

**UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE**

**Přírodovědecká fakulta**

Katedra buněčné biologie

Studijní program: Biologie (navazující magisterské studium)

Studijní obor: Imunologie



**Bc. Julie Vacková**

**Mechanismy působení imunosupresivních látek na  
mezenchymální kmenové buňky.**

**Mechanisms of immunosuppressive drug-mediated effect on mesenchymal  
stem cell properties.**

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Magdaléna Krulová, Ph.D.

Praha 2016

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracoval/a samostatně a že jsem uvedl/a všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze dne

.....

podpis

## **Poděkování**

Děkuji školitelce RNDr. Magdaléně Krulové, Ph.D. a Mgr. Michaele Hájkové za vedení diplomové práce. Rovněž bych chtěla poděkovat Mgr. Barboře Heřmánkové za ochotu provést kvantitativní polymerázovou řetězovou reakci. Děkuji i Laboratoři tkáňových kultur a kmenových buněk z Ústavu experimentální medicíny, AVČR, v.v.i. za poskytnuté lidské mezenchymální kmenové buňky a myši.

Ráda bych na tomto místě projevila velkou vděčnost svým rodičům, kteří mě podporovali po celé moje studium po psychické i finanční stránce. Srdečné poděkování také patří mému příteli za ochotu konzultovat diplomovou práci v jakoukoli denní dobu po odborné stránce.

# Obsah

Abstrakt .....	6
Abstract .....	7
Seznam použitých zkratk .....	8
1. Úvod .....	10
1.1 Fenotyp.....	10
1.2 Využití MSC v klinických studiích.....	10
1.2.1 Transplantace .....	10
1.2.2 Autoimunitní onemocnění.....	13
1.3 Imunomodulační mechanismy MSC.....	14
1.3.1 Solubilní faktory produkované MSC .....	17
1.3.2 Povrchové molekuly MSC uplatňující se při imunomodulačních mechanismech..	18
.....	18
1.4 Imunosupresivní látky.....	19
1.4.1 Cyklosporin A .....	21
1.4.2 Mykofenolát mofetil.....	22
1.4.3 Rapamycin.....	23
1.4.4 Glukokortikoidy .....	24
2. Cíle diplomové práce .....	26
3. Metody.....	27
3.1 Média.....	27
3.2 Roztoky.....	27
3.3 Zdroj buněk.....	28
3.4 Izolace myších MSC.....	28
3.5 Diferenciace adipogenní a osteogenní.....	28
3.6 Metabolická aktivita.....	29
3.7 Izolace RNA.....	30
3.8 Reverzní transkripce.....	30
3.9 Polymerázová řetězová reakce.....	31
3.10 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce .....	33
3.11 Průtoková cytometrie.....	35

3.11.1	Povrchové znaky .....	35
3.11.2	Apoptóza... .....	36
3.12	ELISA.....	37
3.12.1	DuoSet® ELISA Development System R&D.....	37
3.12.2	ELISA BD Pharmingen™ .....	38
3.13	Griessova reakce - měření produkce oxidu dusnatého.....	39
3.14	Software.....	39
3.15	Technické vybavení.....	39
3.16	Statistická analýza.....	40
4.	Výsledky.....	41
4.1	Myší MSC.....	41
4.1.1	Fenotypizace MSC .....	41
4.1.2	Diferenciace adipogenní a osteogenní.....	41
4.1.3	Apoptóza .....	43
4.1.4	Metabolická aktivita .....	44
4.1.5	Polymerázová řetězová reakce .....	45
4.1.6	Oxid dusnatý .....	46
4.1.7	Průtoková cytometrie .....	46
4.1.8	ELISA.....	49
4.2	Lidské MSC.....	51
4.2.1	Fenotypizace MSC .....	51
4.2.2	Diferenciace MSC .....	51
4.2.3	Apoptóza .....	54
4.2.4	Metabolická aktivita .....	55
4.2.5	Kvantitativní polymerázová řetězová reakce .....	56
4.2.6	Průtoková cytometrie .....	57
4.2.7	ELISA.....	60
5.	Diskuse.....	62
6.	Závěr .....	69
7.	Literatura .....	80
8.	Přílohy.....	82

## **Abstrakt**

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou definované jako multipotentní buňky negativní pro znaky hematopoetických kmenových buněk. Na imunosupresivních vlastnostech MSC je založena buněčná terapie oboru transplantací a autoimunitních onemocnění. Pacientům bývají současně s MSC podávány imunosupresivní látky. Neví se však, jak imunosupresivní látky ovlivňují imunomodulační mechanismy MSC.

Cílem práce bylo testovat vliv nejčastěji využívaných imunosupresivních látek cyklosporin A, mykofenolát mofetil, rapamycin, dexametazon a prednizon na přežívání a fenotyp myších a lidských MSC. Po krátkodobé kultivaci imunosupresivní látky různě ovlivňují metabolickou aktivitu, přežívání a expresi významných molekul pro imunosupresi MSC. Většina imunosupresivních látek měla inhibiční efekt na studované parametry myších MSC a pouze cyklosporin A fenotyp a přežívání myších MSC neměnil. Naopak u lidských MSC cyklosporin A, mykofenolát mofetil a rapamycin zvyšují expresi TSG-6, PD-L1 a TGF- $\beta$ , a tedy jejich schopnost inhibovat proliferaci a efektorové funkce lymfocytů, inhibovat maturaci dendritických buněk a podpořit vznik tolerogenního fenotypu makrofágů. Glukokortikoidy sice podporují přežívání a expresi Fas-L lidskými MSC, ale snižují expresi řady molekul uplatňujících se při imunosupresi. Vhodnou kombinací imunosupresivních látek s lidskými MSC pro terapeutické účely by proto mohl být cyklosporin A, mykofenolát mofetil a rapamycin.

## **Klíčová slova**

mezenchymální kmenové buňky, buněčná terapie, cyklosporin A, mykofenolát mofetil, rapamycin, dexametazon, prednizon

## **Abstract**

Mesenchymal stem cells (MSC) defined as multipotent, nonhematopoietic stem cells have been shown to possess various immunosuppressive properties. Thus they can be used to attenuate transplant rejection and also for treatment of autoimmune diseases. But simultaneously with MSC patients take immunosuppressive drugs and there is no evidence how this medication affect MSC.

The goal of this study is to elucidate how frequently used immunosuppressive drugs cyclosporineA, mycophenolate mofetil, rapamycin, dexamethasone and prednisone influence immune-related parameters of mice and human MSC. Here we show that MSC from various sources are affected differentially after short-term exposure of the tested immunosuppressants. Only cyclosporine A does not change immune-related parameters of mice MSC in the comparison to other immunosuppressants. However, cyclosporine A, mycophenolate mofetil and rapamycin enhance human MSC expression of TSG-6, PD-L1 and TGF- $\beta$  which are involved in inhibition of lymphocyte proliferation and effector function, inhibition of dendritic cell maturation and in support of tolerogenic phenotype of macrophages. Although glucocorticoid drugs promote survival of human MSC and expression of Fas-L they reduce expression of molecules that mediate immunosuppression. In this respect, the best candidates for therapy using MSCs in the combination with immunosuppressive drugs are cyclosporineA, mycophenolate and rapamycin.

## **Key words**

mesenchymal stem cell, cellular therapy, cyklosporine A, mycophenolate mofetil, rapamycin, dexamethasone, prednisone

## Seznam použitých zkratk

AMPK AMP activated protein kinase, AMP aktivovaná protein kináza  
APC allophycocyanine, alofykocyanin  
CD cluster of differentiation, diferenciační antigen  
COX-2 cyclooxygenase 2, cyklooxygenáza 2  
CsA cyclosporine A, cyklosporin A  
DC dendritic cell, dendritická buňka  
Dex dexamethasone, dexametazon  
DMEM Dulbecco's modified Eagle's medium,  
DNA deoxyribonucleic acid, deoxyribonukleová kyselina  
ELISA Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay  
FasL Fas ligand  
FGF fibroblast growth factor, růstový faktor fibroblastů  
FITC fluorescein isothiocyanate, fluorescein isothiokianát  
FKBP FK506 binding protein, FK506 vázající protein  
GAPDH glyceraldehyd-3-phosphate dehydrogenase, glyceraldehyd-3-fosfát dehydrogenáza  
GR glucocorticoid receptor, glukokortikoidový receptor  
GvHD graft versus host disease, reakce štěpu proti hostiteli  
hAT MSC human adipose tissue mesenchymal stem cell, lidské MSC izolované z tukové tkáně  
hBM MSC human bone marrow mesenchymal stem cell, lidské MSC izolované z kostní dřeně  
HSC hematopoietic stem cell, hematopoetické kmenové buňky  
HGF hepatocyte growth factor, růstový faktor hepatocytů  
HLA human leukocyte antigen, lidský leukocytární antigen  
HO hem oxygenesis, hem oxygenáza  
Hsp heat shock protein, protein teplotního šoku  
ICAM-1 intracellular adhesive molecule-1, mezibuněčná adhezivní molekula-1  
IDO indolamin 2,3-dioxygenáza  
IFN- $\gamma$  interferon  $\gamma$   
IL interleukin  
IMPDH inosine-5'-monophosphate dehydrogenase, inozin-5'-monofosfát dehydrogenáza  
IRF interferon regulatory factor, regulační faktor interferonu  
KGF keratinocyte growth factor, růstový faktor keratinocytů  
MAPK mitogen activated protein kinases, mitogenem aktivované protein kinázy



MCP-1 monocyte chemotactic protein-1, chemotaktický protein monocytů 1  
 $\alpha$ MEM Minimum Essential Medium  
MHC I Major histocompatibility complex class I, molekula hlavního histokompatibilního komplexu třídy I  
MLR mixed lymphocyte reaction, smíšená lymfocytární reakce  
MMF mykofenolát mofetil  
MSC mesenchymal stem cells, mezenchymální kmenové buňky  
NFAT nuclear factor of activated T-cells, nukleární faktor aktivovaných T buněk  
NF- $\kappa$ B nuclear factor kappa B, nukleární faktor kappa B  
NK natural killer, přirození zabíječi  
PBS phosphate buffered saline, fosfátový pufr  
PCR polymerase chain reaction, polymerázová řetězcová reakce  
PD-L1 programmed death ligand 1, ligand programované buněčné smrti 1  
PE phycoerythrin, fykoerytrin  
PGE2 prostaglandine E2, prostaglandin E2  
Pre prednisone, prednizon  
Rapa rapamycin  
RNA ribonucleic acid, ribonukleová kyselina  
SEM standard error of mean, střední chyba průměru  
TGF- $\beta$  transforming growth factor  $\beta$ , transformující růstový faktor  $\beta$   
Th T helper cell, pomocné T buňky  
TLR toll-like receptor  
TNF- $\alpha$  tumor necrosis factor  $\alpha$ , faktor nekrotizující nádory  $\alpha$   
Treg regulatory T-cell, T regulační buňky  
ULK1 unc-51 like kinase 1, unc-51 like kináza 1  
VCAM vascular cell adhesion molekule, adhezivní molekula buněk cév  
WST-1 water soluble tetrazolium 1, ve vodě rozpustná tetrazoliová sůl 1

# 1. Úvod

## 1.1 Fenotyp

Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou definovány jako multipotentní buňky se schopností sebeobnovy a diferenciací do pojivových tkání (adipogenní, osteogenní a chondrogenní), jsou adherentní k plastu během kultivace a exprimují povrchové markery klastru diferenciací (cluster of differentiation, CD) 105, CD73 a CD90, CD44. Zároveň jsou negativní pro markery hematopoetických a endoteliálních buněk: CD45, CD34, CD31, CD11b (Dominici et al., 2006).

MSC je možné izolovat téměř ze všech tkání, nejčastěji se k izolaci využívá tuková tkáň a kostní dřev (Taha and Hedayati, 2010).

## 1.2 Využití MSC v klinických studiích

Podle databáze klinických studií <https://clinicaltrials.gov> jsou MSC využívány ve více než 474 studiích. Většina z nich využívá imunomodulační efekt MSC s cílem navodit toleranci transplantátu. Dále jsou MSC používány v klinických studiích léčby autoimunitních onemocnění.

Pro léčbu jsou využívány autologní i allogenní MSC. Bylo prokázáno, že podání MSC nezávisle na shodě v lidských leukocytárních antigenech (human leukocyte antigen, HLA) má srovnatelný efekt a je pro pacienty bezpečné. Navíc MSC využívané při transplantacích prodloužily přežívání transplantátu (Le Blanc et al., 2008; Mudrabettu et al., 2015; Ra et al., 2011; Reinders et al., 2013). Allogenní hBM MSC jsou připravovány jako terapeutikum firmou Osiris pod názvem Prochymal® ([http://osiris.com/OLD/clinical\\_prochymal.php](http://osiris.com/OLD/clinical_prochymal.php)). Obdobně jsou připravovány buňky JR-031-301 firmou JCR Pharmaceuticals Co. Ltd. (Ashiya, Japan) a jsou určeny pro léčbu reakce štěpu proti hostiteli (graft-versus-host disease, GvHD).

### 1.2.1 Transplantace

Pro zabránění rejekce transplantátu jsou pacientům tradičně podávány imunosupresivní látky (viz tabulka 1), které ale mají mnoho nežádoucích vedlejších účinků (López et al., 2006). Studie na zvířecích modelech *in vitro*, *in vivo* a nyní i klinické studie ukazují, že MSC snižují míru proliferace lymfocytů při smíšené lymfocytární reakci (mixed lymphocyte reaction, MLR) (Bartholomew et al., 2002), mají schopnost podpořit přežívání transplantátu a omezit GvHD

(Auletta et al., 2015; Wan et al., 2008). Díky imunosupresivním vlastnostem MSC je možné snížit dávky imunosupresivních látek. Na rozdíl od zvířecích modelů (Wan et al., 2008) je riskantní imunosupresivní látky pacientům po transplantaci nepodávat vůbec. Existuje řada klinických studií transplantací, kdy jsou aplikovány MSC v kombinaci s imunosupresivními látkami (Mudrabettu et al., 2015). Avšak není známo, jaký vliv mají imunosupresivní látky na imunomodulační vlastnosti MSC. V některých studiích léčby akutní GvHD, kdy byli pacienti rezistentní k imunosupresivním látkám, nebyli jedinci léčeni imunosupresivními látkami v době podání MSC (Muroi et al., 2015).

Z počátku bylo využití MSC při transplantacích studováno na zvířecích modelech, jako např. krysí model transplantace jater, transplantace kůže u paviána a další (Bartholomew et al., 2002; Wan et al., 2008). Klinické studie využívající MSC nejčastěji při transplantacích ledvin, jater a pro léčbu GvHD jsou nyní na úrovni pilotních studií, ale i ve fázi 1 až 3 (viz tabulka 1) (Mudrabettu et al., 2015; Reinders et al., 2013).

Typické je intravenózní podání MSC, v některých případech kotransplantace MSC s hematopoetickými kmenovými buňkami (hematopoetic stem cell, HSC) je praktikováno intraoseální podání (viz tabulka 1). MSC bývají podávány ve více dávkách, např. 1 den před transplantací a 30 dnů po transplantaci (Mudrabettu et al., 2015). V rámci jiné studie byly MSC podány 6 měsíců po transplantaci ve dvou dávkách s rozstupem sedmi dnů v případě známek odhojování (Reinders et al., 2013). V jiných studiích bylo podáno až 12 infuzí MSC (Muroi et al., 2015).

Také bylo studováno imunomodulační působení MSC na imunitní systém. Bylo zjištěno, že pacienti, kterým byly podávány MSC, měli sníženou proliferaci CD4<sup>+</sup> T buněk v porovnání s pacienty, kterým MSC nebyly podány. Od 30 dnů po transplantaci byl pozorován u pacientů léčených MSC procentuální nárůst populace regulačních T buněk (Treg) (Mudrabettu et al., 2015). V jiných studiích naopak tento efekt zaznamenán nebyl, ale došlo ke snížení proliferace lymfocytů příjemce transplantátu v MLR s lymfocyty dárce (Reinders et al., 2013).

Zároveň byli pacienti léčeni imunosupresivními látkami, ale jejich vliv na imunomodulační vlastnosti MSC studován nebyl.

Tabulka 1 klinické studie využívající imunomodulačních vlastností mezenchymálních kmenových buněk při transplantacích. Současně jsou podávány imunosupresivní látky; Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), prednizon (Pre), hematopoetické kmenové buňky (HSC), mezenchymální kmenové buňky (MSC), kostní dřev (BM).

Transplantovaný orgán	Fáze klinické studie	Původ MSC	Rok ukončení	Stát	Imunosupresivní látky	Reference (www.clinicaltrials.gov)
Ledviny Játra	1-2	BM autologní	2017	Belgie	Takrolimus, MMF, steroidy	NCT01429038
Ledviny	1	BM autologní	Prosinec 2016	Indie	CsA, azathioprin, steroidy	NCT02409940 (Mudrabetu et al., 2015)
Ledviny	1-2	BM autologní	2013	Itálie	CsA, MMF, Methylprednisolone	NCT00752479 (Perico et al., 2013)
Ledviny	1	BM autologní	2013	Nizozemí	CsA/takrolimus, MMF, Pre	(Reinders et al., 2013)
Ledviny	1-2	BM autologní	2011	Čína	Inhibitory kalcineurinu, MMF, glukokortikoidy	NCT00658073
HSC (léčba leukemie, lymfomů, intraoseální podání)	neuveдено	neuveдено	2017	USA (Ohio)	CsA, MMF, cyklofosfamid	NCT02181478
HSC (léčba GvHD)	1-2	BM neuvedeno	Prosinec 2016	USA (Maryland)	Kortikosteroidy	NCT02379442
HSC (léčba GvHD)	2	BM autologní allogenní	2008	Švédsko Itálie Rakousko	Prednizolon, CsA/takrolimus, MMF	(Le Blanc et al., 2008)
(léčba GvHD)	3	BM allogenní Prochymal	2010	USA Austrálie Kanada	Methylprednizolon	NCT00562497
HSC (léčba GvHD)	1-2	AT allogenní	2020	Španělsko		NCT02687646

## 1.2.2 Autoimunitní onemocnění

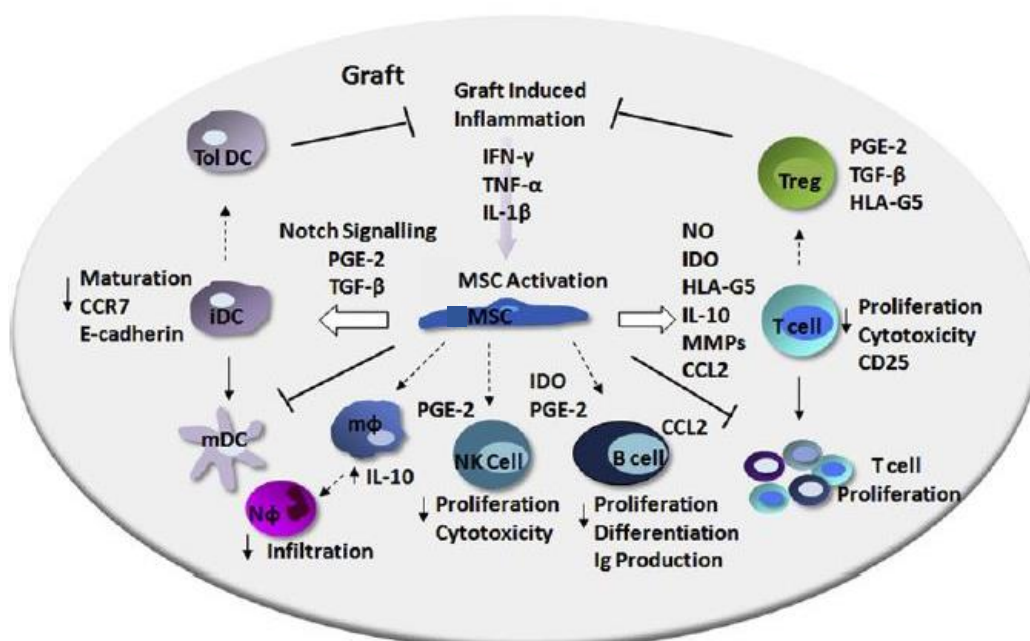
MSC jsou využívány také pro léčbu autoimunitních onemocnění v klinických studiích fáze 1 a 2 (viz tabulka 2).

*Tabulka 2 Příklad klinických studií autoimunitních onemocnění, které využívají MSC. Zároveň jsou pacientům podávány imunosupresivní látky: Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), prednizon (Pre), kostní dřev (BM), pupečník (UBC).*

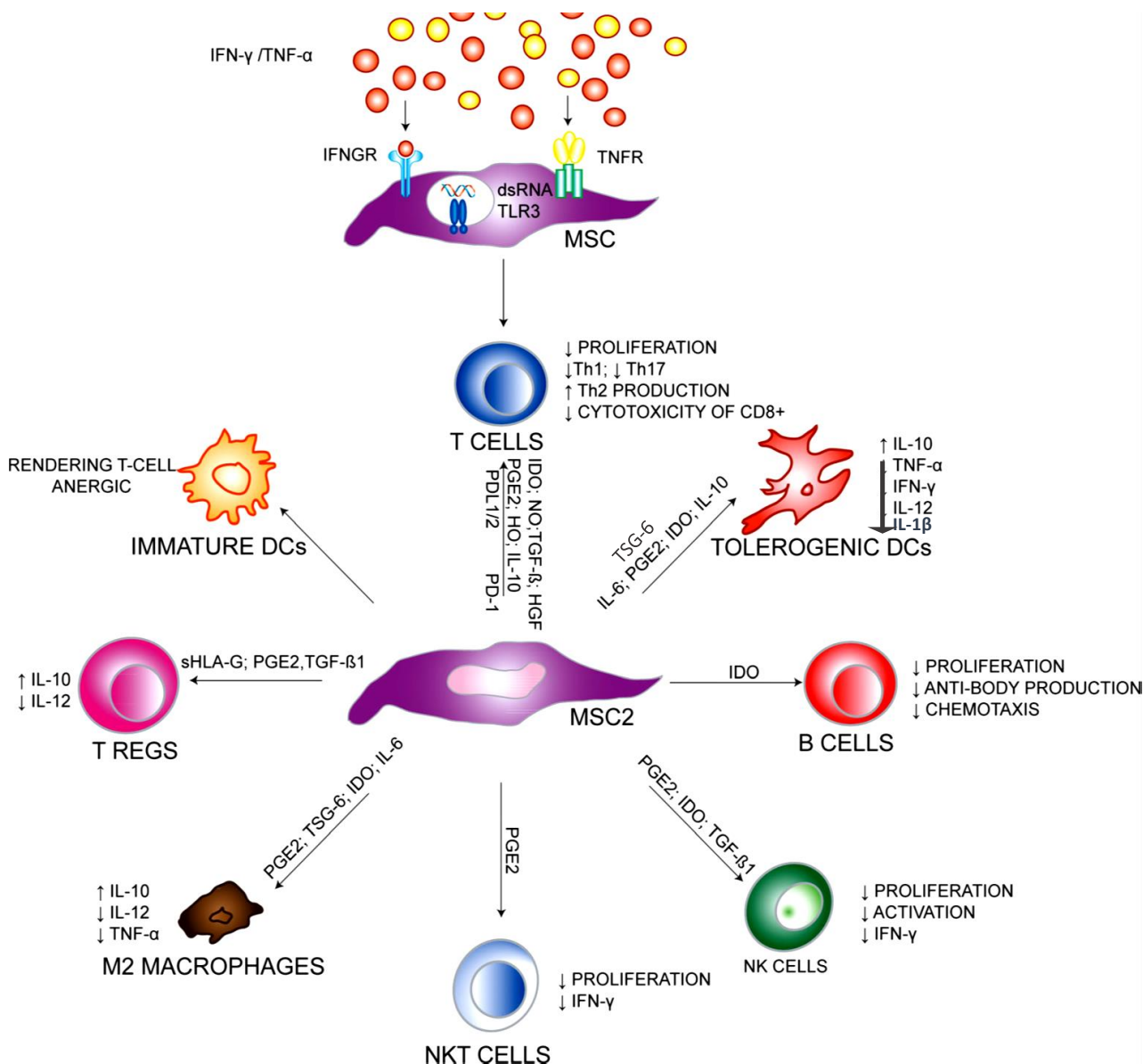
<b>Autoimunitní onemocnění</b>	<b>Fáze klinické studie</b>	<b>Původ MSC</b>	<b>Rok ukončení</b>	<b>Stát</b>	<b>Imunosupresivní látky</b>	<b>Reference</b>
Aplastická anémie	1-2	BM autologní	2014	Brazílie	CsA	NCT01297972 www.clinicaltrials.gov
Roztroušená skleróza	1	autologní	2014	USA	CsA, MMF	NCT00813969 www.clinicaltrials.gov
Revmatoidní artritida	neuvedeno	BM, UBC allogenní	2012	Čína	CsA	(Liang et al., 2012)
Lupus erythematodes	Pilotní studie	BM	2010	Čína USA	CsA Pre	(Liang et al., 2010)

### 1.3 Imunomodulační mechanismy MSC

MSC mají kromě schopnosti diferenciaci do buněčných typů mezodermy řadu imunoregulačních vlastností. Interagují s buňkami imunitního systému prostřednictvím solubilních a povrchových molekul. V důsledku stimulace MSC různými způsoby jsou MSC polarizovány buď na fenotyp MSC1 nebo MSC2 a hrají různou úlohu v regulaci imunitní odpovědi (Waterman et al., 2010). V časně fázi zánětu, kdy je produkováno málo prozánětlivých cytokinů jako např. faktor nekrotizující nádory  $\alpha$  (tumor necrosis factor  $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) a interferon  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), ale naopak je přítomno velké množství mikroorganismů, dochází ke stimulaci MSC prostřednictvím LPS přes „Toll-like“ receptor (TLR) 4. Poté MSC vykazují prozánětlivý fenotyp MSC1. Dojde-li naopak ke zvýšení koncentrace IFN- $\gamma$  nebo TNF- $\alpha$ , případně je-li stimulován TLR-3, je podporován fenotyp MSC2 (viz obrázek 2) a jsou exprimovány cytokiny, které podporují protizánětlivé populace imunitních buněk a hojivé prostředí (English et al., 2007; Gazdic et al., 215). Pro ustanovení tolerance transplantátu s využitím MSC je nutné navození fenotypu MSC2 (viz obrázek 1, 2).



Obrázek 1 Navození tolerance transplantovaného orgánu mezenchymálními kmenovými buňkami (MSC). Po stimulaci prozánětlivými cytokiny v prostředí transplantátu MSC produkují cytokiny, které podporují vznik tolerogenních dendritických buněk (Tol DC) a regulačních T buněk (Treg). Podporují produkci interleukinu (IL)-10 makrofágy (Mφ) a tím je snížena infiltrace transplantátu neutrofilů (Nφ). Zároveň inhibují proliferaci a cytotoxicitu T, B a NK buněk. Imaturní dendritická buňka (iDC), maturovaná dendritická buňka (mDC). (English et al., 2010).



Obrázek 2 Vliv mezenchymálních kmenových buněk (MSC) v prozánětlivém prostředí na buňky imunitního systému. Solubilními faktory i povrchovými molekulami snižují MSC proliferaci a cytotoxicitu leukocytů. Zároveň podporují tolerogenní populace imunitních buněk (Gazdic et al., 2015).

MSC mají schopnost potlačovat proliferaci a cytotoxicitu prozánětlivých populací leukocytů přirozené (Le Blanc and Davies, 2015) i adaptivní imunity, které způsobují odhojování transplantátu nebo rozvoj autoimunitních onemocnění jako jsou např. aktivované monocyty (Du Rocher et al., 2012), makrofágy (Cho et al., 2014), B buňky (Corcione et al., 2006), NK buňky (Spaggiari et al., 2008), NKT buňky (Prigione et al., 2009), prozánětlivé populace T lymfocytů Th1, Th17 (Normanton et al., 2014)  $\gamma\delta$  T lymfocyty (Liu et al., 2015), (viz obrázek 2). MSC ale nemají schopnost cíleně inhibovat buňky specifické vůči konkrétnímu antigenu (Krampera et al., 2003).

V přítomnosti MSC je podporován regulační fenotyp imunitních buněk, což napomáhá navození periferní tolerance (viz obrázek 1). Regulační T buňky (Treg) vznikají díky tomu, že MSC konstitutivně produkují transformující růstový faktor  $\beta$  (transforming growth factor- $\beta$ , TGF- $\beta$ ), prostaglandin E2 (PGE2) (English et al., 2009), HLA-G (Selmani et al., 2008). MSC také podporují prostřednictvím cytokinů PGE2, TNF- $\alpha$  stimulující gen 6 (TNF- $\alpha$ -stimulating gene 6, TSG-6),IDO a interleukin-6 (IL)-6 vznik M2 makrofágů (viz obrázek 2), které také napomáhají vzniku Treg (Choi et al., 2011; Melief et al., 2013b).

MSC ovlivňují efektorové populace lymfocytů i nepřímo inhibicí maturace dendritických buněk (dendritic cell, DC) a navozením jejich tolerogenního fenotypu. Jedním z mechanismů je zvýšení produkce IL-10 MSC, když jsou kokultivovány s DC, a následném snížení exprese markerů maturovaných DC (CD80, CD86, OX62, MHC II, CD11b/c) a také snížení produkce IL-12 DC (Liu et al., 2013). MSC navozují tolerogenní fenotyp DC, který odpovídá fenotypu tolerogenních DC indukovanému apoptickými buňkami. Tento fenotyp je podobný nematurovaným DC, ale zůstává stabilní i po stimulaci „signály nebezpečí“. Dle některých studií je navození tolerogenních DC pomocí MSC závislé na mezibuněčném kontaktu (Jagged-2 vážící se na Notch receptor) (Zhang et al., 2009). Uplatňují se také solubilní faktory, jako je TSG-6, který blokuje dráhu mitogenem aktivovaných protein kináz (mitogen activated protein kinases, MAPK) a translokaci NF $\kappa$ B do jádra DC stimulovaných „signály nebezpečí“, čímž je zabráněno maturaci DC (Liu et al., 2014). Tolerogenní DC mají zvýšenou expresi IL-10, IDO, Fas-L a CD11b a naopak sníženou expresi IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , CD11c, CD80, CD86 a CD40 (Beyth et al., 2005). Mají schopnost indukovat Treg např. prostřednictvím TGF- $\beta$  (Zhao et al., 2012).

