

A hypoxia és a hypoxiás prekondicionálás hatása humán csontvelői mesenchymalis őssejtekre

Doktori Tézisek

dr. Lakatos Kinga

Semmelweis Egyetem
Elméleti Orvostudományok Doktori Iskola



Témavezető: Prof. Dr. Merkely Béla

Hivatalos bírálók: Dr. Zádori Anita
Dr. Cervenák László

Szigorlati bizottság elnöke: Prof. Dr. Varga Gábor

Szigorlati bizottság tagjai: Dr. Németh Katalin
Dr. Kiss Levente

Budapest 2017

Bevezetés

Az őssejtek definíció szerint képesek szinte korlátlan számú osztódásra, önmegejítő képességük fenntartásával, ugyanakkor különféle érett sejttypusokká is differenciálódhatnak. Nehéz az őssejteket szigorúan csoportosítani, de a leggyakrabban használt kategóriák az embrionális, az indukált pluripotens és a felnőtt őssejtek. A mesenchymalis őssejtek (MSC) a felnőtt őssejtek csoportjába sorolhatók, ezek a sejtek postnatalisan elvesztik pluripotenciájukat, azonban nyugvó állapotban megtalálhatóak a felnőtt szervezetben, és szöveti inzultus esetén képesek proliferálni és differenciálódni az adott szövet érett és funkcionális sejtjeivé. A mesenchymalis őssejteket először rágcső csontvelőből izolálták Friedenstein és mtsai, mint nem-hematopoietikus stróma sejteket, melyek sejt kultúrában kolóniaképzésre voltak képesek, és csont-, porc-, valamint zsír irányba differenciálódtak. Első leírásuk óta gyakorlatilag minden felnőtt szövetből izoláltak hasonló tulajdonságú, perivascularis sejteket. A mesenchymalis őssejtek mai tudásunk szerint elsősorban niche sejtek, azaz szöveti őssejtek számára alkotnak speciális és az önmegejításhoz nélkülözhetetlen mikrokörnyezetet, ezt a legalaposabban a csontvelőben, a hematopoietikus őssejtek kapcsán tárták fel. A MSC-k képesek subcutan átültetve miniatűr csont-szervecske létrehozására és hematopoietikus mikrokörnyezet kialakítására, amelyben vérképzés is zajlik. A MSC-k fontos szerepet töltenek be az érújdonképződésben, többek között számos proangiogenikus fehérje szekrécióján keresztül. Továbbá a sejttenyésztésben felszaporított MSC-k képesek a sejtek és szövetek különböző noxiáira (pl. hypoxia) adott választ modulálni, az apoptózis gátlásával, a környező

sejtek túlélésének segítségével, érújdonképződés serkentésével, és a fibrosis gátlásával. Számos állatkísérletben nyert bizonyítást, hogy a MSC bevitel serkenti a sejt/szöveti regenerációt többek között miokardialis infarktusból, stroke után, és alsó végtagi ischaemiában. A biztató preklinikai vizsgálatok után rendkívüli gyorsasággal kísérleti humán alkalmazásra kerülő MSC terápia azonban igen szerény, több metaanalízis szerint csak neutrális hatással bírt például miokardialis infarktus akut vagy szubakut szakában illetve krónikus szívelégtelenségben. Ennek hátterében az egyik fontos mechanizmus a sejtbeadást követő rövid túlélés és alacsony retenció az ischaemiás szövetben. Az irodalomban számos stratégia ismert ennek áthidalására, például a különböző hypoxias, farmakológiai és genetikai prekondicionálások, melyek javították a sejtek túlélését és regeneratív kapacitását miokardialis infarktus, traumás agysérülés és hátsó végtagi ischaemia kísérletes modelljeiben, azonban ennek oka még nem teljesen feltárt.

