

Szent István Egyetem, Állatorvos-tudományi Kar
Ökológia Tanszék

Az egér-mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitásának vizsgálata

Készítette: Kudlik Gyöngyi

Témavezető: Dr. Uher Ferenc
Országos Vérellátó Szolgálat, Őssejt-biológiai Laboratórium

Budapest

2011

Tartalomjegyzék

Tartalomjegyzék	2
Rövidítésjegyzék	4
Bevezetés	5
Irodalmi áttekintés	6
1. A csontvelőből izolált mesenchymalis őssejtek és immunszuppresszív aktivitásuk	6
2. A zsírszövet-eredetű mesenchymalis őssejtek	10
3. A makrofágok	11
Célkitűzések	15
Anyagok és módszerek	16
1. Kísérleti állatok	16
2. Mesenchymalis ősz-/stromasejtek izolálása és tenyésztése	16
3. Sejtfelületi markerek vizsgálata	17
4. A mesenchymális őssejtek differenciáltatása	17
5. A makrofágok izolálása	18
6. A makrofágok fagocitózis-intenzitásának vizsgálata	18
7. A TNF α -, az IL-10 és a prosztaglandin-E2-termelés mérése	19
8. Statisztikák	19
Eredmények	20
1. A mesenchymalis őssejtek karakterizálása	20
2. A mesenchymalis őssejtek hatása a makrofágok élesztő-fagocitózisára	23
3. A mesenchymalis őssejtek hatása a makrofágok TNF α , IL-10 és prosztaglandin-E2 termelésére:	25
a. A Mf-kultúrák felülszóiiban mérhető TNF α , IL-10 és PGE2 szintjének változása csontvelői és zsírszöveti eredetű MSC-k, valamint endotoxin (LPS) jelenlétében	25
b. A Mf-BM-MSK ko-kultúrák felülszóiiban mérhető TNF α , IL-10 és PGE2 szintjének változása élesztősejtek, illetve apoptotizáló thymocyták bekebelezését követően	27
4. A Mf-ok CD206 expressziójának mérése	29

Az eredmények megvitatása	31
Konklúzió	34
Összefoglalás	35
Abstract	37
Köszönetnyilvánítás	39
Irodalomjegyzék	40

Rövidítésjegyzék

AD-MSC, BM-MSC: (adipose-derived stem/stromal/progenitor cell) zsírszövet eredetű ős-/stroma-/progenitorsejt; (bone marrow stromal cell) csontvelői eredetű ős-/stromasejt

CD206: mannóz receptor

CFU-F: (colony forming unit fibroblast) fibroblaszt-szerű kolóniaképző sejt

DC: (dendritic cell) dendritikus sejt

DMEM: Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium

EGF: (Epidermal Growth Factor) epidermisz növekedési faktor

FCS: (Fetal Calf Serum) főtális borjú savó

FGF: (Fibroblast Growth Factor) fibroblaszt növekedési faktor

FITC: fluoreszcein izotiocianát

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

HGF: (hepatocyte growth-factor) hepatocita növekedési faktor

HLA: (human leukocyte antigen) humán leukocita antigén

IGF: (Insulin-like Growth Factor) inzulin-szerű növekedési faktor

IL-10: interleukin-10

IMT: indometacin

IFN γ : gamma interferon

LPS: lipopoliszacharid

M1, M2: klasszikus, ill. alternatív úton aktivált (makrofág)

M-CSF: (macrophage colony-stimulating factor) makrofág kolónia-stimuláló faktor

Mf: makrofág

MHC I,II: (main histocompatibility complex I) fő hisztokompatibilitási génkomplex I, II

MSC: (mesenchymal stem cell) mesenchymalis őssejt

NK-sejt: (natural killer cell) természetes ölüsejt

PBS: (phosphate buffered saline) foszfáttal pufferelt sóoldat

PGE2: prosztaglandin-E2

SDS: (sodium dodecyl sulphate) nátrium-dodecil-szulfát

TGF- β 1: (transforming growth factor β 1) transzformáló növekedési faktor- β 1

Th1, Th2: 1-es/2-es típusú helper T-sejt

TLR: Toll-like receptor

TNF α : tumor-nekrózis faktor alfa

Bevezetés

Jelen munkánkban a szöveti őssejtek egy típusával, a mesenchymalis őssejtekkel (MSC-k) végeztünk vizsgálatokat. Ezek a multipotens sejtek – mint minden szöveti őssejt – hosszú ideig képesek aszimmetrikus osztódás révén önmaguk fenntartására, és ugyanakkor meghatározott (fiziológiás vagy kísérleti) körülmények között speciális funkciót ellátó, differenciálódott leánysejtek létrehozására. Számos szervben illetve szövetben fellelhetők, mint például a csontvelő, az izom, a bél, a zsírszövet, a lép stb., ahol szövetfenntartó, regeneráló, stromaképző, immunmoduláló és vérképzést támogató tulajdonságaik révén járulnak hozzá a szervezet működéséhez¹. Mivel MSC-specifikus sejtfelületi markerek máig nem ismertek, meghatározásuk három szempont szerint történik, melyeknek együttes fennállása szükséges az MSC-k definiálásához:

1. Plasztik-adherencia: standard kultúrában tenyésztve a sejteknek ki kell tapadniuk a tenyésztőedény falára megnyúlt, fibroblaszt-szerű morfológiát mutatva;
2. Sejtfelületi markerek: a következő markereknek jelen kell lenniük: CD105, CD73, CD90, valamint vérfejlődési sorokra jellemző markerekre feltétlenül negatívnak kell lenniük: CD45, CD34, CD14, CD11b, CD79a, CD19 és HLA-DR;
3. Differenciálódás: képesnek kell lenniük osteoblast, chondrocyta és adipocyta irányba differenciálódni in vitro körülmények között².

Egyes vizsgálatok szerint az MSC-k nem csak a mesodermális eredetű sejtípusok létrehozására lehetnek képesek (transzdifferenciáció), ha speciális tenyésztési körülményeket biztosítanak számukra. Így nem csak csont-, porc-, ín- és zsírsejtek, váz- és szívizomsejtek, hanem neuronok, májsejtek, hasnyálmirigy szigetsejtek, stb. is létrehozhatók belőlük³.

Az MSC-kkel való munkát nagyban segíti, hogy könnyen izolálhatók, és viszonylag egyszerű a belőlük létrehozott sejtenyészeteket fenntartani. A szövetek fenntartásában és regenerálásában, valamint a gyulladásos és immunfolyamatok gátlásában betöltött szerepüknek köszönhetően fontos szerepet kapnak a különböző autoimmun betegségek kezelésében, transzplantációs technikák fejlesztésében, és a szövetregenerációt igénybe vevő kutatásokban.

Irodalmi áttekintés

1. A csontvelőből izolált mesenchymalis őssejtek és immunszuppresszív aktivitásuk

Elsőként Friedenstein és mtsai⁴ (1968) izoláltak a csontvelőből olyan kolóniaképző sejteket, melyek fibroblaszt-szerű morfológiát mutattak, és in vitro a tenyésztőedény falához kitapadva növekedtek (adherencia). Ezek alapján a sejteket CFU-F-nek (colony forming unit fibroblast) nevezték el. Speciális induktorok segítségével a sejteket csont- és porc irányba tudták differenciáltatni. Vizsgálataikból kiderült továbbá, hogy a CFU-F-ek olyan speciális mikrokörnyezet kialakítására képesek, amely alkalmas a vérképző ő- és elődsejtek fejlődésének biztosítására. Ma már a szakirodalom az ilyen tulajdonságokkal rendelkező sejteket mesenchymalis őssejtekként, mesenchymalis stroma sejtekként vagy multipotens stroma sejtekként (MSC-k) definiálja.

A mesenchymalis „stromasejt” elnevezés jelzi, hogy ezek az MSC-k valójában nem alkotnak homogén kultúrákat, ugyanis a tenyészetekben mindig találhatók a multipotens, osztódó sejtek mellett spontán differenciálódó alakok is, melyek az elődjeiktől eltérően már kisebb-nagyobb mértékben elköteleződött tri-, bi- vagy unipotens elődsejtek⁵. Ezeknek a sejteknek és a „valódi” MSC-knek a morfológiája között alig, vagy egyáltalán nem figyelhető meg számottevő különbség, de még sejtfelületi markereik alapján sem különíthetők el jól egymástól, tekintve, hogy csak multipotens őssejtekre jellemző sejtfelületi marker(ek) egyelőre nem ismert(ek). Ezek miatt az elkülönítési nehézségek miatt heterogén mesenchymalis sejtkultúrákon zajlanak a különböző vizsgálatok, melyet figyelembe kell venni az eredmények értelmezése, illetve összehasonlítás során – a vizsgálatok megismétlésével növelhető az eredmények megbízhatósága.

A regeneratív orvoslásban történő felhasználás során részben állatkísérletek, részben klinikai kipróbálás alatt figyelték fel a mesenchymalis őssejtek két – addig még nem ismert – fontos tulajdonságára. A donor eredetű MSC-k allogén (ugyanazon faj genetikailag eltérő egyede), de néha még xenogén (más faj egyede) recipiensben sem váltanak ki erőteljes immunválaszt (hipoimmunogenitás), valamint hogy in vitro és in vivo körülmények között egyaránt megfigyelhető immunszuppresszív aktivitással bírnak⁶. Ezek a tulajdonságok kiemelkedő fontosságúak lehetnek a sejterápiás alkalmazás során, ugyanis

sürgős esetben – ha a páciens saját MSC-graftjának elkészítése nem lehetséges, vagy arra nem áll rendelkezésre elegendő idő – bármilyen allogén donor MSC-i felhasználhatók a kezelés során, például egy allogén csontvelő-transzplantációt követően kialakult akut graft versus host betegség (GVHD) esetén, amikor a donor eredetű vérképző sejtekből kialakuló lymphocyták megtámadják a recipiens számukra idegként felismert szerveit/szöveteit.

Hipoimmunogenitásuk oka máig sem tisztázott pontosan. Az MSC-k valószínűleg annak köszönhetően tudnak „láthatatlanok” maradni az immunrendszer effektorsejtjei előtt, hogy az MHC I-es antigéneket csak kis mértékben expresszálják, valamint hogy az MHC II-es antigének és a kostimulátor molekulák hiányoznak (CD40, CD80, CD86) a felszínükről, így még az alloreaktív lymphocytákat sem képesek stimulálni⁷. Ugyanakkor egyes vizsgálatokban az MSC-k meghatározott környezeti feltételek hatására képessé váltak antigén-prezentációra is, ami éppen az immunválasz aktivációját segíti elő. Inoue et al. (2006) gyenge CD80 expressziót mutattak ki MSC-ken, ami felveti az antigén-prezentáció lehetőségét, in vivo⁸. Több munka is állítja, hogy a mesenchymalis őssejtek kis mennyiségű interferon-gamma (IFN γ) hatására megkezdik az MHC II-es antigének expresszióját⁹. Stagg et al. egyenesen azt feltételezik, hogy az MSC-k az antigén-prezentáló sejtek (APC) egy nem hematopoietikus csoportja. Vizsgálatukban az IFN γ -val kezelt MSC-k sikeresen aktiválták az antigén-specifikus CD8 pozitív citotoxikus T-sejteket¹⁰. Ezek az eredmények megkérdőjelezzik az MSC-k hipoimmunogenitását. Chan et al. azt is leírták, hogy antigén hozzáadására az MSC-k képesek voltak antigén-prezentációra, vagyis stimulálták az antigén-specifikus CD4 pozitív T-sejtek proliferációját¹¹. Ezek az eredmények azonban mégsem zárják ki az MSC-k immunszuppresszív képességét, ugyanis a fent említett immunválaszt serkentő hatás csak egy szűk és alacsony IFN γ koncentráció-tartományban jelentkezik, az IFN γ szintjének emelkedésével együtt egyre inkább az immunszuppresszív hatás érvényesül¹².