MSC jsou poměrně heterogenní v imunomodulačních i diferenciacích schopnostech a to jak mezidruhově tak v rámci organismu. Například myší MSC produkují NO a inhibují tak proliferaci lymfocytů, zatím co u lidských MSC tuto funkci plní převážně IDO. U myších MSC nebyla exprese IDO potvrzena (Bouffi et al., 2010; Ren et al., 2009). Lidské MSC produkují IL-10 (Kim et al., 2015a), zatím co u myších MSC exprese IL-10 potvrzena nebyla (English et al., 2007). Rozdíly v expresi imunomodulačních faktorů jsou také mezi MSC, které se nachází v různých tkáních (Hwang et al., 2009; Yang et al., 2013).



### 1.3.1 Solubilní faktory produkované MSC

Mezi molekuly, které hrají nejzásadnější roli v potlačení proliferace prozánětlivých populací imunitních buněk, patří solubilní faktory oxid dusnatý (NO), TGF- $\beta$ , indoleamine-2,3-dioxygenáza (indoleamine-2,3-dioxygenase, IDO), PGE<sub>2</sub>, růstový faktor hepatocytů (hepatocyte growth factor, HGF), hem oxygenáza (heme oxygenase, Ho), IL-6, TSG-6, IL-7 a mnoho dalších (viz obrázek 2) (Castro-Manrreza and Montesinos, 2015).

NO je molekula produkovaná pomocí enzymu indukovaná syntáza oxidu dusnatého (inducible nitric oxid synthase, iNOS) z aminokyseliny L-arginin. Enzym iNOS je MSC exprimován, pouze pokud se v prostředí vyskytuje dostatečné množství prozánětlivých cytokinů, případně LPS (Li et al., 2012). Myši MSC produkují NO až po stimulaci LPS a IFN- $\gamma$  a díky tomu transkripční faktory nukleární faktor kappa B (nuclear factor kappa B, NF- $\kappa$ B) a regulační faktor interferonu (interferon regulatory factor, IRF) nasednou na svá vazebná místa v promotoru iNOS. Následně je tento enzym exprimován a je produkován NO (Xie et al., 1993). Stimulace MSC samotným LPS nebo samotným IFN- $\gamma$  nestačí pro expresi iNOS a následnou produkci NO (Svobodova et al., 2011). NO plní různou funkci v přirozené a adaptivní imunitě. Buňky přirozeného imunitního systému produkují NO zejména proto, aby zničily fagocytované patogeny (Marcinkiewicz, 1997). Převážně u myši hraje NO významnou roli v regulaci odpovědi adaptivního imunitního systému. Bylo prokázáno, že NO má schopnost inhibovat proliferaci lymfocytů (Hoffman et al., 1990; Sato et al., 2007). Touto molekulou je ovlivňována i polarizace T lymfocytů. Z CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> T lymfocytů, které se mohou podílet na odhojování transplantátu, mohou v prostředí s NO vznikat tolerogenní CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup> NO-Treg. Tyto buňky mají unikátní schopnost inhibovat prozánětlivé populace jako např. Th17 (Niedbala et al., 2013).

Cytokin IL-6 je konstitutivně exprimovaný MSC. V časně fázi zánětu funguje jako prozánětlivý cytokin. Podporuje přežívání a efektorové funkce neutrofilů (Raffaghello et al., 2008) a v kombinaci s TGF- $\beta$  indukuje vznik prozánětlivého fenotypu lymfocytů Th17 (Veldhoen et al., 2006). Na druhou stranu bazální úroveň exprese IL-6 MSC inhibuje diferenciaci monocytů na DC a podporuje vznik tolerogenní populace makrofágů, které dále indukují vznik Treg (Melief et al., 2013a; Melief et al., 2013b). U MSC izolovaných z myši s delecí genu pro IL-6 bylo pozorováno snížení produkce PGE<sub>2</sub>, což nasvědčuje tomu, že Cox-2 je pozitivně regulována IL-6 (Bouffi et al., 2010).

MSC podporují tolerogenní fenotyp makrofágů M2 prostřednictvím produkce cytokinu TSG-6. Makrofágy stimulované „signály nebezpečí“ zvýší expresi prozánětlivých cytokinů,

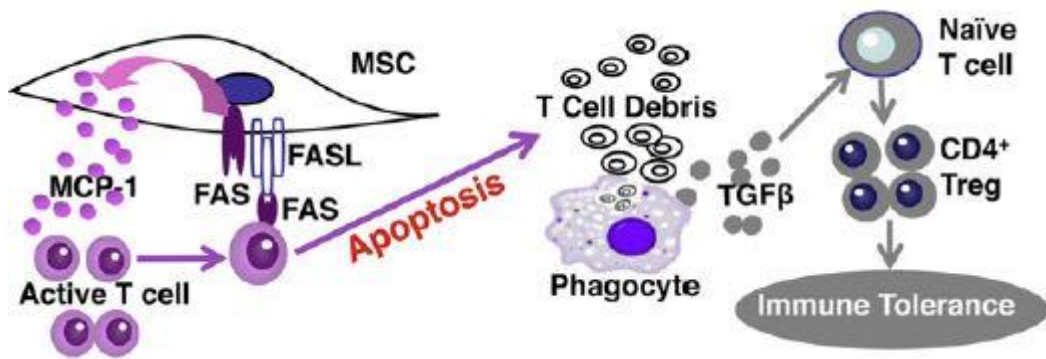
jako např. TNF- $\alpha$ , čímž amplifikují zánětlivou reakci. Zároveň ale dochází k tomu, že prozánětlivé cytokiny směřují MSC k fenotypu MSC2, které mají zvýšenou expresi TSG-6. Tímto faktorem MSC inhibují signalizační dráhu NF- $\kappa$ B makrofágů, a tedy jejich schopnost navodit prozánětlivé prostředí (Choi et al., 2011). TSG-6 také stabilizuje tolerogenní fenotyp DC (mechanismus uveden výše) (Liu et al., 2014).

Cytokin IL-7, který se váže na molekulu CD127 (IL-7 receptor, IL-7R), je nezbytný v časně fázi vývoje lymfocytů (Peschon et al., 1994; Yu et al., 2004), IL-7 produkovaný MSC podporuje přežívání naivních lymfocytů (Normanton et al., 2014). IL-7R je také markerem paměťových T buněk (Huster et al., 2004). Na rozdíl od jiných efektorových T buněk jsou Treg definovány jako populace T lymfocytů CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> (Seddiki et al., 2006). Bylo ale zjištěno, že exprese IL-7R vzrůstá po aktivaci Treg a koreluje s markery aktivovaných Treg (CD103, ICOS) (Simonetta et al., 2010). Signalizace IL-7R po navázání IL-7 podporuje schopnost Treg odpovídat na IL-2 a tedy zprostředkovávat periferní toleranci (Schmaler et al., 2015). IL-7 podporuje obnovení krvetvorby po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Broers et al., 2003), ale zároveň napomáhá přežívání alloreaktivních lymfocytů a amplifikuje GvHD (Chung et al., 2008; Sinha et al., 2002).

### **1.3.2 Povrchové molekuly MSC uplatňující se při imunomodulačních mechanismech**

Významnými povrchovými molekulami exprimovanými MSC pro ovlivnění imunitního systému jsou např. ligand programované buněčné smrti 1 (programmed cell death-ligand 1, PD-L1), Fas ligand (Fas-L), intracelulární adhezivní molekula 1 (intercellular adhesion molecule-1, ICAM-1), adhezivní molekula buněk cév (vascular cell adhesion molecule-1, VCAM-1) (Majumdar et al., 2003).

Mezibuněčný kontakt MSC s buňkami imunitního systému je důležitý pro imunosupresivní působení MSC (Quaedackers et al., 2009). MSC prostřednictvím povrchové molekuly z rodiny B7, PD-L1 inhibují proliferaci a efektorové funkce leukocytů (Augello et al., 2005; Chinnadurai et al., 2014). PD-L1 se váže na molekulu PD-1, kterou exprimují aktivované lymfocyty, NKT, aktivované monocyty a DC (Keir et al., 2008). Prostřednictvím molekuly Fas-L MSC indukují apoptózu buněk, které exprimují Fas. Toto je významné pro inhibici T buněk. Mechanismus je takový, že MSC atrahují T buňky produkcí chemotaktického proteinu monocyty 1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1) do své blízkosti a poté navodí apoptózu T buněk prostřednictvím Fas-L. Apoptické T buňky podporují makrofágy v produkci TGF $\beta$ , čímž je výrazně podpořen vznik Treg (viz obrázek 3) (Akiyama et al., 2012).

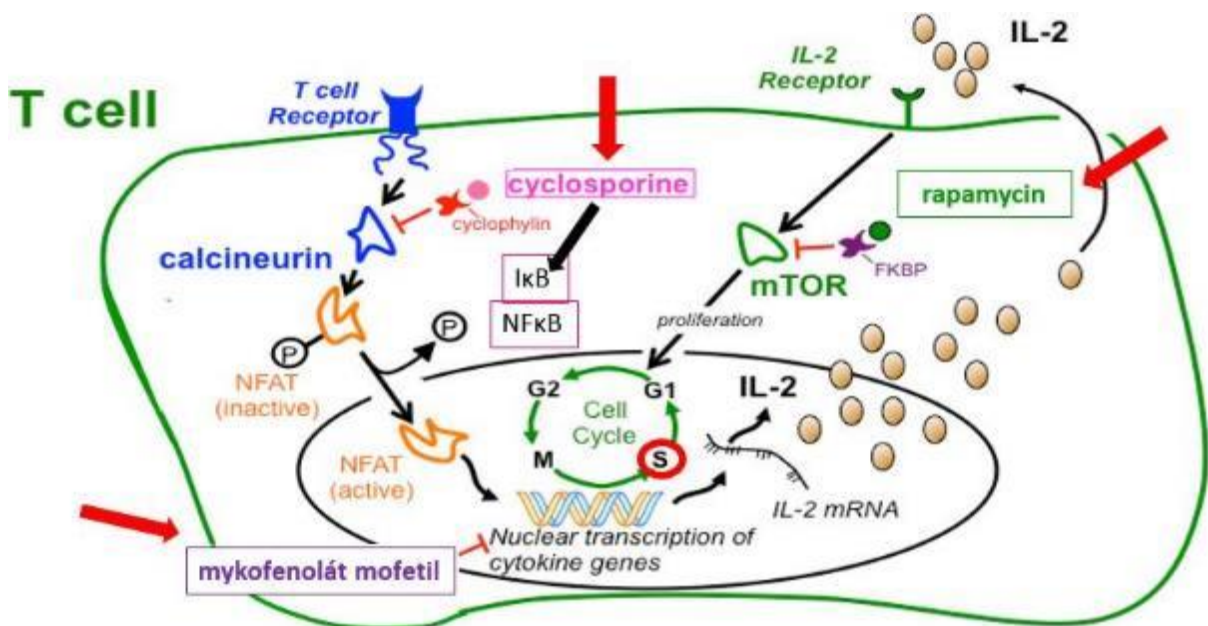


Obrázek 3 MSC produkcí chemotaktického proteinu monocytů (MCP-1) atrahují aktivované T buňky do své blízkosti a prostřednictvím interakce Fas/Fas-L navozují apoptózu těchto T buněk. Fagocytózou apoptických tělísek makrofágy je zvýšena produkce TGF- $\beta$  a podpořen vznik regulačních T buněk (Treg), které zprostředkovávají imunitní toleranci (Akiyama et al., 2012).

Také bylo prokázáno, že se zvýšenou expresí adhezivních molekul ICAM-1 a VCAM-1 mají MSC větší schopnost imunopresivně působit na imunitní buňky, především na T lymfocyty (Ren et al., 2010).

## 1.4 Imunosupresivní látky

Mechanismy působení imunosupresivních látek byly doposud nejlépe prozkoumány na T buňkách (viz obrázek 4). Cílové molekuly imunosupresivních látek ale exprimují i MSC, proto lze předpokládat, že imunosupresivní látky ovlivňují i MSC (Hoogduijn et al., 2008).



Obrázek 4 Molekulární mechanismy působení cyklosporinu, mykofenolátu a rapamycinu. Upraveno podle: [http://medweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ\\_transplantation](http://medweb.tulane.edu/pharmwiki/doku.php/organ_transplantation).

Imunosupresivní látky lze rozdělit dle mechanismu působení (viz Tabulka 3).

Tabulka 3 Klasifikace imunosupresivních látek dle mechanismu působení. Upraveno podle: (Survase et al., 2011).

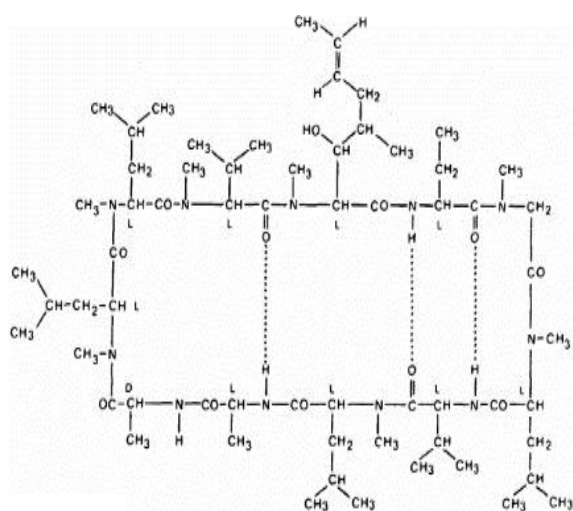
<b>Regulátory genové exprese</b>	Glukokortikoidy	Inhibice MAPK, PI3K, Akt signalizační dráhy Inhibice transkripčních faktorů AP-1, NF- $\kappa$ B
<b>Alkylační činidla</b>	Cyklofosfamid	Alkylace DNA, suprese B lymfocytů
<b>Inhibitory <i>de novo</i> syntézy purinů</b>	Metotrexát, Azatioprin, Mykofenolát mofetil	Suprese prozánětlivé imunitní odpovědi prostřednictvím adenosinu, indukce apoptózy aktivovaných T lymfocytů, inhibice syntézy purinů a pyrimidinů
<b>Inhibitory <i>de novo</i> syntézy pyrimidinů</b>	Leflunomid	Inhibice dihydroorotát dehydrogenázy
<b>Inhibitory kináz a fosfatáz</b>	Cyklosporin A, FK-506 (takrolimus), rapamycin	Inhibice fosfatázové aktivity kalcineurinu (NFAF signalizační dráha), signalizační dráhy NF- $\kappa$ B a kináz buněčného cyklu (mTOR)

## 1.4.1 Cyklosporin A

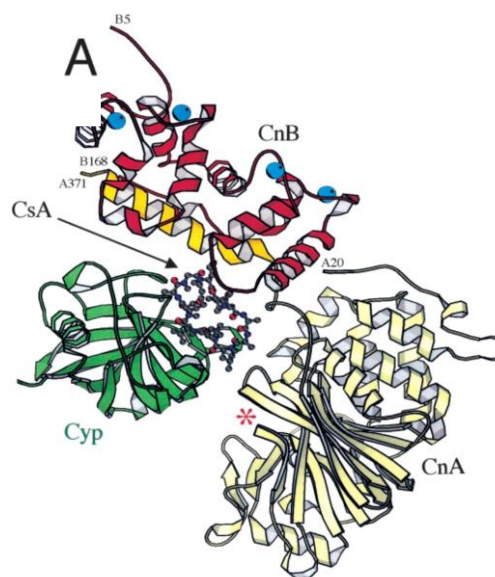
Imunosupresivní látka CsA byla poprvé izolována z houby *Tolypocladium infantum* v roce 1970. O 6 let později bylo na zvířecím modelu odhaleno, že CsA působí imunosupresivně na T lymfocyty (Borel et al., 1976) což bylo později prokázáno i u lidí (Leoni et al., 1978). Je však známo, že má nefrotoxické vedlejší účinky (de Mattos et al., 2000).

CsA je cyklický peptid o 11 aminokyselinách (viz obrázek 5). Cyklické peptidy jsou oproti lineárním peptidům odolnější vůči proteolytické degradaci a navíc mají schopnost se více specificky a pevněji vázat na makromolekulární receptory (Zhang et al., 2008).

Imunosupresivní vlastnosti CsA vyplývají ze schopnosti inhibovat signalizační dráhy nukleárního faktoru aktivovaných T buněk (nuclear factor of activated T-cells, NFAT) a NFκB, což bylo studováno především na T buňkách. K inhibici translokace NFAT do jádra dochází tak, že se CsA váže na cyklofilin (Cyp) a následně tento komplex po vazbě na kalcineurin (Cn) (Liu et al., 1991) způsobí posun autoinhibičního alfa-helixu z aktivního místa Cn a stericky brání navázání substrátu do aktivního místa (viz obrázek 6). Tato vazba je nekompetitivní (Jin and Harrison, 2002). Pro přesun transkripčního faktoru NFκB do jádra je nutné, aby byl odstraněn inhibitor IκB ubikvitinací a degradací v proteazomu. CsA má schopnost se nekompetitivně vázat na 20S proteazom, čímž zamezí degradaci IκB a přesunu NFκB do jádra (Meyer et al., 1997; Nishiyama et al., 2005).



Obrázek 5 Chemický vzorec cyklosporin A (Borel et al., 1976).



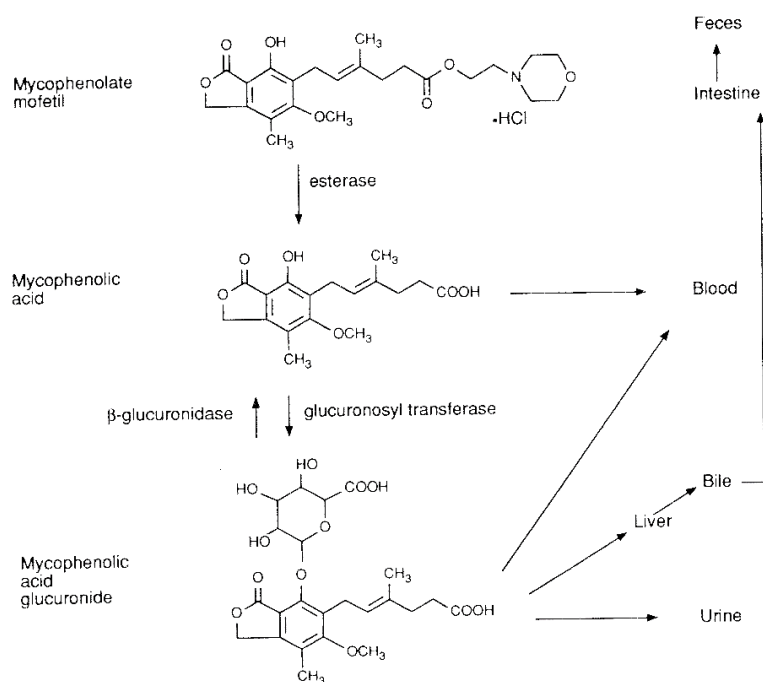
Obrázek 6 Krystalová struktura vazby CsA s Cyp na Cn. Cn je tvořen podjednotkami CnA, CnB. Hvězdičkou je označeno aktivní místo Cn (Jin and Harrison, 2002).

## 1.4.2 Mykofenolát mofetil

Mykofenolát mofetil (MMF) (2-morfolinoetyl ester kyseliny mykofenolové) je prekurzorem kyseliny mykofenolové (MPA). V přírodě je MMF produkován plísněmi rodu *Penicillium* (Anderson et al., 1988). V organismu je MMF rychle metabolizován na MPA a glukuronid MPA a vylučován z těla tělními tekutinami (viz obrázek 7). MPA působí jako inhibitor inosin monofosfát dehydrogenázy (IMPDH) a ovlivňuje tak syntézu guaninu v S fázi buněčného cyklu (Cohn et al., 1999) (viz obrázek 8). Existují dvě různé izoformy tohoto enzymu, a to IMPDH I a IMPDH II, které jsou kódovány různými geny na různých chromozomech (Natsumeda et al., 1990). Tyto izoformy vykazují 84% shodu v sekvenci aminokyselin, jsou evolučně konzervovány, avšak MPA má 4,8 krát vyšší účinnost inhibovat IMPDH II oproti IMPDH I (Carr et al., 1993).

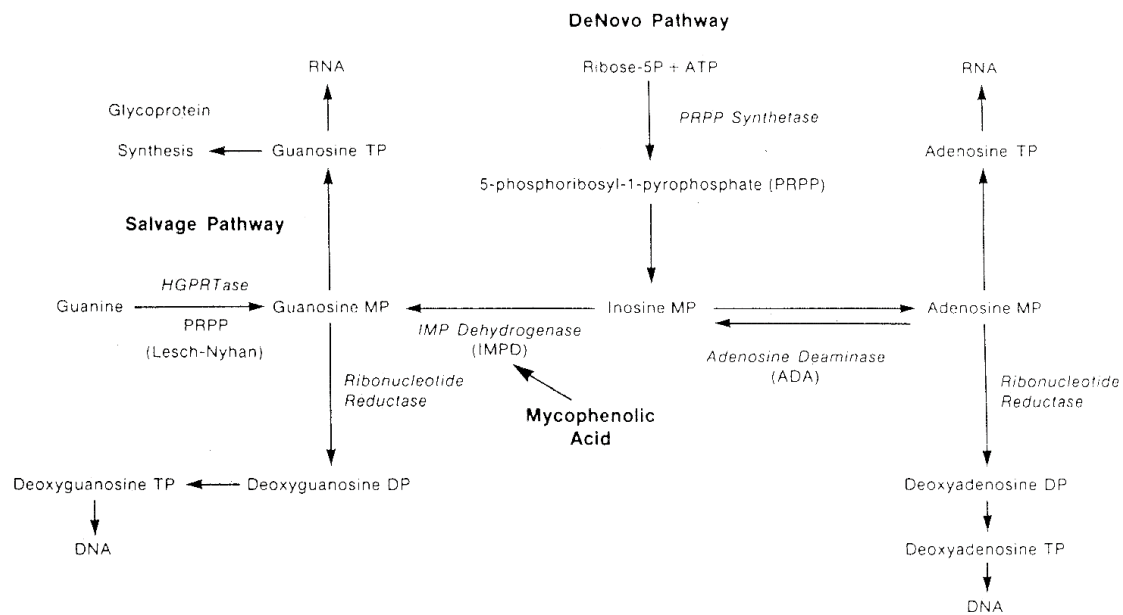
Zejména proliferující buňky mají zvýšenou expresi IMPDH II. Je známo, že lymfocyty mají vysokou expresi IMPDH II, a proto jsou citlivé k inhibičnímu působení MPA na rozdíl od ostatních buněk (Cohn et al., 1999). Tento efekt je využíván k imunosupresi po transplantacích, kdy MPA inhibuje klonální expanzi a cytotoxicitu lymfocytů.

U MSC ale byla také zjištěna vysoká úroveň exprese IMPDH II ve vztahu k pozitivnímu markeru MSC - CD90 (Hoogduijn et al., 2008), proto lze očekávat výrazný vliv MPA na MSC.



Obrázek 7 Strukturní vzorec mykofenolát mofetil, kyselina mykofenolová, glukuronid kyseliny mykofenolové. Vzájemná přeměna a vylučování z organismu tělními tekutinami (Allison and Eugui, 2000).

## Pathways of Purine Biosynthesis



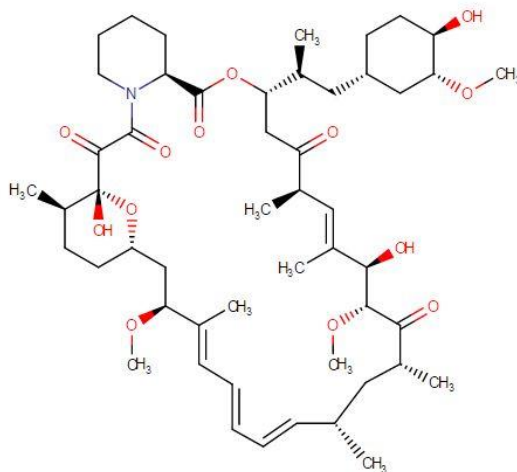
Obrázek 8 Biosyntéza purinů de novo a prostřednictvím Salvage dráhy. Zvýrazněno inhibiči MPA na IMPDH (Allison and Eugui, 2000).

### 1.4.3 Rapamycin

Rapamycin (Rapa) (viz obrázek 9), označován také jako sirolimus, je produkován bakterií *Streptomyces hygroscopicus*, která byla nalezena ve vzorcích půdy Velikonočního ostrova (Rapa Nui). Poprvé byl Rapa izolován v roce 1975 (Sehgal et al., 1975). V následujících letech bylo zjištěno, že má vliv na metabolismus nukleových kyselin, lipidů i proteinů (Singh et al., 1979) a je schopen zastavit buněčný cyklus v G1 fázi, což bylo testováno na modelu kvasinek *Saccharomyces cerevisiae*. Kvasinky s delecí genu *FPR1* kódující protein FK506 vázající protein (FK506 binding protein, FKBP) byly rezistentní vůči působení Rapa. Pokud se nacházela mutace v genech *TOR1* a *TOR2*, rovněž došlo k rezistenci vůči Rapa, čímž bylo prokázáno, že tyto proteiny hrají roli v působení Rapa (Heitman et al., 1991). Bylo potvrzeno, že Rapa inhibuje T buněčnou proliferaci zablokováním buněčné signalizace vedoucí od IL-2 receptoru na modelu myších buněk (Bierer et al., 1990). Bylo ověřeno, že u savců se vyskytuje jak receptor pro Rapa FKBP, tak i homolog kvasinkových TOR, známý jako mammalian target of rapamycin (mTOR) a byla potvrzena shoda v sekvenci aminokyselin 45% vůči kvasinkovým proteinům TOR1 a TOR2 (Sabers et al., 1995).

Podle přítomnosti či nepřítomnosti živin, růstových faktorů a hormonů je řízena aktivace mTOR, který plní funkci regulátoru buněčného růstu, podporuje anabolické procesy a inhibuje autofagii. Senzorem energie v buňce je oproti tomu protein kináza aktivovaná AMP (AMP activated protein kinase, AMPK). Za podmínek nedostatku energie AMPK podporuje

katabolické procesy, aktivuje signalizační dráhu pro autofagii. Toto působí jako ochrana před apoptózou z důvodu nedostatku energie (Kim et al., 2011). Bylo zjištěno, že krátkodobé ovlivnění MSC nízkou (nanomolární) koncentrací Rapa zvyšuje imunosupresivní vlastnosti MSC, k čemuž pravděpodobně dochází podpořením autofagie (Kim et al., 2015b).



Obrázek 9 Chemický vzorec Rapamycinu (Wishart et al., 2006).

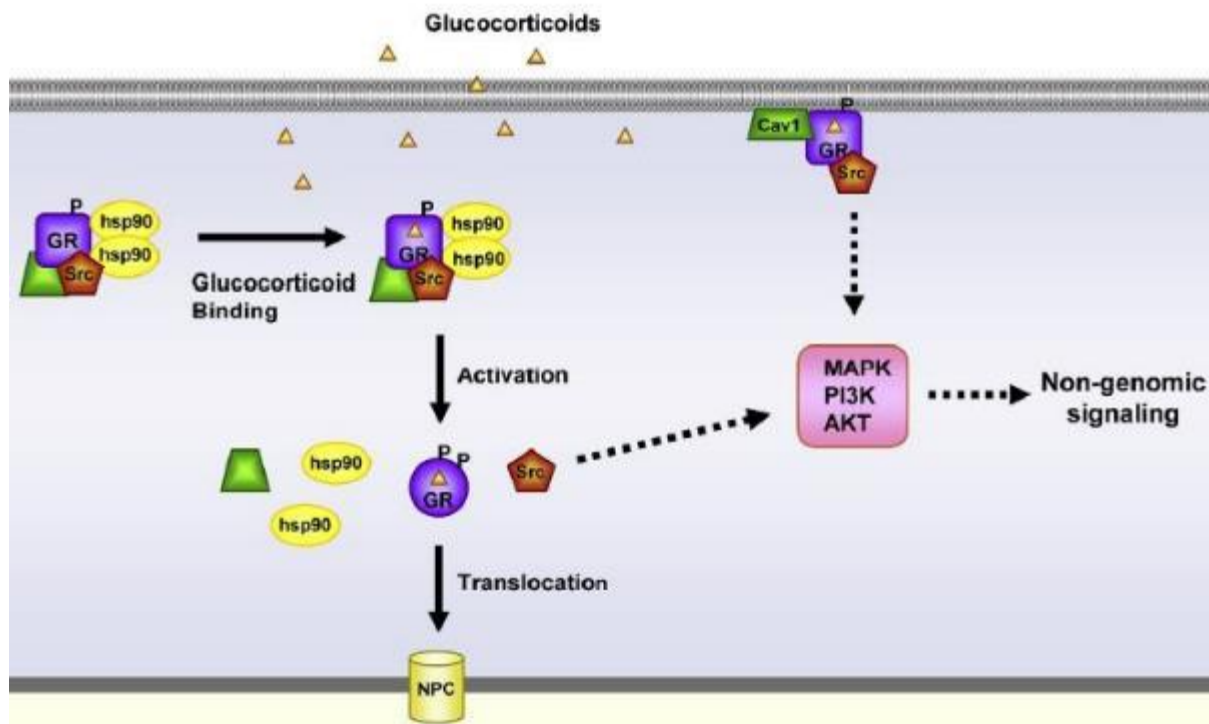
#### 1.4.4 Glukokortikoidy

Glukokortikoidy jsou steroidní hormony přirozeně produkované v těle obratlovců. V buňce se váží na glukokortikoidový receptor (GR), který je exprimován i nejprimitivnějšími zástupci obratlovců (Thornton, 2001). Glukokortikoidy se účastní regulace zánětu, negativně ovlivňují expresi prozánětlivých cytokinů buňkami přirozené i adaptivní imunity (Berkenbosch et al., 1987). GR tvoří komplex s dalšími proteiny jako např. Hsp90, Src. Po navázání glukokortikoidu na GR se tento komplex rozpadá, GR putuje do jádra a ovlivňuje genovou expresi buď přímou vazbou na DNA, nebo se váže na jiné transkripční faktory už navázané na DNA případně se GR váže na DNA a zároveň interaguje s ostatními transkripčními faktory, jako je např. NF- $\kappa$ B, AP-1 (Nissen and Yamamoto, 2000). Navíc dochází k tzv. nengenomické signalizaci prostřednictvím proteinů, které před navázáním glukokortikoidu tvořily komplex s GR a po rozpadu tohoto komplexu jsou uvolněny a mohou spouštět signalizaci přes MAPK, PI3K, AKT dráhu (viz obrázek 10) (Oakley and Cidlowski, 2013).