Hypoxia hatására jelentős változások következnek be a MSC proliferációban, differenciációban és migrációban, valamint változik a MSC-k által szekretált fehérjék szintje. Az eddigi vizsgálatok ebben a témában rendszerint normoxiában és egyféle, alacsony oxigénkoncentrációban tenyésztett sejteket hasonlítottak össze, és egymástól eltérő eredményekre jutottak. Hypoxiában a sejtek lipidösszetétele is megváltozik, valamint régóta ismert, hogy a lipidek nem csupán az energiatárolásban és a membránalkotásban, hanem sokféle jelátviteli folyamatban is nélkülözhetetlenek. Az őssejtek és ezen belül a MSC-k lipid összetételét és a hypoxia hatására bekövetkező változásokat kevesen vizsgálták eddig.

Célkitűzéseink

Elsőként a különböző mértékű hypoxia (1%, 5%, 10% O₂) MSC differenciációra és proliferációra kifejtett hatását vizsgáltuk és hasonlítottuk össze normoxias sejtekkel. Vizsgáltuk továbbá, hogy a hypoxias prekondicionálás (HP) javítja-e a sejtek túlélését egy oxigén- és tápanyagszegény *in vitro* környezetben, és hogy okoz-e metabolikus változásokat, ezt a sejtek által elhasznált glükóz mennyiségének és a laktátszekréció mértékének mérésével követtük. Vizsgáltuk, hogy a hypoxias prekondicionálás fokozza-e a sejtretenciót *in vivo*, egerekbe való intramuscularis beadást követően. Elemeztük az MSC-k lipid összetételét normoxiában és a lipid összetételben hypoxia hatására létrejövő esetleges változásokat, valamint, hogy a lipidszintek változásai milyen lehetséges funkcionális következményekkel járnak MSC-kben, az angiogenikus fehérje-szekréció példáján keresztül.

Módszerek

Mesenchymalis őssejt izoláció és sejt kultúra

Kísérleteinkhez egészséges önkéntesekből nyert teljes humán csontvelőből mesenchymalis őssejteket izoláltunk, az ismert módszerek szerint. A sejt szaporítást 20% oxigénben (5% CO₂), 37 °C-on végeztük, 10% marhaszérummal (FBS) szupplementált tápfolyadékban.

Sejtproliferáció és differenciáció vizsgálata

A sejteket 10%, 5%, és 1% O₂ koncentrációjú inkubátorokban tenyésztettük, a kontroll sejteket 20% oxigénben, 12 napig. A jelzett időpontokban a sejteket trypsinnel felszedtük, majd haemocytometerrel számoltuk, Trypan kék festék hozzáadása után. Sejtciklus analízishez 4 napig tenyésztettük a sejteket a fent jelzett 4- féle oxigénkoncentrációban, majd ethanollal permeabilizáltuk, és propídium jodid jelöléssel és áramlási citométerrel mértük a sejtek DNS tartalmát. A differenciációt adipogén és osteogen differenciációs médiumban vizsgáltuk, a sejteket a fenti 4-féle oxigén koncentrációban tenyésztve. Az adipogén differenciációt olajvörös O festékkel, az osteogen differenciációt alkalikus foszfatáz aktivitás mérésével, a kalcium-lerakódás mértékét Alizarin vörössel mutattuk ki és kvantifikáltuk.

In vitro sejttúlélés vizsgálat

A sejteket 0 (kontroll), 16, 48, illetve 96 órán keresztül prekondicionáltuk 1% oxigénben, teljes médiumban, majd az összes sejtet 1% O₂-be helyeztük szérumentes médiumban 12 napra, miközben minden harmadik napon haemocytométerrel sejtszámolást végeztünk, Trypan kék festék hozzáadása után. A élő/halott sejtek arányának vizsgálatához az MSC-eket üveg fedőlemezen tenyésztettük 48 órán át 1 vagy 20% oxigénben, teljes médiumban, majd a sejteket 1% O₂-be helyeztük 9 napra, szérumentes médiumban. A 9. napon a sejtmagot DAPI-val, a halott sejteket Etídium homodimer III-mal jelöltük, és fluoreszcens mikroszkóppal automata sejtszámlálást végeztünk. Az apoptotikus

sejteket phycoerythrin-Annexin V apoptózis kittel, és áramlási citométerrel kvantifikáltuk.

