukban mutatkozik meg. Az embrionális fejlődés során kialakuló szedercsíra sejtjei (blasztomerek) még totipotensek, vagyis extraembrionális és embrionális szöveteket egyaránt képesek létrehozni. A hólyagcsíra (blasztociszta) állapotú embrió belső sejtcsomójából nyerhető embrionális őssejtek (ESC-k) már csak az embrionális csíralemezek mentén képesek differenciálódni, belőlük az egyed bármilyen szerve/szövege létrejöhet, vagyis pluripotensek (1). Ilyen tulajdonságokkal rendelkeznek még a Yamanaka és munkatársai által kifejlesztett módszer alapján létrehozott, érett testi sejtekből visszaprogramozott úgynevezett indukált pluripotens őssejtek (iPSC-k), melyeket napjainkban számos kutatási területen nagy érdeklődés övez (2). Az embrió beágyazódása után már szűkülő potenciával kell számolnunk. A szöveti őssejtek már csak a saját csíralemezük mentén létrejövő szervek/szövetek sejtjeivé, illetve sejtfejlődési soraivá képesek differenciálódni *in vivo*, tehát multipotensek (3). Ilyen szöveti őssejtek például az epidermiszben fellelhető interfollikuláris epidermális őssejtek (IFE-SC-k) (4), az agy szubventrikuláris és szubgranuláris zónájában található neurális őssejtek (NSC-k) (5), a vérképzés alapjait biztosító hematopoetikus őssejtek (HSC-k) (6) vagy a számos szervünkől illetve szövetünkől nyerhető mesenchymalis őssejtek (MSC-k) (7) (a teljesség igénye nélkül).

1.2. Mesenchymalis őssejtek

A mesenchymalis őssejtek tehát a szöveti őssejtek egy csoportját képviselik, melyeket elsőként Friedenstein és munkatársai írtak le (1970-es évek) mint a csontvelőből létrehozható, *in vitro* a tenyésztőedény falához kitapadó, elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutató sejteket, melyek kolóniaformáló képességekkel rendelkeznek, *in vivo* a bőr alá ültetve pedig ektopikus csontot és csontvelői stromát tudnak létrehozni, amely képes a vérképzés támogatására. Megfigyelt tulajdonságaik alapján ezeket a sejteket Friedenstein fibroblaszt kolóniaformáló egységeknek nevezte el (CFU-F, colony-forming unit fibroblast) (8–10). Ma már tudjuk, hogy hasonló tulajdonságokkal rendelkező sejtek nem csak a csontvelőből nyerhetők, az MSC-knek megfelelő sejtek gyakorlatilag bármilyen másik szervünkben illetve szövetünkben megtalálhatók: máj, lép, vese, zsírszövet, izom, tüdő, agy, Wharton-kocsonya stb. (7, 11). Széles előfordulási spektrumukat magyarázhatja a feltételezés, miszerint az ezeknek a sejteknek otthont adó mikrokönyezet, az úgynevezett „perivaszkuláris niche” a vérerek – főként kapillárisok és kisebb artériák – falában található, így könnyen elképzelhető, miért sikerül MSC kultúrákat létrehozni a legkülönbözőbb szervekből/szövetekből (12).

Plaszticitásuk bizonyos mezoderma leszármazású sejtekké: vérképzést elősegítő stromává, fibroblasztokká, oszteoblasztá, adipocitává, kondroblasztá, illetve esetenként tendocitákká, mioblasztokká vagy szívizomsejtekké való differenciációt tesz lehetővé (ortodox plaszticitás) (13). Egyes munkacsoportok szerint az MSC-ket megfelelő összetételű differenciáltató médiumban tenyésztve azokból csíralemezükhöz nem tartozó sejtfeleségek is létrehozhatók: idegsejtek, gliasejtek vagy epidermális sejtek (ektoderma), májsejtek vagy inzulintermelő β -sejtek (endoderma) stb. (nem ortodox plaszticitás) (14, 15), azonban az, hogy az így létrejövő sejtek mennyire funkcióképesek, illetve *in vivo* képesek-e beépülni a megfelelő szövetekbe és ott ellátni a feladatukat, egyelőre megkérdőjelezhető (16).

Az MSC-k definiálását megnehezíti, hogy a mai napig nem sikerült olyan markert vagy legalább egy viszonylag egyszerű markerkombinációt találni, amely egyértelműen elkülönítené ezeket a sejteket a belőlük származó, de már szűkebb differenciációs potenciállal rendelkező sejtektől. Ezért egyelőre az International Society for Cellular Therapy (ISCT) ajánlása alapján elkészített minimum kritériumrendszer

szolgál az MSC-k definiálására, miszerint humán mesenchymalis ősz-/stromasejtnek tekinthető minden olyan sejt, amely *in vitro* (17):

- standard kultúra körülmények között – azaz 10% borjúsavót tartalmazó tápfolyadékban – a tenyésztőedény falához tapadva képes növekedni és elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutat,
- a CD105, CD73, CD90 markereket kifejezi sejt felszínén, míg negatív a különböző vérsajtfejlődési sorokra és endotél sejtekre jellemző markerekre, úgymint: CD45, CD34, CD14 vagy CD11b, CD79 α vagy CD19 és HLA-DR, valamint
- képesnek kell lennie megfelelő körülmények között oszteoblasztok, adipociták és kondroblasztok létrehozására.

További nehézség, hogy az MSC-eket *in vitro* tenyésztve a kultúrákban mindig keletkeznek spontán differenciációval létrejövő leánysejtek, melyek az őssejtekkel együtt heterogén populációt alkotnak (18). Ez tovább nehezíti az MSC-kkel történő munkát illetve a kísérleti eredmények kiértékelését.

Ezekből az okokból kifolyólag *in vivo* lokalizációjuk felderítésére is csak közelítőleges eredmények szolgálnak, melyek alapján a már fentebb említett perivaszkuláris niche-ben vélték felfedezni ezeket a sejteket. Ez a kép jórészt nesztin⁺CD45⁻, CD271⁺CD45⁻ és CD146⁺CD45⁻ (pericita) marker-kombinációk alapján elkülönített sejtek differenciációs képességének vizsgálata után alakult ki (19–21). Mégsem jelenthető ki egyértelműen, hogy ezek lennének az MSC-k pontos megfelelői a szervezetben, ugyanis sok esetben az *in vitro* körülmények között megfigyelt differenciációs potenciál nem igazolódott teljes mértékben *in vivo*, így lehetséges, hogy valójában ezek a sejtek MSC-eredetű, de annál már valamivel elkötelezettebb elődsejtek.

A mesenchymalis őssejtekkel foglalkozó kutatásokat az MSC-k több, terápiás szempontból kiemelkedő tulajdonsága miatt is nagy figyelem övezi. Az első terápiás beavatkozások során azt remélték, hogy az MSC-k differenciációs képességeiknek köszönhetően képesek lesznek a befogadó szervezetben a sérült sejtek és szövetek pótlására. Megfigyelték, hogy az *in vitro* kultúrákban felszaporított, majd a beteg szervezetébe juttatott MSC-k először az erekkel dúsan átszőtt szervekben (pl. a tüdőben, lépben és vesében) akadnak meg, majd egy részük a gyulladt, sérült szövetekből

felszabaduló kemokineket követve az érintett helyre vándorol, és elősegíti a regenerációt (22). A technológia fejlődésének köszönhetően azonban hamar kiderült, hogy a donor eredetű MSC-k nem épülnek be és viszonylag gyorsan eltűnnek a recipiens szervezetéből (24 órás felezési idő), pozitív hatásukat ehelyett rövid idő alatt, parakrin faktorok termelése által fejtik ki: citokineket, szolubilis faktorokat, extracelluláris vezikulákat hoznak létre; utóbbiak peptideket, fehérjéket, anyagcsere melléktermékeket, mikro RNS-eket és néha még mitokondriumokat is képesek magukkal vinni és célba juttatni (23), így támogatva a gyulladásgátló immunfolyamatokat és a sérült szövetek regenerációját. A folyamatot „üss és fuss” („hit and run”) mechanizmusnak nevezték el. A mai napig intenzív kutatás tárgya, hogy hogyan képesek az MSC-k ilyen rövid idő alatt olyan jelentős változásokat létrehozni a szervezetben, amivel eltűnésük után hosszú hónapokra képesek fenntartani a terápiával célzott kórképek javulását.

Az MSC-k terápiás haszna tehát egyrészt annak köszönhető, hogy a szöveti sérülés jeleire válaszul regenerációt segítő növekedési faktorok egész sorát képesek termelni, ilyen például az epidermális növekedési faktor (EGF), a fibroblaszt növekedési faktor (FGF), a vérlemezke eredetű növekedési faktor (PDGF), a transzformáló növekedési faktor-béta (TGF β), a vaszkuláris endoteliális növekedési faktor (VEGF), hepatocita növekedési faktor (HGF), inzulinszerű növekedési faktor (IGF) vagy az angiopietin-1 (Ang-1) (24). Terápiás szempontból másik kiemelkedő tulajdonságuk, hogy képesek az immunrendszer sejtjeivel olyan molekuláris kommunikációt folytatni, aminek végeredményeként a gyulladós és autoimmun folyamatokat fenntartó sejtek túlsúlya mérséklődik, és a gyulladásgátló (regulátor), valamint a szövetregenerációt segítő immunsejtek jutnak nagyobb szerephez a beteg szövetekben.

1.3. A mesenchymalis őssejtek immunológiai sajátosságai

Bartholomew és munkatársai 2002-ben páviánokon végzett vizsgálataik során figyelték meg, hogy stimulált allogén perifériás fehérvérsejtek kultúráihoz pávián MSC-
ket adva csökken a fehérvérsejtek osztódása, tehát az MSC-k immunszuppresszív
aktivitással rendelkeznek (25). Bőráttűtetéseket is végeztek az állatokon, ahol az MSC-

ket intravénásan az állatokba juttatva sikeresen növelték a bőrgraftok túlélését. Azt is megfigyelték, hogy nem számított az MSC-donorok eredete: autogén, allogén és xenogén (más fajból származó egyed) modellben is létrejött a szuppresszív hatás (26). Tehát az MSC-k egyszerre képesek elnyomni az immunválaszt és jórészt „láthatatlanok” maradni a nem-saját sejteket felismerő immunsejtek előtt. Utóbbi tulajdonságuk, a hipoimmunogenitás feltehetően annak köszönhető, hogy az MSC-k csak kevés I-es típusú fő hisztokompatibilitási komplex (MHC-I) antigént fejeznek ki a felszínükön, MHC-II-es és kostimulátor molekulák (CD40, CD40L, CD80, CD86) pedig egyáltalán nem találhatóak meg rajtuk (27). Igaz, hogy alacsony mennyiségű interferon-gamma ($IFN\gamma$) stimulációra megnőhet az MHC-I és MHC-II antigének expressziója (28), azonban a kostimulátor molekulák hiánya – elvben – továbbra is megakadályozza, hogy ezek a sejtek immunválaszt provokáljanak vagy professzionális antigénbemutató sejtekként funkcionáljanak. Ráadásul gyulladásos környezetben az $IFN\gamma$ jóval magasabb koncentrációban van jelen, ami kivédi a molekula fentebb említett induktív hatását. Az, hogy az MSC-k immunológiailag ilyen kiváltságos tulajdonsággal bírnak, terápiás szempontból nagy jelentőséggel bír, ugyanis sürgős esetben – amennyiben a páciens saját MSC-graftjának elkészítése nem lehetséges, vagy arra nem áll rendelkezésre elegendő idő – bármilyen allogén donor MSC-i felhasználhatók a kezelés során. A legújabb eredmények szerint azonban az MSC-k hipoimmunogenitása megdőlni látszik, több *in vivo* vizsgálat is arról számolt be, hogy a beadott allogén MSC-eket a recipiens immunrendszere nem fogadta be, a beadott sejtek ellen termelődött antitesteket vagy megnövekedett $CD8^+$ T sejt- és természetes ölüsejt beszűrődést tudtak kimutatni (26). Ha az MSC-k valóban nem hipoimmunogének, és terápiás hatásukat a már fentebb említett „üss és fuss” elven fejtik ki, nem szükséges hosszú ideig jelen lenniük a szervezetben ahhoz, hogy a páciensek állapotában javulást tudjanak okozni, tehát terápiás hasznuk nem feltétlenül kérdőjeleződik meg, amit a klinikai eredmények is visszaigazolnak. Számos szövetregenerációt célzó, vagy gyulladásos és/vagy autoimmun betegség esetében értek el javulást MSC-k alkalmazásával, ilyen például az akut graft versus host betegség (GVHD, graft versus host disease), a vesefibrózis, a Crohn-betegség, a rheumatoid arthritis, szisztémás lupus erythematosus (SLE), a szklerózis multiplex (MS) vagy különböző iszkémiás betegségek (11). Az MSC-kkel történő terápiás próbálkozások tehát általában olyan esetekben bizonyultak sikeresnek,

ahol egyszerre van szükség az elpusztult sejtek/szövetek pótlására, valamint a jelen lévő gyulladásos és autoimmun folyamatok gátlására.

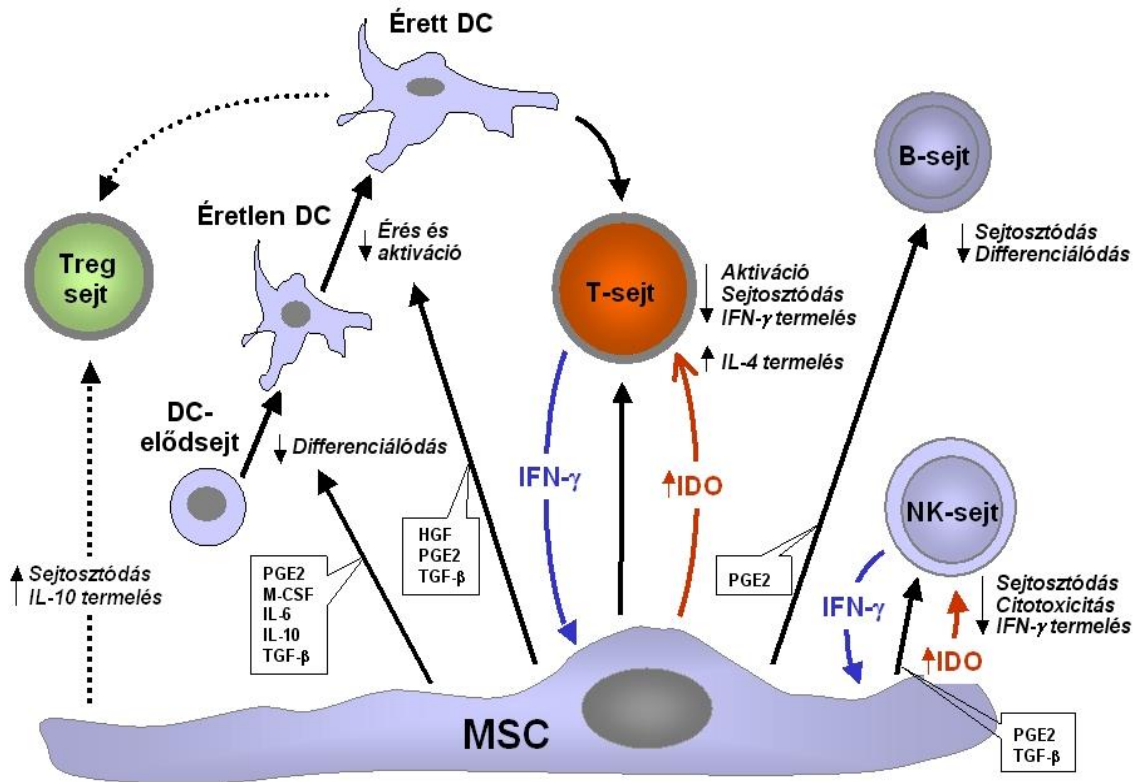
Az MSC-k legígéretesebb tulajdonsága tehát, hogy mind a veleszületett, mind az adaptív immunrendszer sejtjeivel képesek kommunikálni, és megváltoztatni azok működését. A mesenchymalis őssejtek direkt immunszuppresszív aktivitását vizsgáló első kísérletek arról számoltak be, hogy az MSC-k képesek a mitogén- és alloantigén-indukált T-sejtek osztódását gátolni *in vitro* (29, 30). A két sejtfeleséget féligáteresztő hártyával elválasztva egymástól arra is fény derült, hogy a megfigyelt hatásért elsősorban szolubilis faktorok felelősek (31). A folyamatban szerepet játszó fontosabb mediátorok lehetnek: a HGF, a TGF β 1, az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO), a nitrogén-monoxid (NO), a prosztaglandin-E2 (PGE-2) és az interleukin-10 (IL-10) (32). Kísérleti körülményektől függően azonban más-más faktorok kaphatnak szerepet a gátló hatásban: kevert limfocita-kultúrában például a HGF és a TGF β 1, míg mitogén indukált T-sejt proliferáció-gátlásban szerepük kizárható (33). Ezek az adatok felhívják a figyelmet arra, hogy a különböző faktorok szerepe stimulustól függően változhat. Az itt felsorolt mediátorok pontos szerepe máig sem tisztázott, sok az egymásnak ellentmondó adat, ami valószínűleg a sokszor igen eltérő kísérleti körülményekre vezethető vissza. Az eddigi eredmények tanúbizonysága szerint az MSC-k és T-sejtek kölcsönösen befolyásolják egymás folyamatait. Az aktivált T-sejtek (és szintén jelen lévő monociták, makrofágok, NK-sejtek) gyulladásos citokineket termelnek – például IFN γ -t, tumor nekrozis faktor alfát (TNF α) és/vagy IL-1 β -t (34). Ezek hatására az MSC-k több, a T-sejt osztódás gátlásáért felelős faktort szekretálnak (pl. PGE-2, NO). Erre válaszul a T-sejtek citokintermelése a gyulladásos faktorok (IFN γ , TNF α , IL-6 és IL-17) felől a gyulladásgátló molekulák felé (IL-4 és IL-10) tolódik. Az első vizsgálatok szerint az MSC-k nem indukálnak sejthalált az aktivált T-sejtekkel történő interakció során, mindössze megakasztják azok sejtciklusát a G0/G1 fázisban (35). Újabb eredmények azonban azt bizonyítják, hogy az MSC-k képesek lehetnek T-sejtapoptózist is előidézni a Fas-ligandfüggő Fas-úton keresztül (36). Mára már az is egyértelmű, hogy az MSC-k mind a naiv és memória T-sejtek (37), mind a CD4 és CD8 pozitív T-sejtek osztódását (38) képesek gátolni. A direkt gátláson túl indirekt módon is meg tudják akadályozni a citotoxikus és segítő T-sejtek (Th) proliferációját: az MSC-k fokozzák a regulátor T-

sejtek (Treg) osztódását, azonban új Treg sejtek képződését nem képesek előidézni (39, 40).

Az MSC-k a dendritikus sejtekre (DC) is indirekt módon hatnak: gátolják azok differenciálódását és érését (41). Ramasamy és munkatársai szerint az MSC-k a G0/G1 fázisban akasztják meg a DC-k sejtciklusát (42). Ezzel együtt a kostimulátor molekulák mennyisége is csökken azok felszínén, így nem képesek hatékonyan stimulálni a „naiv” T-sejtek osztódását és citokintermelését. A folyamatban feltételezetten résztvevő szolubilis faktorok az IDO, PGE-2, NO, IL-10, a mediátorok szerepe és a pontos hatásmechanizmus azonban itt sem tisztázott (43, 44).

Az MSC-k és B-sejtek egymásra hatásáról egyelőre keveset tudunk. Glennie és munkatársai *in vitro* egér lépsejteken végzett vizsgálatai során kimutatták, hogy az MSC-k hasonló mértékben gátolják az aktivált B-sejtek osztódását és így ellenanyag-termelő plazmasejté történő érését is, mint aktivált T-sejtek esetében (38). Corcione és munkatársai emberi MSC-kkel is megerősítették Glennie és mtsai eredményét (45). Ugyanakkor Rasmusson és munkatársainak vizsgálatai azt mutatják, hogy a B-sejtek aktivációjától függően az MSC-k ellenanyag-termelést gátló, vagy serkentő hatással is rendelkezhetnek, *in vitro* (46). Ugyanakkor a regulátor B sejtek aktivitását a Treg sejtekéhez hasonlóan fokozzák (47).

Az MSC-k többféle módon is képesek hatni a természetes ölösejtekre (NK-sejtek): az IL-2-vel vagy IL-5-tel stimulált NK-sejtek osztódása, valamint IFN γ -termelése egyaránt gátolt a jelenlétükben (48). A hatásért főként az MSC-k által termelt TGF β -t és PGE-2-t tették felelőssé. Aktivált NK-sejteket felhasználó kísérletekben azonban az ölösejtek osztódása már alig lassul az össejtek hatására (49). A citotoxikus reakciót szintén nem képesek befolyásolni az MSC-k, hacsak pár napig elő nem inkubálják velük az ölösejteket (50). Ekkor az NK-sejteknél csökkent aktivitás figyelhető meg. Az MSC-k immunszuppresszív hatásának feltételezett mechanizmusát összefoglalva (a teljesség igénye nélkül) az 1. ábra szemlélteti.



1. ábra: A mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitásának összefoglalása. (Részletes magyarázat a szövegben.) Forrás: Kiss Judit, Urbán S. Veronika, Dudics Valéria, Vas Virág, Uher Ferenc: *A mesenchymalis őssejtek és az immunrendszer – Immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?* Orvosi Hetilap 2008, 149:(8), 339–346 (2008)

Az ábrán nem szerepelnek a makrofágok (M ϕ), mivel az MSC-kkel történő egymásra hatásokról még keveset tudunk. A közelmúltban publikált kisszámú vizsgálat alapján feltételezik, hogy az MSC-k képesek a M ϕ -ok úgynevezett gyulladásgátló („alternatív” úton aktivált) M2-es vagy regulátor M ϕ -profilba történő polarizációját előidézni. Maggini és munkatársainak eredményei szerint a bakteriális lipopoliszachariddal (LPS-sel) gyulladáskeltő („klasszikus”) M1-es állapotba juttatott M ϕ -ok citokintermelése az MSC-k hatására az M2-es (gyulladásgátló/szövetregeneráló) M ϕ -ok citokintermeléséhez vált hasonlóvá, vagyis a gyulladást mediátorok (TNF α , IL-6, IL-12p70, IFN γ) szintje csökkent, míg a gyulladásgátló IL-10, illetve IL-12p40 mennyisége emelkedett a kultúrák felülúszóiban (51). Azt is leírták továbbá, hogy a kizárólag MSC-eket tartalmazó kultúrák felülúszói is hasonlóan képesek kiváltani a M ϕ -

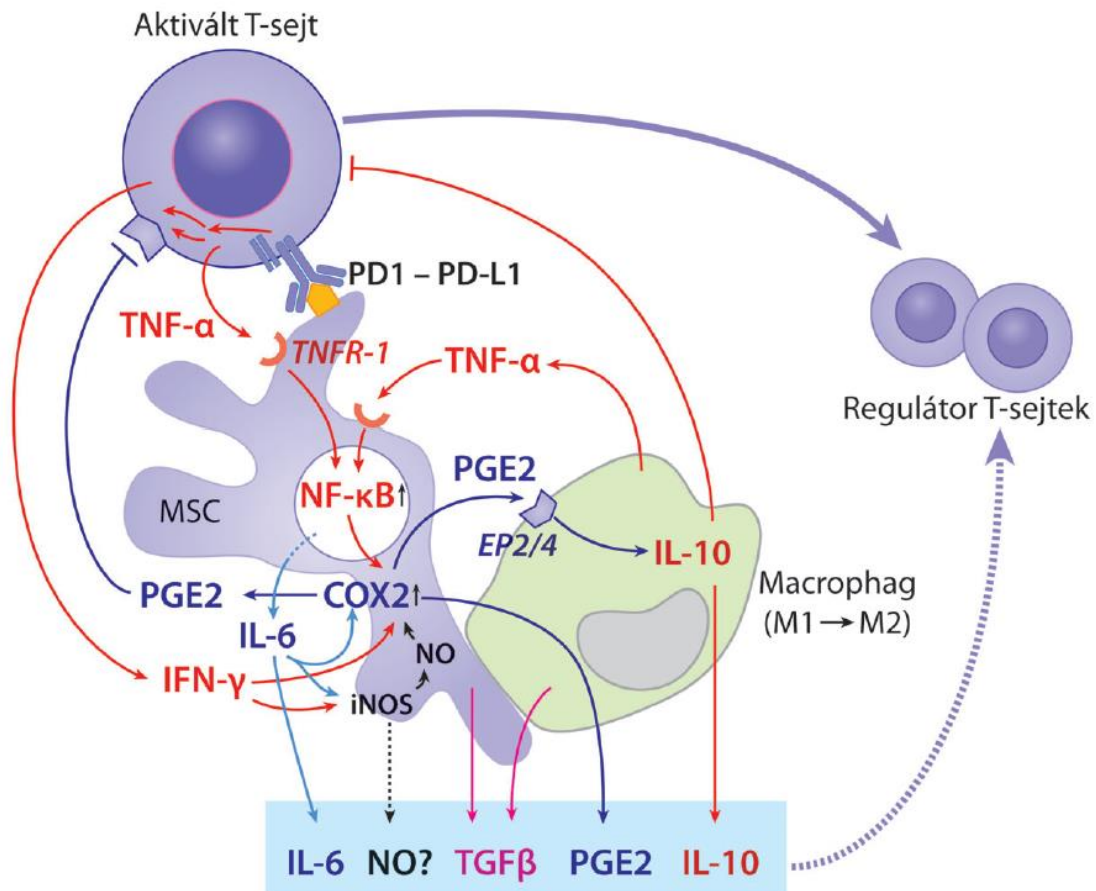
ok M2-es irányú polarizációját, ami az MSC-k által szekretált faktorok szerepét feltételezi. Qun-Zhou Zhang és munkatársai is hasonló eredményekre jutottak fogínyből izolált emberi MSC-kkel végzett *in vitro* illetve *in vivo* kísérletek során: az MSC-k megnövelték a M ϕ -ok felületén a mannóz receptorok (CD206) számát, gátolták TNF α szekréciójukat, illetve növelték IL-10 termelésüket, ami szintén gyulladásgátló tulajdonságokkal bíró M ϕ -ok kialakulását jelzi (52).

1.4. A mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitásának főbb mediátorai

Az MSC-k immunszuppresszív aktivitása többféle mediátoron keresztül valósul meg, a pontos hatásmechanizmusok azonban máig nem tisztázottak, sok az egymásnak ellentmondó kísérleti adat (53). Számos MSC-k által termelt szolubilis faktor szerepe igazolódott a folyamatban, ilyen a PGE-2, különböző citokinek (HGF, TGF β), a tumor nekrosis faktor stimulált gén 6 fehérje (TSG-6), a NO, azIDO, és a szolubilis humán leukocita antigén G (HLA-G) molekulák, míg számos munka mutatta ki bizonyos sejt-sejt kontaktust létrehozó molekulák szerepét is, úgymint a B7-H1 (PD-L1), B7-H4, a Notch receptorok vagy a Jagged1 (54, 55). Az azonban mára világossá vált, hogy az MSC-k önmagukban nem rendelkeznek jelentős immunmoduláló képességgel, a lokálisan kialakuló gyulladással teszi őket immunszuppresszívvá. Ebben az IFN γ és valamilyen gyulladással citokin (általában TNF α vagy IL-1) együttes hatása meghatározó szerepű, az MSC-k ilyenkor negatív visszacsatolással gátolják az aktivált T-sejtek IFN γ -termelését (34, 56).

A gyulladással környezet aktiváló jeleire tehát az MSC-k különféle módokon – sejt-sejt kontaktust lehetővé tévő molekulák kifejezésén keresztül, és szolubilis faktorok termelése által – immunszuppresszívvá válnak. Általánosan elmondható, hogy a különböző kísérleti elrendezésekben és *in vivo* patológias állapotokban különböző faktorok és molekuláris mechanizmusok kombinációi eredményezik a gátló hatás kialakulását. Kulcsfontosságú a jelenlévő immunsejtek kombinációja és aktivációs állapota. Az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának kialakulását, annak folyamatát a 2. ábra szemlélteti egy leegyszerűsített modell segítségével. A gyulladással környezetben jelenlévő IFN γ önmagában is képes kiváltani az MSC-k programozott sejtsejt ligand-1 (PD-L1, CD274) expresszióját (57). Ennek segítségével az MSC-k a

programozott sejthalál receptor-1-en (PD1, CD279) keresztül létesítenek közvetlen kapcsolatot az aktivált T-sejtekkel (58). Közben a T-sejtek által termelt IFN γ , valamint a szintén tőlük és a jelenlevő M ϕ -októl (vagy DC-ktől) származó TNF α együttesen indukálják az MSC-kben a ciklooxygenáz-2 enzimek expresszióját, ami nagy mennyiségű PGE-2 termelését teszi lehetővé (59, 60). Az így keletkező PGE-2 egyrészt direkt módon képes gátolni az aktivált T-sejtek proliferációját, másrészt a M ϕ -ok felszínén kifejezett 2-es és 4-es típusú prosztaglandin receptorokon (EP2 és EP4) keresztül hatva egyrészt azok gyulladáshoz vezető mediátor (pl. TNF α) expresszióját csökkentik, másrészt számos gyulladásgátló faktor (pl. IL-10 és feltételezhetően a TGF β) termelését tudják beindítani a sejtekben (61, 62). Ez szintén gátolja az aktivált T-sejtek működését, és egyidejűleg M2-es gyulladásgátló M ϕ -ok létrejöttét jelzi (63). Az IFN γ egy másik úton is képes fokozni az MSC-k PGE-2 termelését: az indukálható nitrogén-monoxid szintáz (iNOS) enzim expressziója és aktivitása növekszik az őssejtekben, ami a termelődő NO-on keresztül tovább fokozza a PGE-2 szintéziséért felelős ciklooxygenáz-2 (COX-2) enzim aktivitását (59). A NO továbbá nagy mennyiségben, a sejtekből kijutva közvetlenül is képes gátolni a T-sejtek (és B-sejtek) osztódását (64, 65). Az MSC-k által folyamatosan termelt IL-6 autokrin/parakrin módon ugyancsak fokozza a sejtek PGE-2 termelését, ugyanis a szintén MSC-ken kifejeződő IL-6-receptoron keresztül hatva mind COX-2, mind az iNOS expresszióját képes növelni (66). Az így kialakuló, MSC-eket, T-sejteket és M ϕ -okat (vagy DC-eket) tartalmazó mikrokönyezet pedig képes aktiválni és osztódásra bírni a Treg sejteket (60).