Glukokortikoidy bývají podávány pacientům pro léčbu GvHD, avšak ne vždy jsou účinné, proto se přistupuje k jiným možnostem jako je podávání jiných imunosupresivních látek nebo léčba monoklonálními protilátkami (Deeg, 2007). Novou alternativou by mohlo být využití imunosupresivních vlastností MSC (Auletta et al., 2015). Glukokortikoidy jsou

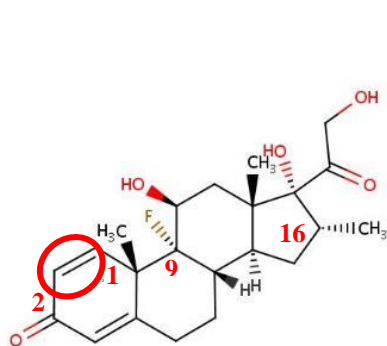


podávány i v případě transplantací např. ledvin (Perico et al., 2013) nebo autoimunitních onemocnění, jako je lupus erythematodes (Liang et al., 2012) (viz tabulka 1, 2).



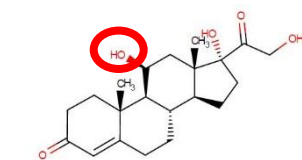
Obrázek 10 Signalizace přes GR; GR tvoří komplex s dalšími proteiny jako např. Hsp90, Src. Po navázání glukokortikoidu se komplex rozpadá, GR putuje do jádra a ovlivňuje genovou expresi. Ostatní proteiny komplexu mohou zprostředkovávat tzv. „Negenomickou signalizaci“ a ovlivnit MAPK, PI3K, AKT dráhu (Oakley and Cidlowski, 2013).

Glukokortikoidy se v těle vyskytují v inaktivní formě (mají 11 $\beta$ -ketoskupinu) a v případě potřeby je tato skupina redukována a glukokortikoidy jsou tak změněny na formu aktivní (mají 11 $\beta$ -hydroxyskupinu) (viz obrázek 11). Syntetické glukokortikoidy (jako např. dexametazon (Dex), prednizon (Pre)) jsou modifikacemi přirozeně se vyskytujícího glukokortikoidu kortizol (viz obrázek 12 – 13) (Diederich et al., 2002).

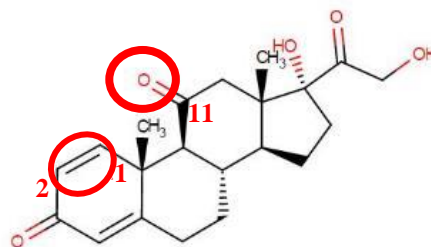


Obrázek 12 Chemický vzorec dexametazon.

Odvozen od přirozeně se vyskytujícího glukokortikoidu kortizol. Mezi uhlíky 1 a 2 dvojná vazba. V pozici 9 fluor (F), v pozici 16 methyl (CH<sub>3</sub>) (Wishart et al., 2006).



Obrázek 11 Chemický vzorec kortizol (Wishart et al., 2006).



Obrázek 13 Chemický vzorec prednizon, inaktivní forma glukokortikoidu – v pozici 11 ketoskupina. Odvozen od přirozeně se vyskytujícího glukokortikoidu kortizol. Mezi uhlíky 1 a 2 dvojná vazba (Wishart et al., 2006).

## 2. Cíle diplomové práce

Buněčná terapie založená na podávání MSC je předmětem řady klinických studií v oblasti transplantací i autoimunitních onemocnění. Současně jsou pacientům podávány imunosupresivní látky. Je známo, že imunosupresivní látky ovlivňují působení MSC na buňky imunitního systému. Byla popsána řada cytokinů i povrchových molekul, prostřednictvím kterých MSC modulují imunitní odpověď. Dosud ale není známo, jaký vliv mají imunosupresivní látky na expresi konkrétních molekul, které zprostředkovávají imunomodulační vlastnosti MSC.

**Cíle této diplomové práce jsou ověřit vliv vybraných imunosupresivních látek na:**

- Přežívání
- Metabolickou aktivitu
- Diferenciaci
- Expresi molekul, které hrají významnou roli v imunomodulačních mechanismech na modelu myších MSC izolovaných z tukové tkáně a lidských MSC izolovaných z tukové tkáně a kostní dřeně *in vitro*

## 3. Metody

### 3.1 Média

Pro kultivaci myších MSC bylo použito médium DMEM (Dulbecco's modified Eagle's medium – Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) obohacené o tepelně inaktivované fetální telecí sérum (FCS, fetal calf serum), (Sigma-Aldrich) o výsledné koncentraci 10 %. Dále byl přidáván penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich), streptomycin (100µg/ml, Sigma-Aldrich), 2-merkптоethanol ( $5 \times 10^{-5}$  M, Serva, Heidelberg, Germany) a HEPES pufr (10mM, Sigma-Aldrich).

Lidské MSC byly kultivovány v médiu  $\alpha$ -MEM (Minimum Essential Medium, Sigma) s 5% destičkovým lyzátem a antibiotiky penicilin (100 U/ml, Sigma-Aldrich), streptomycin (100µg/ml, Sigma-Aldrich).

### 3.2 Roztoky

- a) Fosfátový pufr (phosphate buffered saline, PBS): 37 mM NaCl, 10 mM Phosphate, 2.7 mM KCl, pH 7,2-7,4.
- b) Tris borátový pufr (TBE) 0,089 M Tris-borát, 0,089 M kyselina boritá, 0,002 M EDTA
- c) Promývací pufr – ELISA: 0,05% Tween®20 v PBS, pH 7,2-7,4.
- d) Hovězí sérum albumin (bovine serum albumin, BSA)
- e) Substrát – ELISA:
  - a) 120 mg 2,2'-azino-bis-3-ethylenbenzthiazolin-6-sulfonové kyseliny
  - b) 11 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>
  - c) 7,68 g kyseliny citronové
  - d) 400 ml H<sub>2</sub>O, pH upraveno na 4,35 (Sigma-Aldrich)
- f) Griessova reakce: Roztok A
  - a) 0,5g sulfonamidu (Sigma-Aldrich)
  - b) 1,5 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
  - c) 48,5 ml H<sub>2</sub>ORoztok B
  - a) 0,15 g N-1-naphtylendiamine dihydrochloride (Sigma-Aldrich)
  - b) 1,5 ml H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>
  - c) 48,5 ml H<sub>2</sub>O

### **3.3 Zdroj buněk**

Pro izolaci myších MSC byl použit inbrední kmen myši BALB/c z chovů Ústavu experimentální medicíny, AVČR, v.v.i..

Lidské MSC poskytla Laboratoř tkáňových kultur a kmenových buněk z Ústavu experimentální medicíny, AVČR, v.v.i..

### **3.4 Izolace myších MSC**

Myší MSC byly izolovány z tukové tkáně abdominálních tříselných kapes. Tuková tkáň byla nejprve rozstříhána a pak štěpena 60 minut 1% kolagenázou I (Sigma-Aldrich) ve 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Suspenze pak byla doplněna PBS na 7 ml, zcentrifugována 4 minuty při otáčkách 170g. Nakonec byly buňky převedeny do média DMEM a kultivovány v termostatu ve 37°C a 5% CO<sub>2</sub>. Po uplynutí 48 hod bylo médium vyměněno. MSC byly nadále kultivovány a po 3 až 4 pasážích použity k pokusům.

### **3.5 Diferenciace adipogenní a osteogenní**

Diferenciace myších i lidských MSC proběhla dle stejného protokolu. V 1 ml bylo kultivováno 30 tis. MSC ve 24-jamkové destičce v termostatu ve 37°C a 5% CO<sub>2</sub> do konfluence. Následně bylo médium obohaceno o diferenciální činidla (viz tabulka 4) a imunosupresivní látky (viz tabulka 5) a pravidelně vyměňováno 3x týdně. Pro dosažení adipogenní diferenciace byly buňky takto kultivovány 7 dnů a pro dosažení osteogenní diferenciace 21 dnů. Poté byly buňky zafixovány paraformaldehydem. Tukové váčky byly obarveny Oil Red O a depozita kalcia Alizarin Red. Pod mikroskopem Olympus IX81 byly buňky mikroskopovány a nafoceny.

Tabulka 4 Diferenční činidla přidávaná na 10 ml média DMEM. Dexametazon (Dex), 3-isobutyl-1-methylxanthine (IBMX), kyselina askorbová (ascorbic acid, AA), glycerinaldehyd 2 fosfát (G-2P). (Sigma-Aldrich)

<b>Diferenciace</b>			
<b>Adipogenní</b>		<b>Osteogenní</b>	
Dex 1mM	1 µl	Dex 1 mM	1 µl
IBMX 0,5 M	10 µl	AA 0,1 M	20 µl
Insulin 10 mg/ml	10 µl	G-2P 1M	100 µl
Indometacin 10 mM	100 µl		

Tabulka 5 Přehled přidávaných imunosupresivních látek. Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). (Sigma-Aldrich)

<b>Imunosupresivní látka</b>	<b>Koncentrace myší MSC</b>	<b>Koncentrace lidská MSC</b>
CsA	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
MMF	0,05 µg/ml	0,5 µg/ml
Rapa	0,05 µg/ml	0,05 µg/ml
Dex	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml
Pre	0,5 µg/ml	0,5 µg/ml

### 3.6 Metabolická aktivita

Pro měření metabolické aktivity byly myší MSC kultivovány v počátečním množství 6 tis. MSC na jamku v 96-jamkové destičce v objemu 200 µl. Myší MSC byly kultivovány s imunosupresivními látkami o koncentracích 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml, 5 µg/ml s a bez přidání IFN-γ o koncentraci 10 ng/ml a lidské MSC s koncentracemi: CsA, MMF, Dex, Pre 0,5 µg/ml, 5 µg/ml, Rapa 0,05 µg/ml, 0,5 µg/ml. Použité koncentrace imunosupresivních látek byly odvozeny od dávek používaných v klinické praxi. Kultivace myších i lidských MSC trvala 2 dny.

Metabolická aktivita MSC byla určena pomocí tetrazoliové soli WST-1 (water soluble tetrazolium-1) (Roche, Německo), která byla přidána do média v poměru 1:10 a buňky byly dále inkubovány v termostatu za standardních podmínek po dobu 120 minut. Metabolická

aktivita byla přímo úměrná zbarvení média v jamce a byla měřena spektrofotometrem při vlnové délce 450 nm.

### 3.7 Izolace RNA

Pro izolaci RNA byly myši MSC kultivovány 24 hodin v 6-jamkové destičce v objemu 3 ml v počátečním množství 300 tis. MSC na jamku. Myši MSC byly kultivovány s imunosupresivními látkami o následujících koncentracích: CsA, Dex, Pre 0,5 µg/ml, MMF, Rapa 0,05 µg/ml s a bez IFN- $\gamma$  o koncentraci 10 ng/ml.

RNA byla izolována metodou fenol chloroformové extrakce.

- Po odebrání supernatantu bylo přidáno 500 µl Trireagentu (TRI Reagent® RT, MRC, Cincinnati, USA), 2 µl polyakrylového nosiče (Polyacryl Carrier) (Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) a 100 µl chloroformu. Po důkladném protřepání byly vzorky centrifugovány na 12 000 g 15 minut při 4°C.
- K vodní fázi obsahující RNA bylo přidáno 250 µl izopropanolu. Následovala centrifugace na 12 000 g 8 min při 4°C.
- Pelety byly opláchnuty 75% ethanolem a sušeny 5 minut při 39°C. RNA byla resuspendována ve 25 µl H<sub>2</sub>O bez obsahu RNáz (Top-Bio, Praha, Česká republika) a inkubována 65°C na 5 minut pro rozvolnění sekundárních struktur.
- Poté následovala reverzní transkripce

### 3.8 Reverzní transkripce

- 1 µg vzorku RNA
- 1 µl nukleotidů 10µM (Deoxynucleotide triphosphates, dNTP) (Invitech)
- 200 µg primerů (hexanukleotidy) (Promega)
- 65°C 5 minut
- 4 µl 5x first-strand buffer [250 mM Tris-HCl (pH 8.3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>] (Invitrogen, Praha, Česká republika)
- 1 µl 0,1M dithiotreitol (DTT, Invitrogen, Praha, Česká republika)
- 0,5 µl RNasin® Ribonuclease Inhibitor (Promega)
- 0,7 µl reverzní transkriptázy (SuperScript® III Reverse Transcriptase) (Invitrogen, Praha, ČR)
- Program termocykléru pro reverzní transkripci vyizolované RNA na cDNA

- 25°C 5 minut
- 50°C 30-60 minut
- 70°C 15 minut

### 3.9 Polymerázová řetězová reakce

Polymerázová řetězová reakce (Polymerase chain reaction, PCR) obsahovala následující reagenty:

- sens a antisens primery v poměru 1:1; (1,5 µl primeru GAPDH, ostatní primery 2 µl; výchozí koncentrace primerů 0,025 mM roztok H<sub>2</sub>O), nukleotidová sekvence primerů (viz tabulka 6).
- 1,5 µl vzorku cDNA
- 6 µl PPP Master Mix (Top-Bio)
- 4,5 µl H<sub>2</sub>O (Top-Bio)

Program termocykléru pro PCR

- 2 minuty denaturace při 95 °C
- 20 vteřin denaturace při 95 °C
- 20 vteřin nasedání primerů při 60 °C
- 20 vteřin elongace při 72 °C
- 10 minut finální syntéza při 72 °C

Kroky b) až d) byly opakovány 24 – 35x. Produkty proběhlé PCR byly nanášeny na elektroforézu a sledovány pomocí interkalačního činidla ethidium bromid. Byl použit 2% agarózový gel a pufr TBE.

Tabulka 6 Použité primery pro PCR. S-sense, A-antisense.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
GAPDH S	5'-GGGTGTGAACCACGAGAAAT-3'
GAPDH A	5'-ACACATTGGGGGTAGGAACA-3'
HGF S	5'-CACCCCTTGGGAGTATTGTG-3'
HGF A	5'-GGGACATCAGTCTCATTACAG-3'
FGF S	5'-CGGCTCTACTGCAAGAACG-3'
FGF A	5'-TGCTTGGAGTTGTAGTTTGACG-3'
HO-1 S	5'-CAGAACCCAGTCTATGCCCC-3'
HO-1 A	5'-GCTGATCTGGGGTTTCCCTC-3'
Fas S	5'-GAAGGAGTACATGGACAAGA-3'
Fas A	5'-TGATATGCATCACTCTTCCC-3'
PD-L1 S	5'-GGCCGAGGGTTATCCAGAAG-3'
PD-L1 A	5'-CTGCTAAGCCAGGAACCCTC-3'
ICAM S	5'-GTCCGCTGTGCTTTGAGAAC-3'
ICAM A	5'-TCGAGCTTTGGGATGGTAGC-3'
VCAM S	5'-GTCACGGTCAAGTGTTTGGC-3'
VCAM A	5'-AGATCCGGGGGAGATGTCAA-3'
IL-7 S	5'-TCTTGGGATGGATGGACCAGG-3'
IL-7 A	5'-AACTTGCGAGCAGCACGATT-3'
IL-6 S	5'-AGTTGCCTTCTTGGGACTGA-3'
IL-6 A	5'-TTCTGCAAGTGCATCATCGT-3'



### 3.10 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Lidské MSC byly kultivovány 24 hodin v 6-jamkové destičce v objemu 3 ml v počátečním množství 300 tis. MSC na jamku za přítomnosti imunopresivních látek o koncentracích 5  $\mu\text{g/ml}$ . (Izolace RNA a přepis do cDNA byl proveden podle protokolu, který je uveden v kapitolách 3.7 a 3.8)

Kvantitativní PCR provedla Mgr. Barbora Heřmánková na Ústavu experimentální medicíny, AVČR, v.v.i..

#### Reagencie:

- 1) 5  $\mu\text{l}$  SYBRGreen Supermix (Bio-Rad)
- 2) 1  $\mu\text{l}$  primerů (nukleotidové sekvence (viz tabulka 7); výchozí koncentrace primerů 0,016 mM roztok  $\text{H}_2\text{O}$ )
- 3) 1  $\mu\text{l}$   $\text{H}_2\text{O}$

Reakce proběhla v objemu 10  $\mu\text{l}$  (7  $\mu\text{l}$  mix, 3  $\mu\text{l}$  cDNA)

Program termocykléru iCycler (Bio-Rad) pro real-time PCR:

- a) 3 minuty denaturace 95°C
- b) 10 vteřin denaturace 95°C
- c) 20 vteřin annealing 60°C
- d) 20 vteřin elongace 72°C

Fluorescence byla detekována v každém cyklu po elongaci při 80°C po dobu

5 vteřin. Data byla analyzována na detekčním systému iCycler (Bio-Rad) a byla vztažena k referenčnímu genu GAPDH.

Tabulka 7 Seznam primerů pro kvantitativní PCR.

<b>Primer</b>	<b>Sekvence</b>
h TSG-6 L	5'-GGCCATCTCGCAACTTACA-3'
h TSG-6 R	5'-CAGCACAGACATGAAATCCAA-3'
h TGFβ1 L	5'-GCAGCACGTGGAGCTGTA-3'
h TGFβ1 R	5'-CAGCCGGTTGCTGAGGTA-3'
h IL-6 L	5'-GACCCAACCACAAATGCCA-3'
h IL-6 R	5'-GTCATGTCCTGCAGCCACTG-3'

## 3.11 Průtoková cytometrie

### 3.11.1 Povrchové znaky

Metodou průtoková cytometrie byly měřeny povrchové znaky (viz tabulka 8) a také apoptóza. MSC byly kultivovány po dobu 2 dnů ve 24-jamkové destičce v počátečním množství 150 tis. buněk na jamku v 600  $\mu\text{l}$  média. Myší MSC byly kultivovány s imunosupresivními látkami o koncentracích 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  s a bez přidání IFN- $\gamma$  o koncentraci 10 ng/ml a lidské MSC s koncentracemi: CsA, MMF, Dex, Pre 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$ , Rapa 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

Příprava buněk pro měření na průtokovém cytometru proběhla podle následujícího protokolu.

- Buňky byly z 24-jamkové destičky uvolněny trypsinem a přeneseny do mikrotitrační destičky (Nunc) v objemu 200  $\mu\text{l}$ .
- Centrifugace 3 minuty (170g). Pelety byly rozvolněny a poté byly přidány protilátky naředěné PBS v objemu 10  $\mu\text{l}$ .
- Inkubace ve 4°C bez přístupu světla po dobu 25 minut. Poté byly protilátky odmyty, vzorek byl naředěn do 175  $\mu\text{l}$ . Mrtvé buňky byly označeny barvou Hoechst33258.

Pro měření povrchových znaků MSC byly použity monoklonální protilátky konjugované s fluorochromy alofykocyanin (APC, allophycocyanine), fluorescein isothiokianát (FITC, fluorescein isothiocyanate), fykoerytrin (PE, phycoerythrin) (viz tabulka 8).

Naměřená data byla vyhodnocena v programu GateLogic308.3A (Inivai, Mentone Victoria, Australia). Gatovací strategie (viz obrázek 1 přílohy).

Tabulka 8 Protílátky průtoková cytometrie.

Znak	Fluorochrom	Koncentrace (mg/ml)	Výrobce	Ředění	Původ MSC
CD106	APC	0,2	BioLegend	1:70	myší
PD-L1	APC	0,2	BioLegend	1:70	myší
Fas-L	PE	0,2	BioLegend	1:70	myší
CD45	PE	0,2	BioLegend	1:300	myší
CD45	FITC	0,5	BioLegend	1:300	myší
CD45	APC	0,2	BioLegend	1:300	myší
CD11b	APC	0,2	BioLegend	1:70	myší/lidské
CD31	PE	0,5	BD	1:70	myší
CD34	PE	0,2	BD	1:70	myší
CD44	APC	0,2	BioLegend	1:70	myší
CD73	PE	0,2	eBioscience	1:70	myší
CD90.2	PE	0,5	eBioscience	1:70	myší
CD105	PE	0,5	BioLegend	1:70	myší
CD105	FITC	0,5	BioLegend	1:5	lidské
CD44	FITC	0,2	BioLegend	1:5	myší/lidské
CD45	FITC	0,5	BioLegend	1:10	lidské
CD106	PE	0,025	BioLegend	1:30	lidské
PD-L1	APC	0,4	BioLegend	1:10	lidské
Fas-L	PE	0,2	BioLegend	1:5	lidské

### 3.11.2 Apoptóza

Myší i lidské MSC byly kultivovány za stejných podmínek jako pro měření povrchových znaků. Pro měření apoptózy byl použit kit AnnexinV-Dy647 (Apronex Biotechnologies, Česká republika). AnnexinV se váže na fosfatidil serin, který je translokován na vnější povrch plazmatické membrány během apoptózy.

Příprava buněk pro měření apoptózy byla obdobná jako tomu bylo u měření povrchových markerů. Po převedení buněk do mikrotitrační destičky proběhlo barvení AnnexinemV v 50  $\mu$ l pufru (ředěno 1:100) 20 minut v pokojové teplotě. Pak byl nenavázaný

AnnexinV odmyt. Vzorky byly měřeny ve 175  $\mu$ l pufru, nekrotické buňky byly značeny barvou Hoechst33258.

### 3.12 ELISA

Myší i lidské MSC byly kultivovány za stejných podmínek, jako pro měření povrchových markerů a apoptózy metodou průtoková cytometrie. Po uplynutí 2 dnů byl odebrán supernatant, který byl následně měřen metodou ELISA. Byla detekována produkce cytokinů IL-6, IL-7 u myších i lidských MSC.

#### 3.12.1 DuoSet® ELISA Development System R&D

Pomocí tohoto kitu byly měřeny cytokiny myší IL-7, lidské IL-6, IL-7.

Test ELISA byl prováděn v 96-jamkové mikrotitrační destičky Immunoplate (SPL Life Sciences).

- Nanesení 100  $\mu$ l primární protilátky ředěné v PBS, inkubace přes noc v pokojové teplotě
- Promytí 3x promývacím pufrem
- Blokování 1% BSA minimálně 1 hodinu, 300  $\mu$ l na jamku
- Promytí 3x promývacím pufrem
- Přidání 100  $\mu$ l vzorku, 100  $\mu$ l standardu (rekombinantní protein), blank (médium), inkubace 2 hodiny v pokojové teplotě
- Promytí 3x promývacím pufrem
- Přidání 100  $\mu$ l sekundární protilátky ředěné v 1% BSA, inkubace 2 hodiny v pokojové teplotě
- Promytí 3x promývacím pufrem
- Přidání 100  $\mu$ l Streptavidin-HRP, inkubace 20 minut v pokojové teplotě ve tmě
- Promytí 3x promývacím pufrem
- Přidání 100  $\mu$ l substrátu (reagent A H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a reagent B Tetramethyl benzidin 1:1), inkubace 20 minut v pokojové teplotě ve tmě
- Přidání 50  $\mu$ l 2N kyseliny sírové H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
- Měření optické denzity při vlnové délce 450 nm a referenční vlnové délce 570 nm

(Množství cytokinu ve vzorku je přímo úměrné intenzitě zbarvení.)

### 3.12.2 ELISA BD Pharmingen™

Pomocí tohoto kitu byla měřena produkce IL-6 myších MSC. Test ELISA byl prováděn v 96-jamkové mikrotitrační destičky Immunoplate (SPL Life Sciences).

- 50 µl 0,1M roztoku NaHCO<sub>3</sub> (200 ml H<sub>2</sub>O, 1,68 g NaHCO<sub>3</sub> s primární protilátkou proti IL-6 (Pharmigen, San Diego, CA) o koncentraci 0,76 µg/ml
- Navázání primární protilátky přes noc ve 4°C
- 2x promyto promývacím roztokem
- Blokování volného povrchu jamek 150 µl 7,5% FCS rozpuštěným v PBS (blokovací roztok) při laboratorní teplotě 2 hodiny
- 4x promyto promývacím roztokem
- 100 µl vzorku, 100 µl blank (médiu DMEM), 100 µl cytokinový standard (Genzyme, Boston, MA)
- Inkubováno přes noc ve 4°C
- 4x promyto promývacím roztokem
- 100 µl roztoku sekundární protilátky proti IL-6 (Pharmigen) v koncentraci 0,38 µg/ml, inkubováno 1 hodinu v laboratorní teplotě
- 6x promyto promývacím roztokem
- 100 µl avidin peroxidázy (2,5 µg/ml v blokovacím roztoku) po dobu 45 minut
- 8x promyto promývacím roztokem
- 100 µl substrátu
- Vzniklý barevný produkt po proběhlé enzymatické reakci byl měřen spektrofotometricky pomocí měřicího filtru nastaveného na hodnotu 405 nm. (Množství cytokinu ve vzorku je přímo úměrné intenzitě zbarvení.)

### 3.13 Griessova reakce – měření produkce oxidu dusnatého

Myši MSC byly kultivovány ve výchozím množství 18 tis. na jamku v 96-jamkové destičce v objemu média 200  $\mu\text{l}$  s imunosupresivními látkami o koncentracích 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  s IFN- $\gamma$  o koncentraci 10  $\text{ng/ml}$  a LPS o koncentraci 1,25  $\mu\text{g/ml}$ . Po 48 hodinách byl odebrán supernatant.

Griessova reakce byla měřena v 96-jamkové destičce. Do jamek bylo přidáno 100  $\mu\text{l}$  supernatantu a 100  $\mu\text{l}$  roztoku (Smíchané roztoky A a B 1:1). Jako standard sloužil roztok dusitanu sodného ( $\text{NaNO}_3$ , Sigma-Aldrich). Jako blank bylo použito médium DMEM. Měření na spektrofotometru proběhlo při 570nm.

### 3.14 Software

- Ovládací software pro průtokový cytometr: FACSDiva Software (BD)
- Vyhodnocovací software pro data získaná na průtokovém cytometru: GateLogic308.3A (Inivai, Mentone Victoria, Australia)
- Ovládací software pro invertovaný mikroskop: Olympus soft Imaging Solutions 31 (Olympus, Munster, Germany)
- Ovládací software pro spektrofotometr: Revelation Quicklink (Dynex Technologies, Chantilly, VA)
- Ovládací software pro transluminátor elektroforetických gelů: Scion Image (Scion Corporation, Howston, TX)
- Ovládací software pro iCycler: Bio-Rad
- Statistické zpracování výsledků: program GraphPad Prism6 (GraphPad Software, La Jolla, CA)

### 3.15 Technické vybavení

- Centrifuga Hettich Universal 32R (DJB Labcare, Buckinghamshire, England)
- Centrifuga 5430 (Eppendorf, Hamburg, Germany)
- Cycler PTC-100TM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Inc., St. Bruno, Canada)
- iCycler (Bio-Rad, Hercules, CA)

- Elektroforetická aparatura: PowerPac 300 (Bio-Rad), Hoefer HE33 (Pharmacia Biotech, Piscataway, NY)
- Inkubátor (Sanyo, Osaka, Japan)
- Invertovaný mikroskop Olympus IX81, vybavený kamerou Hamamatsu ORCA C4742-80-12AG (Olympus, Munster, Germany)
- Laminární box CleanAir Technik (Telstar, Woerden, The Netherlands)
- Magnetická ohřevová míchačka RCTbasic (IKA, Staufen, Germany)
- Minicentrifuga MiniSpin (Eppendorf)
- MyCycler™ Thermal Cycler (Bio-Rad)
- Optický mikroskop (Carl Zeiss, Oberkochen, Germany)
- pH-metr pH526 (WTW, Weilheim, Germany)
- Průtokový cytometr LSR II (BD, Franklin Lakes, NJ)
- Spektrofotometr ELx800 (Biotek, Winooski, VT)
- Transiluminátor Electronic U.V. Transilluminator (Ultra Lum, Inc., Claremont, CA)
- Vodní lázeň TE-10D Tempunit (Techne, Minneapolis, MN)
- Vortex MS1 Minishaker (IKA)
- Vyhřívaná třepačka Thermomixer comfort (Eppendorf)

### **3.16 Statistická analýza**

Naměřená data byla statisticky vyhodnocena programem GraphPad Prism 6. Byla použita jednosměrná analýza rozptylu (Analysis of variance, ANOVA), Dunnettův test.

Pro charakteristiku variability byla použita střední chyba průměru (standard error of mean, SEM).