A mesenchymalis őssejtek direkt immunszuppresszív aktivitását először emberi¹³ és egér¹⁴ MSC-kkel végzett kísérletekben igazolták. Ezekben a kísérletekben az őssejtek általában a T-sejtek osztódását is gátolták in vitro. A megfigyelt hatás MHC-függetlennek bizonyult, mivel sem autológ-, sem allogén-eredetű MSC-k használatánál nem jelentkezett számottevő különbség a mitogén-, illetve az alloantigén indukált T-sejt proliferáció gátlásában¹⁵. A vizsgálatokból arra is fény derült, hogy a gátló hatásért elsősorban szolúbilis faktorok felelősek, ugyanis az MSC-eket a T-sejtektől féligáteresztő hártyával elválasztva a gátlás szintén bekövetkezett. A folyamatban szerepet játszó fontosabb

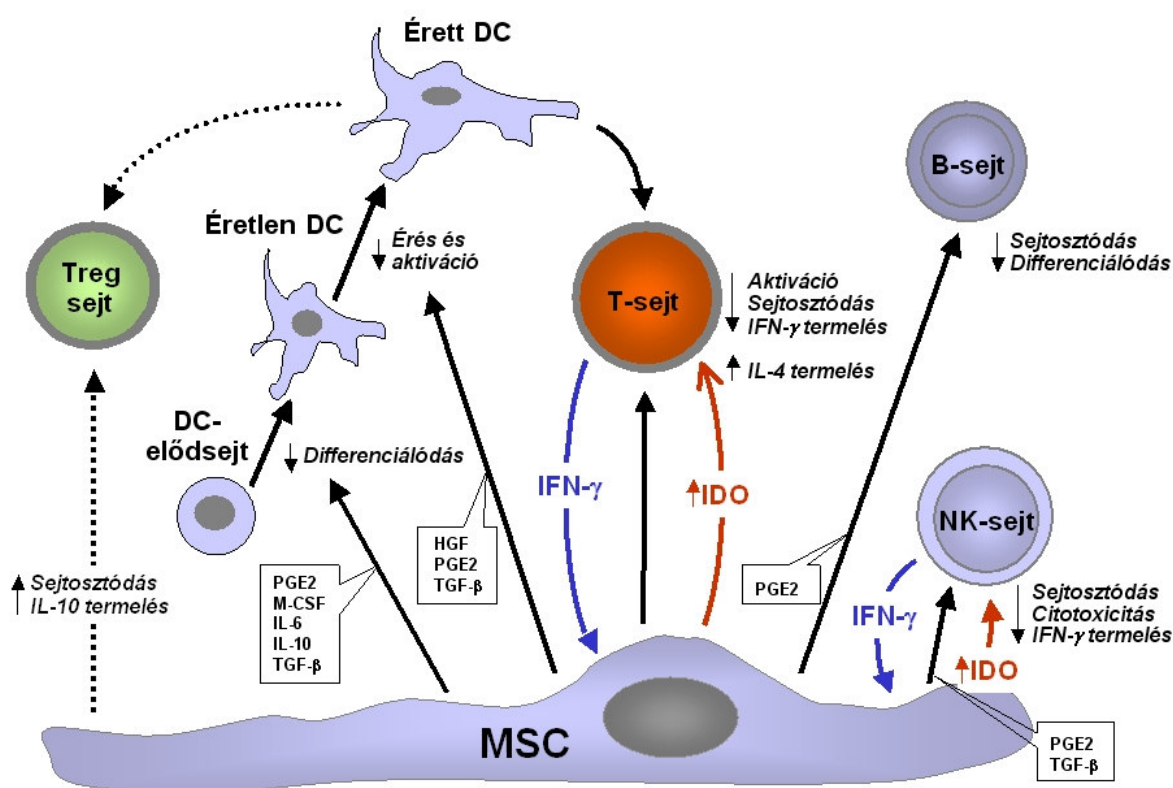
szolúbilis mediátorok lehetnek: a hepatocita növekedési faktor (HGF), a transzformáló növekedési faktor $\beta 1$ (TGF- $\beta 1$), az indolamin-2,3-dioxigenáz enzim (IDO), a nitrogén-monoxid (NO), a prosztoglandin-E2 (PGE2) és az interleukin-10 (IL-10). Kísérleti körülményektől függően azonban más-más faktor(ok) kaphatnak szerepet a gátló hatásban: kevert lymphocita-kultúrában például a HGF és a TGF- $\beta 1$, míg mitogén indukált T-sejt proliferáció-gátlásban szerepük kizárható¹⁶. 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, amely valószínűleg a sokszor igen eltérő kísérleti körülményekre vezethető vissza. Az viszont már nagy biztonsággal kijelenthető, hogy az MSC-k és T-sejtek kölcsönösen befolyásolják egymás folyamatait. Az aktivált T lymphocyták (és szintén jelen lévő monocyták, makrofágok, NK-sejtek) gyulladásos citokineket termelnek – például IFN γ -t, TNF- α -t és/vagy IL-1 β -t¹⁷. Ezek hatására a mesenchymalis őssejtek több, a T-sejt osztódás gátlásáért felelős faktort szekretálnak¹⁸. Mára már az is egyértelmű, hogy az MSC-k mind a naiv és memória T-sejteket¹⁹, mind a CD4 és CD8 pozitív T-sejtek osztódását²⁰ képesek gátolni.

Az előbb említett direkt gátláson túl a mesenchymalis őssejtek indirekt módon is meg tudják akadályozni a citotoxikus és helper T-sejtek proliferációját: az MSC-k fokozzák a regulátor T-sejtek (Treg) osztódását, azonban új Treg sejtek képződését nem képesek előidézni²¹. Emellett indirekt módon hatnak a dendritikus sejtek (DC) differenciálódásának és érésének gátlásán keresztül²². Ennek eredményeképpen a DC-elődsejt/érett-DC arány az elődsejtek javára tolódik el, a felhalmozódott éretlen DC-k pedig természetüknél fogva immunszuppresszív, tolerogén hatásúak: csökkentik a segítő és effektor T-sejtek reakcióképességét és támogatják a Treg sejtek osztódását. A folyamatban feltételezetten résztvevő szolúbilis faktorok a HGF, TGF- β , PGE2, IL-10, valamint az IL-6 és a makrofág kolónia-stimuláló faktor (M-CSF) szerepe is felvetődött, a mediátorok szerepe és a pontos hatásmechanizmus azonban itt sem tisztázott.

Az MSC-k és B lymphocyták egymásra hatását eddig kevés munkacsoport vizsgálta. Glennie et al. (2006) in vitro egér lépsejteken végzett vizsgálatai során kimutatták, hogy az MSC-k hasonló mértékben gátolják az aktivált B lymphocyták proliferációját (és így ellenanyag-termelő plazmasejtté történő érését is), mint aktivált T-sejtek esetében²³. Corcione et al. (2006) emberi MSC-kkel is megerősítették Glennie és mtsai eredményét²⁴. Ugyanakkor Rasmusson et al. (2007) eredményei azt mutatják, hogy a B-sejtek

aktivációjától függően az MSC-k ellenanyag-termelést gátló, vagy serkentő hatással is rendelkezhetnek, in vitro²⁵.

A mesenchymalis őssejtek többféle módon is képesek hatni a természetes ölüsejtekre (NK-sejtek): az IL-2-vel vagy IL-5-tel stimulált NK-sejtek osztódása, valamint IFN γ -termelése egyaránt gátolt MSC-k jelenlétében²⁶, az aktivált²⁷ NK-sejtek proliferációja azonban már alig lassul az őssejtek hatására. A citotoxikus reakciót szintén nem képesek befolyásolni az MSC-k²⁸, hacsak pár napig elő nem inkubálják velük az ölüsejteket. Ekkor az NK-sejteknél csökkent aktivitás figyelhető meg²⁹. Az MSC-k immunszuppresszív hatásának feltételezett mechanizmusát összefoglalva (a teljesség igénye nélkül) az 1. ábra³⁰ szemlélteti.



1. ábra: A mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív hatásának összefoglalása

Nem szerepelnek az ábrán a makrofágok (Mf), mivel a mesenchymalis őssejtek és a Mf-ok egymásra hatásáról nagyon keveset tudunk. A közelmúltban publikált kisszámú vizsgálat alapján feltételezik, hogy az MSC-k képesek a Mf úgynevezett gyulladásgátló („alternatív” úton aktivált) M2-es vagy regulátor Mf-profilba történő polarizációját előidézni. Maggie et al. (2010) egér eredetű, tioglikoláttal előaktivált (un. „elicitált”) makrofágokat kezeltek bakteriális endotoxinnal (LPS-sel), majd egyidejűleg csontvelői

MSC-ket (BM-MSC) adtak a kultúrákhoz. Eredményeik szerint az ilyen módon előzetesen gyulladáskeltő („klasszikus” úton aktivált) M1-es állapotba juttatott Mf-ok citokintermelése az MSC-k hatására az M2-es Mf-ok citokintermeléséhez vált hasonlóvá – vagyis a gyulladásos mediátorok (TNF α , IL-6, IL-12p70, IFN γ) szintje csökkent, míg a gyulladásgátló IL-10, illetve IL-12p40 mennyisége emelkedett a kultúrák felülúszóiban. Azt is leírták továbbá, hogy a kizárólag MSC-ket tartalmazó kultúrák felülúszói is hasonlóan képesek kiváltani a Mf-ok M2-es irányú polarizációját, amely az MSC-k által szekretált faktorok szerepét feltételezi. A prosztaglandin-E2 (PGE2) szerepét is kimutatták, mint a Mf-ok gyulladásos citokintermelésének gátlásáért felelős mediátorét³¹. Qun-Zhou Zhang et al. (2010) hasonló eredményekre jutottak fogínyből izolált emberi MSC-kkel, in vitro illetve in vivo kísérletek során: az MSC-k megnövelték a Mf-ok felületén a mannóz-receptorok (CD206) számát, gátolták TNF α szekréciójukat, illetve növelték IL-10 termelésüket, amely szintén gyulladásgátló tulajdonságokkal bíró Mf-ok kialakulását jelzi. Érdekes különbség azonban, hogy in vitro körülmények között az MSC-k a kultúra-felülúszókban mért IL-10 mennyiségének növelése mellett a Mf-ok IL-6 (egy gyulladásos citokin)-produkcióját is fokozták³².

2. A zsírszövet-eredetű mesenchymalis őssejtek

A csontvelői őssejtek (BM-MSC-k) felfedezése után számos más szövetből is izoláltak a csontvelőihez hasonló morfológiájú, különböző sejttypusokká differenciálódni képes sejteket. A zsírszövetben elhelyezkedő sejtek (adipocyták, ereket alkotó endotheliális sejtek, pericyták, fibroblasztok, makrofágok) között található azok a szöveti ősz/stroma- vagy progenitor sejtek (AD-MSC-k), melyek – a BM-MSC-khez hasonlóan – fibroblaszt-szerű morfológiával rendelkeznek, in vitro plasztik-adherens kolóniákat képeznek, valamint képesek számos mesodermális sejttypussá differenciálódni: adipocytá, osteoblast, chondrocyta, fibroblast, myocytá³³. Egyes vizsgálatok eredményei szerint transzdifferenciáció révén akár idegsejtekké is alakulhatnak³⁴, További kutatások folynak az AD-MSC-k más, nem mesodermális eredetű sejttypusok - hasnyálmirigy szigetsejtek, májsejtek, endothel sejtek és cardiomyocyták – irányába történő differenciáltatásának lehetőségével kapcsolatban.

A csontvelői őssejtekhez hasonlóan ennél a sejttypusnál sem beszélhetünk homogenitásról az előbbieken már tárgyalt okok miatt. A szervezetben ezek a sejtek az

adipocyták között, valószínűleg a vérerek körül vagy az extracelluláris mátrixban helyezkednek el. A zsírsejtek és az erek falát alkotó pericyták/simaizom sejtek progenitoraiként³⁵ működve hozzájárulnak a szövetek megújulásához³⁶. Hangsúlyoznunk kell azonban, hogy a csontvelői-, illetve zsírszövet eredetű őssejtek közös eredete, bár valószínűnek tűnik³⁷, korántsem bizonyított. A hasonló sejtfelszíni markermintázat és funkció ezt nem feltétlenül támasztja alá.

Az AD-MSC-k immunszuppresszív aktivitása a BM-MSC-khez viszonyítva jóval kevésbé kutatott – tekintve hogy sokkal később fedezték fel őket csontvelői társaiknál –, ezért a jövőbeli esetleges immunterápiás alkalmazhatóságuk felderítésére további, feltáró kutatásokra van szükség. Ha mind in vitro, mind in vivo kutatások során bebizonyosodna, hogy az AD-MSC-k alkalmasak lehetnek a csontvelői MSC-k immunszuppressziót igénylő terápiák során való helyettesítésére, akkor lényegében egy olyan sejtforrást nyernénk, ami szinte korlátlan mennyiségben rendelkezésre áll, tekintve a napjainkban igen gyakran végzett zsírleszívásokat, míg a megfelelő mennyiségű és minőségű csontvelő csak nagyon korlátozott mennyiségben férhető hozzá.

3. A makrofágok

A makrofágok (Mf) a fehérvérsejtek közé tartoznak és a keringésből a testüregekbe, illetve szövetekbe kilépő monocytákból alakulnak ki – a monocyta eredetű mononukleáris fagocitarendszer (MPS) részei. 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 osteoclastok, a pleurában és a peritoneumban mint pleuralis, illetve peritonealis makrofágok stb. A Mf-ok veleszületett immunválasz központi alakjai: 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 gátlásában³⁸.