2. ábra: A mesenchymalis őssejtek, aktivált T-sejtek és makrofágok kölcsönhatása. (Részletes magyarázat a szövegben.) Forrás: Hegyi Beáta, Sági Bernadett, Kudlik Gyöngyi, Uher Ferenc: A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladásos- és immunfolyamatok szabályozásában. *Immunológiai Szemle* 4:(2), 4-10 (2012)

Az egyszerűsített modellünkben felsorolt főbb MSC-k által termelt mediátorok mellett még fontos megemlíteni a szintén IFN γ -val indukálható indolamin-2,3-dioxenáz (IDO) enzim szerepét. Ez is az MSC-k által termelt immunszuppresszív faktorok közé tartozik, ami szintén képes gátolni az aktivált T-sejtek osztódását. Kifejeződésekor az enzim a sejtek környezetében lévő esszenciális aminosavat, a triptofánt kinureninen keresztül pikolénsavra és kinolénsavra bontja. A T-sejtek gyors osztódásához elengedhetetlen a megfelelő mennyiségű triptofán, így az IDO-t expresszáló MSC-k környezetében kialakuló lokális triptofánhiány és bomlástermékeinek felszaporodása valószínűleg együttesen felelősek a T-sejtek (és NK-sejtek) proliferációjának gátlásáért.

Ezen felül a fokozottIDO aktivitást mutató MSC-k képesek a Th1 sejtek apoptózisát is előidézni, ezáltal a Th1/Th2 sejtek aránya az utóbbi javára tolódik el (60, 61).

A többi, MSC-k által termelt, vagy kifejezett immunszuppresszív molekula hatásmechanizmusáról viszonylag keveset tudunk, ezért modellünkben nem tárgyaljuk ezek szerepét, azt azonban nem szabad elfelejteni, hogy ők biztosítják az MSC-k által közvetített immunszuppresszió alternatív útjait.

1.5. A makrofágok különböző aktivációs állapotai

A M ϕ -ok a veleszületett immunrendszer részeként minden szervben és kötőszövetben megtalálhatók, ennek alapján különböző elnevezést kaptak: a májban Kupffer-sejteknek, a központi idegrendszerben mikroglia-sejteknek, a tüdőben alveoláris makrofágoknak nevezik őket, de megtalálhatók még a csontokban mint oszteoklasztok, a mellhártyán és a hashártyán belül mint pleurális, illetve peritoneális makrofágok stb. Kitüntetett szereplői a különböző gyulladásos és regeneratív folyamatoknak: fagocitózis révén különböző patogének (gomba, baktérium), sérült vagy apoptotizáló sejtek és sejtörmelékek eltakarításában játszanak szerepet; biológiailag aktív molekulákat (pl. citokineket, növekedési faktorokat, komplementfehérjéket) termelnek, valamint antigénbemutató képességüknek köszönhetően kapcsolatot hoznak létre az adaptív immunrendszerrel. Szerepük kiemelkedő mind az akut, mind a krónikus gyulladás kialakításában, szabályozásában, és gátlásában (67).

A M ϕ -ok a monocita eredetű mononukleáris fagocitarendszer (MPS) részei, ugyanis a keringésből a testüregekbe, illetve szövetekbe kilépő monocitákból alakulnak ki. Az elkötelezett mieloid elődsejtekből főként makrofág kolóniastimuláló faktor (M-CSF) és/vagy granulocita–makrofág kolóniastimuláló faktor (GM-CSF) hatására differenciálódó „naiv” sejtek nagy mennyiségben hordoznak CD11b (monocita/M ϕ marker) és F4/80 (érett M ϕ marker) molekulákat és jelentős mennyiségű sejtörmelékkel és kórokozót tudnak bekebelezni. Antigénbemutatásra csak aktiváció után képesek, tehát MHC-II és kostimulátor (B7) molekulákat még nem fejeznek ki sejt felszínükön (68). Sokáig úgy gondolták, hogy ebből a „naiv” állapotból aktiváció hatására gyulladásos M ϕ -ok keletkeznek, amik a kiváltó ágensek eltűnése után passzív formába kerülnek az esetleges újabb gyulladásos aktivációig. Mára azonban számos – köztük

gyulladásgátló tulajdonságokkal bíró – M ϕ -fenotípust írtak le, amik különböző aktivációs stimulusra alakulnak ki.

A „klasszikus” vagy M1 M ϕ -ok széles körben ismert, gyulladásos folyamatokat támogató sejtek. LPS (és egyéb Toll-like receptor (TLR)-antagonisták), illetve Th1-sejt eredetű citokinek (TNF α és/vagy IFN γ) jelenlétében alakulnak ki. Megnö a sejtek antigénprezentáló képessége, sejt felszínükön nagy mennyiségű MHC-II és B7 kostimulátor molekulát fejeznek ki, magas az iNOS aktivitásuk, tehát nagy mennyiségű NO termelésére képesek (69), ami központi szerepet játszik a M ϕ -ok által közvetített citotoxicitásban hozzájárulva a gyulladásos folyamatokhoz (70). Az M1-es M ϕ -ok további tulajdonsága, hogy nagy mennyiségű TNF α -t, IL-1 β -t és IL-12-t termelnek (71). Az általuk szekretált lipidmediátorok, gyulladásos citokinek és kemokinek visszahatva a Th1-sejtekre, felerősítik azok válaszát. Tehát az ilyen módon aktivált M ϕ -ok immuneffektor sejtekként funkcionálnak, feladatuk a gyulladáskeltés és az intracelluláris patogénekkal szembeni védelem biztosítása (72). Az M1-es M ϕ -ok túlzott vagy hosszantartó aktivációja azonban kóros, nem kívánt szöveti károsodáshoz vezethet. Ilyenkor az M2-es M ϕ -ok szerepe kiemelkedő fontossággal bír a gyulladásos állapot feloldásában.

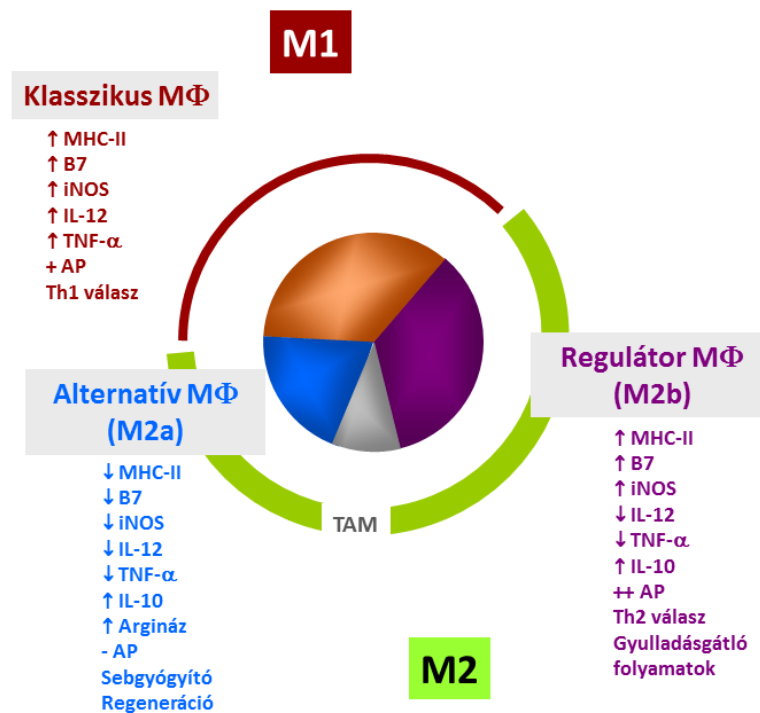
Az aktivált M ϕ -ok másik nagy csoportját M2 M ϕ -oknak nevezték el utalva ezzel az M1-es M ϕ -okkal ellentétes funkcióikra. Idővel több alcsoport alakult ki az M2-es M ϕ -okon belül köztük olyan tulajdonságokkal, amik részben átfednek az M1-es sejtek jellemzőivel (73). Az „alternatív” vagy „sebgyógyító” M2a M ϕ -ok általában Th2-sejtek által termelt IL-4, illetve IL-13 hatására jönnek létre. Alacsony MHC-II és B7 expressziót mutatnak alacsony iNOS és magas kitináz-3-szerű fehérje 3 (Ym1) termeléssel, míg az M1-es M ϕ -ok általt termelt gyulladásos mediátorok előállítására nem jellemző rájuk (73). Az Ym1 egy extracelluláris térbe kiválasztott lektin. Funkciója kevésbé ismert, feltételezeten a patogének megkötésében és a sebgyógyulás során az extracelluláris mátrix termelésében játszhat szerepet (74). Jó markere az egér M2a M ϕ -oknak, ugyanis az M1-es M ϕ -ok és a többi M2-es alcsoport tagjai nem termelnek jelentős mennyiségű Ym1-t (69, 71). Az M2a M ϕ -ok további tulajdonsága, hogy IL-10, IL-1 receptor antagonista, TGF β , argináz enzim, valamint különböző fagocitózist segítő receptorok (mannóz receptor, galaktóz receptor, „scavenger” receptorok) expressziójának fokozásával immunregulátor funkciókat látnak el (72). Az

arginázaktivitás növekedésének köszönhetően a sejtekben található L-argininből NO helyett (mely egy gyulladáshoz vezető mediátor) ornitin és karbamid keletkezik, a folyamat így hozzájárul az M2a M ϕ -ok gyulladásgátló képességéhez, az ornitinszintézis (kollagénprekurzor) révén pedig hozzájárulnak az extracelluláris mátrix (ECM) termeléséhez. Az M2a M ϕ -ok fő feladata a szövetregeneráció, sebgyógyulás és a parazitaelimináció segítése, de szerepük van a magzati placenta érékezésének, valamint a placenta immunszuppresszív mikrokörnyezetének kialakításában (és a tumorfejlődés támogatásában) is (72).

Az M2 M ϕ -k csoportján belül egy másik viszonylag jól jellemzett aktivációs profil az úgynevezett „regulátor” vagy M2b M ϕ fenotípus. Ezek a sejtek főként endotoxinok és immunkomplexek egyidejű jelenlétében aktiválódnak, és nagy mennyiségű kostimulátor molekulát képesek kifejezni sejt felszínükön, antigénprezentációs képességük igen jó. Ez alapján és megnövekedett iNOS aktivitásuk miatt hasonlítanak az M1-es klasszikus M ϕ -okhoz, azonban gyulladáshoz vezető citokintermelésük (például TNF α , IL-12) nem jelentős. Magas IL-10 termelésük már az M2a M ϕ -okhoz teszi hasonlatossá őket, de argináz aktivitás nem észlelhető bennük, és nem képesek hozzájárulni az ECM termeléséhez (71, 73). Megnövekedett antigénprezentációs képességükkel és mediátortermelésükkel a „naív” T-sejtek Th2-es irányú elköteleződését támogatják, továbbá szerepet játszanak a Th1-sejtek citokintermelésének (IL-2, TNF α , IFN γ) szabályozásában, így hatékony gyulladásgátló sejtekként funkcionálnak (73, 75). Először TLR-agonistákkal és immunkomplexekkel (IgG) való együttes stimuláció után figyelték meg az M2b M ϕ -ok kialakulását, majd számos más stimulus is hatékonyan bizonyult a transzíció kiváltásában, ilyenek a prosztaglandinok (PG), az apoptotikus sejtek, az IL-10 és néhány G-protein-kapcsolt receptorligand, az adozin, a dopamin, vagy a hisztamin (a teljesség igénye nélkül). Az M2b M ϕ -ok egyik fő jellemzője, hogy két stimulus együttes hatására van szükség gyulladásgátló tulajdonságaik kialakulásához: például az immunkomplexek, a PG-ok, az adozin vagy az apoptotikus sejtek mint első stimulus, valamint egy TLR ligand mint második stimulus már képesek kiváltani a M ϕ -ok IL-10 termelését (71).

Leegyszerűsítve, az IL-10 és a TNF α vagy az IL-12 arányát gyakran használják az M1 kontra M2 M ϕ -ok elkülönítésére (76, 77). Az itt bemutatott M ϕ fenotípusok a legjobban jellemzett funkcionális állapotok napjainkban, főbb tulajdonságaikat a 3. ábra

foglalja össze. A közelmúltban újabb és újabb alcsoportokat írtak le, ilyenek például a glükokortikoidok és TGF β hatására kialakuló M2c, az IL-6 és adenzin stimulációra létrejövő M2d vagy a tumorasszociált M ϕ -ok (TAM) (72, 78). Ezek (ahogyan a fentebb említett három csoport tagjai is) tulajdonságaikban sokszor sok tekintetben átfednek egymással. Jól látszik tehát, hogy a M ϕ -ok funkcionális profilja közel sem kétpólusú, sokkal inkább aktivációs állapotok egész spektruma fordulhat elő a szervezetben attól függően, hogy a fiziológias viszonyok az éppen aktuális mikrokönyezettel milyen funkciójú sejteket követelnek meg és hoznak létre.



3. ábra: A makrofágok heterogenitása. Az M1-es vagy klasszikus makrofág aktiváció jellemző fenotípusa a megnövekedett MHC-II, B7, iNOS enzim expresszió, valamint IL-12, és TNF α termelés. A sejtek jó antigénprezentáló (AP) képességgel rendelkeznek és a Th1-es immunválaszt támogatják. Az M2a vagy alternatív makrofág profil kialakulását csökkent MHC-II, B7 és iNOS expresszió, csökkent IL-12 és TNF α , de megnövekedett IL-10 és argináz enzim termelés jellemzi. Ezek a sejtek nem funkcionálnak jó antigénprezentáló sejtekként, fő feladatuk a sebgyógyítás és regeneráció támogatása. Az M2b vagy regulátor makrofágokra jelentős MHC-II, B7, és iNOS expresszió, csökkent IL-12 és TNF α termelés, de magas IL-10 szekréció jellemző. Erőteljes antigénprezentációs képességgel rendelkeznek és a Th2-es immunválaszt segítik elő a gyulladásgátló folyamatokat támogatva.

2. CÉLKITŰZÉSEK

Jelen munkánkban a következő kérdések megválaszolása volt a cél:

1. Létre tudunk-e hozni C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből a mesenchymalis őssejtekkel szemben támasztott kritériumoknak megfelelő őssejtkultúrákat?
2. Igazolni tudjuk-e az így létrehozott MSC-k immunszuppresszív aktivitását mitogén és alloantigén-indukált T-sejtes rendszerekben?
3. Milyen fő, az MSC-k által termelt immunszuppresszív molekulák felelősek a megfigyelt immunszuppresszív hatásért?
4. Miként befolyásolják a főbb gyulladáscsökkentő citokinek – a TNF α és az IFN γ – az MSC-k PGE-2-termelését?
5. Az aktivált MSC-k PGE-2-termelése milyen molekuláris mechanizmus útján valósul meg?
6. Az MSC-k jelenlétében hogyan változik a különbözőképpen aktivált peritoneális M ϕ -ok fagocitotikus és antigénprezentáló képessége, valamint citokintermelése – tehát aktivációs profilja?
7. Sikeresen létre tudunk-e hozni egér csontvelői sejtekből differenciáltatott M ϕ -okat, valamint létre tudjuk-e belőlük hozni megfelelő induktorok használatával a legismertebb M ϕ aktivációs állapotokat: M1, M2a, M2b?
8. Hogyan befolyásolják az MSC-k az M1, M2a és M2b induktív környezetben a csontvelői M ϕ -ok fagocitotikus képességét és citokintermelését?
9. Képesek-e a csontvelői M ϕ -ok az induktív környezet változását követve újrapolarizálódni, valamint befolyásolni tudja-e a folyamatot az MSC-k jelenléte?
10. Milyen fő mediátor felel az MSC-k M ϕ -okra gyakorolt hatásáért?

3. MÓDSZEREK

3.1. Kísérleti állatok

Kísérleti állatként fiatal és felnőtt (4-12 hetes) C57Bl/6-os (H-2^b) és felnőtt (10-12 hetes) Balb/c (H-2^d) egereket használtunk. Az állatokat az Országos Onkológiai Intézetből (Budapest) szereztük be.

3.2. A mesenchymalis őssejtek izolálása és tenyésztése

A csontvelői MSC-k izolálását Peister és munkatársai módszereit (79) alapul véve a laboratóriumunkban már korábban leírt módszerrel végeztük (80). Röviden: a 10-12 hetes C57Bl/6-os egerekből preparált combcsontok epifiziseit eltávolítottuk, majd fecskendőbe felszívott komplett médiummal (leírását lásd később) fűjtük ki belőle a csontvelőt. Az így kapott sejteket Hanks-féle oldattal mostuk (Invitrogen, Carlsbad, CA), majd $2-5 \times 10^6$ sejt/cm² sűrűségben 25 cm²-es tenyésztőedényekbe szélesztettük (BD Falcon, Bedford, MA). A tenyésztéshez általunk használt komplett médium (KM) összetétele a következő volt: Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium (DMEM) és Ham-féle F-12 médium 1:1 arányú keveréke kiegészítve 10 v/v%-os főtális borjúsavóval (FBS), 5 v/v% lósavóval (HS), 2 mM L-glutaminnal (mind Invitrogen), 50 U/ml penicillinnel és 50 µg/ml streptomycinnel (Sigma-Aldrich, St.Louis, MO). A tenyészeteket 37°C-on 5% CO₂-t biztosító termosztátban inkubáltuk. A tenyésztőedény falához nem tapadó (nem adherens) sejteket a tápfolyadék heti kétszeri cseréjével távolítottuk el. 2-4 hét elteltével az összefüggő réteget alkotó adherens sejteket a médium leszívása után hideg Hanks-féle oldattal mostuk, majd 0,25%-os tripszin/EDTA oldattal szedtük fel őket. Újabb Hanks-féle oldatos mosás után 75 cm²-es tenyésztőedénybe (BD Falcon) szélesztettük a sejteket, 1:5 arányú átoltással folytatva a tenyésztést. Az MSC-eket a 7. és 15. átoltás között használtuk fel a kísérletekhez.

3.3. T-sejtek tisztítása

A T-sejtek szeparálását SpinSep Mouse CD3⁺ T Cell Enrichment kit segítségével végeztük, a cég által előírt módon (StemCell Technologies Inc.). Felnőtt C57Bl/6 egerek lépét Hanks-féle oldattal történő mosás után orvosi fecskendő végével homogenizáltuk. A kapott sejtszuspenziót egy másik fecskendővel és 25 G-s tűvel egy műanyagcsőbe szívtuk át, így megszabadulva a maradék, nagyméretű szövetdarabkáktól. A maradék léphez Hanks-féle oldatot adtunk, majd megismételtük a homogenizálás és átszívás folyamatát. Az így kapott sejteket 10 percig 1200-1500-as percenkénti fordulatszámon centrifugáltuk, majd a cső alján összegyűlt sejtekről pipettával óvatosan leszívtuk a folyadékot. Az üledéket felráztuk, majd előzőleg kikevert 5%-os patkánysavót tartalmazó PBS-t adtunk a sejtekhez. Az így kapott szuszpenzióból 10 µl megfestése után megszámloltuk a sejteket, majd a milliliterenkénti sejtszámot a gyári leírás szerinti 5×10^7 -re állítottuk be. A továbbiakban egy biotinált ellenanyagoktól volt a segítségünkre a T-sejtek minden olyan más sejttől való elkülönítésében, amelyek szintén a lépben találhatóak, ugyanis a koktél a T-sejtek kivételével minden más sejthez hozzákötődő ellenanyagokat tartalmaz. 15 perces 4°C-on történő inkubálás után második reagensként egy olyan tetramer ellenanyagkomplexet adtunk a sejtekhez, amiben az egyik ellenanyag biotinfelismerő, a másik dextránspecifikus, míg a komplexben résztvevő két „linker” molekula e két ellenanyag között teremt kapcsolatot. Az előző 15 perces inkubáció megismétlése után dextránnal burkolt vasgyöngyöket adtunk a sejtekhez. Újabb 15 perces 4°C-on történő inkubáció után a szuszpenziót négyszeresére hígítottuk az 5%-os patkánysavót tartalmazó PBS-sel és pipettával óvatosan előzőleg kitett, megfelelő mennyiségű sűrűséggradiensre rétegeztük, majd 10 percre 2000-2500-as percenkénti fordulatszámon fék nélkül centrifugáltuk. A két eltérő sűrűségű folyadékréteg határán megülő sejteket leszívva, majd Hanks-féle oldattal mosva jutottunk a tiszta T-sejtekhez. A preparátum tisztaságát CD3-specifikus monoklonális ellenanyag segítségével, áramlási citométerrel ellenőriztük (részletesen lásd a „T-sejtek és makrofágok karakterizálása” című fejezetben).

3.4. Peritoneális- és csontvelői makrofágkultúrák alapítása

A peritoneális makrofágokat (Pe-M ϕ) 10-12 hetes C57Bl/6-os egerekből nyertük. A peritoneális üreget 5 ml fecskendőbe felszívott heparintartalmú (10 NE/ml) Hanks-féle oldattal többször átmostuk, majd az így kinyert peritoneális exudátumot (PEC, peritoneal exudate cells) Hanks-féle oldattal mostuk. A sejtszuspenziót 10 percig 250 xg fordulatszámon centrifugáltuk, majd a cső alján összegyűlt sejtekről pipettával óvatosan leszívtuk a folyadékot. Az üledéket felráztuk és kis mennyiségű KM-ban hígítottuk. Az így kapott szuszpenzióból kísérleti elrendezésnek megfelelő mennyiségű magvas sejtet mértünk ki lapos fenekű tenyésztőtálcákra (BD Falcon). A sejteket 1 órán keresztül inkubáltunk 37°C-on. A nem adherens sejteket a médium leszívásával, majd egyszeri Hanks-féle oldattal történő mosással távolítottuk el a kultúrákból. Minden kísérlethez frissen izolált Pe-M ϕ -okat használtunk.

A csontvelői makrofágok (BM-M ϕ) létrehozását 4-8 hetes C57Bl/6-os egerek femurjainak kimosásával kezdtük. A kifűjt csontvelői sejteket 7 napig inkubáltuk BM-M ϕ differenciációs médiumban: 50 ng/ml M-CSF (Miltenyi Biotec, Germany) tartalmú lósavót nem tartalmazó KM-ban 5% CO₂-t biztosító inkubátorban 37°C-on. A sejteket ezután Hanks-féle oldattal mostuk, majd lósavómentes KM-ban egy napig inkubáltuk őket. Minden kísérlethez frissen differenciáltatott BM-M ϕ -okat használtunk.

3.5. A mesenchymalis őssejtek karakterizálása

Az MSC-k karakterizálását sejtfelületi markereik vizsgálata és differenciációs képességeik alapján vizsgáltuk. Az MSC-kből 2-5x10⁵ sejtet tartalmazó mintákat készítettünk, majd kétszeri 0.5% v/w borjú szérum albumin tartalmú foszfáttal pufferelt sóoldattal (BSA-PBS-sel) történő mosás után az általunk vizsgált sejtfelületi markerekhez specifikusan kötődő ellenanyagot mértünk a sejtekhez. A jelölést csövenként külön-külön fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) (anti-CD34 és anti-CD90.2), fikoeritrinnel (PE) (anti-Sca-1, anti-CD73, anti-CD44 és anti-Gr1) (direkt jelölés), vagy biotinnal konjugáltatott (anti-CD45R/B220, anti-CD11b és anti-TER-119) egér monoklonális ellenanyagokkal (BD Pharmingen, San Diego, CA) végeztük. A biotinnal konjugáltatott ellenanyagokkal fedett sejtekhez második reagensként PE-nel konjugáltatott streptavidint (Sigma-Aldrich) adtunk (indirekt jelölés). A sejteket az

elsődleges ellenanyagokkal 20 percig inkubáltuk sötétben, 4°C-on BSA-PBS-ben, majd kétszer mostuk őket ugyanezzel a pufferrel. A másodlagos ellenanyagot igénylő mintákat a PE-nel konjugáltatott streptavidinnel szintén 20 percig inkubáltuk sötétben, 4°C-on, majd BSA-PBS-sel történő mosás után a mérést FACScan áramlási citométerrel (Becton, Dickinson and Company, Franklin Lakes, NJ) végeztük. Eredményeinket a CellQuest nevű szoftver segítségével kaptuk meg (Becton, Dickinson and Company).

Az MSC-k oszteoblaszt- és adipocita (zsírsejt) irányú differenciálását a Pittenger és munkatársai (13) által kifejlesztett módszer alapján végeztük. Csont irányú differenciáláshoz a sejteket β -glicerofoszfát (10 mM), dexametazon (10^{-8} M) és aszkorbinsav (0,3 mM) tartalmú, 10% FBS-sel kiegészített DMEM médiumban 2 hétig inkubáltuk (mind Sigma-Aldrich). A csont irányú differenciáció során a sejtek által termelt, majd lerakódott extracelluláris kalciumot alizarinvörös (Sigma-Aldrich) festékkal mutattuk ki. A zsírsejt irányú differenciáláshoz a tenyésztésnél használt, de lósavót itt nem tartalmazó KM-ot egészítettük ki dexametazonnal (10^{-7} M) és 3-izobutil-1-metilxantinnal (0,5 mM) (mind Sigma-Aldrich), majd a sejteket 2 hétig inkubáltuk ebben a médiumban. A sejtek által felhalmozott lipidcseppeket olajvörös festékkal (Sigma-Aldrich) tettük láthatóvá. A kontroll, nem differenciált MSC-eket Giemsa festéssel jelöltük. A festési eljárások során a sejteket – a médium leszívása után – háromszor mostuk PBS-sel, majd ezt követően PBS-sel pufferelt 8%-os formalinnal 10 percig fixáltuk őket. Újabb háromszori PBS-sel történő mosás után a festékoldatok hozzáadása következett, amiben 1 órán keresztül festődtek a sejtek. Utolsó háromszori PBS-sel történő mosás után az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük. A képeket Olympus CK2-es inverz mikroszkópra (Olympus, Tokió, Japán) csatlakoztatott Nikon Coolpix 4500 digitális kamerával (Nikon GmbH, Düsseldorf, Németország) készítettük.

3.6. T-sejtek és makrofágok karakterizálása

Az MSC-k sejtfelszíni markereinek karakterizálásánál leírt módszer segítségével a következő ellenanyagok használatával jellemeztük az általunk létrehozott T-sejteket és M ϕ -kultúrákat:

- a T-sejteket biotinnal konjugáltatott monoklonális anti-CD3 elsődleges, majd PE-nel jelölt streptavidin másodlagos ellenanyaggal jelöltük (mind BD Pharmingen);
- a Pe-M ϕ -okat és a BM-M ϕ -okat FITC-tal konjugáltatott monoklonális anti-F4/80 (AbD Serotec Ltd., Oxford, UK), anti-CD11b, anti-MHC-II és anti-Ly-6c (mind BD Pharmingen) ellenanyagokkal jelöltük;
- a Pe-M ϕ -ok antigénprezentációs vizsgálatánál allofikocianiddal jelölt monoklonális anti-CD86 ellenanyagot, és biotinnal konjugáltatott monoklonális anti-MHC-II elsődleges, valamint PE-nel konjugáltatott streptavidin másodlagos ellenanyagot használtunk.

A méréseket és a kiértékelést szintén FACScan áramlási citométerrel és a CellQuest szoftverrel végeztük (mind Becton, Dickinson and Company).

3.7. Aktivált T-sejtek osztódásának gátlása

Az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának mérését 96-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákon (BD Falcon) végeztük. Az MSC-eket az „Eredmények” című fejezetben feltüntetett számban, 100 μ l komplett médiumban mértük a lyukakba. 24 óra elteltével a nem adherens sejteket a médium leszívásával eltávolítottuk a tenyészetekből. A továbbiakban a „T-sejtek tisztítása” pontban leírt módon szeparált lépsejtekkel, vagy lépből tisztított T-sejtekkel dolgoztunk. Az MSC-khez 2×10^5 lépsejtet vagy T-sejtet adtunk 5 μ g/ml concanavalin A (ConA) (Sigma-Aldrich) jelenlétében illetve hiányában.