Sejretenció vizsgálata *in vivo*

A három különböző donorból izolált luciferáz expresszáló MSC-eket (lentivirális transzdukció, pCCLc-MNDU3-Luciferase-PGK-eGFP-WPRE) teljes médiumban 48 órán át 20% ill. 1% oxigénben (HP) prekondicionáltuk, majd nem-obez diabetikus súlyos kombinált immundeficiens (NOD/SCID-ILR γ / γ) egerekbe adtuk be intramuscularisan (14 állat/ kísérleti csoport, 2×10^5 sejt/ állat). A beadás helyén a sejretenciót 28 napon keresztül követtük, a képalkotás az első, majd minden 7. napon történt, intraperitoneális luciferin szubsztrát beadást követően *in vivo* képalkotó rendszerrel (IVIS).

Glükóz és laktát mérés

A sejteket 16, 48 és 96 órán keresztül 1% O₂-ben tenyésztettük normoxias kontroll mellett, majd a felülúszóból megmértük a glükóz és laktát szinteket. A sejteket ezután az *in vitro* túlélés assay-nél leírtakkal azonos módon tenyésztettük, és minden harmadik napon legyűjtöttük a felülúszókat, majd kolorimetrikus módszerrel mértük a glükóz és laktát koncentrációt.

Nagyteljesítményű folyadékkromatográfia (HPLC) – elektropray ionizáció (ESI) – quadrupol time-of-flight tandem tömegspektrometria (QTOF-MS/MS)

A sejteket 48 órán át 20 illetve 1 % oxigénben tenyésztettük, majd kromatográfiás elválasztás után elektropray ionizáció, végül tandem tömegspektrometria módszerekkel került analízisre az MSC-k lipid összetétele. A lipidek jelölése: [lipid osztály] [össz- szénatom szám a szénláncban] [kettős kötések száma].

A diglicerid (DG) szint mérése enzim- kapcsolt immunoszorbens assay-vel (ELISA)

Az MSC-eket 1% illetve 20% oxigénben tenyésztettük, a phosphatidyl-cholin- specifikus phospholipáz C (PC-PLC) és a sphingomyelin synthase (SMS) enzimeket gátló D609 (50 μ M) hozzáadásával vagy a nélkül. Normoxiában, kobalt-klorid (CoCl_2 , 100 μ M) jelenlétében is vizsgáltuk a sejteket. 48 óra után a sejtekből lipidextrakciót végeztünk, majd ELISA módszerrel mértük a sejtek digliceridtartalmát.

Angiogenikus faktorok detektálása

Az MSC-eket a DG mérésnél leírtakkal azonos módon tenyésztettük, majd a sejtek felülúszójából ELISA módszerrel meghatároztuk a szekretált vascularis endothelialis növekedési faktor (VEGF), az interleukin 8 (IL-8) és az angiopoinetin 2 (Ang-2) mennyiségét. A VEGF, az IL-8 és az Ang-2 mRNS szintméréshez RNS extrakciót, reverz transzkripciót és real time polimeráz láncreakciót (RT-PCR) végeztünk Taqman primerekkel és próbákkal.

In vitro „sebgyógyulás” assay

Az MSC-eket a DG mérésnél leírtakkal azonos módon tenyésztettük, majd a sejtekről felülúszókat gyűjtöttünk. VeraVecs endothel sejteket tenyésztettünk plasztik inzertet tartalmazó plate-eken, melynek következtében a sejt monolayerek között egy homogén, 500 μm -es hiány keletkezik. Az endothelsejteken a médiumot ezután az MSC-kről legyűjtött felülúszóra cseréltük. A sejteket rögtön ekkor, majd 10 órával később fotóztuk, és az endotélsejt migráció mértékét TScratch szoftverrel kvantifikáltuk. A sebzáródást a kezdeti és a 10 órás hiány arányaként határoztuk meg.