A makrofágok különböző stimulusoktól vagy stimuluskombinációktól függően különböző aktivációs állapotokba kerülhetnek, amelyek részben fenotípusuk alapján is

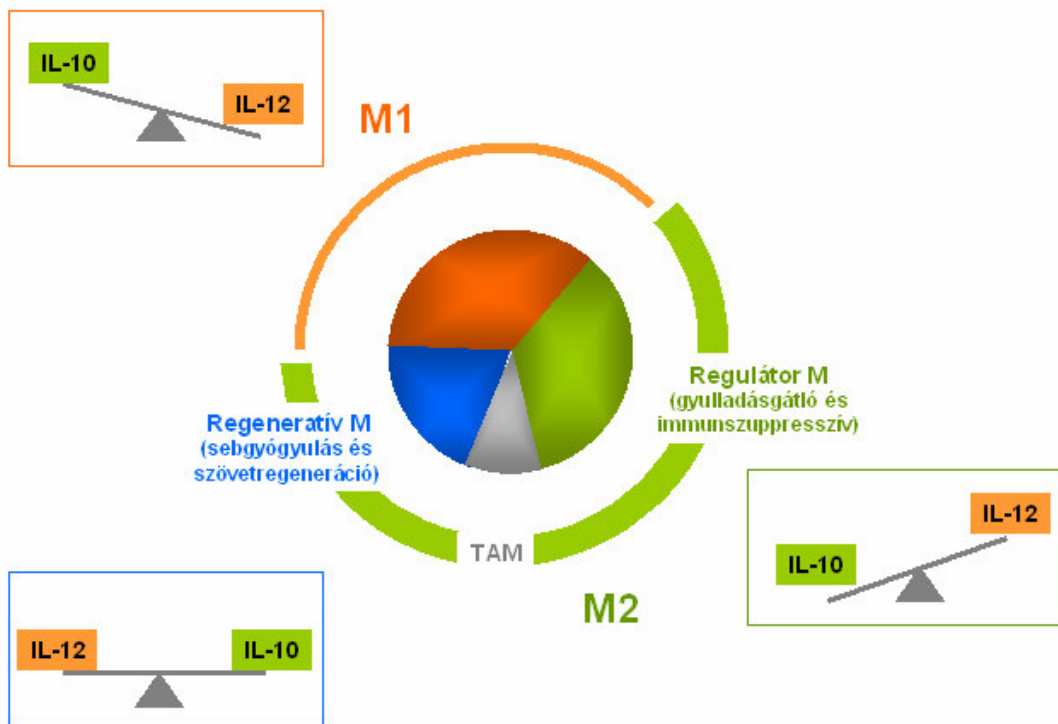
megkülönböztethetők egymástól. Leggyakrabban kétféle: M1-es, un. „klasszikus úton aktivált”, illetve M2-es, un. „alternatív úton aktivált” Mf-okat szoktak megkülönböztetni. Az elkülönítés természetesen nem éles, a populációk sokszor átfednek, a két csoport között ugyanis folytonos az átmenet. Az M1-es Mf-ok LPS (és egyéb Toll-like receptor (TLR)-antagonisták), illetve Th1-sejt eredetű citokinek (TNF α és/vagy IFN γ) jelenlétében kialakuló, gyulladásokeltő sejtek. Az ilyen Mf-ok IL-12 és IL-23 termelése megnő, ezzel párhuzamosan nagy mennyiségű reaktív oxigén-, illetve nitrogén-gyököt termelnek, illetve a felszínükön megnő az MHCII-es és a kostimulátor (CD80, CD86) molekulák mennyisége. Ezáltal megnő a sejtek antigénprezentáló képessége, valamint mikrobaelenes és tumorelles aktivitása. Az M1-es Mf-ok által termelt lipidmediátorok, gyulladásos citokinek és kemokinek visszahatva a Th1-sejtekre, felerősítik azok válaszát. Tehát az ilyen módon aktivált Mf-ok immuneffektor sejtekként funkcionálnak, feladatuk a gyulladásokeltés és az intracelluláris patogénekkal szembeni védelem biztosítása³⁹. Az M1-es Mf-ok túlzott vagy hosszantartó aktivációja azonban kóros, nem kívánt szöveti károsodáshoz vezethet. Ilyenkor az M2-es Mf-ok szerepe kiemelkedő fontossággal bír a gyulladásos állapot feloldásában.

Az M2-es Mf-ok általában Th2-sejtek által termelt IL-4, illetve IL-13 hatására jönnek létre, és IL-10, IL-1 receptor antagonista, argináz enzim, valamint különböző fagocitózist segítő receptorok (mannóz receptor, galaktóz receptor, „scavenger” receptorok) expressziójának fokozásával immunregulátor funkciókat látnak el. Az argináz-aktivitás növekedésének köszönhetően a sejtekben található L-argininből NO helyett (mely egy gyulladásos mediátor) ornitin és húgysav keletkezik, a folyamat így hozzájárul az M2-es Mf-ok gyulladásgátló képességéhez, az ornitinszintézis (kollagén-prekurzor) révén pedig hozzájárulnak az extracelluláris mátrix (ECM) termeléséhez. Az M2-es Mf-ok fő feladata a szövetregeneráció, sebgyógyulás és a parazitaelimináció segítése, de szerepük van a magzati placenta vascularizációjának, valamint a placenta immunszuppresszív mikrokörnyezetének kialakításában (és a tumorfejlődés támogatásában) is. Leegyszerűsítve, a Mf-ok polarizációja IL-12/IL-10 termelésük arányával is jellemezhető: míg „klasszikus” aktiváció esetén az IL-12 termelés túlsúlya figyelhető meg, addig „alternatív” aktiváció esetén ennek ellenkezője, az arány az IL-10 javára tolódik el⁴⁰.

Más megítélések szerint nem elég pontos a Mf-ok fentebb említett kétfélesé elkülönítése. Edwards et al. (2006) egy harmadik típusú Mf-populációt is megnevez (un. II-es típusú aktivált Mf). Ezek a sejtek immunkomplexek hatására aktiválódnak, az M2-es Mf-okhoz hasonlóan magas IL-10 termelés jellemzi őket, azonban argináz aktivitás nem

észlelhető bennük. Nagy mennyiségű kostimulátor molekulát képesek kifejezni sejtfelszínükön, és antigénprezentációs képességük igen jó, mellyel a naiv T-sejtek Th2-es irányú expansióját támogatják. Ezen tulajdonságaik alapján sokkal inkább a klasszikus úton aktivált Mf-okra hasonlítanak. Szerepet játszanak a T-sejtes válasz kostimulációjában és a Th1-sejtek citokintermelésének (IL-2, TNF α , IFN γ) kontrollálásban⁴¹. Biswas és Mantovani (2010) ugyancsak megnevez egy másik, tumormintákból kimutatott Mf-populációt, melyet tumor-asszociált Mf-oknak (TAM) nevez. Ezek a sejtek M2-szerű Mf-fenotípust mutatnak⁴². Más munkák megint más felosztást használnak: a klasszikus úton aktivált Mf-ok mellett az alternatív úton aktivált Mf-okat sebgyógyító Mf-okként említik, valamint megneveznek egy harmadik, ún. regulátor Mf-populációt. Először TLR-agonistákkal és IgG immunkomplexekkel való együttes stimuláció után figyelték meg a regulátor Mf-ok kialakulását, majd számos más stimulus is hatékonyan bizonyult a tranzíció kiváltásában, ilyenek a prosztaglandinok (PG), az apoptotikus sejtek, az IL-10 és néhány G-protein-kapcsolt receptorligand, az adenzin, a dopamin, a hisztamin (a teljesség igénye nélkül). A regulátor Mf-ok egyik fő jellemzője, hogy két stimulus együttes hatására van szükség gyulladásgátló tulajdonságaik kialakulásához: például az immunkomplexek, a PG-ok, az adenzin vagy az apoptotikus sejtek mint első stimulus, valamint egy TLR ligand mint második stimulus már képesek kiváltani a Mf-ok IL-10 termelését. A sebgyógyító Mf-októl eltérően ezek a regulátorsejtek nem képesek hozzájárulni az ECM termeléséhez, valamint nagy mennyiségben képesek kostimulátor molekulák (CD80 és CD86) kifejezésére, és ezáltal antigén-bemutatásra a T-sejtek felé. A TAM-ok egy része is osztozik a regulátor Mf-ok tulajdonságaiban⁴³.

Az itt felsorolt Mf-csoportok számos helyen átfedhetnek, és a már leírt populációkon belül is léteznek többé-kevésbé különböző alpopulációk, melyből jól látszik a Mf-ok heterogenitása. A különböző Mf-populációkat összefoglalva a 2. ábra mutatja be.



2. ábra: A makrofágok heterogenitásának bemutatása.

M1: „klasszikus úton aktivált” vagy gyulladás-keltő makrofág, M2: „alternatív úton aktivált” vagy gyulladás-gátló makrofág, TAM: tumor-asszociált makrofág. Narancssárga keretben makrofágok IL-12-produkciójának túlsúlya; Zöld keretben: a reggulátor makrofágok IL-10-produkciójának túlsúlya; Kék keretben: a regeneratív makrofágok IL-10/IL-12-produkciójának egyensúlya

Célkitűzések

Munkánkban a következő kérdések megválaszolása volt a célunk:

1. Képesek-e a csontvelőből izolált mesenchymalis őssejtek a makrofágok M2-es (gyulladásgátló) profilba történő polarizációját előidézni? Azaz befolyásolják-e:
 - 1.1. a peritoneális Mf-ok élesztő és apoptotizáló thymocita fagocitózist;
 - 1.2. a fagocitózis következtében és/vagy endotoxin (LPS) hatására megváltozik-e a Mf-ok citokin termelése MSC-k egyidejű jelenlétében; illetve
 - 1.3. fokozódik-e a CD206 (mannóz receptor) kifejeződése MSC-k hatására a Mf-ok felszínén?
2. Milyen szerepet játszik a PGE2 a Mf-ok és az MSC-k kölcsönhatásában?
3. Hasonló módon hatnak-e a zsírszöveti eredetű MSC-k a Mf-okra, mint csontvelői eredetű társaik?

Anyagok és módszerek

1. Kísérleti állatok

Kísérleti állataink felnőtt (10-12 hetes) C57Bl/6-os egereket voltak. Az állatokat az Országos Onkológiai Intézetből (Budapest) szereztük be.

2. Mesenchymalis ősz-/stromasejtek izolálása és tenyésztése

A csontvelői MSC-k izolálását a laboratóriumunkban már korábban leírt módszerrel végeztük⁴⁴. A C57Bl/6-os egerekből preparált combcsontok epifíziseit eltávolítottuk, majd fecskendőbe felszívott médiummal fújtuk ki belőle a csontvelőt. Az így kapott sejteket Hanks-féle oldattal mostuk (Invitrogen, Carlsbad, CA), majd 25 cm²-es tenyésztőedényekbe szélesztettük (BD Falcon, Bedford, MA).

A zsírszövet eredetű MSC-k kinyeréséhez a C57Bl/6-os egerek bőr alatti és hasi (viscerális) zsírszövetét használtuk. A kivett szövetet feldarabolás után hideg foszfáttal puffertelt sóoldattal (PBS-sel) átmostuk, 25 cm²-es tenyésztőedénybe tettük, majd 0,1% kollagenáz (Sigma-Aldrich, St. Louis, Mo) jelenlétében 30 percig emésztettük őket 37°C-on. A sejtszuspenziót 15 ml-es műanyagcsőbe szívtuk át, ügyelve arra, hogy ne kerüljön át nagy mennyiségű zsírdarabka. A szuszpenzióban lévő sejteket újból átmostuk PBS-sel és borjúsavót adtunk hozzájuk, ami leállítja az emésztőenzimet. A sejteket ezután 5-10 percre 1200-1500-as percenkénti fordulatszámon centrifugáltuk. A leülepedett sejtekről leöntöttük a folyadékot, a csőben maradt sejteket felráztuk, Hanks-féle oldatot adtunk hozzájuk, majd megismételtük a centrifugálást.

Innentől mind a csontvelői, mind a zsírszövet eredetű sejteket hasonló módon kezeltük. A sejtszuspenzióból 10 µl-t festve számlálóba tettünk, majd a sejtszámot 2-5x10⁶/ml-re állítottuk be. A tenyésztéshez Dulbecco-által módosított Eagle-féle médium (DMEM) és Ham-féle F-12 médium 1:1 arányú keverékét használtuk, kiegészítve azt 10 v/v%-os foetalis borjúsavóval (FCS), 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) (komplett médium). A tenyészeteket 37°C-on CO₂-termosztátban inkubáltuk. A tenyésztőedény falához nem tapadó (non-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. Ezt követően 0,25%-os tripszin/EDTA oldattal felszedtük a sejteket, és újabb Hanks-féle oldatos mosás után egy, az előzőnél nagyobb, 75 cm²-es tenyésztőedénybe (BD Falcon) oltottuk át, így folytatva a tenyésztést.

3. Sejtfelületi markerek vizsgálata

Mindkét MSC-típus sejtfelületi markereinek, valamint a Mf-ok mannóz receptor-expressziójának vizsgálata áramlási citometriával történt. Mind csontvelői, mind zsírszövet-eredetű (5-10-szer átoltott tenyészetből felvett) MSC-kból $2-5 \cdot 10^5$ sejtet – valamint Mf-okból az „Eredménynek” fejezetben leírtak szerint kezelt sejteket – tartalmazó mintákat készítettünk, amelyekből 1-1 a kezeletlen kontroll szerepét töltötte be, a további csövekben lévő sejtekhez pedig az általunk vizsgált sejtfelületi markerekhez specifikusan kötődő ellenanyagot tettünk. A jelölést csövenként külön-külön fluoreszcein izotiocianáttal (FITC) (anti-CD34, anti-CD90.2 és anti-CD206), fikoeritrinnel (PE) (anti-Sca-1, anti-CD73, anti-CD44) (direkt jelölés), vagy biotinnal konjugáltatott (anti-CD3, anti-CD45R/B220, anti-CD11b, anti-Ly-6G 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 20 percig 4°C-on inkubáltuk, majd kétszer mostuk őket PBS-sel. Újabb 20 perces 4°C-on történő inkubálás és 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).