A kevert limfocita kultúrákat (MLR) hasonló körülmények között, 2×10^5 „válaszó” (C57Bl/6) és 2×10^5 „stimulátor” (30 Gy-vel besugárzott Balb/c) lépsejt összemérésével, szintén az „Eredmények” című részben feltüntetett számú MSC jelenlétében készítettük. A mikrokultúrák végtérfogata minden esetben 200 μ l volt lósavómentes KM-ban. A mitogén (ConA) stimulált kultúrák esetében két, a kevert

limfocita kultúrák esetében négy nap inkubáció után 1 μCi ^3H -timidinnel (Amersham Pharmacia Biotech Export GmbH, Bécs, Ausztria) 6-12 órán keresztül jelöltük a sejteket, learattuk őket és folyadékszintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

A sejtkontaktus szerepének vizsgálatakor 2×10^5 MSC kultúráihoz 2×10^6 T-sejtet adtunk 24-lyukú tenyésztőedényekben, 1 ml végtérfogatban, lósavómentes KM-ban. A T-sejteket direkt, vagy a tenyésztőedény típusának megfelelő, abba illeszkedő 1 μm pórusátmérőjű féligáteresztő hártárával ellátott „transwell” kamrákba mérve adtuk a kultúrákhoz (BD Falcon).

3.8. Sejtfelülúszókba szekretált citokinek mérése

A különböző kísérleti elrendezésekből gyűjtött sejtfelülúszókból enzimhez kötött immunoszorbens analízis (ELISA) segítségével mutattuk ki a minket érdeklő fehérjék, mediátorok (PGE-2, $\text{TNF}\alpha$, IL-10, Ym1) mennyiségét. Minden esetben az adott citokinre specifikus, kvantitatív ParameterTM ELISA Kiteket használtuk (R&D Systems Inc., Minneapolis, MN, USA). A méréseket a kitek gyári leírását követve végeztük.

3.9. Az MSC-k prosztaglandin-E2-termelésének vizsgálata

2×10^5 sejt/lyuk MSC-t szélesztettük 24-lyukú tenyésztőedényekbe (BD Flacon) 1 ml KM-ban, majd 24 órán keresztül inkubáltuk őket 37°C -on. A le nem tapadt sejtektől a tápfolyadék cseréjével szabadultunk meg. A kultúrákhoz 10 vagy 50 ng/ml $\text{TNF}\alpha$ -t, 20 vagy 100 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ -t (mind R&D Systems, Inc.), 10 μM indometacint (Indo), 1mM N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA), 1 μM metil-triptofánt (1-MT) vagy 80 μM nitrogén-monoxid donor molekulát (NOC-18) (mind Sigma-Aldrich) adtunk a kísérleti elrendezésnek megfelelően, majd további 48 órán keresztül inkubáltuk a sejteket, ezután a kultúra felülúszókból mintákat gyűjtöttünk.

3.10. Makrofágok különböző aktivációs profilba történő indukciója

A Pe-M ϕ -ok aktivációját vagy 10 $\mu\text{g/ml}$ lipopoliszachariddal (LPS) (Sigma-Aldrich), vagy 100 ng/ml LPS + 10 ng/ml $\text{IFN}\gamma$ (Miltenyi Biotec) tartalmú

lósavómentes KM-mal (M1 indukciós médium) értük el. Ehhez 10^6 PEC/lyuk sejtet tapasztottunk ki 24-lyukú tenyésztőedényben, majd a mosás után megmaradt sejteket használtuk (lásd a „Peritoneális- és csontvelői makrofágkultúrák alapítása” pontban), amiket bizonyos esetekben 2×10^4 MSC-vel kezeltünk.

A BM-M ϕ -ok indukciójához csontvelősejteket (2×10^5 sejt/lyuk) tapasztottunk 24-lyukú tenyésztőedényekbe, majd a „Peritoneális- és csontvelői makrofágkultúrák alapítása” pontban ismertetett eljárás szerint differenciáltattuk őket. Ezután az M1, M2a és M2b aktivációs állapotok kiváltásához a következő koktélokot használtuk:

- M1 indukciós médium: 100 ng/ml LPS + 10 ng/ml IFN γ lósavómentes KM-ban;
- M2a indukciós médium: 20 ng/ml IL-4 (Miltenyi Biotec) lósavómentes KM-ban;
- M2b indukciós médium: 100 ng/ml LPS + 100 μ g/ml hőaggregált egér IgG (IgGa) lósavómentes KM-ban.

A hőaggregált egér IgG-t a következőképpen készítettük: egyenlő mennyiségben kevertünk össze egér IgG1-et, IgG2a-t, IgG2b-t és IgG3-at (mind Sigma), majd a keveréket 0,22 μ m-es nejlon szűrőn szűrtük át, és 63°C-os vízfürdőben 20 percig melegítettük. Az indukció 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában zajlott.

3.11. M ϕ -ok élesztő- és apoptotizáló timocita fagocitózisának vizsgálata

Első lépésként hőinaktivált élesztősejtoldatot készítettünk, ehhez *Saccharomyces cerevisiae* sejteket használtunk. Az élesztősejteket 30 perces forralással előltük, majd PBS-ben 5×10^7 élesztősejt/ml-re állítottuk be a sejtszámot. A kísérletekhez ezt a törzsoldatot használtuk fel.

Az apoptotizáló timociták létrehozásához 6-8 hetes C57Bl/6 egerek tímuszát izoláltuk, majd kétszeri PBS-es mosás után egy steril fecskendő végével szétnyomkodtuk a szervet. Az így kapott sejtszuszpenziót centrifugálás után 2 μ M dexametazonnal kezeltük 12 órán át 37°C-on, majd ezeket a sejteket használtuk fel a megfelelő kísérletekhez.

A 24-lyukú tenyésztőtálcákra kitapasztott Pe-M ϕ -okhoz, vagy BM-M ϕ -okhoz az „Eredmények” című fejezetben leírtak szerint lyukanként MSC-ke, LPS-t, M1-, M2a- vagy M2b indukciós médiumot adtunk. 48 órás 37°C-on történő inkubáció után 5×10^6

hőinaktivált élesztősejtet adtunk a kultúrákhoz, majd egy órát inkubáltuk őket 37°C-on. Ezután a sejteket – a médium leszívását követően – háromszor mostuk PBS-sel, majd PBS-sel pufferelt 8%-os formalinnal 10 percig fixáltuk őket. Újabb háromszori PBS-sel történő mosás után Giemsa festékoldatot adtunk a lyukakhoz, amiben 1 órán keresztül festődtek a sejtek. Egy végső, háromszori PBS-sel történő mosás után az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük (random képeket rögzítettünk), majd megszámoltuk a bekebelezett élesztősejtek mennyiségét (élesztősejt/makrofág) kezelésként 100-100 makrofágban. Az ötnél kevesebb élesztősejtet tartalmazó M ϕ -okat figyelmen kívül hagytuk. A képeket Olympus CK2-es inverz mikroszkópra (Olympus, Tokió, Japán) csatlakoztatott Nikon Coolpix 4500 digitális kamerával (Nikon GmbH, Düsseldorf, Németország) készítettük.

A Pe-M ϕ -ok apoptotizáló timocita-fagocitózist specifikus fluoreszcens jelöléssel bizonyítottuk. A vizsgálathoz a már fentebb leírt módon timocita szuszpenziót készítettünk, majd – a gyári utasításnak megfelelően – 5(6)-CFDA/SE-t (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) adtunk hozzá, ami a sejtekben membránon áthatolni nem képes fluoreszcens festékké, CFSE-vé (karboxifluorescein-diacetátszukcinimidil-észter) alakul. Az ilyen módon jelölt sejteket 12 órán át 37 °C-on inkubáltuk 2 μ M dexametazon (Sigma) jelenlétében, majd kétszeri mosás után adtuk a kultúrákhoz. Az mCherry génjét egy harmadik generációs lentivírus vektor (RRLPPT.SF91) segítségével Dr. Német Katalin és munkatársai (OVSZ) juttatták be az MSC-kbe. Az „Eredmények” fejezetben bemutatottak szerint 5×10^5 CFSE-jelölt timocitát és 2×10^4 mCherry fluoreszcens fehérjét expresszáló MSC-t adtunk a 10^6 kiindulási sejtszámmal kitapasztott Pe-M ϕ tartalmú kultúrákhoz, majd 48 órán át inkubáltuk a sejteket. Az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük Olympus IX51 fluoreszcens mikroszkóp és SPOT RT3 (Burroughs) digitális kamera segítségével, valamint áramlási citométerrel is vizsgáltuk az apoptotizáló sejtek felvételét (szintén FACScan áramlási citométerrel és a CellQuest nevű szoftver segítségével (Becton, Dickinson and Company)). Egyes kísérletekben jelöletlen apoptotizáló timocitákat, vagy hőinaktivált élesztősejteket alkalmaztunk, és az egy órás fagocitózis után a M ϕ -ok által fel nem vett sejteket eltávolítottuk, majd friss lósavómentes KM-ban inkubáltuk a sejteket még 48 órán át, hogy citokinanalízis céljából felülűszókat gyűjtsünk.

3.12. A Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességének vizsgálata MSC-eket és T-sejteket tartalmazó kultúrákban

4×10^3 MSC-t, 2×10^5 PEC-ből nyert Pe-M ϕ -ot, 2×10^5 *in vivo* előaktivált T-sejtet, valamint ovalbumin (OVA) (Sigma) különböző koncentrációit (4; 20; 100 $\mu\text{g/ml}$) mértük össze az “Eredmények” fejezet megfelelő pontjában bemutatottak szerint, majd a kultúrákat 37°C -on 5 napig inkubáltuk. A vizsgálatban felhasznált T-sejteket a következőképpen nyertük: 10-12 hetes C57Bl/6 egereket oltottunk komplett Freund adjuváns és ovalbumin 1:1 arányú keverékével. Az oltóanyagot szubkután az állatok combjaiba adtuk. Az oltás utáni 7. napon az állatok megduzzadt nyirokcsomóit izoláltuk, Hanks-féle oldatban egy fecskendő végével szétnyomkodtuk, majd a felülúszót leszívtuk, lecentrifugáltuk, és KM-ban való felvétel után a sejtszámot meghatároztuk. Ezek után a sejteket a kísérleti elrendezések szerint a kultúrákhoz adtuk. 5 napos inkubáció után $1 \mu\text{Ci } ^3\text{H-timidin}$ (Amersham Pharmacia Biotech Export GmbH) hozzáadásával 18 órán keresztül jelöltük a sejteket, learattuk őket és folyadék-szcintillátorban mértük a percenkénti beütésszámot.

3.13. A különböző T-sejt alpopulációkban bekövetkező változások vizsgálata

Ehhez a vizsgálathoz 4×10^3 MSC-t, 2×10^5 PEC-ből nyert Pe-M ϕ -ot, 2×10^5 *in vivo* ovalbuminnal előaktivált T-sejtet, valamint 20 $\mu\text{g/ml}$ ovalbumint mértünk össze az “Eredmények” fejezet megfelelő pontjában szemléltetett elrendezésben, majd a kultúrákat 5 napig inkubáltuk 37°C -on. Ezután a kultúrákból Hanks-féle oldatos mosással gyűjtöttük be a T-sejteket, míg a letapadt MSC-k és M ϕ -ok a tenyésztőedényben maradtak. A $\text{CD4}^+\text{CD25}^+\text{FOXP3}^+$ (Forkhead Box P3) Treg-sejtek jelölését a Mouse Regulatory T Cell Staining Kit #1 (eBioscience Inc., San Diego, CA) segítségével végeztük. A $\text{CD4}^+\text{IL-17}^+$ T helper 17 limfociták meghatározásához a sejteket a Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit (BD Pharmingen, San Diego, CA) leírása szerint készítettük elő, majd ugyanennek a kitnek a segítségével jelöltük őket (a kit komponensei részben az intracellulárisan felhalmozódott citokineket, köztük az IL-17-et, jelöli). A jelölt sejtek arányát FACScan áramlási citométerrel (Becton, Dickinson

and Company) mértük. Eredményeinket a CellQuest nevű szoftver segítségével elemeztük (Becton, Dickinson and Company).

3.14. A sejtkontaktus szerepének vizsgálata BM-M ϕ és MSC kokultúrákban

2×10^5 BM-M ϕ -ot szélesztettünk 24-lyukú tenyésztőedényekbe, majd a lyukakba 2×10^4 MSC-t helyeztünk a tenyésztőedény típusának megfelelő 1 μ m pórusátmérőjű féligáteresztő hártával ellátott „transwell” kamrák segítségével (BD Falcon). Az így kialakított kokultúrákat ezután M1-, M2a- vagy M2b indukciós médiummal kezeltük, majd 48 órán át inkubáltuk 37°C-on, végül a sejtfelülűszókból mintákat vettünk a termelődött TNF α és IL-10 mennyiségeinek méréséhez.

3.15. A prosztoglandin-E2 szerepének vizsgálata BM-M ϕ kultúrákban

A PGE-2 szintézisének megakadályozásához COX-1-gátlóként 10 μ M Resveratrolt (Sigma) és/vagy COX-2-gátlóként 10 μ M Celecoxibot (Sigma) adtunk M2b indukciós médiumot tartalmazó BM-M ϕ -ok és MSC-k kokultúráihoz. 48 órás 37°C-on történő inkubáció után felülűszókat gyűjtöttünk a termelődött TNF α és IL-10 mennyiségeinek meghatározásához.

A külső forrásból adagolt PGE-2-t felhasználó kísérletekben 200, 400 vagy 800 pg/ml PGE-2-t (Sigma) adtunk az M2b indukciós médiumot tartalmazó BM-M ϕ kultúrákhoz. 48 órás 37°C-on történő inkubációt követően a felülűszókból mintákat vettünk a termelődött TNF α és IL-10 mennyiségeinek méréséhez.

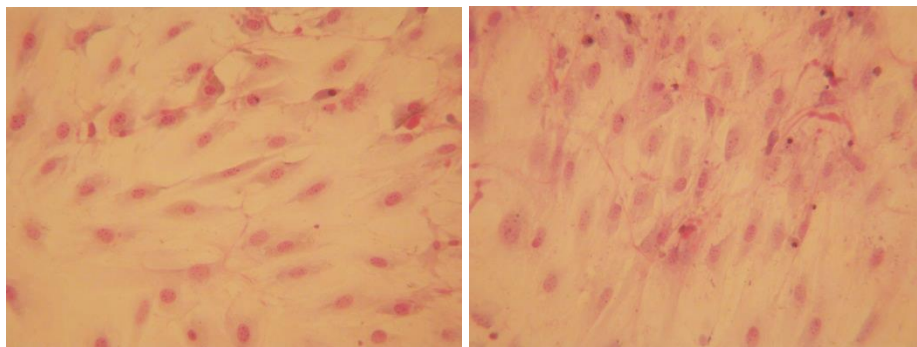
3.16. Statisztikák

Az eredmények szignifikáns voltát Student-féle t-próba segítségével ellenőriztük $p < 0,05$ figyelembe vételével. Az ábrákat három független mérés alapján, a mérési pontok felrajzolásával készítettük átlag \pm szórás formában. Az élesztőfagocitózis kiértékelésekor a változók nem normál eloszlása miatt nem-paraméteres Kruskal-Wallis próbát végeztünk szintén $p < 0,05$ figyelembe vételével.

4. EREDMÉNYEK

4.1. A csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek karakterizálása

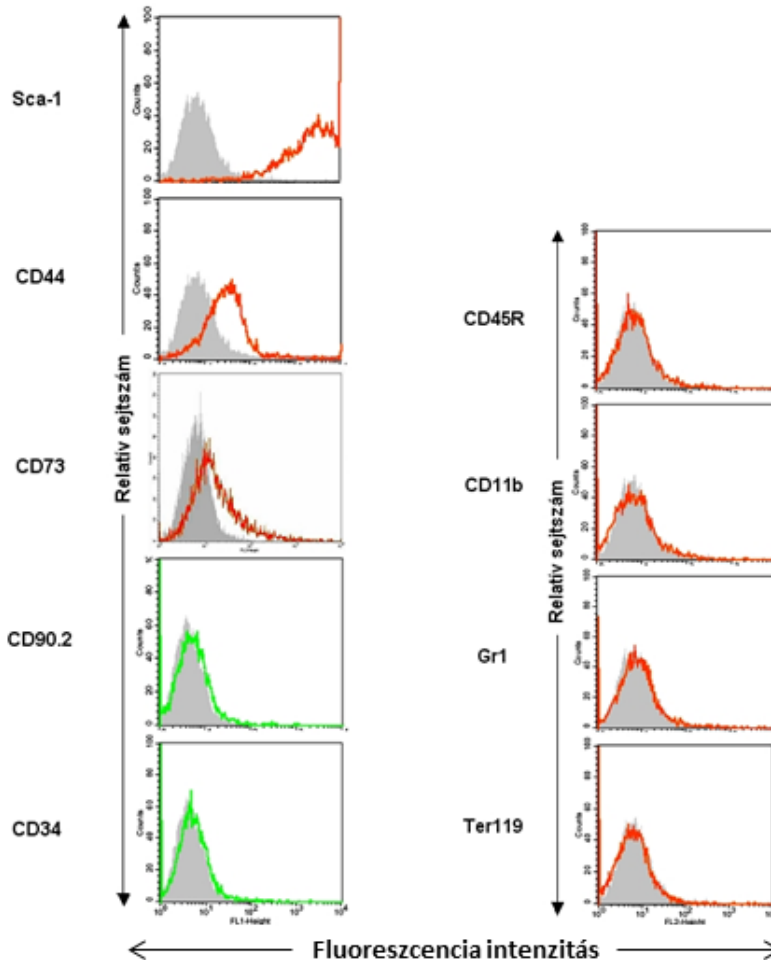
Munkánk első lépéseként elengedhetetlen volt bizonyítani, hogy a 10-12 hetes egerek csontvelőjéből alapított sejttenyészetek megfelelnek-e a mesenchymalis őssejtekkel szemben állított követelményeknek. Az adherens sejtek elnyúlt, fibroblasztszerű morfológiát mutattak, amit Giemsa-festéssel tettünk láthatóvá (4. ábra).



4. ábra: Csontvelői eredetű adherens sejtek morfológiája. 7. átoltású csontvelői eredetű sejtek kultúrájának Giemsa-festése (eredeti nagyítás x10).

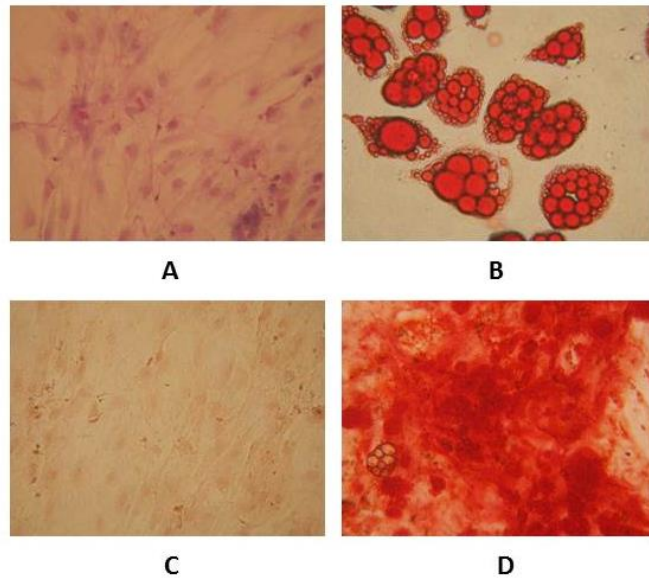
Adherens sejtjeink sejt felszíni markerprofilja MSC-kre jellemző képet mutatott (5. ábra). Megfelelő mennyiségben hordoztak egér fibroblasztokra jellemző markereket, úgymint Sca-1, CD44, CD73. A CD90.2 szintén egér MSC-k és fibroblasztok definiálására szolgáló marker, azonban ennek megjelenése és a sorozatos átoltások során való fennmaradása szövetfüggő – például zsírszöveti eredetű MSC-k nagy százalékban fejezik ki –, csontvelői eredetű MSC-ken nem fordul elő (79). Ennek megfelelően az általunk vizsgált sejtek is CD90.2 negatívak voltak. A csontvelőből alapított MSC kultúrák nagyjából a 6. átoltásig tartalmazhatnak vérképző őssejteket/progenitorokat és/vagy érett vérsejteket, ezért munkánk során a kísérletekben a 7. átoltástól használtuk a sejteket. Ahogyan a sejt felszíni markerek vizsgálatából is kiderült (5. ábra), az általunk vizsgált kultúra már nem tartalmazott hematopoetikus elemeket (CD34, CD45R, CD11b, Gr1, Ter117). Az egér MSC-k *in vitro* fenntartott

kultúrái spontán immortalizálódnak, azonban nagyjából a 20. átoltás fölött már olyan mértékben megnőhet a genominstabilitás (kromoszómaszám-beli változások, plaszticitás és immunszuppresszív képesség csökkenése stb.) (nem mutatjuk), ami nagymértékben befolyásolhatja a kísérleti eredmények kimenetelét, ezért vizsgálatainkhoz 15. átoltásnál öregebb sejteket már nem használtunk.



5. ábra: Csontvelői eredetű stromasejtek sejtfelületi markereinek vizsgálata áramlási citométerrel. 6. passzálású MSC-k sejtfelületi markerprofilja. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a színes hisztogramok az adott sejtfelületi marker fluoreszcens jelét mutatják (piros: fikoeritrinnel jelölt, zöld: fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt antitest).

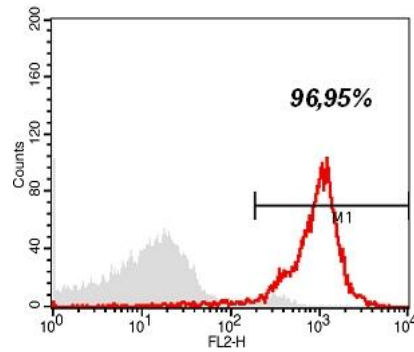
Ezek után a csontvelői kultúrákból speciális induktorok használatával 14 nap alatt sikeresen differenciáltattunk lipidcseppeket felhalmozó zsírsejteket, és extracellulárisan kalciumot felhalmozó oszteoblasztokat (6. ábra). Differenciációs képességeiket tekintve tehát sejteink multipotensnek tekinthetők (vagy legalábbis bipotensek).



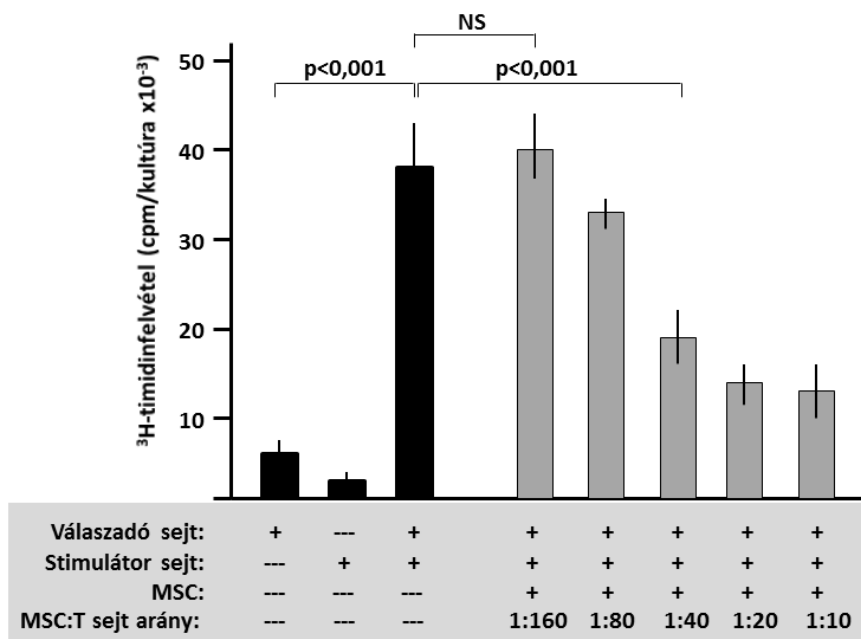
6. ábra: Csontvelői eredetű stromasejtek differenciálódása speciális induktorok hatására. 14 napos adipogén differenciációs vizsgálat (A) kontroll kultúrája Giemsa-festéssel, és (B) adipogén kultúrája olajvörös festéssel. Az olajvörös festék a felhalmozott lipidcseppeket teszi láthatóvá. 14 napos oszteogén differenciációs vizsgálat (C) kontroll kultúrája és (D) oszteogén kultúrája alizarin vörös festéssel. Az alizarin vörös az extracelluláris térben felhalmozott kalciumot festi meg. Az eredeti nagyítások: x10.

4.2. Csontvelői MSC-k immunszuppresszív aktivitásának vizsgálata T-sejtes rendszerekben

A csontvelői MSC-k immunszuppresszív aktivitásának bizonyítására kétféle aktivált T-sejtes rendszerben végeztünk vizsgálatokat. Az általunk mégneses gyöngyök segítségével preparált és felhasznált lép T-sejtek tisztasága 95% fölötti volt (7. ábra). Kevert limfocita reakció során (MLR, mixed lymphocyte reaction) az alloantigén-indukált T-sejt osztódásgátlást különböző mennyiségű MSC hozzáadására vizsgáltuk. 2×10^5 „válaszó” (C57Bl/6-os egerekből származó, osztódóképes) és ugyanennyi „stimulátor” (Balb/c egerekből izolált, besugárzott, osztódásképtelen) lépsejtet adtunk MSC-k $1,25 \times 10^3$, $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 10^4 , illetve 2×10^4 sejtet tartalmazó kultúráihoz. A T-sejtek proliferációját ^3H -timidinbeépülés mértékének változásával követtük nyomon. Eredményeinkből kiderült (8. ábra), hogy az MSC-eket 1:40 arányban alkalmazva azok már jelentős mértékben képesek gátolni az alloantigén-indukált T-sejtosztódást, a gátlás maximumát pedig 1:20 MSC:T-sejt aránynál tapasztaltuk. A kísérletet mitogénindukált T-sejtes rendszerben, $5 \mu\text{g/ml}$ Concanavalin A (ConA) jelenlétében is megismételtük (a stimulátor lépsejteket elhagyva a rendszerből), és az MSC-k T-sejtosztódást gátló hatása itt is 1:40 MSC:T-sejt aránynál jelentkezett, a gátlás maximuma szintén 1:20 sejtaránynál volt megfigyelhető (nem mutatjuk). A továbbiakban már csak mitogénindukált T-sejtekkel és 1:20 MSC:T-sejt aránnyal dolgoztunk.



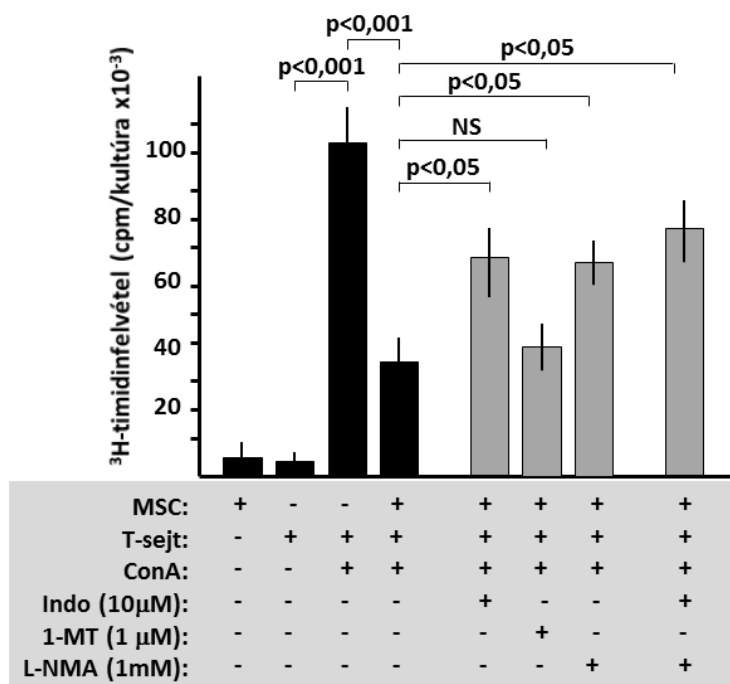
7. ábra: Egér lépből izolált T-sejtek tisztasága. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a piros hisztogram a CD3 sejtfelszíni marker fluoreszcens jelét mutatja. A százalék érték az M1 tartományba eső CD3⁺ sejtek arányát mutatja. Egy reprezentatív mérés eredményét mutatjuk.



8. ábra: Az MSC-k lépsejtek osztódására gyakorolt szuppresszív aktivitásának dóziszfüggése kevert limfocita kultúrában (MLR). A fekete hisztogramok 2×10^5 válaszó lépsejt és/vagy 2×10^5 stimulátor lépsejt ³H-timidin felvételét mutatják. A szürke hisztogramok $1,25 \times 10^3$, $2,5 \times 10^3$, 5×10^3 , 10^4 , vagy 2×10^4 MSC 2×10^5 válaszó lépsejt ³H-timidin felvételére gyakorolt hatását mutatják kevert limfocita kultúrában. Cpm: beütésszám. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns.