Statisztikai elemzés és adatközlés

Minden kísérletet minimum háromszor ismételtünk, különböző donorokból származó MSC-kkel. Az eredmények számtani közepét és az átlagtól való átlagos eltérést (SEM) tüntettük fel. Két kísérleti csoport összehasonlításához Student-féle t-próbát használtunk $p < 0.05$ szignifikanciaszinttel, négy kísérleti csoporthoz pedig ANOVA (analysis of variance) módszert, vagy Student-féle t-próbát Bonferroni korrekcióval $p < 0.0125$ szignifikanciaszinttel.

Eredmények

A hypoxia dóziszfüggő módon gátolja az MSC-k proliferációját és differenciációját

Vizsgáltuk a mélyülő hypoxia hatását az MSC-k differenciációjára és proliferációjára, 20, 10, 5 és 1% oxigénben tenyésztve a sejteket. A

proliferációs assay, a sejtciklus analízis és az adipogén illetve osteogen differenciációs assay alapján azt találtuk, hogy a hypoxia mérsékli az MSC-k proliferációját és csökkenti differenciációját, dózisfüggő módon. Az 1% oxigénben történő tenyésztés volt a legerősebb hatással az MSC-re, míg a 10% O₂ csak minimális mértékben befolyásolta a sejtproliferációt és differenciációt.

A hypoxias prekondicionálás hatására javul az MSC-k túlélése *in vitro*

A sejteket 0, 16, 48 vagy 96 órán át 1% oxigénben prekondicionáltuk teljes médiumban, majd 1% oxigénben és szérummentes tápfolyadékban tenyésztettük 12 napon át, így szimulálva egy oxigén- és tápanyagszegény környezetet. A 12. napra gyakorlatilag nem találtunk élő sejtet egyik kísérleti csoportban sem, azonban a 48 és 96 órán át prekondicionált sejtek szignifikánsan nagyobb arányban éltek túl, a hatodik napon történt sejszámolás szerint, míg a 16 órás prekondicionálás nem serkentette a túlélést a kontroll csoporthoz képest. Ezeket az eredményeket megerősítendő, az MSC-ket ethidium homodimerrel illetve Annexin V-tel jelöltük, és azt találtuk, hogy 9 nap oxigén- és szérummegvonás után a hypoxiában prekondicionált sejtpopulációban szignifikánsan alacsonyabb volt a halott és az apoptotikus sejtek mennyisége, mint a kontroll (nem prekondicionált) sejtpopulációban.

A hypoxia fokozza az MSC-k retencióját *in vivo*

Lentivirális transzdukcióval luciferáz expresszáló MSC-ket hoztunk létre, majd a sejteket 48 órán át 20% ill. 1% oxigénben prekondicionáltuk, majd súlyos kombinált immundeficiens egerekbe adtuk

be intramuscularisan. A sejttretenciót 28 napon át követve azt láttuk, hogy a hypoxiában prekondicionált sejtek szignifikánsan nagyobb arányban éltek túl a beadást követően, és még a 28. napon is detektálhatóak voltak alacsony mennyiségben, míg a nem-prekondicionált sejtek ekkor már nem voltak detektálhatóak.

A hypoxias prekondicionált MSC felülűszójában több glükóz marad szérum- és oxigénmegvonás során

A sejteket 16, 48 és 96 órán tenyésztettük 1% oxigénben, normoxias kontroll mellett, és azt találtuk, hogy a 96 órán át hypoxiában tenyésztett sejtek felülűszójában szignifikánsan magasabb a glükóz szint a többi kísérleti csoporthoz viszonyítva, illetve, hogy a 48 és a 96 órán át hypoxiában tenyésztett sejtek felülűszójában szignifikánsan magasabb volt a laktát szint, mint a 16 órás hypoxia után, illetve a normoxiás kontrollban. Majd 3 napos szérumdepriváció és hypoxia után vizsgálva a sejteket azt láttuk, hogy a 48- és 96 órán át prekondicinált sejtek felülűszójában szignifikánsan magasabb a glükóz szint és szignifikánsan alacsonyabb a laktát szint, mint a 16 óráig prekondicionált sejtekben illetve a nem-előkezelt csoportban.