4. A mesenchymális őssejtek differenciáltatása

Az MSC-k osteoblast- és adipocyta (zsírsejt) irányú differenciáltatását a Pittenger et al.⁴⁵ által kifejlesztett módszer alapján végeztük. Csont irányú differenciáltatáshoz a sejteket β -glicerofoszfát (10 mM), dexametazon (10⁻⁸ M) és aszkorbinsav (50 μ g/ml) tartalmú, 10% FCS-sel kiegészített DMEM médiumban 2 hétig inkubáltuk. A csont irányú differenciáció során a sejtek által termelt, majd lerakódott extracelluláris kalciumot

alizarinvörös festékekkel mutattuk ki. A zsírsejt irányú differenciálathoz az előbb leírt DMEM/FCS médiumhoz dexametazont (10^{-7} M) és izobutil-1-metilxanthint (0,5 mM) adtunk, a sejteket a médiumban 7 napig inkubáltuk, majd olajvörös festékekkel (mind Sigma-Aldrich) mutattuk ki az intracellulárisan felhalmozódott lipidcseppeket. A kontroll, nem differenciált MSC-eket Giemsa festéssel tettük láthatóvá. A festési eljárások során a sejteket – a médium leszívása után – 3-szor mostuk PBS-sel, majd ezt követően PBS-sel pufferelt 8%-os formalinnal 10 percig fixáltuk őket. Újabb 3-szori PBS-sel történő mosás után a festékoldatok hozzáadása következett, melyben 1 órán keresztül festődtek a sejtek. Utolsó 3-szori 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.

5. A makrofágok izolálása

A makrofágokat C57Bl/6-os egerek peritoneális üregéből nyertük. A peritoneális üreget 5 ml fecskendőbe felszívott heparintartalmú (10 NE) PBS-sel többször átmostuk, majd az így kinyert peritoneális exudátumot (PEC: peritoneal exudate cells) Hanks-féle oldattal mostuk. A sejtszuspenziót 8-10 percig 1200-1500-as percnkénti fordulatszámon centrifugáltuk, majd a cső alján összegyűlt sejtekről pipettával óvatosan leszívtuk a folyadékot. Az üledéket felráztuk és kis mennyiségű komplett médiumban hígítottuk. Az így kapott szuszpenzióból 10 μ l megfestése után megszámloltuk a sejteket, a milliliterenkénti sejtszámot 10^6 -ra állítottuk be, melyből 1-1 ml-t mértünk ki 24-lyukú, lapos fenekű tenyésztőtálcákra (BD Falcon). A sejteket 1 órán keresztül inkubáltunk 37 °C-on. A nem adherens sejteket (vörösvérsejtek, granulocyták) a médium leszívásával, majd egyszeri Hanks-féle oldattal történő mosással távolítottuk el a kultúrákból.

6. A makrofágok fagocitózis-intenzitásának vizsgálata

A 24-lyukú tenyésztőtálcákra kitapasztott makrofágokhoz az „Eredmények” című fejezetben leírtak szerint lyukanként $2 \cdot 10^4$ MSC-t (csontvelői vagy zsírszöveti eredetű), 10 μ g/ml LPS-t és/vagy 10 μ M indometacint adtunk. 48 óra 37°C-on történő inkubáció után $5 \cdot 10^6$ élesztősejtet vagy $5 \cdot 10^5$ dexametazonnal előkezelt (12-18 óra 37°C-on) thymocytát

adtunk a kultúrákhoz, majd egy órát inkubáltuk őket 37°C-on. Ez után a sejteket – a médium leszívását követően – 3-szor mostuk PBS-sel, majd PBS-sel pufferelt 8%-os formalinnal 10 percig fixáltuk őket. Újabb 3-szori PBS-sel történő mosás után Giemsa festékkoldatot adtunk a lyukakhoz, melyben 1 órán keresztül festődtek a sejtek. Egy végső, 3-szori PBS-sel történő mosás után az eredményeket digitális fényképeken rögzítettük, majd megszámoltuk a fagocitált élesztősejtek mennyiségét (élesztő/makrofág) kezelésként 100-100 makrofágban. A képeket Olympus CK2-es inverz mikroszkópra (Olympus, Tokió, Japán) csatlakoztatott Nikon Coolpix 4500 digitális kamerával (Nikon GmbH, Düsseldorf, Németország) készítettük.

Egyes kísérletekben a fagocitózis után inkubáltuk a sejteket 48 órát és ezeket a felülúszókat vizsgáltuk.

7. A TNF α -, az IL-10 és a proszttaglandin-E2-termelés mérése

Az „Anyagok és módszerek” fejezet 6. pontjában leírt vizsgálati rendszer kultúráiból korábban fagyasztóba eltett, majd fagyból felvett felülúszókból ParameterTM TNF- α ELISA Kit, IL-10 ELISA Kit, illetve PGE2 ELISA Kit (mind R & D Systems, Inc., Minneapolis, MN) segítségével határoztuk meg a PGE2, az IL-10, és a TNF α koncentrációját.

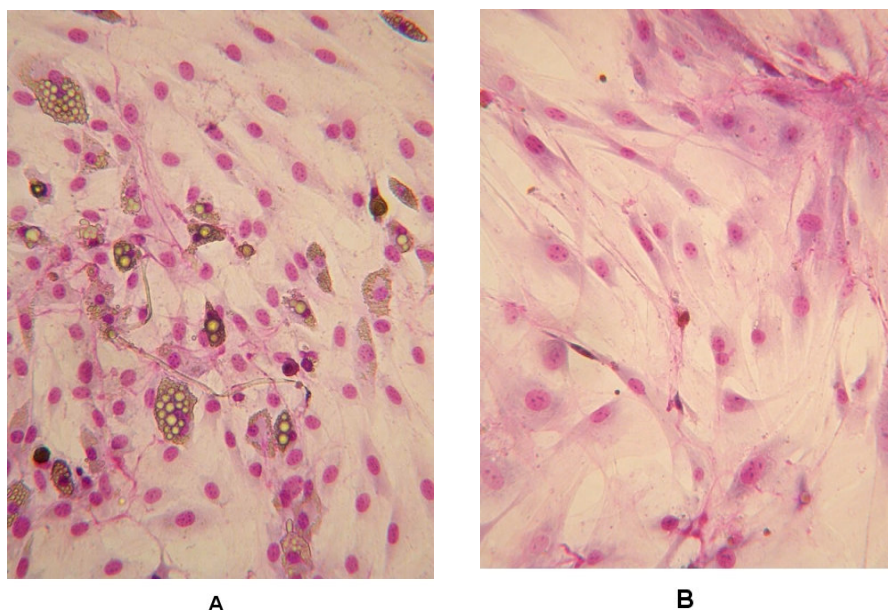
8. Statisztikák

Az eredmények szignifikáns voltát kétmintás Student-féle t-próba (nem egyenlő varianciákra) segítségével ellenőriztük, $p < 0,05$ figyelembe vételével. Az ábrákat a mérési pontok felrajzolásával készítettük (átlag $\pm$ SD).

Eredmények

1. A mesenchymalis őssejtek karakterizálása

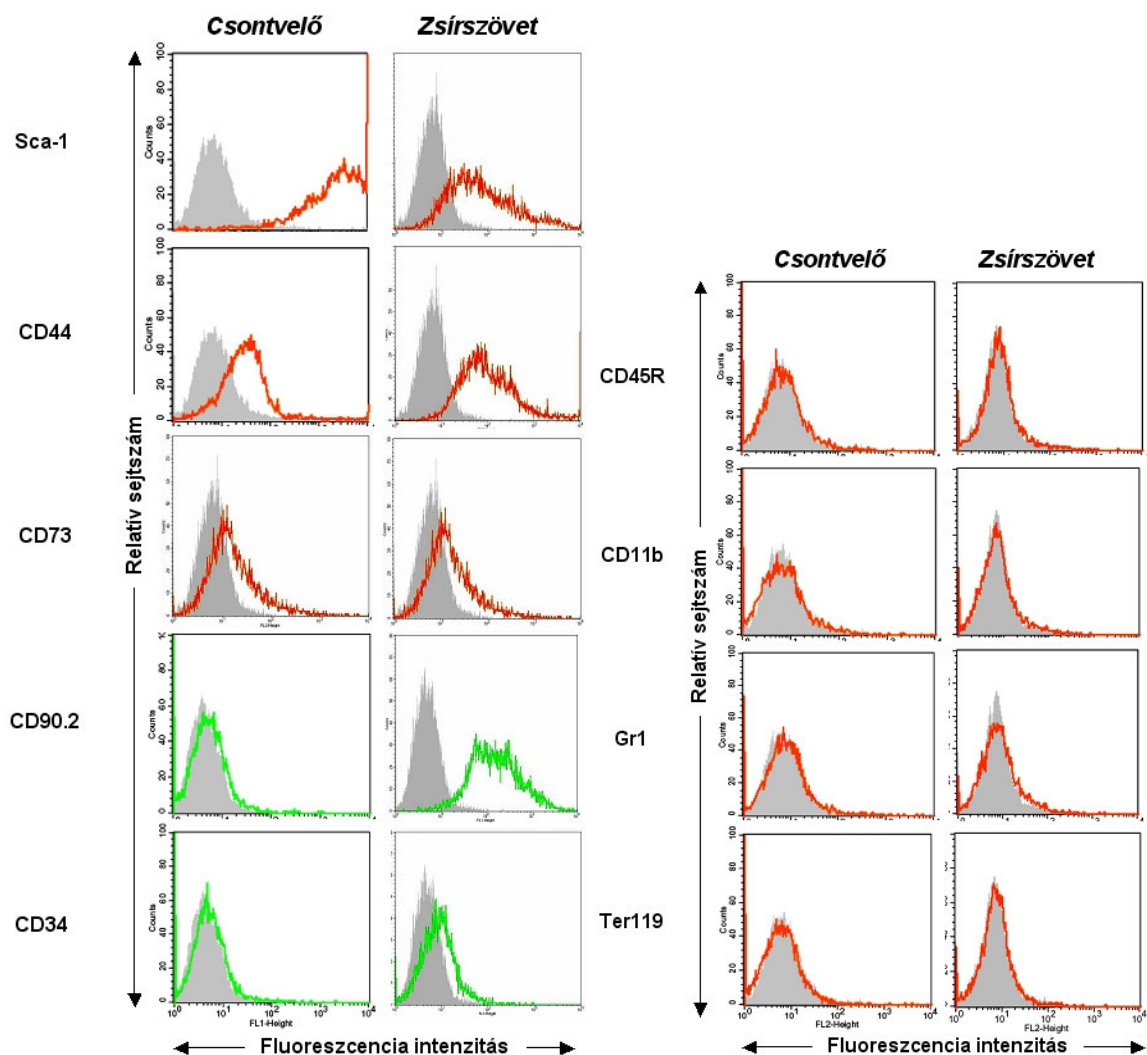
Első vizsgálatainkban a 10-12 hetes C57Bl/6-os egerek combcsontjából, illetve bőr alatti és viscerális zsírjából izolált, majd tenyészetekben fenntartott sejtekről szeretnénk bizonyítani, hogy azok morfológia, adherencia, immunfenotípus és differenciációs képességek tekintetében mesenchymalis ős-/stromasejteknek tekinthetők. A vizsgálatokat 8-15-ször passzált (átoltott) sejteken végeztük, ugyanis – a szakirodalom és saját tapasztalataink szerint – csontvelő esetében az MSC tenyészetek még a 7-8. átoltásig tartalmazhatnak vérképző elemeket⁴⁶. Az általunk izolált adherens sejtek fibroblaszt-szerű morfológiát mutattak, valamint differenciálatlanságukat a sorozatos passzálások (átoltások) során nagyrészt megőrizték (3. ábra).



3. ábra: Csontvelői és zsírszövet eredetű adherens sejtek morfológiája. A: Csontvelői eredetű sejtek (Giemsa-festés, eredeti nagyítás x10); B: Zsírszövet eredetű sejtek (Giemsa-festés, eredeti nagyítás x10)

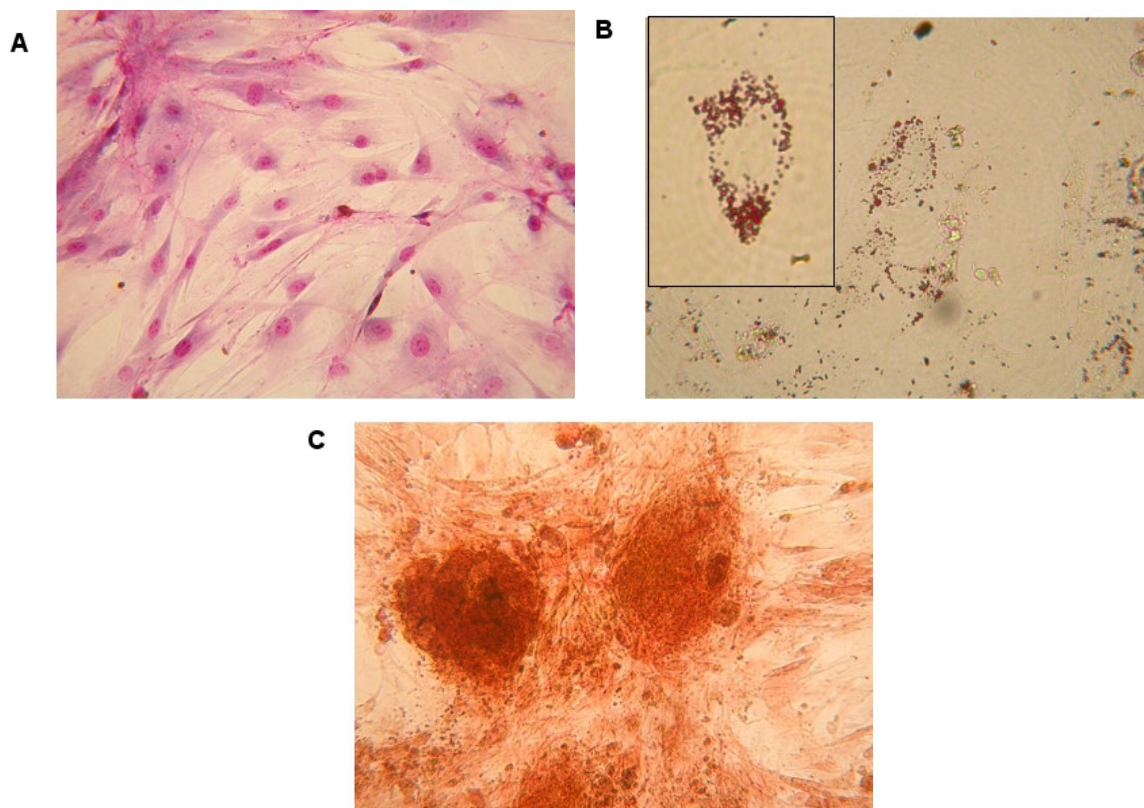
A sejtfelszíni markerek vizsgálatának eredményei a 4. ábrán láthatók. Vizsgálatunkban mindkét sejtípus pozitív volt Sca-1-re (stem cell antigen-1), CD44-re és

CD73-ra. CD90.2-re a csontvelői eredetű sejtek negatívak, míg a zsírszövet-eredetűek pozitívak voltak. Szintén mindkét sejtípus negatív lett vérképző sejtekre jellemző markerekre, úgymint: CD34 (kapillárisendotélre és hematopoietikus őssejtre jellemző), CD45R (pan-leukocyta, minden fehérvérsejtre jellemző), CD11b (monocytára, granulocytára jellemző), Gr1 (granulocytára jellemző), Ter119 (erythroid sejtekre jellemző).