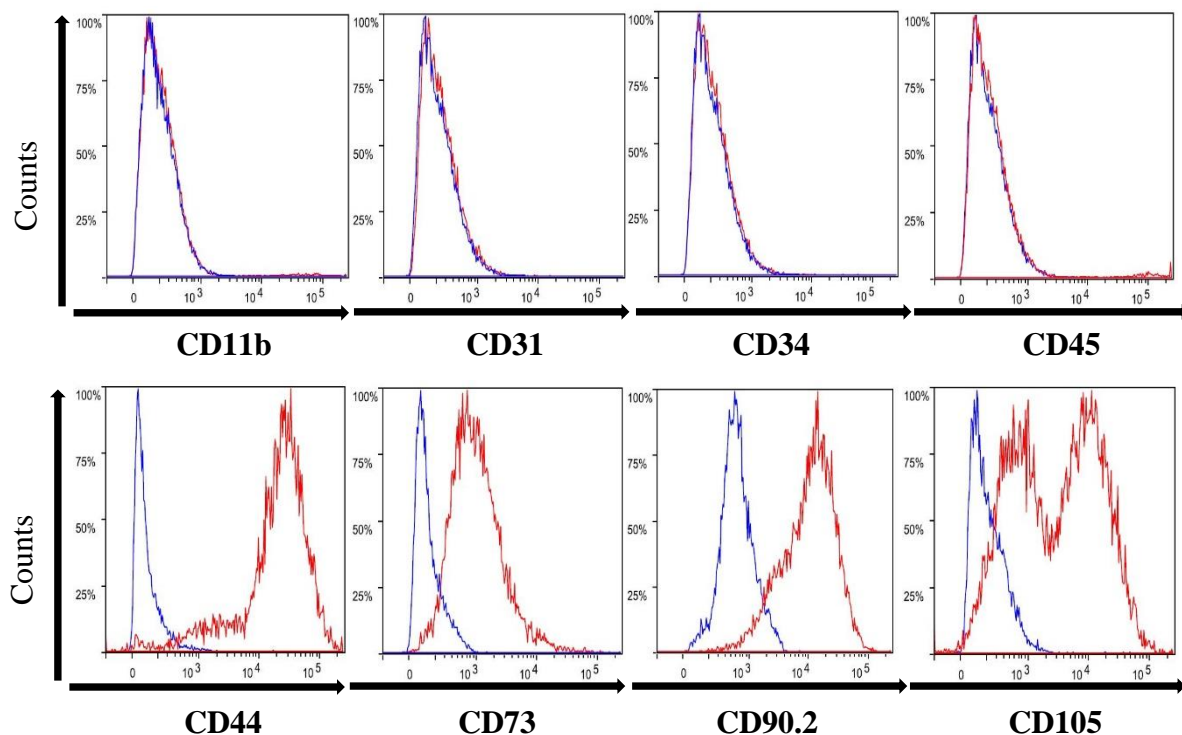


## 4. Výsledky

### 4.1 Myší MSC

#### 4.1.1 Fenotypizace MSC

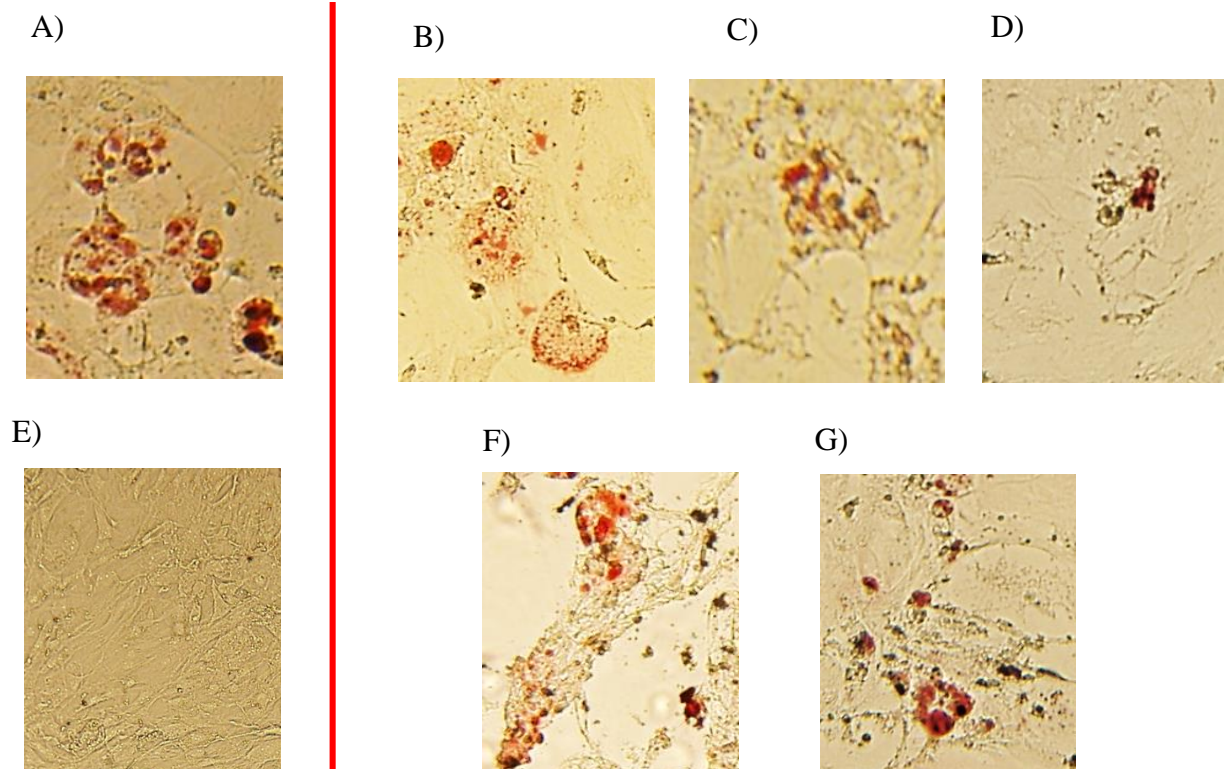
Nejprve bylo ověřeno, že myší MSC odpovídají minimálním kritériím pro MSC definovaným podle: (Dominici et al., 2006). Pomocí průtokové cytometrie bylo prokázáno, že myší MSC exprimují CD44, CD73, CD90.2, CD105 (pozitivní markery MSC) a zároveň jsou negativní pro CD11b, CD31, CD34, CD45 (negativní markery MSC) (viz obrázek 14).



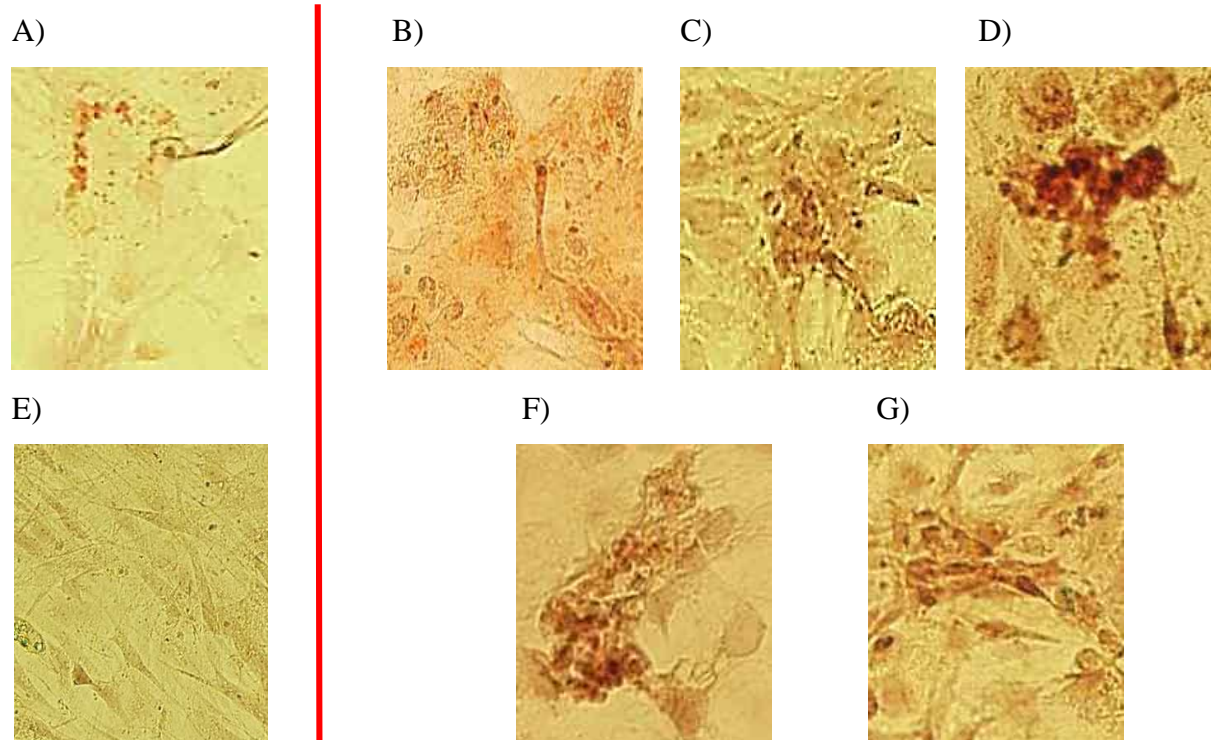
Obrázek 14 Fenotypizace MSC. Negativní markery CD11b, CD31, CD34, CD45. Pozitivní markery CD44, CD73, CD90.2, CD105. Modrá čára znázorňuje negativní kontrolu a červená čára znázorňuje expresi studovaného znaku.

#### 4.1.2 Diferenciace adipogenní a osteogenní

Byla testována schopnost adipogenní a osteogenní diferenciace MSC (viz obrázek 15,16). MSC mají schopnost diferenciace do buněčných typů mezodermu (viz obrázek 15, 16) ve srovnání s MSC kultivovanými bez diferenciálních činidel (viz obrázek 15E, 16E). Žádná z použitých imunopresivních látek neinhibovala schopnost adipogenní (viz obrázek 15B-D, F, G) nebo osteogenní (viz obrázek 16B-D, F, G) diferenciace myších MSC ve srovnání s MSC kultivovaných bez imunopresivních látek (viz obrázek 15A, 16A).



Obrázek 15 Adipogenní diferenciace myších mezenchymálních kmenových buněk. Barveno Oil Red O, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5 µg/ml C) mykofenolát mofetil 0,05 µg/ml D) rapamycin 0,05 µg/ml E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5 µg/ml G) prednison 0,5 µg/ml.



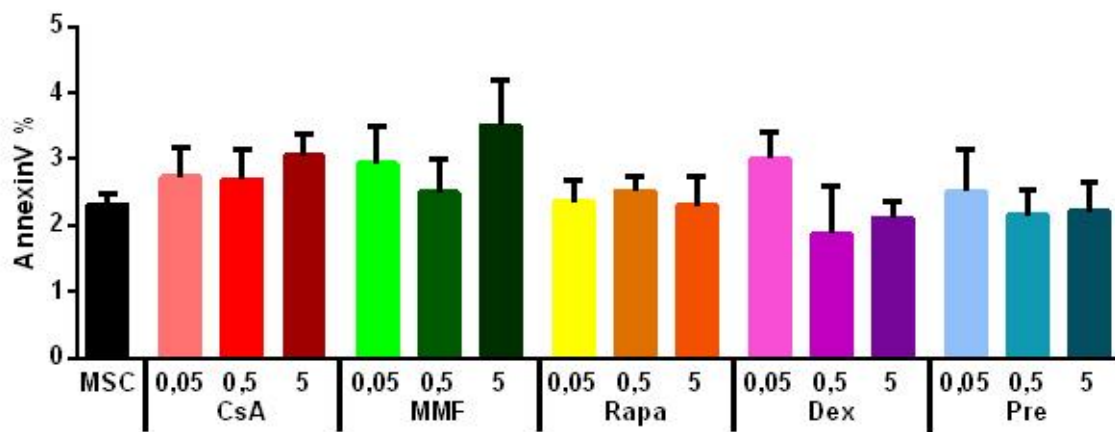
Obrázek 16 Osteogenní diferenciace myších mezenchymálních kmenových buněk. Barveno Alizarin red, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5 µg/ml C) mykofenolát mofetil 0,05 µg/ml D) rapamycin 0,05 µg/ml E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5 µg/ml G) prednison 0,5 µg/ml.

### 4.1.3 Apoptóza

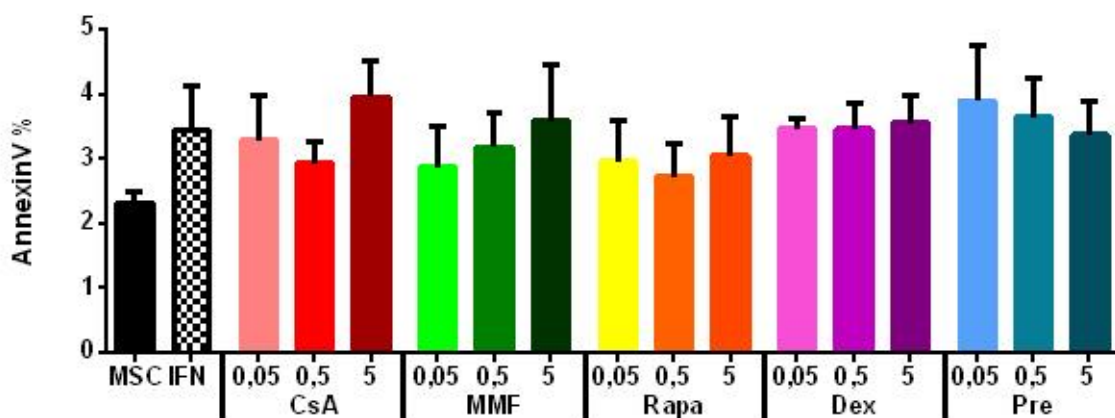
Pro ověření, zda MSC přežívají kokultivaci s imunosupresivními látkami o koncentracích 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$ , 5  $\mu\text{g/ml}$  po dobu 2 dnů, byla měřena míra apoptózy metodou průtoková cytometrie (viz obrázek 17). Myší MSC byly kultivovány bez stimulace a se stimulací IFN- $\gamma$ , aby bylo možné ověřit, zda mají imunosupresivní látky vliv na fenotyp MSC 2. Tento fenotyp je indukovaný IFN- $\gamma$  a TNF- $\alpha$  a významně se uplatňuje při tolerogenním působení MSC (Gazdic et al., 2015).

Z výsledků je patrné, že v porovnání s negativní kontrolou (neovlivněné MSC) nedochází k signifikantním změnám v apoptóze MSC ovlivněných imunosupresivními látkami (viz obrázek 17A). Po současné stimulaci IFN- $\gamma$  a kokultivaci s imunosupresivními látkami byla míra apoptózy mírně zvýšená v porovnání s negativní kontrolou (viz obrázek 17B).

A)



B)

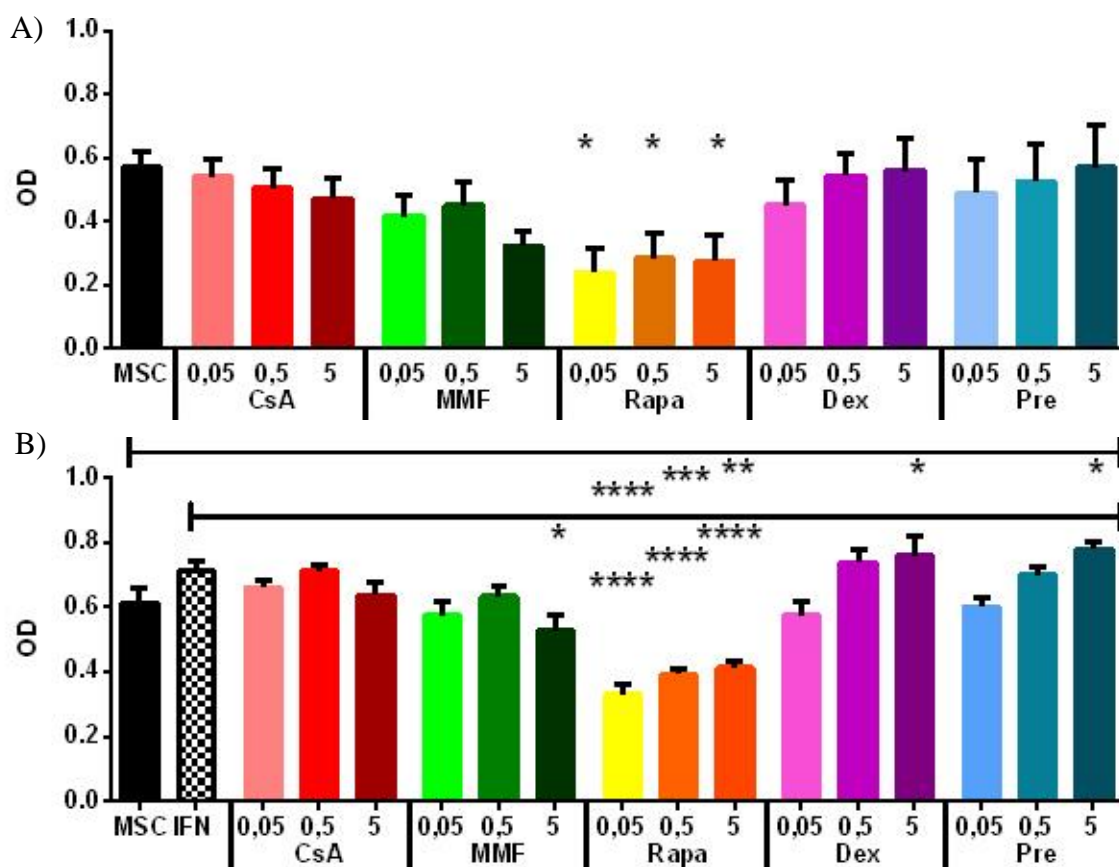


Obrázek 17 Míra apoptózy nestimulovaných A), stimulovaných MSC IFN  $\gamma$  B).

Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre),  $\mu\text{g/ml}$ .

#### 4.1.4 Metabolická aktivita

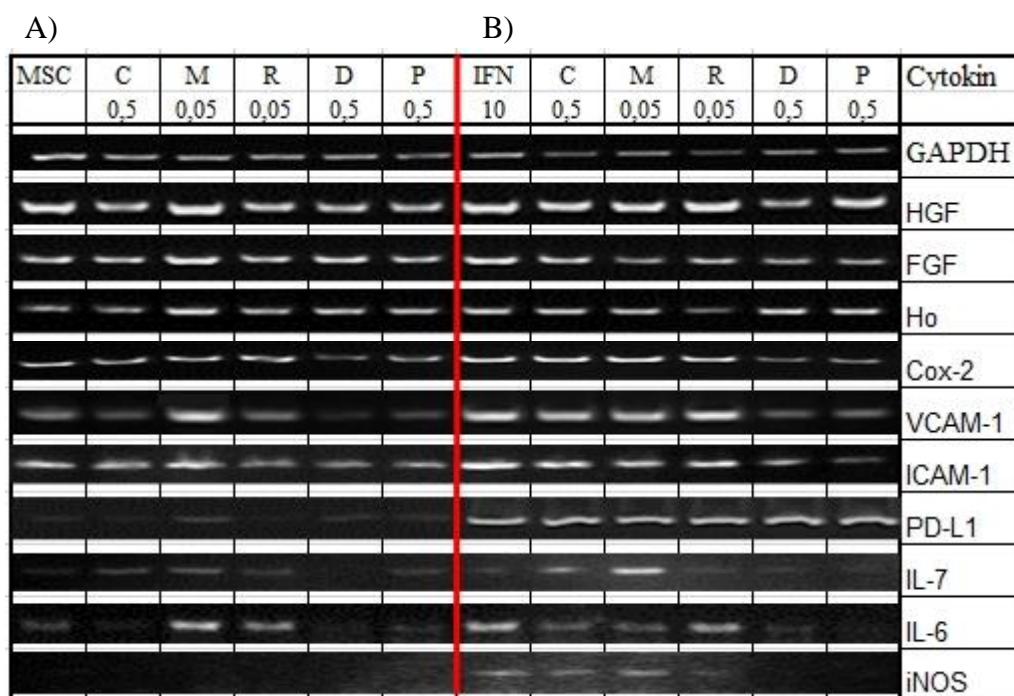
Metodou WST bylo ověřeno, že po dvou denní kultivaci s imunosupresivními látkami o koncentracích 0,05  $\mu\text{g/ml}$ , 0,5  $\mu\text{g/ml}$  a 5  $\mu\text{g/ml}$  jsou MSC metabolicky aktivní (viz obrázek 18). Z výsledků je možné vidět, že po 2 dnech působení imunosupresivních látek se v porovnání s neovlivněnými MSC signifikantně snižuje metabolická aktivita jen v případě MSC kultivovaných s Rapa nezávisle na použité koncentraci. K mírnému snižování metabolické aktivity dochází i po kultivaci MSC s MMF o nejvyšší použité koncentraci 5  $\mu\text{g/ml}$ . Ostatní imunosupresivní látky nemají na metabolickou aktivitu vliv (viz obrázek 18A). Jsou-li MSC navíc stimulovány IFN- $\gamma$  (viz obrázek 18B), je v porovnání s neovlivněnými MSC signifikantní snížení metabolické aktivity po kultivaci s Rapa a zvýšení metabolické aktivity po kultivaci s glukokortikoidy ve vztahu k neovlivněným MSC. Po srovnání MSC stimulovaných IFN- $\gamma$  a zároveň ovlivněných imunosupresivními látkami s MSC ovlivněnými pouze IFN- $\gamma$  je patrné signifikantní snížení metabolické aktivity MSC s Rapa nezávisle na koncentraci a také signifikantní snížení metabolické aktivity MSC ovlivněných IFN- $\gamma$  a nejvyšší koncentrací MMF.



Obrázek 18 Metabolická aktivita, měřeno metodou WST. Nestimulovaná A), stimulovaná MSC IFN- $\gamma$  B). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre),  $\mu\text{g/ml}$ . \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,001$  \*\*\*\* $P < 0,0001$

#### 4.1.5 Polymerázová řetězová reakce

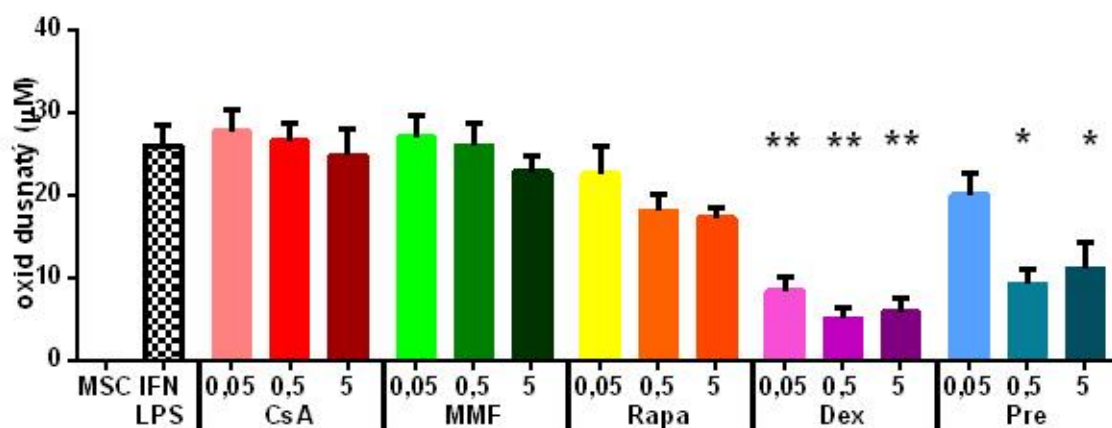
Pro zjištění změn v expresi genů významných růstových faktorů a cytokinů na úrovni mRNA po ovlivnění myších MSC imunosupresivními látkami byla provedena PCR. Z výsledků vyplývá, že imunosupresivní látky nemají výrazný vliv na expresi růstových faktorů (HGF, FGF), ani na Ho. Oproti tomu exprese genů VCAM-1, iNOS, IL-6, (velice mírně Cox-2) je snižována glukokortikoidy (Dex, Pre) (viz obrázek 19). Exprese PD-L1, iNOS a mírně ICAM-1 je indukována stimulací IFN- $\gamma$  (viz obrázek 19 B). Exprese cytokinů, která byla na úrovni mRNA imunosupresivními látkami ovlivněna, byla následně testována na úrovni konečného produktu metodou průtoková cytometrie, ELISA a Griessova reakce.



Obrázek 19 Exprese významných růstových faktorů a cytokinů MSC. Srovnání nestimulovaných A) a stimulovaných MSC IFN- $\gamma$  B). Interferon - $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ), cyklosporin A (C), mykofenolát mofetil (M), rapamycin (R), dexametazon (D), prednizon (P). Negativní kontrola: GAPDH.

#### 4.1.6 Oxid dusnatý

Jednou z nejdůležitějších molekul myších MSC pro navození imunologické tolerance je NO (Ren et al., 2009). Produkce NO je indukována IFN- $\gamma$  a LPS, nestimulovaná MSC NO neprodukuje (viz obrázek 20). Produkce NO je mírně snížena střední a nejvyšší dávkou Rapa. Ke statisticky významnému snížení produkce NO došlo po kokultivaci s glukokortikoidy (zejména Dex) ve vztahu k MSC ovlivněným pouze IFN- $\gamma$  a LPS. CsA a MMF neměly na produkci NO vliv.

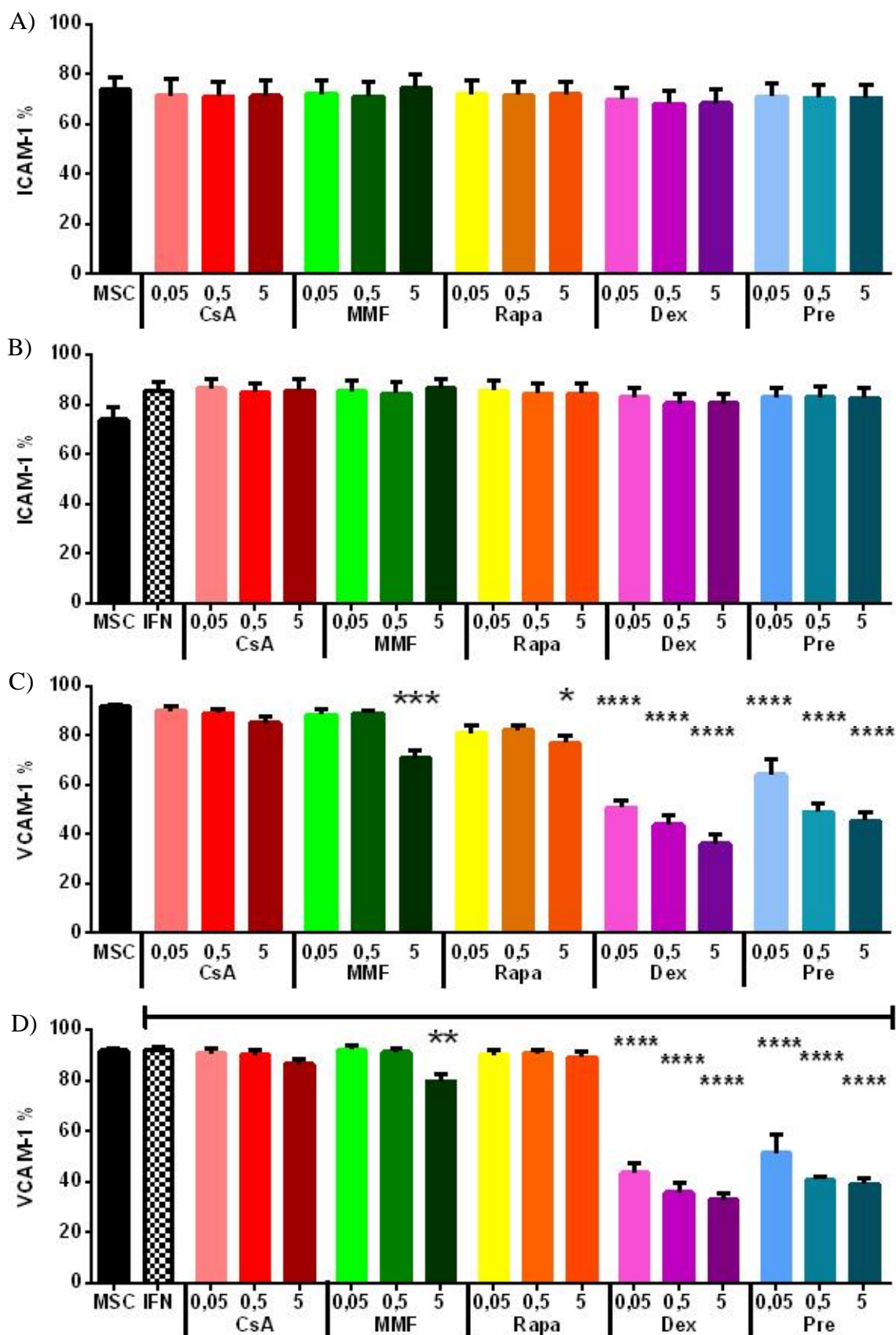


Obrázek 20 Produkce oxidu dusnatého (NO). Interferon  $\gamma$  (IFN), lipopolysacharid (LPS), cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,001$  \*\* $P < 0,0001$

#### 4.1.7 Průtoková cytometrie

Metodou průtoková cytometrie byla měřena exprese potenciálních imunopresivních navozujících povrchových molekul ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, Fas-L.