Az MSC-k lipidösszetétele

Öt különböző egészséges donorból izoláltunk MSC-eket, majd 48 órán át 20% illetve 1% oxigénben tenyésztettük őket. A HPLC-ESI-QTOF-MS/MS módszerrel 1956 különböző molekuláris ion volt detektálható, ezek közül 390 ion volt azonosítható az ismert lipidek egyikeként a LipidBLAST könyvtár segítségével. Ezek közül a legnagyobb arányban a

phosphatidylcholine (PC) lipidek voltak jelen (76.5%), a sphingomyelin (SM) 11%-ban, phosphatidylethanolaminok (PE) 2%-ban és a trigliceridek (TG) 2%-ban voltak jelen. Összességében, a PC, SM, PE és TG lipidek alkották az azonosított lipidek 90%-át. A legnagyobb mennyiségben detektált lipid a PC (18:1/16:0) volt.

Hypoxia hatására számos lipid szintje emelkedik MSC-ben

Kétféle módszerrel vizsgáltuk a hypoxia hatására bekövetkezett változásokat a lipidszintekben: először lipidosztály szerint összehasonlítva, ahol azt találtuk, hogy hypoxia hatására szignifikánsan nő a triglicerid, diglicerid lipidek, valamint a zsírsavak szintje. Másodszor, a lipideket egyesével összehasonlítva azt láttuk, hogy 41 lipid szintje szignifikánsan emelkedik hypoxiában, különösen is a digliceridek, melyek összes detektált fajtája emelkedett volt a hypoxias mintákban. Ezt az eredményt ELISA módszerrel is megerősítettük, illetve a hypoxia-szimuláló ágens, kobalt-klorid jelenlétében. Azt vizsgálándó, hogy a hypoxiában megfigyelt DG-szintnövekedés jár-e funkcionális változásokkal, D609-et adtunk a sejtekhez, mely gátolja a PC-PLC és SMS enzimeket, így két ponton is gátolva DG képződést. Azt tapasztaltuk, hogy 50 uM D609 hatására csökkent a DG szint az MSC-ben hypoxiában, de nem normoxiában.

A D609 kezelés befolyásolja az angiogénikus fehérjék szekrécióját

Az MSC-eket 48 órán át 20% illetve 1% oxigénben, D609 jelenlétében illetve a nélkül tenyésztettük, majd legyűjtöttük a sejtek felülúszóját és meghatároztuk a szekretált VEGF, IL-8 és Ang-2 szinteket. Hypoxia hatására szignifikánsan emelkedett a VEGF szintje, míg D609

hatására csökkent a VEGF szintje hypoxiában és normoxiában is. Ezzel ellentétben, az IL-8 szintje csökkent hypoxiában, míg D609 hatására emelkedett a szintje hypoxiában és normoxiában is. Az Ang-2-t az MSC csak nagyon alacsony mennyiségben szekretálták, emellett figyeltük meg, hogy hypoxiában csökkent a szintjük, míg a D609 hozzáadása tovább csökkentette a szekretált Ang-2 mennyiségét. A trendek hasonlóak voltak génexpressziós szinten is. A VEGF és az Ang-2 mRNS szintje változott hypoxia hatására, azonban a többi kísérleti csoport között nem volt szignifikáns különbség az mRNS szintek között.

D609 hatására mérséklődik az MSC-k endothel migrációt serkentő hatása *in vitro*

Az MSC-eket 48 órán át 20% illetve 1% oxigénben, D609 jelenlétében illetve a nélkül tenyésztettük, legyűjtöttük a sejtek felülúszóját, majd vizsgáltuk, hogy a kondicionált médium hogyan hat az endothelsejtek *in vitro* migrációjára. Azt találtuk, hogy az endothel sejtek migrációja szignifikánsan kisebb mértékű volt a D609-cel, hypoxiában előkezelt MSC-ről származó felülúszóban, mint a kezeletlen hypoxias MSC-k felülúszójában. Azonban a D609 nem okozott jelentős különbséget a normoxiában tenyésztett MSC-k felülúszójának endothel migrációt serkentő kapacitásában.