4. ábra: Csontvelő és zsírszövet eredetű stromasejtek sejtfelületi markereinek (Sca-1, CD44, CD73, CD90.2, CD34, CD45R, CD11b, Gr1, Ter119) vizsgálata áramlási citométerrel. Zöld hisztogram: fikoeritrines (PE) jelölés; Piros hisztogram: fluorescein-izotiocianátos (FITC) jelölés; Szürke hisztogram: kontroll

Mind a csontvelői, mind a zsírszövet eredetű adherens sejtek képesek voltak speciális induktorok hatására osteoblast és adipocyta irányba differenciálódni, kontroll ellenében. Ilyen módon mindkét sejtípus multipotensnek, vagy legalábbis bipotensnek tekinthető. A kontroll esetében differenciálatlan fibroblaszt-szerű sejteket láthatunk. Az adipocyta irányba történt differenciációnál az olajvörös festék hatására láthatóak a sejtekben felhalmozódott lipidcseppeket. Osteoblast irányú differenciáció esetében az alizarinvörös festés az extracelluláris kalcium felhalmozódását mutatja. Az 5. ábrán a zsírszöveti eredetű MSC-k differenciálódását mutatjuk.

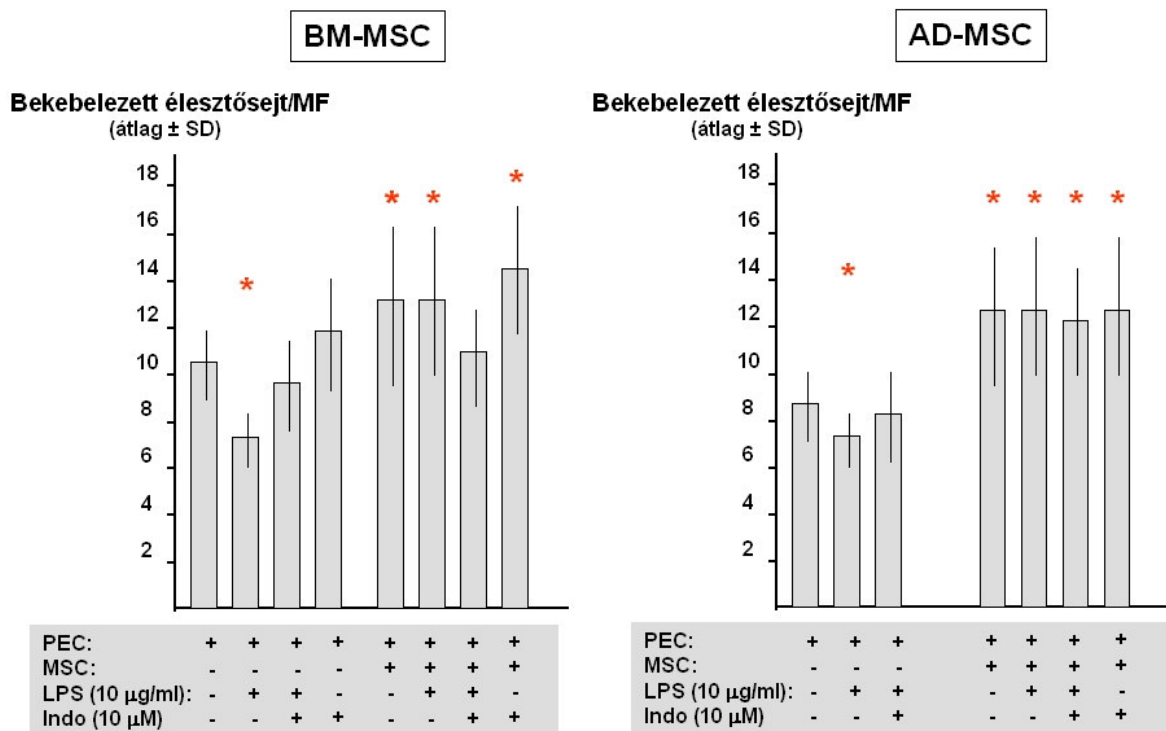


5. ábra: Zsírszövet-eredetű stromasejtek differenciálódása speciális induktorok hatására. *A: Kontroll*, Giemsa festés, eredeti nagyítás x10; *B: Adipocyta*, Olajvörös, eredeti nagyítás x20; *C: Osteoblast*, Alizarin vörös, eredeti nagyítás x10.

2. A mesenchymalis őssejtek hatása a makrofágok élesztő-fagocitózisára

A Mf-ok élesztő-fagocitózisában bekövetkező változásokat mindkét típusú (csontvelői, zsírszöveti eredetű) MSC jelenlétében vizsgáltuk. A 24-lyukú tenyésztőtálcán kitapasztott Mf-okhoz (ábrákon: PEC) 10 μ M indometacint, 10 μ l/ml LPS-t (mind a legmagasabb, hatásos dózis, amelyet a sejtek még károsodás nélkül elviselnek), valamint $2 \cdot 10^4$ AD- vagy BM-MSc-t (előkísérleteinkből igazolt legkisebb biztosan hatásos MSC-mennyiség) adtunk különböző kombinációkban (6. ábra szerint). 48 óra inkubálás után $5 \cdot 10^6$ élesztősejtet adtunk minden kultúrához, majd egy óra elteltével vizsgáltuk a Mf-ok fagocitózisának mértékét.

Eredményeink szerint a Mf-ok élesztő-fagocitózisának intenzitása csökken LPS jelenlétében, azonban specifikus PGE2-szintézisgátló, az indometacin (IMT) képes feloldani ezt a csökkentő hatást ($p=7,88 \cdot 10^{-10}$, illetve a párhuzamos vizsgálatban $p=5,72 \cdot 10^{-4}$). Az MSC-k fagocitózist növelő hatása ennél még kifejezettebb (BM-MSc esetében $p=0,000796$, AD-MSc esetében $p=6,77 \cdot 10^{-6}$), amely még LPS jelenlétében is megmarad (BM-MSc-knél $p=1,37 \cdot 10^{-13}$, AD-MSc-knél $p=3,23 \cdot 10^{-11}$). Az IMT jelenléte sem befolyásolja az MSC-k fagocitózist növelő képességét, LPS-sel együtt alkalmazva azonban a BM-MSc-k hatását közömbösíti (PEC kontrollhoz viszonyítva $p=0,473$).



6. ábra: A makrofágok élesztő-fagocitózisának változása bakteriális endotoxin, PGE2-szintézisgátló, valamint csontvelői és zsírszöveti eredetű mesenchymalis őssejtek jelenlétében. Élesztősejt-felvétel/makrofág a különböző kezelés-kombinációk függvényében. **BM-MSC**: csontvelői MSC-k; **AD-MSC**: zsírszöveti eredetű MSC-k; **PEC**: makrofágok; **LPS**: bakteriális (endotoxin) lipopoliszacharid, **Indo**: indometacin (PGE2-szintézisgátló). **Piros csillagok**: A kontrolltól (PEC) való szignifikáns eltérés ($p < 0,05$).

3. A mesenchymalis őssejtek hatása a makrofágok TNF α , IL-10 és prosztaglandin-E2 termelésére:

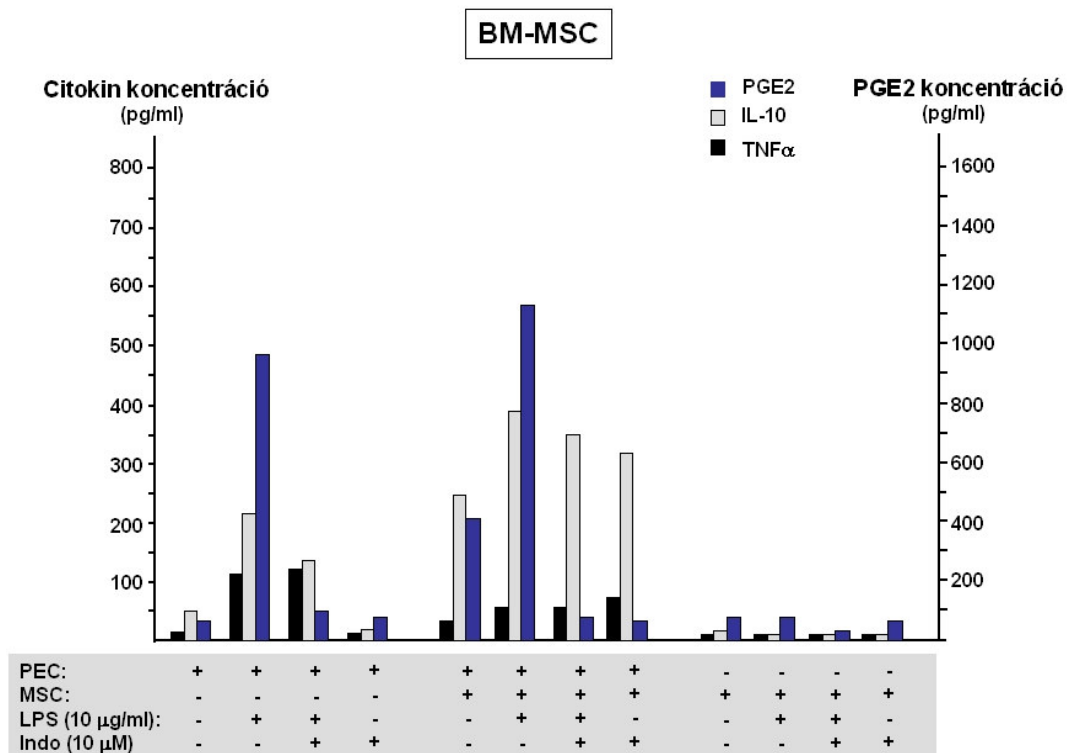
a) A Mf-kultúrák felülúszóiban mérhető TNF α , IL-10 és PGE2 szintjének változása csontvelői és zsírszöveti eredetű MSC-k, valamint endotoxin (LPS) jelenlétében

Az Mf-ok élesztő-fagocitózisának vizsgálata mellett megmértük a kultúrák felülúszóiban található citokinek/mediátorok mennyiségét – amelyhez az „Eredmények” fejezet 2. pontjában leírt vizsgálati elrendezés – a fagocitózis előtt összegyűjtött – felülúszóit használtuk. Egy gyulladásos citokin, a TNF α , egy gyulladásgátló citokin, az IL-10, valamint egy lipid mediátor, a PGE2 mennyiségében bekövetkező változásokra voltunk kíváncsiak.