4.2.1. Az MSC-k T-sejtosztódást gátló hatásában szerepet játszó mediátorok vizsgálata

Szerettük volna kideríteni, hogy az egér MSC-k és aktivált T-sejtek között kialakuló kölcsönhatásért milyen szolubilis mediátor(ok) felel(nek). Ehhez a szakirodalmi adatok alapján feltételezhető mediátorok termelésében szerepet játszó kulcsenzimek gátlószereit adtuk a kokultúrákhoz. A PGE-2 termelésben szerepet játszó enzimek, a ciklooxygenázok (COX-1, COX-2) gátlószereként indometacint (Indo), az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO) gátlószereként 1-metil-triptofánt (1-MT), valamint a nitrogén-monoxid (NO) szintéziséért felelős indukálható nitrogén-monoxid-szintáz (iNOS) gátlószereként N-metil-L-arginin-acetátot (L-NMA) adtunk MSC-k és ConA-stimulált T-sejtek különböző kultúráihoz. A 9. ábrán látható, hogy az MSC-k erőteljes T-sejtproliferációt gátló hatása megint kialakult. Ezt a gátló hatást az Indo és L-NMA gátlószerek voltak képesek részlegesen feloldani, hatásuk azonban nem volt additív. A prosztoglandinok és a NO hatása tehát igazolódott az MSC-k és aktivált T-sejtek kölcsönhatásában. Azonban az is kiderült, hogy szerepük nem kizárólagos, együttes gátlásuk is csak részlegesen tudta helyreállítani az aktivált T-sejtek osztódását. Az 1-MT hatása, tehát az IDO szerepe vizsgálataink szerint nem volt kimutatható.



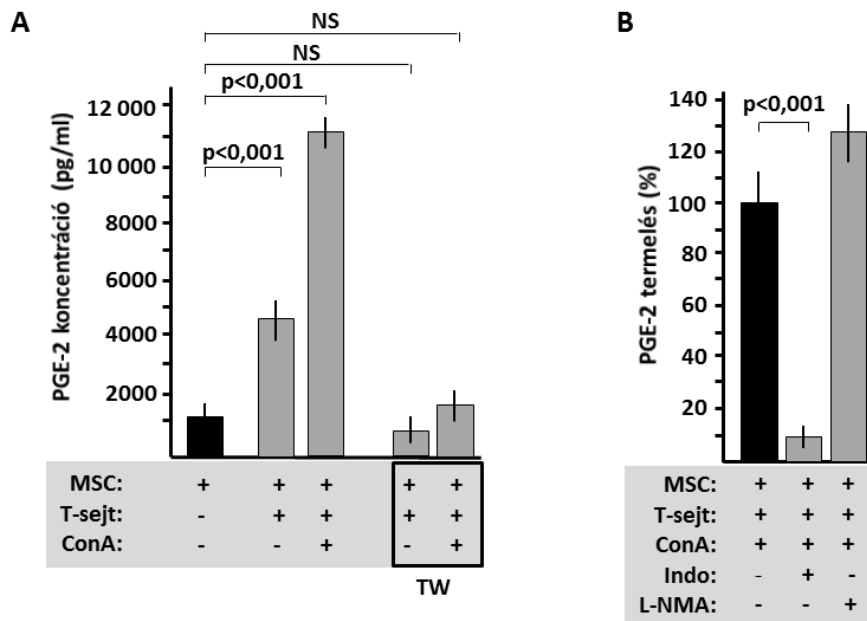
9. ábra: Az MSC-k T-sejtek osztódására gyakorolt szuppresszív hatása különböző enzimgátlók jelenlétében. 2×10^5 MSC hatása 2×10^6 5 µg/ml ConA-val stimulált T-sejt ^3H -timidinfelvételére különböző enzimgátlók jelenlétében vagy hiányában. *Indo*: indometacin, egy ciklooxygenáz-gátló; *1-MT*: 1-metil-triptofán, az indolamin-2,3-dioxigenáz gátlószere; *L-NMA*: N-metil-L-arginin-acetát, az indukálható nitrogén-monoxid-szintáz gátlószere; *cpm*: beütésszám. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, $n=3$, NS: nem szignifikáns.

4.2.2. A prosztaglandin E2 termelésének vizsgálata aktivált T-sejtek és MSC-k kokultúráiban

Miután a PGE-2 MSC–T-sejt kölcsönhatásban betöltött szerepe a mi méréseink alapján is beigazolódni látszott, szeretnénk volna megvizsgálni, hogyan alakul az MSC-k PGE-2 termelése aktivált T-sejtek jelenlétében. Méréseink alapján az MSC-k önmagukban átlagosan 1150 pg/ml PGE-2-t termeltek (kontroll) (10.A ábra). Ez az érték már aktiválatlan T-sejtek jelenlétében is körülbelül négyszeresére ugrott, azonban a ConA-val aktivált T-sejteket tartalmazó kokultúrákban volt a legmagasabb (kb. tízszerese a csak MSC-eket tartalmazó kultúrákban mért PGE-2 szintnek). Ha a két sejttípus között a fizikai kontaktust féligáteresztő hátyával megszüntettük (TW, trans-

well rendszer), akkor a T-sejtek sem önmagukban, sem aktivált állapotukban nem voltak képesek előidézni a felülúszókban mérhető PGE-2 szint emelkedését a kontroll kultúrához viszonyítva. Eredményünk tehát arra mutat, hogy az aktivált T-sejtek képesek fokozni az MSC-k PGE-2-szintézisét, azonban ehhez a kétféle sejtnak direkt kontaktusba kell kerülnie egymással.

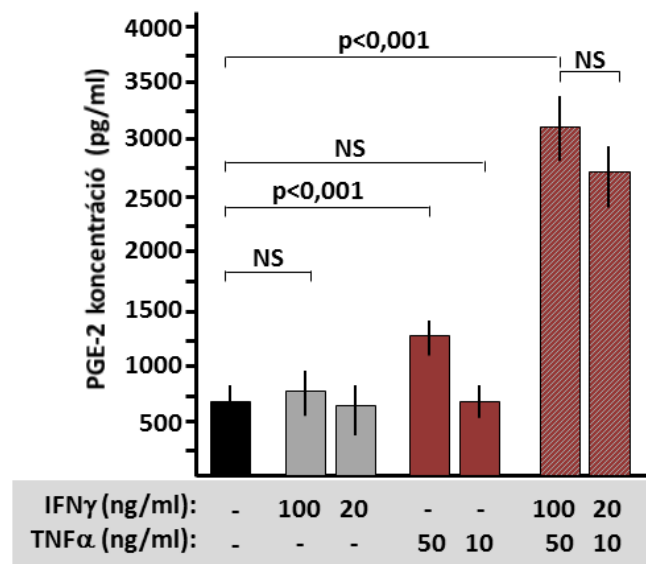
Az aktivált T-sejtek PGE-2-növelő hatását gátlószerek jelenlétében is vizsgáltuk (10.B ábra). Nem meglepő módon Indo hozzáadására a PGE-2 termelés erőteljesen lecsökkent, az L-NMA jelenlétében azonban nem figyeltünk meg gátló hatást. Az aktivált T-sejtek PGE-2 növelő hatása tehát döntően a COX enzimeken keresztül, és nem az iNOS és így a NO igénybevételével valósul meg.



10. ábra: Az MSC-k prosztaglandin-E2 (PGE-2) termelése aktivált T-sejtek jelenlétében. 2×10^5 μ g/ml ConA-val stimulált T-sejt és 2×10^5 MSC kultúráinak 48 órás felülúszóiban mértünk PGE-2-termelést ELISA segítségével. (A) A „TW” jelölésnél az MSC-eket és aktivált T-sejteket 1 μ m pórusátmérőjű féligáteresztő hártya segítségével választottuk el egymástól. (B) Az MSC–aktivált T-sejt kokultúrákban 1 μ M indometacin (Indo) vagy 1 mM N-metil-L-arginin-acetát (L-NMA) PGE-2-termelésre gyakorolt hatását vizsgáltuk. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns.

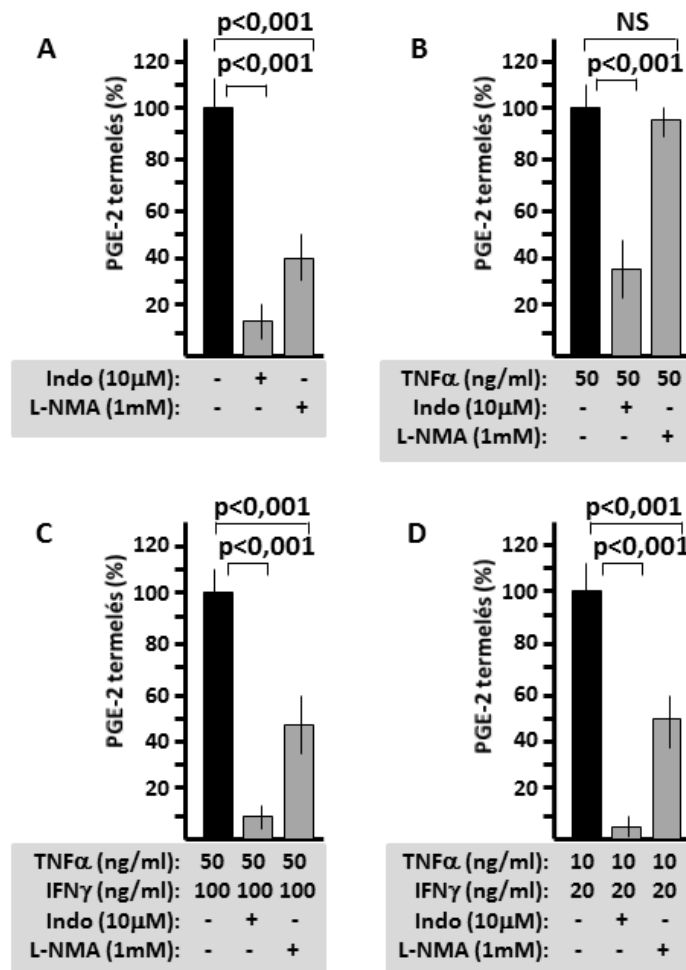
4.2.3. A mesenchymalis őssejtek prosztaglandin E2-termelésének hatásmechanizmusa gyulladásos citokinek jelenlétében

Szerettük volna felderíteni az MSC-k PGE-2-termelésének növekedése mögött húzódo mechanizmust. Ehhez a gyulladásos környezetet a T-sejtek által is termelt legfontosabb citokinekkal, interferon-gamma (IFN γ) és tumor nekrosis faktor-alfa (TNF α) hozzáadásával modelleztük: MSC-eket tartalmazó kultúrákhoz alacsony (20 ng/ml IFN γ ; 10 ng/ml TNF α) és magas (100 ng/ml IFN γ ; 50 ng/ml TNF α) koncentrációban adtuk ezeket a rekombináns citokineket (11.ábra). A TNF α magasabb koncentrációban képes volt jelentősen fokozni az MSC-k PGE-2-termelését, míg alacsonyabb koncentrációnál ez a hatás elmaradt. Az IFN γ sem magasabb, sem alacsonyabb koncentrációban nem befolyásolta a PGE-2-termelést, azonban ha azt TNF α egyidejű hozzáadása mellett alkalmaztuk, a hatás nem additív volt, hanem szinergisztikus: az IFN γ még alacsony koncentráció mellett is a TNF α hatását potenciálva sokszorosára növelte a PGE-2 felülúszókban mérhető szintjét. Az IFN γ tehát jelentős mértékben képes fokozni az MSC-k TNF α -indukált PGE-2-szintézisét.

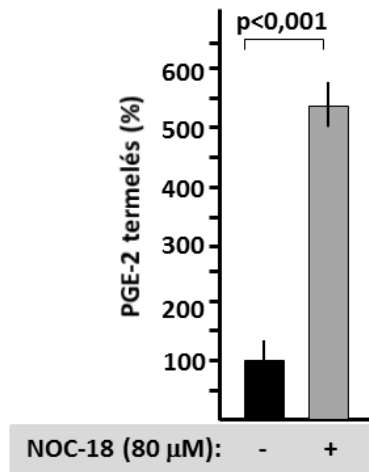


11. ábra: Az MSC-k prosztaglandin-E2 (PGE-2) termelése TNF α és/vagy IFN γ különböző koncentrációinak jelenlétében. 2×10^5 MSC-t inkubáltunk 48 órán át az ábrán feltüntetett koncentrációjú TNF α és/vagy IFN γ jelenlétében vagy hiányában, majd a felülúszókból ELISA segítségével mértük meg a PGE-2 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, $n=3$, NS: nem szignifikáns.

Ezek után a PGE-2-termelés jelátviteli útjában feltételezhetően szerepet játszó enzimek (COX enzimek és iNOS) gátlószereit adtuk az előbb ismertetett rendszerhez. Az MSC-k alap PGE-2-termelése Indo hatására szinte teljesen megszűnt (85%-os gátlás), az iNOS-gátló L-NMA viszont az Indo-nál gyengébb mértékben ugyan (mintegy 60%-ban), de szintén képes volt mérsékelni a mediátor szintézisét (12.A ábra). Ezután az MSC-k 50 ng/ml TNF α -val indukált PGE-2-termelését kontrollnak véve megfigyeltük, hogy az Indo megint erős szintézisgátlónak bizonyult (65%-os eredményesség) (12.B ábra). Ebben az aktivált állapotban viszont már az L-NMA nem tudta befolyásolni az MSC-k PGE-2-szintézisét. A TNF α tehát valószínűleg egy külön reakcióúton, az iNOS-tól függetlenül, de a COX enzimeken keresztül indukál PGE-2 szintézist. Mikor a TNF α -t az IFN γ -val együtt alkalmaztuk (12.C és D ábrák), akkor már az L-NMA is kifejti gátló hatását, azonban soha nem éri el az Indo okozta gátlás erősségét. Ez arra utal, hogy az IFN γ viszont egy olyan jelátviteli úton kapcsolódik be – szintén a COX enzimeken keresztül – a PGE-2-szintézis szabályozásába, amelynek az iNOS enzim is fontos résztvevője. Ezt támasztja alá az az eredményünk is, hogy a NOC-18-cal, egy NO-donorral kezelt MSC-kból szintén jelentős mennyiségű PGE-2 szabadul fel (13. ábra).



12. ábra: Az MSC-k gyulladásos citokinek által indukált prosztaglandin-E2 (PGE-2) termelésének befolyásolása különböző enzimgátlókkal. 2×10^5 MSC-t inkubáltunk 48 órán át az ábrán feltüntetett koncentrációjú TNF α , IFN γ , indometacin (Indo) vagy N-metil-L-arginin-acetát (L-NMA) jelenlétében, majd a felülszókból ELISA segítségével mértük meg a PGE-2 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns.



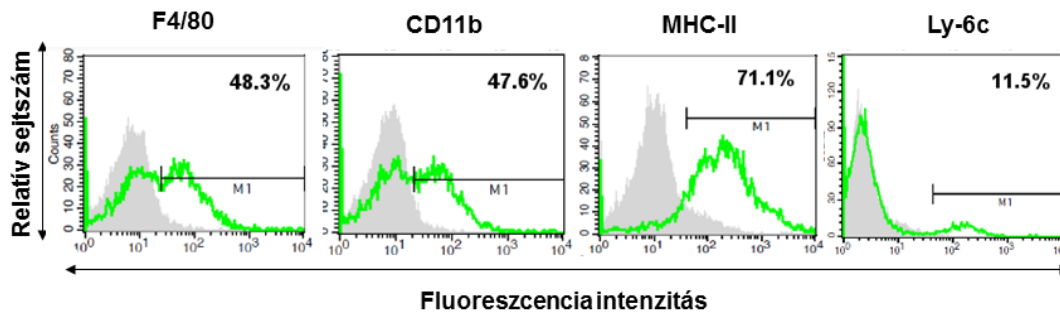
13. ábra. A nyugvó MSC-k prosztaglandin-E2 (PGE-2) termelésének serkentése nitogén-monoxid donorral. 2×10^5 MSC-t inkubáltunk 48 órán át $80 \mu\text{M}$ nitrogén-monoxid-donor (NOC-18) jelenlétében, majd a felülúszókból ELISA segítségével mértük meg a PGE-2 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, $n=3$.

4.3. Mesenchymalis őssejtek és peritoneális makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata

4.3.1. A peritoneális makrofágok karakterizálása

Munkánk további részében a gyulladásos és/vagy autoimmun betegségek hátterében álló másik, központi sejtfeleségre, a makrofágokra fókuszáltunk, és szeretnénk volna kideríteni, hogyan befolyásolják az MSC-k ezeket a sejteket. Felnőtt, 10-12 hetes egerek peritoneumából izoláltunk makrofágokat (Pe-M ϕ): a peritoneumból kimosott sejteket egy órán át tapasztottuk, majd a kultúrákat lemostuk (lásd a Módszerek fejezetben), az így megmaradt letapadt sejteket áramlási citometriával jellemeztük. Eredményeinket a 14. ábra szemlélteti, amin egy reprezentatív mérés értékeit mutatjuk. A sejtek $49,6 \pm 7,3\%$ -ban tartalmaztak érett makrofágokat (F4/80 marker alapján), amiből $48,8 \pm 6,3\%$ hordozott CD11b monocita-makrofág markert. Ezenkívül főként CD19⁺ B-sejteket és kisebb mennyiségben CD3⁺ T-sejteket detektáltunk (nem mutatjuk), míg granulociták nem voltak kimutathatók a kultúrákban (nem mutatjuk). A vizsgált sejtek $69,8 \pm 5,4\%$ -ban hordoztak MHC-II antigént, valamint $12,8 \pm 2,3\%$ -ban

Ly-6c-t. Mindkét marker a M ϕ -ok aktiváltságára utal, azonban az MHC-II⁺ sejtek kisebb hányadát a detektált B-sejtek teszik ki (26.5±4.4%, nem mutatjuk).

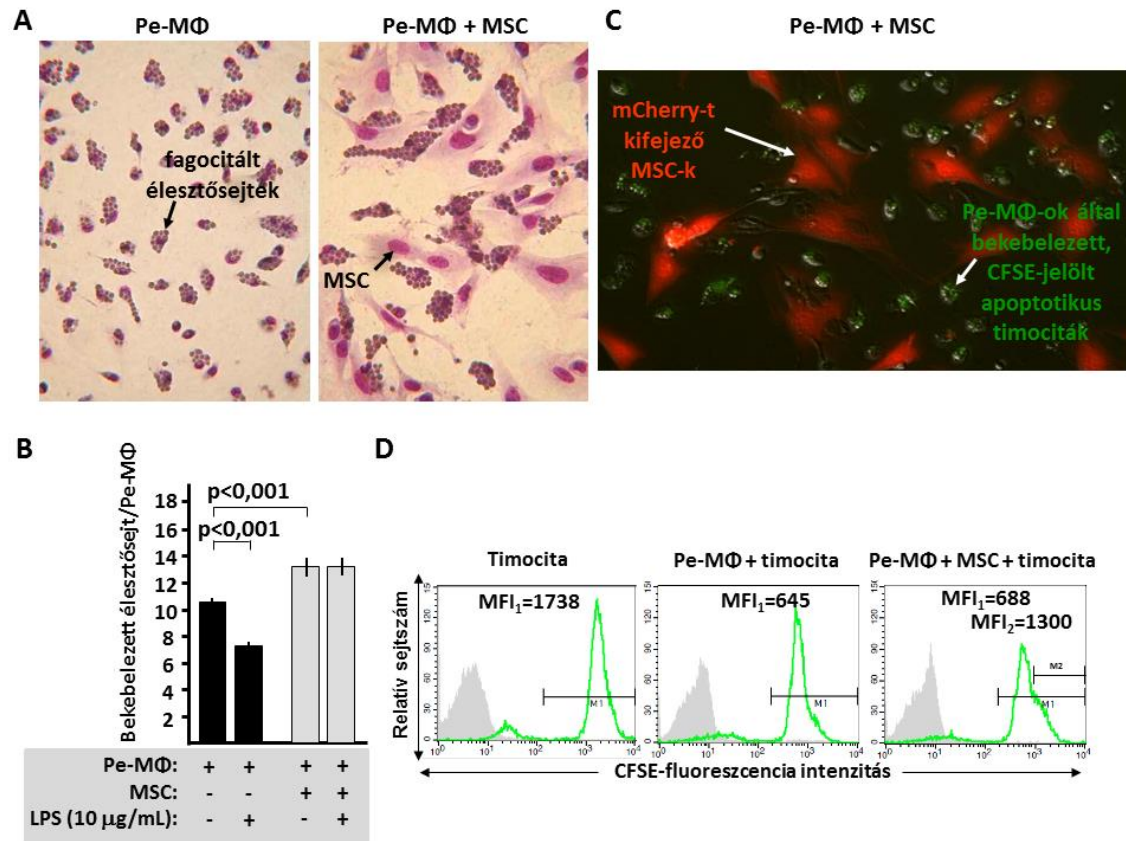


14. ábra: Peritoneális M ϕ -ok sejtfelületi markereinek vizsgálata áramlási citométerrel. Az F4/80 mint érett M ϕ marker, a CD11b mint monocita/M ϕ marker, valamint az MHC-II és Ly-6c mint aktivációs markerek expresszióját vizsgáltuk egér peritoneumból kimosott, majd egy órán át tapasztott, és lemosott Pe-M ϕ kultúrákban. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a zöld hisztogramok az adott sejtfelszíni marker fluoreszcens jelét mutatják (zöld: fluoreszcein-izotiocianáttal jelölt antitest). A százalék érték az M1 tartományba eső adott markerre pozitív sejtek arányát mutatja. Egy reprezentatív mérés eredményét mutatjuk.

4.3.2. A peritoneális makrofágok élesztő- és apoptotizáló timocita-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében

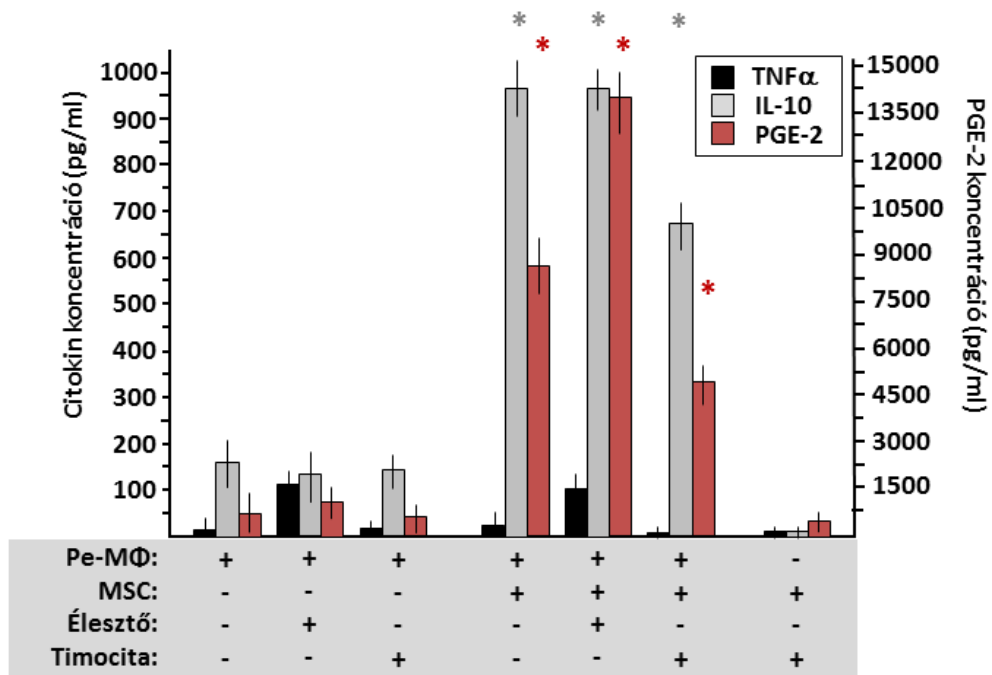
Az általunk alkalmazott módszerrel létrehozott kultúrákban a Pe-M ϕ -ok jelentős mértékben voltak képesek élesztő sejteket fagocitálni (15.A ábra), tehát funkcionálisan megfelelő M ϕ -okat tudunk izolálni. Az MSC-k jelenléte nagymértékben tudta fokozni a Pe-M ϕ -ok élesztő-fagocitózisát (15.A ábra), amit számszerűsítve a 15.B ábrán mutatunk be. LPS-sel, egy Toll-like receptor 4 (TLR4)-liganddal a M ϕ -ok további aktivációját érhetjük el (81). Méréseink szerint a 10 μ g/ml-rel történő LPS-kezelés nagymértékben csökkentette a Pe-M ϕ -ok élesztő-fagocitózisát, míg az MSC-k jelenléte jelentősen fokozta azt (15.B ábra). Az MSC-knek ezt a hatását az LPS jelenléte nem befolyásolta. A patogének internalizációjának vizsgálata után kíváncsiak voltunk, hogy miként befolyásolja az MSC-k jelenléte a Pe-M ϕ -oknál a pusztuló saját sejtek

fagocitózist. Az apoptotikus sejtek felvételét fluoreszcens festékkel (CFSE) jelölt, és előzetesen dexametazonnal kezelt timociták segítségével bizonyítottuk a kokultúrákban. Ahogyan azt a 15.C ábra is mutatja, a CFSE-jelölt timociták a Pe-M ϕ -ok belsejébe kerültek, míg a fluoreszcens fehérjét (mCherry) kifejező MSC-kben nem fedezhetőek fel a 48 órás inkubációt követően. Áramlási citometriás méréseink szerint is megtörtént az apoptotizáló sejtek felvétele: a közepes fluoreszcencia intenzitás (MFI) értékek szerint ugyanis a szabad timociták fluoreszcens jele a Pe-M ϕ -ok jelenlétében jelentősen csökkent (15.D ábra). Az MSC-k jelenlétében a Pe-M ϕ -ok általánosan több apoptotizáló timocitát internalizáltak, ezeknek a M ϕ -oknak egy jelentős hányada pedig kifejezetten erős zöld fluoreszcens jelet adott, ami még több timocita bekebelezésére utal (MFI₂ szerint az átlagos fluoreszcencia intenzitás közel kétszeresére nőtt MFI₁-hez viszonyítva). A Pe-M ϕ -ok tehát intenzívebb patogén- és apoptotizáló saját sejt felvételre képesek MSC-k jelenlétében.



15. ábra: Peritoneális Mφ-ok (Pe-Mφ) élesztő- és apoptotizáló timocita fagocitózisa MSC-k jelenlétében. 10^6 peritoneális exudátum sejtéből nyert Pe-Mφ-ot kezeltünk 2×10^4 MSC-vel és/vagy 10 µg/ml bakteriális lipopoliszachariddal (LPS). (A) 48 órás inkubáció után 5×10^7 hőinaktivált élesztősejt adtunk a kultúrákhoz, majd egy órás fagocitózis után az élesztősejteket felvett Mφ-okat tartalmazó kultúrákat fixáltuk, majd Giemssal festettük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk. (B) A bekebelezett élesztősejteket a Giemsa-festett kultúrák fénymikroszkópos képei alapján számoltuk meg kezelésenként 100-100 Mφ figyelembe vételével. Az eredményeket átlag \pm SE formában mutatjuk. (C-D) 10^6 peritoneális exudátum sejtéből nyert Pe-Mφ tartalmú kultúrákhoz 5×10^5 CFSE-jelölt apoptotizáló timocitát és 2×10^4 mCherry fluoreszcens fehérjét expresszáló MSC-t adtunk, majd 48 órán át inkubáltuk a sejteket. Az eredményeket (C) fluoreszcens mikroszkóppal, valamint (D) áramlási citométerrel vizsgáltuk. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a zöld hisztogramok a CFSE fluoreszcens jelét mutatják. Az MFI értékek (MFI₁ és MFI₂) az adott tartományba (M1 vagy M2) eső pozitív sejtek közepes fluoreszcencia értékeit jelölik. Egy reprezentatív mérés eredményét mutatjuk.