Következtetések

Noha a mesenchymalis őssejtek jótékony hatását a szöveti regenerációra számtalan állatkísérlet igazolta, humán vizsgálatokban igen

szerény, vagy csak neutrális hatással bírtak. Emiatt véleményem szerint továbbra is nagyon fontos az MSC-k alapvető tulajdonságainak laboratóriumi vizsgálata, valamint különböző módszerek alkalmazása, melyek javítják a sejtek retencióját a regenerálódó szövetekben sejterápiás alkalmazások során.

A sejtek túlélésének és terápiás kapacitásának növelésére többféle prekondicionálási stratégiát írtak le az irodalomban, a hypoxiás az egyik gyakran alkalmazott ilyen stratégia, amely fokozta az MSC terápia regeneratív hatását például alsó végtagi ischaemia modellekben. A hypoxiás prekondicionálás hatására fokozódik a sejtek retenciója és túlélése a beadás helyén, azonban nem teljesen ismert, hogy milyen mechanizmussal.

A hypoxia hatását MSC-ken vizsgálva azt láttuk, hogy a hypoxia dóziszfüggő módon csökkenti az MSC-k proliferációját, valamint az adipogén és osteogen differenciációját. A jövőben ez fontos szempont lehet csontdefektusok sejterápiája során. *In vitro* és *in vivo* körülmények közt vizsgáltuk a hypoxiás prekondicionálás hatását MSC-ken. Az tapasztaltuk, hogy a hypoxiás prekondicionálás javította a sejtek túlélését kombinált szérummegvonás és hypoxia során. Megállapítottuk, hogy az 1%-os O₂ optimális hypoxiaszint a prekondicionáláshoz. Megállapíthatjuk továbbá, hogy a (minimum) 48 óra optimális időtartam a hypoxiás prekondicionáláshoz, hiszen kísérleteink során a 16 óra prekondicionálás nem befolyásolta a sejtek túlélését, míg a 48 és 96 óra jelentős növelte a sejtek túlélési arányát *in vitro* kombinált szérummegvonás és hypoxia során. Még fontosabb, hogy 48 óra hypoxiás prekondicionálás hatására szignifikánsan emelkedett az MSC-k retenciója *in vivo* intramuscularis

injekciót követően egerekben. Eredményeink alapján javasoljuk mind a kísérletes, mind a klinikai vizsgálatokban az MSC hypoxiás prekondicionálását sejterápiás alkalmazások során.

Vizsgáltuk a sejtek anyagcseréjében bekövetkező változásokat. Hypoxiában történő tenyésztés során 96 óra után a sejtek felülűszójában szignifikánsan magasabb glükóz koncentráció volt mérhető, mint 0, 16 vagy 48 óránál. Három napos *in vitro* kombinált szérummegvonás és hypoxia mellett pedig azt láttuk, hogy a 48 és 96 órán át prekondicionált sejtek felülűszójában szignifikánsan magasabb volt a glükóz szint, mint a 16 órán át prekondicionált sejtekben és a kontroll sejtekben. Eredményeinkből arra következtetünk, hogy hypoxias prekondicionálás során a sejtek metabolizmusa megváltozik, alacsonyabb ütemben használják fel a számukra elérhető glükózt, így „gazdaságosabban” bálnak az elérhető energiaforrással, újabb hypoxia- és szérummegvonás esetén.

Vizsgáltuk továbbá a hypoxia hatására bekövetkező változásokat a sejtek lipidösszetételében. Ismert ugyanis, hogy a lipidek nem csupán a sejtek energiátárolásában és a biológiai membránok felépítésében vesznek részt, hanem fontos jelátviteli és szabályozó szerepük is van szinte minden celluláris folyamatban. Azt találtuk, hogy hypoxia hatására számos lipid szintje megemelkedik MSC-ben, különösen is az összes azonosított diglicerid szintje. Az össztriglicerid és az össz- zsírsav szint is emelkedett hypoxiában, amit annak tulajdonítunk, hogy hypoxiában a sejtek nem képesek végrehajtani az oxigénigényes zsírsav-bétaoxidációt, így felhalmozódnak a sejtben. Tovább vizsgálva, hogy a látott diglicerid emelkedés jár-e funkcionális következményekkel, D609 hozzáadásával gátoltuk mind a phosphatidylcholine- specifikus phospholipase C, mind a