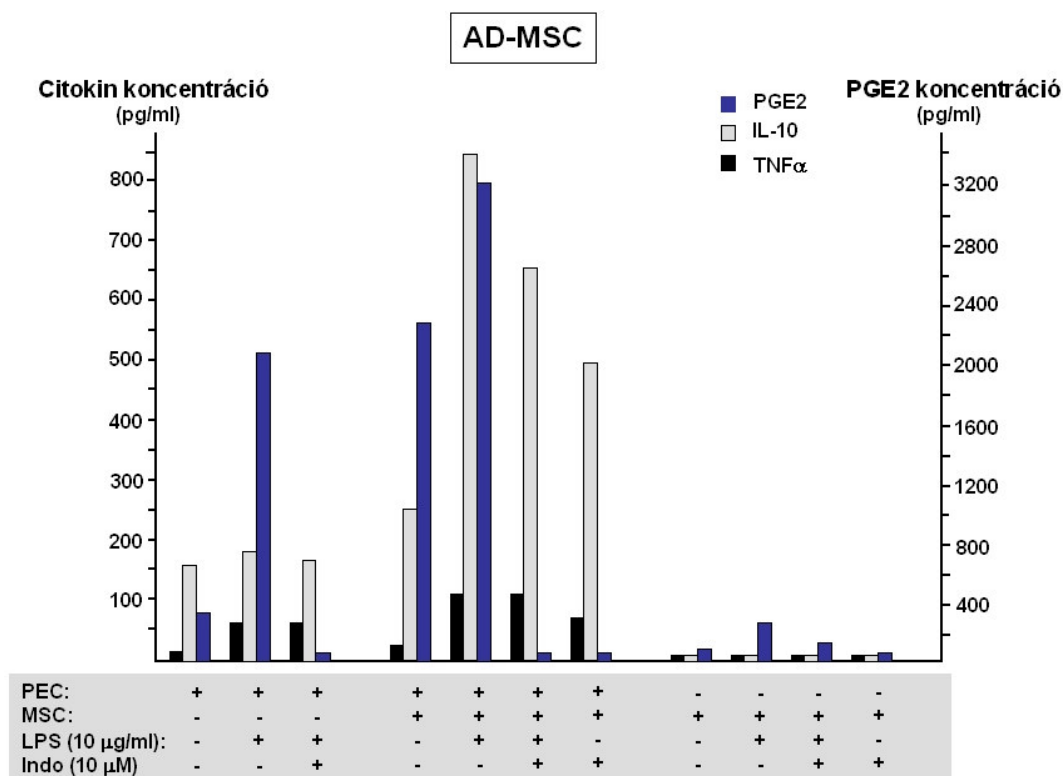
Eredményeink (7. ábra) azt mutatják, hogy:

1. LPS hatására a Mf-ok IL-10, de főként a TNF α és PGE2-termelése megnő. Ha LPS mellett IMT is van a rendszerben, a PGE2-termelés megszűnik, az IL-10 és a TNF α mennyisége azonban nem változik számottevően a csak LPS-sel kezelt Mf-ok felülúszóiban mérhető TNF α szintjéhez képest.
2. ha a Mf-ok mellett AD- vagy BM-MSK-k is vannak a kultúrában, mind az IL-10, mind a PGE2 szintje megemelkedik a felülúszóban, azonban a TNF α mennyisége nem változik a csak Mf-okat tartalmazó kultúrákhoz képest. Ha LPS is kerül a rendszerbe, bár a TNF α szintje valamelyest fokozódik a csak Mf-okat és MSC-ket tartalmazó kultúrákban mért TNF α -szinthez képest, azonban az IL-10 nagymértékű növekedésével a TNF α /IL-10 arány az IL-10 javára tolódik el. Továbbá az IL-10 felülúszóban mérhető mennyiségének fokozódásával a PGE2 mennyisége párhuzamosan nő. IMT hozzáadására – LPS egyidejű jelenlététől függetlenül – a PGE2-termelés gyakorlatilag megszűnik, azonban az IL-10 mennyisége, habár kis mértékben visszaesik – nem csökken a kezeletlen Mf-kontroll IL-10-termelésének szintjére.

3. önmagukban sem az AD-, sem a BM-MSC-k nem termelnek IL-10-et és $\text{TNF}\alpha$ -t, valamint PGE2-t csak kis mennyiségben mérhettünk ilyenkor a kultúra-felülűszókban. Az előbb említett citokinek és PGE2 szintje sem LPS-sel, sem IMT-nal történő kezelés esetén nem változott számottevően.
4. az AD-MSC-k jelenlétében a kultúrák felülűszóiban általánosan nagyobb mennyiségű citokin figyelhető meg.



7/a. ábra: A makrofág-BM-MSC ko-kultúrák felülűszóiban mérhető citokinek és mediátorok mennyiségének változása bakteriális endotoxin és/vagy PGE2-szintézisgátló jelenlétében. Citokin-, illetve PGE2 koncentráció-változás a különböző kezelés-kombinációk függvényében. **BM-MSC**: csontvelői MSC-k; **PEC**: makrofágok; **LPS**: bakteriális (endotoxin) lipopoliszacharid; **Indo**: indometacin (PGE2-szintézisgátló).

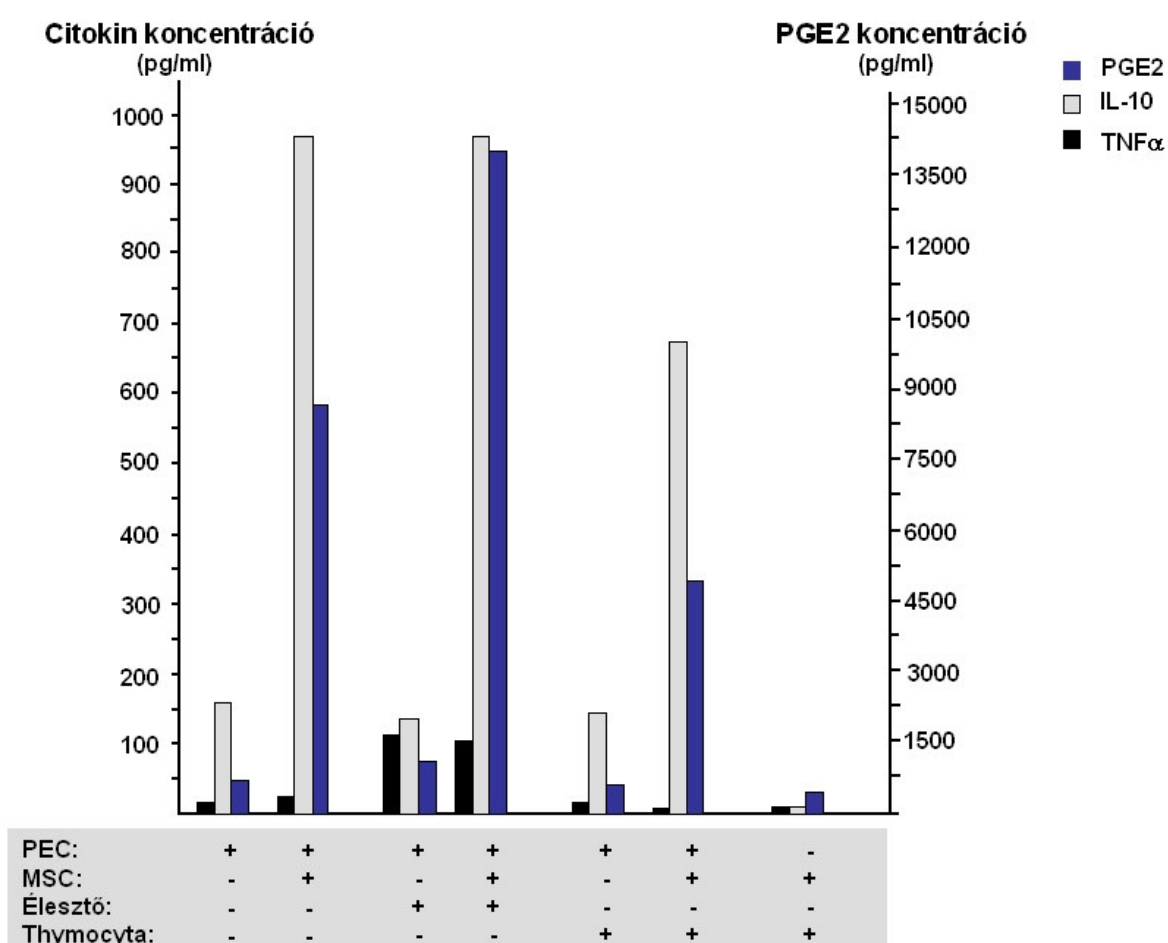


7/b. ábra: A makrofág-AD-MS co-kultúrák felülúszóiban mérhető citokinek és mediátorok mennyiségének változása bakteriális endotoxin és/vagy PGE2-szintézisgátló jelenlétében. Citokin-, illetve PGE2 koncentráció-változás a különböző kezelés-kombinációk függvényében. **AD-MS**: zsírszöveti eredetű MSC-k; **PEC**: makrofágok; **LPS**: bakteriális (endotoxin) lipopoliszacharid; **Indo**: indometacin (PGE2-szintézisgátló).

b) A Mf-BM-MS co-kultúrák felülúszóiban mérhető TNFα, IL-10 és PGE2 szintjének változása élesztősejtek, illetve apoptotizáló thymocyták bekebelezését követően

Azt is megvizsgáltuk, hogyan alakul a Mf-ok citokintermelése a co-kultúrákban élesztő sejtek (gomba), illetve dexametazonnal kezelt thymocyták (apoptotizáló sejtek) fagocitózisát követően. Ezekben a kísérletekben a kitapasztott sejtekhez (PEC és/vagy MSC) élesztőt ($5 \cdot 10^6$) vagy apoptotizáló thymocyták ($5 \cdot 10^5$) adtunk, majd egy óra elteltével a be nem kebelezett partikulumokat eltávolítottuk és friss tenyésztőfolyadékban további 48 órát inkubáltuk a sejteket.

Ahogy a 8. ábrán is látható, a Mf-ok élesztő hozzáadására nagy mennyiségű TNF α -t kezdenek termelni, ami apoptotizáló thymocyták jelenlétében elmarad. Az MSC-k mind a nyugvó, mind az élesztővel vagy apoptotizáló thymocytával aktivált Mf-ok felülúszóiban erőteljesen növelik az IL-10 mennyiségét, ezzel párhuzamosan a PGE2 szintje is emelkedik. Megfigyelhettük továbbá, hogy az MSC-k önmagukban apoptotizáló thymocyták hatására sem termelnek számottevő mennyiségű TNF α -t, IL-10-et vagy PGE2-t a többi, MSC-eket is tartalmazó vizsgálati elrendezéshez képest.



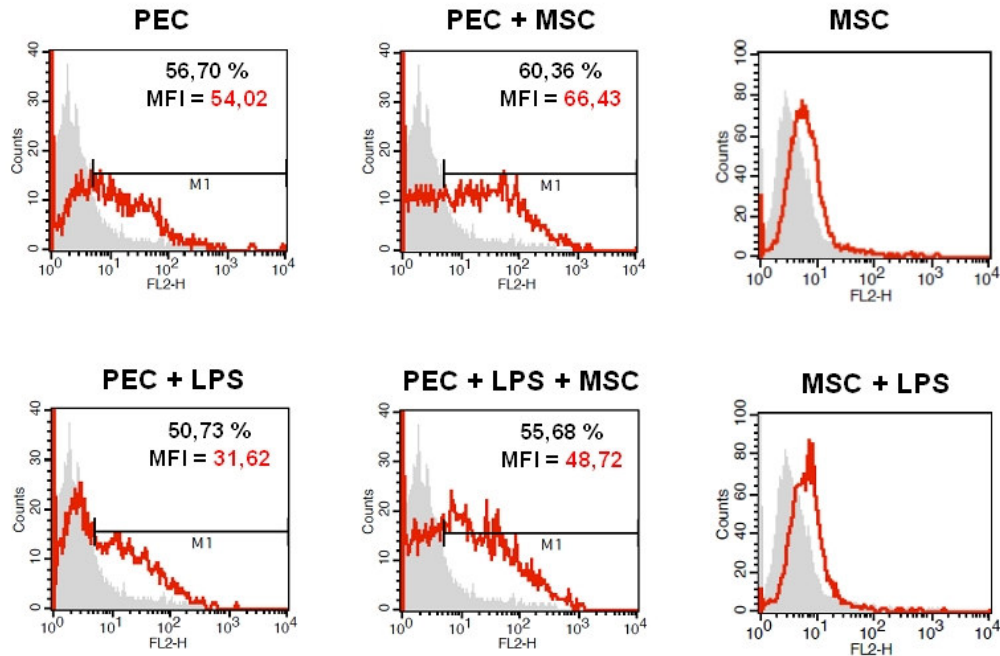
8. ábra: Az élesztőt vagy apoptotizáló thymocytát fagocitáló Mf-okat tartalmazó kultúrák felülúszójában mérhető citokinek és mediátorok mennyiségének változása csontvelői eredetű mesenchymalis őssejtek jelenlétében. Citokin-, illetve PGE2 koncentráció-változás a különböző kezelés-kombinációk függvényében. **PEC:** makrofágok.

4. A Mf-ok CD206 expressziójának mérése

A Mf-ok élesztő-fagocitózisra való képességében szerepet játszó CD206 (mannóz receptor) molekula kifejeződését is vizsgáltuk LPS, illetve csontvelői MSC-k jelenlétében. A 24-lyukú tenyésztőtálcán kitapasztott Mf-okhoz 10 µl/ml LPS-t, valamint $2 \cdot 10^4$ BM- MSC-t adtunk különböző kombinációkban, majd 48 óra elteltével meghatároztuk a sejtek felületén kifejeződött CD206 molekula mennyiségét.

Ahogy a 9. ábra is mutatja, az MSC-k sem önmagukban, sem LPS hatására nem fejeznek ki CD206 molekulát a sejtfelszínükön, a Mf-ok azonban mindig pozitívak rá (kezeletlen Mf-kultúrában a sejtek 56,70%-a). Míg a pozitív sejtek aránya nem változik számottevően a kezelések hatására, a sejtek felületén kifejeződő CD206 molekulák mennyisége különbözőképpen alakul: MSC-k hatására a mért közepes fluoreszcencia intenzitás (MFI) 54,02-ről 66,43-ra nő; LPS-sel történő kezelésre pedig 31,62-re csökken, jelezve az egy-egy sejt felszínén expresszálandó CD206 molekulák relatív mennyiségét. Eredményeink szerint az MSC-k LPS-sel történő egyidejű adásakor az LPS CD206-expresszió intenzitását csökkentő hatását kiküszöbölik, az MFI 31,62-ről 48,72-re nő.