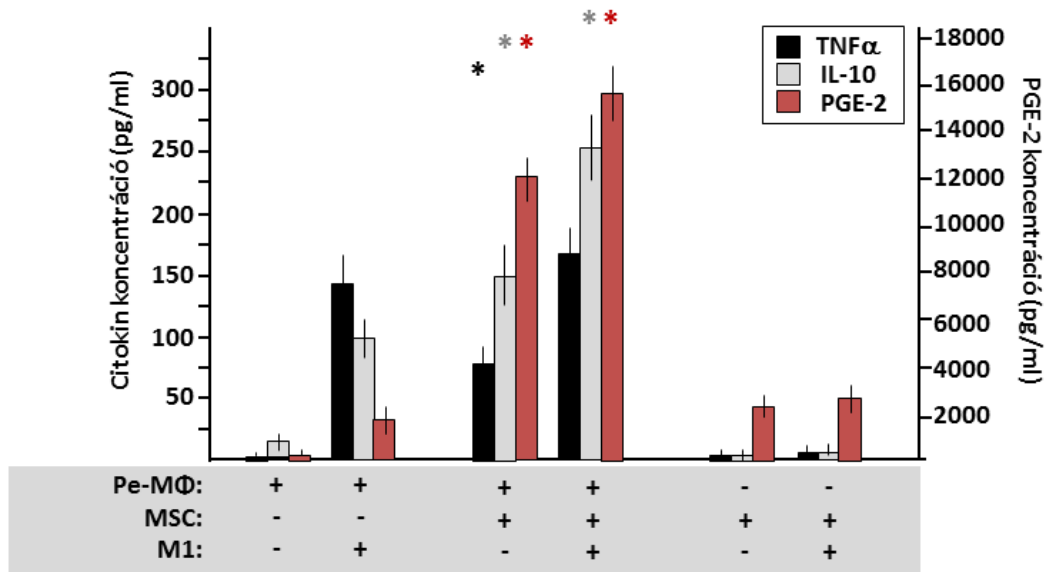
Azt is szeretnénk volna tudni, hogy milyen változások zajlanak le a M ϕ -ok citokintermelésében, miközben a kétféle sejtet (élesztőt vagy apoptotizáló timocitát) felveszik. A változások követésére a TNF α (egy gyulladásgátló citokin), az IL-10 (egy gyulladásgátló citokin), és a PGE-2 (az MSC-T-sejt kölcsönhatásban általunk már vizsgált immunmoduláló lipid mediátor) mennyiségét mértük a felülúszókban. Ahogyan a 16. ábrán is látható, a Pe-M ϕ -ok élesztő hozzáadására jelentős mennyiségű TNF α -t termeltek, ami apoptotizáló timociták jelenlétében teljesen elmaradt. Az MSC-k jelenléte mind a nyugvó, mind az élesztővel vagy apoptotizáló timocitával aktivált Pe-M ϕ -ok felülúszóiban erőteljesen növelte az IL-10 mennyiségét, ezzel párhuzamosan a PGE-2 szintje is erősen megemelkedett. Megfigyelhettük továbbá, hogy az MSC-k önmagukban apoptotizáló timociták hatására sem termeltek számottevő mennyiségű TNF α -t, IL-10-et vagy PGE-2-t. Eredményeinkből kiderül, hogy az MSC-k jelenléte még patogénnel vagy apoptotizáló saját sejtrel történő M ϕ -aktivációkor is gyulladásgátló citokinprofilt hoz létre a Pe-M ϕ kultúrákban, és a PGE-2 az IL-10 mennyiségével együtt mozogva valószínűleg fontos mediátora ennek a folyamatnak.



16. ábra: Peritoneális Mφ-ok (Pe-Mφ) citokintermelése MSC-k jelenlétében élesztő- és apoptotizáló timocita fagocitózisa után. 10^6 peritoneális exudátum sejtől nyert Pe-Mφ-ot kezeltünk 5×10^7 hőinaktivált élesztősejttel, 5×10^5 apoptotizáló timocitával és/vagy 2×10^4 MSC-vel. Az élesztősejteket és a timocitákat egy óra elteltével lemostuk, majd 48 órán át inkubáltuk a kultúrákat. A felülúszókból ELISA segítségével mértük meg a TNF α , IL-10 és a PGE-2 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3. A színes csillagok az adott oszlopok szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseit jelölik MSC-t nem tartalmazó kontrolljaikhoz képest.

4.3.3. A gyulladáshoz vezető környezet hatása a peritoneális makrofágok és MSC-k kölcsönhatására

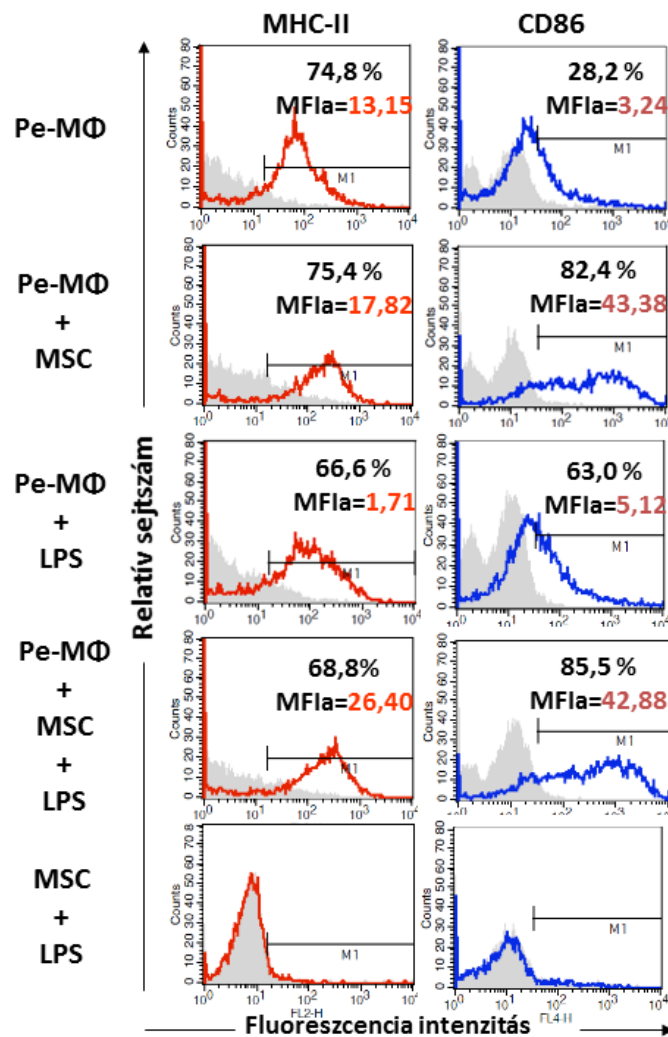
A gyulladáshoz vezető (M1) makrofágok polarizációjának két fontos induktora az LPS és az IFN γ (71), így kíváncsiak voltunk, hogy az ilyen módon aktivált M ϕ -ok hogyan reagálnak az MSC-k közelségére. A Pe-M ϕ -MSC kokultúrákat M1 indukciós koktétallal (100 ng/ml LPS-t + 10 ng/ml IFN γ -t tartalmazó médium) kezeltük. Az M1-indukció hatására a csak Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban gyulladáshoz vezető profil kialakulását figyelhettük meg (17. ábra), amit a TNF α és IL-10 emelkedett szintje jelez erőteljes TNF α -dominanciával. Az MSC-k viszont önmagukban még M1 induktív környezetben sem termeltek jelentős mennyiségű TNF α -t és IL-10-et. Kokultúrákban az MSC-k jelenléte mind a normál médiumban, mind az M1-induktív környezetben inkubált Pe-M ϕ -oknál IL-10-domináns citokintermelést eredményezett, miközben az M1-indukció alatt kialakuló TNF α -termelést nem befolyásolta. Tehát az MSC-k a Pe-M ϕ -ok IL-10-termelésének fokozásán keresztül képesek ellensúlyozni az általunk használt gyulladáshoz vezető profilt indukáló faktorok hatását. A PGE-2 ebben a kísérleti elrendezésben is az IL-10 szintjének emelkedését követte a kokultúrákban, ami megint csak arra utal, hogy fontos mediátora lehet a kialakuló Pe-M ϕ -MSC kölcsönhatásnak.



17. ábra: Peritoneális Mφ-ok (Pe-Mφ) citokintermelése MSC-k jelenlétében M1 induktív környezetben. 10^6 peritoneális exudátum sejtéből nyert Pe-Mφ-ot kezeltünk 100 ng/ml LPS + 10 ng/ml IFN γ -t tartalmazó M1 induktív médiummal és/vagy 2×10^4 MSC-vel. A felülúszókból ELISA segítségével mértük meg a TNF α , IL-10 és a PGE-2 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3. A színes csillagok az adott oszlopok szignifikáns ($p < 0,05$) eltéréseit jelölik MSC-t nem tartalmazó kontrolljaikhoz képest.

4.3.4. Az MSC-k hatása a makrofágok antigénbemutató képességére

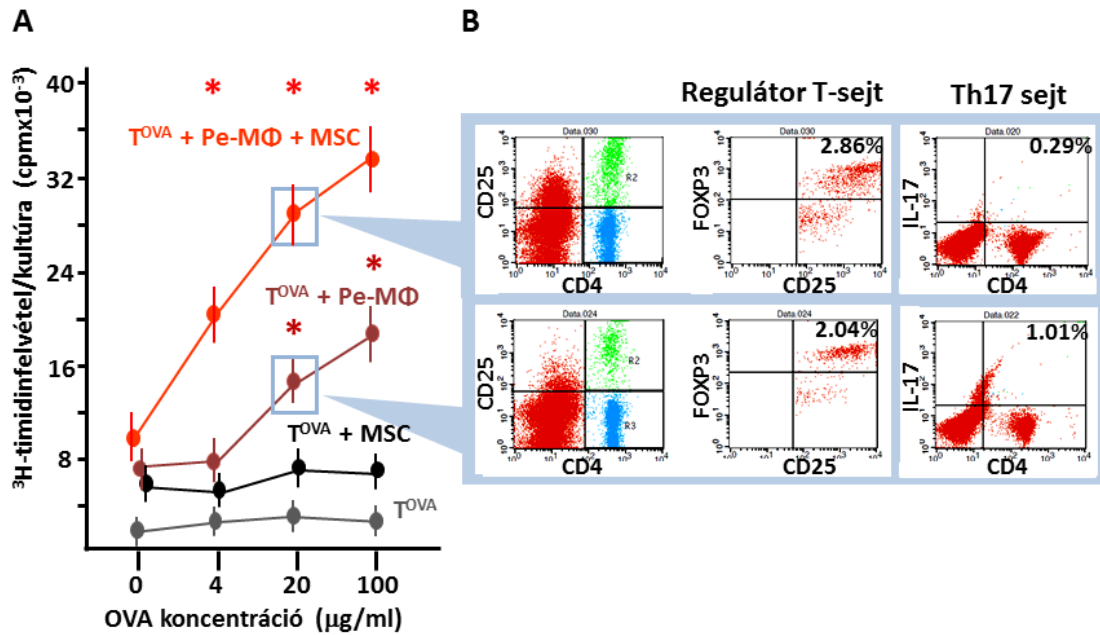
A Pe-Mφ-ok antigénbemutató képességét először LPS-sel történő aktiváció során követtük nyomon. Eredményeink szerint a Pe-Mφ-ok LPS-stimulusra nagyobb százalékban váltak antigénprezentálásra alkalmas sejtekké, egyrészt az MHC-II⁺ és CD86⁺ sejtek száma dúsult a kultúrákban, másrészt a molekulák mennyisége is nőtt a sejtek felszínén, amit a közepes fluoreszcencia intenzitás arányok (MFIa) növekedése jelzett (18. ábra). MSC-k hatására mind az aktiválatlan, mind az LPS-sel stimulált Pe-Mφ-ok felszínén nagymértékben dúsult az MHC-II és CD86 molekula. Az MHC-II molekula esetében ez közel kétszeres, míg a CD86 kostimulátor molekula esetében közel tízszeres növekedést jelent az MFIa értékek alapján. Tehát az MSC-k jelenléte LPS-től független módon mind a „nyugvó”, mind az aktivált Pe-Mφ-ok esetében intenzívebb antigénbemutató képességet tesz lehetővé.



18. ábra: Az MSC-k hatása a peritoneális Mφ-ok (Pe-Mφ) MHC-II és CD86 expressziójára. 10^6 peritoneális exudátum sejtéből nyert Pe-Mφ-hoz 2×10^4 MSC-t és/vagy 10 µg/ml LPS-t adtunk, majd a sejteket 48 óráig inkubáltuk. A Pe-Mφ-ok antigénprezentációs képességének vizsgálatához a felszínükön kifejezett MHC-II és CD86 kostimulátor molekula mennyiségét mértük áramlási citometriával. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a színes hisztogramok az adott sejtfelszíni marker fluoreszcens jelét mutatják (piros: fikoeritrinnel jelölt antitest; kék: allofikocianinnal jelölt antitest). A százalékos érték az M1 tartományba eső adott markerre pozitív sejtek arányát mutatja. Az MFIa értékek a közepes fluoreszcencia intenzitások arányát mutatják, amit a következőképpen számoltunk ki: az adott marker fluoreszcens jelére kapott közepes fluoreszcencia intenzitás értéket elosztottuk az izotípuskontroll jelére kapott átlagos fluoreszcencia intenzitás értékkel. Egy reprezentatív mérési eredményét mutatjuk.

A Pe-M ϕ -ok antigénprezentáló képességét ovalbumin- (OVA-) specifikus T-sejtek osztódásának mérésén keresztül vizsgáltuk tovább az OVA különböző koncentrációinak (4 μ g/ml; 20 μ g/ml; 100 μ g/ml) jelenlétében. Eredményeink szerint már 20 mg/ml-es OVA-koncentrációnál jelentősen fokozódott az OVA-specifikus T-sejtek osztódása a Pe-M ϕ kokultúrákban (19.A ábra), tehát a Pe-M ϕ -ok hatékony antigénprezentáló sejteknek bizonyultak. Az MSC-k ugyanakkor semmilyen OVA koncentráció mellett nem fokozták az OVA-specifikus T-sejtek osztódását, tehát – az elvártak szerint (28) – nem funkcionálnak professzionális antigénbemutató sejtekként. Az OVA-specifikus T-sejtek osztódása azokban a kultúrákban volt a legjelentősebb, amikben az OVA hozzáadásakor Pe-M ϕ -ok és MSC-k is jelen voltak, ilyenkor a T-sejtek dózifüggő módon az OVA egyre magasabb koncentrációira egyre kifejezettebb osztódással reagáltak. Az MSC-k jelenléte tehát nagymértékben fokozta a Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességét.

Kíváncsiak voltunk, hogy eközben hogyan alakul a regulátor T-sejtek és a gyulladáshoz vezető folyamatokban szerepet játszó (82) 17-es típusú helper T-sejtek (Th17) aránya. Azt tapasztaltuk, hogy az MSC-eket és Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban a CD4⁺CD25⁺ sejtek között $2 \pm 0,2\%$ -ról $2,9 \pm 0,3\%$ -ra nőtt a regulátor (FOXP3⁺) T-sejtek száma a csak Pe-M ϕ -okat tartalmazó kultúrákhoz képest (19.B ábra). Ezzel párhuzamosan a Th17-es sejtek aránya $1 \pm 0,1\%$ -ról $0,32 \pm 0,06\%$ -ra csökkent. Az MSC-k tehát egyrészt fokozzák az immunválaszt szabályozó CD4⁺ sejtek regulátor T-sejt irányú differenciálódását, ugyanakkor gátolják az erősen autoreaktív, gyulladáshoz vezető Th17-es sejtek kialakulását.

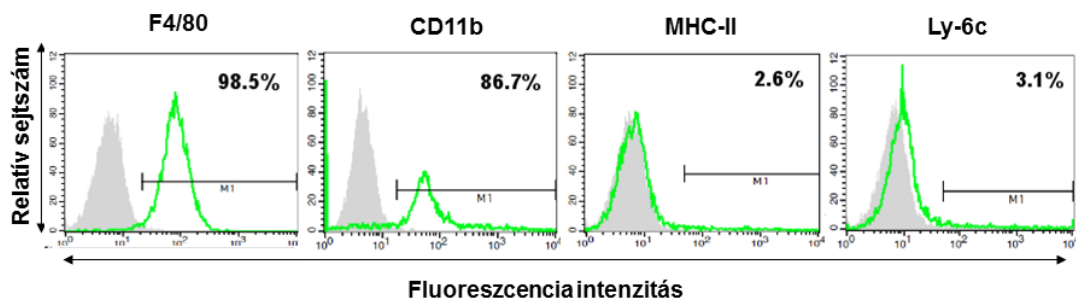


19. ábra: Az MSC-k hatása a peritoneális Mφ-ok (Pe-Mφ) antigénprezentálóképességére. 4×10^3 MSC-t, 2×10^5 PEC-ből nyert Pe-Mφ-ot, 2×10^5 *in vivo* előaktivált T-sejtet (T^{OVA}), valamint ovalbumint (OVA) (az ábrán jelzett koncentrációban) mértük össze, majd a kultúrákat 5 napig inkubáltuk. Ezután (A) ³H-timidint adtunk a kultúrákhoz, és folyadékszintillátorral mértük a percenkénti beütésszámot (cpm). Az ovalbuminnal előaktivált T-sejtek osztódásának mértékét átlag ± SD formában mutatjuk, n=3. A piros csillagok a pirossal jelölt kezelések szignifikáns (p<0,05) eltéréseit jelölik a bordóval jelölt kezelésekhez képest. A bordó csillagok a bordóval jelölt kezelések szignifikáns (p<0,05) eltéréseit jelölik a feketével jelölt kezelésekhez képest. (B) A T-sejtek alpopulációit az előbb leírt sejtarányban és 20 mg/ml OVA koncentrációnál vizsgáltuk. 4 nap inkubáció után a T-sejteket izoláltuk, majd a regulátor T-sejteket és a 17-es típusú helper T-sejteket (Th17) Mouse Regulatory T Cell Staining Kit, valamint a Mouse Th1/Th2/Th17 Phenotyping Kit segítségével jelöltük és áramlási citometria segítségével mértük a pozitív sejtek arányát a fluoreszcencia-intenzitások alapján. Egy reprezentatív mérés eredményét mutatjuk.

4.4. Mesenchymalis őssejtek és „naiv” makrofágok kölcsönhatásának vizsgálata

4.4.1. A csontvelői eredetű makrofágok karakterizálása

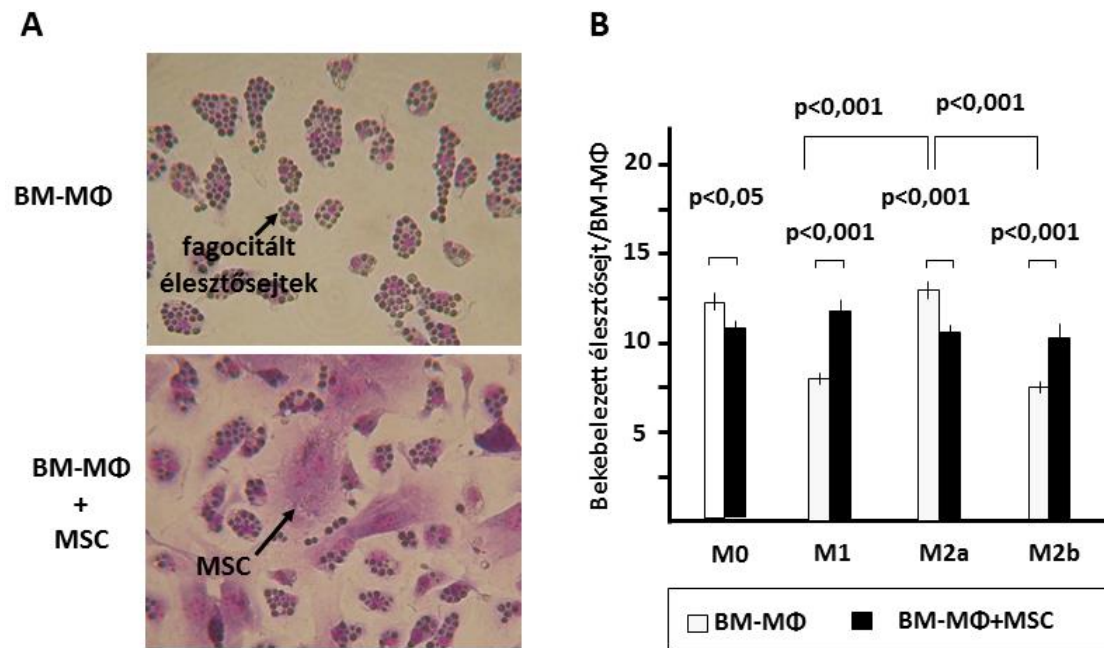
Az MSC-k és M ϕ -ok kölcsönhatását szeretnénk volna behatóbban vizsgálni. Ehhez arra volt szükségünk, hogy a Pe-M ϕ -oknál tisztább, homogénebb és aktiválatlan sejtekkel dolgozzunk. 4-8 hetes C57Bl/6-os egerek csontvelőiből preparáltunk magas sejteket, amikből M-CSF jelenlétében 7 nap alatt csontvelői M ϕ -okat (BM-M ϕ) differenciáltattunk (lásd Módszerek fejezet). Ezzel a módszerrel $98 \pm 0,6\%$ -os tisztasággal tudunk létrehozni naiv, aktiválatlan (MHC-II⁻Ly-6c⁻) F4/80-at kifejező érett M ϕ -okat (F4/80⁺CD11b⁺) (20. ábra).



20. ábra: Csontvelői M ϕ -ok sejtfelületi markereinek vizsgálata áramlási citométerrel. Az F4/80 mint érett M ϕ marker, a CD11b mint monocita/M ϕ marker, valamint az MHC-II és Ly-6c mint aktivációs markerek expresszióját vizsgáltuk egér csontvelői sejtekből makrofág kolóniastimuláló faktor hatására frissen differenciálódott M ϕ kultúrákban. A szürke hisztogramok az izotípus kontroll fluoreszcenciáját, míg a zöld hisztogramok az adott sejtfelületi marker fluoreszcens jelét mutatják (zöld: fluorescein-izotiocianáttal jelölt antitest). A százalékos érték az M1 tartományba eső adott markerre pozitív sejtek arányát mutatja. Egy reprezentatív mérés eredményét mutatjuk.

4.4.2. A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok élesztő-fagocitózisának változása MSC-k jelenlétében

Ezek után a BM-M ϕ -ok fagocitotikus képességét vizsgáltuk. Nyugvó, naiv (M0) állapotban vagy speciális induktorok segítségével a három főbb, ismert M ϕ aktivációs profilba polarizálva (M1 - gyulladáscsökkentő, M2a - sebgyógyító és M2b - regulátor) mértük a BM-M ϕ -ok élesztő-fagocitózisát. A nyugvó sejtek önmagukban átlagosan 12 élesztősejtet vettek fel (21. ábra), ami M2a induktív környezetben sem változott számottevően. Az M1-es és M2b M ϕ -ok viszont jelentősen kevesebb élesztőt tudtak bekebelezni. Az általunk használt BM-M ϕ -ok tehát mind nyugvó, mind aktivált állapotban rendelkeztek fagocitotikus képességgel, vagyis funkcionális M ϕ -oknak tekinthetők. Az MSC-k jelenléte különbözőképpen befolyásolta az egyes aktiváltsági állapotokban lévő BM-M ϕ -ok élesztő-fagocitózisát: M0 és M2a állapotokban csökkentette, míg M1 és M2b aktivációs környezetben jelentősen növelte annak mértékét.



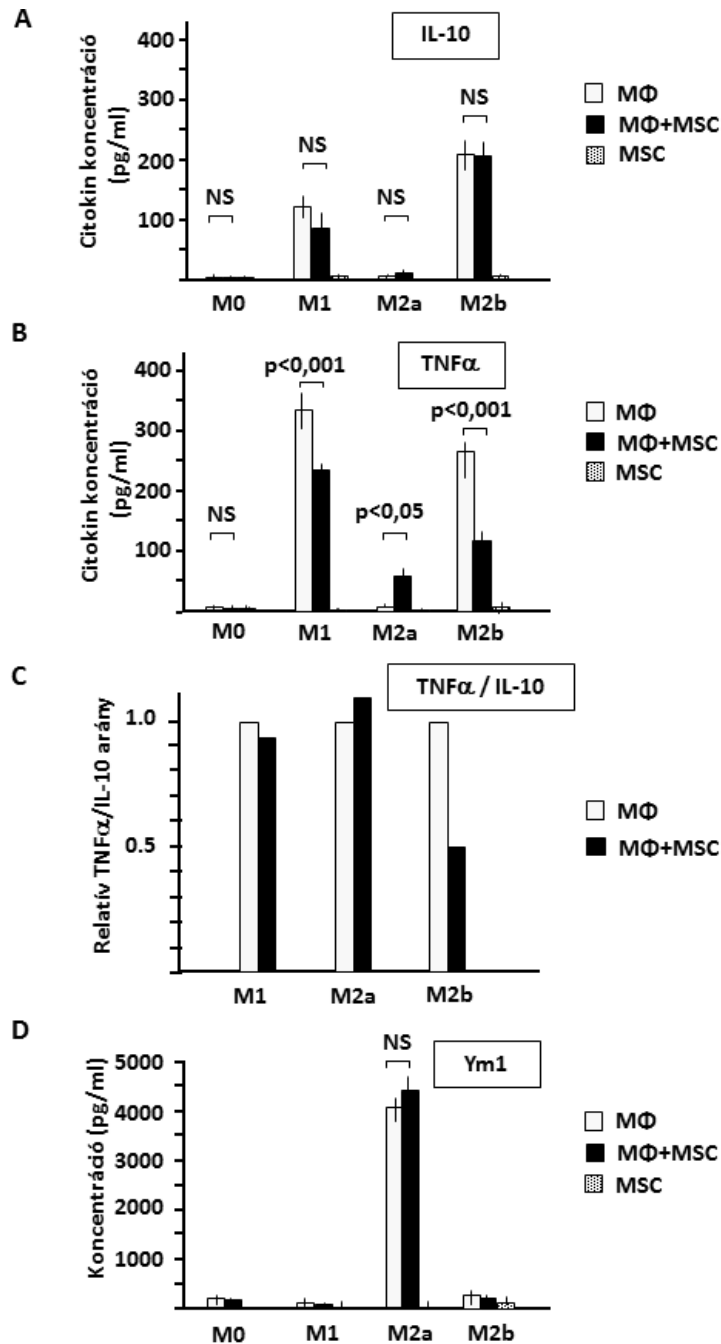
21. ábra: Különböző aktivációs állapotú csontvelői M ϕ -ok (BM-M ϕ) élesztő-fagocitózisa MSC-k jelenlétében. 2×10^5 csontvelői sejtből differenciáltatott BM-M ϕ -ot kezeltünk M1, M2a vagy M2b induktív médiummal 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában. 48 órás inkubáció után a kultúrákhoz 5×10^7 hőinaktivált élesztősejtet adtunk. (A) Egy órás fagocitózis után az élesztősejteket felvett M ϕ -okat tartalmazó kultúrákat fixáltuk, majd Giemssal festettük és fénymikroszkóppal vizsgáltuk. (B) A bekebelezett élesztősejteket a Giemsa-festett kultúrák fénymikroszkópos képei alapján számoltuk meg kezelésenként 100-100 M ϕ figyelembe vételével. Az eredményeket átlag \pm SE formában mutatjuk.

4.4.3. A különböző irányokban aktivált csontvelői makrofágok citokintermelése MSC-k jelenlétében

A fagocitotikus képesség vizsgálatával párhuzamosan szeretnénk tudni, a különböző induktorok valóban kialakítják-e a megfelelő M ϕ -polarizációs állapotokat (M1, M2a és M2b), illetve hogy az MSC-k hogyan befolyásolják az indukciókor kialakuló citokinprofil. Ezt a TNF α , IL-10 és a kitináz-3-szerű fehérje 3 (Ym1) – rendszerünkben a M ϕ -ok által termelt – faktorok sejtfelülészókban mérhető szintjének vizsgálatán keresztül szeretnénk tudni bizonyítani. Eredményeink szerint a naiv M0

M ϕ -ok önmagukban nem termeltek számottevő mennyiségű IL-10-et és TNF α -t (22.A és B ábra). M1-es és M2b aktiváció során viszont jelentős IL-10- és TNF α -szinteket mérhettünk a felülúszókban. M2b állapotban magasabb IL-10 és alacsonyabb TNF α termelés volt jellemző, ami megfelel a gyulladásgátló, regulátor M ϕ -profilnak. M1-es aktiválás alatt ez az arány pont fordított, tehát a gyulladáscitokin javára eltol, ami szintén megfeleltethető a gyulladáscitokin M1 makrofág profillal. Az M2a M ϕ -ok a naiv M0 sejtekhez hasonlóan nem termeltek jelentős mennyiségű IL-10-et és TNF α -t, azonban – az erre az aktivációs állapotra jellemzően – Ym1-termelésük kiemelkedő volt (22.D ábra). Eredményeink szerint tehát sikeresen hoztuk létre M1, M2a és M2b aktivációs profilba tartozó BM-M ϕ -okat.