Molekula ICAM-1 je exprimována nezávisle na ovlivnění MSC imunopresivními látkami (viz obrázek 21A) a to i po stimulaci IFN- $\gamma$  (viz obrázek 21B). Exprese ICAM-1 je mírně inducibilní IFN- $\gamma$  (viz obrázek 21B). Oproti tomu exprese VCAM-1 je ve srovnání s negativní kontrolou signifikantně snížena kultivací s MMF a Rapa o nejvyšší použité koncentraci a glukokortikoidy o všech použitých koncentracích (viz obrázek 21C, D). Nedošlo k výrazným změnám exprese VCAM-1 po stimulaci IFN- $\gamma$  ve srovnání s nestimulovanými MSC, ale nejvyšší koncentrace MMF a Rapa mají v kombinaci s IFN- $\gamma$  menší vliv na expresi VCAM-1, ve srovnání s MSC nestimulovanými IFN- $\gamma$  (viz obrázek 21C, D).

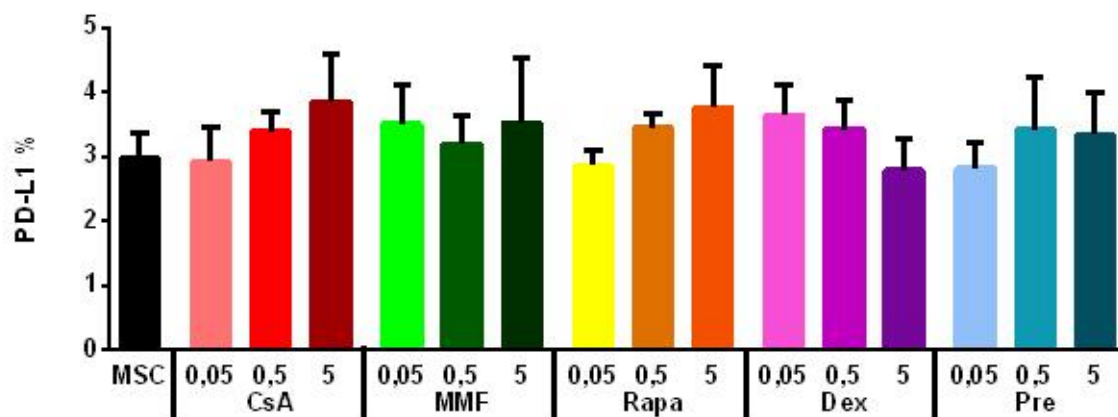


Obrázek 21 Expres povrchové molekuly ICAM-1 A,B), VCAM-1 C,D). Nestimulované A,C), stimulované MSC interferonem  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) B,D). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre).

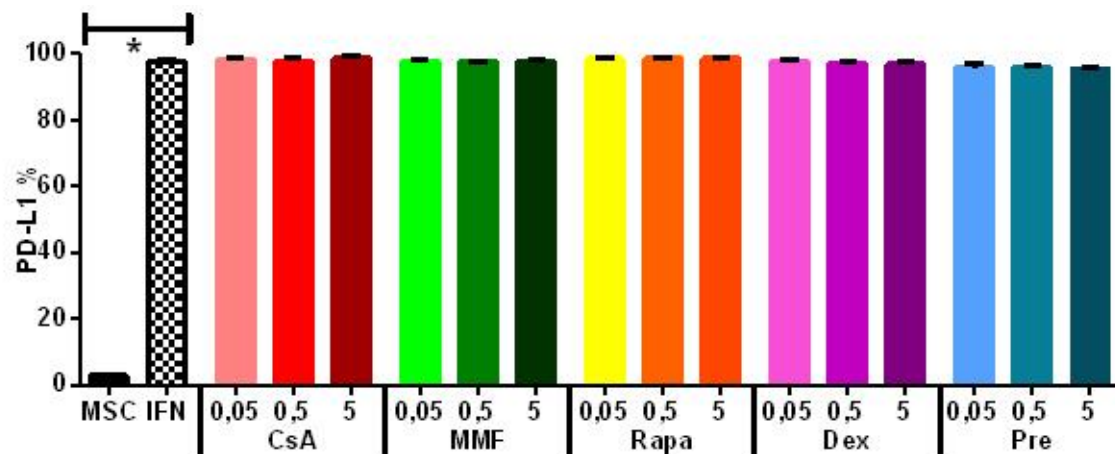
\* $P < 0,05$  \*\*\* $P < 0,001$  \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

Expres molekuly PD-L1 není signifikantně ovlivněna imunosupresivními látkami (viz obrázek 22A) a to ani po stimulaci IFN- $\gamma$  (viz obrázek 22B). Expres PD-L1 je výrazně zvýšena po stimulaci IFN- $\gamma$  ve vztahu k negativní kontrole – nestimulované MSC, opět ale není ovlivněna imunosupresivními látkami (viz obrázek 22B).

A)



B)



Obrázek 22 Expres povrchové molekuly PD-L1. Nestimulované A), stimulované MSC interferonem  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) B).

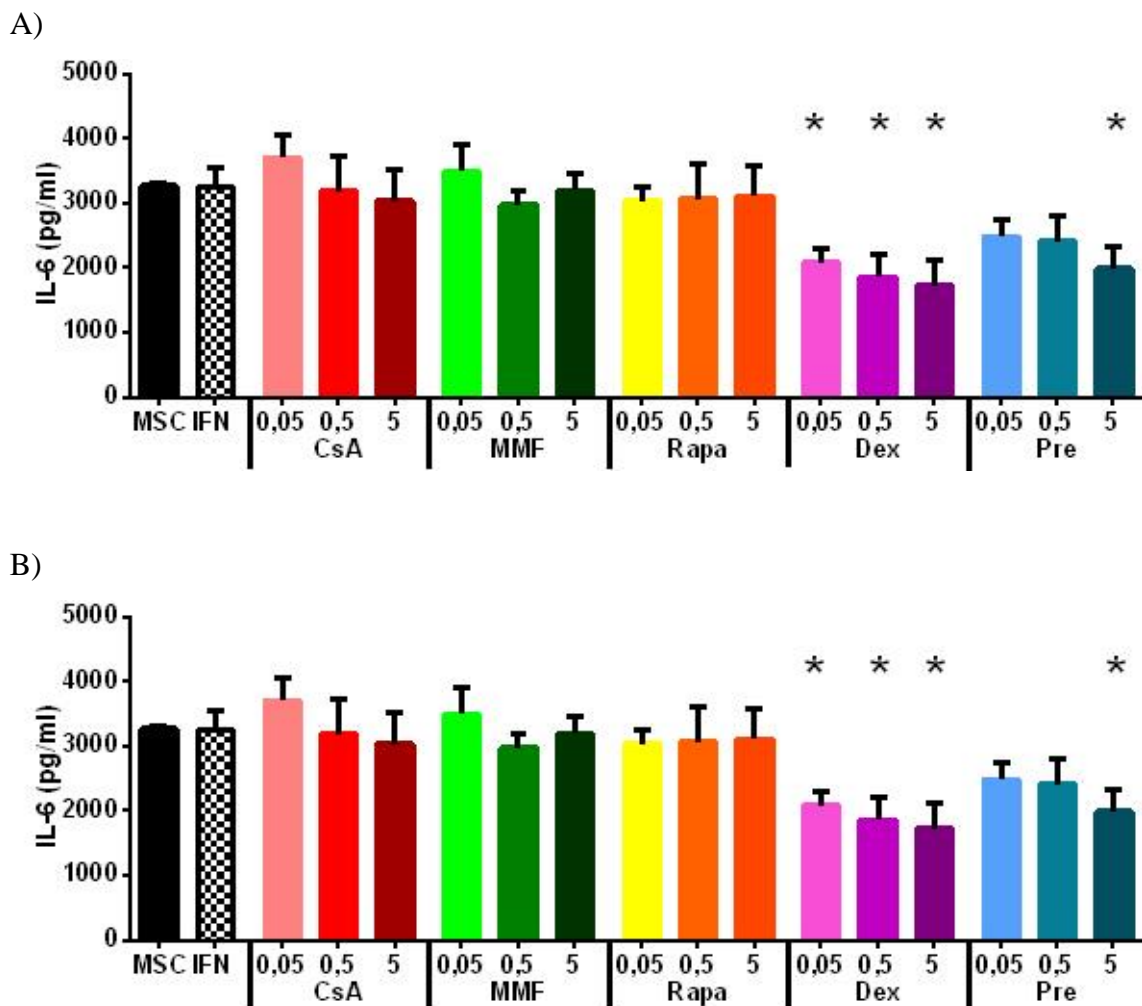
Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,0001$ .



#### 4.1.8 ELISA

Solubilní cytokiny IL-6, IL-7 byly měřeny metodou ELISA, protože mohou mít vliv na navození tolerogenního fenotypu leukocytů a jejich efektorové funkce (Bouffi et al., 2010; Schmalzer et al., 2015).

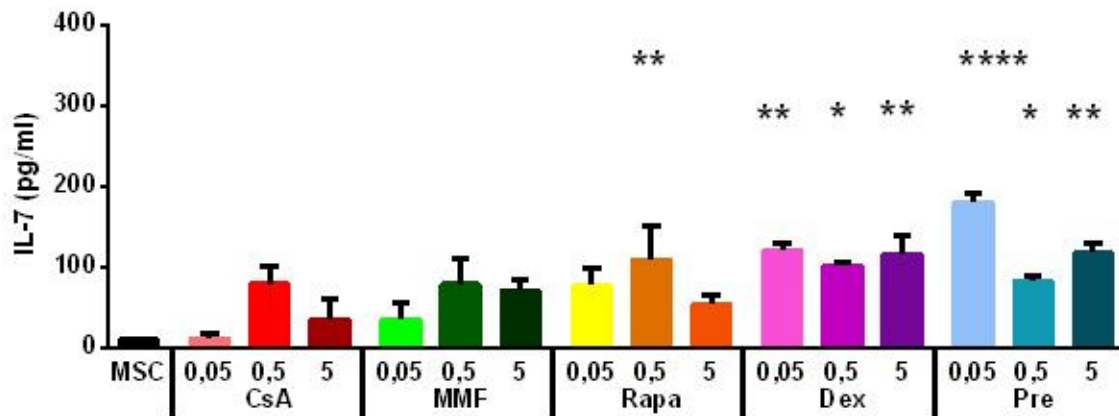
Expresi IL-6 MSC kultivovanými s imunosupresivními látkami v porovnání s neovlivněnými MSC je signifikantně snížena glukokortikoidy (viz obrázek 23A). Poté, co byly MSC stimulovány IFN- $\gamma$ , došlo ke snížení exprese IL-6 nejen v důsledku působení Dex, ale také Pre o nejvyšší koncentraci, ve srovnání s MSC kultivovanými pouze s IFN- $\gamma$  (viz obrázek 23B). Na rozdíl od glukokortikoidů nemají ostatní imunosupresivní látky na expresi IL-6 vliv (viz obrázek 23A,B).



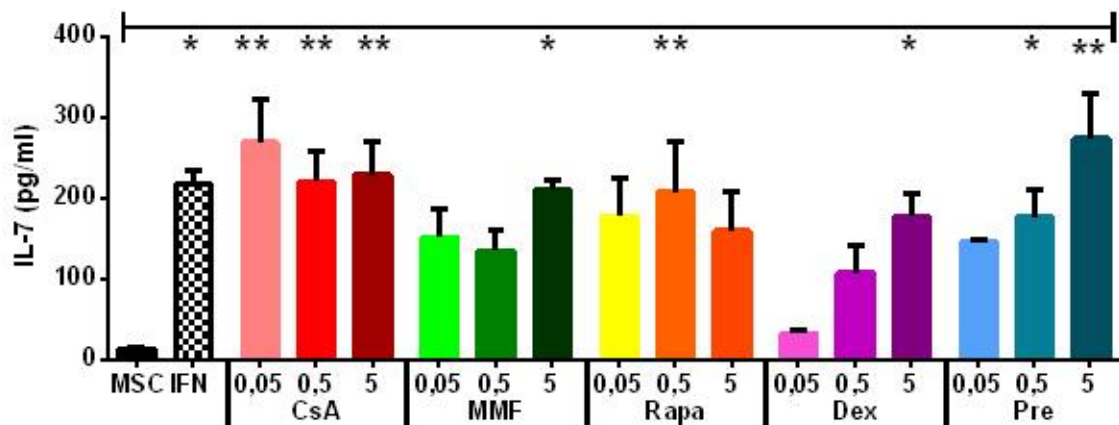
Obrázek 23 Produkce IL-6. Nestimulované MSC A), stimulované MSC interferonem (IFN- $\gamma$ ) B). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,05$ .

Produkce cytokinu IL-7 nestimulovanými MSC je zvyšována všemi imunosupresivními látkami, nejvýrazněji po kultivaci s glukokortikoidy a střední koncentrací Rapa (viz obrázek 24A). MSC stimulované IFN- $\gamma$  exprimují IL-7 více než neovlivněné MSC. Oproti negativní kontrole (neovlivněné MSC) došlo k výraznému zvýšení exprese IL-7 u stimulovaných MSC ovlivněných všemi typy imunosupresivních látek. Je také patrné mírné zvýšení exprese IL-7 stimulovaných MSC v kombinaci s CsA, střední koncentrací Rapa a nejvyšší koncentrací Pre ve vztahu k MSC stimulovaných IFN- $\gamma$ . Nízké koncentrace MMF a glukokortikoidů naopak snižují expresi IL-7 ve srovnání se stimulovanými MSC bez imunosupresivních látek, nejvýznamněji Dex (viz obrázek 24B).

A)



B)



Obrázek 24 Produkce IL-7. Nestimulované MSC A), stimulované MSC interferonem (IFN- $\gamma$ ) B). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\*\* $P < 0,0001$ .

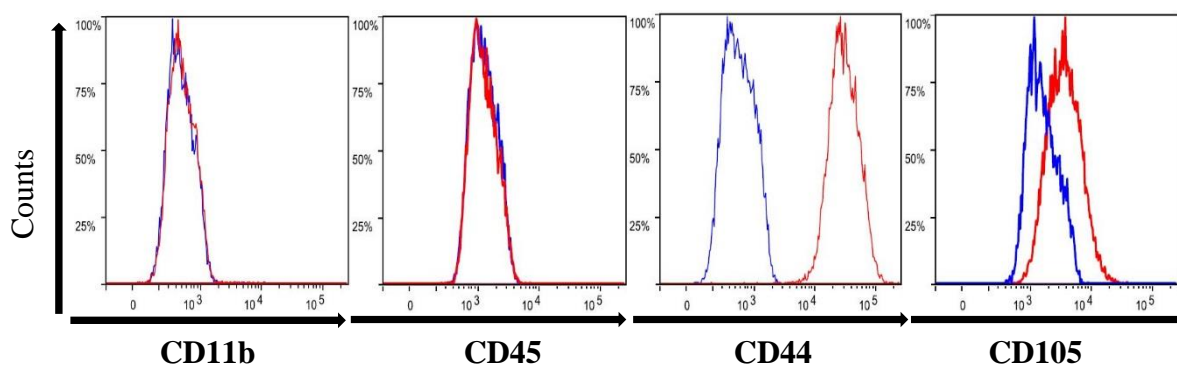
## 4.2 Lidské MSC

Pro ověření, jakým způsobem se budou v přítomnosti imunopresivních látek chovat lidské MSC (hMSC) byly na modelu hMSC izolovaných z tukové tkáně (AT) a kostní dřeně (BM) provedeny podobné experimenty, jako tomu bylo u myších MSC.

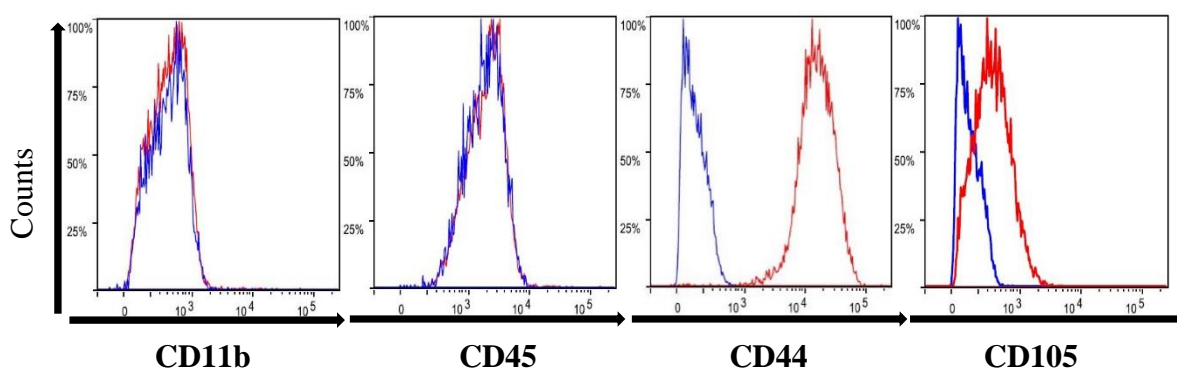
### 4.2.1 Fenotypizace MSC

Lidské MSC exprimují pozitivní markery CD44, CD105 a zároveň jsou negativní pro CD11b a CD45 (hAT MSC viz obrázek 25A, hBM MSC viz obrázek 25B).

A)



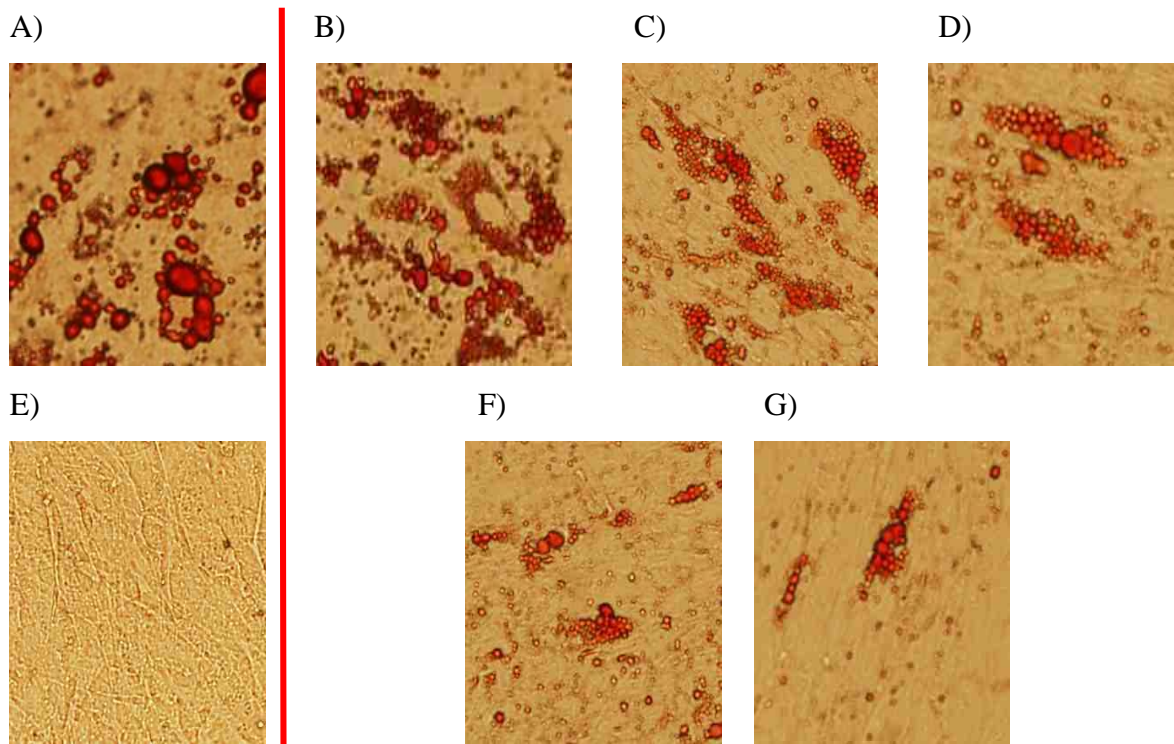
B)



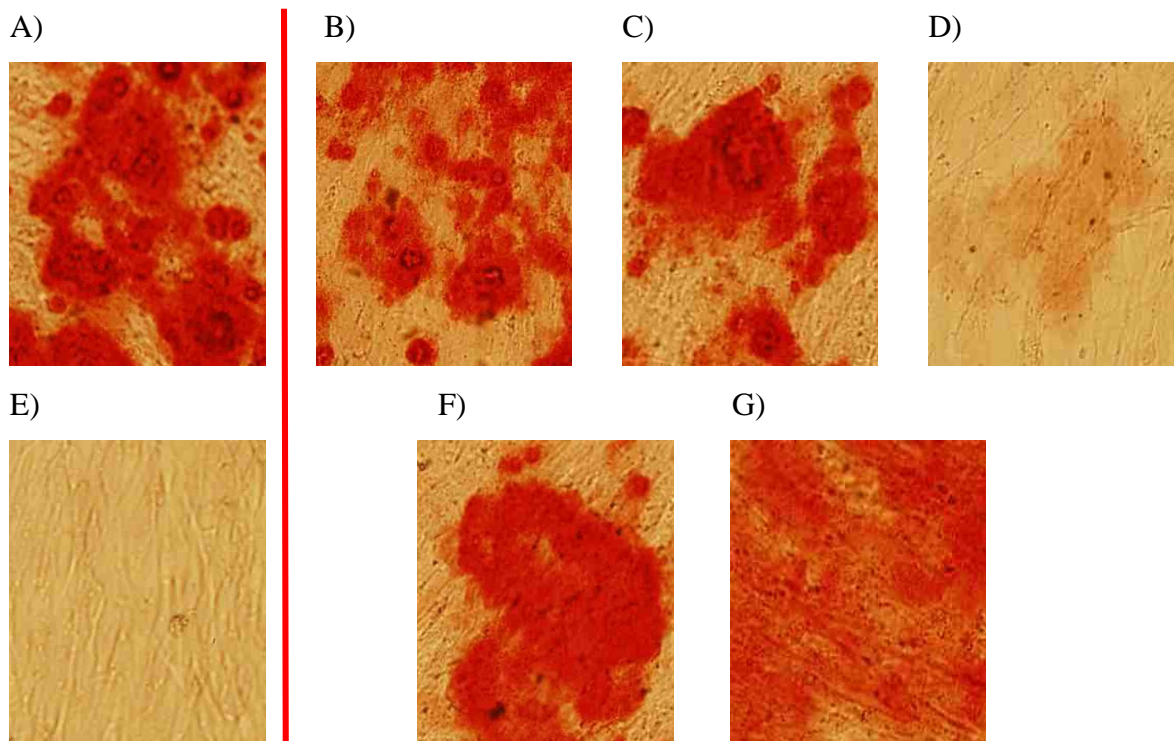
Obrázek 25 Fenotypizace lidských MSC izolovaných z tukové tkáně A), kostní dřeně B). Negativní markery CD11b, CD45. Pozitivní markery CD44, CD105. Negativní kontrola je znázorněna modrou čarou, studovaný znak červenou čarou.

### 4.2.2 Diferenciace MSC

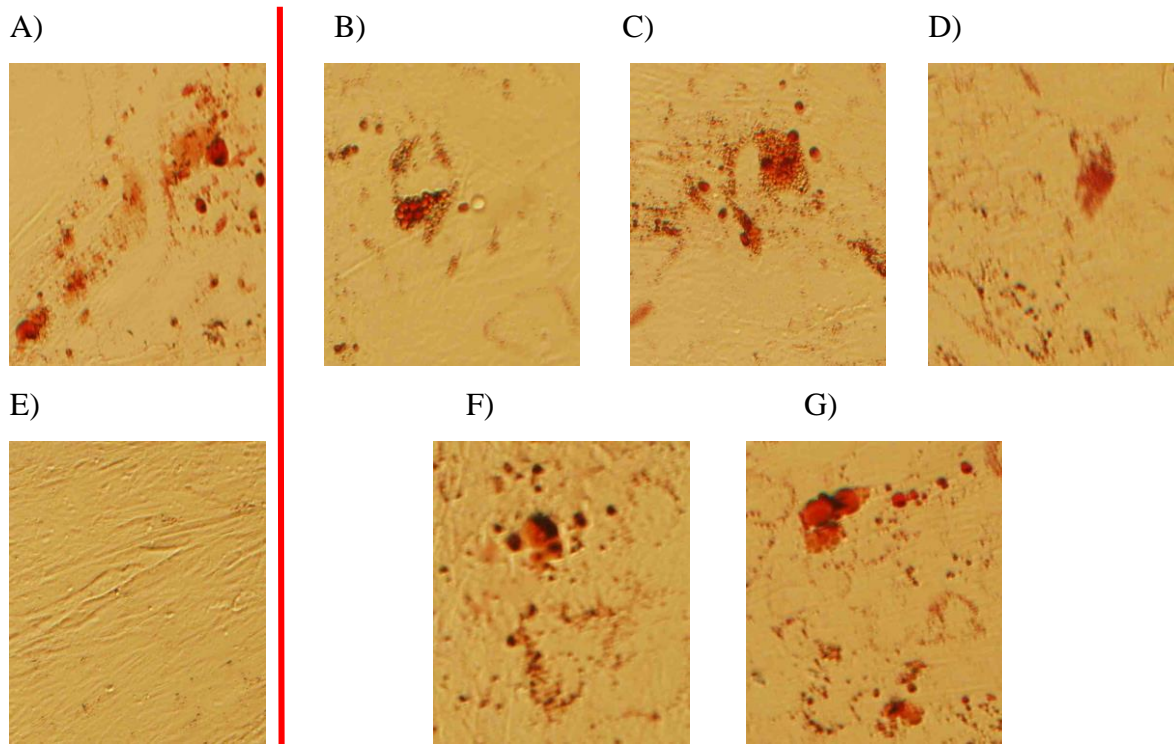
Lidské MSC vykazují schopnost adipogenní i osteogenní diferenciace (viz obrázek 26 – 29) v porovnání s MSC, které byly kultivovány bez přítomnosti diferenciálních činidel (viz obrázek 26 – 29E). Pouze po kultivaci hAT MSC v přítomnosti Rapa byla osteogenní diferenciace snížena (viz obrázek 27D) ve vztahu k negativní kontrole (viz obrázek 27A).



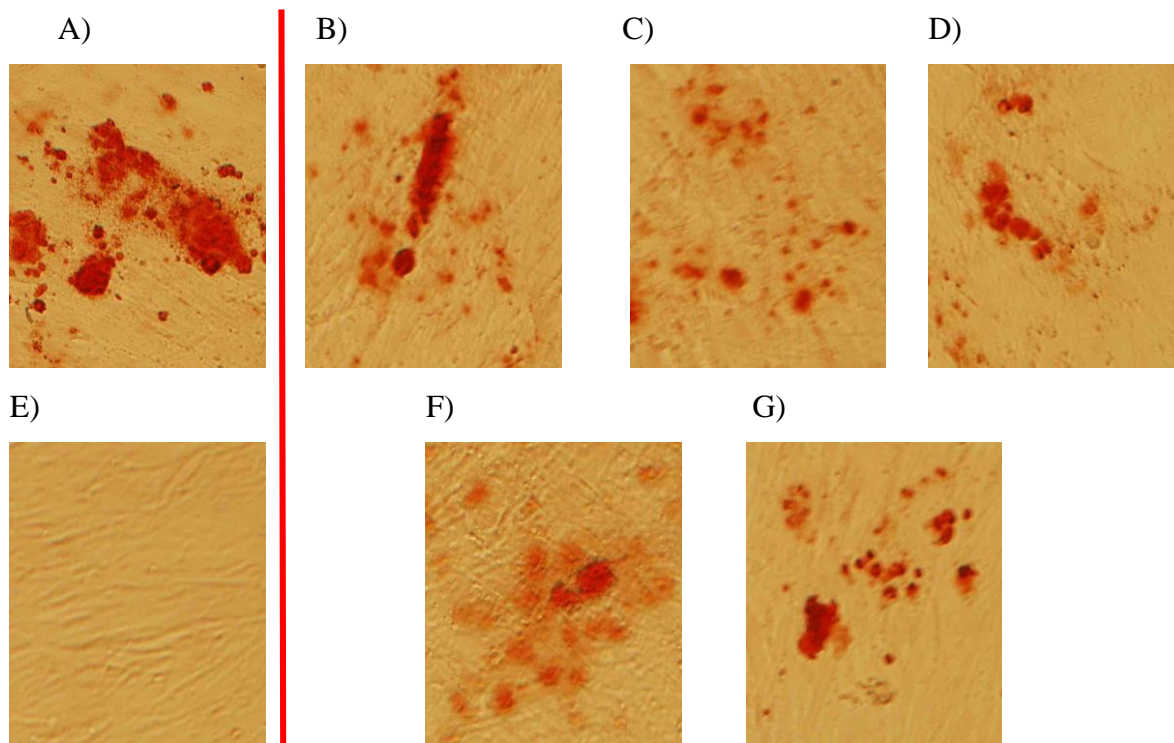
Obrázek 26 Adipogenní diferenciace lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Barveno Oil Red O, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5  $\mu\text{g/ml}$  C) mykofenolát mofetil 0,5  $\mu\text{g/ml}$  D) rapamycin 0,5  $\mu\text{g/ml}$  E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  G) prednizon 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .



Obrázek 27 Osteogenní diferenciace lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z tukové tkáně. Barveno Alizarin red, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5  $\mu\text{g/ml}$  C) mykofenolát mofetil 0,5  $\mu\text{g/ml}$  D) rapamycin 0,5  $\mu\text{g/ml}$  E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  G) prednizon 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .



Obrázek 28 Adipogenní diferenciace lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně. Barveno Oil Red O, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5  $\mu\text{g/ml}$  C) mykofenolát mofetil 0,5  $\mu\text{g/ml}$  D) rapamycin 0,5  $\mu\text{g/ml}$  E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  G) prednizon 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

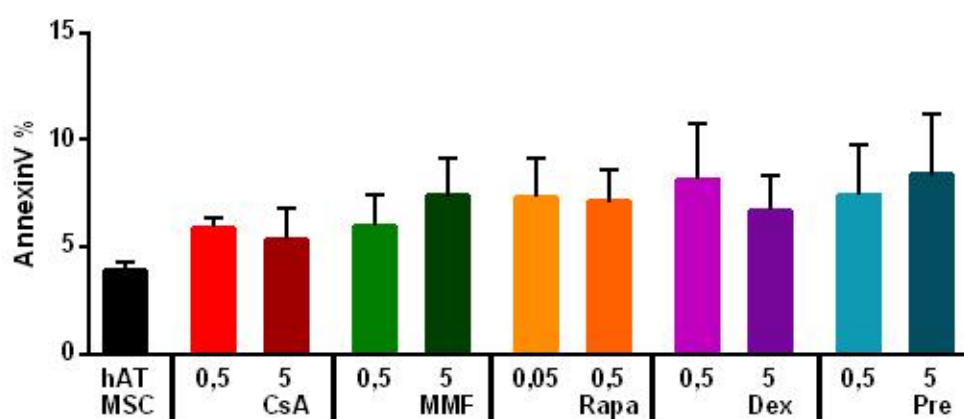


Obrázek 29 Osteogenní diferenciace lidských mezenchymálních kmenových buněk izolovaných z kostní dřeně. Barveno Alizarin red, světelná mikroskopie, zvětšení 200x. A) MSC bez imunosupresivních látek B) cyclosporin A 0,5  $\mu\text{g/ml}$  C) mykofenolát mofetil 0,5  $\mu\text{g/ml}$  D) rapamycin 0,5  $\mu\text{g/ml}$  E) nediferencované mezenchymální kmenové buňky F) dexametazon 0,5  $\mu\text{g/ml}$  G) prednizon 0,5  $\mu\text{g/ml}$ .

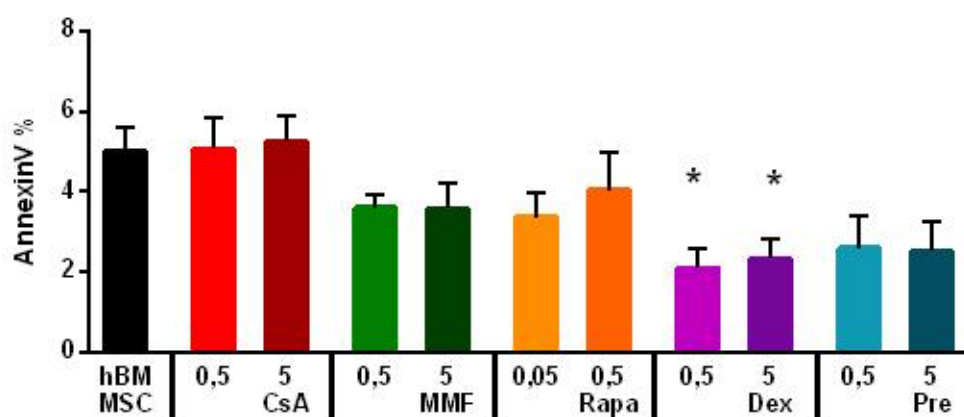
### 4.2.3 Apoptóza

Pomocí průtokové cytometrie a barvení AnnexinemV bylo ověřeno, že lidské MSC nepodléhají po 2 dnech kultivace s imunosupresivními látkami vysoké frekvenci apoptózy v porovnání s neovlivněnými MSC (viz obrázek 30). hAT nevykazují statisticky významné změny apoptózy po ovlivnění imunosupresivními látkami (viz obrázek 30A). U hBM MSC dochází k signifikantnímu snížení apoptózy glukokortikoidy, významný vliv má Dex (viz obrázek 30B).

A)



B)

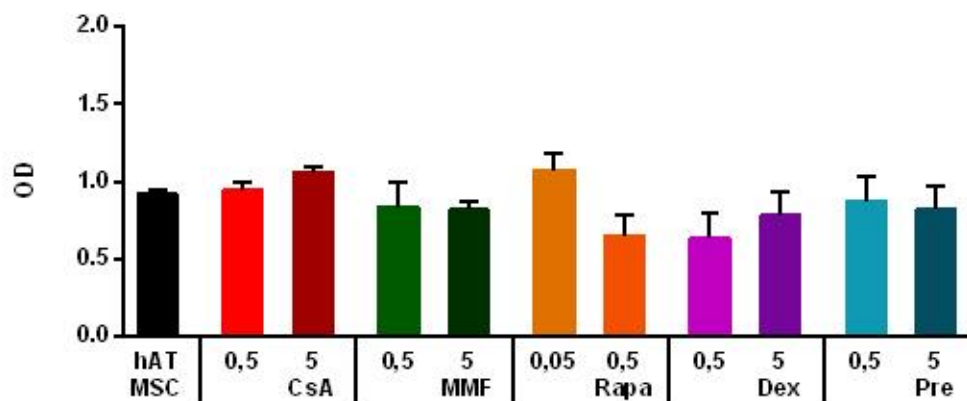


Obrázek 30 Apoptóza, lidské MSC izolované z A) tukové tkáně (AT), B) kostní dřeně (BM). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,05$

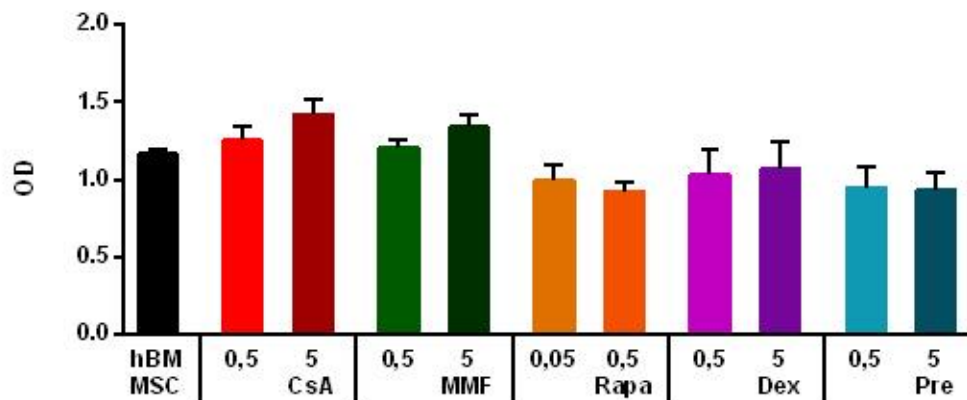
#### 4.2.4 Metabolická aktivita

Nebyly pozorovány signifikantní změny v metabolické aktivitě v případě hAT MSC ve srovnání s negativní kontrolou (neovlivněné buňky). Došlo ale k mírnému zvýšení metabolické aktivity po kultivaci hAT MSC s CsA a Rapa (viz obrázek 31A) a hBM MSC s CsA a MMF (viz obrázek 31B) oproti negativní kontrole. Glukokortikoidy neměly vliv na míru metabolické aktivity lidských MSC.

A)



B)



Obrázek 31 Metabolická aktivita, WST-1, lidská MSC izolovaná z A) tukové tkáně (hAT) B) kostní dřeně (hBM).

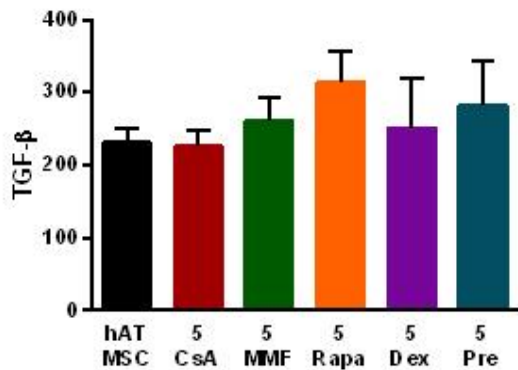
#### 4.2.5 Kvantitativní polymerázová řetězová reakce

Metodou kvantitativní PCR byla měřena exprese cytokinů TGF $\beta$  a TSG-6 na úrovni mRNA, které hrají významnou roli v imunosupresivním působení MSC (viz obrázek 32).

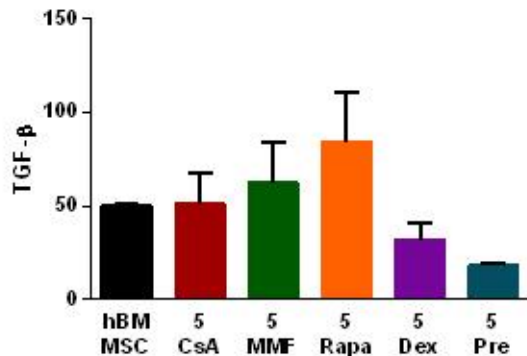
Úroveň exprese TSG-6 a TGF- $\beta$  je vyšší u hAT MSC se srovnání s hBM MSC. Expresse TGF- $\beta$  nebyla statisticky významně ovlivněna žádnou z imunosupresivních látek u lidských MSC v porovnání s negativní kontrolou – neovlivněné MSC (viz obrázek 32A, B). U obou typů lidských MSC ale došlo k mírnému zvýšení exprese TGF- $\beta$  po kultivaci s Rapa. Působením Pre byla exprese TGF- $\beta$  v případě hAT MSC mírně zvýšena (viz obrázek 32A). Glukokortikoidy (zejména Pre) mírně snižují expresi TGF- $\beta$  hBM MSC (viz obrázek 32B).

Expresse TSG-6 byla signifikantně zvýšena po kultivaci hAT i hBM MSC s CsA, MMF ve vztahu k negativní kontrole (viz obrázek 32C, D). CsA má významnější vliv v případě hAT MSC ve srovnání s hBM MSC. Dex mírně snížil u hAT MSC expresi TSG-6 (viz obrázek 32C).

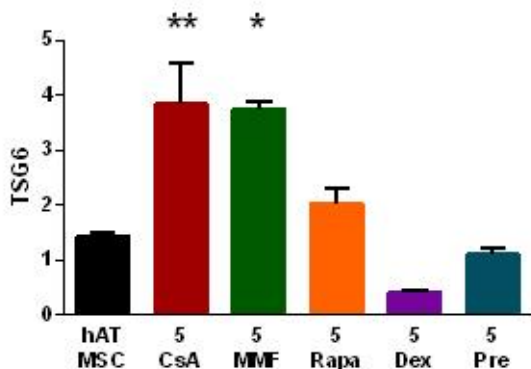
A)



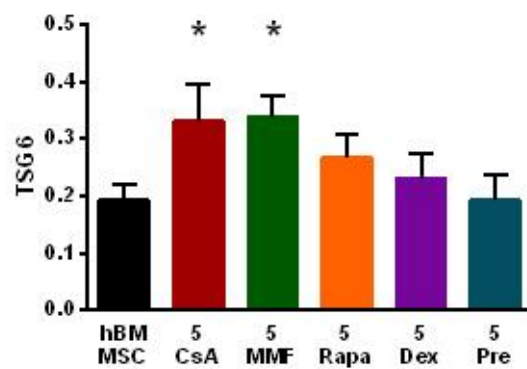
B)



C)



D)



Obrázek 32 Kvantitativní PCR. Expresse cytokinů transformující růstový faktor  $\beta$  (TGF $\beta$ ), tumor necrosis factorem inducibilní gen 6 (TSG-6). Obrázky A, C, MSC izolované z tukové tkáně. Obrázky B, D MSC izolované z kostní dřeně. Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$



#### 4.2.6 Průtoková cytometrie

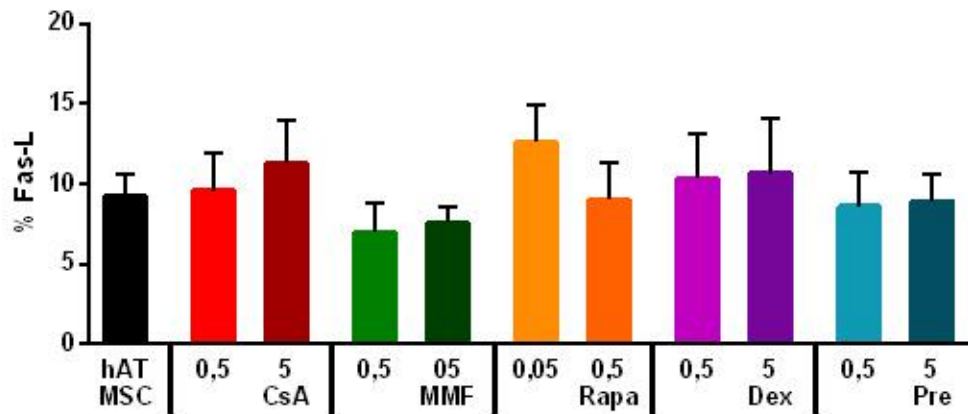
Metodou průtoková cytometrie byly měřeny povrchové molekuly VCAM-1, PD-L1 a Fas-L (viz obrázek 33, 34).

V případě hAT nedochází k signifikantním změnám v expresi Fas-L v porovnání s negativní kontrolou (viz obrázek 33A). Naopak hBM vykazují statisticky významné zvýšení exprese Fas-L po ovlivnění glukokortikoidy, především Dex, v porovnání s negativní kontrolou (viz obrázek 34A).

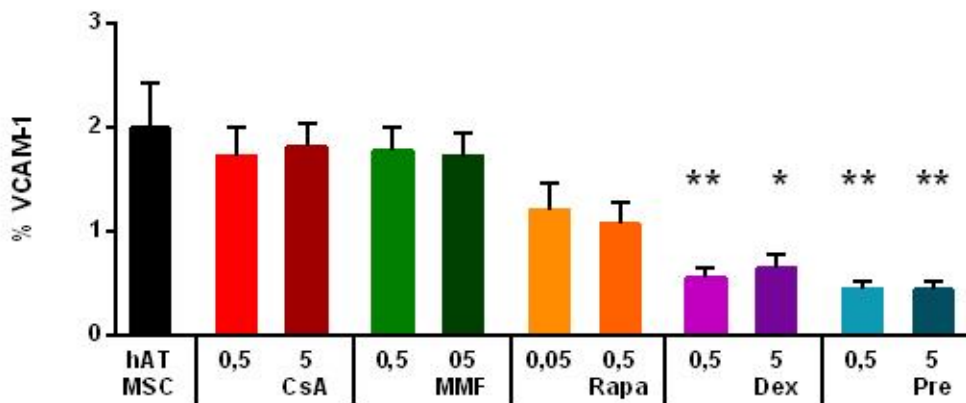
U obou typů lidských MSC je signifikantně snížena exprese VCAM-1 glukokortikoidy a k mírnému snížení exprese VCAM-1 dochází po kokultivaci MSC s Rapa. CsA a MMF však neměly na expresi této molekuly vliv (viz obrázek 33B, 34B). Navíc je patrné, že molekula VCAM-1 je exprimována více než polovinou populace neovlivněných hBM MSC, zatím co neovlivněné hAT MSC tuto molekulu exprimují výrazně méně.

Exprese PD-L1 je statisticky významně zvýšená po kokultivaci hAT MSC s CsA (viz obrázek 33C). V případě hBM tento efekt nebyl patrný, ale byla zde tendence mírného snížení exprese PD-L1 glukokortikoidy (viz obrázek 34C).

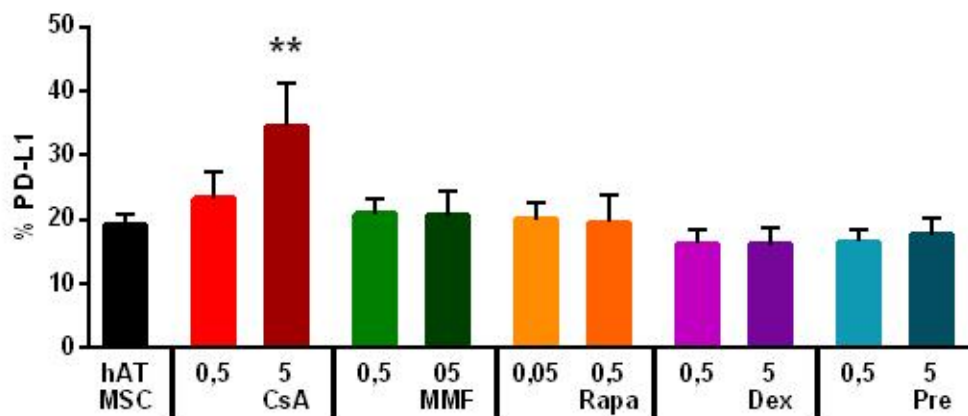
A)



B)

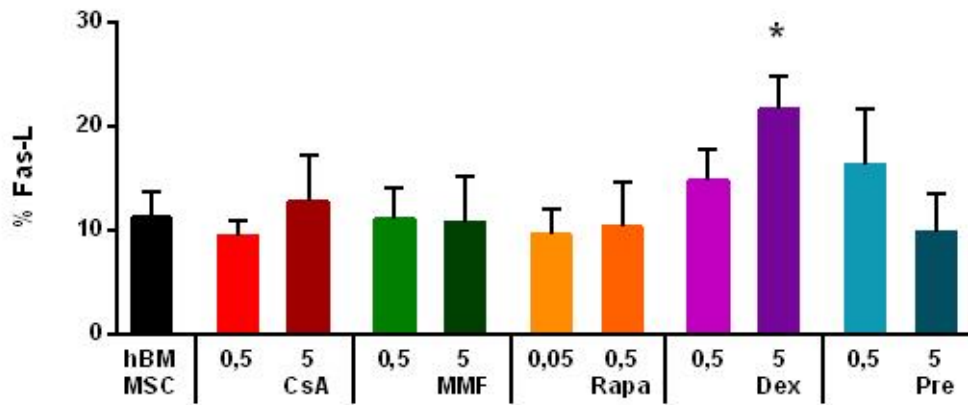


C)

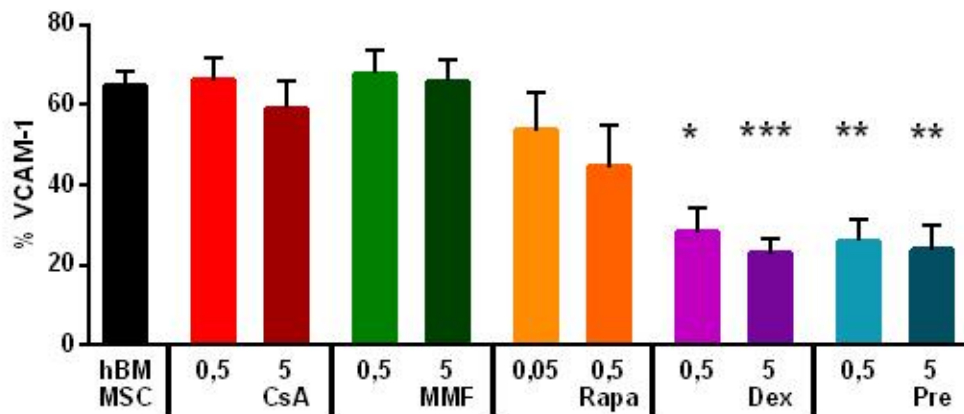


Obrázek 33 Expresse Fas-L A) VCAM-1 B) PD-L1 C) lidskými MSC izolovanými z tukové tkáně. Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ .

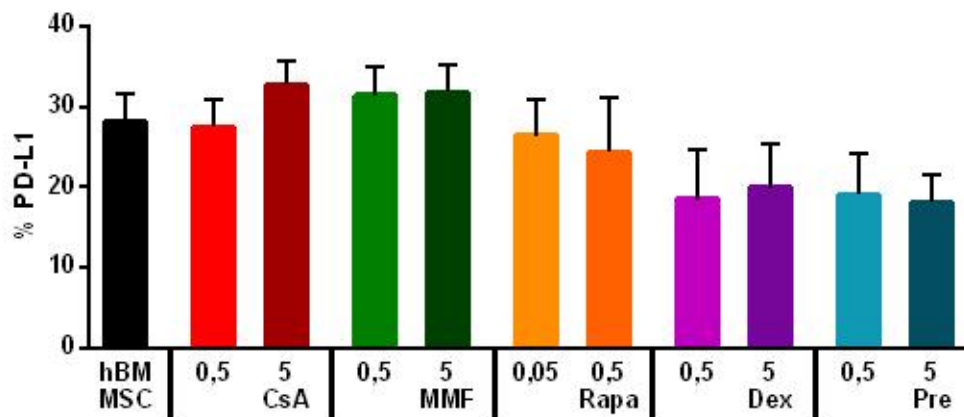
A)



B)



C)



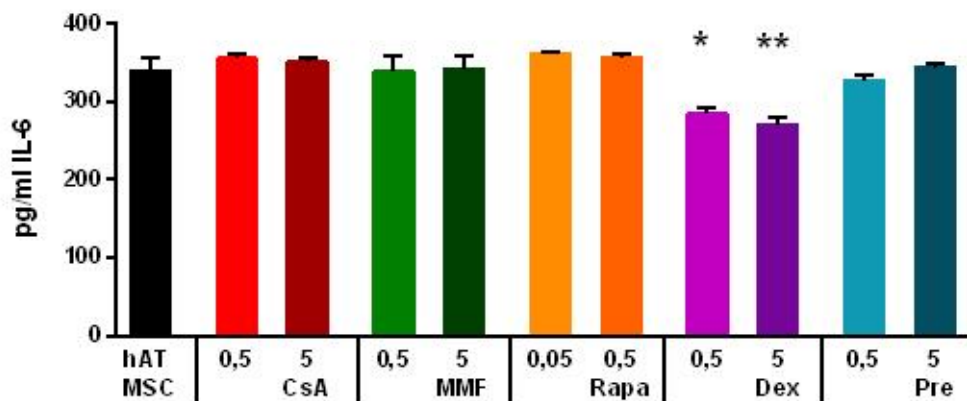
Obrázek 34 Expresse Fas-L A) VCAM-1 B) PD-L1 C) lidskými MSC izolovanými z kostní dřeně. Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$  \*\*\*  $P < 0,001$ .

#### 4.2.7 ELISA

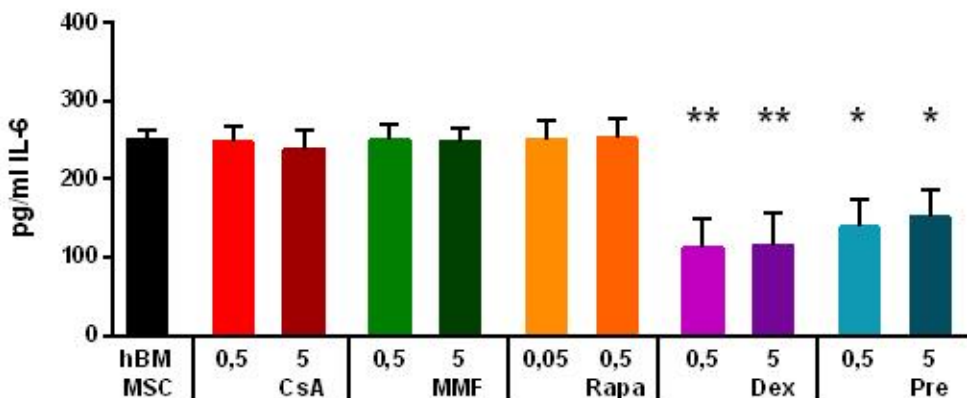
Metodou ELISA byla u lidských MSC (stejně jako v případě myších MSC) měřena produkce solubilních cytokinů IL-6, IL-7.

Produkce IL-6 byla ovlivněna pouze glukokortikoidy, u hAT i hBM došlo ke statisticky významnému snížení tohoto cytokinu v porovnání s negativní kontrolou (viz obrázek 35). Z výsledků vyplývá, že hAT MSC produkují více IL-6 než hBM MSC a jsou ovlivněny pouze Dex (viz obrázek 35A), zatím co produkce IL-6 hBM MSC je snížena oběma testovanými typy glukokortikoidů (viz obrázek 35B).

A)



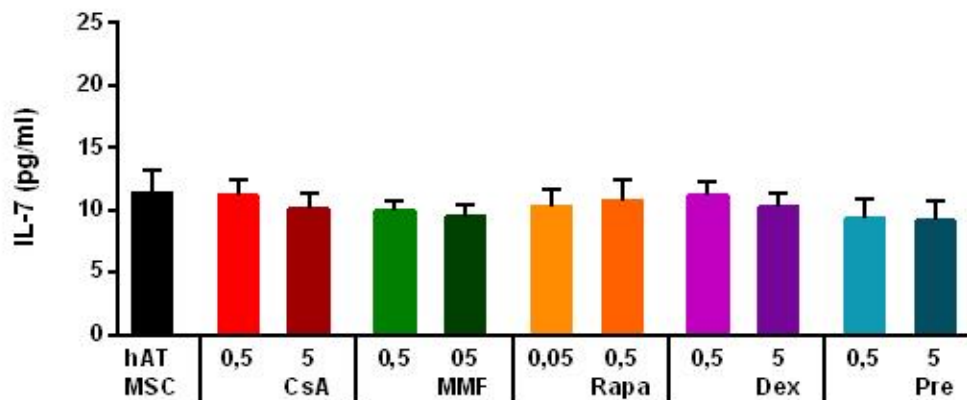
B)



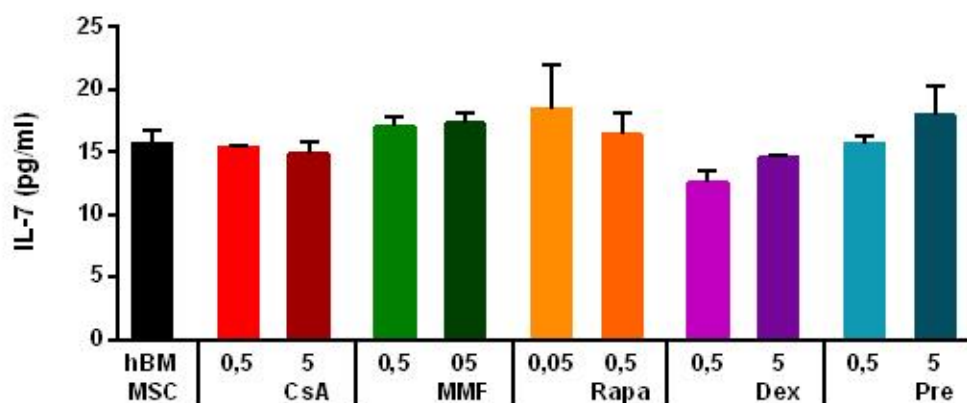
Obrázek 35 Produkce IL-6 MSC izolovanými z tukové tkáně A), kostní dřeně B). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). \*  $P < 0,05$  \*\*  $P < 0,01$ .

Expres IL-7 není výrazně ovlivněna žádnou z imunosupresivních látek u hAT ani hBM MSC (viz obrázek 36). Produkce IL-7 hBM MSC je mírně zvýšena (viz obrázek 36B) v porovnání s hAT MSC (viz obrázek 36A).

A)



B)



Obrázek 36 Produkce IL-7 MSC izolovanými z tukové tkáně A), kostní dřeně B). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre).

## 5. Diskuse

MSC mají kromě schopnosti diferenciaci do buněčných typů mezodermy také schopnost interagovat s imunitním systémem. Převážně mají MSC protizánětlivý efekt a podporují navození tolerogenního fenotypu buněk imunitního systému. Díky svým vlastnostem jsou MSC hojně využívány v klinických studiích oboru transplantací a autoimunitních onemocnění. Pacientům jsou ale současně s MSC podávány imunosupresivní látky. Molekulární cíle imunosupresivních látek jsou exprimovány MSC, proto je možné předpokládat, že tyto látky ovlivňují imunosupresivní vlastnosti MSC. Hlavním cílem této diplomové práce bylo ověřit, zda imunosupresivní látky mají vliv na supresivní působení myších a lidských MSC na buňky imunitního systému. Experimenty byly provedeny nejprve na myších MSC izolovaných z tukové tkáně. Imunosupresivní působení MSC je výrazně podporováno po stimulaci IFN- $\gamma$ , kdy je navozen fenotyp MSC2, který zejména se uplatňuje při inhibici odhojování transplantátu a autoimunitních onemocněních. Proto jsme myší MSC stimulovali IFN- $\gamma$ . Pro ověření, zda mají imunosupresivní látky podobný vliv na lidské MSC, byly testovány i lidské MSC. V klinických studiích jsou nejčastěji používány MSC izolované z tukové tkáně a kostní dřeně, proto byly pro další experimenty zvoleny hAT MSC a hBM MSC. Pro studii byly použity klinicky relevantní koncentrace imunosupresivních látek.

Nejprve bylo ověřeno, že myší i lidské MSC odpovídají minimálním kritériím definovaným podle (Dominici et al., 2006). Myší i lidské MSC byly schopné adipogenní a osteogenní diferenciaci, a to i za přítomnosti imunosupresivních látek. Kromě snížení schopnosti osteogenní diferenciaci hAT MSC vlivem Rapa, nedošlo u myších MSC ani hBM MSC ke změnám diferenciaci. Inhibice osteogenní diferenciaci Rapa již byla publikována, ale v kontextu myších BM MSC (Isomoto et al., 2007). V našem případě byly použity myší MSC izolované z tukové tkáně a Rapa osteogenní diferenciaci neinhiboval. Ostatní testované imunosupresivní látky neměly na schopnost diferenciaci myších i lidských MSC vliv.