CD206 expresszió



9. ábra: A különböző módokon kezelt Mf-ok CD206-expressziójának vizsgálata áramlási citométerrel. Relatív sejtszám a fluoreszcencia-intenzitás függvényében. Piros hisztogram: fluoreszcein-izotiocianátos (FITC) jelölés; Szürke hisztogram: kontroll; M1 intervallum: pozitív minta; MFI: átlagos fluoreszcencia-intenzitás; a fekete százalékok az M1 intervallumhoz tartozó pozitív sejtek arányát mutatják. **PEC**: makrofágok; **LPS**: bakteriális (endotoxin) lipopoliszacharid; **MSC**: itt csontvelői mesenchymalis őssejtek.

Az eredmények megvitatása

Napjainkban egyre több vizsgálat irányul a mesenchymalis őssejtek immunszuppresszív aktivitásának felderítésére. Kevés azonban az olyan munka, amely az MSC-k és Mf-ok funkcionális kapcsolatát vizsgálja.

Eredményeink szerint mind a csontvelőből, mind a zsírszövetből (bőr alatti és viscerális) sikeresen izolálhatók olyan – in vitro – a tenyésztőedény falához kitapadó, fibroblaszt-szerű morfológiát mutató multipotens (de legalábbis bipotens), osteoblast és adipocita irányba differenciálódni képes sejtek, melyek hosszú időn keresztül képesek aszimmetrikus osztódások révén (többszöri átoltság mellett) önmaguk fenntartására. Ezen tulajdonságok alapján tehát ezek a sejtek mesenchymalis ős-/stroma-/progenitorsejteknek tekinthetők. Morfológiában, differenciációs képességben, valamint immunfenotípusban mindkét sejtípus nagyfokú hasonlóságot mutat. Kisebb különbségek azonban megfigyelhetők, ilyen például az AD-MSK-k felszínén kifejeződő CD90.2-es marker, amely BM-MSK-k sejt felszínén nem volt jelen. (Emberben mind a csontvelői, mind a zsírszövet eredetű MSK-k CD90 pozitívak). Ennek hátterében állhat a fajok közti különbség, eltérő szöveti eredet, vagy valami más. Tekintve, hogy a CD90 molekula funkciója ma még nem ismert, a megfigyelt különbséget pillanatnyilag nem lehet biztosan megmagyarázni.

A Mf-ok élesztő-fagocitózisában bekövetkező változások vizsgálatából kiderült, hogy az MSK-k (szöveti eredetüktől függetlenül) nemcsak hogy kiküszöbölik az LPS élesztő-fagocitózist csökkentő hatását, hanem kis mértékben, de szignifikánsan fokozzák is azt. A Mf-ok LPS-re adott válasza itt megfeleltethető egy az M1-es, gyulladásos Mf-okra jellemző tulajdonságnak, a MSK-k hatására bekövetkező élesztő-fagocitózis növekedés pedig egy M2-es, gyulladásgátló Mf-okra jellemző tulajdonság. Ezzel összhangban a CD206 molekula – egy az élesztő, valamint más patogének fagocitózisába szerepet játszó receptor (mannóz receptor) – Mf-ok sejt felületén megjelenő mennyisége jól korrelál a LPS-, illetve az MSK-kezelés Mf-ok fagocitózisára gyakorolt hatásával:

- LPS jelenlétében mind az élesztő-fagocitózis, mind a CD206 expressziója csökken,
- MSK-k jelenlétében viszont a CD206 molekula kifejeződésének intenzitása és a bekebelezett élesztő sejtek mennyisége egyaránt fokozódik.

Habár az MSK-k még LPS egyidejű jelenlétében is képesek voltak fokozni a Mf-ok élesztő-fagocitózist, a CD206 molekula kifejeződését nem tudták számottevően

megnövelni a Mf-ok felszínén, csak az LPS hatását tudták kiküszöbölni. Valószínű tehát, hogy az MSC-k nem csak az M2-es Mf-ok egyik jellemző markerének tekintett CD206, hanem más, a gombasejtek fagocitózisában szerepet játszó ún. „scavenger” receptorok expresszióját is befolyásolják.

Egy specifikus PGE2-szintézisgátló, az IMT segítségével vizsgáltuk a PGE2 szerepét a Mf-SCC kölcsönhatásban. Eredményeink szerint a PGE2 legalábbis nem egyedül felelős Mf-ok gyulladásgátló profilba történő tranzíciójának kiváltásában – szemben a korábbi leegyszerűsítő elképzelésekkel⁴⁷ –, ugyanis IMT alkalmazásakor az MSC-knek sem az élesztő-fagocitózisra, sem az IL-10 mennyiségének növelésére gyakorolt hatása nem szűnik meg. PGE2 hiányában részleges csökkenés figyelhető meg a Mf-ok felülúszóiban mérhető IL-10 mennyiségében, amely arra utal, hogy a PGE2 – bár közre játszik az MSC-k Mf-okra gyakorolt hatásában – nem egyedüli mediátora a folyamatnak. Ez nem meglepő, ha figyelembe vesszük, hogy az MSC-k a PGE2-n kívül számos más – a Mf-ok működését befolyásolni képes szolubilis faktort (citokineket, kemokineket, galektin-1-et, stb) is termelnek⁴⁸.

Az IMT gátolta az LPS azon képességét, hogy csökkentse a Mf-ok élesztő-fagocitózisának mértékét. Ezzel párhuzamosan az IMT – mint nem szteroid típusú gyulladásgátló – gátolta a sejtek LPS-indukált PGE2 termelését is, ami szintén a Mf-ok aktivációjának a gyógyszer hatására bekövetkező, M2 irányú eltolódására utalhat. Az LPS által kiváltott Mf-válasz – az élesztő-fagocitózis intenzitásának csökkenése, a PGE2, valamint a TNF α termelés fokozódása – mind egy M1-es, gyulladásos Mf-populáció kialakulását jelzik.

Mind a csontvelői, mind a zsírszöveti eredetű MSC-k képesek – LPS jelenlététől függetlenül – erőteljesen növelni a Mf-ok felülúszóiban az IL-10 szintjét, amely a IL-10/TNF α arányban az immunszuppresszív és gyulladásgátló aktivitású IL-10⁴⁹ túlsúlyát eredményezi, vagyis a sejtek citokin-profilja is M2 irányba tolódik el.

Míg az élesztővel (kórokozó) aktivált Mf-ok TNF α -termelése jelentősen megugrik, addig ez apoptotizáló thymocyta bekebelezése során nem következik be. Ez összhangban van azzal, hogy a szervezetben lezajló apoptotikus folyamatok nem keltenek gyulladásos reakciót⁵⁰. Ugyanakkor az MSC-k mindkét típusú Mf-aktiváció során képesek a felülúszóban mérhető IL-10/TNF α arányt az IL-10 javára növelni. Ez ismételtén azt bizonyítja, hogy az MSC-k képesek a Mf-okat „alternatív úton aktivált” (gyulladásgátló vagy regulátor) sejtekké formálni⁵¹.

Az, hogy az AD-MSK-ket tartalmazó kultúrák felülszövetekben konzekvensen nagyobb citokin-koncentrációkat mérünk, mint BM-MSK-k esetén, magyarázható az eltérő szöveti eredettel, tekintve, hogy a zsírszövet egy krónikus gyulladásra hajlamos szövet⁵², ezért feltételezhető, hogy az innen származó MSC-k erőteljesebb gyulladásgátló hatással bírhatnak.

Összességében elmondhatjuk, hogy az MSC-k szöveti eredetüktől (csontvelő ill. zsírszövet) függetlenül elősegítik a peritoneális Mf-ok alternatív (M2), illetve gátolják „klasszikus” – azaz gyulladás keltő – (M1) irányú polarizációját. Ennek meghatározó szerepe lehet az MSC-k in vivo megfigyelt erős gyulladásgátló aktivitásában. A továbbiakban szükséges lehet a PGE2 szerepének alaposabb tisztázása, tekintve, hogy a szakirodalomban – eredményeinkkel ellentétben – a PGE2 a Mf-MSK kölcsönhatás központi mediátoraként szerepel. Szükséges lehet még annak tisztázása is, hogy a felülszövetekben mért citokinek és PGE2 termeléséért melyik sejttípus milyen mértékben felelős.

Konklúzió

- Sikeresen izoláltunk a C57Bl/6-os egerek bőr alatti és viscerális zsírszövetéből olyan adherens, fibroblaszt-szerű morfológiával rendelkező sejteket, amelyek sejtfelszíni markereik és differenciációs képességeik alapján mesenchymalis őssejteknek tekinthetők. Ezek alapján a tulajdonságaik alapján nagymértékben hasonlítanak a csontvelői eredetű MSC-khez.
- Mind a csontvelői, mind a zsírszöveti eredetű MSC-k képesek a Mf-okat azok élesztő- és thymocyt-fagocitózisnak, valamint citokintermelésének megváltozásán keresztül gyulladásgátló aktivitásra bírni, tehát M2-es Mf-profilba juttatni, in vitro.
- Igazoltuk, hogy a proszttaglandin-E2, bár szerepet játszik a Mf-ok gyulladásgátló profilba történő polarizálásában, nem egyedüli mediátora a folyamatnak.
- A továbbiakban szükséges a PGE2 pontos szerepének tisztázása az MSC-Mf kölcsönhatásban, valamint annak kiderítése, hogy a Mf-okat és MSC-ket együttesen tartalmazó kultúrákban melyik sejt milyen mértékben járul hozzá az egyes citokinek és a PGE2 felülúszókban mérhető mennyiségéhez.

Összefoglalás

Napjainkban számos munkacsoport foglalkozik a csontvelői mesenchymalis ősvagy stromasejtek (BM-MSK) terápiás célú felhasználásával a hematopoézis támogatásában, a szövetek fenntartásában és regenerálásában, valamint a gyulladásos és immunfolyamatok gátlásában betöltött szerepüknek köszönhetően. Az MSC-k segítségével remélhetőleg kezelhetők lesznek olyan gyulladásos- és/vagy autoimmun betegségek, mint például az akut graft versus host- vagy a Chron-betegség. Rendkívül keveset tudunk azonban az MSC-k makrofágokra (Mf) gyakorolt hatásáról, így jelen munkánk célja annak vizsgálata volt, hogy milyen funkcionális következményei lehetnek e két sejttípus kölcsönhatásának, különös tekintettel a Mf-ok fagocitózis képességének és citokin termelésének esetleges változására. Mivel a csontvelő mellett egy számos szempontból ideálisabb sejtforrásból, a zsírszövetből is nyerhetők olyan MSC-k, melyek a BM-MSK-khez nagyban hasonló immunmoduláló funkcióval rendelkeznek, vizsgálatainkban ezért zsírszövetből izolált MSC-kre (AD-MSK) is kiterjesztettük.

Kísérleteink során 10-12 hetes egerek csontvelőjéből, ill. zsírszövetéből származó MSC-ket és az állatok peritoneális üregéből kimosott Mf-okat használtunk. Vizsgáltuk az önmagukban, illetve MSC-k egyidejű jelenlétében szélesztett és 48 óráig inkubált Mf-ok élesztő-, valamint apoptotikus sejt (szteroiddal kezelt thymocyt) fagocitózisát. Meghatároztuk a tenyészetek felülszóban található $\text{TNF}\alpha$ (egy gyulladásos citokin), IL-10 (egy gyulladásgátló citokin) és PGE_2 mennyiségét. Ugyanezeket a vizsgálatokat bakteriális endotoxinnal (LPS) stimulált Mf-okkal is megismételtük. Megállapítottuk, hogy mind a BM-MSK-k, mind az AD-MSK-k képesek fokozni a Mf-ok fagocitáló képességét és egyidejűleg jelentősen megváltoztatják a szekretált citokinek arányát a kultúra-felülszóokban. A $\text{TNF}\alpha$ abszolút mennyiségét általában nem befolyásolják, a gyulladásgátló IL-10 termelését viszont jelentősen fokozzák, így az MSC-k jelenlétében a Mf-ok inkább gyulladásgátló (M2-es, vagy alternatív), mint „klasszikus” gyulladásokeltő (M1)-es fenotípust mutatnak. Az LPS-el in vitro aktivált Mf-ok M1 irányú polarizációját szintén gátolják a stroma sejtek. Ez a hatás indometacin, egy prosztaglandin szintézis gátló jelenlétében csökken, ráadásul a kultúra-felülszó PGE_2 koncentrációja az IL-10 mennyiségének növekedésével többé-kevésbé párhuzamosan nő, ami arra utal, hogy a PGE_2 az MSC-Mf kölcsönhatás egyik fontos mediátora lehet.

Eredményeink tehát azt mutatják, hogy az MSC-k szöveti eredetüktől (csontvelő ill. zsírszövet) függetlenül elősegítik a Mf-ok alternatív (M2), illetve gátolják „klasszikus” – azaz gyulladás keltő – (M1) irányú polarizációját. Ennek meghatározó szerepe lehet az MSC-k in vivo megfigyelt erőteljes gyulladásgátló aktivitásában.

Abstract

Recently, bone-marrow derived mesenchymal stem- or stromal cells (BM-MSC) have been subjects to several researches due to their ability to support hematopoiesis, promote tissue maintenance and regeneration and inhibit inflammatory and immune processes. MSCs are promising targets in the treatment of certain inflammatory and/or autoimmune diseases, such as acute graft versus host disease or Chron-disease. Little is known, however, about the interaction between BM-MSCs and macrophages (MP), therefore, in our work we aimed to clarify the functional consequences resulting from the relationship between these cell types, especially the changes resulting from possible alterations in the phagocytic activity and cytokine production. Since MSCs derived from the more easier accessible adipose tissue (AD-MSC) are also capable of exerting a highly similar immunomodulatory effect in the body as BM-MSCs, we aimed to investigate the similarities and/or differences between the effects of these two cell types on MPs as well.