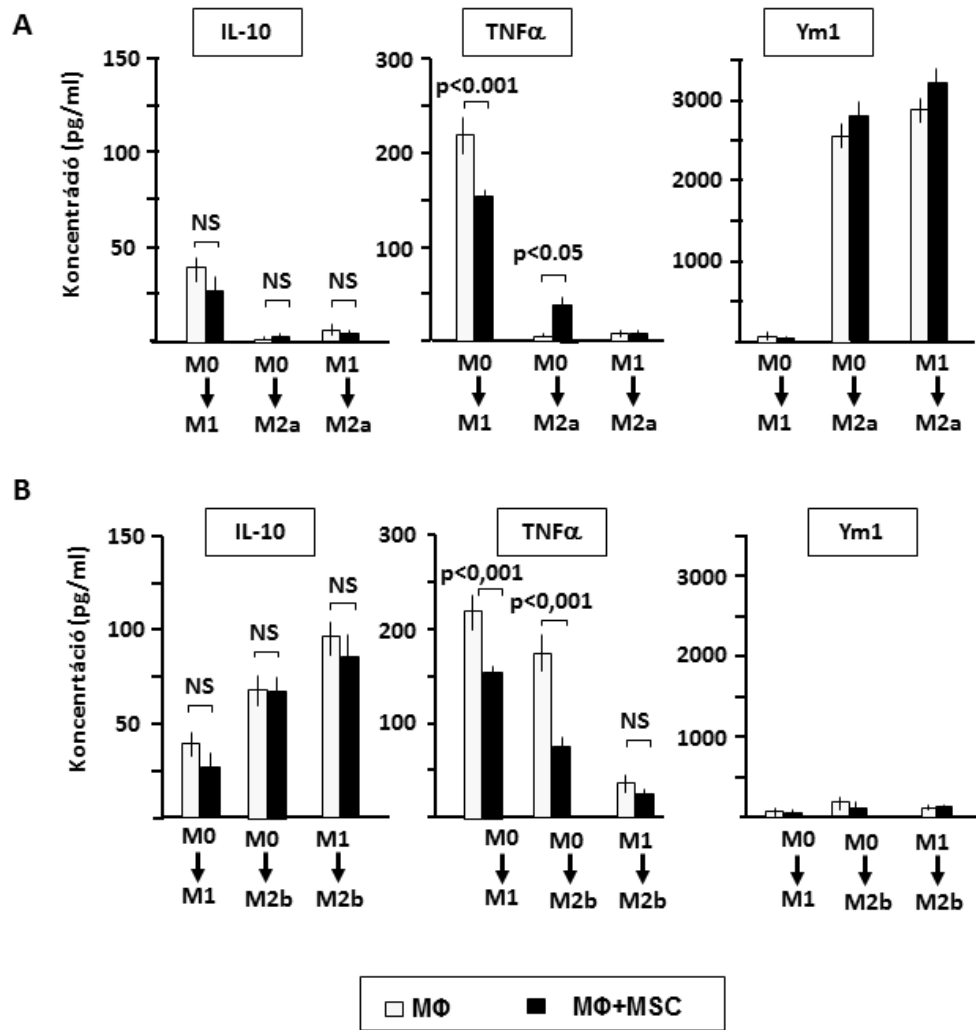
Mikor a különböző indukciók során MSC-k is kerültek a BM-M ϕ -ok mellé, a TNF α szintjének befolyásolásával fejtették ki a hatásukat (22. ábra). M1 és M2b aktivációs környezetben jelentősen csökkentették, míg M2a indukció alatt növelték a citokin felülúszókban mérhető szintjét, miközben az IL-10 vagy a Ym1 mennyiségét nem befolyásolták. Ezzel M1 és főként M2b állapotban a citokinarányt az IL-10 javára tolták el (22.C ábra), tehát az MSC-k jelenléte az ilyen induktív környezetekben gyulladásgátló M ϕ -profil kialakulásának kedvez. Kísérleti elrendezésünkben az MSC-k egyik általunk vizsgált faktor termelésére sem voltak képesek.



22. ábra: Különböző csontvelői M ϕ alpopulációk citokintermelése MSC-k jelenlétében. 2×10^5 csontvelői sejtéből differenciáltatott „naiv” M0 M ϕ -ot kezeltünk M1, M2a vagy M2b induktív médiummal 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában, majd 48 órán át inkubáltuk a kultúrákat. A felülírókból ELISA segítségével mértük meg (A) az IL-10, (B) a TNF α , és (D) a Ym1 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns. (C) A relatív TNF α /IL-10 arányt a csak M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban mért TNF α /IL-10 arányokhoz (értékét egynek véve) viszonyítva adtuk meg.

4.4.4. A csontvelői eredetű makrofágok repolarizációs képessége

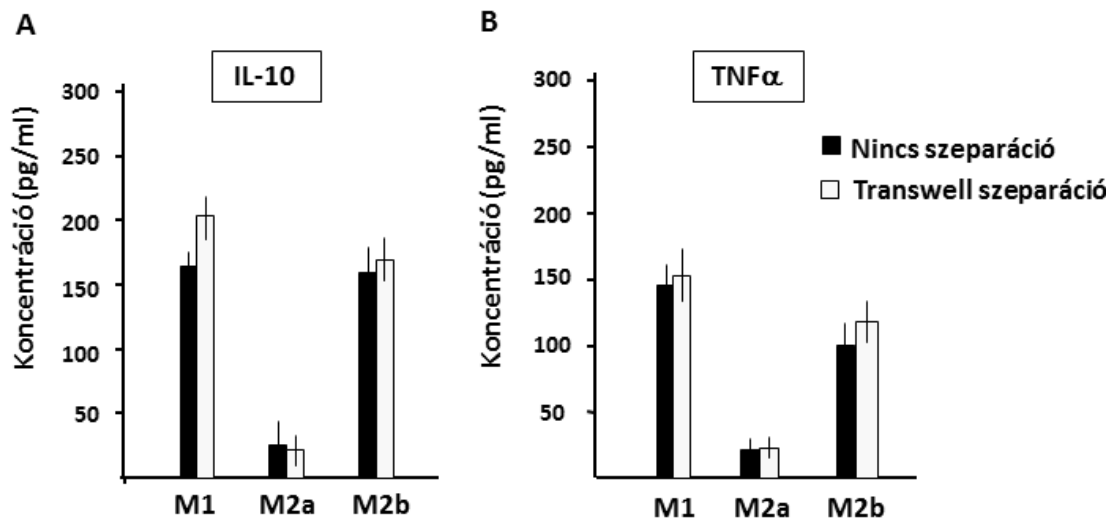
Szerettük volna kideríteni, hogy a M ϕ -ok egymás után többször is képesek-e különböző polarizációs állapotokba jutni, illetve hogy az MSC-k képesek-e befolyásolni az így létrejövő M ϕ -okat. Ehhez a naiv BM-M ϕ -okat először M1, majd M2a vagy M2b irányba aktiváltuk, a különböző indukciós lépéseknél pedig MSC-eket adtunk a kultúrákhoz. Az M1-es állapotból M2a-ba vagy M2b-be polarizált M ϕ -ok kultúráinak citokintermelését naiv BM-M ϕ -okból kialakuló M2a és M2b M ϕ -ok citokintermelésével is összehasonlítottuk. Ahogyan a 23. ábra is mutatja, a BM-M ϕ -ok M1-es stimuláció hatására jelentős mennyiségű IL-10-et és TNF α -t termeltek. Ezek után az M1-ből M2a irányba repolarizált BM-M ϕ -oknál kialakult az M2a sejtekre jellemző alacsony IL-10 és TNF α termelés, és a magas Ym1 szintézis (23.A ábra). Az így létrejövő M2a M ϕ -ok megegyeztek a naiv BM-M ϕ -okból létrehozott M2a M ϕ -okkal – legalábbis az általunk vizsgált három faktor tekintetében. Az M1-ből M2b irányba történő polarizáció során szintén létrejött az M2b M ϕ -okra jellemző citokinprofil: a TNF α /IL-10 arányban a TNF α túlsúlyát az IL-10 dominanciája váltotta fel (23.B ábra). Az így kialakuló citokinarány hasonló volt a naiv BM-M ϕ -okból polarizált M2b sejtek citokintermeléséhez, de az IL-10 szintje ez esetben erősebben dominált a felülúszókban. Ym1-termelődés az M1 és M2b állapotokra jellemzően sem az M0 \rightarrow M1 \rightarrow M2b, sem az M0 \rightarrow M2b indukciók során nem volt jelentős. Eredményeink szerint tehát a BM-M ϕ -ok gyulladásszerű aktivációt (M1) követően átrepolarizálhatóak M2a és M2b irányokba. Érdekes különbség, hogy míg az MSC-k a naiv sejtekből létrehozott és különféleképpen aktivált BM-M ϕ -ok citokintermelését a TNF α szabályozásán keresztül befolyásolták, az előzőleg M1 irányba polarizált M ϕ -okból létrejövő sejteknél sem M2a, sem M2b irányban nem tudtak hatni a kialakuló citokinprofilokra.



23. ábra: Az M1 Mφ-ok átpolarizálhatósága M2a vagy M2b Mφ-profilokba. (A és B) 2×10^5 csontvelői sejtéből differenciáltatott „naiv” M0 Mφ-ot kezeltünk M1, M2a vagy M2b induktív médiummal 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában, majd 48 órán át inkubáltuk a kultúrákat. (A) M1→M2a és (B) M1→M2b tranzíció során az M1 irányba 48 órán át előpolarizált Mφ-okat kétszeri Hanks-féle oldattal történő mosás után M2a vagy M2b induktív médiummal kezeltük 2×10^4 MSC jelenlétében vagy hiányában. 48 órás inkubáció után felülúszókat gyűjtöttünk, majd ELISA segítségével mértük a termelt IL-10, TNFα és Ym1 mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns.

4.4.5. A prosztaglandin-E2 szerepe a csontvelői eredetű makrofágok és MSC-k kölcsönhatásában

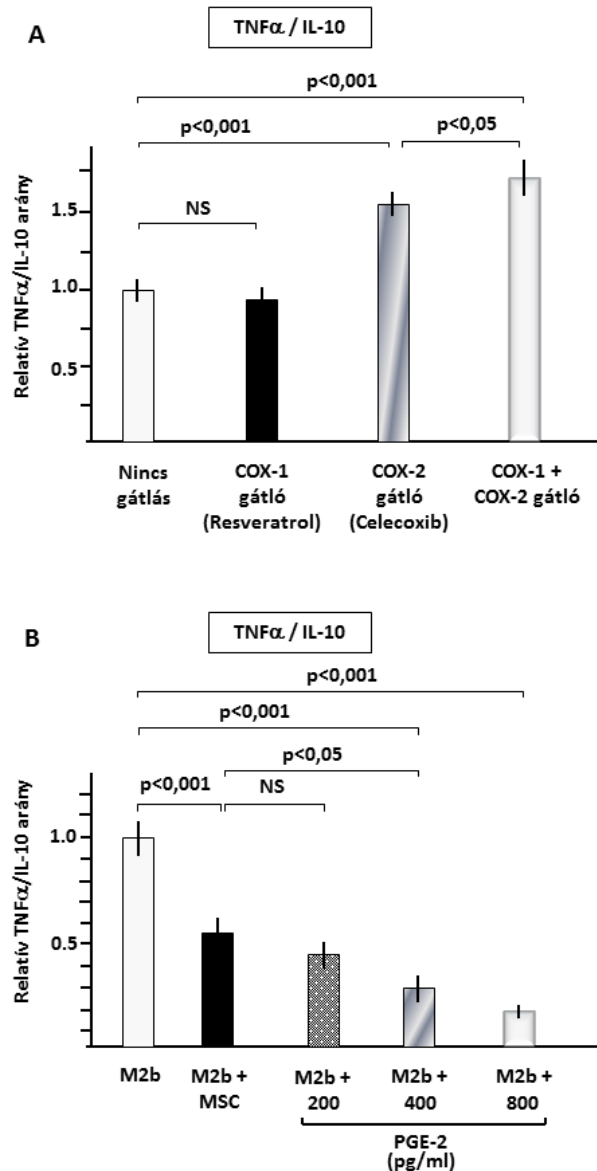
Szerettük volna tudni, hogy hogyan képesek befolyásolni az MSC-k a TNF α termelődését, és így a TNF α /IL-10 arány alakulását a BM-M ϕ kultúrákban. Először arra voltunk kíváncsiak, hogy döntően szolubilis mediátorok vagy sejt-sejt kontaktus tehető-e felelőssé a hatásért. Ehhez a BM-M ϕ -okat és MSC-eket féligáteresztő hártával választottuk el egymástól az M1, M2a és M2b indukció során. Kiderült, hogy a kokultúrákban mérhető IL-10 és TNF α arányok nem változtak meg a térbeli szeparálás hatására (24. ábra), ami arra mutatott rá, hogy döntően szolubilis faktorok felelnek az MSC-k hatásáért.



24. ábra: A sejtkontaktus szerepe az MSC-k és csontvelői M ϕ -ok kölcsönhatásában. 2×10^5 csontvelői sejtől differenciáltatott M ϕ -ot kezeltünk M1, M2a vagy M2b induktív médiummal 2×10^4 MSC jelenlétében úgy, hogy az MSC-eket direkt vagy $1 \mu\text{m}$ pórusátmérőjű féligáteresztő hártával elválasztva helyeztük a kultúrákba. 48 órás inkubáció után felülészókat gyűjtöttünk, majd ELISA segítségével mértük a termelt (A) IL-10 és (B) TNF α mennyiségét. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, $n=3$.

Irodalmi adatok alapján (51, 83), és az általunk Pe-M ϕ -ok vizsgálatánál tapasztalt eredmények szerint az MSC–M ϕ kölcsönhatásban potenciálisan szerepet

játszó egyik mediátor a PGE-2 lehet. Ennek vizsgálatára az M2b M ϕ -indukciót választottuk modellrendszerként, mivel az MSC-k ebben az aktivációs állapotban hatottak a legerősebben a BM-M ϕ -ok citokintermelésére. Az M2b indukció során a PGE-2 szintéziséért felelős fő enzimek (COX-1 és COX-2) gátlószereit (Resveratrol és Celecoxib) adtuk a BM-M ϕ -MSC kokultúrákhoz. Eredményeinkből kiderült, hogy a COX-2 enzim gátlásakor a TNF α /IL-10 arányban jelentős TNF α -dominancia alakult ki a gátlószert nem tartalmazó kontroll kokultúrákhoz képest (25.A ábra), míg a COX-1 enzim egyedüli gátlásakor ilyet nem figyelhettünk meg. A vizsgálatot M1-es induktív környezetben is megismételtük, ahol hasonló eredményeket kaptunk (nem mutatjuk). A PGE-2 tehát a COX-2 enzimen keresztül termelődve járulhat hozzá ahhoz, hogy MSC-k jelenlétében a BM-M ϕ -ok citokintermelésében az IL-10 dominanciája alakulhat ki. A PGE-2 szerepének további bizonyítására a MSC-k hatását külső forrásból hozzáadott PGE-2 különböző koncentrációival (200 pg/ml; 400 pg/ml; 800 pg/ml) helyettesítettük M2b induktív környezetben. A PGE-2 – már 200 pg/ml-es koncentrációban is – képes volt imitálni az MSC-k hatását, és dóziszfüggően toltta el a TNF α /IL-10 arányát az IL-10 javára a M ϕ -kultúrákban (25.B ábra). Eredményeink alapján bebizonyosodott, hogy a PGE-2 fontos szerepet játszik az MSC–BM-M ϕ interakcióban.



25. ábra: A prosztaglandin-E2 (PGE-2) szerepe az M2b M ϕ -ok által termelt TNF α /IL-10 arányának kialakításában. (A) 2×10^5 csontvelői sejtéből differenciáltatott M ϕ és 2×10^4 MSC kokultúráit kezeltünk M2b induktív médiummal 10 μ M Resveratrol (COX-1) és/vagy 10 μ M Celecoxib (COX-2) jelenlétében 48 órán keresztül. (B) 2×10^5 csontvelői sejtéből differenciáltatott M ϕ -ot kezeltünk M2b induktív médiummal, majd 2×10^4 MSC-vel, vagy az ábrán feltüntetett mennyiségű PGE-2-vel kezeltük őket 48 órán át. A felülírókból ELISA segítségével mértük a termelt TNF α és IL-10 mennyiségét. A relatív TNF α /IL-10 arányt (A) a gátlószereket nem tartalmazó M ϕ -MSC kokultúrákban vagy (B) a csak M ϕ -okat tartalmazó kultúrákban mért TNF α /IL-10 arányokhoz (értékét egynek véve) viszonyítva adtuk meg. Az eredményeket átlag \pm SD formában mutatjuk, n=3, NS: nem szignifikáns.

5. MEGBESZÉLÉS

Munkánk során sikeresen hoztunk létre egér csontvelői sejtekből olyan sejttenyészeteket, amik a tenyésztőedény falához letapadva nőttek, fibroblasztszerű morfológiát mutattak, hordozták az egér MSC-kre jellemző sejtfelszíni markereket, míg vérképző sejtekre jellemző markerekre negatívak voltak, valamint képesek voltak zsír és csont irányba differenciálódni, tehát mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.

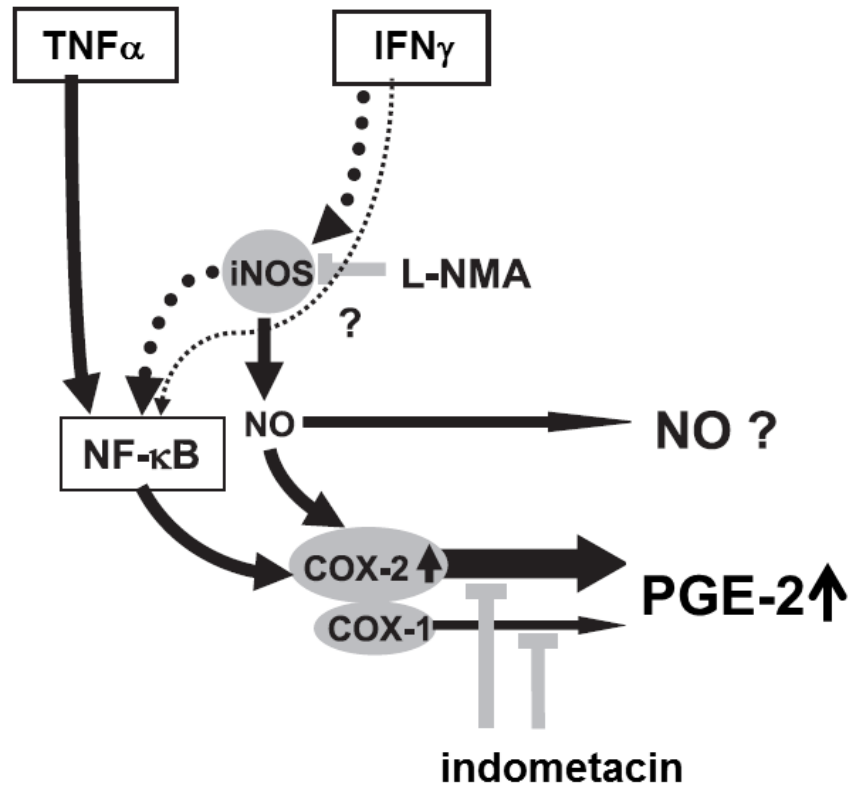
Terápiás szempontból kiemelkedő fontosságú, hogy az MSC-k hogyan képesek befolyásolni a különböző gyulladásos és/vagy autoimmun kórképekre jellemző immunsejteket. Az általunk felhasznált MSC-k hatékonyan gátolták mind a mitogén, mind az alloantigén-indukált T-sejtek osztódását, ez összhangban áll az eddigi szakirodalmi adatokkal (29, 84, 85) és laborunk korábbi eredményeivel, ahol nem csak a csontvelői, de számos más szervből izolált egér MSC-k immunszuppresszív aktivitását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze *in vitro* rendszerekben, és *in vivo* streptozotocin-indukált diabétesz modellben is (86). A szuppresszív hatás mögött húzódo mechanizmus felderítésére az IDO enzim hatását és a prosztaglandin jelátviteli út egyes elemeit vizsgáltuk. Eredményeink szerint az IDO nem játszik szerepet az egér MSC-k T-sejtosztódást szabályzó aktivitásában, amit a szakirodalmi adatok többsége is megerősít, miszerint IDO-expressziót indukáló anyagok jelenlétében – a humán MSC-kkel ellentétben – az egér MSC-k elenyésző mennyiségű IDO-t termelnek, és immunszuppresszív aktivitásukban inkább az iNOS jut nagyobb szerephez (87, 88).

A PGE-2 egy kis molekulású lipíd mediátor. Az MSC-k immunmoduláló hatásában betöltött szerepét már számos munka bizonyította (83, 89), az őssejtek PGE-2-termelése mögött húzódo mechanizmus azonban máig nem ismert pontosan, sok egymásnak ellentmondó eredmény született: a különböző vizsgálati rendszerekben hol a sejt-sejt kontaktus (90, 91), hol szolubilis faktorok szerepét mutatták ki (92, 93). A PGE-2 arachidonsavból történő kialakulását a ciklooxygenáz enzimek két izoformája, a COX-1 és COX-2 katalizálja. Normál fizioiogiás állapotban a PGE-2 szintézisét a konstitutívan kifejeződő COX-1 izoforma biztosítja, míg gyulladásos állapotban az indukálható COX-2 segítségével nagy mennyiségű PGE-2 tud termelődni (94). Ezzel összhangban bizonyítottuk, hogy az MSC-k konstitutív módon jelentős mennyiségű PGE-2 szintézisére képesek, aktiváló tényezők (aktivált T-sejtek, TNF α , IFN γ) hatására

azonban ugrásszerű emelkedés figyelhető meg a mediátor termelésében. Eredményeink szerint az MSC-k ConA-indukált T-sejtosztódást gátló hatása hatékonyan feloldható volt a COX-enzimek gátlószerével (indometacinnal), ami a PGE-2 központi szerepét bizonyítja a folyamatban. Továbbá az MSC–T-sejt kokultúrákban a ConA által aktivált T-sejtek erőteljesen fokozták a PGE-2 termelődését, a kétféle sejt közötti fizikai kontaktus megakadályozásával azonban ez a hatás teljes egészében elmaradt. Tehát maguk az aktivált T-sejtek felelnek azért, hogy az MSC-k olyan mennyiségű PGE-2-t tudjanak termelni, ami hatékonyan képes gátolni a T-sejtosztódást, és ebben a folyamatban kulcsfontosságú szerepet játszik az MSC-k és aktivált T-sejtek között kialakuló sejtkontaktus. Ezek az eredmények megerősítik más munkacsoportok korábbi megfigyeléseit (95).

Rekombináns citokinek, TNF α és IFN γ segítségével sikeresen tudtuk fokozni az MSC-k PGE-2 termelését. A TNF α önmagában, dózisfüggően, míg az IFN γ csak a TNF α -val együtt alkalmazva volt hatásos induktora a folyamatnak, ekkor azonban többszörösére volt képes növelni a PGE-2 mennyiségét a felülúszókban. A két citokin közötti szinergisztikus kapcsolat nem csak a PGE-2 szintézis fokozásánál figyelhető meg. Különböző kísérleti rendszerekben a CXCL10 (96), RANTES (97) és IL-8 (98), tehát más nukleáris faktor-kappa B (NF- κ B) transzkripciós faktor targetgénnek esetében is hasonló megfigyelésekről számoltak be, a fehérjék mRNS-einek kifejeződése többszörösére nőtt TNF α és IFN γ egyidejű jelenlétében. A két citokin által bekapcsolt transzkripciós faktorok kölcsönhatásai mellett (99) a jelenség egyik magyarázata lehet, hogy az IFN γ indirekt módon képes lehet fokozni a célsejtek TNF α receptorának kifejeződését, így a sejt környezetében jelenlévő TNF α még erőteljesebben tudja aktiválni célgénjeinek átíródását (100). Eredményeink azt bizonyítják, hogy az MSC-k immunszuppresszív aktivitásának kiváltásához IFN γ mellett más gyulladásozó citokin(ek) – például TNF α , IL-1 α vagy IL-1 β – jelenléte is szükséges (93), így képesek a sejtek a COX-2 enzim génjének expresszióját megfelelő mértékben növelni. A kétféle gyulladásozó citokinnal történő indukció során a következőt figyelhettük meg: az iNOS-t gátló L-NMA csak abban az esetben volt képes akadályozni az MSC-k PGE-2-termelését, amikor IFN γ is jelen volt a rendszerben, és ekkor is csak részleges gátlást figyelhettünk meg. A csak TNF α -val történő aktiváció során, tehát a TNF α jelpályában az iNOS nem játszik szerepet, helye – legalábbis részben – az IFN γ útvonalon

igazolódott. Az iNOS-on keresztül termelődő NO szerepét feltételezi az is, hogy a NO-donorral kezelt MSC-k kultúráiban jelentős mennyiségű PGE-2-t tudunk mérni. A vizsgálataink alapján levont következtetéseket a 26. ábrán foglaltuk össze.



26. ábra: Az MSC-k prosztaglandin-E2 (PGE-2) termelésének indukciós útjai gyulladáscsökkentő citokinek jelenlétében – összefoglalva. (Részletes magyarázat a szövegben olvasható.)

A NO szerepét árnyalja, hogy mikor az MSC-k aktivált T-sejtekkel kerültek direkt kontaktusba és emiatt PGE-2 termelésük nagymértékben nőtt, az iNOS gátlása nem befolyásolta a felülészókban a PGE-2 termelését, de az MSC-k T-sejtosztódást gátló hatását részben feloldotta. Tehát ilyenkor a NO valószínűleg a PGE-2 útvonalon kívül hat, ugyanis nagy mennyiségben a sejtek környezetébe jutva is képes gátolni a T-sejtek osztódását, ahogyan azt már más munkacsoportok is megfigyelték (64, 65). Felvetődik a kérdés, hogy ha az aktivált T-sejtek képesek IFN γ és TNF α -termelésre, miért olyan meghatározó a sejt-sejt kontaktus szerepe az MSC-k jelentős mértékű PGE-

2-termelésének kiváltásában. Rekombináns TNF α -val és IFN γ -val gyorsan kiváltható a COX-2 enzim aktivációja, a valóságban azonban a T-sejtek és az MSC-k olyan molekuláris párbeszédet folytatnak egymással, amivel finomhangolni tudják egymás működését, biztosítva ezzel, hogy csak megfelelő körülmények között valósuljon meg az immunválasz befolyásolása.

Eredményeink szerint tehát a csontvelői MSC-k aktivált T-sejtek jelenlétében, vagy megfelelő gyulladáscitokinek – TNF α , IFN γ – hatására nagy mennyiségű, potenciálisan gyulladásgátló tulajdonságokkal bíró PGE-2 termelésére képesek, a PGE-2 indukciója azonban nem egy kizárólagos molekuláris mechanizmus működésének az eredménye.

Munkánk másik felében az MSC-k és M ϕ -ok kölcsönhatását vizsgáltuk. A M ϕ -ok összehangolt működése biztosítja a szervezetben a gyulladáscsökkentő folyamatok kialakulását és feloldását, valamint az azt követő helyreállító folyamatok megfelelő levezetését. Számos gyulladáscsökkentő, és autoimmun kórképben köszön vissza a M ϕ -ok nem megfelelő működése (101–103), így ideális célsejtjei lehetnek az MSC-kkel történő terápiás beavatkozásoknak. Az MSC-k és M ϕ -ok egymásra hatásáról jelenleg keveset tudunk, és a különféle M ϕ aktivációs profilok felfedezésével még fontosabbá válik kideríteni, hogy ha az MSC-k képesek hatni ezekre a sejtekre, milyen polarizációs állapotba vezetnek azokat, a különböző kórképekben ugyanis különböző M ϕ alpopulációk jelenthetnek problémát.

Először egér peritoniumból izolált M ϕ -okat vizsgáltunk, amik könnyen hozzáférhetőek, de a standard izolációs eljárás (104) után bizonyos százalékban mindig tartalmaznak egyéb immunsejteket (105, 106). Használatuk mellett szólt mégis, hogy szöveti M ϕ -okként ők találkoznak elsőként a szervezet számára kihívást jelentő eseményekkel, tehát fontos volt kideríteni, hogy az ilyen állapotú M ϕ -ok hogyan reagálnak az MSC-k jelenlétére. Az általunk izolált Pe-M ϕ kultúrák szintén tartalmaztak egyéb immunsejteket – főként limfocitákat –, valamint részben aktivált fenotípust mutattak. Eredményeink szerint az MSC-k jelenléte egyértelműen befolyásolja a Pe-M ϕ -ok funkcióit. Az MSC-k még LPS – tehát a M ϕ -okra nézve aktiváló molekula – jelenlétében is fokozták a Pe-M ϕ -ok élesztőfagocitózist, valamint az apoptotikus sejtek felvételét is elősegítették a kokultúrákban. Ezzel összhangban Maggini és munkatársai is megnövekedett zimozán- és apoptotikus timocita fagocitózist írtak le egér M ϕ -ok és

MSC-k kultúráiban (51). Az MSC-k hatására tehát mind a patogének, mind a pusztuló saját sejtek eltakarítása fokozódik. Eközben a sejtek citokintermelése is változik: a patogénfelvételkor tapasztalható gyulladásos M ϕ -aktiváció átfordul gyulladásgátló profilba, amit a TNF α -domináns citokintermelés IL-10-dominanciára váltása jelez. Az apoptotikus sejtek felvétele nem jár gyulladásos folyamatok kialakulásával (107), ennek megfelelően mi sem figyeltünk meg TNF α -emelkedést az apoptotikus timocitákat felvevő Pe-M ϕ -ok kultúráiban. Ilyenkor a Pe-M ϕ -ok eleve IL-10-hangsúlyos citokintermelését az MSC-k jelenléte képes volt tovább fokozni. Ezeket a trendeket figyelhettük meg akkor is, amikor az M1-es, klasszikus gyulladásos M ϕ -ok induktív koktélját használtuk a Pe-M ϕ -okon: az MSC-k képesek voltak a Pe-M ϕ -ok citokintermelését TNF α -dominanciáról IL-10 dominanciára változtatni. Mindezen tulajdonságok azt mutatják, hogy a Pe-M ϕ -ok MSC-k jelenlétében egy gyulladásgátló, M2-szerű fenotípust vesznek fel. Az MSC-ket ebben a hatásukban sem az LPS (TLR-ligand), az M1-indukciós médium, az élesztősejtek (patogén) vagy az apoptotikus sejtek jelenléte nem volt képes befolyásolni, tehát a létrehozott M ϕ -fenotípusbeli változások stabilnak tekinthetők MSC-k jelenlétében. Ez a tulajdonság nagy jelentőséggel bírhat terápiás alkalmazás során. Eredményeink megerősítik más munkacsoportok egér és humán M ϕ -okon végzett *in vitro* és *in vivo* vizsgálatait, ahol szintén IL-10-termelő, regulátor funkciókkal rendelkező M2 fenotípusú M ϕ -ok kialakulását írtak le MSC kezelés hatására (51, 83, 108–110).