Pro ověření, že MSC přežívají dvoudenní kultivaci v přítomnosti imunosupresivních látek, byla měřena apoptóza. Apoptóza myších ani lidských MSC nebyla výrazně zvýšena žádnou z použitých imunosupresivních látek a stimulace myších MSC pomocí IFN- $\gamma$  také nenavodila statisticky významné rozdíly v apoptóze. Naše výsledky jsou v souladu se studií apoptózy MSC, kdy byly jako model využity lidské MSC izolované ze srdeční tkáně a po 2 dnech kultivace s imunosupresivními látkami apoptóza nebyla ovlivněna inhibitorem fosfatázy

Cn, MMF ani Rapa (Hoogduijn et al., 2008). Podle jiných studií imunosupresivní látky mohou ovlivňovat přežívání MSC, např. CsA může apoptózu snižovat, což bylo studováno na modelu krysích BM MSC v prostředí hypoxie (Chen et al., 2008). Na rozdíl od myších MSC a hAT MSC jsme pozorovali signifikantní snížení apoptózy hBM MSC kultivovaných s glukokortikoidy ve vztahu k neovlivněným hBM MSC, kdy měl významný vliv především Dex. Snížení apoptózy MSC po kultivaci s Dex bylo pozorováno již dříve na modelu lidských MSC izolovaných z pupečníku. Buňky byly kultivovány kratší dobu v porovnání s naší studií - 12 a 24 hodin a Dex byl použit v koncentracích 40  $\mu\text{g/ml}$  a vyšších (Wang et al., 2012).

Dále bylo potřeba zjistit, zda jsou MSC metabolicky aktivní po dvoudenní kultivaci s imunosupresivními látkami. Po kultivaci myších MSC s MMF, Rapa a glukokortikoidy došlo ke změnám metabolické aktivity. Rapa a nejvyšší koncentrace MMF signifikantně snižují metabolickou aktivitu myších MSC, což vyplývá z podstaty fungování daných imunosupresivních látek, protože MMF a Rapa jsou inhibitory buněčného cyklu (Cohn et al., 1999; Heitman et al., 1991). Naopak glukokortikoidy Dex a Pre metabolickou aktivitu myších MSC významně podporují. Tento efekt je umocněn stimulací myších MSC IFN- $\gamma$ . CsA ale na metabolickou aktivitu neměl vliv, což odpovídá studiím vlivu CsA na proliferaci krysích BM MSC (Byun et al., 2012).

Lidské buňky byly k působení imunosupresivních látek méně citlivé. Metabolická aktivita lidských MSC nebyla imunosupresivními látkami o testovaných koncentracích statisticky významně ovlivněna. Došlo pouze k mírnému zvýšení metabolické aktivity hAT MSC vlivem CsA a Rapa a hBM MSC vlivem CsA a MMF. Vliv inhibitoru fosfatázy Cn, MMF a Rapa na proliferaci lidských MSC byl již studován na modelu lidských MSC izolovaných ze srdeční tkáně. Inhibice proliferace byla zaznamenána až po 3 dnech kultivace MSC s MMF a Rapa. Inhibitor Cn neměl na proliferaci MSC vliv ani po delší době působení (Hoogduijn et al., 2008). Podle studií proliferace na modelu MSC izolovaných z pupečníku došlo po kultivaci s vysokou koncentrací Dex (400  $\mu\text{g/ml}$ ) po dobu 2 dnů k jejímu signifikantnímu zvýšení (Wang et al., 2012). V naší studii ale byly použity koncentrace glukokortikoidů zhruba 100x nižší, a proto jsme zvýšení metabolické aktivity nepozorovali.

MSC působí na buňky imunitního systému řadou solubilních molekul. NO je jednou z nejdůležitějších molekul, které se uplatňují v imunosupresivním působení myších MSC. Produkce NO myšími MSC byla snížena glukokortikoidy, ostatní testované imunosupresivní látky neměly na produkci NO vliv. Důvodem by mohla být schopnost glukokortikoidů

inhibovat signální dráhu NF- $\kappa$ B (Nissen and Yamamoto, 2000), která se uplatňuje při regulaci exprese enzymu iNOS.

Cytokin IL-6 je konstitutivně exprimovaný MSC v malém množství, kdy inhibuje diferenciaci monocytů na DC a uplatňuje se při směřování makrofágů k tolerogennímu fenotypu M2 (Melief et al., 2013a). IL-6 také pozitivně reguluje expresi Cox-2, a tedy PGE2 (Bouffi et al., 2010). PGE2 pak hraje významnou roli v inhibici proliferace lymfocytů a navození regulačního fenotypu DC (Son et al., 2006), Treg (English et al., 2009) a makrofágů (Németh et al., 2009). Exprese IL-6 MSC je inducibilní. MSC1 (stimulované prozánětlivými cytokiny a LPS) (Gazdic et al., 2015) produkují velké množství IL-6 (Svobodova et al., 2011). MSC ale zároveň konstitutivně exprimují TGF $\beta$ , což v kombinaci s IL-6 vede k podpoření populace Th17 (Svobodova et al., 2011). IFN- $\gamma$  může expresi IL-6 BM MSC mírně zvyšovat (Svobodova et al., 2011), což se ale v rámci našeho měření v případě myších AT MSC neprokázalo. Množství IL-6, které produkují nestimulované MSC nebo MSC stimulované IFN- $\gamma$  by pravděpodobně nemělo být dostatečné pro navození fenotypu Th17.

Z našich výsledků vyplývá, že glukokortikoidy (zejména Dex) významně snižují expresi IL-6 myších i lidských MSC, a proto by mohly snižovat schopnost MSC indukovat tolerogenní fenotyp imunitních buněk. Snížení exprese IL-6 vlivem Dex je v souladu se studií, která byla provedena na modelu hBM MSC (Haynesworth et al., 1996). Ostatní testované imunosupresivní látky neměly v naší studii na expresi IL-6 vliv. Podle některých studií ale může být exprese IL-6 významně snížena po dvoudenní kultivaci hAT MSC s Rapa (Kim et al., 2015b).

Vzhledem k významné funkci IL-7 produkovaného MSC v inhibici apoptózy buněk imunitního systému (Normanton et al., 2014) jsme testovali změny v expresi tohoto cytokinu myšími a lidskými MSC. Je známo, že IL-7 napomáhá rekonstrukci imunitního systému po transplantaci hematopoetických kmenových buněk (Broers et al., 2003). Také bylo prokázáno, že IL-7 produkovaný stromálními buňkami v lymfatických uzlinách stabilizuje tolerogenní schopnosti a podporuje proliferaci Treg prostřednictvím zvýšené exprese CD25 Treg, a tedy jejich schopnost kompetice o IL-2 s T buňkami podílejícími se na zánětlivé reakci a odhojování transplantátu (Schmaler et al., 2015). Na druhou stranu však bylo zjištěno, že IL-7 podporuje přežívání alloreaktivních T buněk a dochází tak k rozvoji GvHD (Chung et al., 2008). Všechny námi testované imunosupresivní látky zvyšovaly expresi IL-7 myších MSC, a tedy jejich schopnost podporovat přežívání naivních lymfocytů a paměťových buněk a efektorových funkcí Treg. Exprese IL-7 myšími MSC je inducibilní IFN- $\gamma$  a byl zaznamenán slabý aditivní



efekt IFN- $\gamma$  v kombinaci s CsA, střední koncentrací Rapa a nejvyšší koncentrací Pre na expresi IL-7. Nejnižší koncentrace Dex v kombinaci s IFN- $\gamma$  snižovala expresi IL-7 myších MSC ve srovnání se stimulovanými MSC, které byly kultivovány bez přítomnosti imunosupresivních látek, což by mohlo být výhodou při léčbě GvHD. Expresie cytokinu IL-7 lidskými MSC, na rozdíl od myších MSC, nebyla imunosupresivními látkami významně ovlivněna. Z předběžných dat naší laboratoře vyplývá, že expresie IL-7 lidských MSC je také inducibilní IFN- $\gamma$ .

MSC navozují tolerogenní fenotyp imunitních buněk, které hrají klíčovou roli v odhojování transplantátu a při rozvoji autoimunitních onemocnění. MSC prostřednictvím cytokinu TSG-6 podporují tolerogenní fenotyp makrofágů M2 (Choi et al., 2011) a DC (Liu et al., 2014). Cytokin TGF- $\beta$ , který je konstitutivně exprimovaný MSC významně podporuje vznik Treg (English et al., 2009). Proto byla u lidských MSC byla měřena expresie cytokinů TGF- $\beta$  a TSG6. Kultivace lidských MSC s CsA a MMF signifikantně zvyšuje expresi TSG-6, což by mohlo podporovat schopnost MSC podporovat vznik M2 makrofágů a inhibovat maturaci DC (Choi et al., 2011; Liu et al., 2014). Z výsledků je patrné, že imunosupresivní látky nemají na expresi TGF- $\beta$  lidskými MSC signifikantní vliv, pouze Rapa mírně zvyšuje expresi TGF- $\beta$  oběma typy lidských MSC a glukokortikoidy (zejména Pre) ji mírně zvyšují u hAT MSC a mírně snižují v případě hBM MSC. Lze předpokládat, že imunosupresivní látky nemají výrazný vliv na schopnost lidských MSC navodit regulační fenotyp T buněk (Treg) (English et al., 2009). Podle některých studií ale Rapa může expresi TGF- $\beta$  lidských MSC signifikantně zvyšovat na úrovni mRNA i na úrovni proteinu, což bylo studováno na modelu hAT MSC (Kim et al., 2015a).

MSC atrahují buňky imunitního systému do své blízkosti a interagují s nimi pomocí povrchových molekul, jako jsou např. ICAM-1, VCAM-1, PD-L1, Fas-L, které hrají významnou úlohu při jejich imunosupresivním působení (Akiyama et al., 2012; Augello et al., 2005; Ren et al., 2010). Proto jsme testovali změny v expresi těchto molekul MSC po kultivaci s imunosupresivními látkami.

Díky adhezivním molekulám, jako jsou ICAM-1, VCAM-1 MSC přímo interagují s lymfocyty a působení cytokinů, které MSC produkují, je pak vysoce účinné (Ren et al., 2010). Expresie VCAM-1 myších i lidských MSC byla ovlivněna pouze glukokortikoidy, které snižují expresi této molekuly. Důvodem odlišného působení glukokortikoidů na expresi VCAM-1 a ICAM-1 může být přítomnost vazebných míst pro transkripční faktory GATA a IRF-1

v promotoru VCAM-1, které jsou ovlivněny glukokortikoidy, ale v promotoru ICAM-1 se nevyskytují (Nizamutdinova et al., 2012; Oakley and Cidlowski, 2013). U lidských MSC byly vidět rozdíly v míře exprese VCAM-1 hAT oproti hBM MSC. Zatímco v případě hBM MSC byla molekula VCAM-1 exprimována více než polovinou populace, exprese VCAM-1 hAT MSC byla minimální, což ukazují i jiné studie (Yang et al., 2013).

Prostřednictvím povrchové molekulou PD-L1 MSC inhibují proliferaci a efektorové funkce lymfocytů (Augello et al., 2005). U myších MSC nedošlo k významným změnám exprese PD-L1 po kultivaci s imunosupresivními látkami, což se nezměnilo ani po stimulaci MSC IFN- $\gamma$ . Nestimulované myši MSC exprimují PD-L1 minimálně, ale stimulace IFN- $\gamma$  způsobí, že PD-L1 začne exprimovat přes 90% populace. Zvýšení exprese PD-L1 jsme pozorovali po dobu 7 dnů (data nejsou ukázána). V jiných studiích bylo zjištěno, že k nárůstu exprese PD-L1 dochází během 24 hod působení IFN- $\gamma$  a minimální koncentrace IFN- $\gamma$  pro plnou expresi PD-L1 je 5 ng/ml (Sheng et al., 2008). V případě lidských MSC jsme pozorovali zhruba 10x vyšší úroveň exprese PD-L1 nestimulovaných buněk v porovnání s myšími MSC, což bylo ukázáno i v jiných studiích (Stagg et al., 2006). Lidské MSC konstitutivně exprimují velké množství IL-25, který zvyšuje expresi PD-L1, a proto mají lidské MSC schopnost inhibovat efektorové populace T lymfocytů (např. Th17) prostřednictvím PD-L1 nezávisle na stimulaci IFN- $\gamma$  (Wang et al., 2015). Exprese PD-L1 je však stejně jako u myších MSC také u lidských MSC inducibilní IFN- $\gamma$  (Stagg et al., 2006). Bylo zjištěno, že hBM MSC mají zvýšenou schopnost blokovat efektorové funkce T buněk prostřednictvím PD-L1 po stimulaci IFN- $\gamma$  (Chinnadurai et al., 2014), což odpovídá modelu imunosupresivního působení fenotypu MSC2 (Gazdic et al., 2015). Po kultivaci hAT MSC (na rozdíl od hBM MSC) s CsA jsme pozorovali signifikantní zvýšení exprese PD-L1, ostatní imunosupresivní látky neměly na expresi této molekuly vliv. CsA proto zřejmě zvyšuje inhibiční působení MSC na prozánětlivé populace lymfocytů, jako např. Th17.

Povrchovou molekulou Fas-L MSC navozují apoptózu efektorových lymfocytů (Akiyama et al., 2012). Na rozdíl od myších MSC, které exprimují molekulu Fas-L minimálně (data nejsou neukázána), byla exprese Fas-L lidských MSC mnohem výraznější. V případě hBM MSC byla exprese Fas-L signifikantně zvýšena glukokortikoidy, zejména Dex, což by mohlo významně podpořit apoptózu aktivovaných T buněk a vznik Treg (Akiyama et al., 2012). Imunosupresivní látky neměly na expresi Fas-L hAT MSC statisticky významný vliv.

Z námi získaných dat vyplývá, že nejpříznivější kombinací imunosupresivních látek s lidskými MSC je CsA a MMF. Rapa na imunosupresivní vlastnosti lidských MSC nemá signifikantní vliv. Existuje však mnoho dalších molekul, kterými MSC ovlivňují imunitní systém a navozují imunosupresivní prostředí. Mezi nejvýznamnější z nich patří např. IDO (inducibilní IFN- $\gamma$ ), PGE-2 (inducibilní IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ ), které mají vliv na proliferaci převážné většiny populací imunitních buněk (English et al., 2007). Dále také IL-10, produkovaný lidskými MSC, podlejí se na inhibici maturace DC (Liu et al., 2013), galektin-9 (expresi zvyšuje IFN- $\gamma$ ), který působí pro-apopticky na Th1 populaci lymfocytů a snižuje proliferaci a produkci protilátek B lymfocytů (Ungerer et al., 2013).

Vliv imunosupresivních látek byl v rámci této práce testován pouze při působení po dobu dvou dnů. Proto bude zajímavé ověřit, jaký vliv mají imunosupresivní látky na MSC po dlouhodobém působení *in vitro* a *in vivo*.

Současné působení imunosupresivních látek a MSC již bylo studováno v rámci mnoha studií. Na příklad na modelu transplantace ledvin krysy bylo zjištěno, že MSC v kombinaci s nízkou dávkou CsA podporují přežívání transplantátu, ale neprodlužují délku života jedinců ve srovnání s léčbou CsA samotným (Zhang et al., 2007).

V jiných studiích byl vliv imunosupresivních látek na imunosupresivní působení hBM MSC testován *in vitro* na modelu MLR. Podle této studie je jako nejpříznivější kombinace imunosupresivní látky s MSC hodnocen MMF, protože byla amplifikována inhibice proliferace lymfocytů v MLR. Naopak Rapa a inhibitor Cn snižovaly inhibiční působení MSC (Buron et al., 2009). Nebylo ale testováno, které konkrétní populace lymfocytů a jaké cytokiny produkované MSC uplatňující se v inhibici MLR jsou imunosupresivními látkami nejvíce ovlivněny. Podle jiných studií je také kladně hodnocena kombinace MSC s MMF (na rozdíl od MSC v kombinaci s CsA), kdy byl použit myší model MLR *in vivo* a allogenní transplantace srdce. Tento výsledek je vysvětlen tak, že CsA (na rozdíl od MMF) inhibuje expresi IFN- $\gamma$  T lymfocyty, takže nedochází ke stimulaci MSC a podpoření jejich imunosupresivního působení na buňky imunitního systému (Eggenhofer et al., 2011).

Studie vlivu hAT MSC na MLR *in vitro* naopak ukazuje, že MSC amplifikují imunosupresivní působení CsA na T lymfocyty, inhibici jejich proliferace a aktivity. Tento efekt je zprostředkován mezibuněčným kontaktem MSC a T buněk, kdy interakce Jagged-1 a Notch hraje roli v inhibici translokace NF- $\kappa$ B do jádra u T buněk. Inhibice translokace NF- $\kappa$ B do jádra významně snižuje schopnost T buněk exprimovat IL-2 a IFN- $\gamma$  (Shi et al., 2011). Vzhledem k vedlejším účinkům CsA (jedním z nejčastějších je např. nefrotoxicita) by bylo

snížení dávek této imunosupresivní látky díky současnému podání MSC pro pacienty velice přínosné (de Mattos et al., 2000).

MSC je také možné ovlivnit imunosupresivními látkami a až poté využít pro imunosupresi. Bylo zjištěno, že MSC mají schopnost adsorbce lipofilních imunosupresivních látek, jako jsou CsA a Rapa, na svůj povrch a díky migraci těchto buněk mohou být imunosupresivní látky doručeny do místa zánětu (Girdlestone et al., 2015). Pro adsorbci imunosupresivních látek stačí inkubace MSC po dobu 5 minut v médiu obsahujícím 0,05 µg/ml Rapa nebo 5 µg/ml CsA. Takto připravené MSC byly použity v preklinické studii akutního GvHD na xenogenním modelu myši, kterým byly transplantovány lidské mononukleární buňky. MSC s navázaným Rapa byly schopné zabránit vzniku GvHD a významně zvýšit dobu přežití daných jedinců ve srovnání s jedinci, kterým byl podán pouze Rapa nebo samotné MSC. To znamená, že Rapa nemusí indukovat změny fenotypu MSC, ale jedná se o imunosupresivní působení navázaného Rapa (Girdlestone et al., 2015). Toto pozorování je v souladu s jinou studií, podle které nemají MSC v kombinaci s Rapa signifikantně rozdílný vliv na MLR ve srovnání s Rapa samotným (Eggenhofer et al., 2011). Existují však studie, které ukazují, že inkubace hAT MSC s Rapa zvyšuje expresi IL-10, IDO a TGFβ, inhibuje klonální expanzi Th17 a podporuje vznik Treg a zvyšuje schopnost migrace MSC k CD4<sup>+</sup> T buňkám (Kim et al., 2015b).

## 6. Závěr

- Imunosupresivní látky mají odlišný vliv na myší a lidské MSC a také na MSC izolované z různých tkání. Výběr kombinace imunosupresivních látek a MSC je důležitý zohlednit pro léčbu konkrétního onemocnění.
- Na apoptózu myších MSC ani hAT MSC nemají imunosupresivní látky vliv. Dex podporuje přežívání (snižuje apoptózu) hBM MSC.
- V případě myších MSC byla snížena metabolická aktivita po kultivaci s Rapa a nejvyšší koncentrací MMF. Glukokortikoidy s IFN- $\gamma$  metabolickou aktivitu zvyšují. Pouze CsA nemá na metabolickou aktivitu myších MSC vliv. U lidských MSC nedošlo k signifikantním změnám metabolické aktivity po kultivaci s imunosupresivními látkami.
- Glukokortikoidy, MMF a Rapa významně inhibují expresi molekul uplatňujících se při imunosupresi myších MSC.
- V případě lidských MSC glukokortikoidy (zejména Dex) signifikantně zvyšují expresi Fas-L hBM MSC a Pre mírně zvyšuje expresi TGF- $\beta$  hAT MSC. Současně ale dochází k významnému snížení exprese VCAM-1 a IL-6 glukokortikoidy u obou typů lidských MSC, k mírnému snížení TSG-6 působením Dex na hAT MSC a mírnému snížení exprese TGF- $\beta$  hBM MSC vlivem Pre.
- CsA nemá vliv na většinu testovaných parametrů myších MSC. V případě hAT MSC ale CsA výrazně zvyšuje expresi PD-L1.
- CsA i MMF podporují expresi TSG-6 lidských MSC.
- Rapa mírně zvyšuje expresi TGF- $\beta$  lidských MSC. Na ostatní studované molekuly lidských MSC nemá Rapa vliv.
- Exprese IL-7 myšími MSC byla ovlivněna všemi testovanými imunosupresivními látkami, u lidských MSC nedošlo k signifikantním změnám.
- CsA, MMF a Rapa by mohly být vhodnými imunosupresivními látkami pro léčbu transplantací a autoimunitních onemocnění v kombinaci s lidskými MSC.

## 7. Literatura

- Akiyama, K., Chen, C., Wang, D., Xu, X., Qu, C., Yamaza, T., Cai, T., Chen, W., Sun, L., and Shi, S. (2012). Mesenchymal-stem-cell-induced immunoregulation involves FAS-ligand-/FAS-mediated T cell apoptosis. *Cell stem cell* 10, 544-555.
- Allison, A.C., and Eugui, E.M. (2000). Mycophenolate mofetil and its mechanisms of action. *Immunopharmacology* 47, 85-118.
- Anderson, H., Bracewell, J., Fraser, A., Jones, D., Robertson, G., and Russell, J. (1988). 5-Hydroxymaltol and mycophenolic acid, secondary metabolites from *Penicillium echinulatum*. *Transactions of the British Mycological Society* 91, 649-651.
- Augello, A., Tasso, R., Negrini, S.M., Amateis, A., Indiveri, F., Cancedda, R., and Pennesi, G. (2005). Bone marrow mesenchymal progenitor cells inhibit lymphocyte proliferation by activation of the programmed death 1 pathway. *Eur Journal of Immunology* 35, 1482-1490.
- Auletta, J.J., Eid, S.K., Wuttisarnwattana, P., Silva, I., Metheny, L., Keller, M.D., Guardia-Wolff, R., Liu, C., Wang, F., Bowen, T., *et al.* (2015). Human mesenchymal stromal cells attenuate graft-versus-host disease and maintain graft-versus-leukemia activity following experimental allogeneic bone marrow transplantation. *Stem cells* 33, 601-614.
- Bartholomew, A., Sturgeon, C., Siatskas, M., Ferrer, K., McIntosh, K., Patil, S., Hardy, W., Devine, S., Ucker, D., and Deans, R. (2002). Mesenchymal stem cells suppress lymphocyte proliferation in vitro and prolong skin graft survival in vivo. *Experimental hematology* 30, 42-48.
- Berkenbosch, F., Van Oers, J., Del Rey, A., Tilders, F., and Besedovsky, H. (1987). Corticotropin-releasing factor-producing neurons in the rat activated by interleukin-1. *Science* 238, 524-526.
- Beyth, S., Borovsky, Z., Mevorach, D., Liebergall, M., Gazit, Z., Aslan, H., Galun, E., and Rachmilewitz, J. (2005). Human mesenchymal stem cells alter antigen-presenting cell maturation and induce T-cell unresponsiveness. *Blood* 105, 2214-2219.
- Bierer, B.E., Mattila, P.S., Standaert, R.F., Herzenberg, L.A., Burakoff, S.J., Crabtree, G., and Schreiber, S.L. (1990). 2 distinct signal transmission pathways in lymphocytes-T are inhibited by complexes formed between an immunophilin and either FK506 or

rapamycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87, 9231-9235.

- Borel, J.F., Feurer, C., Gubler, H.U., and Stahelin, H. (1976). Biological effects of cyclosporin-A - New antilymphocytic agent. *Agents and actions* 6, 468-475.
- Bouffi, C., Bony, C., Courties, G., Jorgensen, C., and Noel, D. (2010). IL-6-dependent PGE2 secretion by mesenchymal stem cells inhibits local inflammation in experimental arthritis. *PLoS One* 5, e14247.
- Broers, A.E., Posthumus-van Sluijs, S.J., Spits, H., van der Holt, B., Löwenberg, B., Braakman, E., and Cornelissen, J.J. (2003). Interleukin-7 improves T-cell recovery after experimental T-cell-depleted bone marrow transplantation in T-cell-deficient mice by strong expansion of recent thymic emigrants. *Blood* 102, 1534-1540.
- Buron, F., Perrin, H., Malcus, C., Hequet, O., Thaumat, O., Kholopp-Sarda, M.-N., Moulin, F., and Morelon, E. (2009). Human mesenchymal stem cells and immunosuppressive drug interactions in allogeneic responses: an in vitro study using human cells. *Transplantation proceedings (Elsevier)*, 3347-3352.
- Byun, Y.-K., Kim, K.-H., Kim, S.-H., Kim, Y.-S., Koo, K.-T., Kim, T.-I., Seol, Y.-J., Ku, Y., Rhyu, I.-C., and Lee, Y.-M. (2012). Effects of immunosuppressants, FK506 and cyclosporin A, on the osteogenic differentiation of rat mesenchymal stem cells. *Journal of periodontal & implant science* 42, 73-80.
- Carr, S.F., Papp, E., Wu, J.C., and Natsumeda, Y. (1993). Characterization of human type I and type II IMP dehydrogenases. *Journal of Biological Chemistry* 268, 27286-27290.
- Castro-Manreza, M.E., and Montesinos, J.J. (2015). Immunoregulation by Mesenchymal Stem Cells: Biological Aspects and Clinical Applications. *Journal of immunology research* 2015.
- Cohn, R., Mirkovich, A., Caulfield, J., and Eugui, E. (1999). Apoptosis of human activated peripheral T-cells and T lymphocytic and promonocytic cell lines induced by mycophenolic acid, the active metabolite of CellCept. In *The Sixth Basic Sciences Symposium of the Transplantation Society*, Monterey, CA.
- Corcione, A., Benvenuto, F., Ferretti, E., Giunti, D., Cappiello, V., Cazzanti, F., Risso, M., Gualandi, F., Mancardi, G.L., and Pistoia, V. (2006). Human mesenchymal stem cells modulate B-cell functions. *Blood* 107, 367-372.

- de Mattos, A.M., Olyaei, A.J., and Bennett, W.M. (2000). Nephrotoxicity of immunosuppressive drugs: long-term consequences and challenges for the future. *American journal of kidney diseases* 35, 333-346.
- Deeg, H.J. (2007). How I treat refractory acute GVHD. *Blood* 109, 4119-4126.
- Diederich, S., Eigendorff, E., Burkhardt, P., Quinkler, M., Bumke-Vogt, C., Rochel, M., Seidelmann, D., Esperling, P., Oelkers, W., and Bähr, V. (2002). 11 $\beta$ -Hydroxysteroid dehydrogenase types 1 and 2: an important pharmacokinetic determinant for the activity of synthetic mineralo- and glucocorticoids. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism* 87, 5695-5701.
- Dominici, M., Le Blanc, K., Mueller, I., Slaper-Cortenbach, I., Marini, F., Krause, D., Deans, R., Keating, A., Prockop, D., and Horwitz, E. (2006). Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. *Cytotherapy* 8, 315-317.
- Rocher, Bárbara Du, et al. (2012). Mesenchymal stromal cells impair the differentiation of CD14<sup>++</sup> CD16<sup>-</sup> CD64<sup>+</sup> classical monocytes into CD14<sup>++</sup> CD16<sup>+</sup> CD64<sup>++</sup> activate monocytes. *Cytotherapy* 14.1: 12-25.
- Eggenhofer, E., Renner, P., Soeder, Y., Popp, F.C., Hoogduijn, M.J., Geissler, E.K., Schlitt, H.J., and Dahlke, M.H. (2011). Features of synergism between mesenchymal stem cells and immunosuppressive drugs in a murine heart transplantation model. *Transplant immunology* 25, 141-147.
- English, K., Barry, F.P., Field-Corbett, C.P., and Mahon, B.P. (2007). IFN- $\gamma$  and TNF- $\alpha$  differentially regulate immunomodulation by murine mesenchymal stem cells. *Immunology letters* 110, 91-100.
- English, K., French, A., and Wood, K.J. (2010). Mesenchymal stromal cells: facilitators of successful transplantation? *Cell stem cell* 7, 431-442.
- English, K., Ryan, J.M., Tobin, L., Murphy, M.J., Barry, F.P., and Mahon, B.P. (2009). Cell contact, prostaglandin E-2 and transforming growth factor beta 1 play non-redundant roles in human mesenchymal stem cell induction of CD4(+)CD25(High)forkhead box P3(+) regulatory T cells. *Clinical and Experimental Immunology* 156, 149-160.
- Flechner, S.M., Kurian, S.M., Solez, K., Cook, D.J., Burke, J.T., Rollin, H., Hammond, J.A., Whisenant, T., Lanigan, C.M., and Head, S.R. (2004). De novo kidney



transplantation without use of calcineurin inhibitors preserves renal structure and function at two years. *American Journal of Transplantation* 4, 1776-1785.

- Gazdic, M., Volarevic, V., Arsenijevic, N., and Stojkovic, M. (2015). Mesenchymal Stem Cells: A Friend or Foe in Immune-Mediated Diseases. *Stem Cell Reviews and Reports* 11, 280-287.
- Girdlestone, J., Pido-Lopez, J., Srivastava, S., Chai, J., Leaver, N., Galleu, A., Lombardi, G., and Navarrete, C.V. (2015). Enhancement of the immunoregulatory potency of mesenchymal stromal cells by treatment with immunosuppressive drugs. *Cytotherapy* 17, 1188-1199.
- Haynesworth, S.E., Baber, M.A., and Caplan, A.I. (1996). Cytokine expression by human marrow-derived mesenchymal progenitor cells in vitro: Effects of dexamethasone and IL-1 $\alpha$ . *Journal of cellular physiology* 166, 585-592.
- Heitman, J., Movva, N.R., and Hall, M.N. (1991). Targets for cell-cycle arrest by the immunosuppressant rapamycin in yeast. *Science* 253, 905-909.
- Hoffman, R.A., Langrehr, J., Billiar, T.R., Curran, R.D., and Simmons, R.L. (1990). Alloantigen-induced activation of rat splenocytes is regulated by the oxidative metabolism of L-arginine. *The Journal of Immunology* 145, 2220-2226.
- Hoogduijn, M.J., Crop, M.J., Korevaar, S.S., Peeters, A.M., Eijken, M., Maat, L.P., Balk, A.H., Weimar, W., and Baan, C.C. (2008). Susceptibility of human mesenchymal stem cells to tacrolimus, mycophenolic acid, and rapamycin. *Transplantation* 86, 1283-1291.
- Huster, K.M., Busch, V., Schiemann, M., Linkemann, K., Kerksiek, K.M., Wagner, H., and Busch, D.H. (2004). Selective expression of IL-7 receptor on memory T cells identifies early CD40L-dependent generation of distinct CD8<sup>+</sup> memory T cell subsets. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 5610-5615.
- Hwang, J.H., Shim, S.S., Seok, O.S., Lee, H.Y., Woo, S.K., Kim, B.H., Song, H.R., Lee, J.K., and Park, Y.K. (2009). Comparison of cytokine expression in mesenchymal stem cells from human placenta, cord blood, and bone marrow. *Journal of Korean medical science* 24, 547-554.
- Chen, T.L., Wang, J.A., Shi, H., Gui, C., Luo, R.H., Xie, X.J., Xiang, M.X., Zhang, X., and Cao, J. (2008). Cyclosporin A pre-incubation attenuates hypoxia/reoxygenation-

induced apoptosis in mesenchymal stem cells. *Scandinavian journal of clinical and laboratory investigation* 68, 585-593.