We used MSC cultures established from the bone marrow and adipose tissue of 10-12 weeks old mice. MPs were isolated from the peritoneal cavity of mice of the same age. We measured the intensity of yeast- or apoptotic cell (steroid-treated thymocyte) phagocytosis of MPs incubated in cultures with or without MSCs for 48 hours, while the levels of TNF α (an inflammatory cytokine), IL-10 (an anti-inflammatory cytokine) and PGE2 in the culture supernates were determined. The same experiments were repeated using bacterial endotoxin (LPS) stimulated MPs. We found that both BM- and AD-MSCs were capable of enhancing the phagocytic activity of MPs, concurrently significantly altering the ratio of secreted cytokines in the culture supernates: while levels of TNF α was not affected in general, elevated levels of IL-10 could be observed, thus suggesting that MPs tend to show an anti-inflammatory (M2 or „alternative”) phenotype instead of a „classical” pro-inflammatory (M1) phenotype in the presence of MSCs. Polarization of MPs towards an M1 phenotype upon in vitro LPS activation was also hindered by the stromal cells. This effect was mitigated in the presence of indomethacin, a specific prostaglandin synthesis inhibitor, moreover, the concentration of PGE2 in the culture supernates increased more or less in parallel with IL-10 levels indicating that PGE2 can be an important mediator in the MSC-MP interaction.

Our results therefore show that MSCs, regardless of their tissue of origin (bone marrow or adipose tissue), are capable of facilitating the polarization of MPs towards the

„alternative” (M2) phenotype while inhibiting the development of the „classical” – or pro-inflammatory – (M1). This can play a pivotal role in the in vivo observed strong anti-inflammatory effect of MSCs.

Köszönetnyilvánítás

Elsőként köszönet illeti témavezetőmet, **Dr. Uher Ferencet**, segítségéért és türelméért, amit szakdolgozatom készítése alatt nyújtott, mind a labormunka elsajátítása, mind az elméleti háttér megalapozása terén.

Köszönettel tartozok **Hegyi Beátának** és **Sági Bernadettnek** a laboratóriumi munkám során felmerülő gyakorlati és elméleti kérdésekben, feladatokban nyújtott segítségükért.

Köszönöm **Ullrich Olgának**, laboratóriumi asszisztensünknek, hogy alapos munkájával megkönnyítette laboratóriumi munkámat.

Köszönet illeti **Lang Zsoltot**, aki a statisztikai kérdésekben nyújtott elméleti áttekintéssel segítette eredményeim kiértékelését.

Irodalomjegyzék

-
- ¹ Keating A.: Mesenchymal stromal cells., In: *Curr Opin Hematol.* 2006, 13:419-25.
- ² Dominici M, Le Blanc K, Mueller I, et al. Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells., The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy.* 2007, 9:301-2.
- ³ Baksh D, Song L, Tuan RS.: Adult mesenchymal stem cells: characterization, differentiation, and application in cell and gene therapy., In: *J Cell Mol Med.* 2004, 8:301-16.
- ⁴ Friedenstein AJ, Chailakhjan RK, Lalykina KS.: The development of fibroblast colonies in monolayer cultures of guinea-pig bone marrow and spleen cells., In: *Cell Tissue Kinet.* 1970, 3:393-403.
- ⁵ Horwitz EM, Le Blanc K, Dominici M, Mueller I, Slaper-Cortenbach I, Marini FC: Clarification of the nomenclature for MSC., The International Society for Cellular Therapy position statement., In: *Cytotherapy.* 2005, 7:393-5.
- ⁶ Kiss J, Urbán SV, Dudics V, Vas V, Uher F: A mesenchymalis őssejtek és az immunrendszer – immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?, In: *Orvosi Hetilap*, 2008, 149. évf., 8:339-46.
- ⁷ Le Blanc K, Tammik C, Rosendahl K, Zetterberg E, Ringdén O: HLA expression and immunologic properties of differentiated and undifferentiated mesenchymal stem cells., In: *Exp Hematol.* 2003, 31:890-6.
- ⁸ Inoue S, Popp FC, Koehl GE, et al. Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells in a rat organ transplant model., In: *Transplantation*, 2006, 81:1589.
- ⁹ Romieu-Mourez R, Francois M, Boivin MN, et al. Regulation of MHC class II expression and antigen processing in murine and human mesenchymal stromal cells by IFN-, TGF-, and cell density. In: *J Immunol*, 2007; 179: 1549.
- ¹⁰ Stagg J, Pommey S, Eliopoulos N, et al. Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: A new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. In: *Blood* 2006; 107: 2570.
- ¹¹ Chan JL, Tang KC, Patel AP, et al. Antigen-presenting property of mesenchymal stem cells occurs during a narrow window at low levels of interferon-gamma. In: *Blood* 2006; 107: 4817.

-
- ¹² Kiss J, Urbán SV, Dudics V, Vas V, Uher F: A mesencymalis őssejtek és az immunrendszer – immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?, In: *Orvosi Hetilap*, 2008, 149. évf., 8:339-46.
- ¹³ Di Nicola M, Carlo-Stella C, Magni M, Milanesi M, Longoni PD, Matteucci P, Grisanti S, Gianni AM: Human bone marrow stromal cells suppress T-lymphocyte proliferation induced by cellular or non-specific mitogenic stimuli., In: *Blood*, 2002, 99:3838-43.
- ¹⁴ Djouad F, Ponce P, Bony C, Tropel P, Apparailly F, Sany J, Noël D, Jorgensen C: Immunosuppressive effect of mesenchymal stem cells favors tumor growth in allogenic animals., In: *Blood*, 2003, 102:3837-44.
- ¹⁵ Le Blanc, K., Tammik, L., Sundberg, B. és mtsai: Mesenchymal stem cells inhibit and stimulate mixed lymphocyte cultures and mitogenic responses independently of the major histocompatibility complex. Scand. In: *J. Immunol.*, 2003, 57, 11–20.
- ¹⁶ Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K: Mesenchymal stem cells inhibit lymphocyte proliferation by mitogens and alloantigens by different mechanisms., In: *Exp Cell Res.*, 2005, 305:33-41.
- ¹⁷ Ryan, J. M., Barry, F., Murphy, J. M. et al.: Interferon gamma does not break, but promotes the immunosuppressive capacity of adult human mesenchymal stem cells. In: *Clin. Exp. Immunol.*, 2007, 149, 353–363.
- ¹⁸ Groh ME, Maitra B, Szekely E, Koç ON: Human mesenchymal stem cells require monocyte-mediated activation to suppress alloreactive T cells., In: *Exp Hematol.*, 2005, 33:928-34.
- ¹⁹ Krampera M, Glennie S, Dyson J, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T-cells to their cognate peptide. In: *Blood* 2003; 101: 3722.
- ²⁰ Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. In: *Blood* 2005; 105: 2821.
- ²¹ Maccario R, Podestà M, Moretta A, Cometa A, Comoli P, Montagna D, Daudt L, Ibatici A, Piaggio G, Pozzi S, Frassoni F, Locatelli F: 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., In: *Haematologica*, 2005, 90:516-25.

-
- ²² Zhang W, Ge W, Li C, You S, Liao L, Han Q, Deng W, Zhao RC: Effects of mesenchymal stem cells on differentiation, maturation, and function of human monocyte-derived dendritic cells., In: *Stem Cells Dev.*, 2004, 13:263-71.
- ²³ Glennie S, Soeiro I, Dyson PJ, et al. Bone marrow mesenchymal stem cells induce division arrest anergy of activated T cells. In: *Blood* 2005; 105: 2821.
- ²⁴ Corcione A, Benvenuto F, Ferretti E, et al. Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. In: *Blood* 2006; 107: 367.
- ²⁵ Rasmusson I, Le Blanc K, Sundberg B, Ringdén O: Mesenchymal stem cells stimulate antibody secretion in human B cells., In: *Scand J Immunol.*, 2007, 65:336-43.
- ²⁶ Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, et al. Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells. In: *Stem Cells* 2006; 24: 74.
- ²⁷ Sotiropoulou PA, Perez SA, Salagianni M, et al. Characterization of the optimal culture conditions for clinical scale production of human mesenchymal stem cells. In: *Stem Cells* 2006; 24: 462.
- ²⁸ Rasmusson I, Ringdén O, Sundberg B, Le Blanc K: Mesenchymal stem cells inhibit the formation of cytotoxic T lymphocytes, but not activated cytotoxic T lymphocytes or natural killer cells., In: *Transplantation*, 2003, 76:1208-13.
- ²⁹ Sotiropoulou PA, Perez SA, Gritzapis AD, Baxevamis CN, Papamichail M: Interactions between human mesenchymal stem cells and natural killer cells., In: *Stem Cells*, 2006, 24:74-85.
- ³⁰ Kiss J, Urbán SV, Dudics V, Vas V, Uher F: A mesencymalis összegek és az immunrendszer – immunszuppresszió gyógyszerek nélkül?; In: *Orvosi Hetilap*, 2008, 149. évf., 8:339-46.
- ³¹ Maggini J, Mirkin G, Bognanni I et al.: Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile; In: *PloS One*; 2010; Iss. 2, Vol. 5, e9252.
- ³² Zhang Q-Z, Su W-R, Shi S-H et al.: Human Gingiva-Derived Mesenchymal Stem Cells Elicit Polarization of M2 Macrophages and Enhance Cutaneous Wound Healing; In: *Stem Cells*; 2010; 28:1856-68.
- ³³ Lin Y, Chen X, Yan Z et al. Multilineage differentiation of adipose-derived stromal cells from GFP transgenic mice., In: *Mol Cell Biochem*, 2006, 285:69 –78.

-
- ³⁴ Safford KM, Hicok KC, Safford SD et al.: Neurogenic differentiation of murine and human adipose-derived stromal cells., In: *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 294(2), 371–379 (2002).
- ³⁵ Planat-Benard V, Silvestre JS, Cousin B et al.: Plasticity of human adipose lineage cells toward endothelial cells: physiological and therapeutic perspectives., In: *Circulation* 109(5), 656–663 (2004).
- ³⁶ Spalding KL, Arner E, Westermark PO et al.: Dynamics of fat cell turnover in humans., In: *Nature*; 453(7196), 783–787 (2008).
- ³⁷ Lee RH, Kim B, Choi I et al. Characterization and expression analysis of mesenchymal stem cells from human bone marrow and adipose tissue., In: *Cell Physiol Biochem*; 2004, 14:311–324.
- ³⁸ Falus András, Buzás Edit, Rajnavölgyi Éva: Az immunológia alapjai; Semmelweis Kiadó, 2007.
- ³⁹ Biswas SK, Mantovani A: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm; In: *Nature Immunology*; 2010; Vol. 11, 889–896.
- ⁴⁰ Biswas SK, Mantovani A: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm; In: *Nature Immunology*; 2010; Vol. 11, 889–896.
- ⁴¹ Edwards JP, Zhang X, Frauwirth KA, Mosser DM: Biochemical and functional characterization of three activated macrophage populations; In: *Journal of Leukocyte Biology*; 2006; Vol. 80; 1298-1307.
- ⁴² Biswas SK, Mantovani A: Macrophage plasticity and interaction with lymphocyte subsets: cancer as a paradigm; In: *Nature Immunology*; 2010; Vol. 11, 889–896.
- ⁴³ Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation; In: *Nature Immunology*; 2008; Vol. 8, 958-967.
- ⁴⁴ Urbán VS, Kiss J, Kovács J, Gócza E, Vas V, Monostori E, Uher F: Mesenchymal stem cells cooperate with bone marrow cells in therapy of diabetes, In: *Stem Cells*, 2008, 26:244-53.
- ⁴⁵ Pittenger MF, Mackay AM, Beck SC, Jaiswal RK, Douglas R, Mosca JD, Moorman MA, Simonetti DW, Craig S, Marshak DR: Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells., In: *Science*, 1999, 284:143-7.
- ⁴⁶ Meirelles Lda S, Nardi NB: Murine marrow-derived mesenchymal stem cell: isolation, in vivo expansion, and characterisation., In: *Br J Haematol.*, 2003, 123:702-11.

-
- ⁴⁷ Maggini J, Mirkin G, Bognanni I et al.: Mouse Bone Marrow-Derived Mesenchymal Stromal Cells Turn Activated Macrophages into a Regulatory-Like Profile; In: *PloS One*; 2010; Iss. 2, Vol. 5, e9252.
- ⁴⁸ Ghannam S, Bouffi C, Djouad F, Jorgensen C, Noël D: Immunosuppression by mesenchymal stem cells: mechanisms and clinical applications; In: *Stem Cell Research & Therapy*; 2010; 1:2, 1-7.
- ⁴⁹ Grütz G: New insights into the molecular mechanism of interleukin-10-mediated immunosuppression; In: *Journal of Leukocyte Biology*; 2005; 77:3-15.
- ⁵⁰ Falus András, Buzás Edit, Rajnavölgyi Éva: Az immunológia alapjai; Semmelweis Kiadó, 2007.
- ⁵¹ Mosser DM, Edwards JP: Exploring the full spectrum of macrophage activation; In: *Nature Immunology*; 2008; Vol. 8, 958-967.
- ⁵² Trayhurn P, Woodl IS: Adipokines: inflammation and the pleiotropic role of white adipose tissue; In: *British Journal of Nutrition*; 2004; 92 : 347-355.