Az MSC-k a Pe-M ϕ -ok antigénbemutató képességét is nagymértékben képesek befolyásolni. Eredményeink szerint mind az aktiválatlan, mind az LPS-sel stimulált Pe-M ϕ -ok esetében nőtt az MHC-II⁺CD86⁺ sejtek aránya és a molekulák mennyisége is jelentősen dúsult a M ϕ -ok felszínén, tehát azok jobb antigénprezentáló sejtekké váltak az MSC-k hatására. Funkcióképességük ovalbuminnal aktivált T-sejtek kultúráiban is bebizonyosodott, ugyanis MSC-k jelenlétében a Pe-M ϕ -ok a jobb antigénbemutató-képességük révén erőteljesebben tudták kiváltani az OVA-specifikus T-sejtek osztódását, eközben növelték a felszaporodott T-sejtek között a Treg-sejtek arányát, és gátolták a Th17 gyulladásos sejtek kialakulását, segítve ezzel az immunszuppresszív sejt környezet kialakítását. Hasonló eredményekre jutottak Melief és munkatársai humán kísérleti rendszerekben, ahol kiderítették, hogy az MSC-k bizonyos szolubilis faktorok termelésével a M ϕ -ok M2-es profilba történő eltolásán keresztül tudták

fokozni a Treg-sejtek osztódását (109). Az MSC-k általunk eddig már tárgyalt hatásai, és a Pe-M ϕ -ok antigénprezentációs képességének fokozása alapján nem csak hogy M2-szerű, de azon belül is leginkább az M2b aktivációs profilba tartozó M ϕ -ok létrejöttét sejtetik az eredményeink, ugyanis ez az az alcsoport, ahol – többek között – az IL-10-domináns citokintermelés mellett a fokozott antigénbemutató képesség is jellemző a sejtekre (71, 73) (és 3. ábra).

A Pe-M ϕ -ok használatánál felmerült zavaró tényezők – preaktivált állapot, jelenlévő egyéb immunsejtek – kiküszöböléséhez, és az MSC-k jelenlétében kialakuló M ϕ -fenotípus pontosabb megfigyeléséhez tisztább és homogénebb M ϕ -kultúrákra volt szükségünk. Ehhez sikeresen differenciáltattunk egér csontvelőből nagy tisztaságú, homogén és aktiválatlan („naiv”) M ϕ -kultúrákat, és a megfelelő induktorokkal sikeresen létre tudtuk hozni belőlük a szakirodalomban leírt főbb M ϕ -aktivációs állapotokat: M1, M2a és M2b (73, 77, 111). Ezek az aktivációs állapotok különböző fagocitotikus képességet mutattak: az M1 és M2b M ϕ -ok kisebb, míg az M2a sejtek nagyobb hatékonysággal vették fel az élesztősejteket. Korábban – ezzel összhangban – a fagoszómák lassabb érését, és emiatt késleltetett fagocitózist írtak le az M1-es M ϕ -oknál az M2a M ϕ -okhoz képest (112). Eredményeink szerint az MSC-k mind az M1, mind az M2b M ϕ -ok élesztősejt-felvételét fokozták – míg az M2a M ϕ -okét csökkentették –, ez a hatásuk párhuzamba állítható a Pe-M ϕ -ok esetén megfigyeltekkel, ahol az MSC-k szintén növelték az LPS-sel (TLR4-ligand) stimulált Pe-M ϕ -ok élesztő-fagocitózist. Valószínűleg a TLR4-ligandot tartalmazó környezet lehet a kapocs, mivel mind az M1, mind az M2b induktív koktélok tartalmaznak LPS-t, így elképzelhető, hogy a TLR4-en keresztüli aktiváció – ami mind az MSC-keket, mind a M ϕ -okat érinti, hiszen mindkettő kifejezi a receptort (113, 114) – teszi lehetővé, hogy a kétféle sejt egymásra hatásakor a fagocitotikus képesség nőhessen. A jelenség hátterének tisztázása azonban mindenképpen további vizsgálatokat igényel.

A „naiv” csontvelői M ϕ -ok a mi eredményeink szerint is a szakirodalmi adatoknak megfelelően (115) reagáltak a megfelelő induktorokra: M1 és M2b polarizáció alatt jelentős mennyiségű IL-10-et és TNF α -t termeltek, míg az M2a kultúrák M ϕ -jai nem szekretálták ezeket a citokineket. Emellett a kifejezetten M2a markerként számon tartott Ym1 (71) termelését mi is csak az M2a M ϕ -ok esetében tudtuk igazolni. Az MSC-k az IL-10 vagy a Ym1 mennyiségét egyik polarizációs

környezetben sem befolyásolták, azonban jelentősen csökkentették az M1 és M2b M ϕ -ok TNF α -termelését. Így az MSC-k megint csak képesek voltak a TNF α /IL-10 arányát befolyásolni: a TNF α csökkentésén keresztül az IL-10 dominanciája felé tolták el a két citokin arányát, míg Pe-M ϕ -ok esetében a hatás az IL-10 növelésén keresztül valósult meg. A látszólagos ellentmondást az oldhatja fel, hogy a peritoneumból izolált M ϕ -ok jelentős hányada méréseink szerint is *in vivo* előzetesen aktivált állapotba kerülhetett, tehát egyfajta „immunológiai múlttal” rendelkeztek a kísérletek megkezdésekor. Ezért valószínűleg kevert aktivációs állapotú sejtekkel dolgoztunk, amikben a különböző M ϕ alpopulációk különbözőképpen válaszolhattak az MSC-k jelenlétére, valamint a kisebb mennyiségben jelenlévő egyéb immunsejtek is beleszólhattak a felülűszókban mért citokinprofilok kialakulásába. Tehát sokkal tisztább megfigyeléseket vonhatunk le a csontvelőből differenciáltatott tiszta, homogén és előzetesen aktiválatlan M ϕ -ok esetében. A Pe-M ϕ -okon és csontvelői M ϕ -okon végzett vizsgálatoknál megfigyelt különbségek még abból is adódhatnak, hogy újabban számos szöveti M ϕ -ról – többek között a peritoneális M ϕ -okról is – az derült ki, hogy többségében lokálisan megújuló, embrionális szikzacskó-eredetű sejtpopulációk alkotják, így emiatt is különbözőképpen reagálhatnak az MSC-k jelenlétére, mint a folyamatosan termelődő, monocita eredetű M ϕ -ok (116, 117).

A regeneratív orvoslás területén végzett újabb kutatások szerint a sérülést követő néhány napban az M1 M ϕ -ok dominálnak az érintett szervben/szövetben, míg a későbbi fázisokban már az M2a és M2b M ϕ -ok a terület fő effektorsejtjei. Az M1-es M ϕ -ok jelenléte egybeesik a sérülést követő korai gyulladással és intenzív sejtosztódással, míg az M2a és M2b M ϕ -ok a szövet regenerációjában és az ehhez szükséges szöveti átrendeződésben vesznek részt, amihez a különböző M ϕ aktivációs állapotok összehangolt, jól időzített váltása szükséges (101). Ennek megfelelően azt tapasztaltuk, hogy az M1 irányban aktivált M ϕ -ok az induktív környezet változtatásával könnyen át-polarizálhatók M2a és M2b fenotípusba. Ilyenkor azonban az MSC-k nem befolyásolták az M1 állapotból kialakuló M2b sejtek citokintermelését. Ennek magyarázata lehet, hogy az M1 \rightarrow M2b átalakulás során a M ϕ -ok TNF α -termelése erőteljesen lecsökken, az MSC-k pedig ilyenkor már nem képesek tovább csökkenteni a citokin mennyiségét. A TNF α -nak ez az M1 \rightarrow M2b átalakuláskor megfigyelhető hiánya valószínűleg az endotoxin-tolerancia kialakulásának köszönhető (118), hiszen mind az

M1, mind az M2b állapot indukciójában LPS-t használtunk. Az endotoxin-tolerancia kialakulása során a másodszori LPS stimulus gátolni tudja a TNF α -termelődést (119). Eredményeinkből az is kiderül, hogy az MSC-k jelenléte megengedő a TNF α -termelés tekintetében, igaz, csak kis mennyiségben. A citokin jelenléte, valamint a kialakuló TNF α /IL-10 arány kontrollált és dinamikus változása fontos szerepet játszanak a szervezet regenerációs folyamataiban. A gyulladásos és gyulladásgátló citokinek indukciója egyidejűleg történhet a regeneratív folyamatok korai fázisaiban, például egerekben a M ϕ -ok egyszerre expresszálnak IL-10-et és TNF α -t az akut májsérülés után 48 órával (120). Vázizom regenerációja során a TNF α a miogenezis korai proliferációs szakaszában stimulálja a szatellitasejtek osztódását (121), a szív esetében pedig a TNF α védő hatását mutatták ki egerben (122). Másrészt a mononukleáris fagocita sejtek kétirányú kapcsolatban állnak az MSC-kkel (123): a M ϕ -okból származó TNF α az MSC-kben TSG-6 termelést vált ki, az így termelődött TSG-6 pedig egyike az MSC-ktől származó legfontosabb gyulladásgátló és immunszuppresszív mediátoroknak *in vitro* és *in vivo* (124). Fontos megemlíteni, hogy az általunk mért TNF α és IL-10 profilok a M ϕ -ok aktivációs állapotaiban bekövetkezett változásokat jellemzik, mivel már számtalan munkacsoport bizonyította, hogy az MSC-k még különböző TLR-agonisták jelenlétében sem képesek IL-10- (125) vagy TNF α -termelésre (126). Ezekkel a munkákkal megegyezően mi sem tudtuk detektálni a két citokint a kontroll MSC kultúrákban, és ez akkor is így volt, mikor az MSC-k mellett LPS vagy IFN γ is jelen volt a rendszerben. Laboratóriumunkban folyó másik munkánk során, ahol MSC-eket és a központi idegrendszer makrofágjait, mikroglia sejteknek koinkubáltunk, majd transwell-áthelyezéssel vizsgálatot végeztünk, szintén bizonyítottuk, hogy az őssejtek nem képesek a kétféle citokin termelésére (aktivált mikroglia jelenlétében sem) (127). Tehát az MSC-k TNF α vagy IL-10 promoterének aktiválódása M ϕ -ok jelenlétében valószínűtlen.

Számos korábbi munkával összhangban (52, 109, 128) mi is azt tudtuk kimutatni, hogy az MSC-k és M ϕ -ok közti párbeszéd elsődlegesen szolubilis faktorok segítségével zajlik, mivel a kokultúrákban mérhető citokinek mennyiségét nem befolyásolta számottevően, ha a két sejtféleséget fizikailag elhatároltuk egymástól. A PGE-2 egy a M ϕ -ok és MSC-k által egyaránt termelt szolubilis gyulladásgátló mediátor. Eredményeink szerint a PGE-2 központi szerepet tölt be az MSC-k és M ϕ -ok

kölcsönhatásában, és a hatásért az indukálható COX-2 enzim tehető felelőssé, ugyanis a COX-1 és COX-2 gátlószerek alkalmazásakor a COX-2 enzim gátlása tudta feloldani az MSC-k M ϕ -okra gyakorolt hatását: a TNF α /IL-10 arány ekkor a TNF α felé tolódott mind az M2b, mind az M1 kultúrákban. Tehát a COX-2 izoforma jelenléte kiemelkedő fontosságú a TNF α /IL-10 arány IL-10 javára történő eltolódásában MSC-k jelenlétében. A PGE-2 MSC-M ϕ kölcsönhatásban betöltött szerepét külső forrásból a kultúrákhoz adott PGE-2 segítségével is meg tudtuk erősíteni. Ekkor a PGE-2 dózisfüggő módon helyettesíteni tudta az MSC-k hatását az M2b M ϕ -ok kultúráiban. Ezek az eredmények – számos munkacsoport vizsgálataival összhangban (51, 62, 83) – mind azt bizonyítják, hogy a PGE-2-nek központi szerepe van abban, ahogyan az MSC-k a M ϕ -ok polarizációját befolyásolják.

Eredményeink tehát azt bizonyítják, hogy az MSC-k képesek gátolni a mitogén vagy alloantigén által aktivált T-sejtek osztódását, valamint M ϕ -kokultúrákban leginkább az M2b regulátor funkciókat ellátó M ϕ -okhoz hasonló fenotípus kialakulását segítik elő, illetve gátolják a M ϕ -ok gyulladásgátló, M1 irányú polarizációját. Az egyidejűleg jelenlévő T-sejtek alpopulációinak arányát regulátor funkciókkal rendelkező sejtek irányába tolják el olyan vizsgálati elrendezésben, ahol a M ϕ -ok antigént mutatnak be a T-sejtek felé, *in vitro*. Mind T-sejtes, mind M ϕ -okat tartalmazó rendszerekben a PGE-2 központi szerepét tudtuk igazolni. Ezek a megfigyelések magyarázatul szolgálhatnak arra, hogy miért figyelhető meg erőteljes immunszuppresszív, gyulladásgátló aktivitás az MSC-k *in vivo* alkalmazásakor. Eredményeink tehát megerősítik, hogy az MSC-k ígéretes eszközei lehetnek a különböző gyulladásgátló és/vagy autoimmun betegségeket célzó terápiás eljárásoknak.

6. KÖVETKEZTETÉSEK

1. Sikeresen hoztunk létre C57Bl/6-os egerek csontvelőjéből olyan sejtenyészeteket, amik fibroblaszt-szerű morfológiájuk, sejtfelszíni markereik, valamint zsír és csont irányú differenciációs képességeik alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők.
2. Igazoltuk az általunk izolált MSC-k immunuszpresszív aktivitását mitogén és alloantigén-indukált T-sejtes rendszerekben, *in vitro*.
3. Az MSC-k aktivált T-sejtekre gyakorolt szuppresszív hatásában a sejt-sejt kontaktus, valamint a szolubilis mediátorok közül a PGE-2 és az iNOS szerepét mutattuk ki.
4. A TNF α önmagában is, míg az IFN γ csak TNF α jelenlétében képes fokozni az MSC-k PGE-2-termelését. A két gyulladáscitokin hatása szinergisztikus.
5. A TNF α és az IFN γ a COX-2 enzim indukcióján keresztül segíti elő az MSC-k PGE-2-termelését. Az iNOS és a NO – legalábbis részben – az IFN γ útvonalon keresztül, de a TNF α jelpályától függetlenül kapcsolódik a COX-2-indukciós úthoz. Az MSC-k PGE-2-termelésének indukciója tehát redundáns folyamat.
6. Az MSC-k jelenléte fokozza a peritoneális M ϕ -ok fagocitotikus és antigénprezentáló képességét, citokintermelésük pedig TNF α -dominanciáról IL-10-dominanciára vált, tehát a Pe-M ϕ -ok MSC-k jelenlétében gyulladásgátló, M2b-szerű fenotípust mutatnak. A hatás M1 vagy egyéb gyulladáscitokin jelenlétében is megmarad.
7. Sikeresen létre tudtunk hozni egér csontvelői sejtekből differenciáltatott homogén, aktiválatlan, de funkcióképes M ϕ -okat, amiket citokintermelésük alapján sikeresen juttattunk M1, M2a és M2b aktivációs állapotokba.
8. Az MSC-k növelik az M1 és M2b, míg csökkentik az M2a M ϕ -ok fagocitotikus képességét. Citokintermelésükre csak a TNF α -termelés befolyásolásán keresztül hatnak: M1 és M2b M ϕ -ok esetében csökkentik, míg az M2a sejteknél kis mértékben növelik a citokin mennyiségét. Az MSC-k jelenléte M1 és M2b aktivációs környezetben M2b-szerű regulátor M ϕ -fenotípus kialakulását segíti elő.

9. A csontvelői M ϕ -ok képesek M1-es aktivációs állapotból M2a és M2b irányokba újrapolarizálódni, az MSC-k azonban nem képesek befolyásolni ezeket az átalakulásokat.
10. Az MSC-k csontvelői M ϕ -okra gyakorolt hatása főként szolubilis mediátorok segítségével jön létre, ezen belül is a COX-2 enzimen keresztül termelődő PGE-2 meghatározó szerepét bizonyítottuk.

7. ÖSSZEFOGLALÁS

A mesenchymalis őssejtek (MSC-k) olyan szöveti őssejtek, amik képesek az általuk termelt növekedési faktorok, citokinek és egyéb mediátorok segítségével a szervezetben zajló immunfolyamatok szabályozására, és a regeneratív folyamatok támogatására. Ezen tulajdonságaik miatt különböző gyulladásos és/vagy autoimmun betegségek kezelésében kaphatnak kiemelkedő szerepet. Az MSC-k által kifejtett immunmoduláció mechanizmusai azonban máig nem ismertek pontosan.

Ebben a munkában egér csontvelői MSC-k és T-sejtek, valamint peritoneális (Pe-) és csontvelői (BM-) makrofágok (M ϕ -ok) kölcsönhatását vizsgáltuk. Az MSC-k nagymértékben gátolták a mitogén-, és az alloantigén-aktíviált T-sejtosztódást, *in vitro*. A folyamatban a közvetlen sejtkontaktus, és a PGE-2 kiemelkedő szerepét tudtuk bizonyítani. Két gyulladásos citokin – TNF α és IFN γ – segítségével részletesebben is feltérképeztük az MSC-k PGE-2-termelését. Kimutattuk, hogy a TNF α önmagában is, míg az IFN γ csak TNF α jelenlétében, de ekkor szinergisztikusan képes fokozni az MSC-k PGE-2-termelését. Bizonyítottuk, hogy a PGE-2 indukciója redundáns folyamat.

Kiderítettük, hogy az MSC-k számos módon képesek befolyásolni a M ϕ -ok fenotípusát és funkcióját. Még gyulladásos aktivátorok jelenlétében is képesek növelni a M ϕ -ok fagocitotikus és antigénprezentációs képességét, valamint citokintermelésüket TNF α -dominanciáról IL-10-dominanciára változtatják. Az egyidejűleg jelenlévő T-sejtek alpopulációinak arányát regulátor funkciókkal rendelkező sejtek irányába tolják el olyan vizsgálati rendszerben, ahol a M ϕ -ok antigént mutatnak be a T-sejtek felé, *in vitro*. BM-M ϕ -ok segítségével részletesebben vizsgáltuk az MSC-k M ϕ -alpopulációkra gyakorolt hatását. Az MSC-k az M1 és M2b M ϕ -okra hatottak a legerősebben, citokintermelésüket a TNF α csökkentésén keresztül befolyásolták, a TNF α /IL-10 aránya így a gyulladásgátló IL-10 javára tolódott el. Bizonyítottuk továbbá, hogy a BM-M ϕ -ok képesek az induktív környezet változásaira reagálva újrapolarizálódni, azonban az MSC-k nem befolyásolják a folyamatot. Eredményeink alapján tehát az MSC-k jelenléte gyulladásos vagy M2b induktív környezetben regulátor funkciókkal rendelkező M ϕ -ok létrejöttét segíti, a PGE-2 pedig a folyamat egyik központi mediátora.

Eredményeink hozzájárulnak az MSC-kkel végzett terápiás felhasználás során megfigyelt hatások alaposabb megértéséhez, és a terápiás eljárások finomhangolásához.

8. SUMMARY

Mesenchymal stem cells (MSCs) are adult tissue stem cells that are capable of producing a large number of growth factors, cytokines, and other mediators thus being able to modulate immune and regenerative processes. These characteristics make them ideal targets in the treatment of several inflammatory and/or autoimmune diseases. However, the exact mechanisms underlying MSC-mediated immunomodulation is still not clear and are under extensive research.

In this work we used mouse bone marrow-derived MSCs to study their interaction with T cells, peritoneal- (Pe-) and bone marrow-derived (BM-) macrophages (M ϕ s). Our MSCs inhibited both mitogen- and alloantigen-activated T-cell proliferation to a great extent, *in vitro*. Direct cell-to-cell contact and the role of PGE-2 were found to be pivotal in these interactions. With the help of two inflammatory cytokines – TNF α and IFN γ – we were able to investigate the mechanism of PGE-2 production by MSCs in more detail. We showed that TNF α is alone able to induce the PGE-2 production of MSCs, however, IFN γ could do so only in the presence of TNF α , and the two acted in a synergistic manner. Thus, we proved that the process of PGE-2 induction is redundant.

As shown by our results, MSCs affect the phenotype and function of M ϕ s in several ways. They were able to enhance the phagocytic and antigen-presenting ability of M ϕ s, and also shift their cytokine production from TNF α -dominance towards IL-10-dominance even in the presence of pro-inflammatory activators. Moreover, MSCs shifted the ratio of T-cell subpopulations towards regulatory cells in experimental systems where M ϕ s are presenting antigens towards T-cells, *in vitro*. By using BM-M ϕ s, we were able to observe the effect of MSCs on specific M ϕ subpopulations. MSCs most profoundly affected M1 and M2b M ϕ states shifting their TNF α /IL-10 production towards IL-10 by inhibiting TNF α production. Furthermore, we proved that BM-M ϕ s are able to change their polarization state from M1 to M2a or M2b, but MSCs were not able to affect these shifts. Our results suggest that the presence of MSCs favor the establishment of a regulatory M ϕ profile under inflammatory of M2b inducing conditions and PGE-2 is one major partaker in the process.

Our results provide insight into understanding the effects observed in MSC-based therapies, and also contribute to the fine-tuning of future therapeutic approaches.

9. IRODALOMJEGYZÉK

1. Tuch, B. E. (2006) Stem cells--a clinical update. *Aust. Fam. Physician.* **35**, 719–721
2. Diecke, S., Jung, S. M., Lee, J., and Ju, J. H. (2014) Recent technological updates and clinical applications of induced pluripotent stem cells. *Korean J. Intern. Med.* **29**, 547–557
3. Sylvester, K. G., and Longaker, M. T. (2004) Stem cells: review and update. *Arch. Surg. Chic. Ill 1960.* **139**, 93–99
4. Kaur, P. (2006) Interfollicular epidermal stem cells: identification, challenges, potential. *J. Invest. Dermatol.* **126**, 1450–1458
5. Clarke, D. L., Johansson, C. B., Wilbertz, J., Veress, B., Nilsson, E., Karlström, H., Lendahl, U., and Frisén, J. (2000) Generalized potential of adult neural stem cells. *Science.* **288**, 1660–1663
6. Birbrair, A., and Frenette, P. S. (2016) Niche heterogeneity in the bone marrow. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* **1370**, 82–96
7. Beyer Nardi, N., and da Silva Meirelles, L. (2006) Mesenchymal stem cells: isolation, in vitro expansion and characterization. *Handb. Exp. Pharmacol.*
8. Friedenstein, A. J., Petrakova, K. V., Kurolesova, A. I., and Frolova, G. P. (1968) Heterotopic of bone marrow. Analysis of precursor cells for osteogenic and hematopoietic tissues. *Transplantation.* **6**, 230–247
9. Friedenstein, A. J., Chailakhjan, R. K., and Lalykina, K. S. (1970) The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells. *Cell Tissue Kinet.* **3**, 393–403
10. Friedenstein, A. J., Gorskaja, J. F., and Kulagina, N. N. (1976) Fibroblast precursors in normal and irradiated mouse hematopoietic organs. *Exp. Hematol.* **4**, 267–274
11. Wei, X., Yang, X., Han, Z., Qu, F., Shao, L., and Shi, Y. (2013) Mesenchymal stem cells: a new trend for cell therapy. *Acta Pharmacol. Sin.* **34**, 747–754
12. da Silva Meirelles, L., Chagastelles, P. C., and Nardi, N. B. (2006) Mesenchymal stem cells reside in virtually all post-natal organs and tissues. *J. Cell Sci.* **119**, 2204–2213
13. Pittenger, M. F., Mackay, A. M., Beck, S. C., Jaiswal, R. K., Douglas, R., Mosca, J. D., Moorman, M. A., Simonetti, D. W., Craig, S., and Marshak, D. R. (1999)

- Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. *Science*. **284**, 143–147
14. Kuroda, Y., and Dezawa, M. (2014) Mesenchymal stem cells and their subpopulation, pluripotent muse cells, in basic research and regenerative medicine. *Anat. Rec. Hoboken NJ 2007*. **297**, 98–110
 15. Chen, Y., Shao, J.-Z., Xiang, L.-X., Dong, X.-J., and Zhang, G.-R. (2008) Mesenchymal stem cells: a promising candidate in regenerative medicine. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **40**, 815–820
 16. Bianco, P., Robey, P. G., and Simmons, P. J. (2008) Mesenchymal stem cells: revisiting history, concepts, and assays. *Cell Stem Cell*. **2**, 313–319
 17. Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006) Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **8**, 315–317
 18. Horwitz, E. M., Le Blanc, K., Dominici, M., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F. C., Deans, R. J., Krause, D. S., Keating, A., and International Society for Cellular Therapy (2005) Clarification of the nomenclature for MSC: The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy*. **7**, 393–395
 19. Méndez-Ferrer, S., Michurina, T. V., Ferraro, F., Mazloom, A. R., Macarthur, B. D., Lira, S. A., Scadden, D. T., Ma’ayan, A., Enikolopov, G. N., and Frenette, P. S. (2010) Mesenchymal and haematopoietic stem cells form a unique bone marrow niche. *Nature*. **466**, 829–834
 20. Jones, E. A., Kinsey, S. E., English, A., Jones, R. A., Straszynski, L., Meredith, D. M., Markham, A. F., Jack, A., Emery, P., and McGonagle, D. (2002) Isolation and characterization of bone marrow multipotential mesenchymal progenitor cells. *Arthritis Rheum*. **46**, 3349–3360
 21. Sacchetti, B., Funari, A., Michienzi, S., Di Cesare, S., Piersanti, S., Saggio, I., Tagliafico, E., Ferrari, S., Robey, P. G., Riminucci, M., and Bianco, P. (2007) Self-renewing osteoprogenitors in bone marrow sinusoids can organize a hematopoietic microenvironment. *Cell*. **131**, 324–336

22. Chamberlain, G., Fox, J., Ashton, B., and Middleton, J. (2007) Concise review: mesenchymal stem cells: their phenotype, differentiation capacity, immunological features, and potential for homing. *Stem Cells Dayt. Ohio.* **25**, 2739–2749
23. Prockop, D. J. (2017) The exciting prospects of new therapies with mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy.* **19**, 1–8
24. Ma, S., Xie, N., Li, W., Yuan, B., Shi, Y., and Wang, Y. (2014) Immunobiology of mesenchymal stem cells. *Cell Death Differ.* **21**, 216–225
25. Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., Deans, R., Moseley, A., and Hoffman, R. (2002) Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Exp. Hematol.* **30**, 42–48
26. Ankrum, J. A., Ong, J. F., and Karp, J. M. (2014) Mesenchymal stem cells: immune evasive, not immune privileged. *Nat. Biotechnol.* **32**, 252–260
27. Bifari, F., Pacelli, L., and Krampera, M. (2010) Immunological properties of embryonic and adult stem cells. *World J. Stem Cells.* **2**, 50–60
28. Chan, J. L., Tang, K. C., Patel, A. P., Bonilla, L. M., Pierobon, N., Ponzio, N. M., and Rameshwar, P. (2006) Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. *Blood.* **107**, 4817–4824
29. Di Nicola, M., Carlo-Stella, C., Magni, M., Milanesi, M., Longoni, P. D., Matteucci, P., Grisanti, S., and Gianni, A. M. (2002) Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or nonspecific mitogenic stimuli. *Blood.* **99**, 3838–3843
30. Djouad, F., Plence, P., Bony, C., Tropel, P., Apparailly, F., Sany, J., Noël, D., and Jorgensen, C. (2003) Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogeneic animals. *Blood.* **102**, 3837–3844
31. Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B., Haynesworth, S. E., and Ringdén, O. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. *Scand. J. Immunol.* **57**, 11–20

32. Wang, Y., Chen, X., Cao, W., and Shi, Y. (2014) Plasticity of mesenchymal stem cells in immunomodulation: pathological and therapeutic implications. *Nat. Immunol.* **15**, 1009–1016
33. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2005) Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms. *Exp. Cell Res.* **305**, 33–41
34. Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M., and Mahon, B. P. (2007) Interferon-gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. *Clin. Exp. Immunol.* **149**, 353–363
35. Zappia, E., Casazza, S., Pedemonte, E., Benvenuto, F., Bonanni, I., Gerdoni, E., Giunti, D., Ceravolo, A., Cazzanti, F., Frassoni, F., Mancardi, G., and Uccelli, A. (2005) Mesenchymal stem cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis inducing T-cell anergy. *Blood.* **106**, 1755–1761
36. Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012) Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell Stem Cell.* **10**, 544–555
37. Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003) Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood.* **101**, 3722–3729
38. Glennie, S., Soeiro, I., Dyson, P. J., Lam, E. W.-F., and Dazzi, F. (2005) Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. *Blood.* **105**, 2821–2827
39. Maccario, R., Podestà, M., Moretta, A., Cometa, A., Comoli, P., Montagna, D., Daudt, L., Ibatici, A., Piaggio, G., Pozzi, S., Frassoni, F., and Locatelli, F. (2005) Interaction of human mesenchymal stem cells with cells involved in alloantigen-specific immune response favors the differentiation of CD4+ T-cell subsets expressing a regulatory/suppressive phenotype. *Haematologica.* **90**, 516–525
40. Di Ianni, M., Del Papa, B., De Ioanni, M., Moretti, L., Bonifacio, E., Cecchini, D., Sportoletti, P., Falzetti, F., and Tabilio, A. (2008) Mesenchymal cells recruit and regulate T regulatory cells. *Exp. Hematol.* **36**, 309–318