- Chinnadurai, R., Copland, I.B., Patel, S.R., and Galipeau, J. (2014). IDO-independent suppression of T cell effector function by IFN- $\gamma$ -licensed human mesenchymal stromal cells. *The Journal of Immunology* 192, 1491-1501.
- Cho, D.-I., Kim, M.R., Jeong, H.-y., Jeong, H.C., Jeong, M.H., Yoon, S.H., Kim, Y.S., and Ahn, Y. (2014). Mesenchymal stem cells reciprocally regulate the M1/M2 balance in mouse bone marrow-derived macrophages. *Experimental & molecular medicine* 46, e70.
- Choi, H., Lee, R.H., Bazhanov, N., Oh, J.Y., and Prockop, D.J. (2011). Anti-inflammatory protein TSG-6 secreted by activated MSCs attenuates zymosan-induced mouse peritonitis by decreasing TLR2/NF- $\kappa$ B signaling in resident macrophages. *Blood* 118, 330-338.
- Chung, B., Dudl, E., Toyama, A., Barsky, L., and Weinberg, K.I. (2008). Importance of interleukin-7 in the development of experimental graft-versus-host disease. *Biology of Blood and Marrow Transplantation* 14, 16-27.
- Isomoto, S., Hattori, K., Ohgushi, H., Nakajima, H., Tanaka, Y., and Takakura, Y. (2007). Rapamycin as an inhibitor of osteogenic differentiation in bone marrow-derived mesenchymal stem cells. *Journal of Orthopaedic Science* 12, 83-88.
- Jin, L., and Harrison, S.C. (2002). Crystal structure of human calcineurin complexed with cyclosporin A and human cyclophilin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 99, 13522-13526.
- Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu. Rev. Immunol.* 26, 677-704.
- Kim, J., Kundu, M., Viollet, B., and Guan, K.-L. (2011). AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1. *Nature cell biology* 13, 132-141.
- Kim, K.-W., Moon, S.-J., Park, M.-J., Kim, B.-M., Kim, E.-K., Lee, S.-H., Lee, E.-J., Chung, B.-H., Yang, C.-W., and Cho, M.-L. (2015a). Optimization of adipose tissue-derived mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem cell research & therapy* 6, 1-15.
- Kim, K.W., Moon, S.J., Park, M.J., Kim, B.M., Kim, E.K., Lee, S.H., Lee, E.J., Chung, B.H., Yang, C.W., and Cho, M.L. (2015b). Optimization of adipose tissue-derived

mesenchymal stem cells by rapamycin in a murine model of acute graft-versus-host disease. *Stem cell research & therapy* 6, 202.

- Krampera, M., Glennie, S., Dyson, J., Scott, D., Laylor, R., Simpson, E., and Dazzi, F. (2003). Bone marrow mesenchymal stem cells inhibit the response of naive and memory antigen-specific T cells to their cognate peptide. *Blood* 101, 3722-3729.
- Le Blanc, K., and Davies, L.C. (2015). Mesenchymal stromal cells and the innate immune response. *Immunology letters* 168, 140-146.
- Le Blanc, K., Frassoni, F., Ball, L., Locatelli, F., Roelofs, H., Lewis, I., Lanino, E., Sundberg, B., Bernardo, M.E., and Remberger, M. (2008). Mesenchymal stem cells for treatment of steroid-resistant, severe, acute graft-versus-host disease: a phase II study. *The Lancet* 371, 1579-1586.
- Leoni, P., Garcia, R., and Allison, A. (1978). Effects of cyclosporin A on human lymphocytes in culture. *Journal of clinical & laboratory immunology* 1, 67-72.
- Li, W., Ren, G., Huang, Y., Su, J., Han, Y., Li, J., Chen, X., Cao, K., Chen, Q., and Shou, P. (2012). Mesenchymal stem cells: a double-edged sword in regulating immune responses. *Cell Death & Differentiation* 19, 1505-1513.
- Liang, J., Li, X., Zhang, H., Wang, D., Feng, X., Wang, H., Hua, B., Liu, B., and Sun, L. (2012). Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in patients with refractory RA. *Clinical rheumatology* 31, 157-161.
- Liang, J., Zhang, H., Hua, B., Wang, H., Lu, L., Shi, S., Hou, Y., Zeng, X., Gilkeson, G.S., and Sun, L. (2010). Allogeneic mesenchymal stem cells transplantation in refractory systemic lupus erythematosus: a pilot clinical study. *Annals of the rheumatic diseases* 69, 1423-1429.
- Liu, J., Farmer, J.D., Lane, W.S., Friedman, J., Weissman, I., and Schreiber, S.L. (1991). Calcineurin is a common target of cyclophilin-cyclosporine-A and FKBP-FK506 complexes. *Cell* 66, 807-815.
- Liu, W., Liu, J., Wu, J., Zhang, L., Liu, F., Yin, L., Zhang, M., and Yu, B. (2013). Novel mechanism of inhibition of dendritic cells maturation by mesenchymal stem cells via interleukin-10 and the JAK1/STAT3 signaling pathway. *PLoS One* 8, e55487.
- Liu, X., Feng, T., Gong, T., Shen, C., Zhu, T., Wu, Q., Li, Q., and Li, H. (2015). Human Umbilical Cord Mesenchymal Stem Cells Inhibit the Function of Allogeneic Activated V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T Lymphocytes In Vitro. *BioMed research international* 2015.

- Liu, Y., Yin, Z., Zhang, R., Yan, K., Chen, L., Chen, F., Huang, W., Lv, B., Sun, C., and Jiang, X. (2014). MSCs inhibit bone marrow-derived DC maturation and function through the release of TSG-6. *Biochemical and biophysical research communications* 450, 1409-1415.
- López, M.M., Valenzuela, J.E., Álvarez, F.C., López-Álvarez, M.R., Cecilia, G.S., and Paricio, P.P. (2006). Long-term problems related to immunosuppression. *Transplant immunology* 17, 31-35.
- Majumdar, M.K., Keane-Moore, M., Buyaner, D., Hardy, W.B., Moorman, M.A., McIntosh, K.R., and Mosca, J.D. (2003). Characterization and functionality of cell surface molecules on human mesenchymal stem cells. *Journal of biomedical science* 10, 228-241.
- Marcinkiewicz, J. (1997). Nitric oxide and antimicrobial activity of reactive oxygen intermediates. *Immunopharmacology* 37, 35-41.
- Melief, S.M., Geutskens, S.B., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013a). Multipotent stromal cells skew monocytes towards an anti-inflammatory interleukin-10-producing phenotype by production of interleukin-6. *Haematologica* 98, 888-895.
- Melief, S.M., Schrama, E., Brugman, M.H., Tiemessen, M.M., Hoogduijn, M.J., Fibbe, W.E., and Roelofs, H. (2013b). Multipotent stromal cells induce human regulatory T cells through a novel pathway involving skewing of monocytes toward anti-inflammatory macrophages. *Stem cells* 31, 1980-1991.
- Meyer, S., Kohler, N.G., and Joly, A. (1997). Cyclosporine A is an uncompetitive inhibitor of proteasome activity and prevents NF- $\kappa$ B activation. *FEBS letters* 413, 354-358.
- Mudrabettu, C., Kumar, V., Rakha, A., Yadav, A.K., Ramachandran, R., Kanwar, D.B., Nada, R., Minz, M., Sakhuja, V., and Marwaha, N. (2015). Safety and efficacy of autologous mesenchymal stromal cells transplantation in patients undergoing living donor kidney transplantation: a pilot study. *Nephrology* 20, 25-33.
- Muroi, K., Miyamura, K., Okada, M., Yamashita, T., Murata, M., Ishikawa, T., Uike, N., Hidaka, M., Kobayashi, R., and Imamura, M. (2015). Bone marrow-derived mesenchymal stem cells (JR-031) for steroid-refractory grade III or IV acute graft-versus-host disease: a phase II/III study. *International journal of hematology*, 1-8.

- Natsumeda, Y., Ohno, S., Kawasaki, H., Konno, Y., Weber, G., and Suzuki, K. (1990). Two distinct cDNAs for human IMP dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* 265, 5292-5295.
- Németh, K., Leelahavanichkul, A., Yuen, P.S., Mayer, B., Parmelee, A., Doi, K., Robey, P.G., Leelahavanichkul, K., Koller, B.H., and Brown, J.M. (2009). Bone marrow stromal cells attenuate sepsis via prostaglandin E<sub>2</sub>-dependent reprogramming of host macrophages to increase their interleukin-10 production. *Nature medicine* 15, 42-49.
- Niedbala, W., Besnard, A.-G., Jiang, H.R., Alves-Filho, J.C., Fukada, S.Y., Nascimento, D., Mitani, A., Pushparaj, P., Alqahtani, M.H., and Liew, F.Y. (2013). Nitric Oxide-Induced Regulatory T Cells Inhibit Th17 but Not Th1 Cell Differentiation and Function. *The Journal of Immunology* 191, 164-170.
- Nishiyama, S., Manabe, N., Kubota, Y., Ohnishi, H., Kitanaka, A., Tokuda, M., Taminato, T., Ishida, T., Takahara, J., and Tanaka, T. (2005). Cyclosporin A inhibits the early phase of NF- $\kappa$ B/RelA activation induced by CD28 costimulatory signaling to reduce the IL-2 expression in human peripheral T cells. *International immunopharmacology* 5, 699-710.
- Nissen, R.M., and Yamamoto, K.R. (2000). The glucocorticoid receptor inhibits NF $\kappa$ B by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain. *Genes & development* 14, 2314-2329.
- Nizamutdinova, I.T., Kim, Y.M., Lee, J.H., Chang, K.C., and Kim, H.J. (2012). MKP-7, a negative regulator of JNK, regulates VCAM-1 expression through IRF-1. *Cellular signalling* 24, 866-872.
- Normanton, M., Alvarenga, H., Hamerschlak, N., Ribeiro, A., Kondo, A., Rizzo, L. V., & Marti, L. C. (2014). Interleukin 7 plays a role in T lymphocyte apoptosis inhibition driven by mesenchymal stem cell without favoring proliferation and cytokines secretion. *PloS one* 9, e106673.
- Oakley, R.H., and Cidlowski, J.A. (2013). The biology of the glucocorticoid receptor: new signaling mechanisms in health and disease. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 132, 1033-1044.
- Perico, N., Casiraghi, F., Gotti, E., Inrona, M., Todeschini, M., Cavinato, R.A., Capelli, C., Rambaldi, A., Cassis, P., and Rizzo, P. (2013). Mesenchymal stromal cells and kidney transplantation: pretransplant infusion protects from graft dysfunction while fostering immunoregulation. *Transplant International* 26, 867-878.

- Peschon, J.J., Morrissey, P.J., Grabstein, K.H., Ramsdell, F.J., Maraskovsky, E., Gliniak, B.C., Park, L.S., Ziegler, S.F., Williams, D.E., and Ware, C.B. (1994). Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice. *The Journal of experimental medicine* 180, 1955-1960.
- Prigione, I., Benvenuto, F., Bocca, P., Battistini, L., Uccelli, A., and Pistoia, V. (2009). Reciprocal interactions between human mesenchymal stem cells and  $\gamma\delta$  T cells or invariant natural killer T cells. *Stem cells* 27, 693-702.
- Quaedackers, M.E., Baan, C.C., Weimar, W., and Hoogduijn, M.J. (2009). Cell contact interaction between adipose-derived stromal cells and allo-activated T lymphocytes. *European Journal of Immunology* 39, 3436-3446.
- Ra, J.C., Shin, I.S., Kim, S.H., Kang, S.K., Kang, B.C., Lee, H.Y., Kim, Y.J., Jo, J.Y., Yoon, E.J., and Choi, H.J. (2011). Safety of intravenous infusion of human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells in animals and humans. *Stem cells and development* 20, 1297-1308.
- Raffaghello, L., Bianchi, G., Bertolotto, M., Montecucco, F., Busca, A., Dallegri, F., Ottonello, L., and Pistoia, V. (2008). Human mesenchymal stem cells inhibit neutrophil apoptosis: a model for neutrophil preservation in the bone marrow niche. *Stem cells* 26, 151-162.
- Reinders, M.E., de Fijter, J.W., Roelofs, H., Bajema, I.M., de Vries, D.K., Schaapherder, A.F., Claas, F.H., van Miert, P.P., Roelen, D.L., and van Kooten, C. (2013). Autologous bone marrow-derived mesenchymal stromal cells for the treatment of allograft rejection after renal transplantation: results of a phase I study. *Stem cells translational medicine* 2, 107-111.
- Ren, G., Su, J., Zhang, L., Zhao, X., Ling, W., L'huillie, A., Zhang, J., Lu, Y., Roberts, A.I., and Ji, W. (2009). Species Variation in the Mechanisms of Mesenchymal Stem Cell-Mediated Immunosuppression. *Stem cells* 27, 1954-1962.
- Ren, G., Zhao, X., Zhang, L., Zhang, J., L'Huillier, A., Ling, W., Roberts, A.I., Le, A.D., Shi, S., Shao, C., and Shi, Y. (2010). Inflammatory cytokine-induced intercellular adhesion molecule-1 and vascular cell adhesion molecule-1 in mesenchymal stem cells are critical for immunosuppression. *Journal of Immunology* 184, 2321-2328.
- Sabers, C.J., Martin, M.M., Brunn, G.J., Williams, J.M., Dumont, F.J., Wiederrecht, G., and Abraham, R.T. (1995). Isolation of a protein target of the FKBP12-rapamycin complex in mammalian cells. *Journal of Biological Chemistry* 270, 815-822.

- Sato, K., Ozaki, K., Oh, I., Meguro, A., Hatanaka, K., Nagai, T., Muroi, K., and Ozawa, K. (2007). Nitric oxide plays a critical role in suppression of T-cell proliferation by mesenchymal stem cells. *Blood* 109, 228-234.
- Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., and Nanan, R. (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *The Journal of experimental medicine* 203, 1693-1700.
- Sehgal, S., Baker, H., and Vézina, C. (1975). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. II. Fermentation, isolation and characterization. *The Journal of antibiotics* 28, 727-732.
- Selmani, Z., Naji, A., Zidi, I., Favier, B., Gaiffe, E., Obert, L., Borg, C., Saas, P., Tiberghien, P., and Rouas-Freiss, N. (2008). Human leukocyte antigen-G5 secretion by human mesenchymal stem cells is required to suppress T lymphocyte and natural killer function and to induce CD4<sup>+</sup> CD25<sup>high</sup>FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells. *Stem cells* 26, 212-222.
- Sheng, H., Wang, Y., Jin, Y., Zhang, Q., Zhang, Y., Wang, L., Shen, B., Yin, S., Liu, W., and Cui, L. (2008). A critical role of IFN $\gamma$  in priming MSC-mediated suppression of T cell proliferation through up-regulation of B7-H1. *Cell research* 18, 846-857.
- Shi, D., Liao, L., Zhang, B., Liu, R., Dou, X., Li, J., Zhu, X., Yu, L., Chen, D., and Zhao, R.C. (2011). Human adipose tissue – derived mesenchymal stem cells facilitate the immunosuppressive effect of cyclosporin A on T lymphocytes through Jagged-1–mediated inhibition of NF- $\kappa$ B signaling. *Experimental hematology* 39, 214-224. e211.
- Schmalzer, M., Broggi, M.A., Lagarde, N., Stöcklin, B.F., King, C.G., Finke, D., and Rossi, S.W. (2015). IL-7R signaling in regulatory T cells maintains peripheral and allograft tolerance in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112, 13330-13335.
- Simonetta, F., Chiali, A., Cordier, C., Urrutia, A., Girault, I., Bloquet, S., Tanchot, C., and Bourgeois, C. (2010). Increased CD127 expression on activated FOXP3<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> regulatory T cells. *Eur J Immunol* 40, 2528-2538.
- Singh, K., Sun, S., and Vezina, C. (1979). Rapamycin (AY-22,989), a new antifungal antibiotic. IV. Mechanism of action. *The Journal of antibiotics* 32, 630-645.
- Sinha, M.L., Fry, T.J., Fowler, D.H., Miller, G., and Mackall, C.L. (2002). Interleukin 7 worsens graft-versus-host disease. *Blood* 100, 2642-2649.

- Son, Y., Ito, T., Ozaki, Y., Tanijiri, T., Yokoi, T., Nakamura, K., Takebayashi, M., Amakawa, R., and Fukuhara, S. (2006). Prostaglandin E2 is a negative regulator on human plasmacytoid dendritic cells. *Immunology* *119*, 36-42.
- Spaggiari, G.M., Capobianco, A., Abdelrazik, H., Becchetti, F., Mingari, M.C., and Moretta, L. (2008). Mesenchymal stem cells inhibit natural killer-cell proliferation, cytotoxicity, and cytokine production: role of indoleamine 2, 3-dioxygenase and prostaglandin E2. *Blood* *111*, 1327-1333.
- Stagg, J., Pommey, S., Eliopoulos, N., and Galipeau, J. (2006). Interferon-gamma-stimulated marrow stromal cells: a new type of nonhematopoietic antigen-presenting cell. *Blood* *107*, 2570-2577.
- Survase, S.A., Kagliwal, L.D., Annapure, U.S., and Singhal, R.S. (2011). Cyclosporin A--a review on fermentative production, downstream processing and pharmacological applications. *Biotechnology advances* *29*, 418-435.
- Svobodova, E., Krulova, M., Zajicova, A., Pokorna, K., Prochazkova, J., Trosan, P., and Holan, V. (2011). The role of mouse mesenchymal stem cells in differentiation of naive T-cells into anti-inflammatory regulatory T-cell or proinflammatory helper T-cell 17 population. *Stem cells and development* *21*, 901-910.
- Taha, M.F., and Hedayati, V. (2010). Isolation, identification and multipotential differentiation of mouse adipose tissue-derived stem cells. *Tissue and Cell* *42*, 211-216.
- Thornton, J.W. (2001). Evolution of vertebrate steroid receptors from an ancestral estrogen receptor by ligand exploitation and serial genome expansions. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *98*, 5671-5676.
- Ungerer, C., Quade-Lyssy, P., Radeke, H.H., Henschler, R., Königs, C., Köhl, U., Seifried, E., and Schüttrumpf, J. (2013). Galectin-9 is a suppressor of T and B cells and predicts the immune modulatory potential of mesenchymal stromal cell preparations. *Stem cells and development* *23*, 755-766.
- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Atkins, C.J., Locksley, R.M., and Stockinger, B. (2006). TGF $\beta$  in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* *24*, 179-189.
- Wan, C.-D., Cheng, R., Wang, H.-B., and Liu, T. (2008). Immunomodulatory effects of mesenchymal stem cells derived from adipose tissues in a rat orthotopic liver transplantation model. *Hepatobiliary and Pancreatic Diseases International* *7*, 29-33.



- Wang, H., Pang, B., Li, Y., Zhu, D., Pang, T., and Liu, Y. (2012). Dexamethasone has variable effects on mesenchymal stromal cells. *Cytotherapy* 14, 423-430.
- Wang, W.-B., Yen, M.-L., Liu, K.-J., Hsu, P.-J., Lin, M.-H., Chen, P.-M., Sudhir, P.-R., Chen, C.-H., Chen, C.-H., and Sytwu, H.-K. (2015). Interleukin-25 Mediates Transcriptional Control of PD-L1 via STAT3 in Multipotent Human Mesenchymal Stromal Cells (hMSCs) to Suppress Th17 Responses. *Stem cell reports* 5, 392-404.
- Waterman, R.S., Tomchuck, S.L., Henkle, S.L., and Betancourt, A.M. (2010). A new mesenchymal stem cell (MSC) paradigm: polarization into a pro-inflammatory MSC1 or an Immunosuppressive MSC2 phenotype. *PLoS One* 5, e10088.
- Wishart, D.S., Knox, C., Guo, A.C., Shrivastava, S., Hassanali, M., Stothard, P., Chang, Z., and Woolsey, J. (2006). DrugBank: a comprehensive resource for in silico drug discovery and exploration. *Nucleic acids research* 34, D668-D672.
- Xie, Q.W., Whisnant, R., and Nathan, C. (1993). Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *The Journal of experimental medicine* 177, 1779-1784.
- Yang, Z.X., Han, Z.-B., Ji, Y.R., Wang, Y.W., Liang, L., Chi, Y., Yang, S.G., Li, L.N., Luo, W.F., and Li, J.P. (2013). CD106 identifies a subpopulation of mesenchymal stem cells with unique immunomodulatory properties. *PLoS One* 8, e59354.
- Yu, Q., Erman, B., Park, J.-H., Feigenbaum, L., and Singer, A. (2004). IL-7 receptor signals inhibit expression of transcription factors TCF-1, LEF-1, and ROR $\gamma$ t impact on thymocyte development. *The Journal of experimental medicine* 200, 797-803.
- Zhang, B., Liu, R., Shi, D., Liu, X., Chen, Y., Dou, X., Zhu, X., Lu, C., Liang, W., and Liao, L. (2009). Mesenchymal stem cells induce mature dendritic cells into a novel Jagged-2–dependent regulatory dendritic cell population. *Blood* 113, 46-57.
- Zhang, W., Qin, C., and Zhou, Z. (2007). Mesenchymal stem cells modulate immune responses combined with cyclosporine in a rat renal transplantation model. *Transplantation proceedings (Elsevier)*, 3404-3408.
- Zhang, Y., Zhou, S., Wavreille, A.-S., DeWille, J., and Pei, D. (2008). Cyclic peptidyl inhibitors of Grb2 and tensin SH2 domains identified from combinatorial libraries. *Journal of combinatorial chemistry* 10, 247-255.
- Zhao, Z.-G., Xu, W., Sun, L., You, Y., Li, F., Li, Q.-B., and Zou, P. (2012). Immunomodulatory function of regulatory dendritic cells induced by mesenchymal stem cells. *Immunological investigations* 41, 183-198.

## Přílohy

Tabulka 1 (přílohy) Přehled vlivu imunosupresivních látek na myší mezenchymální kmenové buňky (MSC). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). 0 žádný vliv, + pozitivní, - negativní vliv imunosupresivní látky. ↑ Zvýšení exprese. ↓ Snížení exprese. (Změny v expresi IL-7 + / - v závislosti na konkrétní situaci: zvýšení exprese IL-7 + v případě inhibice apoptózy a obnovy krvetvorby po transplantaci hematopoetických kmenových buněk, - v případě GvHD a vice versa.)

Myší MSC	CsA	MMF	Rapa	Dex	Pre
Diferenciace	0	0	0	0	0
Apoptóza	0	0	0	0	0
Metabolická aktivita	0	↓ - (5 µg/ml)	↓ -	↑ + (5 µg/ml) (IFN-γ)	↑ + (5 µg/ml) (IFN-γ)
HGF	0	0	0	0	0
FGF	0	0	0	0	0
Fas	0	0	0	0	0
TGFβ	0	0	0	0	0
NO	0	0	0	↓ -	↓ -
ICAM-1	0	0	0	0	0
VCAM-1	0	↓ - (5 µg/ml)	↓ - (5 µg/ml)	↓ -	↓ -
PD-L1	0	0	0	0	0
IL-6	0	0	0	↓ -	↓ - (5 µg/ml)
IL-7	0	↑	↑(0,5 µg/ml)	↑	↑(0,05 µg/ml)
IL-7 + IFN-γ	↑	0	↑	↓(0,05 µg/ml)	↑(5 µg/ml)

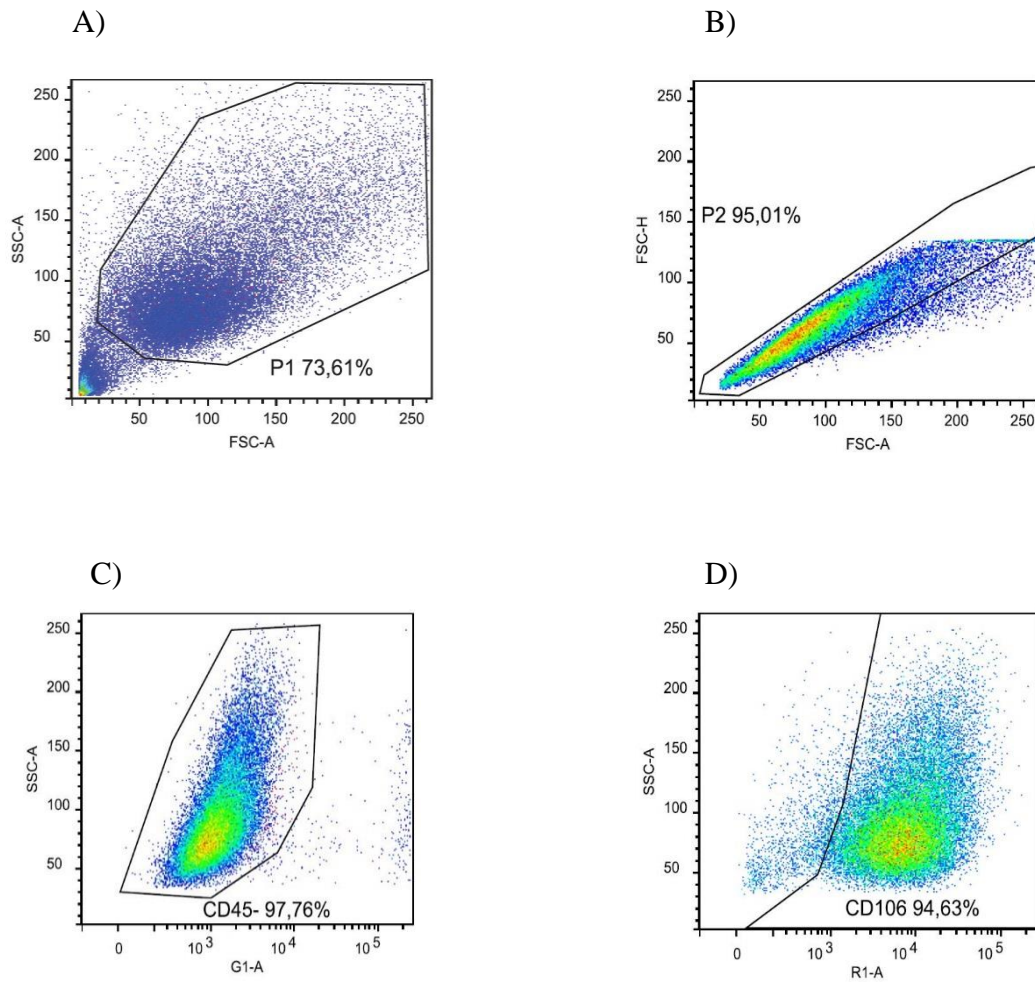
Tabulka 2 (přílohy) Přehled vlivu imunosupresivních látek na lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z tukové tkáně (hAT MSC). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). 0 žádný vliv, + pozitivní, - negativní vliv imunosupresivní látky. ↑ Zvýšení exprese. ↓ Snížení exprese. (mírně ~ statisticky nesignifikantně)

hAT MSC	CsA	MMF	Rapa	Dex	Pre
Diferenciace	0	0	↓ - (osteo)	0	0
Apoptóza	0	0	0	0	0
Metabolická aktivita	+ (mírně ↑)	0	+ (mírně ↑)	0	0
TGFβ	0	0	+ (mírně ↑)	0	+ (mírně ↑)
TSG-6	↑ +	↑ +	0	0	0
Fas-L	0	0	0	0	0
VCAM-1	0	0	0	↓ -	↓ -
PD-L1	↑ +	0	0	0	0
IL-6	0	0	0	↓ -	0
IL-7	0	0	0	0	0

Tabulka 3 (přílohy) Přehled vlivu imunosupresivních látek na lidské mezenchymální kmenové buňky izolované z kostní dřeně (hBM MSC). Cyklosporin A (CsA), mykofenolát mofetil (MMF), rapamycin (Rapa), dexametazon (Dex), prednizon (Pre). 0 žádný vliv, + pozitivní, - negativní vliv imunosupresivní látky. ↑ Zvýšení exprese. ↓ Snížení exprese. (mírně ~ statisticky nesignifikantně)

hBM MSC	CsA	MMF	Rapa	Dex	Pre
Diferenciace	0	0	0	0	0
Apoptóza	0	0	0	↓ +	0
Metabolická aktivita	+ (mírně ↑)	+ (mírně ↑)	0	0	0
TGFβ	0	0	+ (mírně ↑)	0	- (mírně ↓)
TSG-6	↑ +	↑ +	0	0	0
Fas-L	0	0	0	↑ +	↑ +
VCAM-1	0	0	0	↓ -	↓ -
PD-L1	0	0	0	0	0
IL-6	0	0	0	↓ -	0
IL-7	0	0	0	0	0

## Gatovací strategie



Obrázek 1 (přílohy) Gatovací strategie MSC. Buňky A) singlety B) CD45 negativní C) populace exprimující testovaný znak, např. CD106 (VCAM-1) D).