sphingomyelin synthase enzimét, így több ponton is gátolva a diglicerid képződését. Vizsgáltuk, hogy a D609-cel történő kezelés hatására változik-e a MSC-k által szekretált angiogenikus fehérjék szintje. Hypoxiában a VEGF szintje szignifikánsan emelkedett, azonban D609 hatására szintje lecsökkent. Az interleukin 8 szintje hypoxiában szignifikánsan csökkent, azonban D609 hatására szintje emelkedett. Az angiopoetin 2-t az MSC-k csak nagyon alacsony mennyiségben szekretálták, de hypoxia hatására szintjük csökkent, majd D609 hatására tovább csökkent. A VEGF, az IL-8 és az Ang-2 mRNS szintjében a D609 nem okozott szignifikáns változásokat, így azt a következtetést vontuk le, hogy a szabályozás nem génexpressziós szinten, hanem a fehérjeszintézis vagy fehérjeszekréció szintjén történik. Az MSC-t 48 órán át hypoxiában vagy normoxiában, D609-cel vagy a nélkül tenyésztettük, majd legyűjtöttük a sejtek felülúszóját. *In vitro* „sebgyógyulási” assay-ben vizsgáltuk ezen felülúszók hatását az endothel migrációra. Azt láttuk, hogy D609 hatására a hypoxiában tenyésztett MSC-k endothel-migrációt serkentő kapacitása csökkent, míg a normoxiában tenyésztett mesenchymalis őssejteké nem változott. Így megállapíthatjuk, hogy valószínűleg hypoxiában és normoxiában eltér az MSC-kben az endothel-migrációt serkentő szignalizáció, és hogy hypoxiában a diglicerid szintek erősebben befolyásolják ezt a folyamatot.

Az általunk leírt változások az MSC-k lipidösszetételében *in vitro* eredmények, és elsősorban az alapkutatás szempontjából érdekesek, azonban később szerepet kaphatnak klinikai sejterápiák során is.

Publikációk listája

Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. Beegle J, Lakatos K, Kalomoiris S, Stewart H, Isseroff RR, Nolta JA, Fierro FA. Hypoxic preconditioning of mesenchymal stromal cells induces metabolic changes, enhances survival, and promotes cell retention in vivo. *Stem Cells*. 2015;33(6):1818-28.
2. Lakatos K, Kalomoiris S, Merkely B, Nolta JA, Fierro FA. Mesenchymal Stem Cells Respond to Hypoxia by Increasing Diacylglycerols. *J Cell Biochem*. 2016;117(2):300-7.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

3. Kalomoiris S, Cicchetto AC, Lakatos K, Nolta JA, Fierro FA. Fibroblast Growth Factor 2 Regulates High Mobility Group A2 Expression in Human Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stem Cells. *J Cell Biochem*. 2016;117(9):2128-37.
4. Nardai S, Dobolyi A, Skopál J, Lakatos K, Merkely B, Nagy Z. Delayed Gelatinase Inhibition Induces Reticulon 4 Receptor Expression in the Peri-Infarct Cortex. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2016;75(4):379-85.
5. Nardai S, Dobolyi A, Pál G, Skopál J, Pintér N, Lakatos K, Merkely B, Nagy Z. Selegiline promotes NOTCH-JAGGED signaling in astrocytes of the peri-infarct region and improves the functional integrity of the neurovascular unit in a rat model of focal ischemia. *Restor Neurol Neurosci*. 2015;33(1):1-14.
6. Lakatos K, Dékány G, Lendvai Zs, Berta B, Molnár L, Becker D, Nagy Z, Merkely B, Skopál J. Adrenaline induced platelet aggregation in patients with coronary artery disease undergoing stent implantation. *Cardiologia Hungarica* 2012; 42 : 106–111