41. Jiang, X.-X., Zhang, Y., Liu, B., Zhang, S.-X., Wu, Y., Yu, X.-D., and Mao, N. (2005) Human mesenchymal stem cells inhibit differentiation and function of monocyte-derived dendritic cells. *Blood*. **105**, 4120–4126
42. Ramasamy, R., Fazekasova, H., Lam, E. W.-F., Soeiro, I., Lombardi, G., and Dazzi, F. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit dendritic cell differentiation and function by preventing entry into the cell cycle. *Transplantation*. **83**, 71–76
43. Liu, W., Liu, J., Wu, J., Zhang, L., Liu, F., Yin, L., Zhang, M., and Yu, B. (2013) Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One*. **8**, e55487
44. Spaggiari, G. M., Abdelrazik, H., Becchetti, F., and Moretta, L. (2009) MSCs inhibit monocyte-derived DC maturation and function by selectively interfering with the generation of immature DCs: central role of MSC-derived prostaglandin E2. *Blood*. **113**, 6576–6583
45. Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G. L., Pistoia, V., and Uccelli, A. (2006) Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood*. **107**, 367–372
46. Rasmusson, I., Le Blanc, K., Sundberg, B., and Ringdén, O. (2007) Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells. *Scand. J. Immunol.* **65**, 336–343
47. Fan, L., Hu, C., Chen, J., Cen, P., Wang, J., and Li, L. (2016) Interaction between Mesenchymal Stem Cells and B-Cells. *Int. J. Mol. Sci.* 10.3390/ijms17050650
48. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Gritzapis, A. D., Baxevanis, C. N., and Papamichail, M. (2006) Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **24**, 74–85
49. Sotiropoulou, P. A., Perez, S. A., Salagianni, M., Baxevanis, C. N., and Papamichail, M. (2006) Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **24**, 462–471
50. Rasmusson, I., Ringdén, O., Sundberg, B., and Le Blanc, K. (2003) Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells. *Transplantation*. **76**, 1208–1213

51. Maggini, J., Mirkin, G., Bognanni, I., Holmberg, J., Piazzón, I. M., Nepomnaschy, I., Costa, H., Cañones, C., Raiden, S., Vermeulen, M., and Geffner, J. R. (2010) Mouse bone marrow-derived mesenchymal stromal cells turn activated macrophages into a regulatory-like profile. *PLoS One*. **5**, e9252
52. Zhang, Q.-Z., Su, W.-R., Shi, S.-H., Wilder-Smith, P., Xiang, A. P., Wong, A., Nguyen, A. L., Kwon, C. W., and Le, A. D. (2010) Human gingiva-derived mesenchymal stem cells elicit polarization of m2 macrophages and enhance cutaneous wound healing. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **28**, 1856–1868
53. Rasmusson, I. (2006) Immune modulation by mesenchymal stem cells. *Exp. Cell Res.* **312**, 2169–2179
54. Abumaree, M., Al Jumah, M., Pace, R. A., and Kalionis, B. (2012) Immunosuppressive properties of mesenchymal stem cells. *Stem Cell Rev.* **8**, 375–392
55. Spees, J. L., Lee, R. H., and Gregory, C. A. (2016) Mechanisms of mesenchymal stem/stromal cell function. *Stem Cell Res. Ther.* 10.1186/s13287-016-0363-7
56. Krampera, M., Cosmi, L., Angeli, R., Pasini, A., Liotta, F., Andreini, A., Santarlasci, V., Mazzinghi, B., Pizzolo, G., Vinante, F., Romagnani, P., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2006) Role for interferon-gamma in the immunomodulatory activity of human bone marrow mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **24**, 386–398
57. English, K., Barry, F. P., Field-Corbett, C. P., and Mahon, B. P. (2007) IFN-gamma and TNF-alpha differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunol. Lett.* **110**, 91–100
58. Augello, A., Tasso, R., Negrini, S. M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005) Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur. J. Immunol.* **35**, 1482–1490
59. Shi, Y., Hu, G., Su, J., Li, W., Chen, Q., Shou, P., Xu, C., Chen, X., Huang, Y., Zhu, Z., Huang, X., Han, X., Xie, N., and Ren, G. (2010) Mesenchymal stem cells: a new strategy for immunosuppression and tissue repair. *Cell Res.* **20**, 510–518

60. Bassi, E. J., Aita, C. A. M., and Câmara, N. O. S. (2011) Immune regulatory properties of multipotent mesenchymal stromal cells: Where do we stand? *World J. Stem Cells*. **3**, 1–8
61. Bunnell, B. A., Betancourt, A. M., and Sullivan, D. E. (2010) New concepts on the immune modulation mediated by mesenchymal stem cells. *Stem Cell Res. Ther.* **1**, 34
62. MacKenzie, K. F., Clark, K., Naqvi, S., McGuire, V. A., Nöehren, G., Kristariyanto, Y., van den Bosch, M., Mudaliar, M., McCarthy, P. C., Pattison, M. J., Pedrioli, P. G. A., Barton, G. J., Toth, R., Prescott, A., and Arthur, J. S. C. (2013) PGE(2) induces macrophage IL-10 production and a regulatory-like phenotype via a protein kinase A-SIK-CRTC3 pathway. *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* **190**, 565–577
63. Luan, B., Yoon, Y.-S., Le Lay, J., Kaestner, K. H., Hedrick, S., and Montminy, M. (2015) CREB pathway links PGE2 signaling with macrophage polarization. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **112**, 15642–15647
64. Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007) Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood.* **109**, 228–234
65. Niedbala, W., Cai, B., and Liew, F. Y. (2006) Role of nitric oxide in the regulation of T cell functions. *Ann. Rheum. Dis.* **65 Suppl 3**, iii37-40
66. Ren, G., Zhang, L., Zhao, X., Xu, G., Zhang, Y., Roberts, A. I., Zhao, R. C., and Shi, Y. (2008) Mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression occurs via concerted action of chemokines and nitric oxide. *Cell Stem Cell.* **2**, 141–150
67. Falus, A., Buzás, E., and Rajnavölgyi, É. (2007) *Az immunológia alapjai*, Semmelweis Kiadó és Multimédia Stúdió, Budapest
68. Wang, C., Yu, X., Cao, Q., Wang, Y., Zheng, G., Tan, T. K., Zhao, H., Zhao, Y., Wang, Y., and Harris, D. C. (2013) Characterization of murine macrophages from bone marrow, spleen and peritoneum. *BMC Immunol.* **14**, 6
69. Raes, G., De Baetselier, P., Noël, W., Beschin, A., Brombacher, F., and Hassanzadeh Gh, G. (2002) Differential expression of FIZZ1 and Ym1 in alternatively versus classically activated macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **71**, 597–602
70. Li, Z., Zhao, Z.-J., Zhu, X.-Q., Ren, Q.-S., Nie, F.-F., Gao, J.-M., Gao, X.-J., Yang, T.-B., Zhou, W.-L., Shen, J.-L., Wang, Y., Lu, F.-L., Chen, X.-G., Hide, G., Ayala,

- F. J., and Lun, Z.-R. (2012) Differences in iNOS and arginase expression and activity in the macrophages of rats are responsible for the resistance against *T. gondii* infection. *PLoS One*. **7**, e35834
71. Mosser, D. M., and Edwards, J. P. (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nat. Rev. Immunol.* **8**, 958–969
72. Biswas, S. K., and Mantovani, A. (2010) Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm. *Nat. Immunol.* **11**, 889–896
73. Edwards, J. P., Zhang, X., Frauwirth, K. A., and Mosser, D. M. (2006) Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations. *J. Leukoc. Biol.* **80**, 1298–1307
74. Nair, M. G., Gallagher, I. J., Taylor, M. D., Loke, P. 'ng, Coulson, P. S., Wilson, R. A., Maizels, R. M., and Allen, J. E. (2005) Chitinase and Fizz family members are a generalized feature of nematode infection with selective upregulation of Ym1 and Fizz1 by antigen-presenting cells. *Infect. Immun.* **73**, 385–394
75. Hao, N.-B., Lü, M.-H., Fan, Y.-H., Cao, Y.-L., Zhang, Z.-R., and Yang, S.-M. (2012) Macrophages in tumor microenvironments and the progression of tumors. *Clin. Dev. Immunol.* **2012**, 948098
76. Mantovani, A., Sica, A., Sozzani, S., Allavena, P., Vecchi, A., and Locati, M. (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol.* **25**, 677–686
77. Biswas, S. K., Gangi, L., Paul, S., Schioppa, T., Saccani, A., Sironi, M., Bottazzi, B., Doni, A., Vincenzo, B., Pasqualini, F., Vago, L., Nebuloni, M., Mantovani, A., and Sica, A. (2006) A distinct and unique transcriptional program expressed by tumor-associated macrophages (defective NF-kappaB and enhanced IRF-3/STAT1 activation). *Blood.* **107**, 2112–2122
78. Röszer, T. (2015) Understanding the Mysterious M2 Macrophage through Activation Markers and Effector Mechanisms. *Mediators Inflamm.* **2015**, 816460
79. Peister, A., Mellad, J. A., Larson, B. L., Hall, B. M., Gibson, L. F., and Prockop, D. J. (2004) Adult stem cells from bone marrow (MSCs) isolated from different strains of inbred mice vary in surface epitopes, rates of proliferation, and differentiation potential. *Blood.* **103**, 1662–1668

80. Urbán, V. S., Kiss, J., Kovács, J., Góczy, E., Vas, V., Monostori, E., and Uher, F. (2008) Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **26**, 244–253
81. Fujihara, M., Muroi, M., Tanamoto, K., Suzuki, T., Azuma, H., and Ikeda, H. (2003) Molecular mechanisms of macrophage activation and deactivation by lipopolysaccharide: roles of the receptor complex. *Pharmacol. Ther.* **100**, 171–194
82. Waite, J. C., and Skokos, D. (2012) Th17 response and inflammatory autoimmune diseases. *Int. J. Inflamm.* **2012**, 819467
83. Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P. S. T., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P. G., Leelahavanichkul, K., Koller, B. H., Brown, J. M., Hu, X., Jelinek, I., Star, R. A., and Mezey, E. (2009) Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E(2)-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nat. Med.* **15**, 42–49
84. Sudres, M., Norol, F., Trenado, A., Grégoire, S., Charlotte, F., Levacher, B., Lataillade, J.-J., Bourin, P., Holy, X., Vernant, J.-P., Klatzmann, D., and Cohen, J. L. (2006) Bone marrow mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro but fail to prevent graft-versus-host disease in mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950*. **176**, 7761–7767
85. Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., and Noël, D. (2010) IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PloS One*. **5**, e14247
86. Hegyi, B., Sági, B., Kovács, J., Kiss, J., Urbán, V. S., Mészáros, G., Monostori, E., and Uher, F. (2010) Identical, similar or different? Learning about immunomodulatory function of mesenchymal stem cells isolated from various mouse tissues: bone marrow, spleen, thymus and aorta wall. *Int. Immunol.* **22**, 551–559
87. Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L’huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A. I., Ji, W., Zhang, H., Rabson, A. B., and Shi, Y. (2009) Species variation in the mechanisms of mesenchymal stem cell-mediated immunosuppression. *Stem Cells Dayt. Ohio*. **27**, 1954–1962
88. Djouad, F., Charbonnier, L.-M., Bouffi, C., Louis-Plence, P., Bony, C., Apparailly, F., Cantos, C., Jorgensen, C., and Noël, D. (2007) Mesenchymal stem cells inhibit

- the differentiation of dendritic cells through an interleukin-6-dependent mechanism. *Stem Cells Dayt. Ohio.* **25**, 2025–2032
89. Esaki, Y., Li, Y., Sakata, D., Yao, C., Segi-Nishida, E., Matsuoka, T., Fukuda, K., and Narumiya, S. (2010) Dual roles of PGE2-EP4 signaling in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **107**, 12233–12238
90. Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., Cui, L., and Li, N. (2008) A critical role of IFN γ in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell Res.* **18**, 846–857
91. Xue, Q., Luan, X.-Y., Gu, Y.-Z., Wu, H.-Y., Zhang, G.-B., Yu, G.-H., Zhu, H.-T., Wang, M., Dong, W., Geng, Y.-J., and Zhang, X.-G. (2010) The negative co-signaling molecule b7-h4 is expressed by human bone marrow-derived mesenchymal stem cells and mediates its T-cell modulatory activity. *Stem Cells Dev.* **19**, 27–38
92. Yang, S.-H., Park, M.-J., Yoon, I.-H., Kim, S.-Y., Hong, S.-H., Shin, J.-Y., Nam, H.-Y., Kim, Y.-H., Kim, B., and Park, C.-G. (2009) Soluble mediators from mesenchymal stem cells suppress T cell proliferation by inducing IL-10. *Exp. Mol. Med.* **41**, 315–324
93. Chen, K., Wang, D., Du, W. T., Han, Z.-B., Ren, H., Chi, Y., Yang, S. G., Zhu, D., Bayard, F., and Han, Z. C. (2010) Human umbilical cord mesenchymal stem cells hUC-MSCs exert immunosuppressive activities through a PGE2-dependent mechanism. *Clin. Immunol. Orlando Fla.* **135**, 448–458
94. Murakami, M., and Kudo, I. (2004) Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E2-biosynthetic pathway. *Prog. Lipid Res.* **43**, 3–35
95. Duffy, M. M., Pindjakova, J., Hanley, S. A., McCarthy, C., Weidhofer, G. A., Sweeney, E. M., English, K., Shaw, G., Murphy, J. M., Barry, F. P., Mahon, B. P., Belton, O., Ceredig, R., and Griffin, M. D. (2011) Mesenchymal stem cell inhibition of T-helper 17 cell- differentiation is triggered by cell-cell contact and mediated by prostaglandin E2 via the EP4 receptor. *Eur. J. Immunol.* **41**, 2840–2851
96. Clarke, D. L., Clifford, R. L., Jindarat, S., Proud, D., Pang, L., Belvisi, M., and Knox, A. J. (2010) TNF α and IFN γ synergistically enhance transcriptional activation of CXCL10 in human airway smooth muscle cells via STAT-1, NF- κ B,

- and the transcriptional coactivator CREB-binding protein. *J. Biol. Chem.* **285**, 29101–29110
97. Croitoru-Lamoury, J., Guillemin, G. J., Boussin, F. D., Moggetti, B., Gigout, L. I., Chéret, A., Vaslin, B., Le Grand, R., Brew, B. J., and Dormont, D. (2003) Expression of chemokines and their receptors in human and simian astrocytes: evidence for a central role of TNF alpha and IFN gamma in CXCR4 and CCR5 modulation. *Glia.* **41**, 354–370
 98. Yasumoto, K., Okamoto, S., Mukaida, N., Murakami, S., Mai, M., and Matsushima, K. (1992) Tumor necrosis factor alpha and interferon gamma synergistically induce interleukin 8 production in a human gastric cancer cell line through acting concurrently on AP-1 and NF-kB-like binding sites of the interleukin 8 gene. *J. Biol. Chem.* **267**, 22506–22511
 99. Paludan, S. R. (2000) Synergistic action of pro-inflammatory agents: cellular and molecular aspects. *J. Leukoc. Biol.* **67**, 18–25
 100. Bastarache, J. A., Sebag, S. C., Grove, B. S., and Ware, L. B. (2011) Interferon- γ and tumor necrosis factor- α act synergistically to up-regulate tissue factor in alveolar epithelial cells. *Exp. Lung Res.* **37**, 509–517
 101. Sica, A., Erreni, M., Allavena, P., and Porta, C. (2015) Macrophage polarization in pathology. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS.* **72**, 4111–4126
 102. Fairweather, D., and Cihakova, D. (2009) Alternatively activated macrophages in infection and autoimmunity. *J. Autoimmun.* **33**, 222–230
 103. Li, Y., Lee, P. Y., and Reeves, W. H. (2010) Monocyte and macrophage abnormalities in systemic lupus erythematosus. *Arch. Immunol. Ther. Exp. (Warsz.).* **58**, 355–364
 104. Pineda-Torra, I., Gage, M., de Juan, A., and Pello, O. M. (2015) Isolation, Culture, and Polarization of Murine Bone Marrow-Derived and Peritoneal Macrophages. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ.* **1339**, 101–109
 105. Murray, P. J., and Wynn, T. A. (2011) Obstacles and opportunities for understanding macrophage polarization. *J. Leukoc. Biol.* **89**, 557–563
 106. Misharin, A. V., Saber, R., and Perlman, H. (2012) Eosinophil contamination of thioglycollate-elicited peritoneal macrophage cultures skews the functional readouts of in vitro assays. *J. Leukoc. Biol.* **92**, 325–331

107. Henson, P. M., and Bratton, D. L. (2013) Antiinflammatory effects of apoptotic cells. *J. Clin. Invest.* **123**, 2773–2774
108. Ben-Mordechai, T., Holbova, R., Landa-Rouben, N., Harel-Adar, T., Feinberg, M. S., Abd Elrahman, I., Blum, G., Epstein, F. H., Silman, Z., Cohen, S., and Leor, J. (2013) Macrophage subpopulations are essential for infarct repair with and without stem cell therapy. *J. Am. Coll. Cardiol.* **62**, 1890–1901
109. Melief, S. M., Schrama, E., Brugman, M. H., Tiemessen, M. M., Hoogduijn, M. J., Fibbe, W. E., and Roelofs, H. (2013) Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem Cells Dayt. Ohio.* **31**, 1980–1991
110. Cao, X., Han, Z.-B., Zhao, H., and Liu, Q. (2014) Transplantation of mesenchymal stem cells recruits trophic macrophages to induce pancreatic beta cell regeneration in diabetic mice. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **53**, 372–379
111. Ben-Mordechai, T., Palevski, D., Glucksam-Galnoy, Y., Elron-Gross, I., Margalit, R., and Leor, J. (2015) Targeting macrophage subsets for infarct repair. *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* **20**, 36–51
112. Canton, J. (2014) Phagosome maturation in polarized macrophages. *J. Leukoc. Biol.* **96**, 729–738
113. Delarosa, O., Dalemans, W., and Lombardo, E. (2012) Toll-like receptors as modulators of mesenchymal stem cells. *Front. Immunol.* **3**, 182
114. Billack, B. (2006) Macrophage activation: role of toll-like receptors, nitric oxide, and nuclear factor kappa B. *Am. J. Pharm. Educ.* **70**, 102
115. Martinez, F. O., and Gordon, S. (2014) The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment. *F1000prime Rep.* **6**, 13
116. Epelman, S., Lavine, K. J., and Randolph, G. J. (2014) Origin and functions of tissue macrophages. *Immunity.* **41**, 21–35
117. Hashimoto, D., Chow, A., Noizat, C., Teo, P., Beasley, M. B., Leboeuf, M., Becker, C. D., See, P., Price, J., Lucas, D., Greter, M., Mortha, A., Boyer, S. W., Forsberg, E. C., Tanaka, M., van Rooijen, N., García-Sastre, A., Stanley, E. R., Ginhoux, F., Frenette, P. S., and Merad, M. (2013) Tissue-resident macrophages self-maintain locally throughout adult life with minimal contribution from circulating monocytes. *Immunity.* **38**, 792–804

118. Biswas, S. K., and Lopez-Collazo, E. (2009) Endotoxin tolerance: new mechanisms, molecules and clinical significance. *Trends Immunol.* **30**, 475–487
119. Xiong, Y., and Medvedev, A. E. (2011) Induction of endotoxin tolerance in vivo inhibits activation of IRAK4 and increases negative regulators IRAK-M, SHIP-1, and A20. *J. Leukoc. Biol.* **90**, 1141–1148
120. Karlmark, K. R., Zimmermann, H. W., Roderburg, C., Gassler, N., Wasmuth, H. E., Luedde, T., Trautwein, C., and Tacke, F. (2010) The fractalkine receptor CX₃CR1 protects against liver fibrosis by controlling differentiation and survival of infiltrating hepatic monocytes. *Hepatology. Baltim. Md.* **52**, 1769–1782
121. Bakkar, N., Wang, J., Ladner, K. J., Wang, H., Dahlman, J. M., Carathers, M., Acharyya, S., Rudnicki, M. A., Hollenbach, A. D., and Guttridge, D. C. (2008) IKK/NF-kappaB regulates skeletal myogenesis via a signaling switch to inhibit differentiation and promote mitochondrial biogenesis. *J. Cell Biol.* **180**, 787–802
122. Papathanasiou, S., Rickelt, S., Soriano, M. E., Schips, T. G., Maier, H. J., Davos, C. H., Varela, A., Kaklamanis, L., Mann, D. L., and Capetanaki, Y. (2015) Tumor necrosis factor- α confers cardioprotection through ectopic expression of keratins K8 and K18. *Nat. Med.* **21**, 1076–1084
123. Freytes, D. O., Kang, J. W., Marcos-Campos, I., and Vunjak-Novakovic, G. (2013) Macrophages modulate the viability and growth of human mesenchymal stem cells. *J. Cell. Biochem.* **114**, 220–229
124. Prockop, D. J. (2013) Concise review: two negative feedback loops place mesenchymal stem/stromal cells at the center of early regulators of inflammation. *Stem Cells Dayt. Ohio.* **31**, 2042–2046
125. Szebeni, G. J., Kriston-Pál, É., Blazsó, P., Katona, R. L., Novák, J., Szabó, E., Czibula, Á., Fajka-Boja, R., Hegyi, B., Uher, F., Krenács, L., Joó, G., and Monostori, É. (2012) Identification of galectin-1 as a critical factor in function of mouse mesenchymal stromal cell-mediated tumor promotion. *PLoS One.* **7**, e41372
126. van den Berk, L. C. J., Jansen, B. J. H., Siebers-Vermeulen, K. G. C., Roelofs, H., Figdor, C. G., Adema, G. J., and Torensma, R. (2010) Mesenchymal stem cells respond to TNF but do not produce TNF. *J. Leukoc. Biol.* **87**, 283–289
127. Hegyi, B., Környei, Z., Ferenczi, S., Fekete, R., Kudlik, G., Kovács, K. J., Madarász, E., and Uher, F. (2014) Regulation of mouse microglia activation and

effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells Dev.* **23**, 2600–2612

128. Abumaree, M. H., Al Jumah, M. A., Kalionis, B., Jawdat, D., Al Khaldi, A., Abomaray, F. M., Fatani, A. S., Chamley, L. W., and Knawy, B. A. (2013) Human placental mesenchymal stem cells (pMSCs) play a role as immune suppressive cells by shifting macrophage differentiation from inflammatory M1 to anti-inflammatory M2 macrophages. *Stem Cell Rev.* **9**, 620–641

10. SAJÁT PUBLIKÁCIÓK JEGYZÉKE

10.1. A disszertációhoz kapcsolódó publikációk:

Kudlik Gy, Hegyi B, Czibula Á, Monostori É, Buday L, Uher F (2016) Mesenchymal stem cells promote macrophage polarization toward M2b-like cells. *Experimental Cell Research* 348:(1) 36-45.

Kudlik Gy, Matula Zs, Urbán SV, Uher F (2015) A makrofágpolarizáció szerepe a sebgyógyulásban és a szövetregenerációban. *Immunológiai Szemle* 7:(1) 27-37.

Hegyi B, Környei Z, Ferenczi S, Fekete R, Kudlik Gy, Kovács KJ, Madarász E, Uher F (2014) Regulation of mouse microglia activation and effector functions by bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Stem Cells And Development* 23:(21) 2600-12.

Hegyi B, Kudlik Gy, Monostori É, Uher F. (2012) Activated T-cells and Pro-Inflammatory Cytokines Differentially Regulate Prostaglandin E2 Secretion by Mesenchymal Stem Cells. *Biochem Biophys Res Commun* 419: 215-220.

Hegyi B, Sági B, Kudlik Gy, Uher F. (2012) A mesenchymalis őssejtek szerepe a gyulladáso- és immun-folyamatok szabályozásában. *Immunológiai Sz* 4:(2) 4-10

10.2. A disszertációtól független publikációk:

Dülk M, Kudlik Gy, Fekete A, Ernszt D, Kvell K, Pongrácz JE, Merő BL, Szeder B, Radnai L, Geiszt M, Csécsy DE, Kovács T, Uher F, Lányi Á, Vas V, Buday L (2016) The scaffold protein Tks4 is required for the differentiation of mesenchymal stromal cells (MSCs) into adipogenic and osteogenic lineages. *Scientific Reports* 6: 34280.

Matula Zs, Kudlik Gy, Urbán SV, Uher F (2016) „Quo vadis”, hematológia. *Orvosi Hetilap* 157:(46) 1819-1829.

Kudlik Gy, Matula Zs, Kovács T, Urbán SV, Uher F (2015) A pluri- és multipotencia határán: a ganglionléc összejtjei. *Orvosi Hetilap* 156:(42) 1683-1694.

Szabó E, Fajka-Boja R, Kriston-Pál É, Hornung Á, Makra I, Kudlik Gy, Uher F, Katona RL, Monostori É, Czibula Á (2015) Licensing by Inflammatory Cytokines Abolishes Heterogeneity of Immunosuppressive Function of Mesenchymal Stem Cell Population. *Stem Cells And Development* 24(18): 2171-2180.

Sági B, Maraghechi P, Urbán SV, Hegyi B, Szigeti A, Fajka-Boja R, Kudlik Gy, Német K, Monostori É, Gócza E, Uher F. (2012) Positional Identity of Murine Mesenchymal Stem Cells Resident in Different Organs is Determined in the Post-Segmentation Mesoderm. *Stem Cells Dev* 21: 814-828.

11. KÖSZÖNETNYILVÁNÍTÁS

Elsőként témavezetőmnek, **Dr. Uher Ferenc** professzor úrnak szeretném megköszönni, hogy még TDK hallgató koromban befogadott a laboratóriumába és fáradságot és időt nem sajnálva megtanított az össejtbiológiai kutatásban használatos módszerekre, és hogy tudását, tapasztalatait megosztotta velem. Hálás vagyok, hogy kérdéseimmel mindig fordulhattam hozzá, a munkámat minden lépésben támogatta és szakmai előrehaladásomat a szívéen viselte. Szintén sokat köszönhetek kollégámnak, **Dr. Hegyi Beátának**, akitől rengeteg gyakorlati módszert sajátíthattam el, türelmével, megértésével megkönnyítette a munkámat, valamint számos közös projektünk született a segítségével.

Köszönettel tartozom **Dr. Urbán S. Veronika**, **Dr. Sági Bernadett** és **Matula Zsolt** kollégáimnak, akik szintén támogatták munkámat és tapasztalataikat megosztották velem. Köszönet illeti asszisztensnőnk, **Ullrich Olgának**, és állatházi gondozónkat, **Szoták Gabriellának**, mert precíz, alapos munkájuk nélkül ezek az eredmények nem jöhettek volna létre.

Köszönöm a kollaborációs projektekben részt vett kollégáimnak is, **Dr. Monostori Évának** (MTA, SZBK, Genetikai Intézet), **Dr. Czibula Ágnesnek** (MTA, SZBK, Genetikai Intézet), hogy szakértelmükkel, munkájukkal segítették az eredmények megszületését és publikációját. Köszönöm **Dr. Német Katalinnak** (MTA, TTK, Enzimológiai Intézet), **Dr. Szepesi Áronnak**, **Szigeti Annának**, **Bátkai Mónikának** és **Baki Margitnak**, hogy a munkámban felhasznált mCherry gént expresszáló MSC-eket elkészítették nekünk. Továbbá köszönöm **Dr. Zeke Andrásnak** a statisztikai kiértékelésnél adott észrevételeit, ötleteit.

Hálával tartozom főnökömnek, **Dr. Buday Lászlónak** (MTA TTK Enzimológia Intézet), hogy lehetővé tette a munkám befejezését, és a dolgozat megírását, türelme és megértése nagy segítséget jelentett. Köszönöm **Dr. Vas Virágnak**, hogy kollaborációs partnerként segítette a munkámat, ötleteivel és lelkesedésével pedig támogatta a dolgozat megszületését. Köszönöm továbbá kollégáimnak, **Dülk Mettának**, **Koprivanacz Kittinek**, **Cserkaszkzy Annának**, **Haidar Zitának**, **Dr. Radnai Lászlónak**, **Merő Balázsnak** és **Szeder Bálintnak**, hogy türelmükkel és támogatásukkal megkönnyítették a dolgozat elkészítésének időszakát.

Hálásan köszönöm családomnak, hogy tanulmányaimat mindig támogatták, és mellettem álltak az idáig vezető hosszú úton, az élet minden területén, nélkülük nem tarthatnék most itt. Köszönöm páromnak, Kátai Tamásnak türelmét, lelkesítését és támaszát. Barátaimnak pedig hálás vagyok, hogy mellettem álltak és szívükön viselték az előrehaladásomat.